

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ENTRECruzAMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
CON LECTINA RECOMBINANTE POR GENIPINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DAVID CENTENO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

DRA. DIANA ISSELL SANDOVAL CÁRDENAS

DRA. MARGARITA TERESA DE JESUS GARCÍA GASCA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Entrecruzamiento de nanopartículas de plata con
lectina recombinante por genipino

por

David Centeno Chávez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-261912



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ENTRECruzAMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
CON LECTINA RECOMBINANTE POR GENIPINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DAVID CENTENO CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

DRA. DIANA ISSELL SANDOVAL CÁRDENAS

DRA. MARGARITA TERESA DE JESUS GARCÍA GASCA

SINODALES

DRA. DIANA ISSELL SANDOVAL
CÁRDENAS
DIRECTORA

DRA. MARGARITA TERESA DE JESUS
GARCÍA GASCA
SINODAL

DR. ALDO AMARO REYES
SINODAL

DR. JOSE SANTOS CRUZ
SINODAL



ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Nanopartículas de plata.....	1
1.3. Lectina recombinante de <i>Phaseolus acutifolius</i>	5
1.4. Entrecruzamiento de nanopartículas de plata	5
1.5. Justificación	9
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. General.....	12
3.2. Específicos	12
3.3. Materiales.....	13
3.4. Métodos.....	13
3.4.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata	14
3.4.2. Caracterización de las nanopartículas de plata	15
3.4.3. Lectina recombinante	15
3.4.4. Determinación de proteínas totales por ensayo de Bradford.....	16
3.4.5. Cuantificación de grupos amino con ninhidrina	16
3.4.6. Evaluación de las condiciones para el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino.	17

3.4.6.1. Efecto de la concentración de grupos amino sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA.....	17
3.4.6.2. Efecto de la preincubación con genipino y de la temperatura sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA.	17
3.4.6.3. Efecto de la concentración de genipino y el tiempo de reacción sobre el entrecruzamiento.	18
3.4.6.4. Efecto del pretratamiento de AgNPs con urea sobre el entrecruzamiento.....	19
3.4.7. Optimización del entrecruzamiento de nanopartículas de plata con BSA.	19
3.4.8. Caracterización de las nanopartículas de plata entrecruzadas con BSA y lectina recombinante	20
3.5. Diseño experimental.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata	22
4.2. Caracterización de las nanopartículas de plata	23
4.3. Evaluación de las condiciones para el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino.....	27
4.3.1. Efecto de la concentración de grupos amino sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA	27
4.3.2. Efecto de la preincubación con genipino y de la temperatura sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA.....	30
4.3.3. Efecto de la concentración de genipino y el tiempo de reacción sobre el entrecruzamiento.....	32
4.3.4. Efecto del pretratamiento de AgNPs con urea sobre el entrecruzamiento	37
4.4. Optimización del entrecruzamiento de nanopartículas de plata con BSA.	40

4.5. Caracterización de las nanopartículas de plata entrecruzadas con BSA y lectina recombinante.	48
4.5.1. Análisis por espectroscopia UV-Vis	48
4.5.2. Análisis de geles de electroforesis SDS-PAGE.	49
4.5.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión	51
4.5.4. Análisis FTIR	53
4.5.5. Calorimetría diferencial de barrido.....	55
5. CONCLUSIONES	59
6. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Diseño factorial 2^3 variando Lr, Gnp y AgNPs. El valor $\alpha = 1.682$	21
2. Contenido de proteína y grupos amino en AgNPs concentradas por ultracentrifugación a $131,986 \times g$ por 10 minutos, soluciones de 10 g/L de BSA o Lr en amortiguador de fosfatos pH 7.4. El valor presentado es la media \pm la desviación estándar calculado con tres replicas.....	28
3. Resultado de las variables experimentales en el diseño experimental factorial 2^3 de la optimización del entrecruzamiento de AgNPs con BSA por genipino.	41
4. Análisis de varianza del nivel de entrecruzamiento medido como la absorbancia a 600 nm del sobrenadante de las muestras del diseño experimental.	44
5. Análisis de varianza de la concentración de nanopartículas de plata entrecruzadas al nanocomposito medidas en el sobrenadante a 395 nm.	45
6. Análisis de varianza de un solo factor de los tamaños de partícula de las nanoparticulas de plata y los nanocompositos con lectina recombinante y albúmina sérica bovina. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema del mecanismo de reacción de entrecruzamiento del Gnp a pH ácido.	7
2. Esquema de mecanismo de reacción del entrecruzamiento de Gnp en PBS a pH 7.4 y 37 °C.	8
3. Coloración de la infusión de <i>O. basilicum</i> en el proceso de síntesis de las nanopartículas de plata. Infusión amarilla obtenida de <i>O. basilicum</i> (A), después del cambio de pH la infusión cambió a color café (B) y terminando la agitación con AgNO ₃ la solución era café oscuro (C).	22
4. Espectro Uv-Vis de AgNPs biosintetizadas por <i>O. basilicum</i> . Absorbancia de la infusión de albahaca al término de la agitación (rosa), del sobrenadante después de la centrifugación a 2,900 x <i>g</i> (verde), de la pastilla resultante de la centrifugación (café), de la pastilla resultante de la ultracentrifugación resuspendida en amortiguador de fosfatos 1x (azul) y de la infusión de albahaca sin nitrato de plata (rojo).	23
5. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM de las AgNPs en la pastilla después de la centrifugación a 2,900 x <i>g</i> durante 20 minutos. Derecha: Histograma de distribución de 6,087 nanopartículas de tamaño medio de 22 nm ± 17.....	24
6. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM de las AgNPs del sobrenadante después de la centrifugación a 2,900 x <i>g</i> durante 20 minutos y ultracentrifugadas a 131,986 x <i>g</i> por 10 minutos. Derecha: Histograma de distribución de 355 nanopartículas de tamaño medio de 3.4 ± 1.0 nm.....	25
7. Espectro FTIR de las AgNPs sintetizadas por vía verde a partir de la infusión de <i>O. basilicum</i> y concentradas por ultracentrifugación a 131,986 x <i>g</i> por 10 minutos.	26
8. Espectro Raman de las AgNPs sintetizadas por vía verde a partir de la infusión de <i>O. basilicum</i> y concentradas por ultracentrifugación a 131,986 x <i>g</i> por 10 minutos.	27
9. Espectro UV-Vis del entrecruzamiento. Soluciones 1 mM -NH ₂ de AgNPs y BSA, 0.1 % Gnp, mezcla de 1 mM -NH ₂ AgNPs y 1 mM -NH ₂ de BSA (AgNPs+BSA),	

entrecruzados de AgNPs y BSA (AgNPs@BSA) a 1 y 0.1 mM -NH ₂ de ambos reactivos y 0.1 % Gnp, respectivamente.	29
10. Espectro UV-Vis de entrecruzamiento a diferentes temperaturas adicionando el genipino en un solo paso junto a el BSA y AgNPs, por separado al BSA y a AgNPs y adicionado en etapas sucesivas (primero genipino con AgNPs y después adición de BSA). El BSA y AgNPs en concentración 0.1 mM -NH ₂ . .	32
11. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % en un paso a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	33
12. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % en un paso a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	34
13. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % por separado a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	35
14. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % por separado a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	35
15. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % en etapas sucesivas a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	36
16. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % en etapas sucesivas a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH ₂	36
17. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 1 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH ₂ fueron mezcladas con urea al 1 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.	38
18. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 0.1 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH ₂ fueron mezcladas con urea al 0.1 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.	39

19. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 0.01 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH ₂ fueron mezcladas con urea al 0.01 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.	39
20. Espectro UV-Vis del nanocomposito AgNPs@BSA. Entrecruzamiento con pretratamiento de urea al 1 % de las AgNPs, adicionando Gnp y BSA al mismo tiempo, genipino al 1 % y mezclando durante 6 h.	40
21. Grafica de contorno para el entrecruzamiento de mM -NH ₂ AgNPs, mM -NH ₂ BSA maximizando la respuesta A600 de entrecruzamiento y la concentración de AgNPs en el entrecruzado como AgNPs g/L sobrenadante. Valores fijos genipino 1 %. Las líneas diagonales muestran el incremento en el grado de entrecruzamiento y las líneas curvas muestran la concentración de nanopartículas de plata en el nanocomposito.	47
22. SDS-PAGE al 10 % del diseño experimental 2 ³ . Gel Izquierdo, carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 Lr (12.4 µg), carril 3 BSA (20 µg), carril 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 nanocomposito de la corrida 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, respectivamente. Gel derecho, carril 1 MPM, carril 2 nanocomposito de la corrida 2, carril 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 control negativo de la corrida 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.	48
23. Espectro UV-Vis del entrecruzamiento de 0.3 mM -NH ₂ AgNPs y Lr con genipino al 1 %. Barrido de absorbancia de 300 a 700 nm del sobrenadante de la solución de entrecruzamiento AgNPs@Lr. La solución del entrecruzado se diluyo ¼ veces en agua.	49
24. SDS-PAGE al 13 % de 1 mm, carril 1 marcador de peso molecular (MPM), 2 Lr, 3 AgNPs@Lr, 4 BSA, 5 AgNPs@BSA, 6 AgNPs.	51
25. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM del nanocomposito AgNPs@BSA en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g. Derecha: Histograma de distribución de 142 partículas de tamaño medio de 55.18 nm ± 37.25.....	52
26. Micrografía obtenida por TEM del nanocomposito AgNPs@Lr en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g. Derecha: Histograma de distribución de 1,152 partículas de tamaño medio de 12.176 ± 7.036 nm.....	53
27. Espectro FTIR de AgNPs (naranja), BSA (verde) y AgNPs@BSA (azul) presente en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g.	54

28. Espectro FTIR de AgNPs (naranja), Lr (verde) y AgNPs@Lr (azul) presente en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x <i>g</i>	55
29. Termograma DSC de 5 mg de Lr (verde), 6.5 mg de AgNPs (café), 4.6 mg de Gnp (rosa) y 6.6 mg del entrecruzado AgNPs@Lr (azul) secado a 35 °C por 72 h. Las muestras se depositaron en celdas de aluminio, atmosfera N ₂ , rampa de calentamiento de 10 a 300 °C con incremento de 10 °C/min.	56
30. Termograma DSC de 9.1 mg de BSA (verde), 6.5 mg de AgNPs (café), 4.6 mg de Gnp (rosa) y 4.8 mg del entrecruzado AgNPs@BSA (azul) secado a 35 °C por 72 h. Las muestras se depositaron en celdas de aluminio, atmosfera N ₂ , rampa de calentamiento de 10 a 300 °C con incremento de 10 °C/min.	57

RESUMEN

El cáncer de colon es uno de los 5 cánceres con mayor incidencia en México y a nivel mundial, debido a una baja prevención y que los tratamientos disponibles son invasivos o inespecíficos. Las nanopartículas de plata sintetizadas por vía verde son biocompatibles, han demostrado capacidad anticancerígena y funcionan como nanoacarreadores de fármacos. Por otro lado, la lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius* tiene capacidad anticancerígena hacia el cáncer de colon. El objetivo del presente trabajo fue entrecruzar nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino y lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius* usando genipino. Las nanopartículas de plata se sintetizaron mediante una infusión de *Ocimum basilicum*. El efecto de la concentración de nanopartículas de plata, agente entrecruzante (genipino) y albúmina sérica bovina sobre el índice de entrecruzamiento se evaluó mediante un diseño factorial 2^3 . Las mejores condiciones para entrecruzar proteína fueron 0.3 mM $-NH_2$ de proteína sérica bovina y 0.3 mM $-NH_2$ de nanopartículas de plata. El entrecruzamiento se evidenció con una banda de absorción a 600 nm, bandas infrarrojas a 1011 cm^{-1} y 950 cm^{-1} y la desaparición de los picos endotérmicos de las nanopartículas de plata, lectina recombinante y proteína sérica bovina. Los nanocompositos de nanopartículas de plata con lectina recombinante o con proteína sérica bovina pesaron 30 y 50 kDa, con tamaños de 12.176 ± 7.036 y 55.18 ± 37.25 , respectivamente. Es posible sintetizar un nanocomposito de nanopartículas de plata con lectina recombinante o proteína sérica bovina usando genipino como agente entrecruzante.

1. ANTECEDENTES

Las terapias existentes para el cáncer de colon tratan inespecíficamente la condición inflamatoria que da inicio a este padecimiento, mientras que los procesos quirúrgicos generalmente se realizan en etapas avanzadas de la enfermedad y son en consecuencia mucho más agresivos (Shawki y col., 2017). Es por ello necesario desarrollar nuevos tratamientos que permitan atender el problema en etapas tempranas del desarrollo y que ataquen a las células transformadas de forma diferencial. Las nanopartículas de plata (AgNPs) y la lectina recombinante (Lr) han mostrado actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de colon y ambas podrían ser administradas por vía oral, ofreciendo una alternativa menos invasiva para el tratamiento de cáncer de colon. El desarrollo de un nanocomposito basado en la unión de estos componentes podría generar sinergia para el tratamiento del cáncer de colon.

El cáncer de colon, en 2020, fue el cuarto cáncer con mayor incidencia y el quinto de mayor mortalidad a nivel mundial, mientras que a nivel nacional fue el tercero de mayor incidencia con 14,901 casos estimados (International Agency for Research on Cancer, 2020). Los factores que aumentan el riesgo de padecer cáncer, tales como factores ambientales, pueden ser disminuidos como por ejemplo con buena alimentación, practicando ejercicio y evitando efectos carcinogénicos como la inflamación de la mucosa intestinal y la activación de rutas genotóxicas (Pan y col., 2016; Yang y Yu, 2018). No obstante, hasta el 70 % de los casos de incidencia del cáncer de colon se pueden atribuir a errores aleatorios que ocurren durante la replicación del DNA por lo que no se pueden evitar (Cristian y col., 2017).

