



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias Químico-Biológicas

**ENFOQUE BASADO EN QUÍMICA VERDE PARA LA SÍNTESIS DE  
NPs-Au, UTILIZANDO EXTRACTOS DE *Moringa oleifera (moringa)*,  
*Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) Y *Kalanchoe  
daigremontiana* (aranto), PARA DETERMINAR SU ACTIVIDAD  
PROAPOPTÓTICA Y ANTIPIROLIFERATIVA EN LÍNEAS  
CELULARES DE LEUCEMIA TIPO T Y TIPO B.**

**TESIS DOCTORAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta**  
Daniela Alejandra Torres Ortiz

**Dirigida por:**  
Dra. Guadalupe García Alcocer

**Codirigida por:**  
Dra. Miriam Rocío Estévez González

Centro Universitario, Querétaro, Qro  
Mayo 2024  
México

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias Químico-Biológicas

ENFOQUE BASADO EN QUÍMICA VERDE PARA LA SÍNTESIS DE NPs-Au, UTILIZANDO EXTRACTOS DE *Moringa oleifera* (*moringa*), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) Y *Kalanchoe daigremontiana* (aranto), PARA DETERMINAR SU ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA Y ANTIPIROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA TIPO T Y TIPO B.

**TESIS DOCTORAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

Daniela Alejandra Torres Ortiz

**Dirigida por:**

Dra. Guadalupe García Alcocer

**Codirigida por:**

Dra. Miriam Rocío Estévez González

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Presidente

Dra. Miriam Rocío Estevéz González  
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Suplente

Dr. Ángel Ramón Hernández  
Suplente

Dr. José Santos Cruz  
Director de la Facultad de Química

Dr. Manuel Toledano Ayala  
Secretario de Investigación  
Innovación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro  
Mayo 2024  
México

## RESUMEN

La nanotecnología ha cobrado gran importancia como herramienta para el diseño de nanomedicamentos, resultando en el registro de más de 60 nanopartículas (NPs) para el tratamiento contra el cáncer. Existen diversos métodos para la obtención de NPs, sin embargo, la mayoría resultan tóxicos para el medio ambiente y el ser humano. Por tal motivo, se ha desarrollado como alternativa segura la síntesis verde. En dicho método se usan extractos de plantas como medio de síntesis que al mismo tiempo sirve para su funcionalización, debido a la unión de moléculas o metabolitos con actividad biológica en la superficie de las nanopartículas, además de disminuir el impacto ambiental derivado de los desechos de la reacción. Los extractos vegetales se han caracterizado por ser una amplia fuente de compuestos con actividad biológica, como es la actividad anticancerígena, incluyendo leucemia, que, a nivel mundial representa el 38% de los casos de cáncer pediátrico. La tasa de sobrevida de 5 años al tratamiento en pacientes pediátricos a nivel mundial es del 90%; sin embargo, los pacientes pediátricos mexicanos tienen una sobrevida de 5 años del 71.6% para. A nivel mundial, México ocupa el 1<sup>er</sup> lugar en las estadísticas de incidencia y mortalidad por Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL por sus siglas en inglés) en pacientes pediátricos, por lo que constantemente se buscan tratamientos para dicha enfermedad. En este trabajo se hizo uso de la química verde como herramienta para la obtención de nanopartículas de oro (NPs-Au) utilizando extractos de diversas plantas con actividad anticancerígena (*Moringa oleifera*, *Amphipterygium adstringens* y *Kalanchoe daigremontiana*). Los métodos de extracción que se utilizaron fueron homogeneizado ultrasónico y ondas de choque. Con el objetivo de determinar las características fisicoquímicas de las NPs-Au obtenidas por síntesis verde, se utilizaron técnicas microscópicas y espectroscópicas, para definir la morfología, el tamaño de partícula y la dispersión, así como técnicas electroquímicas, para determinar parámetros como la actividad antioxidante y el potencial Z. También, se determinó la viabilidad celular (MTT) de las NPs-Au en líneas celulares de leucemia tipo T (Jurkat). En el caso de las tres plantas los extractos obtenidos por ondas de choque resultaron más eficientes en la síntesis de NPs-Au con tamaño y forma controlada. Las NPs-Au de *Amphipterygium adstringens* AuNPs@SWCD presentaron disminución en la actividad antiproliferativa hasta en un 50 %. La química verde es una herramienta funcional para la síntesis de NPs-Au, que, controlando el tiempo y temperatura de síntesis pueden resultar en el tamaño y forma deseada.

**Palabras Clave:** Leucemia; NPs-Au; NADES; Química Verde; actividad proapoptótica, actividad antiproliferativa.

## ABSTRACT

Nanotechnology has gained great importance as a tool for the design of nanomedicines, resulting in the registration of more than 60 nanoparticles (NPs) for cancer treatment. There are various methods to obtain NPs, however, most are toxic to the environment and humans. For this reason, green synthesis has been developed as a safe alternative. In this method, plant extracts are used as a means of synthesis that at the same time serves for their functionalization, due to the binding of molecules or metabolites with biological activity on the surface of the nanoparticles, in addition to reducing the environmental impact derived from waste. Plant extracts have been characterized as a wide source of compounds with biological activity, such as anticancer activity, including leukemia, which, worldwide, represents 38% of pediatric cancer cases. The 5-year survival rate after treatment in pediatric patients worldwide is 90%; However, Mexican pediatric patients have a 5-year survival rate of 71.6%. Worldwide, Mexico ranks 1st in incidence and mortality statistics for Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in pediatric patients, which is why treatments for this disease are constantly being sought. In this work, green chemistry was used as a tool to obtain gold nanoparticles (NPs-Au) using extracts from various plants with anticancer activity (*Moringa oleifera*, *Amphipterygium adstringens*, and *Kalanchoe daigremontiana*). The extraction methods used were ultrasonic homogenization and shock waves. To determine the physicochemical characteristics of the Au-NPs obtained by green synthesis, microscopic and spectroscopic techniques were used to define the morphology, particle size, and dispersion, as well as electrochemical techniques to determine parameters such as antioxidant activity, and the Z potential. Also, the cell viability (MTT) of the Au-NPs was determined in type T leukemia cell lines (Jurkat). In the case of the three plants, the extracts obtained by shock waves were more efficient in the synthesis of NPs-Au with controlled size and shape. The AuNPs-Au from *Amphipterygium adstringens* AuNPs@SWCD showed a decrease in antiproliferative activity by up to 50%. Green chemistry is a functional tool for the synthesis of Au-NPs, which, by controlling the synthesis time and temperature, can result in the desired size and shape.

**Key words:** Leukemia; NPs-Au; NADES; Green chemistry; proapoptotic activity, antiproliferative activity.

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Daniela Alejandra Torres Ortiz".

DANIELA ALEJANDRA TORRES ORTIZ

ÍNDICE	No. de página
<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>52</b>
<b>2.1. CÁNCER.....</b>	<b>52</b>
2.1.1. <i>Epidemiología .....</i>	52
2.1.2. <i>Causas.....</i>	56
2.1.3. <i>Factores de riesgo .....</i>	56
2.1.4. <i>Diagnóstico .....</i>	57
2.1.5. <i>Tipos de cáncer .....</i>	57
<b>2.2. LEUCEMIA .....</b>	<b>58</b>
2.2.1. <i>Leucemia Aguda .....</i>	59
2.2.2. <i>Leucemia Crónica .....</i>	61
2.2.3. <i>Factores de Riesgo de la Leucemia .....</i>	62
2.2.4. <i>Diagnóstico .....</i>	62
2.2.5. <i>Tratamiento.....</i>	62
<b>2.3. NANOTECNOLOGÍA .....</b>	<b>64</b>
2.3.1. <i>Nanomedicamentos para tratamiento del cáncer .....</i>	64
2.3.2. <i>Nanopartículas.....</i>	65
2.3.3. <i>Nanopartículas de oro.....</i>	66
2.3.4. <i>Síntesis de nanopartículas.....</i>	67
<b>2.4. NANOPARTÍCULAS CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA .....</b>	<b>68</b>
<b>2.5. QUÍMICA VERDE .....</b>	<b>68</b>
<i>Métodos de extracción verdes .....</i>	69
2.5.1. <i>Solventes verdes .....</i>	70
2.5.2. <i>Síntesis verde de nanopartículas.....</i>	71
2.5.2.1. <i>Nanopartículas biosintéticas con actividad anticancerígena .....</i>	72
<b>2.6. EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL .....</b>	<b>73</b>
2.6.1. <i>Género Amphipterygium .....</i>	74
2.6.1.1. <i>Amphipterygium adstringens .....</i>	74
2.6.2. <i>Género Moringaceae .....</i>	76
2.6.2.1. <i>Moringa oleifera .....</i>	76
a) <i>Actividad biológica .....</i>	77
b) <i>Actividad antitumoral .....</i>	77
2.6.3. <i>Género Kalanchoe .....</i>	78
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>80</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>82</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>82</b>
<b>5.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>82</b>
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>84</b>
<b>6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>84</b>
<b>6.2. EXTRACCIÓN VERDE .....</b>	<b>85</b>
6.2.1. <i>Ondas de choque.....</i>	85
6.2.2. <i>Homogeneizado ultrasónico .....</i>	86
6.2.3. <i>Solventes eutécticos profundos naturales .....</i>	86
<b>6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS .....</b>	<b>86</b>

6.3.1.	<i>Análisis espectroscópico</i> .....	86
6.3.2.	<i>Cuantificación de flavonoides totales</i> .....	87
6.3.3.	<i>Cuantificación de compuestos fenólicos totales</i> .....	87
6.3.4.	<i>Capacidad antioxidante de los extractos</i> .....	87
6.4.	<i>Optimización de los parámetros de extracción</i> .....	88
6.5.	<b>SÍNTESIS VERDE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	89
6.6.	<b>CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	90
6.6.1.	<i>Microscopía de barrido de alta resolución</i> .....	90
6.6.2.	<i>Dispersión de luz dinámica</i> .....	90
6.6.3.	<i>Carga eléctrica</i> .....	90
6.6.4.	<i>Análisis espectroscópico</i> .....	90
6.6.5.	<i>Análisis termogravimétrico</i> .....	91
6.7.	<b>ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	91
6.7.1.	<i>Viabilidad celular de las líneas celulares de leucemia</i> .....	91
6.8.	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	92
7.1.	<b>Caracterización de los extractos</b> .....	93
7.1.1.	<i>Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales</i> .....	93
7.1.2.	<i>Especroscopía UV-Vis</i> .....	95
7.1.3.	<i>Tamaño y forma de partícula</i> .....	99
7.1.4.	<i>Potencial Zeta</i> .....	110
7.1.5.	<i>Especroscopía FT-IR</i> .....	111
7.1.6.	<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	116
7.2.7.	<i>Difracción de Rayos X (DRX)</i> .....	118
8.	<b>REFERENCIAS</b> .....	124

## ÍNDICE DE TABLAS

	Tabla	No. pag
1.	Prevalencia de cáncer en pacientes pediátricos a nivel mundial.....	54
2.	Anormalidades genéticas más frecuentes detectadas por citogenética y biología molecular en pacientes pediátricos mexicanos con leucemia linfocítica aguda.....	55
3.	Factores de riesgo de cáncer.....	57
4.	NADES propuestos para preparación de extractos.....	86
5.	Capacidad antioxidante de las muestras de los extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Figura	No. pag
--	--------	------------

1. Gráfico de la distribución de los tipos de cáncer por grupos de edad en pacientes pediátricos y adolescentes.....	7
2. Incidencia mundial de cáncer.....	9
3. Esquema del proceso de cavitación.....	22
4. Estructura del ácido 6-pentadecil salicílico.....	28
5. Estructura de la bufalina.....	31
6. Análisis UV-Vis de extractos de <i>A. adstringens</i> y de NPs-Au sintetizadas con los diferentes extractos <i>A. adstringens</i> .....	97
7. Espectros UV-Vis de NPs-Au sintetizadas a diferentes parámetros.....	98
8. Espéctros UV-Vis de las NPs-Au de los extractos de moringa, alternando las condiciones del medio.....	99
9. Micrografías de las NPs-Au, sintetizadas con diversos extractos de <i>A. adstringens</i> .	
10. Micrografías SEM de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de <i>Amphiptygium adstringens</i> .....	102
11. Micrografías de las NPs-Au sintetizadas con los extractos de <i>K. daigremontiana</i> .....	103
12. Micrografías de las NPs-Au sintetizadas con el extracto de <i>M. oleifera</i> , utilizando diversas técnicas de síntesis.....	104
13. Histogramas de DLS de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de <i>Amphiptygium adstringens</i> .....	106
14. Histograma DLS de las NPs-Au sintetizadas con los extractos de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .....	107
15. Histogramas de DLS de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .....	108
16. Histogramas de las NPs-Au obtenidas con el extracto de <i>Moringa oleifera</i> asistido por ondas de choque con delay constante.....	109
17. Espectros de FTIR de <i>A. adstringens</i> .....	113
18. Espectros FTIR de las NPs-Au sintetizadas con el extracto de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .....	114
19. Espectros de infrarrojo de los extractos de <i>Moringa oleifera</i> .....	115
20. Análisis termogravimétrico de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de <i>Amphiptygium adstringens</i> .....	116
21. Termogramas de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .....	117
22. Patrones de difracción de rayos X de <i>A. adstringens</i> .....	118
23. Difractograma de NPs-Au sintetizadas con el extracto SPea de <i>K. daigremontiana</i> .....	119
24. Curva dosis-respuesta de los extractos y de las NPs-Au obtenidas con los extractos de <i>a. adstringens</i> .....	121
25. Efecto citotóxico e los extractos y de las NPs-Au obtenidas con los extractos de <i>a. adstringens</i> .....	122

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha sido un campo interdisciplinario prometedor para el desarrollo de fármacos, debido a las propiedades físicas, químicas y eléctricas de las nanoestructuras. Las NP-Au han demostrado ser una opción biocompatible para ser utilizadas como acarreadores de fármacos, agentes de imagenología y para terapia fototérmica (López et al., 2015). Sin embargo, en la síntesis química y física de las nanopartículas (NPs), se utilizan agentes estabilizantes y reductores que resultan tóxicos para la salud, además de que generan desechos que contaminan el medio ambiente. Por lo anterior, desde hace tres décadas se ha propuesto el uso de tecnologías que sean menos agresivas con el medio ambiente y que puedan obtener materiales que sean seguros para su uso en seres humanos. En la década de los 90, Paul Anastas describió que. *“La química verde se enfoca en el uso, diseño y manufactura de procesos químicos que tengan poco o nulo potencial de contaminación o riesgo ambiental y que sean tanto económica y tecnológicamente viables”* (Anastas, Williamson, 1994).

La química verde plantea el uso de técnicas de síntesis, y uso de procesos químicos que reduzcan el daño al medio ambiente, así como a los seres humanos. La síntesis verde, hace uso de los extractos de plantas con bioactividad comprobada para sintetizar y funcionalizar NPs (Zhou et al., 2014). Los extractos de diversas plantas medicinales han demostrado tener actividad anticancerígena, de los cuales, el extracto metanólico del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), que es una planta endémica de México, tiene actividad antiproliferativa y proapoptótica en líneas celulares de leucemia linfoblástica tipo T (Rodriguez-Garcia et al., 2015). Por otro lado, los extractos de Moringa (*Moringa oleifera*), que es una planta endémica de la India, han demostrado tener actividad inhibitoria de la síntesis de integrinas, así como inducir la actividad de la caspasa-3, lo que resulta en apoptosis celular (Tiloke et al., 2018). Además, estudios fitoquímicos del Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*) han resultado en la identificación de bufadienólidos, los cuales han

reportado tener actividad antineoplásica en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda tipo T (García-Pérez et al., 2018).

Los métodos de extracción, también son considerados verdes cuando el tiempo se reduce y cuando consumen menos energía en comparación con los métodos tradicionales (Chemat et al., 2019). Actualmente, se utilizan métodos de extracción verde asistidos por ultrasonido y recientemente, por ondas de choque. Adicionalmente, la extracción verde, involucra el uso de solventes que sean biodegradables, reutilizables y generen poca o nula cantidad de desechos para su obtención (Chemat et al., 2019). El agua, el etanol y los solventes eutécticos profundos naturales (NADES, por sus siglas en inglés), son considerados como solventes verdes pues no ponen en riesgo al medio ambiente o al ser humano. Los NADES son sistemas eutécticos que se producen de manera natural en diversos organismos y que solubilizan diversos compuestos gracias a la interacción entre compuestos donadores de puentes de hidrógeno (HBD) y aceptores de puentes de hidrógenos (HBA), lo que genera una amplia red de puentes de hidrógeno (Abbott et al., 2003; Choi et al., 2011; Clarke et al., 2018).

La leucemia representa aproximadamente el 80% de los casos de cáncer pediátrico a nivel mundial, afecta a los monocitos y los linfocitos (Bruce Alberts et al., 2015). La leucemia se clasifica según el tipo de células que afecte, es decir, cuando afecta a linfocitos T, será leucemia linfoblástica tipo T, cuando las células afectadas son los linfocitos B, será leucemia linfoblástica tipo B. Además, a su vez, estas dos se subdividen en crónica y en aguda, dependiendo del patrón clínico que presenten. La leucemia que afecta con mayor frecuencia a los pacientes pediátricos es la leucemia linfocítica aguda (ALL por sus siglas en inglés). Los pacientes pediátricos con ALL, presentan un pico de expresión de la enfermedad entre los 1– 4 años, siendo mayor el porcentaje en niños (55%) que en niñas (45%) (Kato y Manabe, 2018). A nivel mundial la sobrevida a 5 años posterior a los protocolos de tratamiento para ALL, es del 90%, mientras que en pacientes pediátricos mexicanos es del 76.1% (Bekker-Méndez et al., 2014).

Tomando en consideración lo anterior, en este proyecto se propone el uso de solventes, métodos de extracción y síntesis que cumplan con los principios de la

química verde. Puntualmente, para la obtención de los extractos se utilizarán 3 plantas, de las cuales se ha demostrado previamente su actividad antiproliferativa y proapoptótica en líneas celulares de leucemia. Las plantas que se utilizarán fueron *Amphipterygium adstringens*, *Kalanchoe daigremontiana* y *Moringa oleifera*. Los solventes que se usaron fueron: agua, etanol y solventes eutécticos profundos naturales (NADES), utilizando los métodos de extracción de homogeneizado ultrasónico y ondas de choque. Adicionalmente, para la síntesis de las NPs-Au se utilizaron los extractos obtenidos previamente como medio sintético.

Para determinar las condiciones óptimas de extracción, los extractos se analizaron por medio de técnicas espectrofotométricas ultravioleta visible e infrarrojo con transformada de Fourier (UVvis y FTIR). También, se comparó la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante por métodos colorimétricos (DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo) y electroquímicos (CUPRAC: capacidad antioxidante reductora del ion cúprico) de los extractos. La finalidad de elegir el extracto con la capacidad antioxidante adecuada para llevar a cabo la reducción por medio de síntesis verde del precursor metálico para la obtención de las NPs-Au. Los extractos que cumplieron con la capacidad antioxidante adecuada fueron utilizados para llevar la síntesis de las nanopartículas de oro. Una vez obtenidas las NPs-Au, se determinaron las siguientes características fisicoquímicas: potencial Z, morfología y tamaño (Microscopía electrónica de barrido: SEM, FT-IR, UV-vis, dispersión de luz dinámica: DLS, dispersión de rayos x: DRX). Finalmente, se determinó la actividad antiproliferativa (azul tripano) y proapoptótica (citometría de flujo) de las NPs-Au en líneas celulares de leucemia tipo T (Jurkat).

*“No todos los proyectos van a lograr su objetivo de materias primas o reactivos inocuos, o condiciones o productos benignos, pero al esforzarse por este objetivo necesario y mundial, inclusive estos proyectos, van y de hecho han dado como resultado una química excelente”*

*-Paul Anastas, Green Chemistry, 1996-*

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Cáncer**

La Organización Mundial de la Salud (OMS por sus siglas en español), define que el término de “cáncer” puede ser utilizado de manera indistinta para un grupo de enfermedades, que pueden afectar cualquier parte del organismo, en las cuales se presenta como característica común, la multiplicación descontrolada de células anormales, que se extienden e invaden, propagándose hasta otros órganos del cuerpo que se define como metástasis (Hassanpour y Dehghani, 2017). Se considera que el cáncer es una enfermedad genética, debido a que las células tumorales tienen diversas alteraciones en el DNA, que resultan en alteraciones genéticas y re-arreglos cromosomales (Thun Michael J. et al., 2018). Las alteraciones genéticas pueden derivarse en síndromes cancerígenos hereditarios, lo que ocasiona una múltiple expresión de tumores. En 1971, Al Knudson predijo que es posible heredar una copia mutada del gen supresor de tumores, al tiempo que se pierde la función adecuada de la copia del gen no mutado (Knudson, 1971). Aunque las mutaciones genéticas no son iguales en los diversos tipos de cáncer, la resultante de las mismas es en esencia igual, ya que la mayoría de los tumores presentan crecimiento incontrolado, pérdida de reparación de DNA y pérdida de función de la muerte programada (Cavallo et al., 2011).

#### **2.1.1. Epidemiología**

El cáncer es un padecimiento que va en aumento a nivel mundial. Según la OMS, para el 2030, se registrarán anualmente 20 millones de casos nuevos de cáncer, sin embargo, la misma organización también afirma que, de hacer un diagnóstico oportuno, es posible disminuir la cifra entre un 30% y 50% (Torre et al., 2016). En un panorama mundial del año 2018, se estimó que el continente asiático (60% de la Población mundial) tuvo el 50% de las muertes provocadas por cáncer, al continente europeo le correspondió el 23.4% de casos nuevos de cáncer y el 20.3% de muertes a causa de dicha enfermedad. Con respecto al continente americano (13.3% de la población mundial), hubo 21% de incidencia y 14.4% de la mortalidad (Cronin et al., 2018). Según la OMS, el cáncer es la primera causa de muerte antes de los 70 años en 91 de los 172 países (Siegel et al., 2019).

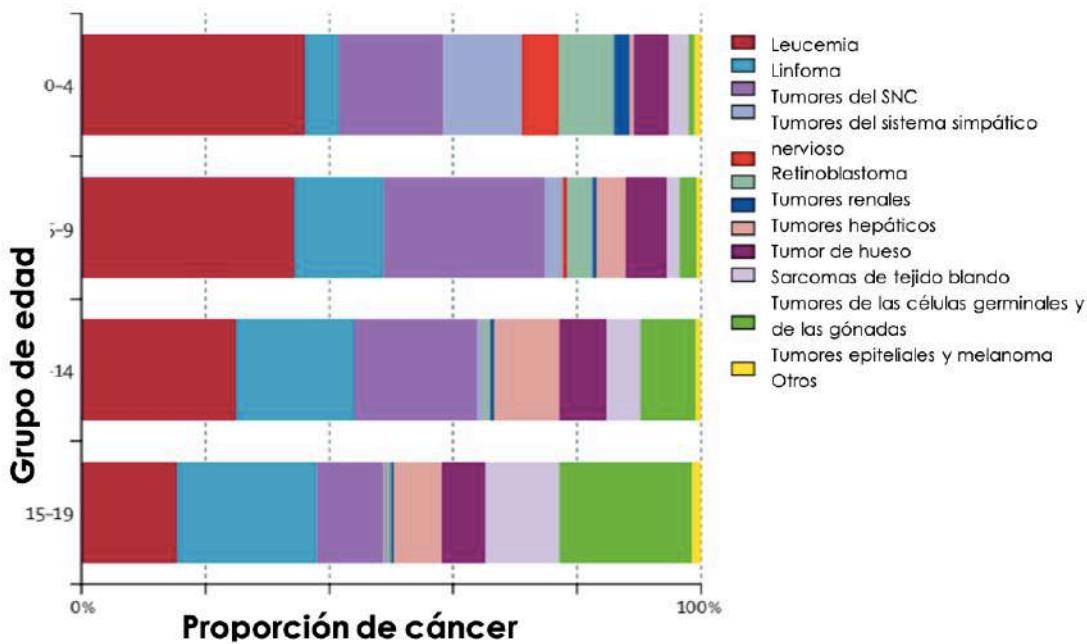
En México, el cáncer ocupa el tercer lugar en los índices de mortalidad, tan solo después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Los tipos de cáncer más comunes entre la población mexicana masculina son los que se enlistan a continuación en orden de importancia: cáncer de próstata, colorrectal, testicular, pulmonar y gástrico. Por otro lado, la prevalencia de cáncer en la población mexicana femenina es la siguiente: mamario, tiroideo, cervicouterino, cuerpo uterino y colorrectal (IARC, 2019). En niños entre 0 y 14 años, los casos de cáncer en general, disminuyeron un 0.8% anualmente en el periodo de 2010 a 2014, sin embargo, la mortalidad fue entre 1.7% y 2.2% en el periodo mencionado (Cronin et al., 2018). El cáncer es la segunda causa de muerte en niños entre 0 y 14 años; la incidencia es tal, que 1 de cada 279 niños, será diagnosticado con cáncer. En la tabla 1, se muestran los tipos de cáncer con mayor prevalencia en pacientes pediátricos (Siegel et al., 2019). Con base en lo reportado por el Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN por sus siglas en inglés) en 2018, de 185 países tomando en cuenta 36 tipos de cáncer, la leucemia ocupa el puesto número 13 en cuanto a incidencia (hombres: 179,518 y mujeres: 129,488) y mortalidad en adultos (hombres: 249,454 y mujeres: 187,579) (Bray et al., 2018). La leucemia representa el 2.6% de todos los casos de cáncer a nivel mundial en adultos, tan solo en 2018, se diagnosticaron 437,033 casos nuevos de leucemia y se produjeron 22, 840 muertes a causa de todos los tipos de leucemia (Bray et al., 2018). En 2019, se han diagnosticado 21, 450 casos nuevos de leucemia de todas las edades, siendo leucemia linfoblástica aguda la que tiene mayor incidencia en pacientes pediátricos (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017).

En la figura 1, se muestra la distribución de los diferentes tipos de cáncer en pacientes pediátricos y adolescentes, siendo la leucemia, el tipo de cáncer con mayor incidencia en pacientes entre 0 y 14 años (Steliarova-Foucher et al., 2017). A nivel mundial, anualmente, se registran 300,000 casos nuevos de cáncer en niños y adolescentes, siendo los tipos más comunes, la leucemia linfoblástica aguda con un índice de supervivencia de 5 años y el cáncer cerebral con índice de supervivencia de un año (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017).

**Tabla 1.** Prevalencia de cáncer en pacientes pediátricos a nivel mundial (Bray et al., 2018).

Tipo de cáncer	Distribución (%)
Niños de 0-14 años	
Leucemia	29
Cáncer de cerebro	26
Sarcomas de tejido suave	6
Neuroblastoma	6
Linfoma non-Hodgkin	5
Tumores renales	5
Linfoma de Hodgkin	3
Adolescentes 15-19 años	
Cáncer de cerebro	21
Leucemia	13
Linfoma de Hodgkin	12
Tumor en células de las gónadas	11
Carcinoma en tiroides	11
Melanoma	4

Estudios inmunogenéticos han demostrado que existe una mayor prevalencia de la expresión del arreglo génico *TCF3-PBX1*, en pacientes pediátricos mexicanos con leucemia a comparación del resto del mundo; cabe mencionar, que dicho arreglo cromosomal tiene un mal pronóstico de recuperación (Bekker-Méndez et al., 2014). En la tabla 2, se pueden apreciar otras anomalías genéticas prevalentes en los pacientes pediátricos mexicanos en comparación con el resto del mundo, explicando la alta tasa de mortalidad de esta población (Jiménez-Morales y Hidalgo-Miranda, 2017). En México de acuerdo con el Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia en las Unidades Médicas Acreditada, se reportó en 2014 que la supervivencia de los pacientes pediátricos con leucemia fue del 56%, a comparación de las estadísticas a nivel mundial en las cuales se registra el 80% de supervivencia (Programa Sectorial de Salud, 2018).



**Figura 1.** Gráfico de la distribución de los tipos de cáncer por grupos de edad en pacientes pediátricos y adolescentes, entre 2001-2010 (Steliarova-Foucher et al., 2017).

Actualmente, los datos derivados del Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes indican que la situación no ha mejorado, debido a que la sobrevida de los pacientes pediátricos (0-9 años) con leucemia es del 57.5%, mientras que, a nivel mundial, la sobrevida ha aumentado hasta el 90% ((Programa Sectorial de Salud, 2018). Específicamente, la sobrevida de 5 años para pacientes con leucemia linfoblástica aguda tipo T (ALL-T) en México, es de 71.6% (Chargoy-Vivaldo et al., 2018).