1.1. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas metálicas del repertorio de nanomateriales son destacadas por sus propiedades ópticas, antimicrobianas, magnéticas, electrónicas, catalíticas aplicadas en varias áreas de la física, química, medicina entre otros. Las nanopartículas metálicas son difusiones de partículas de unidades sólidas con

medidas entre 10 - 1,000 nm, de las cuales las AgNPs han sobresalido por sus aplicaciones antimicrobianas, citotóxicas, antiinflamatorias, antibacterianas, entre otras. (Kanchi y Ahmed, 2018) Diversas investigaciones muestran el potencial de las AgNPs como tratamiento específico contra células cancerosas (Hemlata y col., 2020; Jeyaraj y col., 2013) incluyendo las de cáncer colorrectal (Mousavi y col., 2020). La toxicidad y el comportamiento farmacológico de las nanopartículas pueden modificarse mediante variaciones en sus propiedades físico-químicas como: tamaño, composición química y estructura cristalina (Buszewski y col., 2016).

Las AgNPs se pueden sintetizar usando métodos físicos, químicos o biológicos. La biosíntesis aprovecha como agentes reductores a algunas biomoléculas, mismas que también pueden fungir como agentes estabilizadores. Éstos evitan la aglomeración y precipitación de las AgNPs en medio acuoso, lo cual representa una ventaja para las aplicaciones terapéuticas (Buszewski y col., 2016), así como también definen la estructura morfológica y cristalina de las AgNPs, predominando la forma circular y estructura cúbica centrada en las caras. Cabe destacar que los posibles efectos adversos de las AgNPs han sido evaluados en diversos estudios (Hussain y col., 2005; Rajabnia y Meshkini, 2018). Un estudio administró vía oral a 60 humanos sanos de 18 a 80 años, con 100 a 480 µg diarios de AgNPs recubiertas con óxido de plata y con diámetros de 5 a 40 nm, en concentraciones entre 10 y 32 ppm, durante 3 a 14 días, sin observarse cambios clínicos importantes en análisis sanguíneos, urinarios o imagenológicos (Munger y col., 2014).

Las AgNPs han sido propuestas como nano-acarreadores (NCs), transportando fármacos macromoleculares que son endocitados por las células. Aplicados al desarrollo de terapias contra el cáncer, los NCs incrementan la eficiencia del fármaco, poseen una baja toxicidad y mantienen un nivel continuo del fármaco en el NC. Los NC que poseen grupos funcionales, como por ejemplo hidroxilo, carboxilo y amino, los hacen tanto biocompatibles como útiles para entregas dirigidas a un sitio en particular (Durai y col., 2014). Las AgNPs biosintetizadas poseen recubrimientos con dichos grupos funcionales (Adelere y col., 2020; Pirtarighat y col., 2019; Solgi,

2014). La superficie de AgNPs biosíntetizadas a partir de extracto de *Ocimum basilicum* presentan proteínas, carbohidratos y compuestos nitrogenados en el recubrimiento (Pirtarighat y col., 2019).

1.2. Biosíntesis de nanopartículas de plata con *Ocimum basilicum*.

Existen diversas metodologías para la biosíntesis de AgNPs utilizando biopolímeros, plantas, microorganismos e incluso células humanas. La ventaja en el uso de plantas para la biosíntesis de AgNPs que serán aplicadas en el ámbito de la salud radica en que las AgNPs obtenidas estarán inmersas con otras biomoléculas que atribuyen al vegetal sus propiedades medicinales; asimismo, su producción es más sencilla a comparación del uso de microorganismos. La biosíntesis de nanopartículas metálicas con el uso de plantas o síntesis por vía verde se divide en 3 fases: activación, crecimiento y terminación. En la fase de activación, los iones metálicos provenientes de una sal son reducidos de su estado de oxidación mono o divalente al estado de oxidación cero por el recubrimiento de metabolitos vegetales que tienen esta capacidad; simultáneamente los átomos metálicos reducidos comienzan a asociarse formando nanopartículas metálicas conocida como etapa de crecimiento donde se establece la morfología de las nanopartículas. En la fase final de terminación se define la morfología de las nanopartículas biosíntetizadas ya que son recubiertas y estabilizada por metabolitos, encontrados en extractos vegetales cómo son polifenoles, proteínas, ácidos fenólicos, terpenoides, azúcares, entre otros. Dependiendo de la planta utilizada para el extracto se puede obtener una concentración y composición diferente de estos compuestos activos que resulta, entre otros parámetros, en el rango morfológico de la forma de las nanopartículas biosíntetizadas (Kanchi y Ahmed, 2018).

El uso de extractos vegetales para la biosíntesis de las AgNPs permite adicionalmente explotar al mismo tiempo las propiedades medicinales de las plantas y de las AgNPs. Especies de plantas de la familia *Lamiaceae* tienen actividad antioxidante fuerte y la especie *Ocimum basilicum* pertenece a esta familia. *O. basilicum* también conocida como albahaca es una planta perenne originaria de Asia,

América del sur, África y el mediterráneo, pero se le puede encontrar cultivada en muchos países así que se puede conseguir con relativa facilidad. La albahaca es usada como planta medicinal para tratar diversos malestares en preparaciones a base de hierbas. Contienen compuestos fenólicos y flavonoides como ácido sinapínico, ácido cinámico, ácido caféico (Deepa y col., 2017; Teofilović y col., 2021) importantes para la biosíntesis de AgNPs.

La biosíntesis de AgNPs se ha realizado principalmente con angiospermas, utilizando partes como hojas, corteza, raíces y tallos. Entre las plantas medicinales reportadas se encuentran *Boerhaavia diffusa*, *Tinospora cordifolia*, *Aloe vera*, *Terminalia chebula*, *Catharanthus roseus*, *Ocimum tenuiflorum*, *Azadirachta indica*, *Emblica officinalis* y *Cocos nucifera*. También se ha reportado el uso de algunas especias como *Piper nigrum* y *Cinnamomum zeylanicum*; de alcaloides y aceites esenciales de *Papaver somniferum* y *Mentha piperita* (Srikanth y col., 2016).

Diversos grupos han reportado que AgNPs sintetizadas a partir de extractos vegetales son citotóxicas sobre células cancerosas (Jeyaraj y col., 2013; Kim y col., 2018; Munger y col., 2014). Hillegass y col. (2010) mostraron que AgNPs tuvieron mayor toxicidad sobre células cancerosas, respecto a células no cancerosas; y una citotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, induciendo apoptosis temprana, tardía y necrosis. Kim y col. (2018) mostraron una reducción en la viabilidad de líneas celulares de cáncer de colon y de pulmón al ser expuestas a AgNPs sintetizadas con ginseng siberiano en una concentración de 10 µg/mL, con un efecto citotóxico mayor al inducido por AgNPs comerciales y al inducido por el cisplatino. Aunque no están establecidos los mecanismos por los cuales las células de cáncer son seleccionadas por las AgNPs, se ha mostrado que estimulan la apoptosis en dichas células mediante los mecanismos de caspasa 3, Bcl-2, Bax, la generación de radicales libres, la fragmentación del ADN y el daño de la membrana celular (Hillegass y col., 2010; Kim y col., 2018; Munger y col., 2014; Vlăsceanu y col., 2016).

Las AgNPs biosíntetizadas presentan ventajas como nanoacarreadores debido a que han demostrado baja toxicidad, efectos citotóxicos en células cancerígenas y grupos funcionales en su recubrimiento importantes para la conjugación de fármacos con actividad anticancerígena. Por lo que, las AgNPs son una opción para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer de colon.

1.3. Lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius*.

El equipo de investigación ha realizado estudios mostrando que una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari induce apoptosis en células de cáncer de colon de forma diferencial (Ferriz-Martínez y col., 2015; García-Gasca y col., 2012; Moreno-Celis y col., 2017). Estudios *in vivo* han mostrado que la FCL es capaz de inhibir la tumorigénesis temprana en colon hasta en un 70 % con efectos antiproliferativos y proapoptóticos (Moreno-Celis y col., 2017). La FCL tiene una baja toxicidad y puede ser administrada vía oral en dosis de 50 mg/kg, ya que retiene su actividad hasta por 72 horas. Asimismo, a pesar de presentarse una disminución del 10 % en el peso corporal y un incremento en los eosinófilos, no se observó daño hepático, pancreático o renal (Ferriz-Martínez y col., 2015). Con el fin de aumentar el rendimiento de producción de la lectina y reducir costos se ha desarrollado una lectina recombinante de frijol Tépari en la levadura *Pichia pastoris* para incrementar el rendimiento y reducir los costos de purificación (Martínez-Alarcón y col., 2020). La Lr presenta actividad citotóxica sobre células de cáncer de colon (Dena-Beltrán y col., 2023). Lo anterior abre la oportunidad para hacer uso de esta proteína recombinante para el tratamiento diferencial de tumorigénesis temprana en colon.

1.4. Entrecruzamiento de nanopartículas de plata

El uso de las AgNPs como NC requiere del uso de un agente entrecruzante para unir biomoléculas a las AgNPs. Los agentes entrecruzantes interconectan moléculas a través de grupos funcionales de polímeros de forma química, física y enzimática, aumentando el tamaño de las moléculas y proporcionando mayor estabilidad (Reddy y col., 2015).

La clasificación de los agentes entrecruzantes según su origen se divide en sintéticos, como glutaraldehído, p-benzoquinona, polietilaminas, glicerol diglicidil éter entre otros, y naturales como genipino, pectina y ácido cítrico (Liu y col., 2016). A pesar de la gran variedad de agentes entrecruzantes disponibles el glutaraldehído es de los más comúnmente usados porque puede reaccionar tanto con proteínas como carbohidratos además de mejorar la estabilidad de propiedades mecánicas (Reddy y col., 2015). Sin embargo, el uso del glutaraldehído en materiales biomédicos es limitado por su alta toxicidad por lo que se ha propuesto su reemplazo por un agente de entrecruzamiento químico de origen natural. Shahgholian y col. (2017) demostraron el potencial del genipino (Gnp) para reemplazar al glutaraldehído por la estabilidad que confiere a la estructura de las nanopartículas y modulando el comportamiento de liberación en un patrón determinado. El Gnp ha demostrado proporcionar incluso mayor estabilidad a nanocompositos ante altas temperaturas, pH y tiempos de almacenamiento prolongados que los entrecruzados por glutaraldehído, de manera que representa una excelente opción para el entrecruzamiento de proteínas (Liu y col., 2016).

El Gnp (metil-1-hidroxi-7-(hidroximetil)-1,4a,5,7a-tetrahidrociclopenta[c] piran-4-carboxilato) es un monoterpenoide de tipo ciclopentano sin color hasta diez mil veces menos tóxico que el glutaraldehído. El Gnp es obtenido de forma natural principalmente de la fruta de la planta de gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) a partir de la hidrólisis de genipósido. El genipósido es un compuesto usado en la medicina tradicional Oriental con el que tratan inflamación, trastorno hepático y dolores de cabeza, también es usado como colorante de alimentos en las comidas asiática (Pizzolitto y col., 2020; Tokareva y col., 2017). El Gnp reacciona con los grupos amino primarios lo que provoca un cambio del color a azul causado por la oligomerización de genipino unido a aminas (Figura 2). Tiene buena biocompatibilidad, es seguro y de muy baja toxicidad, incluso el resultado de su interacción con proteínas y polisacáridos es de baja toxicidad (Tokareva y col., 2017; Zeng y col., 2015).

El mecanismo de reacción entre el Gnp y los grupos amino depende mayoritariamente del pH en el que se lleve a cabo la reacción y afecta la estructura del nanocomposito entrecruzado (Figura 2). A pH ácido, se produce un enlace corto en donde solo hay una molécula de Gnp en cambio a pH neutro y básico se pueden encontrar estructuras con dos y hasta 4 residuos de Gnp, aumentando el número conforme incrementa la basicidad (Tokareva y col., 2017).

Según lo descrito por Tokareva y col., (2017), ocurre un ataque nucleofílico por grupo amino en la posición 3 de la molécula Gnp abriendo el anillo y reciclándolo en seguida, formando un anillo dihidropiridina (Figura 1), cuando el pH de la reacción es ácido ocurre una reacción de sustitución de la molécula de metanol por un grupo amino de un radical.

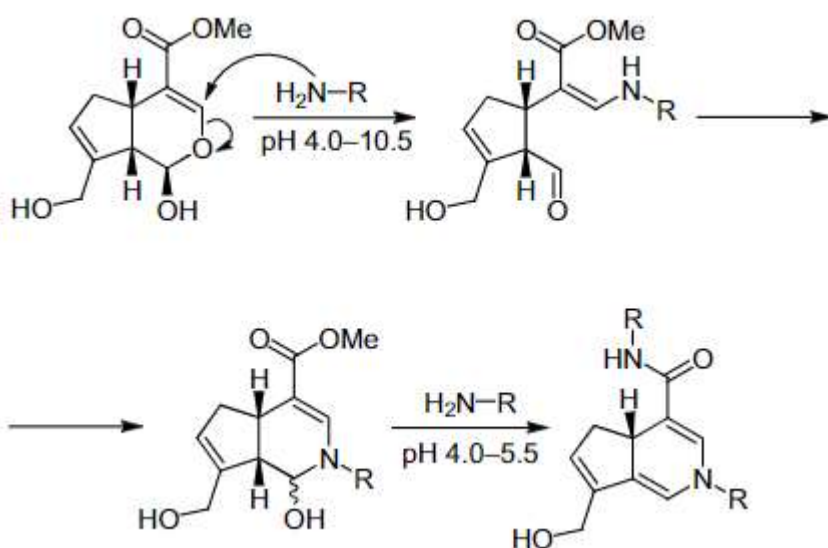


Figura 1. Esquema del mecanismo de reacción de entrecruzamiento del Gnp a pH ácido.