**Tabla 2.** Anormalidades genéticas más frecuentes detectadas por citogenética y biología molecular en pacientes pediátricos mexicanos con leucemia linfocítica aguda (Jiménez-Morales y Hidalgo-Miranda, 2017).

Linaje	Anormalidades citogenéticas	Genes	Frecuencia %		Pronóstico
			Otras poblaciones (%)	Niños mexicanos (%)	
Células B	Hiperdiploidía		20-30 <sup>7,10,13-15</sup>	22.9 <sup>16</sup> , 8 <sup>+19</sup>	Favorable
	Hipodiploidía		5-6 <sup>7,10,13-15</sup>	0 <sup>+19</sup>	Desfavorable
	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	25 <sup>7,10,13-15</sup>	7.4-14 <sup>16-18</sup>	Favorable
	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A-PBX1</i>	13 <sup>7,10,13-15</sup>	7.1-11.5 <sup>17,18</sup>	Desfavorable
	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	3-5 <sup>7,10,13-15</sup>	2-5 <sup>17,18</sup> , 19 <sup>+19</sup>	Desfavorable
	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	6 <sup>7,10,13-15</sup>	1.4 <sup>18</sup> 11 <sup>+19</sup> , 23 <sup>** 20</sup>	Desfavorable
Células T	9q34	<i>NOTCH1</i>	60 <sup>7,15</sup>	Se desconoce	Desfavorable
	10q24	<i>HOX11</i>	20 <sup>7,15</sup>	Se desconoce	

### 2.1.2. Causas

La OMS a través de la IARC, ha determinado que son tres las principales causas de cáncer a nivel mundial. Se atribuye a la obesidad, infecciones y a la radiación U.V., sobrepeso, consumo de grasas de origen animal y el sedentarismo, son también causas de cáncer (IARC, 2019). Además de lo ya mencionado, hay que tomar en cuenta que el medio ambiente, puede tener compuestos con propiedades carcinogénicas que afecten a las células, a los organelos y al material genético, ocasionando mutaciones que posteriormente se deriven en cáncer (Antwi et al., 2015). Los agentes infecciosos también son importantes causas de cáncer, ya que están involucrados en la degeneración de vías de señalización pro inflamatorias, así como de supervivencia, siendo la causa de entre 10% y 16% de casos de cáncer a nivel mundial (Shurin et al., 2015). El cáncer asociado a infecciones bacterianas es de progreso lento, ya que deben llevarse a cabo varias mutaciones previas al desarrollo de un tumor. Cabe mencionar que no todas las personas infectadas con bacterias asociadas al cáncer, presentarán la enfermedad (Goodman y Gardner, 2018).

### 2.1.3. Factores de riesgo

Siendo el cáncer multifactorial, es difícil definir a una sola variable como factor causal. Sin embargo, es pertinente mencionar que existen diferentes factores que pueden aumentar o disminuir el riesgo de cáncer. Para determinar la asociación entre el cáncer y un factor, es necesario obtener evidencias derivadas de estudios epidemiológicos, así como determinar los mecanismos de acción derivados del potencial factor de riesgo que resulten en cáncer (Programa Sectorial de Salud, 2018). Existen factores de riesgo que pueden ser evitados y otros que no. En la tabla 3, se muestran los tipos de factores de riesgo. El consumo activo de tabaco y alcohol, la exposición a la radiación tanto ionizante como ultravioleta, contaminación, agentes infecciosos, exposición a campos electromagnéticos, así como la dieta y obesidad, son factores de riesgo directamente relacionados con los siguientes tipos de cáncer: pulmón, estómago, esófago, colorrectal, leucemia

mieloide, páncreas, cervicouterino, laringe, hígado y riñón (Thun Michael J. et al., 2018).

**Tabla 3.** Factores de riesgo de cáncer (Programa Sectorial de Salud, 2018).

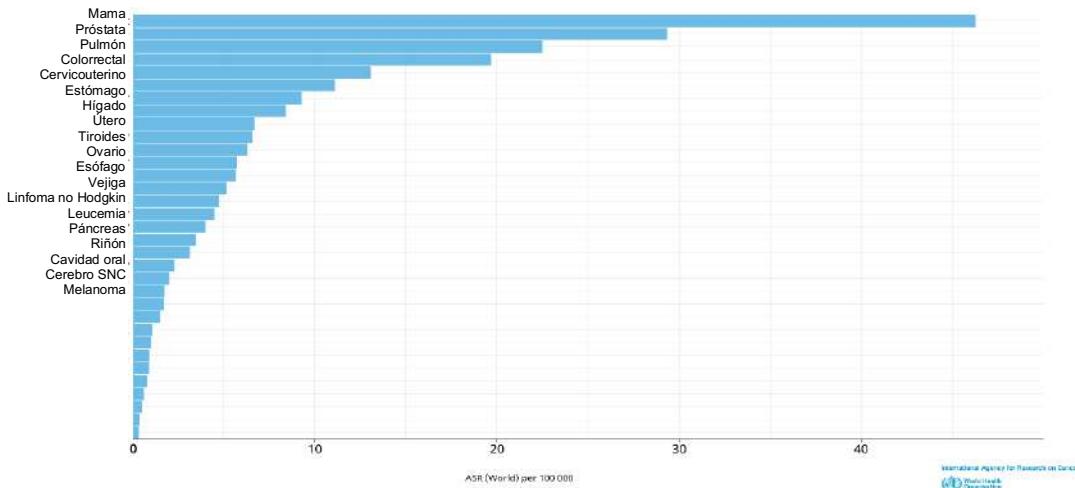
Factores de riesgo que pueden evitarse	Factores de riesgo que no pueden evitarse
Alcohol	Envejecimiento
Dieta	Inflamación crónica
Luz solar/Radiación UV	Inmunosupresión
Obesidad	Gérmenes infecciosos

#### 2.1.4. Diagnóstico

El método para determinar la presencia de cáncer está sujeto al tipo de cáncer. En general, se realizan diversas pruebas confirmatorias de laboratorio, imagenología y biopsia. El resultado normal o anormal de las pruebas de laboratorio, no es una determinante contundente para afirmar o negar la presencia de un tumor cancerígeno. También, es necesario realizar estudios de imagenología como son: tomografía computarizada, exploración nuclear, ecografía, resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones y rayos X. Finalmente, la biopsia, puede ser con aguja, con endoscopio o con cirugía (Programa Sectorial de Salud, 2018).

#### 2.1.5. Tipos de cáncer

El cáncer se clasifica dependiendo del órgano o parte del cuerpo que afecta. El tipo de cáncer que más afecta a la población femenina adulta es el cáncer de mama con una incidencia mundial anual de 46.3% en la población masculina adulta. La figura 3, muestra una tabla de los tipos de cáncer registrados en adultos por la OMS hasta 2018, así como su incidencia (Siegel et al., 2019).



**Figura 2.** Incidencia mundial de cáncer en personas de todo el mundo, de todas las edades y de ambos sexos

## 2.2. Leucemia

La leucemia, es considerada como la proliferación descontrolada de las células precursoras de las células hematopoyéticas. Las células sanguíneas se forman a través de la hematopoyesis, la cual se constituye en dos fases, la primera fase que se da en la etapa embrionaria, en donde se forman los eritrocitos y lo macrófagos, con la finalidad de oxigenar y preservar el organismo. Sin embargo, la célula precursora de esta primera fase no es pluripotente, por lo que no tiene la capacidad de renovarse (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013) La segunda fase, corresponde al proceso definitivo de hematopoyesis en el que participan células madre hematopoyéticas, éstas son multipotentes y están presentes en la médula ósea y en el timo. Las células que constituyen a la línea celular roja de la sangre son los eritrocitos, acarreadores de oxígeno y dióxido de carbono. La línea blanca de la sangre está conformada por leucocitos, que se dividen en tres categorías: granulocitos, monocitos y linfocitos. Los granulocitos se dividen en: neutrófilos: fagocitan microorganismos como bacterias, basófilos: mediadores de la inflamación por la secreción de histamina y eosinófilos: moduladores de las respuestas alérgicas, así como destrucción de parásitos (Hoffman et al., 2018). Por otro lado, los monocitos pueden dar paso a células dendríticas o a macrófagos, los últimos en conjunto con los neutrófilos llevan a cabo la fagocitosis, además, se encargan del reconocimiento y eliminación de células en senescencia, mutadas o dañadas. Las

células dendríticas son presentadoras de antígenos a linfocitos para desencadenar la respuesta inmune (Gribben, 2020) Finalmente, los linfocitos que están involucrados en la respuesta inmune se dividen en dos clases principales que son: a) linfocitos tipo B: que son productores de anticuerpos, b) linfocitos tipo T: que eliminan células infectadas con virus. También están presentes los linfocitos *natural killer* (NK). La diferenciación de los linfocitos T y B, es morfológica y se expresa cuando son expuestos a un antígeno, como consecuencia, éstos maduran y se convierten en células efectoras. Las células efectoras tipo B liberan anticuerpos que son liberados al torrente sanguíneo, mientras que las células efectoras T, liberan citocinas principalmente de manera local (Bruce Alberts et al., 2015). Al tiempo que las células van envejeciendo, el proceso hematopoyético tiende a empezar a fallar por mutaciones, lo que se puede llegar a expresar como una neoplasia. Una característica del envejecimiento de una célula es la disminución de la función, así como de la integridad fisiológica del tejido (Jung, Buisman y Haan, 2016).

Una de las clasificaciones de la leucemia es la linfoblástica, esta depende del tipo de célula precursora que afecta, leucemia linfoblástica tipo B y leucemia linfoblástica tipo T (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017). La leucemia mieloide, forma parte de los 15 tipos de cáncer con mayor incidencia mundial en adultos. Sin embargo, en el cáncer pediátrico, que abarca niños entre 0 y 14 años, la leucemia linfocítica es el tipo de cáncer más abundante, principalmente en niños entre 3 y 5 años (Hunger y Mullighan, 2015). Además de la clasificación basada en el tipo de célula que afecta la leucemia (mieloide o linfoide), se divide en aguda y crónica, dependiendo de los patrones clínicos que presenten. Inicialmente, se hacía uso de la citomorfología y la citoquímica para determinar el tipo de leucemia (aguda o crónica), actualmente, se ha incorporado la inmunofenotipificación (Szczepański et al., 2003).

### 2.2.1. Leucemia Aguda

Afecta a precursores de las células hematopoyéticas, es decir, que aún no están diferenciadas. Según la clasificación del criterio Francés Américo Británico (FAB), el diagnóstico de la leucemia aguda se realiza a través de la citomorfología y la

citoquímica, teniendo dos subtipos, leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) (Bennett et al., 1976 confirmar que sigue la clasificación con referencia actual). Respecto a la incidencia, la leucemia aguda se presenta mayormente en niños (55%) que en niñas (45%) (Hunger y Mullighan, 2015). El estudio constante de leucemia aguda en pacientes pediátricos ha identificado que, aunque la enfermedad se presenta generalmente en pacientes sin comorbilidades también, existe una relación entre los síndromes genéticos como son: síndrome de Down, anemia Fanconi, síndrome de Bloom y ataxia telangiectasia con la expresión de dicha neoplasia (Kato y Manabe, 2018). Además, se sabe que existen aberraciones cromosomales conservadas relacionadas con la manifestación de leucemia aguda, sin embargo, no son una determinante para el desarrollo de la enfermedad. Una mutación génica relacionada con la leucemia aguda es la expresión del perfil genético positivo Philadelphia (Ph), que en la mayoría de los casos presenta deplecciones relacionadas con el desarrollo de células B como factores de transcripción (E2A), EBF1 e IKZF1. También, incluye rearreglos en ABL1, JAK2, PDGFRB, CRLF2 y EPOR, los cuales activan mutaciones en IL7R y FLT3, así como la deplección de SH2B3. Ésta última codifica para el regulador negativo (LNK) de JAK2 (Roberts et al., 2012).

- Leucemia Linfocítica Aguda (ALL)

La leucemia es la más común entre pacientes pediátricos, la edad de incidencia predominante es entre 1- 4 años (Kato y Manabe, 2018). Tiene un perfil genético positivo-Philadelphia, el cual está relacionado con el correcto funcionamiento de la vía de señalización JAK/STAT, evitando así, las restricciones relacionadas con el crecimiento y la proliferación (Roberts et al., 2012). Una de las manifestaciones clínicas de la ALL es la acumulación de células linfoides no diferenciadas en la médula ósea, la leucopenia, la trombocitopenia y la anemia, que están relacionadas con el funcionamiento no correcto de la médula ósea (J. Alvarnas et al., 2015). Inicialmente, la FAB clasificó a la ALL en 3 subtipos (L1, L2 y L3), actualmente no se reconoce dicha clasificación, ya que no tomaba en cuenta rasgos biológicos importantes de la leucemia. La inmunofenotipificación, ha permitido la clasificación

de la ALL, dependiendo del precursor hematopoyético (célula tipo B o célula tipo T) (Szczepański et al., 2003).

- Leucemia linfocítica aguda-Precursor-B

La LLA también es conocida como pre-B, se expresa en aproximadamente entre 30-35% estos pacientes; presenta mutaciones cromosómicas que se encuentran ligadas a la expresión de un fenotipo específico, que es el reflejo de evento oncogénico. Los microarreglos es una metodología con la que se ha podido identificar patrones de expresión génica de los precursores de células B, lo que permite identificar aberraciones moleculares. Su inmunofenotipo es el CD10-/CD19+/CD20-/CD24-/CD34+/TdT+ (Szczepański et al., 2003).

- T- leucemia linfocítica aguda

Los pacientes con este subtipo de leucemia, presentan menor porcentaje de mutaciones cromosómicas, que representan el 15-20%, a diferencia de la pre-B. Los microarreglos han permitido la cuantificación de la expresión génica de los marcadores característicos del inmunofenotipo de la T-ALL, que es CD2+/CD4+/CD5+/CD7+/CD8+ (Szczepański et al., 2003).

- Leucemia mieloide aguda (LMA)

También se le conoce como leucemia mielógena aguda. Es más común en adultos y personas de la tercera edad. En este tipo de leucemia, la célula madre mieloide produce mieloblastos, glóbulos rojos y plaquetas anormales e inmaduros (Instituto Nacional de Cáncer, 2022). Para determinar este tipo de leucemia, es necesario un estudio fenotípico en el cual se expresa, al menos un antígeno mieloide y negativo para antígenos linfoides (Szczepański et al., 2003).

## 2.2.2. Leucemia Crónica

- Leucemia mieloide crónica (LMC)

La denominación mieloide, se atribuye a que se afectan los glóbulos blancos mieloides de la médula ósea. Representa el 15% de las leucemias en adultos, generalmente afecta a esta población y es casi nula en niños y adolescentes

(Instituto Nacional de Cáncer, 2022). La neoplasia, presenta diversas mutaciones que conllevan a que la célula tenga aberraciones apoptóticas (Szczepański et al., 2003).

- Leucemia linfocítica crónica (LLC)

Tiene una incidencia de 4/100,000 personas, la cual aumenta con la edad, expresándose principalmente entre 67-72 años, la relación por género es de 2:1 entre hombres y mujeres. Se ha demostrado que la LLC es desencadenada por el aumento o depleción de cromosomas, como son el 13q y el 11q, así como trisomías (Landau et al., 2015).

#### 2.2.3. Factores de Riesgo de la Leucemia

Existen diversos factores de riesgo que favorecen la expresión de LLA, el más predominante es el Síndrome de Down, que se ha encontrado directamente asociado al padecimiento, así como con el aumento del porcentaje de riesgo para ser expresado (Hunger y Mullighan, 2015). Además, factores como radiación ionizante, pesticidas, algunos solventes y el virus Epstein-Barr, contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017).

#### 2.2.4. Diagnóstico

En general, la leucemia no presenta síntomas característicos que puedan determinar que una persona presente la enfermedad. Algunos pacientes pueden tener periodos largos de febrícula, disnea, dolor de huesos e inflamación de los nódulos linfáticos (Kato y Manabe, 2018). El diagnóstico es positivo cuando existe un 20% de linfoblastos en la médula ósea o en la sangre periférica. Para realizar un diagnóstico de confirmación, se toma en cuenta la morfología, inmunofenotipificación y pruebas citogenéticas (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017).

#### 2.2.5. Tratamiento

Para tratar la leucemia es importante tomar en cuenta el tipo de leucemia, la edad, si hay anormalidades cromosómicas y en general la salud del paciente. Los

tratamientos principales son los siguientes: quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida y terapia de soporte. Los protocolos para pacientes pediátricos, tienen una efectividad de supervivencia del 90%, mientras que la de los adultos es mucho menor.

- Quimioterapia: Es un tratamiento que consiste en la administración de fármacos que detienen o retrasan el crecimiento celular de las células cancerígenas. La quimioterapia, se divide en tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento a largo plazo, con profilaxis al SNC. Se tiene como objetivo, la remisión y la normalización del proceso hematopoyético. El protocolo inicial de la terapia de inducción fue planteada en 1976, en la que principalmente se administra vincristina, corticoesteroides y antraciclina (Scavino et al., 1976). La fase de consolidación, depende del tipo de protocolo que se esté siguiendo, generalmente los fármacos utilizados en esta fase, son los mismos que en la fase de inducción, adicionando quimioterapia intratecal, así como radiación. La terapia de mantenimiento, consiste generalmente en la administración mensual intravenosa de vincristina, la administración trimestral durante 5 días de prednisolona, dosis diarias de 6-MP, y metotrexato intratecal mensualmente, las dosis pueden variar dependiendo del protocolo (Chiengthong et al., 2016).

Actualmente, los protocolos de tratamiento contra la leucemia tienen dos objetivos principales, el primero es sobreponer la resistencia a los quimioterapéuticos y el segundo, mejorar la especificidad, de tal manera que se eviten los efectos secundarios. Recientemente, han tomado importancia las terapias con anticuerpos monoclonales, en especial las que tienen actividad anti antígeno CD22. El CD22, es un antígeno de diferenciación de las células B que se encuentra mayormente expresado en la leucemia tipo LLA-Precursor B. Se ha encontrado a dicho antígeno, en al menos el 20 % de las células leucémicas en general. Mientras que su presencia en la LLA-Precursor B se expresa entre 50-100% en adultos y 90% en pacientes pediátricos (Shah et al., 2015).

- Radioterapia: Es un método físico que tiene la finalidad de destruir las células cancerígenas. La radiación de alta energía daña el material genético y evita la proliferación celular. Sin embargo, la radiación no afecta únicamente a las células cancerígenas, también afecta a las que se encuentran en sus alrededores, por lo que se buscan métodos que permitan hacer de ésta, un tratamiento dirigido. Aunque las células sanas que rodean a las células cancerígenas se ven afectadas, éstas se reparan a una velocidad mayor que las cancerígenas, después de haber sido irradiadas (Baskar et al., 2012). Recientemente, se han incorporado a la radioterapia nanopartículas que son radiosensibilizadoras, ya que, por sus propiedades eléctricas, tamaño, acumulación y producción de radicales libres, dan como resultado un efecto potenciado de la radioterapia (Haume et al., 2016). Aunque los protocolos para tratar el cáncer, son diversos, a largo plazo existe un problema de desarrollo de resistencia a los fármacos por parte del paciente, por lo que se buscan tratamientos coadyuvantes para adicionarlos a los tratamientos convencionales.

### **2.3. Nanotecnología**

En los últimos 10 años, la nanotecnología ha desarrollado estrategias y sistemas para apoyar el tratamiento de enfermedades; ésta se refiere a la síntesis, manipulación y aplicación de especies químicas entre 1-100 nm, los materiales a escala nanométrica, presentan propiedades únicas que no se manifiestan en materiales que son de mayor tamaño. Las nanopartículas, han sido utilizadas como acarreadoras de medicamentos y han demostrado que pueden aumentar la eficacia, estabilidad, solubilidad de los medicamentos, al tiempo que disminuyen su toxicidad (López et al., 2015). La nanotecnología ha cobrado gran interés surgiendo como una ciencia multidisciplinaria, pues utiliza diversas herramientas, así como técnicas para su desarrollo (Shi et al., 2017)

#### **2.3.1. Nanomedicamentos para tratamiento del cáncer**

El creciente interés por el uso de la nanotecnología como herramienta para la distribución de fármacos en el cáncer, se debe a que las nanopartículas tienen

propiedades químicas y físicas que permiten su unión a fármacos, así como a mejorar la permeabilidad a la célula. Además, debido a sus características ópticas y eléctricas son excelentes para el diagnóstico e imagenología de tumores. Cabe mencionar que las NPs con actividad biológica han sido aprobadas (liposomas, micelas, poliméricas) como tratamiento para el cáncer. La administración de las NPs es vía sistémica, éstas se acumulan en el tumor debido al efecto de permeabilidad y retención (Shi et al., 2017).

Sin embargo, la distribución de las NPs al tumor no es el único obstáculo que ha logrado dominar la nanotecnología, también ha conseguido modificar el microambiente del tumor, que es la principal causa de la metástasis. Con la finalidad de resolver lo anterior, se han sintetizado NPs que pueden alterar el microambiente del tumor y permitir el paso de los fármacos (Joyce, 2005; Meads et al., 2009). Algunos ejemplos de nanomedicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés) son las nanopartículas unidas a paclitaxel (nab-paclitaxel; Abraxane), doxorrubicina liposomal (Doxil) para cáncer de ovario y metástasis de cáncer de mama, así como vincristina liposomal (Marquibo) para tratar leucemia linfocítica aguda. En el año 2014, había 15 nanomedicamentos aprobados por dependencias de farmacovigilancia y 35 en fases clínicas, en materia de desarrollo predomina la radioterapia, la hipertermia, la inmunoterapia y la quimioterapia, tanto dirigida como no dirigida (Gitanjali et al., 2014). En el año 2019, el número de nanomedicamentos probados por la FDA aumentó a 28, de los cuales tres son nanopartículas de oro, además hay 75 nanomedicamentos en pruebas clínicas (Anselmo y Mitragotri, 2019).

### 2.3.2. Nanopartículas

El estudio y desarrollo de las nanopartículas (NPs) ha ido en crecimiento, anualmente se duplica el número de artículos en PubMed relacionados con NPs (Shi et al., 2017). Las nanopartículas pueden tener diversas formas (nanorods, nanotubos, nanoesferas, nanoprismas), las cuales influencian sus propiedades químicas, físicas, así como su efecto biológico (Ganeshkumar et al., 2012). La primera síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas se llevó a cabo en 1995,

donde se adicionaron moléculas orgánicas de tiol de manera exitosa, demostrando que es posible realizar una síntesis racionalizada de nanopartículas (Brust et al., 1995).

### 2.3.3. Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro han sido de interés debido a que tienen una gran área de superficie por lo que puede ser modificada con fármacos.

Las NPs-Au como acarreadoras de medicamentos, permiten aumentar la concentración de fármaco que permea la membrana celular, por lo tanto, elevando la concentración del fármaco dentro de la célula; lo anterior, permite superar o evadir la multiresistencia a fármacos. El aumento de la concentración de fármacos dentro de la célula, es debido a una de las tantas propiedades de las nanopartículas que es el efecto de la retención y permeabilidad aumentada (EPR por sus siglas en inglés). Un ejemplo de lo anterior, son las NPs-Au que acarrean Doxorrubicina (5 µg) administradas por vía intravenosa, las cuales se ha demostrado que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y alojarse en el cerebro (Xiao et al., 2017). Además, las NPs-Au, generan especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), cuando son incididas con luz o con ultrasonido, por lo que se presume que se puedan utilizar para promover la terapia fotodinámica y la terapia sonodinámica (Brazzale et al., 2016).

Respecto a la toxicidad de las NPs-Au, un estudio con ratones inoculados vía intraperitoneal (40, 200 y 400 µg/kg/día), durante 8 días, no demostró toxicidad. La concentración de oro en los tejidos (cerebro, hígado, riñón, bazo y pulmones), aumentó de manera dependiente a la concentración administrada de NPs-Au. Los animales no sufrieron cambio en el peso, no presentaron inflamación, decoloración o cambio en el tamaño de los tejidos. Respecto al aclaramiento de las NPs-Au, se observó que dependía del tamaño y forma de las NPs. Se concluyó que la acumulación de las NPs-Au en los tejidos no causó toxicidad ni mortalidad en los animales (Lasagna-Reeves et al., 2010). Ahora bien, el uso de NPs-Au para el tratamiento del cáncer, ha sido como acarreadoras de fármacos o como coadyuvantes, de los cuales han disminuido su toxicidad una vez conjugados con

las NPs-Au, como es el caso del factor de necrosis tumoral humano recombinante (rhTNRF) (Libutti et al., 2010). Nanopartículas de oro menores a 15 nm han resultado tóxicas en diversos cultivos celulares, por lo que el tamaño tiene un papel muy importante (Pan et al., 2007).

#### 2.3.4. Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se puede realizar por métodos físicos, químicos o biológicos. El método físico, consiste en la evaporación-condensación, la cual se lleva a cabo en horno de tubo a presión atmosférica. Sin embargo, los inconvenientes de la técnica son: el tamaño del tubo, el consumo excesivo de energía y la estabilidad térmica que requiere, la técnica es de alto rendimiento, pues se logra obtener grandes cantidades de nanopartículas en el proceso. Los métodos químicos se llevan a cabo a través de la foto-reducción de una sal metálica en camas de arcilla, éstas previenen la agregación de las nanopartículas, a la vez que brindan estabilidad, aunque hay que mencionar que es un método costoso (Natsuki, 2015).

La obtención de nanopartículas por síntesis tradicional involucra principalmente 4 procesos. La síntesis por formación hidrotérmica que es un proceso en el cual se utiliza agua a alta temperatura y presión, en donde se lleva a cabo la reacción de una sal metálica y el metal es oxidado. En el método poliol, se utiliza un medio con compuestos con grupos poliol los cuales llevarán a cabo la reducción de una sal metálica, además, es necesaria la adición de agentes estabilizantes y agentes acomplejantes. Para la obtención de nanopartículas por microemulsión, es indispensable el uso de una solución no polar, una solución polar y un surfactante. Finalmente, el método más usado para obtener nanopartículas es el sol-gel, pues se obtienen nanopartículas homogéneas en referencia a su forma, así como de alta pureza. En este proceso, un monómero es convertido en una solución coloidal o sol a través de la adición de una solución hidroxi-metálica que se obtuvo como resultante de la hidrólisis del metal de elección (Chandra et al., 2020)

## **2.4. Nanopartículas con actividad anticancerígena**

Los nanomedicamentos que se han aprobado como tratamiento para el cáncer, han sido sintetizados por métodos físicos o químicos; sin embargo, la investigación de NPs continúa con la finalidad de desarrollar nuevos medicamentos de este tipo. Un ejemplo de lo anterior, son los nanorods de oro (AuNRs), los cuales han sido utilizados para detener la síntesis de las integrinas, que son receptores de superficie para controlar la organización del citoesqueleto. Las integrinas, están relacionadas de manera directa con la migración de células cancerígenas, por lo que se concluye que el tratamiento de células cancerígenas con AuNRs, puede llegar a retrasar o evitar la metástasis (Zhou et al., 2014). Otro mecanismo que se ha logrado demostrar, es que las nanopartículas de oro inhiben la producción de ATP, por lo que se inhibe el ensamble de la F-actina del citoesqueleto y decrece la migración celular (Parrotta et al., 2016). También, se ha reportado que la combinación de las nanopartículas de oro y la inducción de calor, a través de la incidencia de infrarrojo cercano, permite la reorganización del citoesqueleto, lo que resulta en una disminución de la migración celular (Ali et al., 2017; Huang y El-Sayed, 2011). Recientemente, se realizó un estudio clínico en 16 pacientes con cáncer de próstata, diagnosticado con desarrollo tumoral bajo o moderado. Los pacientes fueron infiltrados con nanoshells de oro (GSNs) que, a su vez, serían excitados con radioterapia. El estudio tuvo como finalidad determinar la distribución de los nanoshells, tanto en el tejido sano como en la zona tumoral, así como, determinar la orientación de la radiación hacia las zonas tumorales, evitando daño del tejido sano que los rodea. Como resultado, se observó que hubo poca distribución de los nanoshells en el tejido sano, a diferencia del tumor, en donde se concentraron los GSNs y la incidencia de la radiación fue específica sobre las zonas con mayor presencia de los GSNs, demostrando finalmente, que el tejido sano no presentó ningún daño (Rastinehad et al., 2019).

## **2.5. Química verde**

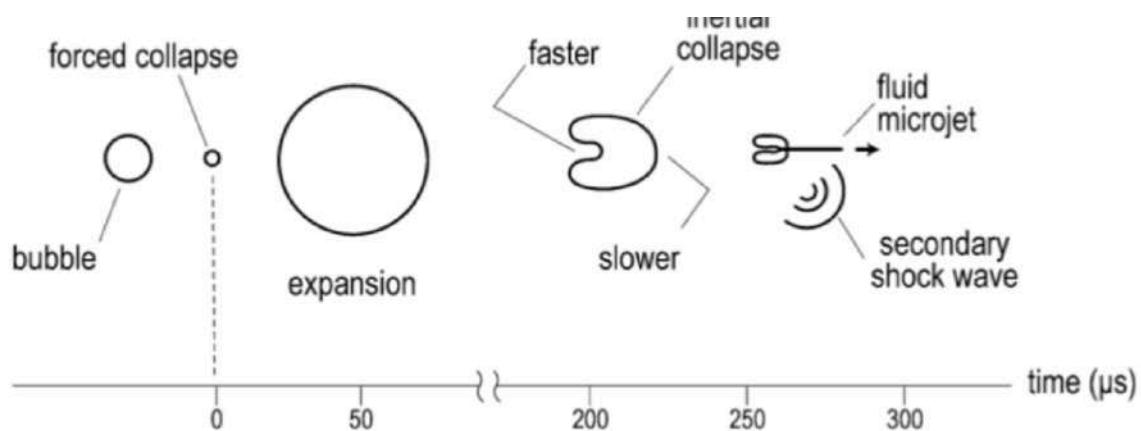
La química verde fue inicialmente descrita por Anastas (Anastas, P. Williamson, 1994), con la finalidad de prevenir la contaminación ambiental derivada de los

procesos químicos, tomando en consideración la investigación, desarrollo y comercialización. La química verde busca principalmente sustituir los métodos tradicionales, así como las materias primas por alternativas sustentables y seguras, tanto para el medio ambiente como para los seres vivos. La química verde, establece 12 principios como guía para la investigación y desarrollo de procesos industriales y académicos: 1) prevenir la producción de desechos, 2) maximizar la economía atómica, 3) diseñar síntesis química que sea menos peligrosa, 4) desarrollar químicos y productos seguros, 5) utilizar solventes y condiciones de reacción seguras, 6) Aumentar la eficiencia de la energía, 7) usar materia prima renovable, 8) evitar la formación de derivados, 9) utilizar catalizadores, 10) diseño de degradación, 11) realizar análisis en tiempo real para evitar contaminación y 12) minimizar los potenciales accidentes.

#### Métodos de extracción verdes

Los métodos de extracción verde se han desarrollado en concordancia con los principios que establece la química verde. Puntualmente, se han planteado ocho principios que integran las bases para la implementación de métodos de extracción verde: 1) innovar seleccionando y utilizando una variedad renovable de recursos vegetales, 2) uso de solventes alternativos, principalmente agua o enfocados biológicamente, 3) reducción del consumo de energía, recuperándola o utilizando tecnologías innovadoras, 4) manufacturar co-productos en lugar de desechos , 5) disminuir el número de unidades utilizadas, favoreciendo la producción segura, robusta y controlada 6) buscar obtener un extracto no desnaturizado, biodegradable y libre de contaminantes (Chemat et al., 2012). Algunos métodos de extracción verdes que se utilizan comúnmente son las microondas, el ultrasonido, el uso de voltaje y recientemente las ondas de choque (Chemat et al., 2019; Molina et al., 2020). El fundamento que permite a los métodos de extracción verdes, antes mencionados, obtener los compuestos fitoquímicos, es la disruptión mecánica de la membrana vegetal. A nivel analítico, el uso de ultrasonido es generalmente a través de un baño ultrasónico, sin embargo, la tecnología más reciente, hace uso de un sonotrodo que emite las ondas ultrasónicas a través de una punta, que es sumergida directamente en la muestra, lo cuál permite que el proceso sea más

eficiente (Chemat et al., 2011). Recientemente, se ha explorado el uso de ondas de choque para la extracción de fitoquímicos. esta técnica es comunmente utilizada en la medicina para el tratamiento de cálculos renales, también conocido como litotripsia, sin embargo, se ha demostrado que también puede afectar de manera importante a células animales y vegetales, con la ventaja de que es una técnica específica (Gutiérrez-Prieto et al., 2019). Ambas técnicas de extracción hacen uso del proceso de cavitación que se puede encontrar ejemplificado en la figura 3. El proceso de cavitación inicia el cambio de presión en un ambiente líquido que produce que las burbujas en el líquido se expanda, hasta reventarse, generando una segunda onda de choque a la vez que producen microjets. Cuando el proceso de cavitación se da cerca de un sólido, la liberación de energía produce disrupción del sólido (Amenta et al., 2018; Loske, 2017; Molina et al., 2020).



**Figura 3.** Esquema del proceso de cavitación (Chen et al., 2011).

### 2.5.1. Solventes verdes

Los solventes orgánicos son tradicionalmente utilizados para la extracción de compuestos. La química verde propone el uso de solventes que sean considerados como seguros, biodegradables, no contaminantes y reutilizables. El agua y el etanol son los solventes verdes que comúnmente son utilizados, sin embargo, presentan dificultades respecto a la diversidad de compuestos que extraen debido a la naturaleza de su polaridad (Castro-Puyana et al., 2017). Por otro lado, los NADES, son sistemas eutécticos que están principalmente formados por HBD y HBA, que

forman amplias redes de puentes de hidrógeno que les permite obtener una diversidad más amplia de compuestos (Choi et al., 2011; Fernández et al., 2018; Oh et al., 2020).

### 2.5.2. Síntesis verde de nanopartículas

Aunque la síntesis de nanopartículas por métodos químicos y físicos son metodologías de elección, se resuelven como no asequibles y tóxicas, debido a que los reactivos involucrados son responsables de riesgos biológicos principalmente al medioambiente (Ahmed et al., 2016).

La síntesis verde, busca reducir al mínimo o eliminar por completo la contaminación producida por los procesos químicos, evitando el desperdicio de materias primas (solventes, reactivos), además de tratar de disminuir el uso de materiales peligrosos, así como los de origen no renovable; con base en lo anterior, la química verde tiene como finalidad, la disminución o eliminación del uso de productos químicos tóxicos, así como el reciclaje de los desechos producidos por las experimentaciones, sin sacrificar el avance tecnológico (Natsuki, 2015). Anastas, conocido como el padre de la química verde, la define como una filosofía de trabajo que implica la utilización de herramientas y caminos alternativos que previenen la contaminación, tanto del diseño, como de la síntesis y finalmente de los productos secundarios que se puedan generar (Anastas, P. Williamson, 1994) . Para llevar a cabo la reacción de síntesis de las nanopartículas, es necesario tener al metal precursor, el medio reductor y los agentes estabilizantes (Natsuki, 2015). En la síntesis verde de nanopartículas, se pueden utilizar como medio reductor a las bacterias, de las cuales, es importante elegir el medio de cultivo adecuado, así como encontrar el número adecuado de población bacteriana para llevar a cabo la reducción del metal; también, se pueden utilizar hongos y algas. El microorganismo se selecciona dependiendo de las necesidades de tamaño y forma de las nanopartículas deseadas, pues se sabe que estos parámetros se ven influenciados por el uso de diversos organismos. Sin embargo, el uso de algas, bacterias y hongos no permite producción a gran escala de las nanopartículas. El uso de extractos de plantas actúa como agente reductor y como estabilizante, por lo que se propicia el ambiente

necesario para llevar a cabo la reacción, además de que se puede tener una producción a gran escala de las nanopartículas. Se utilizan los tallos, las hojas, las flores y las raíces de las plantas para realizar los extractos, a los cuales se adiciona la sal metálica de elección. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerán de factores como la variedad de compuestos presentes en la planta, la temperatura y el tiempo en el que se lleve a cabo la reacción. Además, el uso de plantas medicinales para realizar los extractos en los cuales se llevará a cabo la síntesis, permite funcionalizar las nanopartículas, así como atribuirle propiedades únicas que no se obtendrían por medio de una síntesis tradicional (Chandra et al., 2020).

#### 2.5.2.1. Nanopartículas biosintéticas con actividad anticancerígena

Aunque las nanopartículas sintetizadas por métodos químicos y físicos tradicionales han tenido resultados positivos frente al cáncer, la síntesis verde de nanopartículas también va en aumento. Las NPs obtenidas por síntesis verde, han tenido resultados positivos frente a células cancerígenas. Un ejemplo son las nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto etanólico de la corteza del Cuachalalate, mismas que fueron utilizadas como tratamiento en células de cáncer de mama (HeLa ATCC No. CCL-2), evaluando la viabilidad por MTT, disminuyendo la viabilidad celular en 80% a una concentración de 1 mM de nanopartículas, después de un tratamiento de 24 h disminuyó la viabilidad en 86% después de tratamiento por 48 h, lo cual determinó que la diferencia entre períodos no es significativa, por otro lado, no hubo daño citotóxico en linfoblastos (Rodríguez-Luis et al., 2016).

Además, se ha realizado exitosamente la síntesis verde de nanopartículas de oro usando el extracto acuoso de las flores de la Moringa, de las que se determinó la actividad citotóxica por MTT en células A549 de adenocarcinoma epitelial de pulmón y linfocitos, resultando en una disminución de la viabilidad celular hasta de un 100% en las células A549 (20 mg/mL de extracto), respecto a los linfocitos periféricos no hubo cambio en la viabilidad (Anand et al., 2015). En otro estudio, se determinó que las nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto acuoso de las hojas (475 µg/mL), no son citotóxicas para células sanas PBMCs (células mononucleares de

la circulación periférica), sin embargo, inducen apoptosis a través de la vía intrínseca en células cancerígenas de pulmón A549. También, se determinó que las NPs-Au tuvieron como blanco la expresión de genes supresores de tumores y el splicing alternativo de la caspasa 9, de tal manera que se activó la cascada apoptótica en las células cancerígenas (Tiloke et al., 2018). Aunado a lo anterior, se han sintetizado nanopartículas de planta utilizando como medio reductor el extracto acuoso de la corteza de Moringa, las cuales mostraron un rango de mortalidad del 94% en células de carcinoma cervical (HeLa) a una concentración de 250 µg/mL de nanopartículas, después ser incubadas durante 24 h (Vasantha et al., 2014). También, se ha realizado la síntesis de nanopartículas de óxido de níquel (NiONPs) en el extracto agua-etanol de las hojas de la Moringa, las cuales se utilizaron como tratamiento en HT-29 (cáncer de colon) a una concentración de 1000 µg/mL de NiONPs, como consecuencia, se obtuvo una viabilidad celular del 7.6% (Ezhilarasi et al., 2016).

## **2.6. Extractos de plantas medicinales con actividad antitumoral**

El uso del extracto de plantas medicinales, suplementos herbolarios y fitofármacos como coadyuvantes en el tratamiento del cáncer es una práctica común entre los pacientes con cáncer. En países en vías de desarrollo, como México, más del 50% de la población con cáncer, recurre a la medicina herbolaria como apoyo adicional a su tratamiento quimioterapéutico. Por su parte, en Estados Unidos el 35% de los pacientes con cáncer utilizan medicina herbolaria como coadyuvante. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la quimioterapia acompañada del uso de extractos de plantas medicinales, suplementos alimenticios herbolarios, así como fitomedicamentos, debe ser valorado y aprobado por los profesionales oncológicos (Ben-Arye et al., 2016).

La medicina tradicional, atribuye actividad anticancerígena a las plantas de diversos géneros entre ellos *Amphipterygium*, *Kalanchoe* y *Moringa*; por lo que han cobrado importancia entre la comunidad científica (Rodríguez-Canales et al., 2016).

## 2.6.1. Género *Amphiptygium*

Son plantas pertenecientes a la familia *Anacardiaceae*, árboles que en promedio miden 15 m de altura, corteza rojiza, sus frutos son nueces abultadas. La corteza es astringente ya que contiene taninos (Aguilar y García, 2004). Las principales especies identificadas son: *Amphiptygium glaucum* HEMSLEY y ROSSE, *Amphiptygium molle* HEMSLEY, *Amphiptygium adstringens* SCHLECHTENDAL (Cuevas Figueroa, 2005).

### 2.6.1.1. *Amphiptygium adstringens*

*Amphiptygium adstringens*, en México, se encuentra principalmente en la Sierra Madre sur, que se extiende desde Jalisco hasta Oaxaca (Cuevas Figueroa, 2005). Conocida localmente como “Cuachalalate”, es un árbol de 5-10 m de altura y 40 cm de diámetro, tiene un tronco torcido. En la medicina tradicional mexicana, se utiliza la corteza en infusión para curar malestares estomacales como son la gastritis, ulceras gástrica, cáncer de estómago, fiebre y dolor de diente (Valtierra Galván et al., 2019)

#### a) Actividad Biológica

Con la finalidad de demostrar la actividad biológica que le confiere la medicina tradicional a *Amphiptygium adstringens*, se han llevado a cabo diversas investigaciones. En un estudio realizado por Gómez-Cansino, se ha demostrado la actividad antibacteriana de los extractos de metanol y diclorometano (Gómez-Cansino et al., 2017). También, se han realizado estudios con el extracto etanólico, con la finalidad de determinar la actividad del extracto frente a la colitis, de lo anterior, se realizó un ensayo utilizando ratones (BALB/c) con colitis inducida por 4% de dextran (dextran sulphate sodium) y administrando el extracto etanólico de Cuachalalate (200 mg/kg), lo que resultó en el aumento de peso y evitó el acortamiento del colon, por lo que se infiere que tiene potencial para el tratamiento de la colitis (Rodríguez-Canales et al., 2016). Respecto a la seguridad de los extractos acuoso y metanólico de *Amphiptygium adstringens*, las pruebas de

toxicidad aguda han demostrado que no se presenta riesgo mutagénico en cepas de *S. typhimorium*, por otro lado, las pruebas en Artemia salina, tampoco mostraron toxicidad o daño (Déciga-Campos et al., 2007).

b) Actividad antitumoral

En relación con la actividad antitumoral de la planta, se han realizado diversos estudios de los extractos de la corteza, a continuación, se mencionan los resultados de los hallazgos. En pruebas de inmunosupresión, el extracto acuoso de la corteza de Cuachalalate, en un modelo de ratón administrando 10 mg/kg de peso, presentó efectos inmunoestimuladores, tanto de macrófagos como de la proliferación de esplenocitos, sin embargo, triterpenos purificados del extracto acuoso (ácido masticadienóico, ácido 3 $\alpha$ -masticadienóico, ácido masticadienólico y el ácido 24-25 dihidromasticadienóico) no presentaron ningún efecto inmunoestimuladorio (Alonso-Castro et al., 2016). Así mismo, la actividad antiproliferativa del extracto metanólico, ha sido determinada en diversas líneas celulares cancerígenas, lo que resultó en la inhibición total de la proliferación celular, demostró tener una actividad más potente en las células de adenocarcinoma ovárico (4  $\mu$ g/mL, células:NCI-ADR/RESISTENTE), melanoma (7.30  $\mu$ g/mL, células: UACC-62) y adenocarcinoma de colon (7.90  $\mu$ g/mL, células: HT-29), por otra parte, fue en las células de leucemia mieloide, en las que se obtuvo la menor actividad del extracto, ya que fue necesaria una concentración >250  $\mu$ g/mL para lograr la inhibición total del crecimiento (Rodríguez-García et al., 2015).

Los estudios fitoquímicos del extracto hexánico han reportado que está compuesto en su mayoría por ácidos alquil fenólicos, de los cuales el compuesto mayoritario es el ácido anacárdico 6-pentadecilsalicílico, cuya estructura se muestra en la figura 3 (Mata et al., 1991). Estudios realizados en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (K562) tratadas con ácido 6-pentadecil salicílico (150  $\mu$ M), indicaron que la inducción de apoptosis es dependiente de la concentración y que existe un aumento en la concentración de las caspasas 3,8 y 9. Además, mediante la adición de los inhibidores de las caspasas ya mencionadas, se resolvió que el tratamiento con ácido 6-pentadecilsalicílico induce apoptosis dependiente de caspasa 8 por la vía

extrínseca (Alam-Escamilla et al., 2015). El ácido anacárdico 6-pentadecilsalicílico (2 mg/kg) administrado en modelos de ratón durante 14 días, arrojó como resultados el aumento en la proporción de macrófagos (F4/80-FITC), así como de células *natural killer* (CD 335 PE<sup>Cy</sup>7), además, aumentó los niveles sistémicos del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), de las interleucinas (IL-2, IL-12, IL-6 y IL-1 $\beta$ ) (80 veces la concentración), así como del óxido nítrico. Finalmente, aunque tiene efecto en la proporción de macrófagos, se observó que no existe un efecto en la proporción de linfocitos (Gnanaprakasam et al., 2019). Por otro lado, en estudios fitoquímicos de *A. adstringens*, se han logrado purificar 12 triterpenos, así mismo se demuestra que inhiben la proliferación de células de leucemia (L-1210), teniendo en promedio una IC<sub>50</sub>= 25  $\mu$ g/mL de los triterpenos aislados (Makino et al., 2004).



**Figura 4.** Estructura del ácido 6-pentadecil salicílico

### 2.6.2. Género *Moringaceae*

El género Moringa también ha captado el interés de los investigadores en la búsqueda de metabolitos y extractos con actividad antitumoral. La Moringa pertenece al género *Moringaceae*, del orden *Brassicales*, donde se incluyen al rábano, la col y las alcaparras. El género *Moringaceae*, únicamente comprende al género Moringa del cual se han reportado 13 especies (Verdcourt, 1985), (Olson y Fahey, 2011). La diversidad es grande, ya que comprende hierbas, arbustos e incluso árboles. Sus hojas son pinnadas, grandes, los frutos forman una cápsula leñosa larga (Olson y Fahey, 2011).

#### 2.6.2.1. *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera*, es una de las 13 especies que comprende el género *Moringaceae*. Se ha registrado en bosques al norte de India y Pakistán (Verdcourt, 1985). Sin embargo, en México, es una planta que ya forma parte de la horticultura tradicional,

utilizándose principalmente de forma ornamental. Es abundante en la costa del Pacífico y del sur de Sonora hasta Chiapas. En los años 1900, se utilizaba como fuente comestible, ya que lo que se ingería eran las vainas como espárragos (Olson y Fahey, 2011).

#### a) Actividad biológica

Uno de los principales atributos de la Moringa, es su alto contenido proteico, del cual se ha demostrado que su adición a la dieta ha logrado rescatar a personas en desnutrición, además, las hojas están constituidas principalmente con aminoácidos esenciales (Freiberger et al., 1998). También se ha demostrado que tiene actividad anti hiperlipidémica, hiperglicémica y actividad antimicrobiana (Senthilkumar et al., 2018). El extracto acuoso y etanólico de las hojas, demostró tener una buena capacidad antioxidante, con inhibición de hasta el 87% y una IC<sub>50</sub> de 7.6 µg/mL (Sacchetti et al., 2005). El extracto hidro-alcohólico de las hojas, tiene actividad como antiviral contra herpes simplex-1 a una concentración entre 50-100 µg/mL con un RF:104 (Soltan y Zaki, 2009). También, se ha determinado que hay toxicidad aguda administrando dosis diaria de 1.5 g/kg (Adedapo et al., 2009)

#### b) Actividad antitumoral

Por lo que se refiere a la actividad antitumoral de extractos de Moringa, se han realizado estudios exhaustivos que demuestran efectos biológicos positivos frente a diversas células cancerígenas, a continuación se mencionan los hallazgos:

El tratamiento de células de carcinoma (HeLa de carcinoma cervical), líneas celulares KB (sublínea de Hela) con el extracto acuoso de las hojas, resultó en la disminución de la viabilidad celular (disminución del 85% a 25 µg/mL), cambios en la morfología (200 µg/mL, 48 h) y la fragmentación nucleosomal del DNA en células KB tumorales (200 µg/mL) (Sreelatha et al., 2011). Así mismo, Nair y Varalakshmi, usaron el extracto acuoso y determinaron la actividad apoptótica en células HeLa, tomando en cuenta la fragmentación del DNA y daño apoptótico usando tinción de bromuro de etido. Los cambios morfológicos, fueron atribuidos como resultado del proceso de muerte celular programada que se hicieron evidentes después de 6 h de

haber administrado el tratamiento con el extracto (100 µg/mL). La fragmentación de DNA se determinó por electroforesis (gel de agarosa), así como el aumento de la fragmentación internucleosomal (10 µg/mL). Finalmente, se resolvió que hubo daño apoptótico, debido al encogimiento de las células, así como el rompimiento nuclear (Varalakshmi y Nair, 2011). El tratamiento con 30 mg/mL de extracto acuoso durante 6 h, resultó en la disminución de la concentración de ATP, el aumento de ROS, la activación de caspasas y la expresión de proteínas proapoptóticas (p53, SMAC/Diablo, AIF) en células cancerígenas A549 (Madi et al., 2016).

Al mismo tiempo, muestras de sangre periférica y médula ósea obtenidas de pacientes con ALL y AML (Instituto Nacional de Cáncer), se trataron con extracto etanólico de las hojas de Moringa (20 mg/mL durante 24 h), los resultados indicaron que las células mononucleares de leucemia mieloide aguda presentaron disminución del 82% en la proliferación celular, mientras que los linfoblastos en las muestras de leucemia linfoblástica aguda fue del 86%, en general, la viabilidad celular fue del 25% (Khalafalla et al., 2010).

#### 2.6.3. Género *Kalanchoe*

El género fue inicialmente publicado por Michel Adanson en 1763, pertenece a la familia *Crassulaceae*, tiene alrededor de 125 especies catalogadas, son plantas arbustivas que en su mayoría no alcanzan el metro de altura (Milad, 2014).

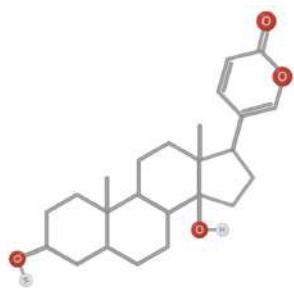
##### a) Actividad biológica

En la medicina tradicional, se utiliza para curar diarrea, fiebre, esquizofrenia, crisis de pánico, como ungüento para tumores, hinchazones y quemaduras.

Por otro lado, estudios científicos han demostrado que el extracto etanólico de *K. pinnata*, tiene actividad positiva frente a heridas, ya que promueve la disminución del área afectada, este mismo extracto tiene actividad antimicrobiana, sin embargo, el extracto metanólico presenta mejor actividad antimicrobiana, además de actividad antinociceptiva. Por otro lado, el extracto acuoso de *K. pinnata*, tiene actividad antileishmanicida visceral (Rajsekhar et al., 2016).

b) Actividad antitumoral

Los extractos acuoso y metanólico de *K. pinnata*, han presentado actividad contra tumores en regiones peritoneales en ratas. Así mismo, se demostró que los extractos presentan actividad proapoptótica y antiproliferativa (Rajsekhar et al., 2016). Por otro lado, la purificación de compuestos de tipo bufadienólidos, presentes en el Aranto, utilizados frente a células cancerígenas, han demostrado actividad antineoplásica y citotóxica. Específicamente, en leucemia linfoblástica tipo T, los bufadienólidos como la bufalina han promovido la actividad apoptótica, así como el arresto celular (García-Pérez et al., 2018). En la Figura 4, se muestra la estructura de la bufalina, que arresta el crecimiento celular en G2, además de reducir los niveles de topoisomerasa-2 en células de leucemia mieloide aguda K562 (Zhai et al., 2014).



**Figura 5.** Estructura de la Bufalina

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La leucemia es el tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial en pacientes pediátricos. Específicamente, los pacientes pediátricos mexicanos con leucemia registran un 56% de supervivencia de 5 años después del tratamiento, mientras que, a nivel mundial, la supervivencia es del 90% (Secretaría de Salud, 2019). Por lo anterior, se busca el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar la leucemia. En los últimos 20 años, la nanotecnología ha sido una herramienta para el diseño de quimioterápicos, ya sea como coadyuvantes o como tratamientos autónomos que ostentan eficacia y seguridad. Las nanopartículas de oro tienen propiedades únicas que les permiten ser utilizadas con fines terapéuticos, como es el tratamiento de cáncer con fototerapia. También, se utilizan como acarreadoras de medicamentos, como adyuvantes para mejorar la solubilidad de quimioterápicos, lo que resulta en una administración menor de dosis del fármaco, disminuyendo así, los efectos tóxicos. Lo anterior, es principalmente atribuido a la relación de área superficial y volumen que les permiten tener propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas y térmicas que les otorgan superioridad frente a otras nanopartículas (Ganeshkumar et al., 2012). Además, se ha demostrado que las nanopartículas de oro tienen actividad antitumoral y antimetastásica en diversas líneas celulares, como cáncer de colon, cáncer de mama y leucemia, con efectos tóxicos casi nulos (Parrotta et al., 2016; Zhou et al., 2014). La obtención de NPs-Au, se lleva a cabo de manera tradicional por medios físicos y químicos, sin embargo, éstos traen consigo dificultades, como el costo elevado, así como la contaminación ambiental, por lo que la nanotecnología se ha inclinado por la síntesis verde, a partir de extractos de plantas que sirven como medio reductor (Natsuki, 2015). Los extractos de plantas medicinales con actividad antitumoral comprobada, son ampliamente utilizados como medio de síntesis de nanopartículas, ya que ofrecen una fuente rica en metabolitos secundarios activos, así como la eficaz síntesis de las nanopartículas. Con respecto a plantas medicinales que han demostrado tener actividad anticancerígena, se encuentran *M. oleífera*, *A. adstringens* y *K. daigremontiana*, de las cuales, tanto extractos, como compuestos purificados han exhibido actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de leucemia linfoblástica tipo T

(García-Pérez et al., 2018). Además, estos extractos, han resultado eficaces en la síntesis de nanopartículas, sin embargo, la síntesis de NPs-Au utilizando como medio sintético los extractos de las plantas mencionadas, así como la actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas celulares de leucemia linfoblástica tipo T no ha sido determinada.

## **4. PLANTEAMIENTO TEÓRICO**

### **4.1. Pregunta de investigación**

¿Presentan las nanopartículas de oro obtenidas por química verde a partir de los extractos de *Moringa oleifera* (moringa), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) y *Kalanchoe daigremontiana* (aranto) actividad antiproliferativa y proapoptótica en líneas celulares de leucemia tipo T?

### **4.2. HIPÓTESIS**

Las nanopartículas de oro obtenidas por un proceso con enfoque basado en química verde utilizando extractos de *Moringa oleifera* (moringa), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) y *Kalanchoe daigremontiana* (aranto) presentan actividad antiproliferativa y proapoptótica en líneas celulares de leucemia tipo T.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Sintetizar NPs-Au a través del uso de la química verde, utilizando los extractos de *Moringa oleifera* (moringa), *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate) y *Kalanchoe daigremontiana* (aranto) y evaluar su actividad apoptótica y antiproliferativa en líneas celulares de leucemia tipo T (Jurkat).