A pH neutro y en presencia de oxígeno la reacción puede tomar diferentes mecanismos de reacción como los propuestos por Pizzolitto y col., (2020), para la primer ruta, se propone una oxidación de dos moléculas de Gnp después del ataque nucleofílico y la sustitución por un grupo amino (G-N) que conduce al compuesto 2(G-N)_{ox} (Figura 2). Por otro lado, además de la oxidación G-N podría sufrir una

deshidratación dando como resultado el entrecruzamiento $2(\text{G-N})_{\text{dox}}$, en cualquiera de los dos casos los compuestos finales $2(\text{G-N})_{\text{ox}}$ y $2(\text{G-N})_{\text{dox}}$ muestran una banda de absorción característica alrededor de los 600 nm (Neves y col., 2022; Pizzolitto y col., 2020; Tokareva y col., 2017).

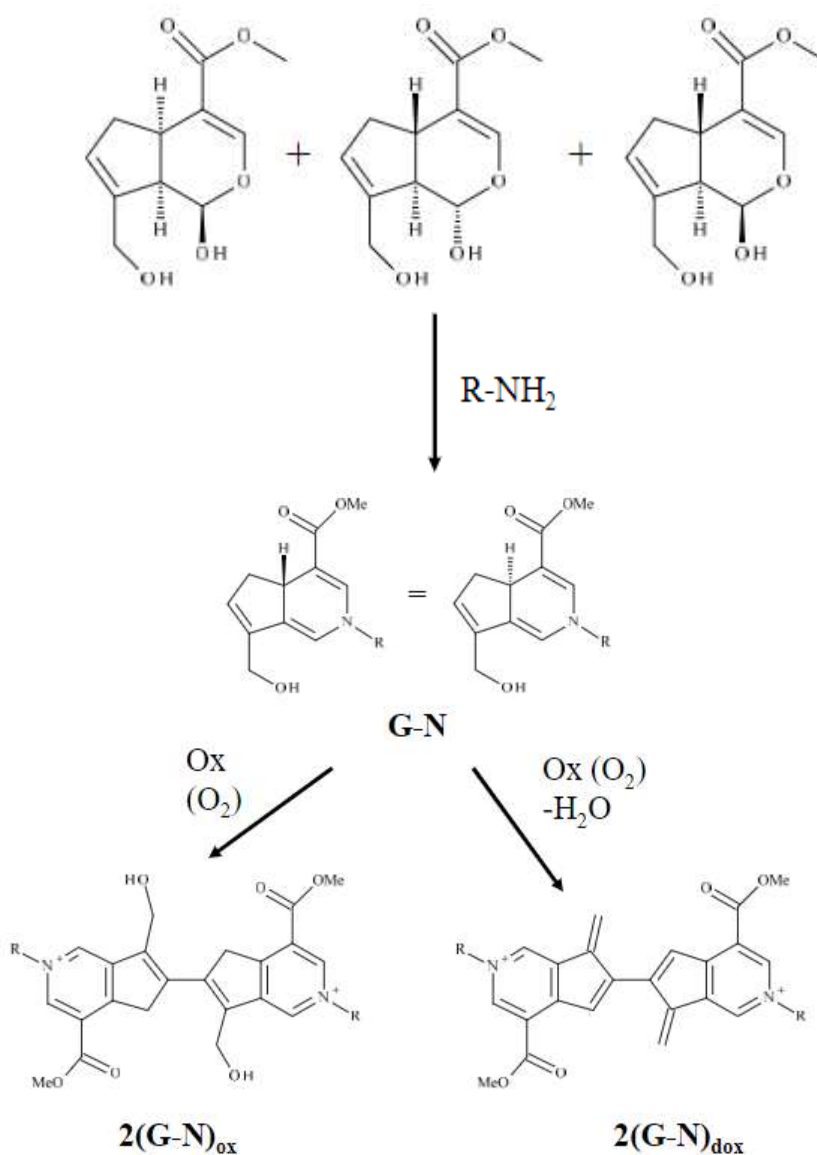


Figura 2. Esquema de mecanismo de reacción del entrecruzamiento de Gnp en PBS a pH 7.4 y 37 °C.

En la presente investigación se pretende que los grupos R mostrados en la Figura 2 sean sustituidos por las AgNPs biosíntetizadas con *O. basilicum* que poseen grupos amino y la proteína, ya sea la albúmina sérica bovina o la lectina recombinante.

Adicionalmente a su actividad como agente entrecruzante, el Gnp también presenta efecto anticancerígeno en líneas celulares de cáncer gástrico, mediante la supresión de la vía Stat3/Mcl-1 provocando disfunción mitocondrial induciendo así apoptosis (Jo y col., 2019). En el trabajo realizado por Razi y col. (2018) el Gnp fue usado para mejorar la estabilidad de un complejo de tamaño nanométrico de quitosano y caseinato en donde además potenció la actividad anticancerígena *in vitro* en la línea celular de cáncer cervical humano HeLa. Por estas razones el Gnp será evaluado como el agente entrecruzante entre AgNPs y Lr. La estandarización del método se realizará usando albúmina sérica bovina (BSA), Gnp y AgNPs.

Se ha usado Gnp para formar enlaces entre los grupos funcionales amino (-NH₂) que recubren nanopartículas magnéticas de quitosano con los que se encuentran disponibles en el BSA (Shahgholian y col., 2017) Basado en esto se pretende usar la BSA en las primeras etapas de estandarización del entrecruzamiento de AgNPs y Lr para disminuir el tiempo y costo invertidos en la producción y purificación de la Lr.

1.5. Justificación

Las lectinas son moléculas que presentan efectos selectivos y diferenciales sobre células cancerígenas. Lectinas de *Phaseolus acutifolius* provocan la inducción de apoptosis e inhibición de tumorigénesis temprana en cáncer de colon. Actualmente se cuenta con la metodología para producir una lectina recombinante con potencial terapéutico. Existen evidencias que muestran la capacidad de lectinas de generar sinergia al ser administradas con medicamentos anticancerígenos.

Las AgNPs han mostrado efectos tóxicos diferenciales sobre células cancerígenas respecto a tejido sano, prevaleciendo la inducción de apoptosis. Además, las AgNPs no han inducido cambios clínicos adversos sobre humanos sanos. Las AgNPs

elaboradas por biosíntesis son más estables en medio acuoso, respecto a las nanopartículas desnudas, por lo que permiten desarrollar aplicaciones terapéuticas, además la presencia en ellas de grupos funcionales las hace biocompatibles. Adicionalmente, la biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de plantas puede ser realizada a temperatura y presión ambiente además el proceso de síntesis es sencillo, barato, no daña el ambiente y puede ser fácilmente escalable (Adelere y col., 2020; Malik y col., 2014).

Otros grupos de trabajo han mostrado el efecto sinérgico de las nanopartículas de plata con medicamentos para el cáncer y metabolitos como ATP. Lo anterior abre la posibilidad de que las AgNPs entrecruzadas con lectinas recombinantes tengan un potencial biomédico para el tratamiento de cáncer mediante la inducción selectiva de apoptosis de células de cáncer de colon respecto a las células sanas.

2. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata se pueden entrecruzar con la lectina recombinante de frijol Tépari usando genipino.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Entrecruzar nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino y lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius* usando genipino.

3.2. Específicos

- Sintetizar por vía verde nanopartículas de plata con *Ocimum basilicum*.
- Establecer el efecto de la concentración de grupos amino, la preincubación con genipino, la temperatura, la concentración de genipino y el tiempo de reacción para el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con proteína bovina de suero albúmina usando genipino como agente entrecruzante.
- Optimizar el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con proteína bovina de suero albúmina usando diferentes concentraciones de genipino como agente entrecruzante mediante un diseño factorial 2³.
- Caracterizar por tamaño, estructura, grupos funcionales, estabilidad térmica y propiedades ópticas los nanocompositos de nanopartículas de plata entrecruzadas con la lectina recombinante y con proteína bovina de suero albúmina usando las condiciones óptimas previamente determinadas.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

El nitrato de plata (AgNO_3) # 209139, nanopartículas de plata (0.02 g/L) estabilizadas con citrato (tamaño de 10 nm, forma esférica, banda de absorción a 395 nm) # 730785, solución de ninhidrina al 2 % (NHD) # N7285 y glicina # 410225 fueron obtenidos de Sigma Aldrich, USA. Extracto de polvo genipino de gardenia de pureza ≥ 98 % # 6902-77-8 Hunan Insen Biotech, China. Proteína albúmina sérica bovina (~66 kDa) # 9048-46-8 Gold-Bio, USA.

4.2. Métodos

De forma general la metodología consistió en las siguientes etapas:

- La síntesis y caracterización por vía verde de las AgNPs que se describen en la sección 4.2.1 y 4.2.2
- La síntesis de la lectina recombinante se describe en la sección 4.2.3
- La cuantificación de proteína y grupos amino en las AgNPs, BSA y Lr se describen en la sección 4.2.4 y 4.2.5, respectivamente.
- Las pruebas preliminares para determinar las condiciones del entrecruzamiento como la concentración de grupos amino, temperatura, preincubación con genipino, concentración de genipino, el tiempo de reacción y el pretratamiento de las AgNPs con urea se describen en la sección 4.2.6. En estas secciones se destacó el uso de las bandas de absorción alrededor de los 400 y 280 nm como seguimiento de la síntesis del nanocomposito.
- Partiendo de las condiciones determinadas en el punto anterior se estableció un diseño experimental 2^3 empleado para optimizar el entrecruzamiento de AgNPs y BSA, lo cual se describe en la sección 4.2.7.
- Finalmente, las técnicas realizadas para la caracterización de los nanocompositos obtenidos de la reacción de entrecruzamiento con los valores óptimos para BSA o AgNPs, Lr y Gnp se describen en la sección 4.3.8.

4.2.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata

Las AgNPs se prepararon usando una infusión de *Ocimum basilicum*. La hoja fresca, cosechada el mismo día que se realizó la biosíntesis de AgNPs, se adquirió de la empresa FreshQro ubicada en Plomeros 51-A Peñuelas, Querétaro, Querétaro. La infusión se preparó con 1 g de hoja de albahaca fresca lavada con agua y jabón, se hirvió durante 2 min en 10 mL de agua destilada después la reacción se detuvo en baño de hielo. La infusión se filtró con papel de poro fino al vacío y se ajustó el pH a 12 usando NaOH 1 M. Se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 psi durante 15 min e inmediatamente se agregó 1 mL de una solución 63 mM estéril de nitrato de plata para obtener una concentración final de 1 mM. Se dejó agitando a 160 rpm por 24 horas protegido de la luz. La absorbancia de las AgNPs se midió en un rango de longitudes de onda de 200 – 800 nm en espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis.

Las AgNPs sintetizadas se centrifugaron a 2,900 x g por 20 min a 4 °C para eliminar materia orgánica y las AgNPs agregadas. El sobrenadante recuperado se centrifugó a 131,986 x g por 10 min a 4 °C y se recuperó la pastilla para concentrar las nanopartículas de menor tamaño. Las nanopartículas de plata se lavaron y resuspendieron en 15 mL de amortiguador de fosfatos 1x (PBS, fórmula por litro: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.45 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄) pH 7.4 concentrando la muestra 34.77 veces.

El porcentaje de rendimiento de AgNPs en el sobrenadante tras la centrifugación a 2,900 x g se calculó como:

$$\% \text{ rendimiento} = \left(\frac{(\text{concentración en sobrenadante}) - (\text{concentración inicial})}{\text{concentración inicial}} \right) * 100$$

El porcentaje de rendimiento de AgNPs en la pastilla tras la centrifugación a 131,986 x g se calculó resuspendiendo la pastilla en 15.5 mL de amortiguador de fosfatos 1x.

4.2.2. Caracterización de las nanopartículas de plata

La concentración de las AgNPs se determinó mediante una curva de calibración elaborada a partir de una solución estándar de AgNPs de 10 nm estabilizadas con citrato y con absorbancia máxima a 395 nm.

Una dilución 1:10 se ultrasonizó por 10 min y se montó sobre una rejilla de cobre lacey carbón para analizar en microscopía eléctrica de transmisión (TEM).

La caracterización de la superficie de las nanopartículas de plata se determinó mediante el método de Bradford (Krohn, 2011) para la cuantificación de proteínas; el análisis de ninhidrina (NDH) y espectrometría infrarroja con transformada de Fourier para la cuantificación de grupos amino e identificación de grupos funcionales. Los principales grupos funcionales que se buscaron son los grupos amino primario de las proteínas (Ebrahimzadeh y col., 2020).