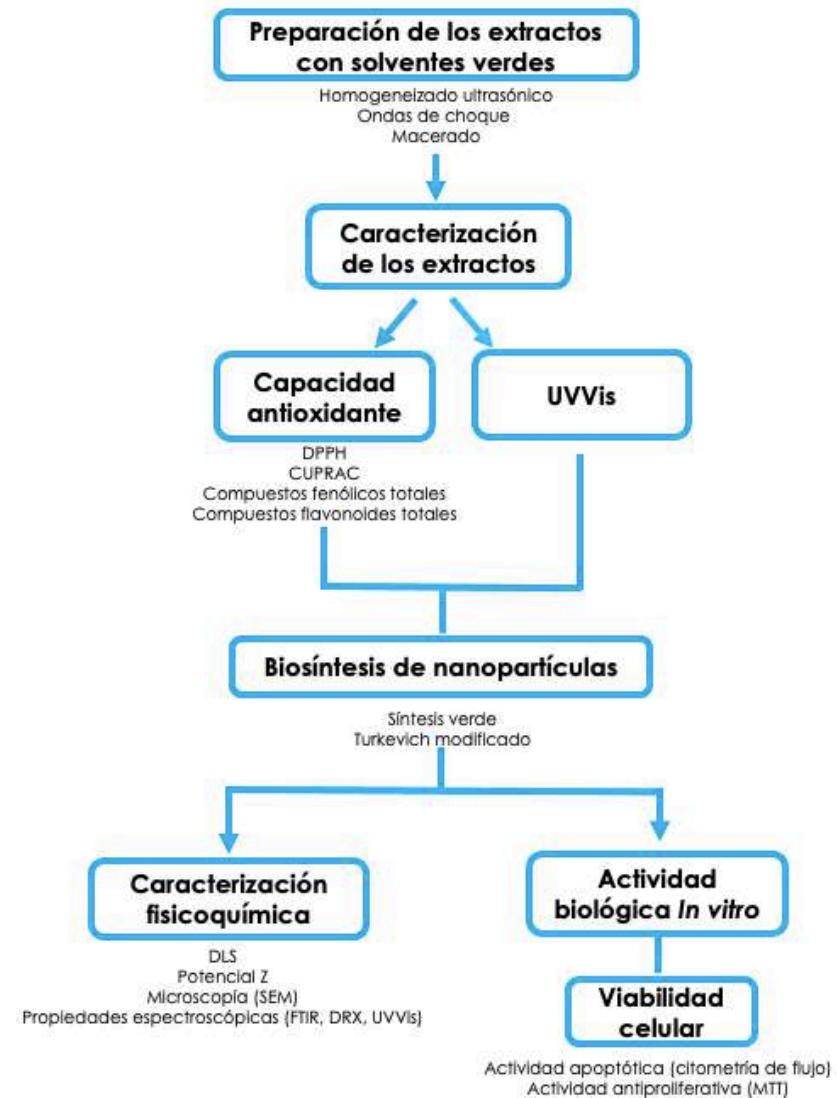
### **5.2. Objetivos específicos**

- 5.2.1. Obtener los extractos verdes de *Moringa oleifera*, *Amphipterygium adstringens* y de *Kalanchoe daigremontiana*, utilizando las técnicas de extracción de ondas de choque y homogeneizado ultrasónico.
- 5.2.2. Comparar la capacidad antioxidante, cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides totales, mediante técnicas electroquímicas, espectrofotométricas y cromatográficas, de los extractos verdes obtenidos por los diferentes métodos de extracción.
- 5.2.3. Obtener las nanopartículas de oro mediante síntesis verde, utilizando el extracto que presente las características adecuadas de capacidad antioxidante.

- 5.2.4. Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas de oro, mediante DLS, potencial Z, microscopía electrónica, espectrofotometría UV-Vis, FTIR y DRX.
- 5.2.5. Determinar la actividad antiproliferativa en líneas celulares de leucemia tipo T (Jurkat) de las nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde, así como de los extractos.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Diseño experimental



## **6.2. Extracción verde**

El material vegetal de las tres plantas, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente y protegido del sol. Posteriormente, el material seco se molgó utilizando un molino Hammer Mill (Mikro pulverizer 2TH model, USA), se tamizó utilizando una malla de 150 µm y almacenó en contenedores de polietileno hasta su uso futuro.

En todos los casos, las extracciones se realizaron a una relación peso:volumen de 67 mg/mL (material vegetal/solvente) (Molina et al., 2022). Los solventes utilizados para las extracciones fueron agua, etanol y NADES (tabla 4). Adicionalmente, se utilizó metanol como solvente control.

La extracción se llevó a cabo utilizando métodos verdes, específicamente, se hizo uso de técnicas que producen un efecto de cavitación, como son el homogeneizado ultrasónico y las ondas de choque. Adicionalmente, la extracción por macerado se realizó con la finalidad de comparar este método de extracción tradicional con los métodos verdes. La extracción por macerado se llevó a cabo durante una semana con el metanol y se mantuvo en un lugar fresco, seco y protegido de la luz. Una vez transcurrida una semana, se recuperó el sobrenadante. Todos los extractos se lyofilizaron y se almacenaron a -4°C para su uso posterior.

### **6.2.1. Ondas de choque**

La extracción asistida con ondas de choque se llevó a cabo en un generador experimental Piezolith 25-01 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania). El equipo genera alto voltaje que es aplicado a cristales piezoeléctricos, los cuales se encuentran en el fondo de una tina cúbica, ordenados de forma semiesférica. Las muestras vegetales fueron sometidas a diferentes números de ataques con las ondas de choque. El protocolo de ataque con monopolso fue desde 1000 hasta 4000 ondas de choque (5 kV). Las muestras del material vegetal tamizado se introdujeron en viales de plástico a los cuales se le adicionó el solvente y se sellaron con calor. El vial con la muestra se sumergió en la parte superior de la tina de agua, posicionándolo en el centro. La temperatura del agua de la tina fue siempre de 20

°C. Posterior a los ataques, se filtró la muestra y se liofilizó el sobrenadante (Molina et al., 2020).

#### 6.2.2. Homogeneizado ultrasónico

La extracción asistida con homogeneizado ultrasónico se realizó con un sonotrodo ultrasónico Cole-Palmer EW-08895-55 (Vernon Hills, USA). La muestra vegetal se añadió en viales de 10 mL y se utilizó la relación peso:volumen mencionada anteriormente. La extracción se realizó a frecuencia de 45 kHz, potencia de 70 W y por un periodo de 300s (Jin et al., 2019).

#### 6.2.3. Solventes eutécticos profundos naturales

Los NADES se prepararon combinando diferentes relaciones molares de sus componentes, en agitación constante a 50 °C por 4 h. A continuación, se expone la tabla de la mezcla de compuestos, así como su relación molar:

**Tabla 4.** NADES propuestos para preparación de extractos.

Combinación	Relación Molar	Referencia
Cloruro de betaina:fructosa:agua	2:5:5	(González et al., 2018)
Glicerol:cloruro de betaina:sacarosa	9:4:1	(Panić et al., 2019)

La extracción se realizó con la misma relación peso:volumen mencionada anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

### 6.3. Caracterización de los extractos

#### 6.3.1. Análisis espectroscópico

Se monitoreó la eficiencia de los métodos de extracción, por medio de espectrofotometría UV-vis (Espectrofotómetro UV/Vis, UV-6300PC), diluyendo 10 µL de cada extracto en 1 mL de solvente, haciendo una lectura a una  $\lambda=200-800$  nm.

Se registraron los espectros de infrarrojo FTIR de los extractos con la finalidad de compararlos con aquellos de las NPs-Au.

#### 6.3.2. Cuantificación de flavonoides totales

Se utilizó el método de Zhishen (Zhishen et al., 1999) para determinar la concentración de flavonoides totales, se tomó una alícuota de un mL de muestra (muestra vegetal o de la solución estándar de catequina) a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y 4 mL de agua desionizada, además, se añadieron 0.3 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5% y se incubó la reacción por 5 min, una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 0.3 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10%, después 2 mL de una solución 1M de NaOH y aforó el matraz con agua desionizada. La absorción se midió a  $\lambda=510$  nm. El total de flavonoides totales se expresó en equivalentes de catequina (CE)/100g de muestra, n=3.

#### 6.3.3. Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Se determinaron los compuestos fenólicos totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Souza et al., 2020). Se preparó una solución estándar de ácido gálico y de la muestra a analizar a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 mg/L). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: se adicionó una alícuota (200  $\mu$ L) de la muestra o el estándar a un mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se permitió reaccionar en agitación constante durante 1 min. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionaron 800  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7%, y se incubaron por 60 minutos a temperatura ambiente en obscuridad total. La absorción se registró a  $\lambda=750$  nm. La concentración de compuestos fenólicos totales se expresó en equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra, n=3.

#### 6.3.4. Capacidad antioxidante de los extractos

- Análisis colorimétrico (DPPH)

Se preparó una solución 50  $\mu$ M de DPPH tamponado con metanol. La solución tampón se realizó mezclando 40 mL de acetato de amonio 0.1 M (pH=5.5) con 60

mL de metanol. La curva de ácido ascórbico (1, 5, 10, 15, 20 y 25 µM) se realizó de una solución stock 1 mM (metanol 80 %). La reacción se llevó a cabo mezclando 150 µL de muestra vegetal o estándar con 800 µL del reactivo DPPH. La reacción se dejó incubar por 1 h en obscuridad total. La absorción se registró a  $\lambda$  517 nm.

Los resultados se reportaron en Meq de ácido ascórbico (Sharma y Bhat, 2009).

- Análisis electroquímico Capacidad Reductora Cúprica (CUPRAC)

Se preparó una solución de CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001M en agua destilada; luego se diluyó la neocuproína 0.0075 M y solución buffer (pH 7.0) de CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>. La curva estándar se preparó con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (400-1000 µM). La reacción se llevó a cabo adicionando 100 µL de cada solución y del estándar o de la muestra y se permitió reaccionar por una hora. La absorción se registró a  $\lambda$  450 nm y los resultados se expresaron en mEq de ácido ascórbico (Espinosa-Acosta et al., 2018).

#### 6.4. Optimización de los parámetros de extracción

Para obtener la capacidad antioxidante deseada, se ajustaron los parámetros de extracción de ambos métodos (ondas de choque y homogeneizado ultrasónico). Las condiciones adecuadas de extracción se determinaron con base en la capacidad antioxidante del extracto. La extracción asistida por homogeneizado ultrasónico se llevó a cabo tomando en cuenta las variables de potencia y tiempo de extracción (tiempo: 10-350 s y potencia: 50, 60, 70, 80, 90, 100 W). Las condiciones óptimas de extracción para este método fueron de: frecuencia 40 kHz, potencia 80 W y tiempo de extracción 15 s. La extracción asistida por ondas de choque para los extractos de Cuachalalate utilizando el protocolo de monopolso, resultó en extractos que contenían 25 % de la capacidad antioxidante con relación a los estándares utilizados en las diferentes metodologías. El modo de ataque se ajustó de monopolso a tándem, conservando el ataque de 2000 eventos, es decir 4000 ondas de choque. El ataque tándem se utilizó en dos protocolos de ataque: El de ataque con variable: 200 eventos con delay de 216 µs, seguidos de 700 eventos con delay de 166 µs. El protocolo de ataque constante: 1100 eventos con delay de 166 µs.

Los extractos de Aranto, se obtuvieron utilizando el protocolo monopulso con 1000 ataques a 5 kV con una temperatura constante de 25 °C. El protocolo de ataque que se utilizó para obtener los extractos de Moringa fue en tandem.

## 6.5. Síntesis verde de las nanopartículas de oro

La síntesis verde de las NPs-Au se llevó a cabo con una solución acuosa 15 µM del precursor metálico (HAuCl<sub>4</sub>), que se mezcló con una solución de acuosa del extracto (1 mg/mL). La síntesis verde tradicional se realizó utilizando una relación 1:1 p/v (extracto/ HAuCl<sub>4</sub>) en agitación constante y a temperatura ambiente por 24 h. La reacción de síntesis se monitoreó cada hora en el espectrofotómetro, en un rango de 200-750 nm, durante 12 h. La solución se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. El lavado se realizó por triplicado con agua tridestilada. Finalmente, las NPs-Au se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y se almacenaron a -4 °C hasta su uso posterior (Britto Hurtado et al., 2016).

### 6.5.1. Optimización de los parámetros de síntesis

El tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas de la síntesis verde se controlaron ajustando parámetros como el tiempo de la síntesis, el pH de la reacción, la temperatura a la que se realiza la síntesis y la relación p/v de la sal metálica y el extracto. La síntesis verde que se llevó a cabo por 24 h a temperatura ambiente se realizó a pH7 y a pH10. Adicionalmente, se utilizó el método de Turkevich modificado, que se lleva a cabo calentando la solución de HAuCl<sub>4</sub> hasta ebullición y añadiéndola al extracto resuspendido en agua destilada a 40 °C, la mezcla se mantuvo a temperatura constante (40 °C) y en agitación, una vez que la solución cambió de color (indicando el inicio de la síntesis), se tomaron alícuotas de 500 µL cada 20 min durante 120 min. Las NPs-Au se lavaron por triplicado con agua destilada a 10,000 rpm por 25 min y se guardaron a -4 °C.

## **6.6. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de oro**

### **6.6.1. Microscopía de barrido de alta resolución**

Se determinaron los parámetros morfológicos de las NPs-Au obtenidas por síntesis verde, por medio de SEM, utilizando un equipo Hitachi SU8230 (Flores-Lopez et al., 2021). Las muestras de NPs-Au se redispersaron y una gota se montó sobre un soporte de cobre recubierto con tintura de carbono, el cual se dejó secar a temperatura ambiente por 48 h.

### **6.6.2. Dispersión de luz dinámica**

Para determinar la distribución del tamaño de partícula, se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica, usando un equipo Litesizer 500 Anton Paar (Vergara-Castaneda et al., 2019). Las muestras de NPs-Au se redispersaron y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, que se adicionó a 900  $\mu$ L de un buffer de fosfatos (pH 7.4). Las mediciones se realizaron usando celdas reutilizables de plástico n=3, T= 25 °C.

### **6.6.3. Carga eléctrica**

La carga eléctrica (potencial- $\zeta$ ) de las muestras se determinó utilizando el equipo Anton Paar Litesizer 500. Las muestras redispersas se diluyeron en un buffer de fosfatos (pH 4, 7.4, 12), para evitar efectos de dispersión, se midieron por triplicado a 90° durante 30 s (Vergara-Castaneda et al., 2019).

### **6.6.4. Análisis espectroscópico**

Para asegurar la formación de las NPs-Au, se realizó el análisis por UV-Vis, registrando el espectro entre 400-600 nm, debido a que el plasmón de oro tiene una absorción máxima en esa zona (Vergara-Castaneda et al., 2019). Las muestras de NPs-Au se redispersaron y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L que se adicionó a 900  $\mu$ L de agua.

El análisis de ATR-FTIR, fue usado para determinar las propiedades espectroscópicas de NPs-Au bioreducidas y se compararon con los espectros obtenidos de los extractos (Vergara-Castaneda et al., 2019). Las muestras de NPs-Au se redispersaron y se montaron sobre el diamante del equipo.

#### 6.6.5. Análisis termogravimétrico

El material orgánico que quedó adherido a la superficie de las NPs-Au fue determinado por un análisis termogravimétrico ( $T= 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para lo cual se adicionó una cantidad conocida de la muestra. Se utilizó un equipo Mettler Toledo Thermogravimetric Analyzer (Espinosa-Acosta et al., 2018). El análisis se llevó a cabo en una atmósfera de aire con una velocidad de calentamiento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  desde  $30$  hasta  $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.6.6. Difracción de rayos X

El análisis por difracción de rayos X, se realizó con la finalidad de determinar la presencia de Au, así como las propiedades estructurales de las NPs. Para lo anterior se utilizó una cantidad de muestra conocida en un equipo Rigaku Ultima IV diffractometer (Tokyo, Japón) con Cu K  $\alpha$  (Flores-Lopez et al., 2021).

### 6.7. Actividad biológica *In vitro* de las nanopartículas de oro

Es importante mencionar que, en todos los casos, una vez terminado el trabajo con líneas celulares, se realizó un lavado de manos para evitar la dispersión del material biológico. Así mismo, una vez terminada la experimentación, el material biológico se inactivó y se le adicionó hipoclorito de sodio antes de ser colocado en bolsas para enviarlas con el proveedor de desechos peligrosos. Además, todo el material que se utilizó sin importar su naturaleza se inactivó con hipoclorito de sodio para su posterior desecho, lavado o esterilización, según el caso.

#### 6.7.1. Viabilidad celular de las líneas celulares de leucemia

Se establecieron cultivos las líneas celulares Jurkat (ATCC No. TIB-152, ATCC, Manassas, VA, USA) y CRL-1991. Las líneas celulares se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %: El medio de cultivo que se utilizó fue RPMI 1640 (ATCC, No 30-2001), con 10 % de suero bovino fetal (FBS, ATCC, No 30-2020) y 2 % de penicilina y estreptomicina.

Para determinar la viabilidad celular presentes en la suspensión, se hizo una prueba de exclusión de colorante. La prueba se realizó mezclando una parte de azul tripano

(0.4 %), con una parte de la suspensión de las células, la mezcla se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu$ L de la solución y se montaron sobre el hematocitómetro. El número total de células viables se obtuvo contando las células viables (sin tinción) y las células no viables (con tinción).

Las células Jurkat fueron tratadas con diferentes concentraciones de las NPs-Au (0.98, 3.94, 7.88, 11.82, 15.76 y 29.55  $\mu$ g/mL) por 24 h. También se trataron las células con diferentes concentraciones de los extractos (10-1000  $\mu$ g/mL). La vincristina se utilizó como control positivo y como control negativo se utilizó una mezcla de agua:etanol al 1:1 . Se calculó la IC<sub>50</sub> y estos valores se utilizaron para determinar la citotoxicidad de las NPs-Au y de los extractos.

#### 6.8. Análisis estadístico

Todos los resultados presentados fueron la media del triplicado de tres experimentos diferentes, se presentó con barras el error estándar.

## **7. Resultados y discusión**

### **7.1. Caracterización de los extractos**

Se determinó la capacidad antioxidante, contenido total de fenoles y flavonoides a todos los extractos obtenidos de *A. adstringens*, *K. daigremontiana* y *M. oleifera*. Los compuestos antioxidantes presentes en los extractos son los que llevan a cabo la reducción del Au<sup>+3</sup> presente en la sal a Au<sup>0</sup> que permite la formación de las NPs-Au. Se evaluó la capacidad antioxidante mediante técnicas espectroscópicas como el ensayo de capacidad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el ensayo de capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC). El método que se utilizó para la cuantificación de fenoles totales fue Folin-Ciocalteau y el método Zhishen para flavonoides totales. La capacidad antioxidante de un extracto debe ser evaluada por diversos métodos, ya que tomar en cuenta los resultados de uno solo, resulta en una aproximación inexacta a la concentración de dichos compuestos presentes en el extracto (Martínez-Cabanas et al., 2021).

El análisis exploratorio para la determinación de capacidad antioxidante de todos los extractos se hizo utilizando la técnica colorimétrica DPPH. La capacidad antioxidante del ácido ascórbico se tomó como referencia, para descartar las muestras que presentaran menor o mayor actividad antioxidante.

#### **7.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales**

Se determinó la capacidad antioxidante y el contenido total de fenoles y flavonoides para todos los extractos.

Los extractos metanólicos de cuachalalate obtenidos con los métodos de extracción verde, presentaron la menor capacidad antioxidante y contenido total de fenoles y flavonoides de todos los extractos.

Los extractos de la corteza del Cuachalalate han demostrado que el total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante son termolábiles, cuando se obtienen por métodos dependientes del calor como los baños de ultrasonido,

presentando un bajo rendimiento de extracción (Chmelová et al., 2020). Los resultados muestran que el rendimiento de extracción de TPC depende del solvente. La **tabla 5** muestra que la extracción asistida por ultrasonido acuoso fue un 91 % más alta que la de macerado con metanol (Mac-MeOH), mientras que la extracción por ultrasonido con etanol:agua fue un 12,9 % más baja que Mac-MeOH. Por el contrario, la extracción asistida por ondas de choque dependía del retraso. El TPC en muestras expuestas a ondas de choque en tandem generadas con un retraso constante fue un 76,1 % superior al de Mac-MeOH. El valor disminuyó cuando se usó el retardo variable, pero aún era un 29,3 % más alto que Mac-MeOH. Los extractos obtenidos con extracción asistida por homogeneizado ultrasónico tuvieron la mayor capacidad antioxidante en comparación con los otros métodos de extracción. Los resultados de los ensayos DPPH y CUPRAC indicaron que el rendimiento de la extracción verde fue mayor en capacidad antioxidante en comparación con el rendimiento obtenido por el método de extracción tradicional Mac-MeOH.

Por otro lado, los extractos de Aranto Ochea6 ( $42.81 \pm 0.17$  mg GAE·mL<sup>-1</sup>) y Ochea4 ( $32.89 \pm 1.21$  mg GAE·mL<sup>-1</sup>) fueron los que tuvieron mayor concentración de compuestos fenólicos totales. En contraste, el extracto con mayor concentración de flavonoides totales fue Me con 0.178 mg CE·mL<sup>-1</sup>. Finalmente, los extractos con menor rendimiento para fenoles fueron Ochea2 y Ochea3 y para flavonoides fueron SPea y Oche2. La capacidad antioxidante de los extractos Me ( $806.3 \pm 2.62$ ) y SPea ( $260.56 \pm 22.74$ ) fue mayor que la de los demás extractos de aranto. Los extractos que registraron mayor capacidad antioxidante por la metodología CUPRAC fueron Ochea4 ( $443.08 \pm 1.45$ ) y Ochea6 ( $202.17 \pm 2.14$ ). Finalmente, Oche2 y Oche3 fueron los extractos con menor capacidad antioxidante.

**Tabla 5.** Capacidad antioxidante de las muestras de los extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción.

Muestra	TPC (mg/100 mL GAE) <sup>a</sup>	TFC (mg/100 mL QE) <sup>b</sup>	DPPH (mM/mL TEAC) <sup>c</sup>	CUPRAC (mM/mL TEAC) <sup>d</sup>
Cuachalalate	Mac-MeOH	30.27 ± 0.25	60.06 ± 0.14	1359.91 ± 23.38
	US-EW	26.36 ± 0.43	75.41 ± 0.32	1836.72 ± 10.25
	SWCD-EW	53.31 ± 0.37	68.58 ± 0.25	4838.95 ± 39.23
Aranto	SWVD-EW	39.15 ± 0.21	90.73 ± 0.18	2588.32 ± 50.17
	US-W	57.83 ± 0.32	97.96 ± 0.41	3537.69 ± 34.81
	Me	16.47±1.27	0.19±0.16	806.3±2.62
Moringa	Spea	25.1± 2.34	0.047±0.03	260.56±22.74
	Oche2	11.25± 0.79	0.041±0.026	37.3±27.62
	Oche3 Ctrl	14.61±0.15	0.098±0.073	67.51±17.05
Ochea4	Ochea4	32.89± 1.21	0.144±0.14	134.1±5.04
	Ochea6 Ctrl	42.81±0.17	0.122±0.19	76.3±34.76
				202.17±2.14

<sup>a</sup> Contenido de compuestos fenólicos totales, <sup>b</sup> Contenido de compuestos flavonoids totales, <sup>c</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, <sup>d</sup> capacidad antioxidante reductora cíprica.

La capacidad antioxidante, así como la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales, permitió determinar los extractos con los que se iba a continuar la experimentación. Los extractos seleccionados obtenidos por medio de macerados, fueron los siguientes: aranto metanol:agua (Me:OH), cuachalalate metanol (MeOH) y moringa etanol:agua (Etol:H<sub>2</sub>O). Los extractos obtenidos con extracción asistida con ultrasonido, fueron Spea (aranto) y US-W (cuachalalate). Finalmente, los extractos asistidos con ondas de choque fueron Ochea4 (aranto), SWCD-EW y SWVD-EW (cuachalalate).

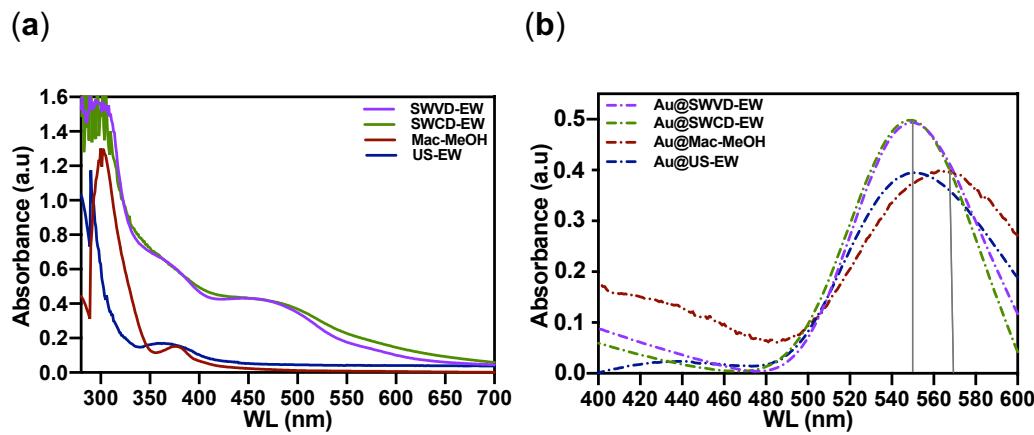
### 7.1.2. Espectroscopía UV-Vis

Para obtener NPs-Au con tamaños que oscilan entre 50 y 150 nm, se utilizaron diferentes extractos de *A. adstringens*, *K. daigremontiana* y *M. oleifera* para determinar cuál podría sintetizar las NPs-Au con las características requeridas. La absorción del plasmón NPs-Au se registró analizando las muestras con UV-Vis. En la **Figura 6** los espectros UV-Vis de las muestras indican una banda de absorción entre 500 y 600 nm que es característica de las NPs-Au. La resonancia de plasmones superficiales (SPR) es el resultado de los electrones de superficie oscilantes que resuenan con la longitud de onda incidente. En la **Figura 6a**, se

muestran los espectros de extracto de cuatro muestras diferentes, para garantizar que no haya una banda de absorción en el rango de absorción de SPR. En la figura 6a, la absorción de SWCD-EW y SWVD-EW alcanza 0.4, en la figura 6b se hace un acercamiento de la zona entre 480 a 600 nm para mejorar la apreciación de la absorción de cada muestra. En la **Figura 6b**, se observan los espectros de NPs-Au posteriores a la limpieza. Para el macerado metanólico y el extracto acuoso asistido por ultrasonido, los espectros exhibieron una banda ancha con máxima absorción a 580 nm, lo que confirma la presencia de NPs-Au. Además, en ambas muestras, la intensidad de la banda de absorción es débil, lo que puede atribuirse a una baja concentración de NPs-Au. Por el contrario, los espectros de las NPs-Au sintetizadas utilizando los extractos asistidos por ondas de choque, tienen una banda de absorción máxima bien definida a 550 nm, lo que indica la presencia de NPs-Au (Sun y Xia, 2003). Esta banda también tiene una mayor intensidad, lo que se asocia con una mayor concentración de NPs-Au, en comparación con el resto de las muestras (Jeon et al., 2019; Nehl y Hafner, 2008). Sin embargo, en todas las muestras hay un cambio de longitud de onda en el plasmón, debido a los diferentes tamaños de las NPs-Au sintetizadas (Jeon et al., 2019). Es importante destacar que, en lo que respecta a las NP, la banda de absorción del SPR revela un desplazamiento a longitudes de onda más pequeñas, cuando el tamaño de la NP es más pequeño, y a longitudes de onda más grandes, cuando el tamaño de la partícula es mayor (Guo et al., 2020; Wang y Astruc, 2014). La diferencia de tamaño afecta de manera directa en el corrimiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda mayores, desplazando de 450 nm hasta 800 nm como lo demostraron Wang y Astruc, 2014.

Por otro lado, las variables como pH (pH 10), tiempo de síntesis y temperatura (Método de Turkevich modificado) se ajustaron para la obtención de las NPs-Au cuando se usaron los extractos de *K.daigremontiana* como medio de síntesis. En la **Figura 7** se muestran los espectros de Uv-Vis, que presentaron bandas de absorción entre 500-600 nm, confirmando la presencia de NPs-Au.