4.2.3. Lectina recombinante

La lectina recombinante (Lr) se obtuvo del grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ-Campus Juriquilla. Es una lectina recombinante de frijol Tépari producida en *Pichia pastoris*. *P. pastoris* transformada se creció en medio YPG líquido (extracto de levadura 12.5 g/L, peptona 25 g/L, dextrosa 15 g/L, biotina 0.4 mg/L, y fosfato de potasio 0.1 M) pH 6 por 48 h después se centrifugó para precipitar el paquete celular y el sobrenadante se filtró a través de papel filtro de poro fino. El sobrenadante se diluyó en amortiguador de fosfatos y se hizo fluir en columnas de níquel, después las columnas se lavaron con gradientes ascendientes de imidazol hasta recuperar la Lr. La Lr presenta actividad citotóxica sobre células de cáncer de colon (Martínez-Alarcón y col., 2020; Palmerín-Carreño y col., 2021).

4.2.4. Determinación de proteínas totales por ensayo de Bradford

La concentración de proteína en el liofilizado de Lr y en el recubrimiento de las AgNPs fue determinado mediante el método de Bradford (1976). Diez μL de cada estándar, muestra o diluyente (blanco) se colocó en el pocillo correspondiente de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Posteriormente se dispensaron 200 μL de reactivo de Bradford (0.01 % p/v azul de Coomassie G-250, 4.7 % p/v de etanol al 95 % y 8.5 % p/v de ácido fosfórico al 85 % p/v). La mezcla se agitó 8 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Justo antes de leer, se volvió a mezclar la placa y luego se midió la absorbancia a 595 nm. La curva estándar se elaboró de 0.1 a 0.6 g/L con BSA (Krohn, 2011).

4.2.5. Cuantificación de grupos amino con ninhidrina

Los grupos amino primarios en las muestras de BSA, Lr y AgNPs fueron medidos por medio del ensayo de ninhidrina (NHD). Basados en la concentración de grupos amino obtenidos se establecieron las relaciones de estos reactivos para el entrecruzamiento con Gnp, acorde a lo descrito por (Shahgholian y col., 2017; Zatorski y col., 2020).

La NHD (2,2-dihydroxy-1,3-indanedione) es un químico destacado y ampliamente usado para la determinación colorimétrica de aminoácidos. Reacciona con los grupos α -amino libres para producir un aldehído, dióxido de carbono y NHD reducido mediante una reacción de tres pasos. El uso de NHD depende de la formación de un color púrpura con funcionalidad amina (Shahgholian y col., 2017).

La curva estándar se elaboró con glicina de 0.005 a 0.035 mg/L, ya que ésta provee una concentración precisa de grupos amino, disuelta en amortiguador de acetatos 50 mM pH 4.5, por triplicado. A 50 μl de muestra se añadió una solución de ninhidrina en etanol al 2 % en relación 1:1 v/v. La solución se incubó en baño maría por 20 min. Una vez a temperatura ambiente las muestras, se añadieron 500 μl de isopropanol al 50 % v/v. La absorbancia se midió a 570 nm.

4.2.6. Evaluación de las condiciones para el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino.

4.2.6.1. Efecto de la concentración de grupos amino sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA.

Tras determinar la concentración de grupos amino, se preparó en PBS 900 μ L de una solución 1 mM de grupos amino de AgNPs y 1 mM de grupos amino de BSA. Posteriormente se añadieron 100 μ L de una solución 0.1 % de Gnp en DMSO. La mezcla se agitó en vórtice de 9 a 10 segundos cada 10 min durante 2 horas según la metodología de (Díaz-Hernández y col., 2018). El ensayo se repitió con soluciones a 0.1 mM y 0.075 mM de grupos amino. El primer y segundo ensayo se realizaron con AgNPs con bandas de absorción características a 400 nm y 388 nm, respectivamente indicando diferentes distribuciones de tamaño. Al finalizar el entrecruzamiento se obtuvo un barrido de 200 a 800 nm para cada muestra.

4.2.6.2. Efecto de la preincubación con genipino y de la temperatura sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA.

La adición de genipino se evaluó en un solo paso, por separado con las AgNPs y BSA, así como en etapas sucesivas. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, entre 20 y 23 °C, y a 37 °C.

La adición de genipino se evaluó en un solo paso descrita en el apartado anterior se repitió a 37 °C.

La adición de genipino por separado con las AgNPs y BSA consistió en preincubar durante 2 horas agitando en vórtice durante 10 s cada 10 min por separado las AgNPs con genipino y el BSA con genipino, ambas mezclas se unificaron y se procedió a mezclar nuevamente. Cincuenta μ L de una solución 0.1 % de genipino en DMSO se adicionaron a 450 μ L de una solución de AgNPs 0.2 mM -NH₂ y se agitó en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 2 h. Este procedimiento se repitió para una solución de BSA. Ambas soluciones se mezclaron en un tubo a temperatura

ambiente con las condiciones antes descritas. El procedimiento se repitió a 37 °C para evaluar el efecto de la temperatura sobre el entrecruzamiento.

La adición de genipino en etapas sucesivas consistió en preincubar por 2 horas 0.2 mM -NH₂ AgNPs con genipino y posteriormente se adicionó BSA a la mezcla y se agitó en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 2 h. Finalmente se realizó un barrido de 200 a 800 nm.

4.2.6.3. Efecto de la concentración de genipino y el tiempo de reacción sobre el entrecruzamiento.

Esta prueba se realizó con tres ensayos. El primer ensayo consistió en evaluar la preincubación de AgNPs y BSA con genipino, en el segundo ensayo sólo se preincubaron las AgNPs con genipino y posteriormente se adicionó BSA a la mezcla y en el tercer ensayo se incubaron las AgNPs, BSA y genipino a la par como se describe a continuación. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. Cada uno de los ensayos previamente descritos se realizó con dos concentraciones de genipino, 0.1 y 1 %. En todos los ensayos se ajustó la concentración de AgNPs y BSA a una concentración final 1 mM -NH₂.

A 450 µL de AgNPs 0.2 mM -NH₂ se le añadieron 50 µL de una solución de genipino en DMSO al 1 y 10 %, la mezcla se agitó en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 2 h. La misma reacción se realizó sustituyendo las AgNPs con BSA. Después ambas soluciones se conjuntaron y se mezclaron a temperatura ambiente durante 6 h en las condiciones descritas previamente. El segundo ensayo se realizó con 764 µL de AgNPs con concentración final 1 mM -NH₂ en 1,000 µL al que se le agregó 100 µL de solución 1 y 10 % de genipino en DMSO y se agitó en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 2 h a temperatura ambiente. Al finalizar este procedimiento se agregaron 136 µL de una solución de BSA para alcanzar una concentración final 0.1 mM -NH₂ y se repitió el proceso de entrecruzamiento por 6 h. El tercer ensayo consistió en mezclar AgNPs 0.1 mM de -NH₂, BSA 0.1 mM de -NH₂ y genipino al 0.1 o al 1 %, el volumen final de reacción fue de 1 mL y las dos mezclas se agitaron en

vórtice durante 10 s cada 10 min durante 8 h, monitoreando la absorbancia de 200 a 800 nm cada 2 horas.

4.2.6.4. Efecto del pretratamiento de AgNPs con urea sobre el entrecruzamiento.

Las AgNPs fueron pretratadas al entrecruzamiento con urea con el fin de incrementar el número de grupos amino en su superficie y así favorecer el entrecruzamiento. La concentración de urea a utilizar para el pretratamiento de las AgNPs y el tiempo de incubación se determinó incubando 0.1 mM $-NH_2$ de AgNPs con urea al 1, 0.1 y 0.01 % a 1,000 rpm durante 4 h a temperatura ambiente. El ensayo de entrecruzamiento se realizó con 0.1 mM $-NH_2$ de AgNPs con urea al 1 % a 1,000 rpm durante 2 h. Posteriormente las AgNPs se preincubaron con genipino al 1 % y se agitó en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 2 h, de la misma forma se preincubó 0.1 mM $-NH_2$ de BSA con genipino al 1 %; se prepararon 500 μ L de cada mezcla y se unificaron mezclando en vórtice durante 10 s cada 10 min durante 6h. Finalmente se registró la absorbancia de 200 a 800 nm.

4.2.7. Optimización del entrecruzamiento de nanopartículas de plata con BSA.

La concentración AgNPs, Gnp y BSA adecuada para realizar el entrecruzamiento se evaluó con un diseño factorial 2^3 como se muestra en la sección 4.3 junto a un control negativo en las mismas condiciones exceptuando el genipino. Las AgNPs fueron ultrasonificadas por 10 min después se agregó urea al 10 % para una concentración final del 1 % y se agitaron a 1,000 rpm a temperatura ambiente durante 2 h. Las AgNPs pretratadas con urea y el BSA se mezclaron para obtener una solución homogénea. Después la solución AgNPs+BSA y el Gnp al 5 % en DMSO o simplemente DMSO, para el control negativo, fueron mezclados en vórtice cada 10 min de 9 a 10 segundos durante 6 horas en amortiguador de fosfatos 1 x pH 7 según la metodología de Díaz-Hernández y col., (2018) y Pizzolitto y col., (2020). Las muestras fueron centrifugadas a 11,650 x g y la absorbancia del entrecruzado se midió en un rango de 300 a 800 nm para visualizar el desplazamiento hacia el IR de la banda de absorción causado por el aumento de tamaño de las AgNPs además de

la banda a 600 nm. Las muestras se analizaron por electroforesis para identificar el entrecruzamiento de AgNPs-BSA o entre las AgNPs.

A partir de los resultados obtenidos en la prueba anterior se establecieron las condiciones para realizar el entrecruzamiento de las AgNPs con la Lr.

4.2.8. Caracterización de las nanopartículas de plata entrecruzadas con BSA y lectina recombinante

La absorbancia del nanocomposito AgNPs@Lr se midió en un rango de longitudes de onda de 200 – 800 nm en espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis. El peso molecular de los nanocompositos AgNPs@Lr y AgNPs@BSA se analizó mediante un gel de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). La morfología de las AgNPs-Lr se determinó mediante un análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEOL modelo JEM-1010 a 80 kV, las imágenes se tomaron con una cámara digital ORIUS GATAN.

La identificación de los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas de plata entrecruzadas con lectina recombinante será investigada por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer equipado con un accesorio de Reflectancia Total Atenuada Universal (U-ATR, Shelton, CT, EUA). Las muestras se leyeron 25 veces en un intervalo de 4,000 a 550 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . La estabilidad térmica del entrecruzado se realizó mediante el análisis de calorimetría diferencial de barrido que se realizó en el equipo DSC Q2000, celdas de aluminio, atmosfera N_2 , con una rampa de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 300 $^{\circ}\text{C}$ partiendo de 10 $^{\circ}\text{C}$. El análisis se realizó pesando 5 mg de Lectina recombinante, 9.1 mg de albúmina de suero bovino, 6.5 mg de nanopartículas de plata, 4.6 mg de genipino, 6.6 mg de AgNPs@Lr y 4.8 mg de AgNPs@BSA usando como referencia un crisol vacío.

4.3. Diseño experimental

El efecto de la concentración de BSA, AgNPs y Gnp con tres niveles se evaluó mediante un diseño factorial 2^3 completo con tres réplicas. El BSA se utilizó como sustituto de la Lr debido a que la producción y purificación de este reactivo es de costo elevado y bajo rendimiento, una vez estandarizado el proceso de entrecruzamiento se implementó las condiciones de síntesis con la Lr. Las variables de respuesta fueron la concentración de AgNPs y absorbancia a los 600 nm en el sobrenadante del entrecruzado centrifugado a 12,000 rpm. La concentración de Gnp al 1 % p/v se estableció acorde a lo reportado en experimentaciones previas. El diseño experimental se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Diseño factorial 2^3 variando Lr, Gnp y AgNPs. El valor $\alpha = 1.682$.

Corrida	BSA [mM -NH ₂]	Gnp [%]	AgNPs [mM -NH ₂]
1	0.1	1	0.1
2	0.1	1.5	0.1
3	0.3	1	0.1
4	0.3	1.5	0.1
5	0.1	1	0.3
6	0.1	1.5	0.3
7	0.3	1	0.3
8	0.3	1.5	0.3

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Biosíntesis de nanopartículas de plata

La biosíntesis de las AgNPs se evidenció mediante un cambio en la coloración. La infusión de las hojas de *O. basilicum* tenía un color amarillo con turbidez, el cual adoptó una coloración café claro una vez ajustado el pH a 12. Después de agregar la solución de nitrato de plata (AgNO_3) se observó un cambio a color a café oscuro como se muestra en la Figura 3. El color café es característico de la presencia de AgNPs (Adelere y col., 2020; Ebrahimzadeh y col., 2020; Pirtarighat y col., 2019).

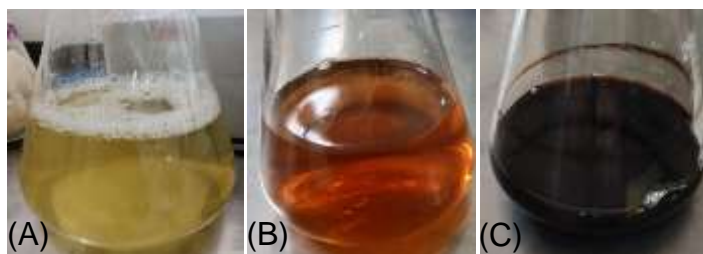


Figura 3. Coloración de la infusión de *O. basilicum* en el proceso de síntesis de las nanopartículas de plata. Infusión amarilla obtenida de *O. basilicum* (A), después del cambio de pH la infusión cambió a color café (B) y terminando la agitación con AgNO_3 la solución era café oscuro (C).

La síntesis de AgNPs se corroboró mediante la presencia de una banda a 387 nm como se muestra en la Figura 4. Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura donde las AgNPs biosintetizadas con *Ocimum basilicum* presentan una banda entre 400 y 450 nm (Deepa y col., 2017; Kanchi y Ahmed, 2018; Malapermal y col., 2017; Pirtarighat y col., 2019) aunque también se ha reportado absorbancias hasta 393 nm en AgNPs recubiertas de fructosa y de 372 nm con síntesis mediada por cascara de granada (Mehata, 2021).

La banda de absorción del plasmón de resonancia permite estimar el tamaño de las AgNPs, ya que un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores corresponde a un incremento en el tamaño y un desplazamiento hacia el ultravioleta corresponde a

un menor tamaño (Srikar y col., 2016), la absorbancia máxima de las AgNPs al finalizar la ultracentrifugación se desplazó hasta a los 397 nm como se puede ver en la Figura 4 se pierde una parte importante de AgNPs de menor tamaño que no se encuentran en suspensión. El rendimiento de las AgNPs tras el proceso de centrifugación a 2,900 x g fue del 40 %, la concentración de AgNPs biosintetizadas y concentradas se determinó en 0.674 g/L.

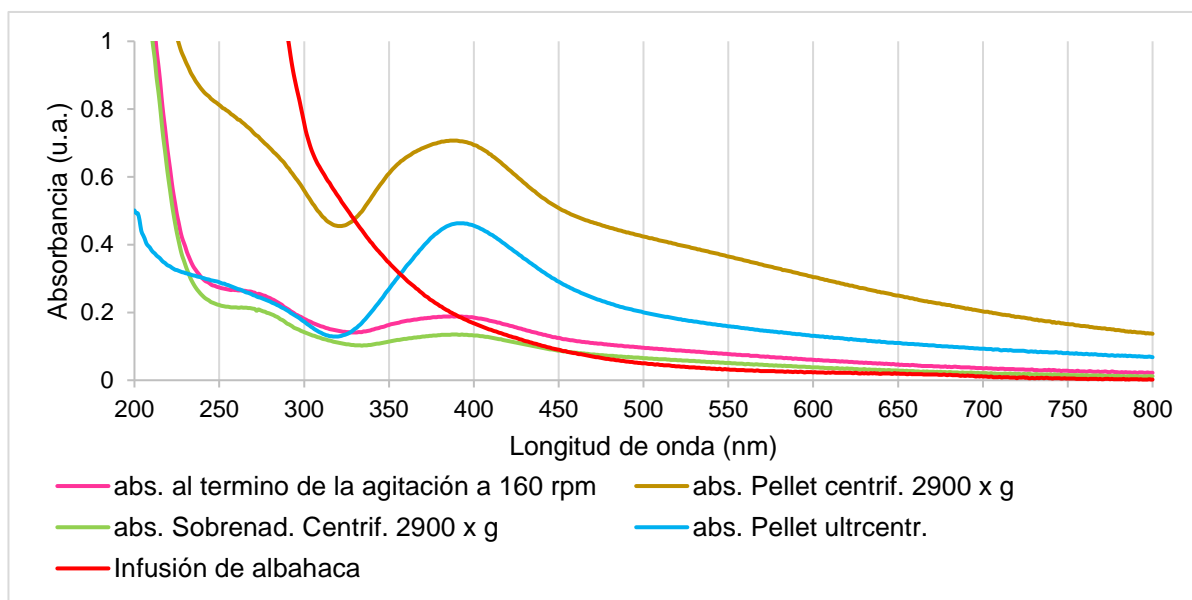


Figura 4. Espectro Uv-Vis de AgNPs biosintetizadas por *O. basilicum*. Absorbancia de la infusión de albahaca al término de la agitación (rosa), del sobrenadante después de la centrifugación a 2,900 x g (verde), de la pastilla resultante de la centrifugación (café), de la pastilla resultante de la ultracentrifugación resuspendida en amortiguador de fosfatos 1x (azul) y de la infusión de albahaca sin nitrato de plata (rojo).

5.2. Caracterización de las nanopartículas de plata

La Figura 5 muestra la micrografía de la pastilla desechada tras la centrifugación a 2,900 x g. Las AgNPs mostraron forma irregular, tamaño medio de 22 nm \pm 17 nm y formación de aglomerados de 10 a 50 nm. El causante de la aglomeración de las

AgNPs podría ser el elevado pH (12), como se ha demostrado por Mehata (2021) y Srikar y col. (2016).

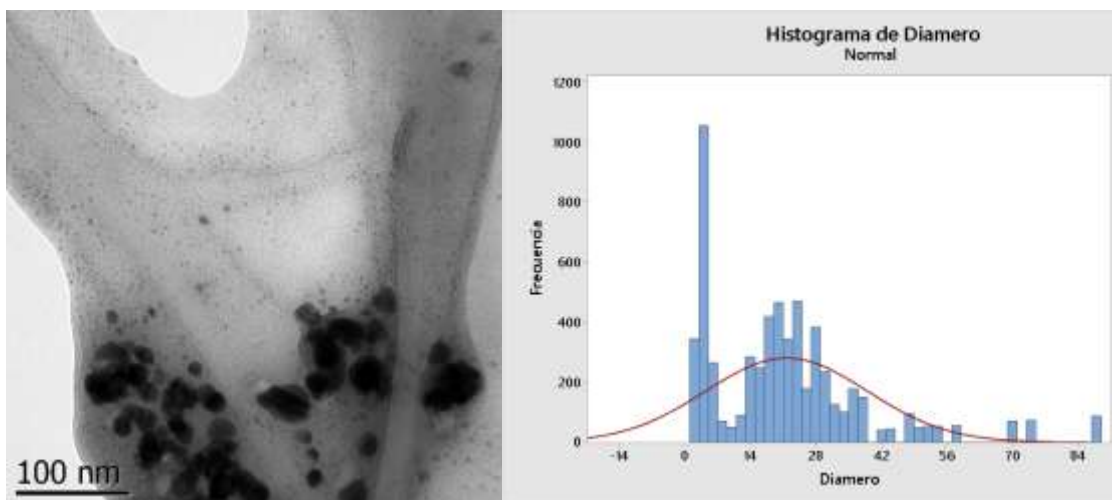


Figura 5. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM de las AgNPs en la pastilla después de la centrifugación a 2,900 x g durante 20 minutos. Derecha: Histograma de distribución de 6,087 nanopartículas de tamaño medio de 22 nm ± 17.

La micrografía que se muestra en la Figura 6 mostró las AgNPs recuperadas en la pastilla tras la ultracentrifugación, con AgNPs predominantemente esferoidales cuyo tamaño sigue una distribución normal con media de las 3.4 ± 1.0 nm. Así, se concluye que el proceso de centrifugación eliminó las AgNPs de mayor tamaño y los aglomerados sedimentados, logrando el objetivo de obtener AgNPs en suspensión, no aglomeradas y de menor diámetro. Un menor diámetro incrementa la toxicidad de las AgNPs (Miranda y col., 2022), lo cual permitirá reducir la cantidad de AgNPs para su futura aplicación en ensayos de citotoxicidad. Asimismo, AgNPs de menor tamaño poseen una mayor superficie disponible para la unión de biomoléculas que nanopartículas de mayor tamaño, por lo que podría esperarse una mayor concentración de proteínas en la superficie de las AgNPs tras el entrecruzamiento.

El tamaño de las AgNPs obtenidas es menor que el reportado mediante biosíntesis con *O. basilicum* por Malapermal y col. (2017) y Deepa y col. (2017), lo cual se atribuyó al cambio de pH en la infusión que no se realizó en ninguno de los casos.

Algunas ventajas reportadas de la síntesis de AgNPs en medios básicos son la rápida tasa de crecimiento, monodispersidad, tamaño pequeño y mejora en el proceso de reducción (Srikar y col., 2016).

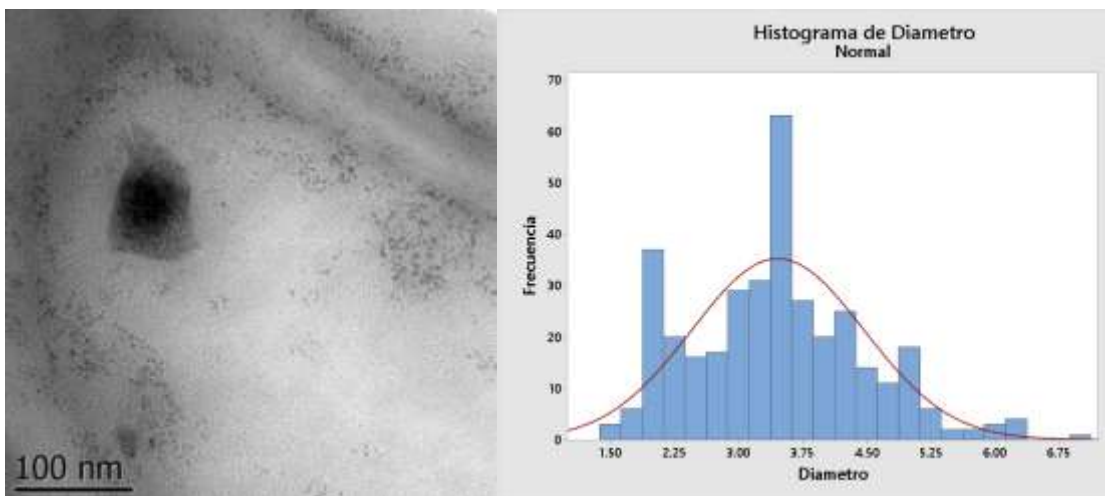


Figura 6. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM de las AgNPs del sobrenadante después de la centrifugación a 2,900 x g durante 20 minutos y ultracentrifugadas a 131,986 x g por 10 minutos. Derecha: Histograma de distribución de 355 nanopartículas de tamaño medio de 3.4 ± 1.0 nm.

La espectroscopía FTIR Y Raman se realizaron para determinar e identificar los grupos funcionales y a su vez los compuestos que constituyen al recubrimiento y estabilización de las AgNPs.

El espectro FTIR de las AgNPs se muestra en la Figura 7. La banda a 2131 cm^{-1} se atribuyó a la presencia del triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$. La banda a 1394 cm^{-1} indica la tensión C-C en anillos de compuestos aromáticos y las bandas a 1251 y 1066 cm^{-1} al estiramiento de C-O en ácidos carboxílicos, alcoholes, ésteres, entre otros, estas bandas se atribuyen a alcoholes, fenoles y flavonoides provenientes de la infusión de *O. basilicum*, que se ha reportado son moléculas que reducen y estabilizan las AgNPs (Al-Khafaji y col., 2023; Jacob y col., 2019; Pirtarighat y col., 2019). La banda de absorción a 1638 cm^{-1} y la banda a 3293 cm^{-1} se atribuyen a la flexión y tensión del enlace amida I, respectivamente, que indica la presencia de proteínas

interactuando con las AgNPs (Deepa y col., 2017; Malapermal y col., 2017; Pirtarighat y col., 2019).

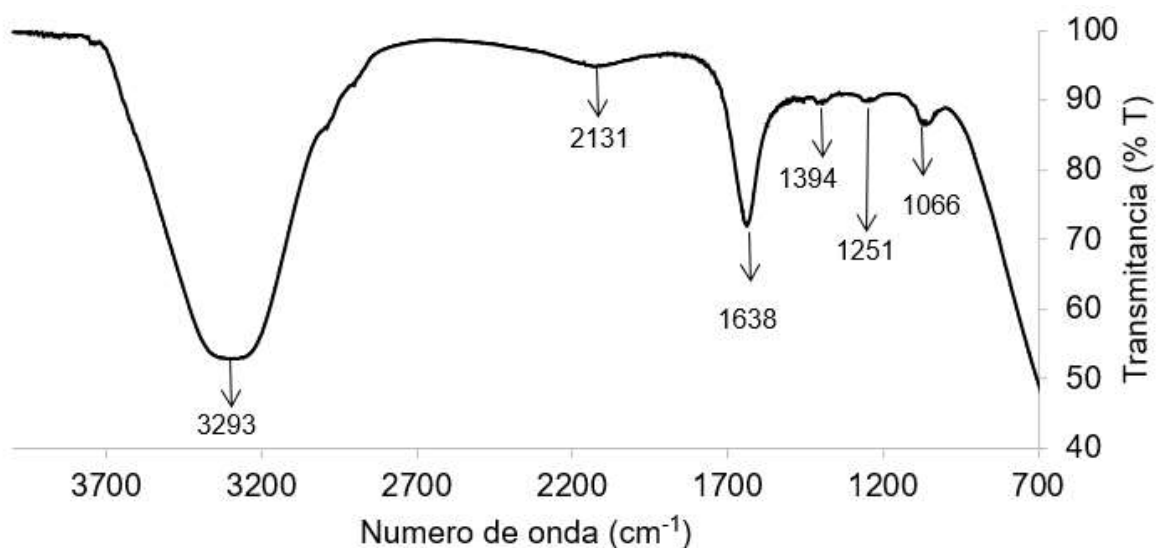


Figura 7. Espectro FTIR de las AgNPs sintetizadas por vía verde a partir de la infusión de *O. basilicum* y concentradas por ultracentrifugación a 131,986 x g por 10 minutos.