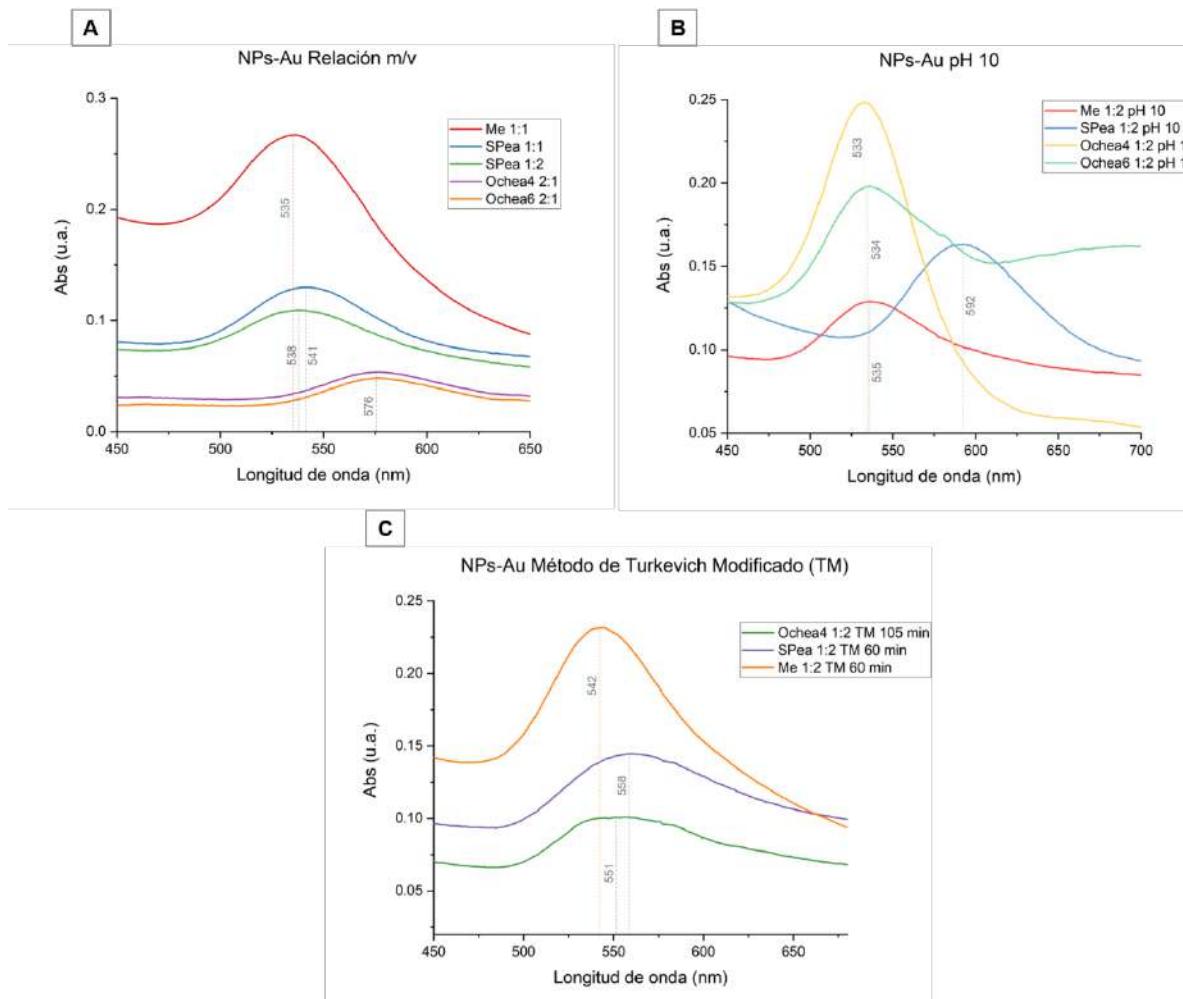
En la **Figura 7 A** se muestra el espectro UV-Vis de las NPs-Au sintetizadas a diferentes concentraciones en relación m/m del extracto y la sal de oro. Las nanopartículas sintetizadas con el extracto Me 1:1 tienen una mayor intensidad a 535 nm, esto se asocia con una mayor concentración de NPs-Au en comparación con el resto de las muestras (Jeon et al., 2019; Nehl y Hafner, 2008). Las NPs-au SPea a 1:1 y 1:2, Ochea4 2:1 y Ochea6 2:1 la señal es débil y amplia, lo que sugiere que la concentración de nanopartículas es baja y la distribución del tamaño es amplia (López-Miranda et al., 2021a).



**Figura 6.** Análisis UV-Vis de (a) extractos de *A. adstringens*; (b) NPs-Au sintetizadas con los diferentes extractos *A. adstringens*.

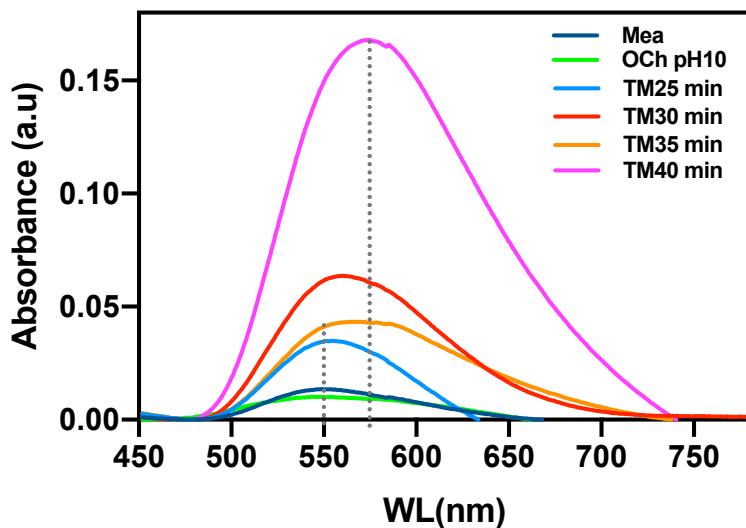
Por otro lado, en todas las muestras hay un cambio de longitud de onda en el plasmón, esto se podría atribuir a diferentes tamaños de NPs-Au sintetizadas (Jeon et al., 2019). La **Figura 7 B** muestra el espectro UV-Vis de NPs-Au sintetizadas a pH 10 (1:2), en donde las NPs-Au sintetizadas con los extractos Oche4, Oche6 y Me, tienen bandas de absorción entre 533-535 nm, lo que pudiera sugerir que presentan un tamaño de partícula parecido entre las muestras. Las NPs de Ochea4 presentan una banda más intensa y bien definida, lo que en estudios previos se ha demostrado que estaría relacionado con NPs de forma esférica (Sun & Xia, 2003). La muestra Spea, registra una banda de absorción en 592 nm, lo que indica que pudiera haber diferencia en el tamaño de las NPs de esta muestra, siendo más grandes en relación con las demás muestras (López-Miranda et al., 2021).

En la **Figura 7 C** se presentan los espectros de UV-Vis de las NPs-Au sintetizadas con el Método de Turkevich Modificado. Las tres muestras registran una banda de absorción en 550 nm, lo que sugiere un tamaño promedio similar.



**Figura 7.** Espectros UV-Vis de NPs-Au sintetizadas a diferentes parámetros A) Relación m/v, B) pH 10 y C) Método de Turkevich modificado (TM).

Los espectros de las NPs-Au de moringa, presentaron el plasmón de resonancia desde 550 hasta 575 nm aproximadamente, esto se observa en la **figura 8**. El corrimiento de las bandas de absorción se debe a los diferentes tamaños de las NPs-Au presentes en la solución, así como a la diferencia en tamaños.



**Figura 8.** Espéctros UV-Vis de las NPs-Au sintetizadas utilizando el extracto acuoso de moringa obtenido por ondas de choque. La síntesis se realizó por el método de Turkevich modificado, se tomaron alícuotas en diferentes tiempos (25, 30, 35 y 40 min).

Los espectros de las NPs-Au obtenidas con los extractos de aranto, de cuachalalate y de moringa, registran plasmones de resonancia en diversas longitudes de onda, lo cual se atribuye a la diferencia de tamaño, forma y concentración en las muestras; es importante tomar en consideración que la diversidad de metabolitos secundarios en los extractos, es responsable de la diversidad de las NPs-Au (Vergara-Castañeda et al., 2019).

#### 7.1.3. Tamaño y forma de partícula

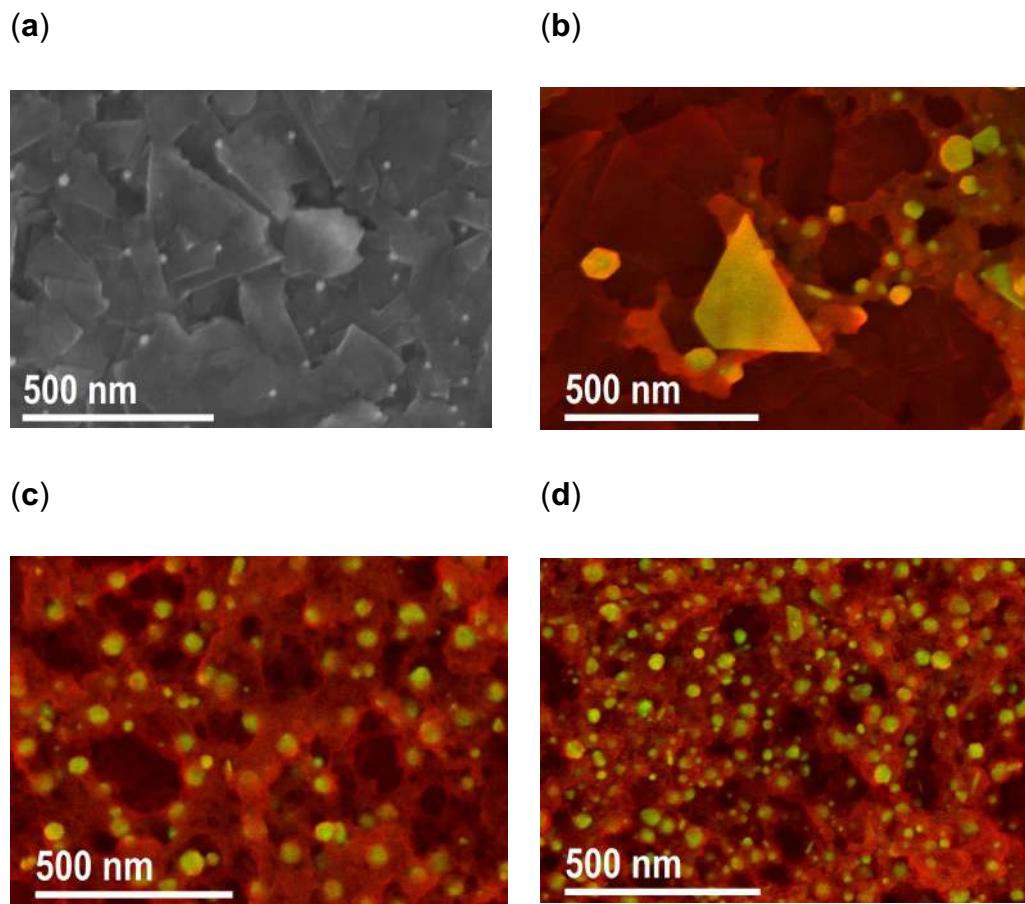
Se obtuvieron imágenes SEM para observar el tamaño y la morfología de las NPs-Au en cada muestra. Estos dos parámetros son importantes cuando se trata de ensayos biológicos, porque la toxicidad puede depender de la forma y el tamaño de las NPs-Au. Por ejemplo, las NPs-Au de diferentes tamaños y formas inoculadas en un modelo *in vivo* de ratas Wistar demostraron que las NPs-Au en forma de esfera de 15 nm son más tóxicas que las NPs-Au de 60 nm y que las estrellas y los triángulos de 60 nm son hepatotóxicos (Enea et al., 2021). La **Figura 9** muestra las micrografías SEM de 12 NPs-Au que cumplieron con los requisitos para ser analizados por esta técnica. Después del análisis, se determinó qué muestras eran viables para continuar con la caracterización y los ensayos biológicos. Las

micrografías SEM se obtuvieron sumando los electrones secundarios (SE), más las señales electrónicas de retrodispersión (HA), para apreciar mejor la contribución de la matriz orgánica y las NPs-Au, con la excepción de la muestra Au@Mac-MeOH (Figura 9a), que se obtuvo con SE (escala de grises). El color verde en las imágenes SEM corresponde a las NPs-Au incrustadas en la matriz orgánica del extracto (color rojo). En la imagen, la muestra de Au@Mac-MeOH muestra NP heterogéneas de menos de 50 nm, principalmente cuasi esféricas. La mayoría de las nanopartículas de oro analizadas por SEM, no tuvieron un uso importante en este estudio, ya que tenían un tamaño fuera del rango necesario para los ensayos biológicos, con tamaños mayores a 150 nm o menores de 20 nm, además, de que su forma no era esférica. Sin embargo, las NPs-Au en forma de estrella y triángulo y de tamaño pequeño (< 30 nm) se pueden usar como medios catalíticos.

Solvente	Macerado	Homogeneizado ultrasónico	Ondas de choque <del>delay</del> contante AM	Ondas de choque <del>delay</del> combinado PF
Metanol				
Agua			NA	NA
Agu:Etano 1:1				
Etanol			NA	
N1	NA		NA	NA

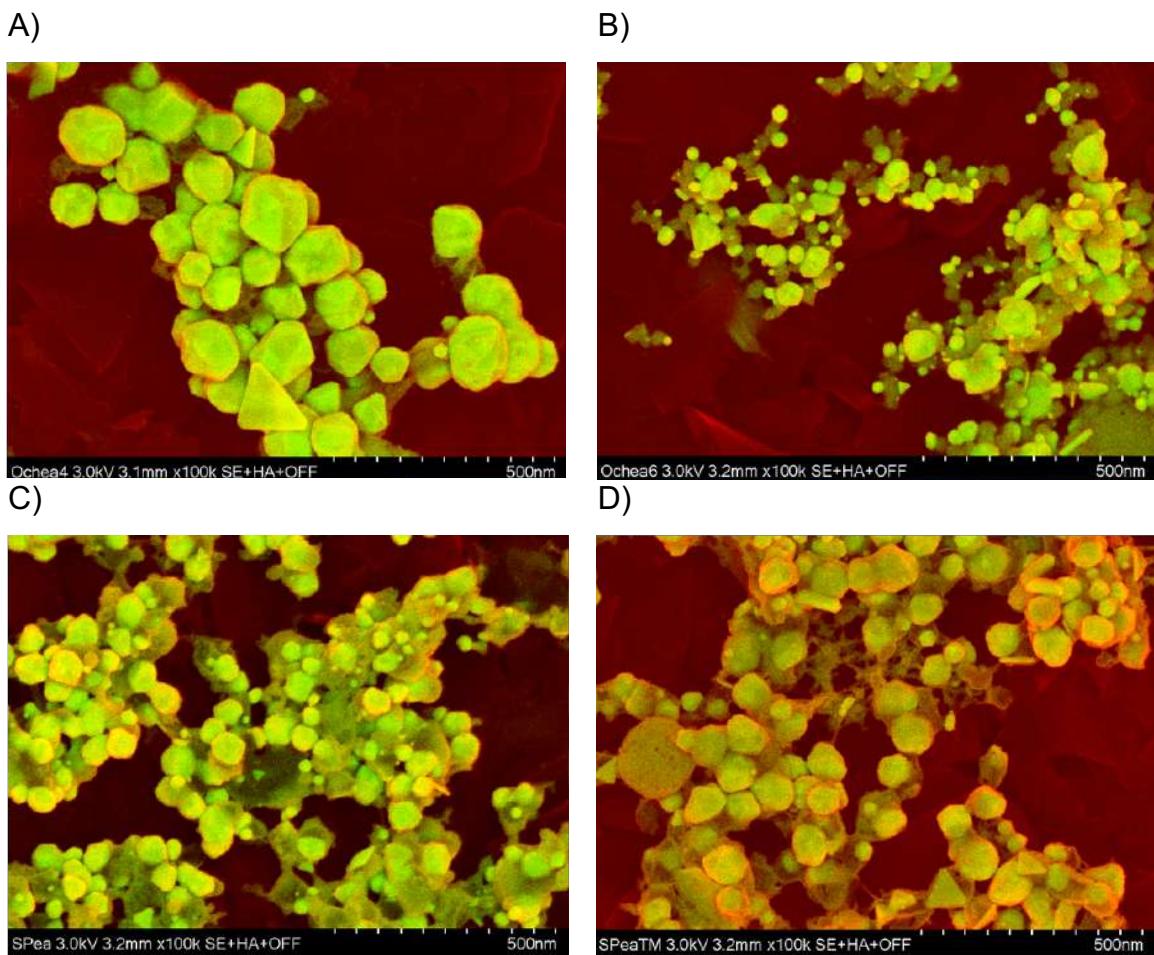
**Figura 9.** Micrografías de las NPs-Au, sintetizadas con diversos extractos de *A. adstringens*.

Por el contrario, las nanopartículas de oro quasi esféricas con tamaños adecuados se pueden describir de la siguiente manera. La **Figura 10b** Au@US-W contiene los NP más grandes de las tres muestras, que oscilan entre 100 y 150 nm y tienen una forma principalmente facetada, pero también tienen triángulos de más de 500 nm. Curiosamente, la **Figura 10c** Au@SWCD-EW y la **Figura 10d** Au@SWVD-EW muestran una alta densidad de NPs-Au, en su mayoría NPs-Au quasi esféricas y facetadas en Au@SWCD-EW, y una distribución más heterogénea de NPs-Au quasi esféricas y tri- formas angulares en Au@SWVD-EW, con tamaños de 50 nm y 50–100 nm, respectivamente. El tamaño de las muestras de NPs-Au concuerda con los resultados obtenidos a partir de la capacidad antioxidante; debido a que el extracto de US-W tenía la mayor capacidad antioxidante de las cuatro muestras, puede reducir más  $\text{Au}^{+3}$  a  $\text{Au}^0$ , lo que da como resultado NP más grandes. Además, el extracto de Mac-MeOH exhibió la capacidad antioxidante más baja, sintetizando así NPs-Au de 10 nm como se ve en la **Figura 10a**. Características como la forma y el tamaño de las NPs-Au obtenidas por síntesis verde, dependen de los metabolitos secundarios presentes en el extracto utilizado como medio de reducción. Al mismo tiempo, los constituyentes obtenidos en el extracto varían según el método de extracción y los solventes utilizados. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la forma y el tamaño de las NPs-Au son difíciles de controlar. Las NPs-Au obtenidas con diferentes extractos de plantas utilizando la misma metodología que las de este estudio, han logrado NPs-Au con un tamaño de 30 a 50 nm en promedio; sin embargo, en algunos casos, se pueden obtener NPs-Au de hasta 200 nm (Li et al., 2021; Muniyappan et al., 2021; Raval et al., 2018).



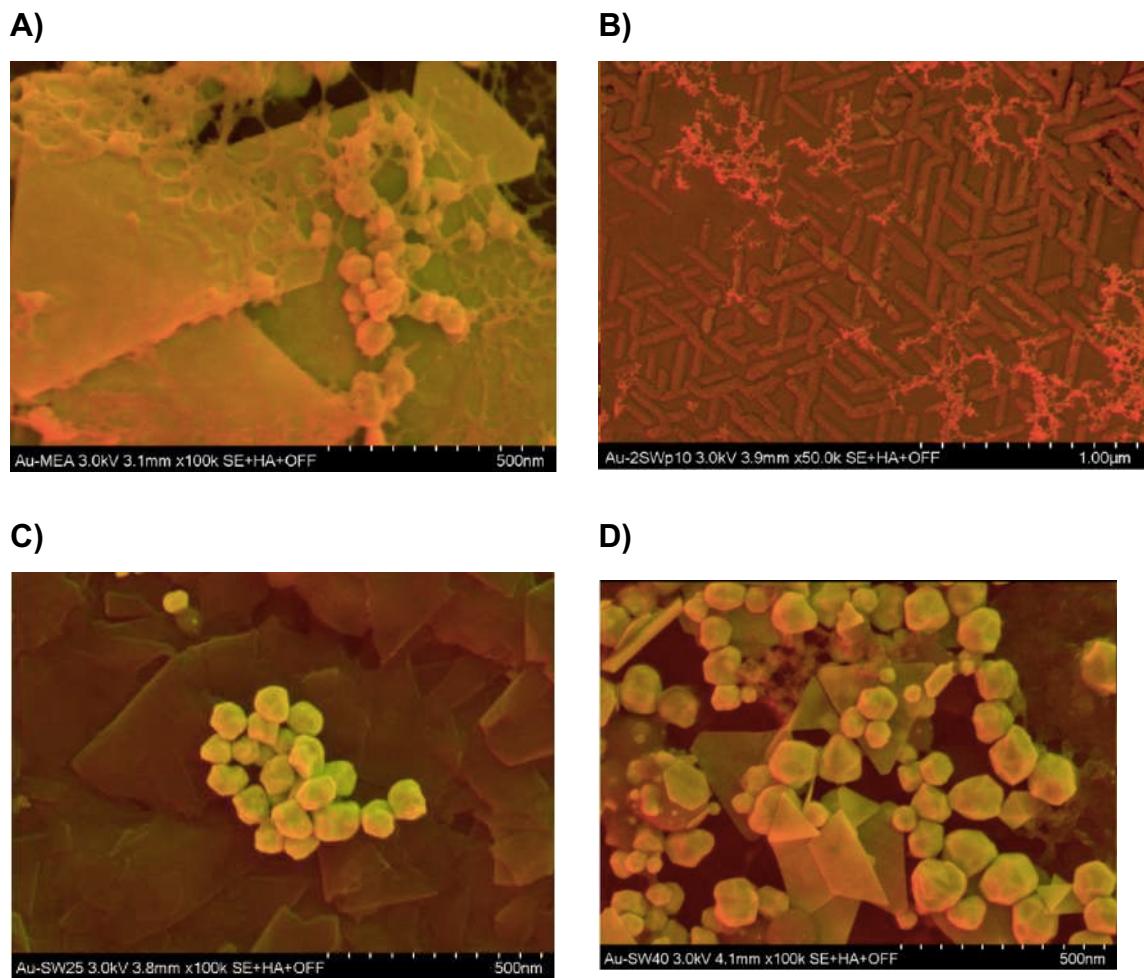
**Figura 10** Micrografías SEM de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de *Amphipterygium adstringens*, **(a)** Au@Mac-MeOH, **(b)** Au@US-EW, **(c)** Au@SWCD-EW, **(d)** Au@SWVD-EW.

En la **Figura 11**, se muestran las micrografías de SEM de las NPs-Au sintetizadas con los extractos de aranto. En la **Figura 11A**) las NPs-Au se encuentran dispersas y presentan diferentes morfologías: quasi-esferas, triángulos, icosaedros y decaedros, mayormente entre 80-200 nm, es importante mencionar que hubo NPs con morfologías más homogéneas (esferas). La muestra en la **Figura 11B**) tiene NPs de tamaño entre 10-30 nm, principalmente esféricas. En la **Figura 11C**) la muestra es similar a la de la **Figura 11A**) la diferencia es que son de menor tamaño (40-80 nm). Finalmente, las NPs-Au en la **Figura 11D**) son quasi-esféricas de tamaños entre 50-150 nm.



**Figura 11.** Micrografías de las NPs-Au sintetizadas con los extractos de *K. daigremontiana* A) NPs-Au Ochea4 TM\_105, B) NPs-Au SPea\_pH10, C) NP-Au Ochea6\_pH10 D) NPs-Au SPea\_TM60.

Las micrografías de la **Figura 12**, muestran que alterar las variables de pH, temperatura y tiempo de reacción en la síntesis verde resulta en NPs-Au de diferentes tamaños y formas. En la **Figura 12A**, se observan NPs de forma no definida y aglomeradas, posteriormente, se ajustó el pH de la reacción a 10 y se dejó que la reacción se lleva a cabo por 24 h, lo que resultó en las NPs-Au de tamaño menor a 50 nm, que se observan en la **Figura 12B**). El método de Turkevich se utilizó para sintetizar las NPs-Au que se muestran en la **Figura 12C) y D)**, en la primera micrografía se muestra la alícuota que se tomó cuando la reacción llevaba 25 min y en la segunda cuando llevaba 30 min, en ambos casos, se observan NP-Au cuasiesféricas con tamaños entre 50 y 100 nm.



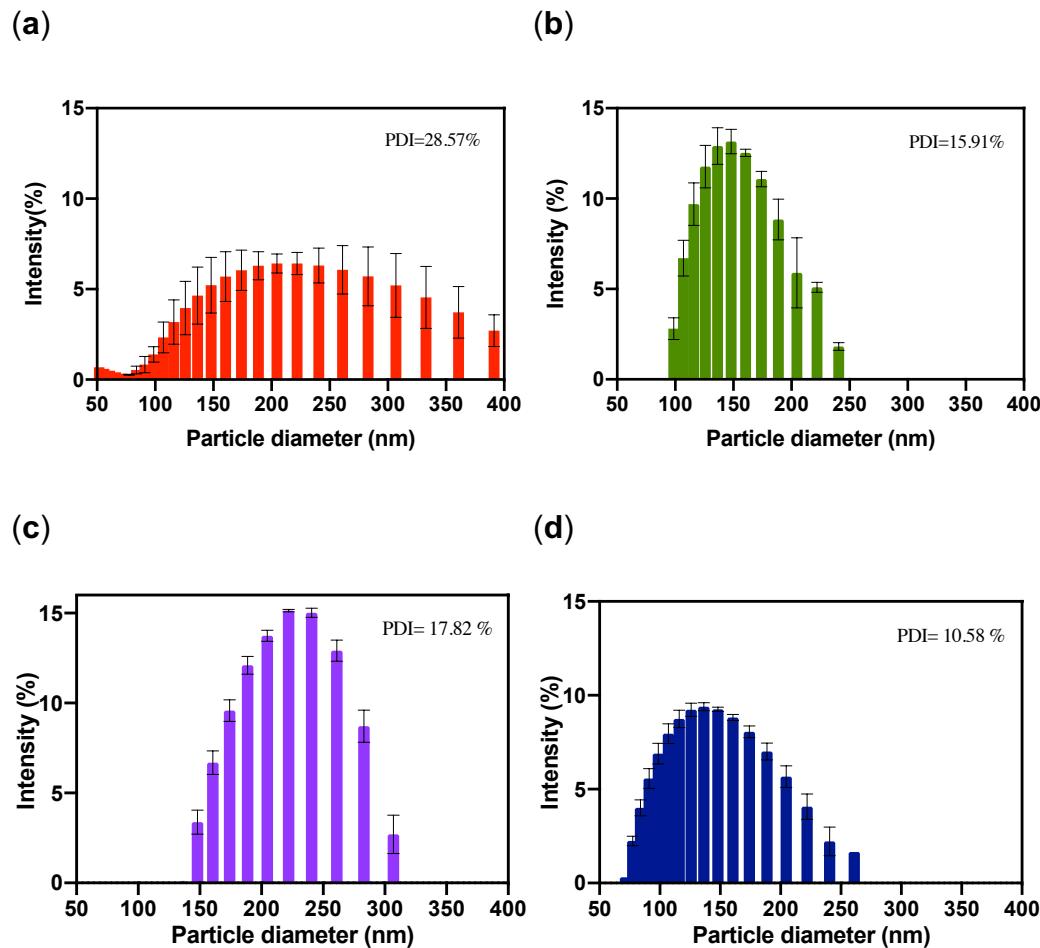
**Figura 12.** Micrografías de las NPs-Au sintetizadas con el extracto de *M. oleifera*, utilizando diversas técnicas de síntesis: A) síntesis tradicional pH7, B) síntesis tradicional pH10, C) Síntesis por el método de Turkevich con tiempo de síntesis de 25 min, D) Síntesis por el método de Turkevich con tiempo de síntesis de 30 min.

El método de síntesis verde de las NPs-Au utilizando como medio de reacción los extractos obtenidos de las tres plantas fue diferente debido a que el contenido de metabolitos secundarios en los extractos es variable. Lo anterior, se atribuye a que son plantas de diferente familia, además de que los métodos de extracción fueron diversos (Chemat et al., 2019; Molina et al., 2020; Gutiérrez-Prieto et al., 2019). Las variables que se ajustaron fueron: el tiempo, la temperatura o el pH, ya que el contenido de metabolitos secundarios en los extractos de las plantas, así como su capacidad antioxidante, es diferente, lo cual provoca que se tengan que ajustar las condiciones en cada uno de los casos (Vergara-Castaneda et al., 2019; Pal et al., 2018).

La distribución de tamaños de las NPs-Au es importante para determinar el control de la reacción de síntesis, así como para predeterminar si las NPs-Au obtenidas son viables para su uso en ensayos *in vitro*.

Se obtuvieron resultados contrastantes de la distribución de tamaño de NPs-Au y el índice de polidispersidad (PDI) por DLS, que indica la presencia de agregados en la solución. En general, todas las muestras de NPs-Au son polidispersas, ya que el PDI es >0,1 %, con Au@MeOH con el mayor PDI = 28,57 % y Au@SWCD-EW ejerciendo el PDI más bajo = 15,91 % (**Figura 13**). Estos resultados de PDI sugieren la presencia de agregados de NPs-Au, lo que puede ser confirmado por los resultados contrastantes de la distribución del tamaño de partícula, obtenidos por DLS y los resultados de las micrografías obtenidas por SEM (Botteon et al., 2021). En la **Figura 13**, los histogramas DLS muestran una mayor distribución general del tamaño de partícula de las NPs-Au en comparación con las registradas por SEM en la **Figura 11**. Mientras que DLS mostró un tamaño de partícula promedio de 125, 110, 75 y 85 nm para Au@Mac-MeOH, Au@SWCD-EW, Au@SWVD-EW y Au@US-W, respectivamente, el análisis SEM mostró un rango de tamaño de partícula general entre 50 y 100 nm para Au@SWCD-EW, Au@SWVD-EW y Au@US-W, y < 50 nm para Au@Mac-MeOH. La distribución de tamaños de las NPs-Au es importante para determinar el control de la reacción de síntesis, así como para predeterminar si las NPs-Au obtenidas cumplen con los estándares establecidos y si son viables para ser utilizadas en ensayos *in vitro*. La **Figura 14** y la **Figura 15** se presentan los resultados obtenidos por DLS de la distribución granulométrica y el índice de polidispersidad (PDI) de las NPs-Au sintetizadas con los extractos de aranto. El PDI indica la amplitud de la distribución de tamaños, donde un valor mayor al 10% indica una distribución de tamaño polidispersa (López-Miranda, et al., 2021b). En general, todas las muestras de NPs-Au son polidispersas, en la **Figura 14 C**) teniendo Ochea4 2:1 el mayor PDI= 26.9% y en la **Figura 15 C)** NPs-AuOchea4 TM\_105 obteniendo el menor PDI= 15.7%. Las NPs-Au sintetizadas con los extractos obtenidos con asistencia del homogeneizado ultrasónico, la muestra NPs-Au SPea 1:1 en la **Figura 14 B)** tuvieron mayor PDI= 25.35% en comparación con las NPs-Au Spea\_pH 10 en la **Figura 15 B)** con

PDI=17.5%; por último, el PDI para ambas muestras Ochea6 2:1 y NPs-Au Ochea6\_pH 10 fue de 19.8% en las **Figura 14 D)** y **Figura 15D)** respectivamente.