El espectro RAMAN de las nanopartículas se muestra en la Figura 8. La banda a 236 cm⁻¹ corresponde la vibración elástica de Ag-N y Ag-O, que indican que la estabilización de las AgNPs ocurre mediante la interacción con grupos amino, formando enlaces amida, éter ó carboxilo; dichos grupos se atribuyen a proteínas originarias de la infusión de *O. basilicum* (Joshi y col, 2018). Las bandas a 1356, 1531 y 1554 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones elásticas simétricas y asimétricas del grupo carboxilo C=O lo que sugiere el enlace directo del grupo COO⁻ a la superficie de las AgNPs (Kora y col, 2012; Sambalova y col, 2017).

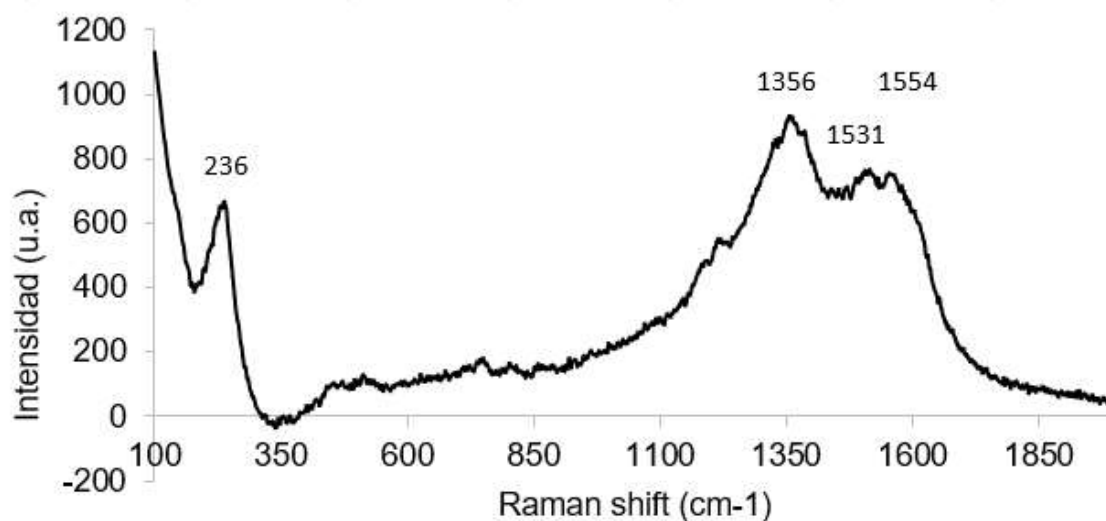


Figura 8. Espectro Raman de las AgNPs sintetizadas por vía verde a partir de la infusión de *O. basilicum* y concentradas por ultracentrifugación a $131,986 \times g$ por 10 minutos.

5.3. Evaluación de las condiciones para el entrecruzamiento de nanopartículas de plata con albúmina de suero bovino.

5.3.1. Efecto de la concentración de grupos amino sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA

Determinación de la concentración de proteína y grupos amino.

La concentración de grupos amino se determinó en las AgNPs concentradas, BSA y Lr, como se muestra en el Cuadro 2. Un primer lote de AgNPs fue entrecruzado de forma inicial con BSA, este lote poseía una mayor concentración de grupos amino con relación a las AgNPs y de mayor tamaño por su absorbancia máxima a 404 nm.

Nanopartículas con menor tamaño tienen una mayor capacidad de unirse a proteínas debido a su extensa área de superficie (Barbir y col., 2021) sin embargo Bekdemir y col., (2019) han demostrado que la interacción de proteínas disminuye con nanopartículas ultrapequeñas (1 – 3 nm) hasta incluso evitar la formación del recubrimiento de las AgNPs por proteínas. Debido a la importancia del tamaño de las

nanopartículas en el trabajo se decidió continuar con el proceso de síntesis del segundo lote.

Cuadro 2. Contenido de proteína y grupos amino en AgNPs concentradas por ultracentrifugación a 131,986 x g por 10 minutos, soluciones de 10 g/L de BSA o Lr en amortiguador de fosfatos pH 7.4. El valor presentado es la media \pm la desviación estándar calculado con tres replicas.

	Concentración de proteína (g/L)	Concentración de grupos amino (mM)
AgNPs concentradas	0.76 \pm 0.02	0.87 \pm 0.03
BSA	10	7.34 \pm 0.41
Lr	0.62 \pm 0.01	1.27 \pm 0.08

El espectro UV-Vis obtenido del barrido de la mezcla AgNPs+BSA+Gnp se muestra en la Figura 9, así como los espectros de los reactivos a concentración 1 mM -NH₂ y una solución AgNPs+BSA usada como control negativo. Las AgNPs, BSA y AgNPs+BSA presentaron una banda de absorción a 280 nm característica de grupos fenólicos que no es visible en el espectro del genipino (Mehata, 2021). Entre 400 y 450 nm se observó la absorbancia de la resonancia de plasmón de superficie presente en todas las muestras que contienen AgNPs (Pirtarighat y col., 2019). La banda a 411 nm en AgNPs@BSA 1 mM -NH₂ presentó un desplazamiento hacia el infrarrojo de 7 nm respecto al control negativo, lo cual representa el aumento de tamaño de las AgNPs por la unión con el BSA. Este desplazamiento coincide con lo reportado por Ananth y col., (2011) quienes estabilizaron AgNPs con alcohol polivinílico con BSA adsorbido a la superficie, provocando el desplazamiento de la banda de absorción de las nanopartículas de 420 nm a 443 nm.

El entrecruzamiento se demostró con la presencia de bandas a 600 nm y 280 nm en el BSA@Gnp@AgNPs. La primera es característica de la unión de dos Gnp previamente enlazados con un grupo amino unido a un radical; mientras que la segunda corresponde a la unión de un grupo amino con una sola molécula de genipino (Pizzolitto y col., 2020).

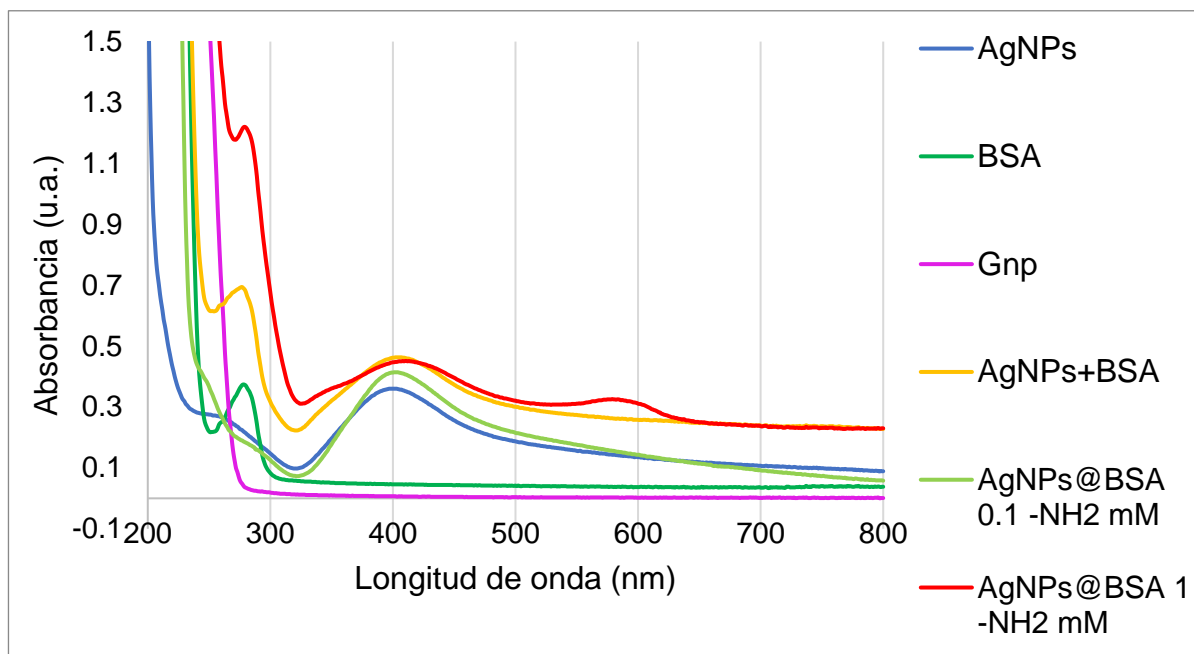


Figura 9. Espectro UV-Vis del entrecruzamiento. Soluciones 1 mM -NH₂ de AgNPs y BSA, 0.1 % Gnp, mezcla de 1 mM -NH₂ AgNPs y 1 mM -NH₂ de BSA (AgNPs+BSA), entrecruzados de AgNPs y BSA (AgNPs@BSA) a 1 y 0.1 mM -NH₂ de ambos reactivos y 0.1 % Gnp, respectivamente.

Los espectros de absorción UV-Vis de los entrecruzados AgNPs@BSA 0.1 y 1 mM -NH₂ se muestran en la Figura 9. Después de 2 h de entrecruzamiento la banda a 404 nm incrementó su intensidad desde 0.373 hasta 0.413 u.a. para 0.1 mM -NH₂, esto indica el entrecruzamiento de una sola molécula de genipino con el grupo amino de BSA o AgNPs como reporta Pizzolitto y col. (2020). La presencia de una banda alrededor de 388 nm indica el entrecruzamiento de una molécula de Gnp con un grupo -NH₂ (Neves y col., 2022), en este caso dicha banda no es distinguible debido a que se sobrepondría con la banda a 404 nm. El incremento en la absorción a 404

se puede atribuir al entrecruzamiento, de forma similar a lo reportado por Caba-Flores y Achilli, (2015) quienes mostraron un incremento en la banda de absorción característica de las nanopartículas de oro a 520 nm después de entrecruzarlas con BSA por irradiación gamma.

La ausencia de la banda a 600 nm no significa que no hay entrecruzamiento; la banda podría presentar una señal débil por la baja concentración de grupos amino en la reacción, por lo que sería indistinguible de la cola de la banda centrada a 404 nm. Por lo anterior, se decidió utilizar con indicativo del entrecruzamiento la absorbancia de la banda a 404 nm y 280 nm.

5.3.2. Efecto de la preincubación con genipino y de la temperatura sobre el entrecruzamiento de AgNPs con BSA

La adición de genipino se evaluó en un solo paso, por separado con las AgNPs y BSA, así como en etapas sucesivas. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y a 37 °C y se muestran en la Figura 10.

Todos los nanocompositos mostraron una banda de absorción a 404 nm, que se atribuye a la presencia de AgNPs (Kumar y col., 2020; Mehata, 2021).

Los ensayos en un paso mostraron una banda a 404 nm correspondiente a las AgNPs, la cual fue mayor para el nanocomposito que para el control negativo con valores de 0.521 y 0.431 u.a., respectivamente; evidenciando el entrecruzamiento.

Los ensayos realizados por separado mostraron una intensidad de absorbancia mayor al realizar el entrecruzamiento a 37 °C respecto al realizado a temperatura ambiente, con valores de 0.584 u.a y 0.509 u.a., respectivamente. Este aumento indica mayor entrecruzamiento, como se mencionó con anterioridad. La banda a 397 nm observada en el control negativo se desplazó hasta los 403 nm después de realizar el entrecruzamiento (AgNPs@BSA), lo cual indica un crecimiento en el tamaño de la partícula. El control negativo y el entrecruzado en un paso realizado a temperatura ambiente mostraron la misma absorbancia a 280 nm de 0.277 u.a.,

mientras que la reacción realizada a 37 °C incrementó a 0.334 u.a., indicando la unión de un Gnp con un grupo -NH₂ (Alhosseini y col., 2017). La reacción en un paso a 22 °C mostró una banda a 600 nm de 0.219 u.a., lo que indicó el entrecruzamiento entre dos Gnp, cada uno con un radical. Dado que esta banda no se observó en el resto de las muestras, se utilizaron estas condiciones para los siguientes ensayos.

Los nanocompositos obtenidos por etapas sucesivas a 22 °C y 37 °C mostraron una mayor y menor intensidad en la banda a 403 nm respecto al control negativo (AgNPs+BSA), con valores de 0.59 y 0.477 y 0.547 u.a., respectivamente; mostrando que la formación de un nanocomposito se favorece a 22 °C. El entrecruzamiento de un -NH₂ con un radical, visualizado en el espectro UV-Vis como el incremento en la absorbancia a 280 nm, se observó en mayor magnitud a 22 °C que a 37 °C y al control negativo, con valores de 0.324, 0.28 y 0.295 u.a., respectivamente.

El entrecruzamiento por separado a 37°C y en etapas sucesivas a 22°C permitió mayor entrecruzamiento de las AgNPs con BSA que el método en un paso a 22°C, esto se vio reflejado en el aumento de la intensidad de la banda a 404 nm de 0.045 y 0.052 u.a. respectivamente. El incremento en la temperatura de reacción de 22 °C a 37 °C favoreció el entrecruzamiento, mostrado por la absorbancia a 404 nm, solo en el ensayo por separado por lo que la temperatura no se aumentó.

La mayor absorción a 404 nm se observó en el entrecruzamiento en etapas sucesivas a 22 °C seguido por un paso a 37 °C con una diferencia mínima por esta razón se decidió hacer los ensayos a temperatura ambiente.

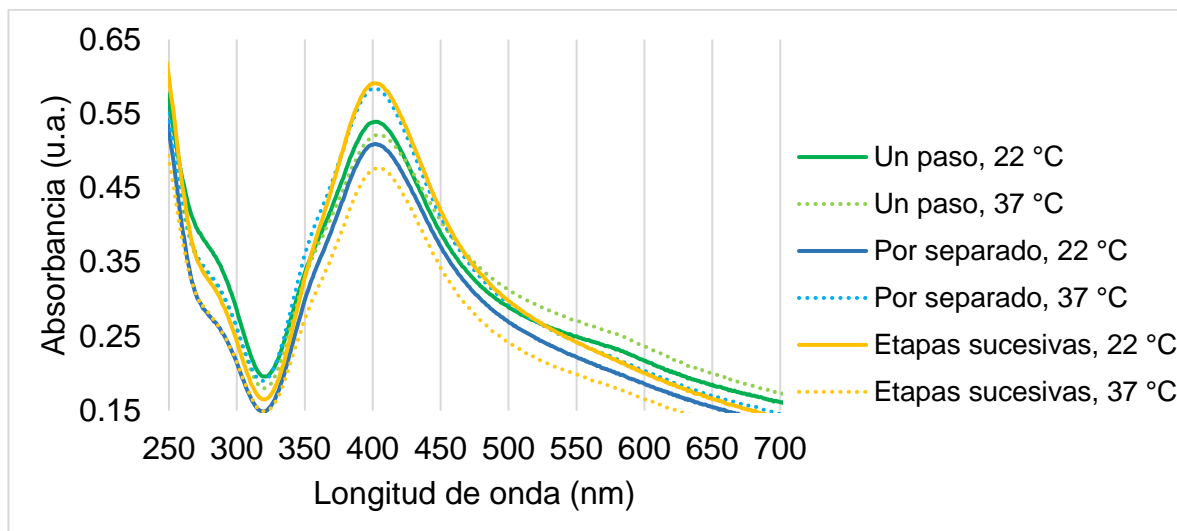


Figura 10. Espectro UV-Vis de entrecruzamiento a diferentes temperaturas adicionando el genipino en un solo paso junto a el BSA y AgNPs, por separado al BSA y a AgNPs y adicionado en etapas sucesivas (primero genipino con AgNPs y después adición de BSA). El BSA y AgNPs en concentración 0.1 mM -NH₂.

5.3.3. Efecto de la concentración de genipino y el tiempo de reacción sobre el entrecruzamiento

El aumento en la concentración de genipino de 0.01 a 0.1 y 1 % se propuso por que la concentración de grupos amino en las AgNPs fue de 0.1 mM, 10 veces menor a lo reportado por Pizzolito y col. (2020); esperando así favorecer el entrecruzamiento al emular sus condiciones de entrecruzamiento. El tiempo de reacción se prolongó para aumentar la probabilidad de interacción entre el genipino y grupos amino, ya que se ha reportado el incremento de la banda a 600 nm, indicador del entrecruzamiento, en tiempos de reacción de hasta 24 h (Kahoush y col., 2021)

En las Figuras Figura 11 a Figura 16 se muestran los espectros de absorción de los controles negativos (AgNPs+BSA) y los ensayos de entrecruzamiento de 0 a 8 ó 10 h. En todos los ensayos se observó una menor absorbancia alrededor de los 404 nm en el tiempo inicial respecto al tiempo final del control negativo. El proceso de agitación durante 10 h del control negativo resuspendió AgNPs que se encontraban agregadas incrementando la absorbancia.

El entrecruzamiento en un solo paso con 0.1 y 1 % de Gnp se muestra en las Figuras Figura 11 y Figura 12, respectivamente. El entrecruzado con adición de 0.1 % de Gnp en un solo paso mostró una absorbancia máxima a 400 nm, la cual incrementó de 0.301 hasta 0.867 u.a. a las 10 h respecto al control negativo (AgNPs+BSA) en este mismo periodo de tiempo. El entrecruzamiento con 1 % de genipino alcanzó la máxima absorbancia a 401 nm después de 8 h de reacción con 1.118 u.a.; 1.15 veces mayor a la absorbancia máxima registrada a las 10 h con 0.1 % de genipino. La banda a los 600 nm se observó a partir de las 8 h en el ensayo con genipino al 0.1 % y a las 6 h en el ensayo con genipino al 1 %, evidenciando el entrecruzamiento (Kahoush y col., 2021; Neves y col., 2022).

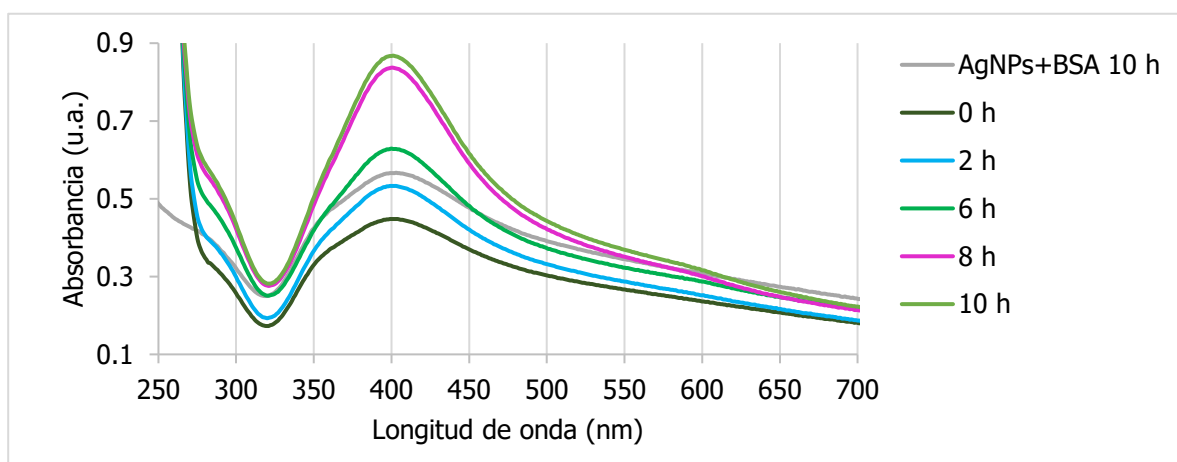


Figura 11. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % en un paso a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

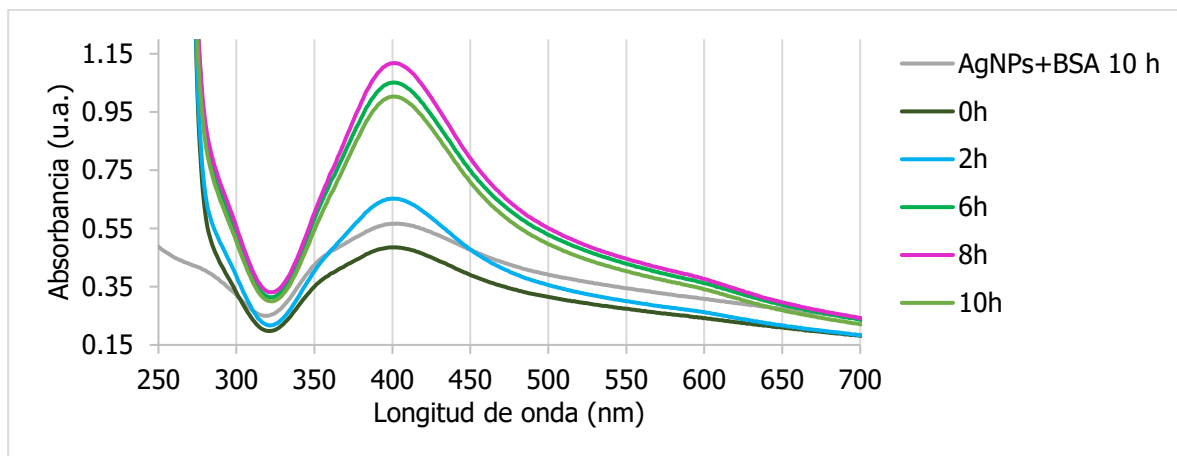


Figura 12. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % en un paso a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

Los entrecruzados obtenidos con adición por separado de genipino al 0.1 y 1 % se muestran en las Figura 13 y Figura 14, respectivamente. La máxima absorbancia a 404 nm se mostró tras 4 y 6 h de reacción, para los ensayos con 0.1 y 1 % de Gnp, respectivamente; con 1 % de Gnp se obtuvo un valor 1.18 veces mayor que con 0.1 % de Gnp.

El ensayo con Gnp a 0.1 % mostró que el entrecruzamiento termina después de 4 h, tras las cuales se alcanzó la máxima absorbancia a 400 nm; mientras que el ensayo a 1 % de Gnp alcanzó la máxima absorbancia a las 6 h con un incremento despreciable respecto a las 4 h. El BSA@Gnp al 0.1 y 1 % mostraron una banda casi imperceptible a 380 nm, la cual es característica de la unión del genipino a un grupo amino. La banda a 380 nm no se observó en AgNPs@Gnp porque se traslapa con la banda de las AgNPs a 400 nm.

La banda a 600 nm, característica del entrecruzamiento se observó tras 4 y 6 h en los ensayos con 0.1 y 1 % de Gnp.

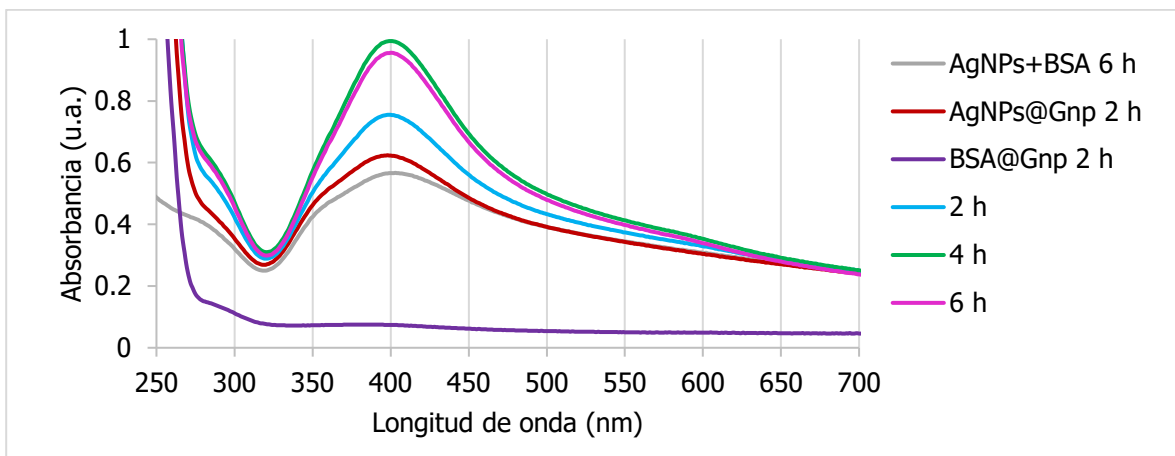


Figura 13. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % por separado a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

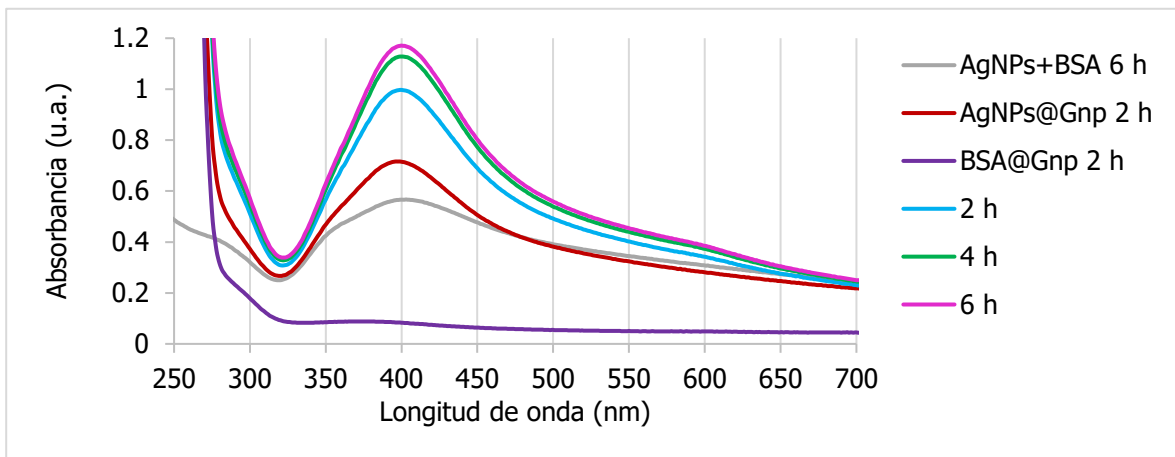


Figura 14. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % por separado a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

El espectro de absorción UV-Vis del entrecruzado por con adición de genipino al 0.1 y 1 % en etapas sucesivas se muestra en las Figura 15 y Figura 16. La máxima absorbancia en los ensayos de entrecruzamiento a 400 nm se alcanzó a las 6 h y 4 h con Gnp al 0.1 y 1 %, alcanzando valores de 0.805 y 0.972 u.a., respectivamente.