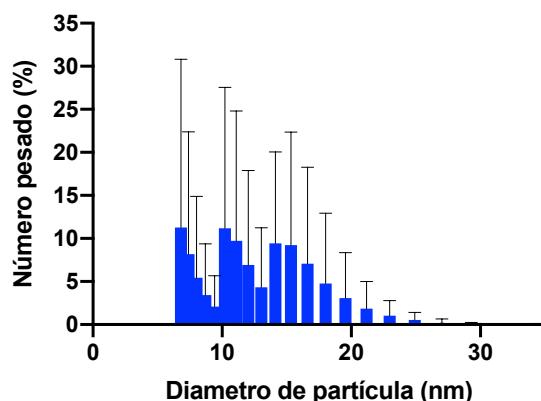


**Figura 13** Histogramas de DLS de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de *Amphipterygium adstringens*. **(a)** Macerado metanólico (Mac-MeOH), **(b)** Extracto agua:etanol asistido por ondas de choque con delay constante (SWCD-EW), **(c)** Extracto agua:etanol asistido por ondas de choque con delay variable (SWVD-EW), **(d)** Extracto acuoso asistido con homogeneizado ultrasónico (US-W).

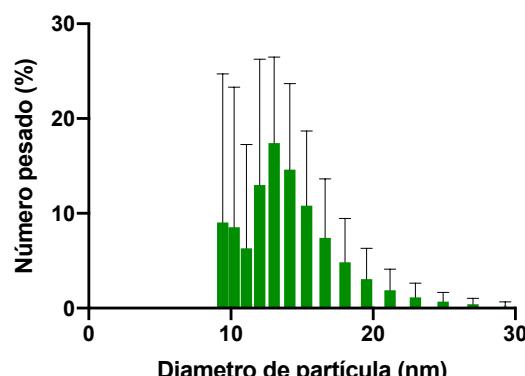
El pH afectó la dispersión de las NPs, como se observó al modificar el pH de la reacción de síntesis a valores más alcalinos, tanto para SPea como para Ochea4 por el Método TM. En general, los resultados obtenidos de PDI sugieren la presencia de agregados de NPs-Au, lo cual se confirma con los resultados de la distribución del tamaño de partícula obtenidos por DLS y los resultados de las micrografías obtenidas por SEM (**Figura 13** y **Figura 14**) (Raval et al., 2019).

En la **Figura 14** se muestran los histogramas DLS de las NPs-Au sintetizadas usando diferentes extractos de *Kalanchoe daigremontiana* a diferentes concentraciones. El tamaño medio de partícula para todas las muestras fue entre 5 y 15 nm. La NPs-Au sintetizadas con el extracto Ochea4 2:1 presentaron el menor tamaño promedio (6 nm), le siguieron las NPs-Au obtenidas con Me 1:1 con diferentes tamaños de (7, 11 y 15 nm); Ochea6 2:1 obtuvo un tamaño promedio de 9 nm y por último SPea 1:1 con tamaño promedio de 13 nm.

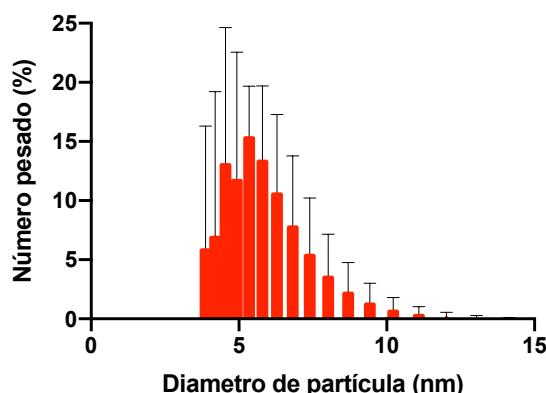
**A)**



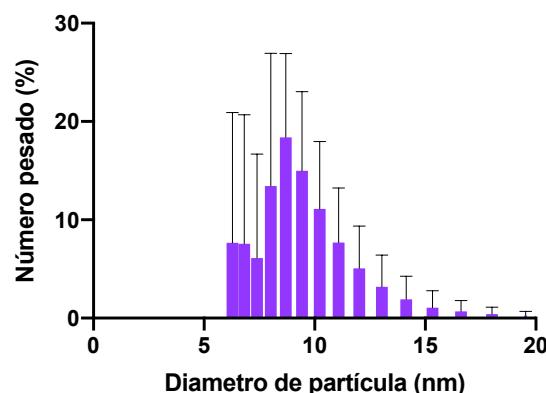
**B)**



**C)**



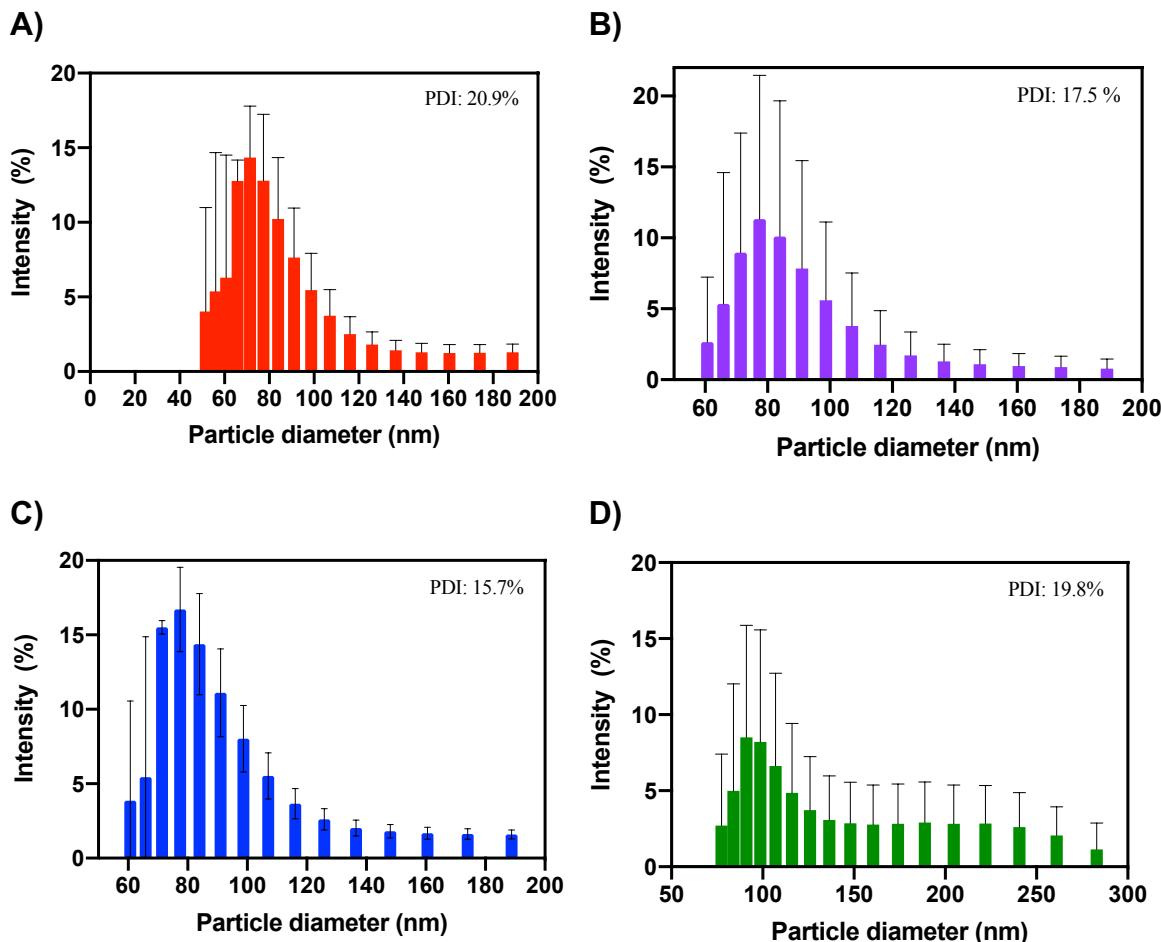
**D)**



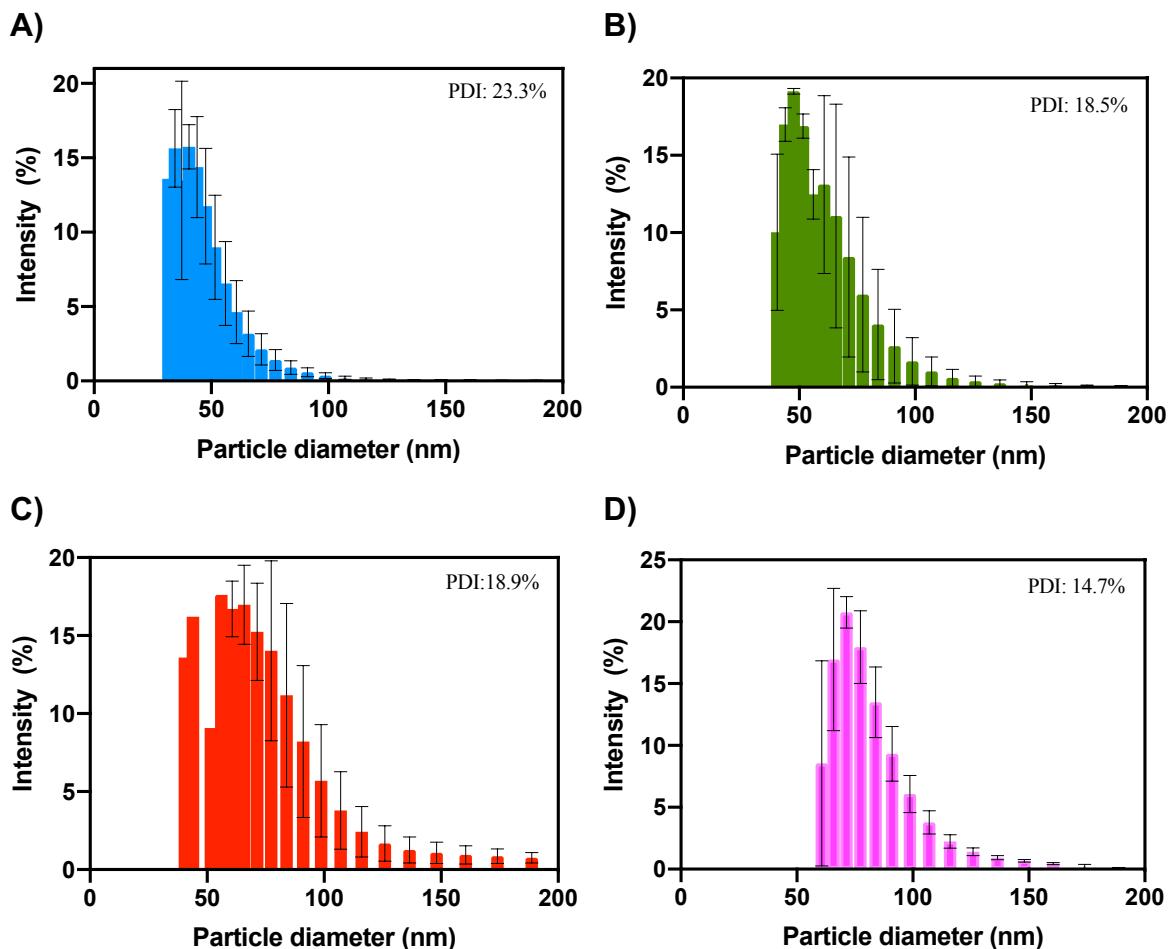
**Figura 14** Histograma DLS de las NPs-Au sintetizadas con A) Me 1:1, B) SPea 1:1, C) Ochea4 2:1 y D) Ochea6 2:1

Las nanopartículas sintetizadas a una concentración fija de 1:2 y cambiando variables como pH, temperatura y tiempo presentaron un tamaño medio de partícula mayor en comparación con las NPs-Au sintetizadas a temperatura ambiente. En la **Figura 15 (A)** y **(C)**, se aprecian el histogramas de las NPs-Au sintetizadas

utilizando el método de Turkevich modificado, usando los extracto SPEa y OChea4 (NPs-Au Spea\_TM60 y NPs-Au Ochea4 TM\_105); el tamaño promedio de partícula que presentan es de 75 y 75 nm. Los histogramas de las NPs-Au obtenidas con pH=10 con los extractos SPEa y OCHea6 (NPs-Au SPEa\_pH10 y NP-Au Ochea6\_pH10), en la **Figura 15 (B) y (D)** respectivamente, tuvieron un tamaño de partícula promedio entre 80 y 90nm.



**Figura 15** Histogramas de DLS de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de *Kalanchoe daigremontiana* **A)** Método de síntesis Turkevich modificado por 60 min, con el extracto obtenido por homogeneizado ultrasónico con agua etanol (NPs-Au SPEa\_TM60), **B)** Síntesis verde en medio alcalino pH10, con el extracto obtenido por homogeneizado ultrasónico con agua etanol (NPs-Au SPEapH10), **C)** Método de síntesis Turkevich modificado por 105 min, con extracto agua:etanol asistido por ondas de choque con delay constante (NPs-Au Ochea4\_TM105), **D)** Síntesis verde en medio alcalino pH10, con extracto agua:etanol asistido por ondas de choque con delay variable (NP-Au Ochea6\_pH10).



**Figura 16.** Histogramas de las NPs-Au obtenidas con el extracto de *Moringa oleifera* asistido por ondas de choque con delay constante, utilizando una mezcla de etanol agua (1:1), por el método de Turkevich modificado con diferentes tiempos e reacción: A) 25 min (NPs-Au Ochea\_TM25), B) 30 min (NPs-Au Ochea\_TM30), C) 35 min (NPs-Au Ochea\_TM35) y D) 40 min (NPs-Au Ochea\_TM40).

La **Figura 16**, muestra los histogramas de las NPs\_Au que se sintetizaron con el extracto de *M. oleifera* obtenido por medio de ondas de choque con un protocolo de tandem a delay constante. Las NPs-Au se sintetizaron por el método de Turkevich modificado, y se tomaron alícuotas de la reacción en diferentes tiempos de la síntesis cada 5 min, iniciando en 25 min hasta 35 min (**Figura 16 A-D**). El método de Turkevich utiliza variables de temperatura y tiempo para llevar a cabo la síntesis, tomando alícuotas a diferentes tiempos, permite que se encuentre el tiempo de reacción adecuado para obtener las NPs-Au del tamaño que se busca (Pal et al., 2018; Vergara-Castaneda et al., 2019).

Los histogramas presentan en todos los casos, discrepancia en el promedio del tamaño de partícula en relación al que se muestra en las micrografías; lo anterior, es debio a que existe una matriz orgánica compuesta de metabolitos secundarios pertenecientes al extracto, que permanece unida a las NPs-Au. Tomando en consideración estas evidencias, se decidió trabajar con las NPs-Au de cuachalalate (SWCD-EW y US-W), de aranto (SPea\_pH10 y Ochea4\_TM105) y de moringa (Ochea\_TM25 y Ochea\_TM30).

#### 7.1.4. Potencial Zeta

La estabilidad de las NPs-Au a diferentes pH se determinó a través del potencial Z. Mientras que las NP que tienen potenciales entre + 30 y -30 mV se consideran inestables y tienden a formar agregados, las NP con potenciales > + 30 mV y < -30 mV pueden considerarse coloides estables. En la **Tabla 6**, Au@MeOH en todos los valores de pH tenía un potencial Z < -30 mV, lo que indica un coloide estable. Con respecto a las muestras Au@SWCD-EW, Au@SWVD-EW y Au@US-W a pH = 4, el potencial Z fue > -30 mV, lo que indica una solución inestable. En particular, Au@SWCD-EW y Au@US-W exhibieron valores de potencial Z < -30 mV cuando el pH de la solución era 7.4. Teniendo en cuenta la evidencia recopilada del análisis de potencial SEM, DLS y Z, las NPs-Au que fueron adecuadas para el análisis biológico fueron Au@SWCD-EW y Au@US-W, porque contienen principalmente NP casi esféricas que oscilan entre 50 y 100 nm y exhibir una suspensión coloidal estable a pH = 7,4.

La **Tabla 6**, muestra los valores de las muestras de *K. daigremontiana* de potencial Zeta para la muestra NPs-Au Spea\_TM60 y NPs-Au Ochea6\_pH10 que tienen un valor > -30 mV a pH 4, lo que resulta en una solución inestable, es decir, que se aglomeran. Todas las muestras a pH7 tiene un valor de potencial Zeta < -30 mV lo que indica que las muestras son estables. En general, los extractos de *M. oleifera*, registraron un potencial Z mayor a -30 en el pH7.4, lo cual sugiere estabilidad bajo esas condiciones.

**Tabla 6.** Potencial Z de las NPs-Au sintetizadas por diversos métodos, usando como medio de síntesis extractos verdes de *Amphipterygium adstringens*, *Kalanchoe daigremontiana* y *Moringa oleifera*.

Planta	Muestra	ZP a pH4 (mV)	ZP a pH7.4 (mV)	ZP a pH11 (mV)
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Au@US-W	-27.3	-33.9	-42.5
	Au@SWCD-EW	-25.9	-30.8	-30.7
	Au@SWVD-EW	-24.7	-31.4	-36.7
	Au@MeOH	-36.4	-43.7	-53.6
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	NPs-Au SPea_TM60	-32.4	-36.5	-38.3
	NPs-Au SPea_pH10	28.7	30.1	34.5
	NP-Au Ochea6_pH10	-31.9	-47.0	-37.5
	NPs-Au Ochea4_TM105	-30.5	-45.4	-44.6
<i>Moringa oleifera</i>	NPs-Au Ochea_TM25	-28.7	-38.6	-45.0
	NPs-Au Ochea_TM30	-17.9	-39.8	-42.1
	NPs-Au Ochea_TM35	-26.5	-38.4	-48.3
	NPs-Au Ochea_TM40	-28.2	-43.9	-51.1

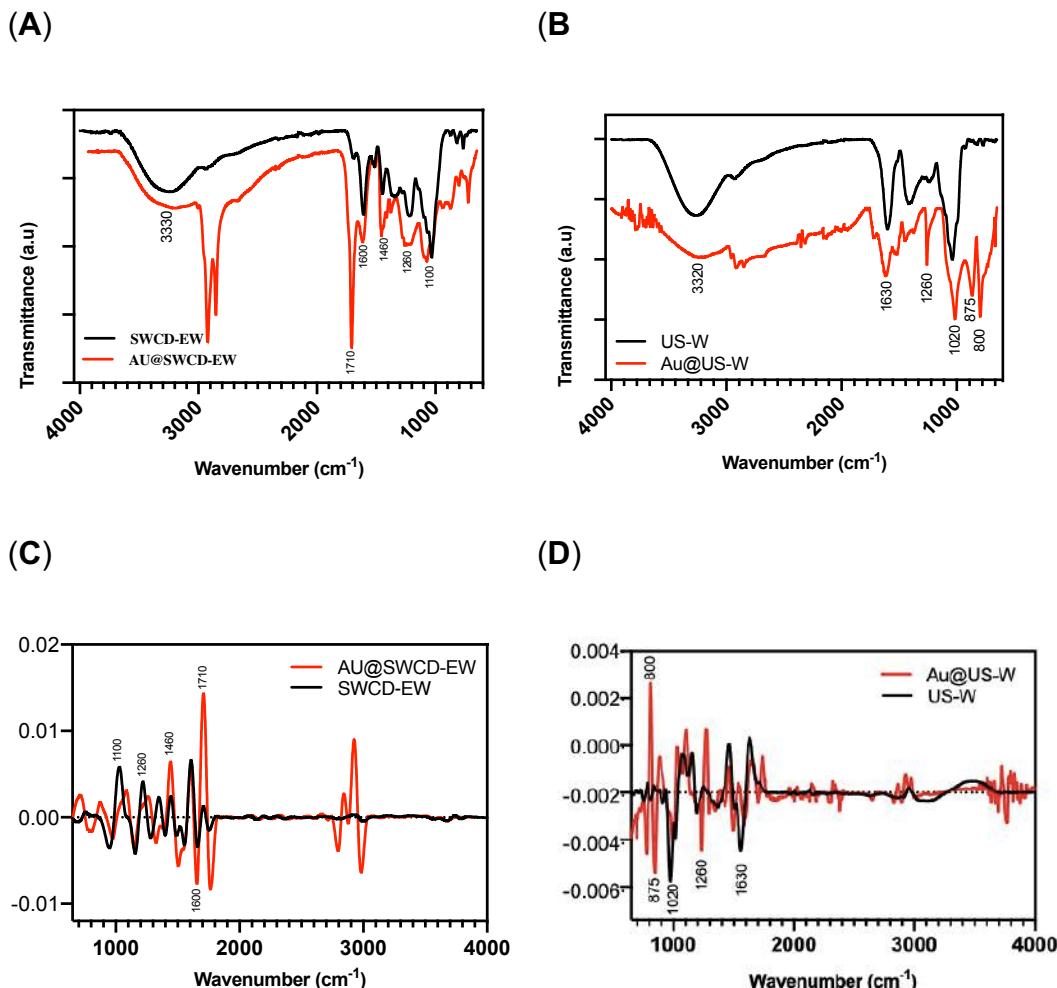
### 7.1.5. Espectroscopía FT-IR

Para determinar qué grupos funcionales estaban potencialmente involucrados en la síntesis de NPs-Au, registramos los espectros FTIR de NPs-Au y extractos para las muestras Au@SWCD-EW, SWCD-EW, Au@US-W y US-W. En la **Figura 17A**, los espectros de Au@SWCD-EW y SWCD-EW casi se superponen. Es importante mencionar que la muestra de Au@SWCD-EW se depositó sobre un cubreobjetos de vidrio, y las bandas en el rango de 2900–2850 cm<sup>-1</sup> corresponden a las vibraciones de SiO del cubreobjetos, sobre el que se depositó la muestra. Las bandas de absorción en los espectros de Au@SWCD-EW y el extracto de SWCD-EW son similares en la región entre 1600 y 1100 cm<sup>-1</sup>; sin embargo, estas diferencias se deben a la intensidad de las bandas. Se puede observar una banda ancha entre 3700 y 3050 cm<sup>-1</sup> (centrada en 3300 cm<sup>-1</sup>), tanto en el extracto como en los espectros de NPs-Au, debido a las vibraciones de estiramiento de -OH, que

pueden estar relacionadas con metabolitos secundarios como fenoles, ácidos carboxílicos y compuestos de polioles, que se sabe que estabilizan las NPs-Au (López-Miranda, et al., 2021). Específicamente, en los espectros de Au@SWCD-EW, aparece una banda de absorción nítida a  $1710\text{ cm}^{-1}$ , que es característica de las amidas cíclicas que se sabe que participan en la estabilización y síntesis de las NPs-Au (Philip, 2010). La banda de absorción media nítida a  $1600\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los iones carboxilato, presentes tanto en el extracto como en las NPs-Au. Las bandas de absorción entre  $1400$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$  son características de las vibraciones de estiramiento de anillos aromáticos, categóricamente en los espectros NPs-Au. Un aumento en la intensidad de las bandas en esta área, indica un cambio en el patrón de sustitución de compuestos aromáticos que se sabe que interactúan con NPs-Au. Las bandas que surgen del estiramiento C-O y la flexión OH de los ácidos carboxílicos aparecen cerca de  $1320$ - $1100\text{ cm}^{-1}$  para los espectros de extracto y NPs-Au. Se registran bandas anchas de absorción media entre  $1270$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  (Silverstein et al., 2015).

Los espectros de NPs-Au en la **Figura 17B**, al igual que en las muestras de ondas de choque, se observaron bandas de absorción entre  $3700$  y  $3050\text{ cm}^{-1}$  (centradas en  $3330\text{ cm}^{-1}$ ), lo que sugiere la presencia de compuestos de poliol y ácidos carboxílicos. En el extracto y las NPs-Au se muestra una banda de absorción media nítida a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los iones carboxilato del ácido carboxílico. Además, aparecen bandas entre  $1300$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  debido a las interacciones de flexión OH y estiramiento C-O. Además, se observan dos fuertes bandas de absorción en  $875$  y  $800\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a la flexión fuera del plano C-H de los compuestos aromáticos que normalmente aparecen en la región entre  $900$  y  $650\text{ cm}^{-1}$ . Es importante destacar que, a diferencia de Au@SWCD-EW, los espectros de Au@US-W no muestran la banda de absorción de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , lo que se puede atribuir al uso de diferentes métodos de extracción, para obtener el extracto de *A. adstringens* y se puede respaldar con la concentración discrepancia de flavonoides y fenoles en los extractos. Además, para confirmar la posición de la banda, se calcularon las segundas derivadas de los espectros FTIR del extracto y NPs-Au

(Figura 17 C, D), en las que las posiciones de la banda (Figura 17 A, B) son más notorias.



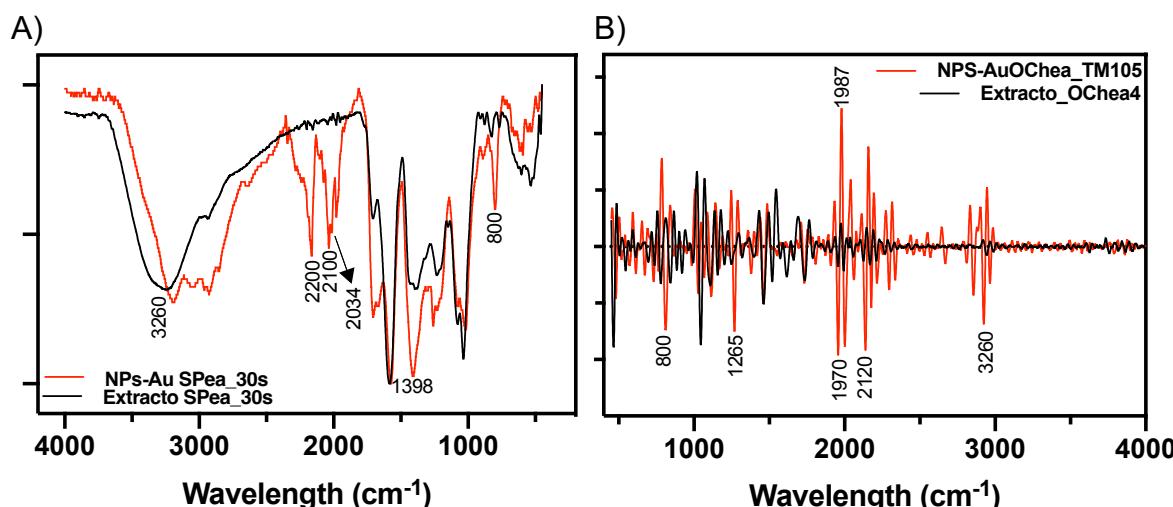
**Figura 17.** Espectros de FTIR de *A. adstringens* (**A**) extractos asistidos con ondas de choque y NPs-Au (SWCD-EW and Au@SWCD-EW, respectivamente) y (**B**) extracto asistido con homogeneizado ultrasónico y NPs-Au (US-W and Au@US-,W respectivamente). Segunda derivada de los espectros de FTIR de (**C**) extractos asistidos con ondas de choque y NPs-Au (SWCD-EW and Au@SWCD-EW, respectivamente) y (**D**) extracto asistido con homogeneizado ultrasónico y NPs-Au (US-W and Au@US-,W respectivamente).

En la **Figura 18A**) se superponen los espectros SPea y NPs-Au Spea\_pH10, y en la **Figura 18B**) los espectros del extracto OCHea4 y NPs-Au Ochea4\_TM105. Las bandas de absorción del extracto como de ambas muestras de NPs-Au son similares entre la región 3750-2750 y 1750-800 cm<sup>-1</sup>, sin embargo, las diferencias radican en la intensidad de las bandas. Se puede observar una banda ancha entre

3500 y 3000 cm<sup>-1</sup> (centrada en 3260 cm<sup>-1</sup>), tanto en el extracto como en los espectros de NPs-Au, correspondientes a vibraciones de estiramiento de -OH (grupos hidroxilo), esto puede estar relacionado con metabolitos secundarios como fenoles y ácidos carboxílicos, y compuestos de poliol, que se sabe participan en la estabilización de las NPs-Au (Baek & Patra, 2015).

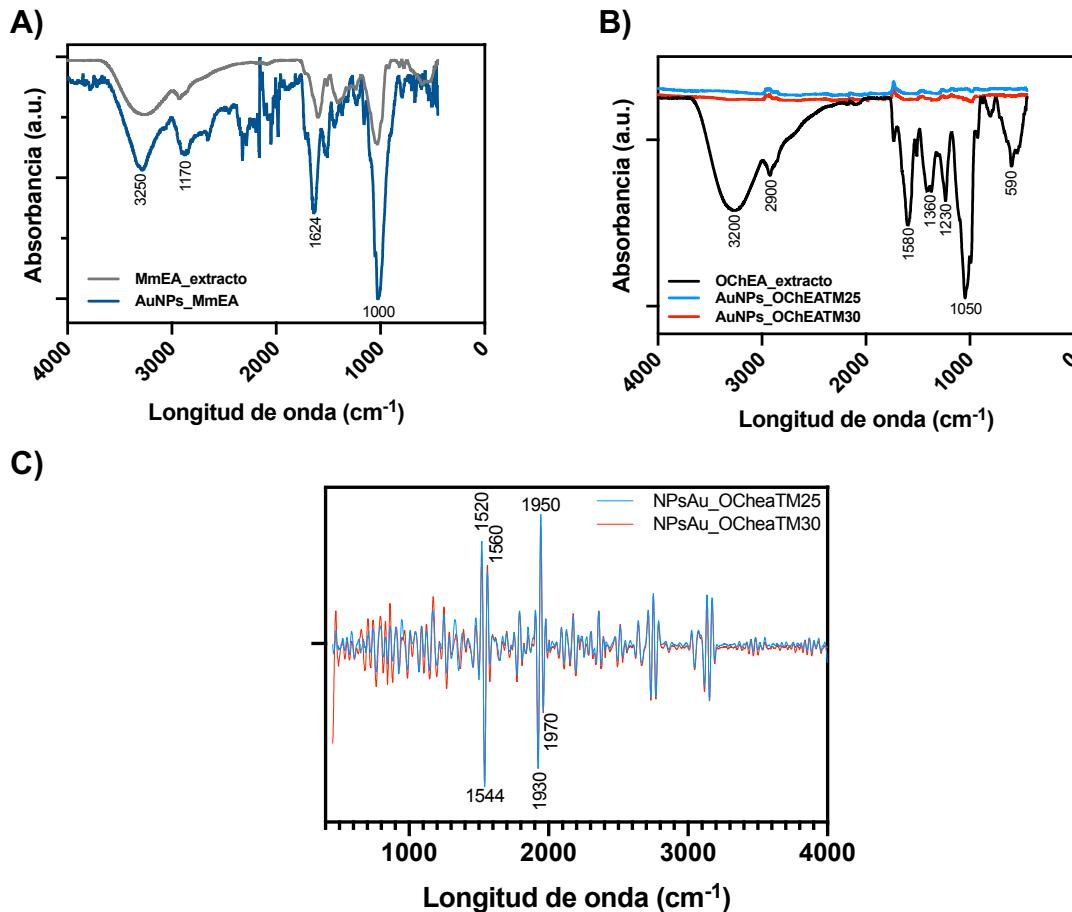
Especificamente, para los espectros NPs-Au SPea\_pH10 y NPs-Au SPea\_TM60, aparecen dos bandas de absorción entre 2200 y 1970 cm<sup>-1</sup>. Las bandas de absorción a 2100 cm<sup>-1</sup> (NPs-Au SPea\_pH10) y 2120 cm<sup>-1</sup> (NPs-Au SPea\_TM60), podrían corresponder a enlaces de estiramiento C≡C de compuestos acetilénicos (Coates, 2006). Por otro lado, las bandas de absorción a 2034 cm<sup>-1</sup> (NPs-Au SPea\_pH10) y 1987 cm<sup>-1</sup> (NPs-Au SPea\_TM60), una combinación de bandas de compuestos aromáticos.

Finalmente, para los espectros se prestan bandas entre 1580–1530 cm<sup>-1</sup> para vibraciones del anillo C–C o C=C (estiramiento del esqueleto). Las bandas entre 1410-1370 cm<sup>-1</sup> son coherentes con las oscilaciones simétricas/asimétricas de los iones carboxilato, mientras que a 535 cm<sup>-1</sup> se produce la vibración de deformación de este grupo. Las bandas de absorción entre 1265-1250 cm<sup>-1</sup> y 1035 cm<sup>-1</sup> se pueden atribuir a oscilaciones C–OH y la banda en 800 cm<sup>-1</sup> se puede atribuir a vibraciones de estiramiento C–C (Das et al., 2011; Vergara-Castañeda et al., 2019).



**Figura 18** Espectros FTIR de las NPs-Au sintetizadas con el extracto SPea A) NPs-Au SPea\_pH10 y B) Segunda derivada del espectro de infrarrojo del extracto de ondas de choque, así como de las nanopartículas de oro (NPs-Au SPea\_TM 60).

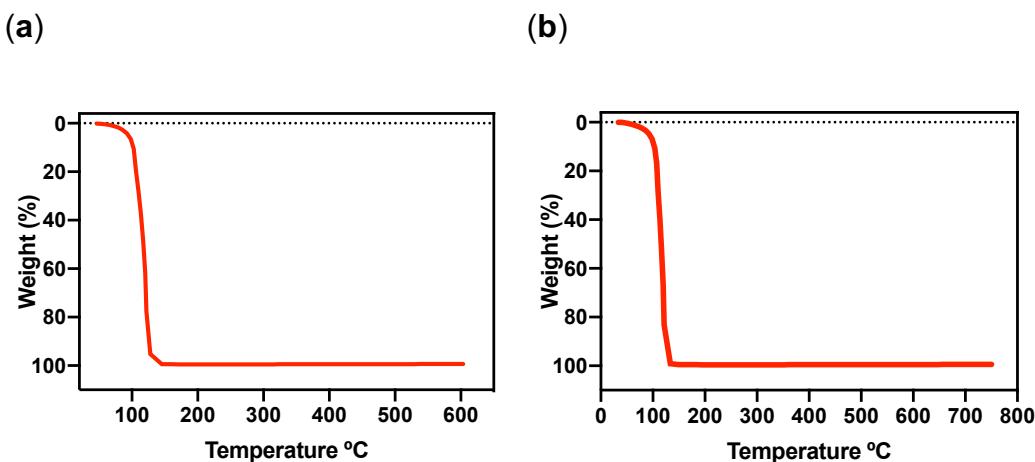
En la **Figura 19**, se observan los espectros de IR correspondientes a los extractos verdes obtenidos de la planta *M. oleifera*. En la **Figura 19A**), se aprecian superpuestos los espectros del extracto obtenido por macerado con el de las nanopartículas de oro sintetizadas en ese mismo extracto. La **Figura 19B)** empalma los espectros correspondientes al extracto obtenido por medio de ondas de choque con ataques en tandem a delay constante, así como las NPs-Au que se obtuvieron. Los espectros de las nanopartículas en ambos casos, tienen bandas de absorción que aparecen de manera constante en los espectros de IR de nanopartículas, como se mencionó anteriormente para el caso de *A. adstringen* y *K.daignemontiana*.



**Figura 19.** Espectros de infrarrojo de los extractos de *Moringa oleifera* y las nanopartículas obtenidas por síntesis verde utilizando los extractos como medio de reacción. **A)** Espectro del extracto macerado con agua:etanol 1:1 (MmEA\_extracto) y nanopartículas (AuNPs\_MmEA), **B)** Espectro obtenido por medio de ondas de choque con ataque tandem delay constante, nanopartículas de oro sintetizadas en el extracto por el método de Turkevich modificado a 25 y 30 min (NPsAu\_OChea\_TM25 y NPsAu\_OChea\_TM30). **C)** segunda derivada del espectro de las nanopartículas de oro sintetizadas en el extracto por el método de Turkevich modificado a 25 y 30 min (NPsAu\_OChea\_TM25 y NPsAu\_OChea\_TM30).

### 7.1.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

Antes de utilizar estas NPs-Au en ensayos biológicos, era importante determinar la concentración de NPs-Au presentes en la muestra para esto, se realizó el análisis termogravimétrico. En la **Figura 20**, los resultados para ambas muestras (Au@SWCD-EW y Au@US-W) muestran una disminución porcentual menor entre 80 y 100 °C, correspondiente a la humedad de la muestra. Se registró un alto porcentaje de disminución entre 110 y 125 °C, lo que se puede atribuir a la descomposición de compuestos orgánicos debido a la alta temperatura, como se ha informado previamente con nanopartículas metálicas (Patra y Baek, 2015; Sampaio y Viana, 2018). El porcentaje de pérdida de peso total para Au@SWCD-EW fue del 99,48 %. El peso restante correspondió a 0,3110 mg, que fue de 7,8 µg/µL. Para la muestra de Au@US-W, la pérdida de peso total, fue del 99,57 % y la concentración de NPs-Au fue de 6,1 µg/µL.

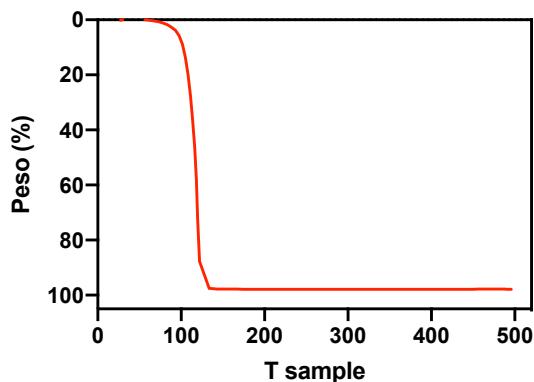


**Figura 20.** Análisis termogravimétrico de las NPs-Au sintetizadas con diferentes extractos de *Amphipterygium adstringens* (a) SWCD-EW, (b) US-W.

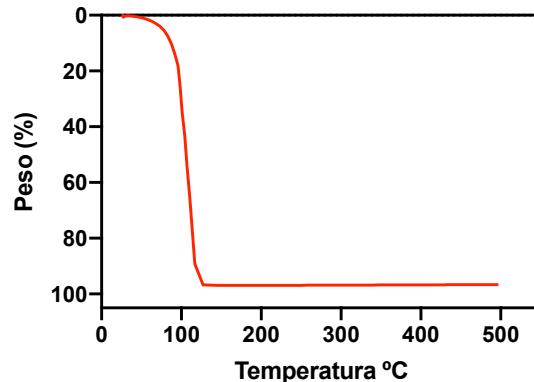
En la **Figura 21 A) y B)** los resultados para ambas muestras (NPs-Au SPea\_pH10 y NPs-Au SPea\_TM60) mostraron una ligera disminución porcentual entre 80-100°C, correspondiente a la humedad de la muestra. Posteriormente se registró una caída porcentual significativa entre 110-125°C, que se puede atribuir a la descomposición de los compuestos orgánicos por la alta temperatura. El porcentaje

de pérdida total de peso para NPs-Au SPea\_pH10 fue de 97.84%, el peso restante correspondió a 0.8179 mg, correspondiente a 20.45  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de  $\text{Au}^0$ . Para la muestra de NPs-Au SPea\_TM60, la pérdida de peso total fue de 96.66%, el peso restante correspondió a 1.1343 mg, por lo cual la concentración de  $\text{Au}^0$  fue de 28.36  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En la **Figura 21 C)**, se muestra el termograma de las NPs-Au obtenidas del extracto de *M. oleifera*, el peso seco de final fue de 32.85  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de  $\text{Au}^0$ . La muestra inició con una disminución significativa del porcentaje de su peso en 100 °C, hasta 120°C cuando la muestra perdió el 99 % de su peso, el cuál se atribuye al peso del agua contenida en la muestra.

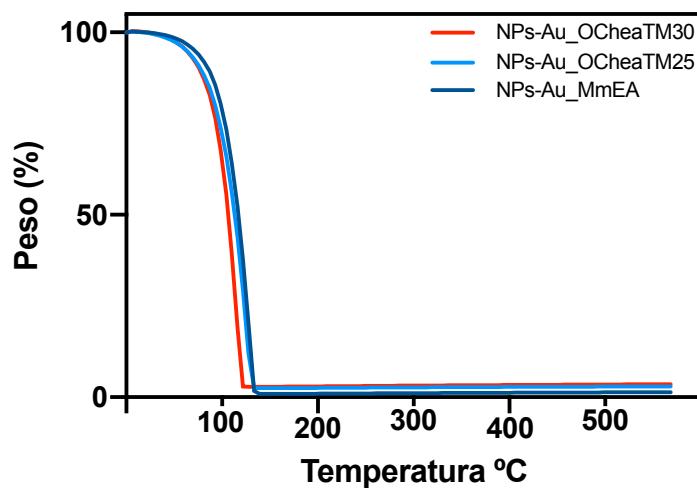
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 21.** Termogramas de **A)** NPs-Au SPea\_pH10 y **B)** NPs-Au SPea\_TM60 de *K. daigremontiana*, **C)** nanopartículas de oro obtenidas utilizando diversas técnicas de síntesis verde usando como medio de reacción extractos de *M. oleifera*.

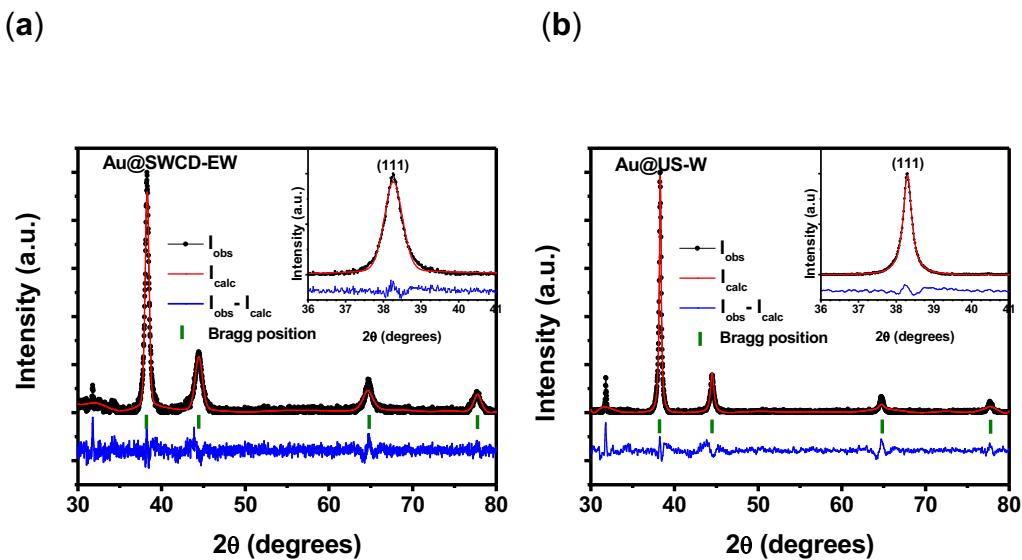
### 7.2.7. Difracción de Rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X (XRD) de Au@SWCD-EW y Au@US-W se muestran en la **Figura 22**, que ilustra claramente que las NPs-Au sintetizadas son de naturaleza cristalina. Ambos patrones XRD muestran picos de difracción en valores de  $2\theta$  de  $38,22^\circ$ ,  $44,42^\circ$ ,  $64,63^\circ$  y  $77,64^\circ$ , que se pueden indexar a los planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311), respectivamente, de la red cúbica de centro de cara (fcc) de Au (JCPDS 65-8601); en el ensanchamiento de las reflexiones de Bragg hay una marcada diferencia debido al tamaño de los cristalitos y la presencia de partículas facetadas en ambas muestras (figura del recuadro). El perfil de refinamiento de Rietveld de los patrones XRD se calculó para el análisis de la estructura cristalina (Doebelin y Kleeberg, 2015).

Como se puede observar, existe una buena concordancia entre los datos experimentales y el refinamiento calculado. Los tamaños promedio obtenidos de los cristalitos fueron  $18.97 \pm 2.47$  nm y  $39.91 \pm 5.75$  nm para Au@SWCD-EW y Au@US-W, respectivamente. Estos resultados indican un tamaño de cristalito más pequeño en la muestra sintetizada usando extracción asistida por ondas de choque y etanol:agua, como se mostró previamente por SEM; por lo tanto, la mayoría de las nanopartículas sintetizadas son policristalinas. Hay una reflexión de Bragg que no corresponde a la estructura de Au, que se ubica en valores de  $2\theta$  de  $31.72^\circ$  y puede indexarse a la estructura de NaCl (JCPDS 75-0306). Este compuesto es un producto de desecho durante el proceso de síntesis (Doebelin y Kleeberg, 2015).

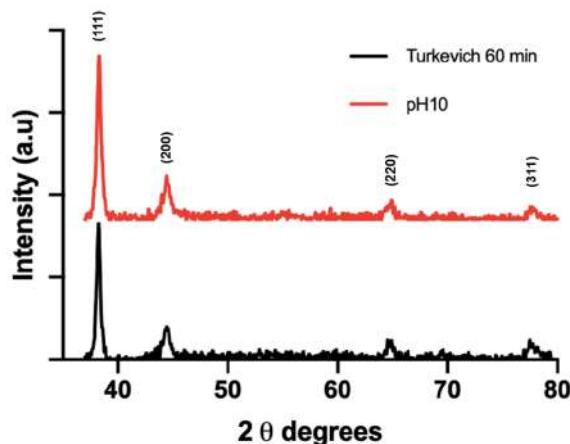
Posteriormente, por medio de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos x (XPS, por sus siglas en inglés) se examinó la composición de la superficie de las nanopartículas de oro. La Figura S4 muestra los espectros de la encuesta de las muestras con señales de Au 4f, Si 2p, C 1s y O 1s. El espectro de alta resolución del nivel del núcleo de oro 4f, se deconvolucionó con dos picos dobles correspondientes al acoplamiento espín-órbita (Au 4f 7/2 y Au 4f 5/2) y reveló una oxidación parcial del oro. El primer y más importante pico doblete (BE de 84 eV) está relacionado con el oro elemental ( $\text{Au}^0$ ), mientras que el otro está relacionado con un estado de oxidación de oro estable de  $\text{Au}^{3+}$  (BE de 87,3 eV).

Por otro lado, la presencia de carbono y oxígeno en cada muestra se atribuye a los compuestos orgánicos que rodean a las NPs-Au.



**Figura 22.** Patrones de difracción de rayos X de a) Au@SWCD-EW and b) Au@US-W.

En la **Figura 23.** se observan los resultados del patrón de difracción de rayos-X de las NPs-Aus (Turkevich 60min y pH10) obtenidas por síntesis verde. En los patrones de difracción de ambas muestras se pueden observar picos en  $38.22^\circ$ ,  $44.42^\circ$ ,  $64.63^\circ$ , and  $77.64^\circ$  ( $2\theta$ ), que corresponden al plano cristalino cúbico centrado en la cara (fcc), (111), (200), (220) y (311) respectivamente, del  $\text{Au}^0$  (JCPDS 65-8601).



**Figura 23.** Difractograma de NPs-Au sintetizadas con el extracto SPea de *K. daigremontiana*.

## 7.2. Ensayo de viabilidad en células de leucemia tratadas con extractos de NPs-Au (Au@SWCD-EW y Au@US-W), SWCD-EW y US-W

La actividad citotóxica y antiproliferativa de varias NPs ha sido ampliamente reportada sobre diferentes tipos de células cancerosas (Lehotay & Lee, 1997). Según la caracterización fisicoquímica de las NPs-Au, solo había dos muestras (Au@US-W y Au@SWCD-EW) que cumplían con los requisitos de tamaño, forma y estabilidad para que las nanopartículas de oro se analizaran en ensayos biológicos. Para determinar el efecto de las NPs-Au en la viabilidad de las células leucémicas, se probaron diferentes concentraciones de NPs-Au, así como el extracto (n=3). Ambos extractos redujeron la viabilidad de Jurkat de forma dependiente de la dosis. En la **Figura 18a**, el extracto US-W rIC<sub>50</sub> se obtuvo a 202 µg/mL, mientras que el extracto rIC<sub>50</sub> SWCD-EW fue 234 µg/mL. Tanto el extracto US-W como el extracto SWCD-EW a 1 mg/mL inhibieron el 80 % y el 75 % de la viabilidad, respectivamente, después de 24 h de tratamiento.

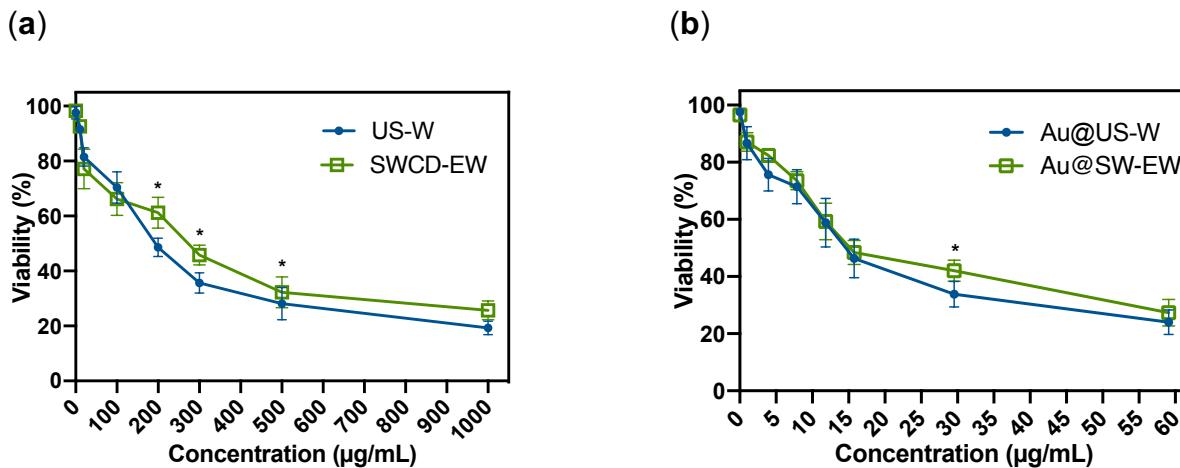
Además, se ha reportado que el extracto metanólico macerado de *A. adstringens* puede exceptuar la inhibición total del crecimiento de diferentes modelos de cáncer *in vitro*, como adenocarcinoma de ovario (células resistentes a NCI/ADR), adenocarcinoma de riñón (células 786-O), y cáncer de próstata (células PC-3), a una concentración de 27,5 ± 0,7 µg/mL. Sin embargo, se requirieron concentraciones >250 µg/mL para lograr la inhibición total del crecimiento en células de leucemia mieloide crónica (células K562) (Rodriguez-Garcia et al., 2015).

Las NPs-Au obtenidas por síntesis verde utilizando ultrasonido y extracción por ondas de choque (**Figura 24b**) alcanzaron IC<sub>50</sub> en una concentración más baja en comparación con la de los extractos. Tanto Au@US-W como Au@SWCD-EW redujeron la viabilidad de Jurkat de forma dependiente de la dosis, alcanzando valores de IC<sub>50</sub> de 17,14 µg/mL (87 µM) y 18,66 µg/mL (94,7 µM), respectivamente, después de 24 h de tratamiento. La inhibición máxima de la viabilidad celular fue del 75% para ambos NPs-Au. Sin embargo, Alam-Escamilla informó una disminución en la proliferación a una IC<sub>50</sub> de 150 µM en leucemia mieloide crónica tratada con

ácido 6-pentadecil salicílico (6-SA) purificado a partir de extracto de hexano de *A. adstringens* después de 48 h de tratamiento (Alam-Escamilla et al., 2015). Además, se ha administrado 6-SA purificado de *A. adstringens* a modelos de cáncer *in vivo* (tumor 4T-1). Por ejemplo, el volumen del tumor en ratones tratados con 6 mg/kg se redujo en un 52 % después de 3 semanas de tratamiento (Galot-Linaldi et al., 2021).

Las NPs-Au pueden inducir estrés oxidativo y, por lo tanto, la fosforilación de p48 para desencadenar la apoptosis en muchos cánceres; es necesario determinar qué tipo de muerte celular es inducida por Au@US-W y Au@SWCD-EW (Surapaneni et al., 2018).

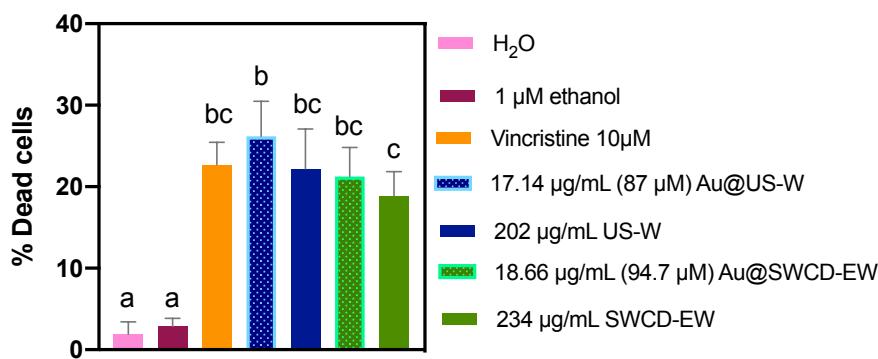
Tanto los extractos US-W como SWCD-EW tienen capacidad antioxidante no enzimática, y es importante considerar que los antioxidantes en altas concentraciones pueden causar daño directo al ADN y más muerte celular (Watson, 2013).



**Figura 24.** Curva dosis-respuesta de los extractos y de las NPs-Au a diferentes dosis IC<sub>50</sub> en células Jurkat. (a) extracto de US-W y extracto de SWCD-EW, (b) Au@US-W y Au@SWCD-EW. La media +/- SE se muestra en cada punto. El porcentaje de células muertas se determine con el ensayo de azul tripano.

Ambos controles negativos mataron el mismo porcentaje de células normales (CRL-1991) que de las células Jurkat, ambos controles indujeron muertes celulares significativamente menores que todos los demás tratamientos probados en este estudio. En las células normales, el tratamiento con Vincristina (10 μM) indujo la muerte celular sin diferencias marcadas con respecto a las NPs-Au (Au@US-W

17.14 µg/mL (87 µM) y Au@SWCD-EW 18.66 µg/mL (97.4 µM) y los extractos (US-W 202 µg/mL y SWCD-EW 234 µg/mL). Los extractos y las NPs-Au indujeron muerte celular, sin embargo, el tratamiento de las células con Au@US-W 17.14 µg/mL (87 µM) logró el efecto citotóxico máximo de muerte celular del 25 %. Como se muestra en la **Figura 25** las NPs-Au o el extracto no indujeron un 50 % de muerte celular en células normales, a diferencia de lo que se observó en las células Jurkat, lo que indica que, al menos las células normales de linfoblastos son resistentes a tales tratamientos y las células leucémicas son más sensibles. Los cambios en el equilibrio redox modifican la tasa de proliferación y supervivencia en las células cancerosas, mientras que en las células normales no se observa un cambio significativo, lo que puede explicar la relativa resistencia de las células CRL-1991 a la muerte celular después del tratamiento con los extractos (Sullivan y Chandel, 2014). Sin embargo, las NPs-Au pueden promover la generación de especies reactivas de oxígeno para desencadenar la muerte celular en ambas líneas celulares, pero en este trabajo no se determinó el mecanismo concreto de la muerte celular. Más estudios sobre los mecanismos de muerte celular ayudarán a comprender por qué las células CRL-1991 son menos sensibles a la muerte celular (Ott et al., 2007). En un tratamiento quimioterapéutico hipotético con NPs-Au y extractos, la citotoxicidad puede ser menos agresiva en las células hematopoyéticas, pero se deben incluir diferentes líneas celulares en estudios futuros. Las NPs-Au están bien caracterizadas y son buenas candidatas para estudios biológicos más extensos relacionados con la terapia del cáncer.



**Figura 25.** Efecto citotóxico de los controles positivos, negativos y de las rIC<sub>50</sub>s de las NPs-Aus y los extractos en células CRL-1991. En cada punto, se muestra la media +/- SE. f

## **Conclusiones**

La extracción asistida con ondas de choque, demostró ser un método eficiente para la obtención de los metabolitos secundarios de *K. daigremontiana*, *M. oleifera* y *A. adstringens*, a comparación de la maceración. Así mismo, la extracción asistida con homogeneizado ultrasónico permitió obtener extractos viables para llevar a cabo la síntesis de NPs-Au. Ambos métodos de extracción permitieron obtener extractos en los cuales se sintetizaron NPs-Au de tamaño entre 50-100 nm, con una forma quasi esférica. La síntesis verde, utilizando como medio de reacción extractos de plantas no tiene una metodología específica que se pueda aplicar con diversas plantas, ya que el método de obtención del extracto, así como las variables como pH y temperatura afectan la forma y tamaño de las NPs.

## 8. REFERENCIAS

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- Adedapo, A. A., Mogbojuri, O. M., & Emikpe, B. O. (2009). Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8), 586–591.
- Aguilar, R., & García, R. (2004). *Catalogo de plantas*.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Alam-Escamilla, D., Estrada-Muñiz, E., Solís-Villegas, E., Elizondo, G., & Vega, L. (2015a). Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.008>
- Alam-Escamilla, D., Estrada-Muñiz, E., Solís-Villegas, E., Elizondo, G., & Vega, L. (2015b). Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.008>
- Ali, M. R. K., Wu, Y., Tang, Y., Xiao, H., Chen, K., Han, T., Fang, N., Wu, R., & El-Sayed, M. A. (2017). Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), E5655–E5663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703151114>
- Alonso-Castro, A. J., Juárez-Vázquez, M. D. C., & Campos-Xolalpa, N. (2016). Medicinal plants from Mexico, Central America, and the Caribbean used as immunostimulants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4017676>
- Amenta, S. C., Amenta, R., & Amenta, G. (2018). *Sonochemistry: An Emerging Green Technology* (Issue 9). Apple Academic Press, CRC Press.
- Anand, K., Gengan, R. M., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A. (2015). Agroforestry waste moringa oleifera petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anti-cancer and catalytic activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 1105–1111. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.021>
- Anastas, P. Williamson, T. (1994). *Green Chemistry Designing Chemistry for the Environment* (Vol. 12, Issue 3).
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2019). Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine*, 4(3), 1–16. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>

- Antwi, S. O., Eckert, E. C., Sabaque, C. V., Leof, E. R., Hawthorne, K. M., Bamlet, W. R., Chaffee, K. G., Oberg, A. L., & Petersen, G. M. (2015). Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes and Control*, 26(11), 1583–1591. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0652-y>
- Baek, K., & Patra, J. K. (2015). Novel green synthesis of gold nanoparticles using *Citrullus lanatus* rind and investigation of proteasome inhibitory activity, antibacterial, and antioxidant potential. *International Journal of Nanomedicine*, 7253. <https://doi.org/10.2147/IJN.S95483>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Bekker-Méndez, V. C., Miranda-Peralta, E., Núñez-Enríquez, J. C., Olarte-Carrillo, I., Guerra-Castillo, F. X., Pompa-Mera, E. N., Ocaña-Mondragón, A., Rangel-López, A., Bernáldez-Ríos, R., Medina-Sanson, A., Jiménez-Hernández, E., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J. G., De Diego Flores-Chapa, J., Fajardo-Gutiérrez, A., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M. D. C., Dorantes-Acosta, E. M., Bolea-Murga, V., ... Mejía-Aranguré, J. M. (2014a). Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study - Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/210560>
- Ben-Arye, E., Samuels, N., Goldstein, L. H., Mutafoglu, K., Omran, S., Schiff, E., Charalambous, H., Dweikat, T., Ghrayeb, I., Bar-Sela, G., Turker, I., Hassan, A., Hassan, E., Saad, B., Nimri, O., Kebudi, R., & Silbermann, M. (2016). Potential risks associated with traditional herbal medicine use in cancer care: A study of Middle Eastern oncology health care professionals. *Cancer*, 122(4), 598–610. <https://doi.org/10.1002/cncr.29796>
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. -T, Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Botteon, C. E. A., Silva, L. B., Ccana-Ccapatinta, G. V., Silva, T. S., Ambrosio, S. R., Veneziani, R. C. S., Bastos, J. K., & Marcato, P. D. (2021). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. *Scientific Reports*, 11(1), 1974. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81281-w>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brazzale, C., Canaparo, R., Racca, L., Foglietta, F., Durando, G., Fantozzi, R., Caliceti, P., Salmaso, S., & Serpe, L. (2016). Enhanced selective sonosensitizing efficacy of ultrasound-based anticancer treatment by targeted

- gold nanoparticles. *Nanomedicine*, 11(23), 3053–3070.  
<https://doi.org/10.2217/nmm-2016-0293>
- Britto Hurtado, R., Cortez-Valadez, M., Ramírez-Rodríguez, L. P., Larios-Rodriguez, E., Alvarez, R. A. B., Rocha-Rocha, O., Delgado-Beleño, Y., Martínez-Nuñez, C. E., Arizpe-Chávez, H., Hernández-Martínez, A. R., & Flores-Acosta, M. (2016). Instant synthesis of gold nanoparticles at room temperature and SERS applications. *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics*, 380(34), 2658–2663.  
<https://doi.org/10.1016/j.physleta.2016.05.052>
- Bruce Alberts, A., Johnson, J., Lewis, D., Morgan, M., Raff, K., & Roberts, P. W. (2015). *Molecular Biology of the Cell*.
- Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Kiely, C. (1995). Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16, 1655–1656.  
<https://doi.org/10.1039/C39950001655>
- Castro-Puyana, M., Marina, M. L., & Plaza, M. (2017). Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.009>
- Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P. L. (2011). 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Chandra, H., Kumari, P., Bontempi, E., & Yadav, S. (2020a). Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24(January), 101518. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101518>
- Chandra, H., Kumari, P., Bontempi, E., & Yadav, S. (2020b). Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24(September 2019), 101518. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101518>
- Chargoy-vivaldo E., Martinez-Hernandez G, Cacique-Sanchez C, & Jimenez-Rodriguez. (2018). *Translocaciones en leucemia linfoblástica aguda y supervivencia a cinco años en niños Translocations in acute lymphoblastic leukemia and five*. 19(4), 165–173.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjovic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 118, 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2010.11.023>
- Chen, D., Sharma, S. K., & Mudhoo, A. (2011). *Handbook on Applications of Ultrasound\_Sonochemistry for Sustainability -CRC Press (2011).pdf* (pp. 23–40). CRC Press.

- Chiengthong, K., Ittiwut, C., Muensri, S., Sophonphan, J., Sosothikul, D., Seksan, P., Suppitat, K., Suphapeetiporn, K., & Shotelersuk, V. (2016). NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. In *Haematologica* (Vol. 101, Issue 1, pp. e24–e26). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.134775>
- Chmelová, D., Škulcová, D., Legerská, B., Horník, M., & Ondrejovič, M. (2020). Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols and antioxidants from *Picea abies* bark. *Journal of Biotechnology*, 314–315(December 2019), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.biotec.2020.04.003>
- Choi, Y. H., Spronsen, van J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., W.C.E. Arends, I., Witkamp, G.-J., & Verpoorte, R. (2011). *Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?* (pp. 1701–1705). *PLant Physiology*.
- Clarke, C. J., Tu, W. C., Levers, O., Bröhl, A., & Hallett, J. P. (2018). Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chemical Reviews*, 118(2), 747–800. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00571>
- Coates, J. (2006). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>
- Cronin, K. A., Lake, A. J., Scott, S., Sherman, R. L., Noone, A. M., Howlader, N., Henley, S. J., Anderson, R. N., Firth, A. U., Ma, J., Kohler, B. A., & Jemal, A. (2018). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*, 124(13), 2785–2800. <https://doi.org/10.1002/cncr.31551>
- Cuevas Figueroa, X. M. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianaceae). *Ibugana*, 13(1), 27–47.
- Das, R. K., Gogoi, N., & Bora, U. (2011). Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis* flower extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(5), 615–619. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0510-y>
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., & Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.001>
- Doebelin, N., & Kleeberg, R. (2015). Profex: A graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMIN. *Journal of Applied Crystallography*, 48(5), 1573–1580.
- Enea, M., Pereira, E., Costa, J., Soares, M. E., Dias da Silva, D., Bastos, M. de L., & Carmo, H. F. (2021). Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles on two distinct hepatic cell models. *Toxicology in Vitro*, 70(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105046>
- Espinosa-Acosta, G., Ramos-Jacques, A. L., Molina, G. A., Maya-Cornejo, J., Esparza, R., Hernandez-Martinez, A. R., Sánchez-González, I., & Estevez, M. (2018a). Stability analysis of anthocyanins using alcoholic extracts from black carrot (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *Atrorubens* alef.). *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112744>

- Ezhilarasi, A. A., Vijaya, J. J., Kaviyarasu, K., Maaza, M., Ayeshamariam, A., & Kennedy, L. J. (2016). Green synthesis of NiO nanoparticles using *Moringa oleifera* extract and their biomedical applications: Cytotoxicity effect of nanoparticles against HT-29 cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 352–360.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.003>
- Fernández, M. de los Á., Boiteux, J., Espino, M., Gomez, F. J. V., & Silva, M. F. (2018). Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. *Analytica Chimica Acta*, 1038, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.059>
- Flores-Lopez, N. S., Cervantes-Chavez, J. A., Tellez de Jesus, D. G., Cortez-Vaadez, M., Estévez-Gonzalez, M., & Esparza, R. (2021). Bactericidal and fungicidal capacity of Ag<sub>2</sub>O / Ag nanoparticles synthesized with *Aloe vera* extract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 0(0), 1–7.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1925492>
- Freiberger, C. E., Vanderjagt, D. J., Pastuszyn, A., Glew, R. S., Mounkaila, G., Millson, M., & Glew, R. H. (1998). Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53(1), 57–69.  
<https://doi.org/10.1023/A:1008080508028>
- Galot-Linaldi, J., Hernández-Sánchez, K. M., Estrada-Muñiz, E., & Vega, L. (2021). Anacardic acids from *amphipterygium adstringens* confer cytoprotection against 5-fluorouracil and carboplatin induced blood cell toxicity while increasing antitumoral activity and survival in an animal model of breast cancer. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 11).  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113241>
- Ganeshkumar, M., Sastry, T. P., Sathish Kumar, M., Dinesh, M. G., Kannappan, S., & Suguna, L. (2012). Sun light mediated synthesis of gold nanoparticles as carrier for 6-mercaptopurine: Preparation, characterization and toxicity studies in zebrafish embryo model. *Materials Research Bulletin*, 47(9), 2113–2119.  
<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.06.015>
- García-Pérez, P., Barreal, M. E., Rojo-De Dios, L., Cameselle-Teijeiro, J. F., & Gallego, P. P. (2018). Bioactive Natural Products From the Genus *Kalanchoe* as Cancer Chemopreventive Agents: A Review. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 61, pp. 49–84). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00002-6>
- Gitanjali, A., Brahmkhatri, V. P., & Atreya, H. S. (2014). Nanomaterial based magnetic resonance imaging of cancer. *Journal of the Indian Institute of Science*, 94(4), 423–454.
- Gnanaprakasam, J. N. R., Estrada-Muñiz, E., & Vega, L. (2019). The antineoplastic agent anacardic 6-pentadecyl salicylic acid produces immunomodulation in vivo via the activation of MAPKs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 376(April), 82–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.05.017>
- Gómez-Cansino, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Campos-Lara, M. G., Espitia-Pinzón, C. I., & Reyes-Chilpa, R. (2017). Natural compounds from mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *Anais Da*

- Academia Brasileira de Ciencias*, 89(1), 31–43. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160298>
- González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(1), 91–96. <https://doi.org/10.1002/ffj.3425>
- Goodman, B., & Gardner, H. (2018). The microbiome and cancer. *Journal of Pathology*, 244(5), 667–676. <https://doi.org/10.1002/path.5047>
- Gribben, J. (2020). Molecular hematology. In W. Blackwell (Ed.), *Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* (Fourth Edi, Vol. 45, Issue 12). <https://doi.org/10.1080/09674845.2011.11978206>
- Guo, Y., Jiang, N., Zhang, L., & Yin, M. (2020). Green synthesis of gold nanoparticles from *Fritillaria cirrhosa* and its anti-diabetic activity on Streptozotocin induced rats. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(4), 5096–5106. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.02.009>
- Gutiérrez-Prieto, Á., de Icaza-Herrera, M., Loske, A. M., & Castaño-Tostado, E. (2019). Kriging model to study the dynamics of a bubble subjected to tandem shock waves as used in biomedical applications. *Ultrasonics*, 91(July 2018), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2018.07.005>
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Haume, K., Rosa, S., Grellet, S., Śmiałek, M. A., Butterworth, K. T., Solov'yov, A. V., Prise, K. M., Golding, J., & Mason, N. J. (2016). Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnology*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0021-x>
- Hoffman, R., Benz, E., Silberstein, L., Heslop, H., Weitz, J., Anastasi, J., Salama, M., & Abutalib, S. (2018). *Hematology Basic Principles and Practice* (Seventh ed). Elsevier.
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2011). Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria Journal of Medicine*, 47(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2011.01.001>
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541–1552. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1400972>
- IARC. (2019). Biennial Report. In *Biennial Report*.
- Instituto Nacional de Cáncer. (2022). <https://www.cancer.gov/espanol>.
- J. Alvarnas, P. Brown, P Aoun, K Ballern, S Barta, U Borate, M Boyer, P Burke, R Cassaday, J Castro, P Coccia, S Coutre, L Damon, & D De J Greer. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Practice Guidelines on Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13, 1240–1279.
- Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis - At A Glance. *Development (Cambridge, England)*, 140(12), 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
- Jeon, H. Bin, Tsalu, P. V., & Ha, J. W. (2019). Shape Effect on the Refractive Index Sensitivity at Localized Surface Plasmon Resonance Inflection Points of

- Single Gold Nanocubes with Vertices. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50032-3>
- Jiménez-morales, S., & Hidalgo-miranda, A. (2017). *Leucemia linfoblástica aguda infantil : una aproximación genómica*. 74(1).
- Jin, Y., Zhang, Y., Liu, D., Liu, D., Zhang, C., & Qi, H. (2019). Efficient Homogenization-Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins and Flavonols from Bog Bilberry (*Vaccinium uliginosum L.*) Marc with Carnosic Acid as an Antioxidant Additive. *Molecules*, 24(2537).
- Joyce, J. A. (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 7(6), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.024>
- Jung, J., Buisman, S., & de Haan, G. (2016). Hematopoiesis during development, aging, and disease. *Experimental Hematology*, 44(8), 689–695.  
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.05.007>
- Kato, M., & Manabe, A. (2018). Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International*, 60(1), 4–12.  
<https://doi.org/10.1111/ped.13457>
- Khalafalla, M. M., Abdellatef, E., Dafalla, H. M., Nassrallah, A. A., Aboul-Enein, K. M., Lightfoot, D. A., El-Deeb, F. E., & El-Shemy, H. A. (2010). Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8467–8471.  
<https://doi.org/10.5897/AJB10.996>
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelmann, J., Kless, S., Kneba, M., ... Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526, 525.
- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Sadagopa Ramanujam, V. M., Urayama, A., Vergara, L., Kogan, M. J., & Soto, C. (2010). Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.046>
- Lehotay, S. J., & Lee, C. H. (1997). Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides. *Journal of Chromatography A*, 785(1–2), 313–327.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00551-7)
- Li, S., Al-Misned, F. A., El-Serehy, H. A., & Yang, L. (2021). Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Mentha Longifolia* leaf and investigation of its anti-human breast carcinoma properties in the in vitro condition. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(2), 102931.  
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.102931>
- Libutti, S. K., Paciotti, G. F., Byrnes, A. A., Alexander, H. R., Gannon, W. E., Walker, M., Seidel, G. D., Yuldasheva, N., & Tamarkin, L. (2010). Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-

- rhTNF Nanomedicine. *Clinical Cancer Research*, 16(24), 6139–6149.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0978>
- López, T., Ortiz-Islas, E., Guevara, P., Rodríguez-Reinoso, F., Gómez, E., Cuevas, J. L., & Novaro, O. (2015). Release of copper complexes from a nanostructured sol-gel titania for cancer treatment. *Journal of Materials Science*, 50(6), 2410–2421. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8796-9>
- López-Miranda, J. L., Esparza, R., González-Reyna, M. A., España-Sánchez, B. L., Hernandez-Martinez, A. R., Silva, R., & Estévez, M. (2021). Sargassum influx on the mexican coast: A source for synthesizing silver nanoparticles with catalytic and antibacterial properties. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/app11104638>
- López-Miranda J. L., Molina, G. A. , Esparza, R. , González-Reyna, M. A. , Silva, R. , & Estévez, M. (2021). Green Synthesis of Homogeneous Gold Nanoparticles Using Sargassum spp. Extracts and Their Enhanced Catalytic Activity for Organic Dyes. *Toxics*, 9(11), 280.
- Loske, A. M. (2017). Medical and Biomedical Applications of Shock Waves. In *Medical and Biomedical Applications of Shock Waves*.
- Madi, N., Dany, M., Abdoun, S., & Usta, J. (2016). Moringa oleifera's Nutritious Aqueous Leaf Extract Has Anticancerous Effects by Compromising Mitochondrial Viability in an ROS-Dependent Manner. *Journal of the American College of Nutrition*, 35(7), 604–613.  
<https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1080128>
- Makino, M., Motegi, T., & Fujimoto, Y. (2004). Tirucallane-type triterpenes from Juliania adstringens. *Phytochemistry*, 65(7), 891–896.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.12.012>
- Martínez-Cabanas, M., López-García, M., Rodríguez-Barro, P., Vilariño, T., Lodeiro, P., Herrero, R., Barriada, J. L., & Sastre de Vicente, M. E. (2021). Antioxidant Capacity Assessment of Plant Extracts for Green Synthesis of Nanoparticles. *Nanomaterials*, 11(7), 1679.  
<https://doi.org/10.3390/nano11071679>
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., & Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of Amphypterygium adstringens. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2–3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
- Meads, M. B., Gatenby, R. A., & Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. *Nature Reviews Cancer*, 9(9), 665–674. <https://doi.org/10.1038/nrc2714>
- Milad, R. (2014). Genus Kalanchoe (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(1), 86–104.  
<https://doi.org/10.9734/ejmp/2014/5901>
- Molina, G. A., González-Fuentes, F., Loske, A. M., Fernández, F., & Estevez, M. (2020). Shock wave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from Eysenhardtia polystachya heartwood: A novel method and its comparison with conventional methodologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 61(July 2019), 104809. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104809>

- Molina, G. A., González-Reyna, M. A., Loske, A. M., Fernández, F., Torres-Ortiz, D. A., & Estevez, M. (2022). Weak shock wave-mediated fucoxanthin extraction from *Sargassum* spp. and its electrochemical quantification. *Algal Research*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102891>
- Muniyappan, N., Pandeeswaran, M., & Almalraj, A. (2021). Green synthesis of gold nanoparticles using *Curcuma pseudomontana* isolated curcumin: Its characterization, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3, 117–124.
- Natsuki, J. (2015). A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *International Journal of Materials Science and Applications*, 4(5), 325. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
- Nehl, C. L., & Hafner, J. H. (2008). Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 18(21), 2415–2419. <https://doi.org/10.1039/b714950f>
- Oh, Y., Park, S., Jung, D., Oh, K. K., & Lee, S. H. (2020). Effect of hydrogen bond donor on the choline chloride-based deep eutectic solvent-mediated extraction of lignin from pine wood. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.145>
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera: Un árbol multiusos para las zonas tropicales secas*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1071–1082.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- P. García-Pérez, M.E. Barreal, L. Rojo -De Dios, J. F. C. T. & P. P. G. (2018). *Bioactive Natural Products From Genus Kalanchoe as Cancer Chemopreventive Agents: A Review*.
- Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2018). Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00001-0>
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., & Jähnen-Decent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11), 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/smll.200700378>
- Panić, M., Gunjević, V., Cravotto, G., & Radojčić Redovniković, I. (2019). Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chemistry*, 300(July). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>
- Parrotta, L., Falieri, C., Cresti, M., & Cai, G. (2016). Heat stress affects the cytoskeleton and the delivery of sucrose synthase in tobacco pollen tubes. *Planta*, 243(1), 43–63. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2394-1>
- Patra, J. K., & Baek, K. H. (2015). Novel green synthesis of gold nanoparticles using *Citrullus lanatus* rind and investigation of proteasome inhibitory activity, antibacterial, and antioxidant potential. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7253–7264. <https://doi.org/10.2147/IJN.S95483>

- Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 42(5), 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.11.081>
- Programa Sectorial de Salud. (2018). Cáncer en la infancia y adolescencia. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000134>
- Rajsekhar, P. B., Bharani, R. S. A., Ramachandran, M., Angel, K. J., Priya, S., & Rajsekhar, V. (2016). The “Wonder Plant” Kalanchoe pinnata (Linn.) Pers.: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(03), 151–158. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60326>
- Rastinehad, A. R., Anastos, H., Wajswol, E., Winoker, J. S., Sfakianos, J. P., Doppalapudi, S. K., Carrick, M. R., Knauer, C. J., Taouli, B., Lewis, S. C., Tewari, A. K., Schwartz, J. A., Canfield, S. E., George, A. K., West, J. L., & Halas, N. J. (2019). Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(37), 18590–18596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906929116>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2018). Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>
- Roberts, K. G., Morin, R. D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Chen, S. C., Payne-Turner, D., Churchman, M. L., Harvey, R. C., Chen, X., Kasap, C., Yan, C., Becksfort, J., Finney, R. P., Teachey, D. T., Maude, S. L., Tse, K., Moore, R., ... Mullighan, C. G. (2012). Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, 22(2), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.005>
- Rodriguez-Canales, M., Jimenez-Rivas, R., Canales-Martinez, M. M., Garcia-Lopez, A. J., Rivera-Yañez, N., Nieto-Yañez, O., Ledesma-Soto, Y., Sanchez-Torres, L. E., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L. I., & Rodriguez-Monroy, M. A. (2016). Protective effect of amhipterygium adstringens extract on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8543561>
- Rodriguez-Garcia, A., Peixoto, I. T. A., Verde-Star, M. J., De La Torre-Zavala, S., Aviles-Arnaut, H., & Ruiz, A. L. T. G. (2015). In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Amhipterygium adstringens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/175497>
- Rodríguez-Luis, O. E., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Sánchez Navarro, M. D. C., Ruiz, F., & Cabral-Romero, C. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and their bactericidal and antimycotic activities against oral microbes. *Journal of Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9204573>
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>

- Sampaio, S., & Viana, J. (2018). Production of silver nanoparticles by green synthesis using artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract and measurement of their electrical conductivity. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9.
- Scavino, H. F., George, J. N., & Sears, D. A. (1976). Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*, 38(2), 672–677. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197608\)38:2<672::AID-CNCR2820380208>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197608)38:2<672::AID-CNCR2820380208>3.0.CO;2-C)
- Secretaría de Salud. (2019). *Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes*.
- Senthilkumar, A., Karuvantevida, N., Rastrelli, L., Kurup, S. S., & Cheruth, A. J. (2018). Traditional uses, pharmacological efficacy, and phytochemistry of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. -A review. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00465>
- Shah, N. N., Stevenson, M. S., Yuan, C. M., Richards, K., Delbrook, C., Kreitman, R. J., Pastan, I., & Wayne, A. S. (2015). Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(6), 964–969. <https://doi.org/10.1002/pbc.25410>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 1, pp. 20–37). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shurin, M. R., Thanavala, Y., & Ismail, N. (2015). *Infection and Cancer: Bi-Directorial Interactions* (1st ed., Vol. 1). Springer International.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019 (US statistics). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2015). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (8th ed.). John Wiley & Sons, INC.
- Soltan, M. M., & Zaki, A. K. (2009). Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(1), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.001>
- Souza, M. C., Santos, M. P., Sumere, B. R., Silva, L. C., Cunha, D. T., Martínez, J., Barbero, G. F., & Rostagno, M. A. (2020). Isolation of gallic acid, caffeine and flavonols from black tea by on-line coupling of pressurized liquid extraction with an adsorbent for the production of functional bakery products. *Lwt*, 117(April 2019), 108661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108661>
- Sreelatha, S., Jeyachitra, A., & Padma, P. R. (2011). Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1270–1275. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.006>
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A. G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesselink, P., Shin, H. Y., Stiller, C. A., Bouzbid, S., Hamdi-Cherif, M., Hablas, A., Chirpaz, E., Buziba, N., Chesumbai, G. C., Manraj, S. S., Reynders, D., Wabinga, H. R., Chokunonga, E., ... Steliarova-Foucher, E. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-

- based registry study. *The Lancet Oncology*, 18(6), 719–731.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
- Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>
- Sun, Y., & Xia, Y. (2003). Gold and silver nanoparticles: A class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm. *Analyst*, 128(6), 686–691. <https://doi.org/10.1039/b212437h>
- Surapaneni, S. K., Bashir, S., & Tikoo, K. (2018). Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Scientific Reports*, 8(1), 12295. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30541-3>
- Szczepański, T., van der Velden, V. H. J., & van Dongen, J. J. M. (2003). Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 16(4), 561–582. [https://doi.org/10.1016/S1521-6926\(03\)00086-0](https://doi.org/10.1016/S1521-6926(03)00086-0)
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Thun Michael J., Martha S, Linnet James R, Cherhan Christopher A, & Haiman David Scottenfeld. (2018). *Cancer Epidemiology and Prevention* (fourth). Oxford University Press.
- Tiloke, C., Anand, K., Gengan, R. M., & Chuturgoon, A. A. (2018). Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108(September), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.060>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Valtierra Galván, M., Vazquez, M., Peña Cabrera, E., Cruz Cruz, D., & Villegas Gomez, C. (2019). El Tronco “Mágico” del Cuachalalate : Regalo de la Medicina Tradicional Mexicana a la Química de Productos Naturales. *Naturaleza y Tecnología*, 36–48.
- Varalakshmi, K., & Nair, S. (2011). Anticancer, cytotoxic potential of Moringa oleifera extracts on HeLa cell line. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2(3), 138. <https://doi.org/10.4103/2229-5119.86260>
- Vasanth, K., Ilango, K., MohanKumar, R., Agrawal, A., & Dubey, G. P. (2014). Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.052>
- Verdcourt, B. (1985). A Synopsis of the Moringaceae. *Kew Bulletin*, 40(1), 1. <https://doi.org/10.2307/4108470>
- Vergara-Castaneda, H., Granados-Segura, L. O., Luna-Bárcenas, G., McClements, D. J., Herrera-Hernández, M. G., Arjona, N., Hernández-Martinez, A. R., Estevez, M., & Pool, H. (2019). Gold nanoparticles bioreduced by natural extracts of arantho (*Kalanchoe daigremontiana*) for biological

- purposes: Physicochemical, antioxidant and antiproliferative evaluations.  
*Materials Research Express*, 6(5). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab0155>
- Vergara-Castañeda, H., Granados-Segura, L. O., Luna-Bárcenas, G., McClements, D. J., Herrera-Hernández, M. G., Arjona, N., Hernández-Martínez, A. R., Estevez, M., & Pool, H. (2019). Gold nanoparticles bioreduced by natural extracts of arancho Kalanchoe daigremontiana for biological purposes: physicochemical, antioxidant and antiproliferative evaluations.  
*Materials Research Express*, 6(5), 055010. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab0155>
- Wang, C., & Astruc, D. (2014). Nanogold plasmonic photocatalysis for organic synthesis and clean energy conversion. *Chem. Soc. Rev.*, 43(20), 7188–7216. <https://doi.org/10.1039/C4CS00145A>
- Watson, J. (2013). Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology*, 3(JAN). <https://doi.org/10.1098/rsob.120144>
- Xiao, W., Ruan, S., Yu, W., Wang, R., Hu, C., Liu, R., & Gao, H. (2017). Normalizing Tumor Vessels To Increase the Enzyme-Induced Retention and Targeting of Gold Nanoparticle for Breast Cancer Imaging and Treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 14(10), 3489–3498. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00475>
- Zhai, X., Lu, J., Wang, Y., Fang, F., Li, B., & Gu, W. (2014). Reversal effect of bufalin on multidrug resistance in K562/VCR vincristine-resistant leukemia cell line. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 34(6).
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4).
- Zhou, T., Yu, M., Zhang, B., Wang, L., Wu, X., Zhou, H., Du, Y., Hao, J., Tu, Y., Chen, C., & Wei, T. (2014). Inhibition of Cancer Cell Migration by Gold Nanorods: Molecular Mechanisms and Implications for Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials*, 24(44), 6922–6932. <https://doi.org/10.1002/adfm.201401642>