En ambas reacciones de entrecruzamiento hubo un cambio en la absorbancia máxima de las AgNPs determinada a 403 nm,

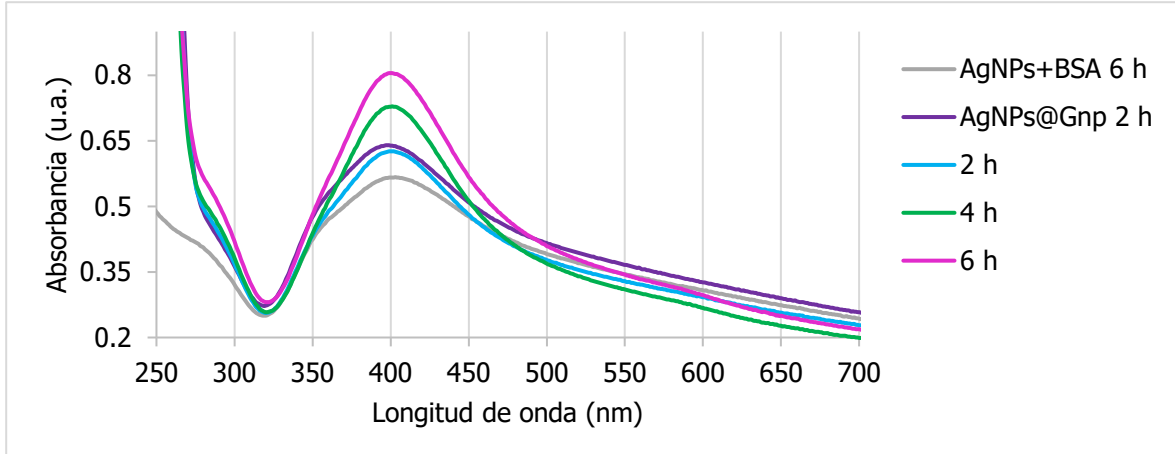


Figura 15. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 0.1 % en etapas sucesivas a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

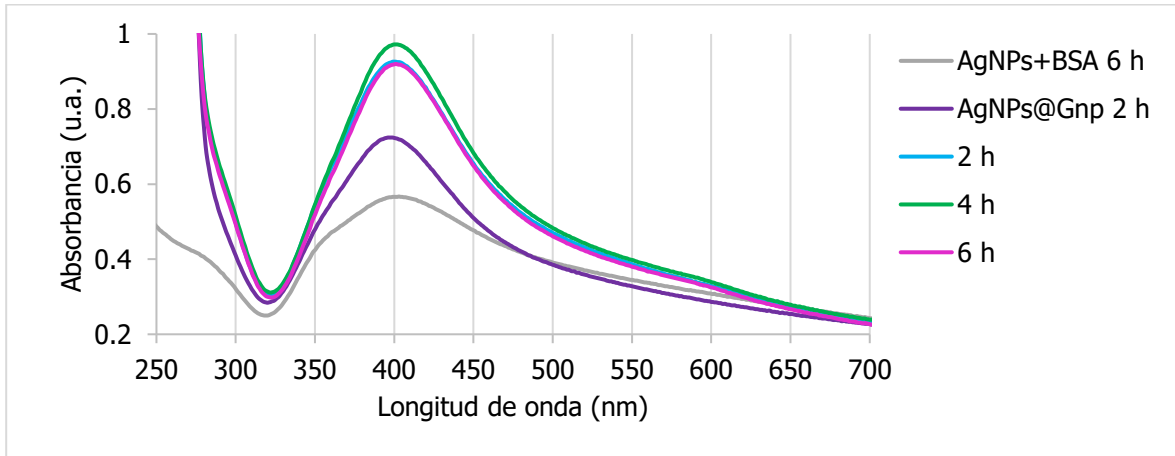


Figura 16. Espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@BSA con adición de genipino al 1 % en etapas sucesivas a diferentes horas. La concentración de BSA y AgNPs fue 0.1 mM -NH₂.

El entrecruzado con genipino al 1 % a las 2 h tiene una intensidad en la banda de las AgNPs similar a la del entrecruzado con genipino al 0.1 % a las 6 h, con valores de 0.924 y 0.805 u.a., respectivamente. Los entrecruzados con Gnp al 0.1 y 1 % a partir

de las 4 h y 2 h, respectivamente, mostraron una banda a 600 nm, la cual no está en AgNPs@Gnp, indicando que las AgNPs no se entrecruzan entre sí, pero si lo hacen con el BSA.

Los ensayos de entrecruzamiento con Gnp al 1 % mostraron mayor entrecruzamiento (banda a 400 nm) que con Gnp al 0.1 %.

Los ensayos con Gnp al 1 % alcanzaron en menor tiempo valores de absorción similares a los obtenidos con Gnp al 0.1 % tras el tiempo final de incubación; por lo que se seleccionó la concentración de 1 % de Gnp para ensayos posteriores. El ensayo de entrecruzamiento en etapas sucesivas presentó menor absorción alrededor de 404 nm que los otros dos ensayos, por ello se descartó. La absorbancia alrededor de 404 nm en el ensayo en un paso con Gnp al 1 % tras 6 h fue similar a la obtenida en el ensayo por separado con Gnp al 1 % tras 4 h (mas 2 horas de preincubación) con valores de 1.08 y 1.16 u.a., respectivamente. Dado que el ensayo en un paso es más sencillo, se optó por utilizar esta metodología

5.3.4. Efecto del pretratamiento de AgNPs con urea sobre el entrecruzamiento

El tratamiento con urea que se presenta a continuación se propuso para aumentar la cantidad de grupos amino en la superficie de las AgNPs de tal forma que se favorezca el entrecruzamiento con BSA. Las Figura 17 aFigura 19 muestran los espectros de absorción de una solución 1 mM -NH₂ de AgNPs adicionadas con 1, 0.1 y 0.01 % de urea a diferentes tiempos de incubación, respectivamente.

La banda de absorción de las AgNPs a 397 nm con pretratamiento de urea al 1 % incrementó respecto a las AgNPs sin adición de urea, aunque presentó la absorbancia máxima de 0.962 u.a. a las 3 h, la diferencia respecto a la absorbancia a las 2 h de incubación fue mínima con un valor de 0.928 u.a. La banda a 350 nm a las 0 h indicó la formación de una segunda distribución de nanopartículas de menor tamaño; después de 1 h de agitación a 1,000 rpm (Thermo Shaker Incubator MS-100 RT) con urea ya no se observa esta banda debido a que se traslapa con la banda a

397 nm de mayor intensidad. Los tratamientos con urea al 0.1 y 0.01 % también mostraron esta banda a 350 nm a las 0 h.

Los pretratamientos con urea al 1, 0.1 y 0.01 % mostraron un corrimiento en la banda de absorción de las AgNPs de 397 nm a 398, 394, y 395 nm, respectivamente. Los corrimientos al ultravioleta indican la interacción AgNPs-Urea, acorde a lo reportado por Ali y col., (2018) e Ismail y col., (2022). Los tratamientos con 0.1 y 0.01 % de urea mostraron una disminución en la intensidad de la banda de absorción de las AgNPs después de 2 h y 1 h, respectivamente, lo que se interpreta como la aglomeración o disminución de las AgNPs (Ashraf y col, 2013) Las bandas a 394 y 395 nm se ensancharon, lo cual se ha reportado como la aglomeración de las AgNPs (Ashraf y col., 2013; Liu y col., 2017).

La urea al 1 % fue seleccionada como el pretratamiento para aumentar la cantidad de grupos amino teniendo en cuenta que fue la banda con la mayor absorbancia a 397 nm, indicando una mayor concentración de AgNPs (Deepa y col., 2017), así como una banda de absorción estrecha que corresponde a nanopartículas estables y monodispersas (Kumar y col., 2020). El tiempo seleccionado fue de 2 h, ya que posteriormente no se observó incremento en la banda a 397 nm.

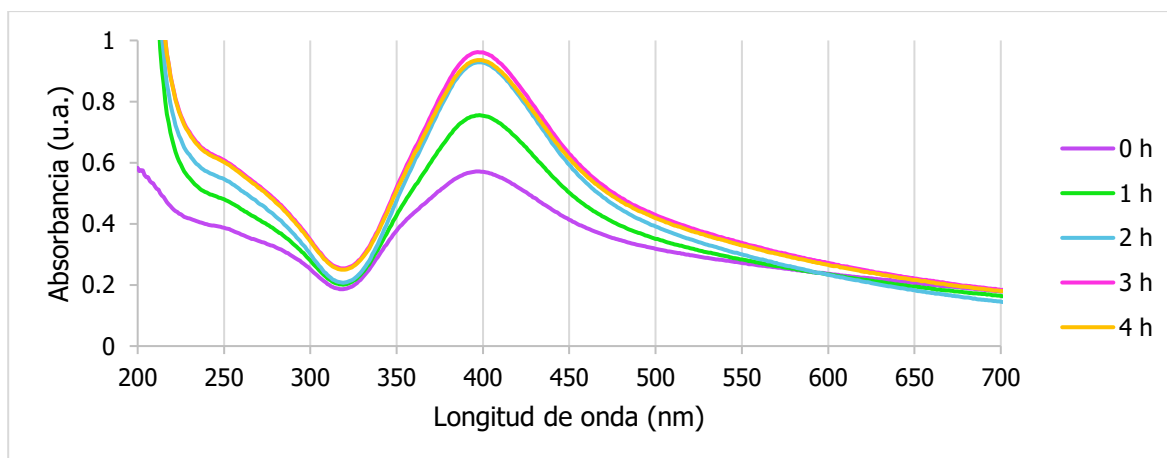


Figura 17. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 1 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH₂ fueron mezcladas con urea al 1 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.

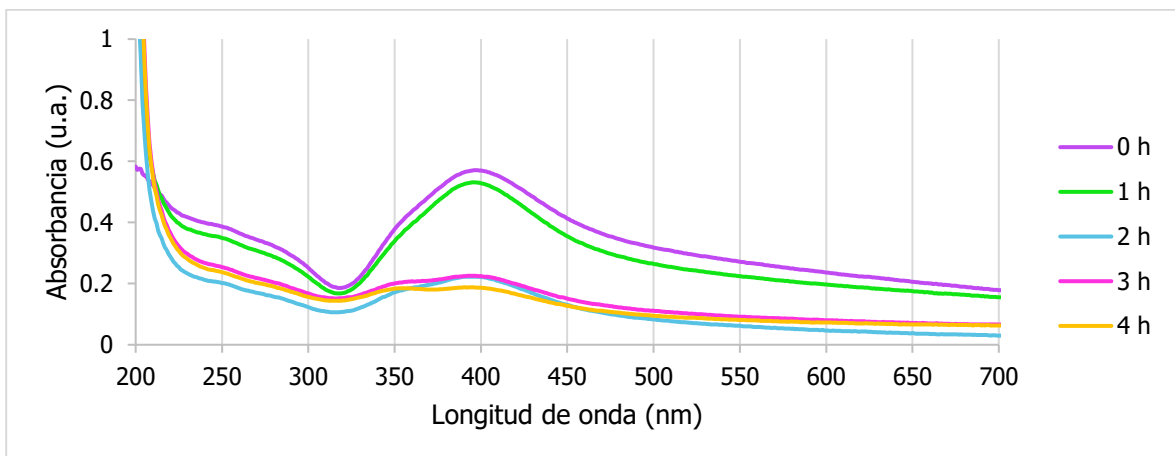


Figura 18. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 0.1 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH₂ fueron mezcladas con urea al 0.1 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.

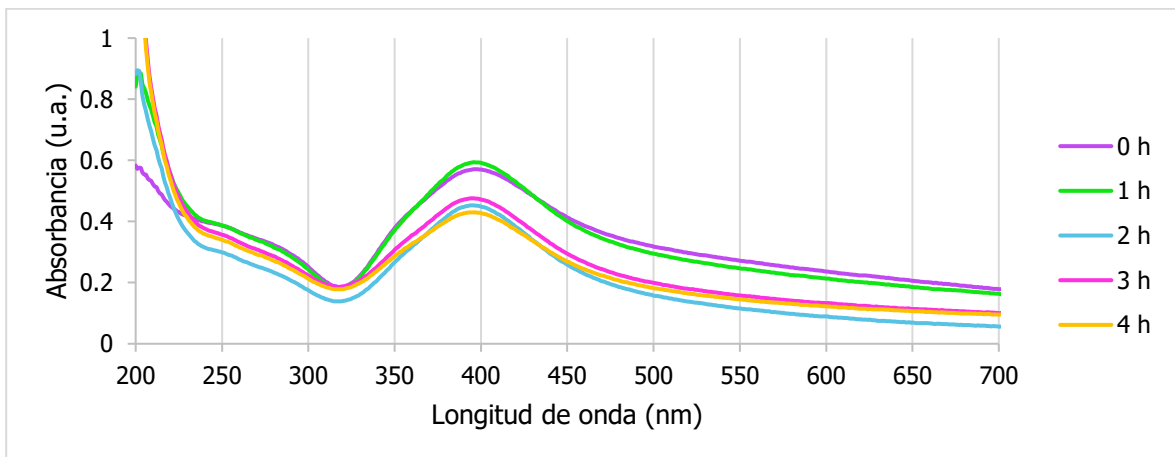


Figura 19. Espectro UV-Vis del pretratamiento de AgNPs con Urea al 0.01 %. Las AgNPs 0.1 mM -NH₂ fueron mezcladas con urea al 0.01 % a 1,000 rpm y se midió su absorbancia cada hora durante 4 horas.

El entrecruzado con las condiciones seleccionadas previamente, AgNPs 0.1 mM -NH₂, temperatura ambiente, mezclado de BSA y Gnp al mismo tiempo, Gnp al 1 %, 6 h de tiempo de reacción y preincubación de urea al 1 %, se muestran en la Figura 20.

El nanocomposito tuvo una absorbancia máxima a 402 nm de 1.509 u.a. que representa 0.429 u.a. más que el mismo proceso sin urea, de forma similar la banda a 600 nm incrementó 0.229 u.a. Indicando una mayor producción de nanopartículas y entrecruzamiento (Deepa y col., 2017; Neves y col., 2022; Pirtarighat y col., 2019).

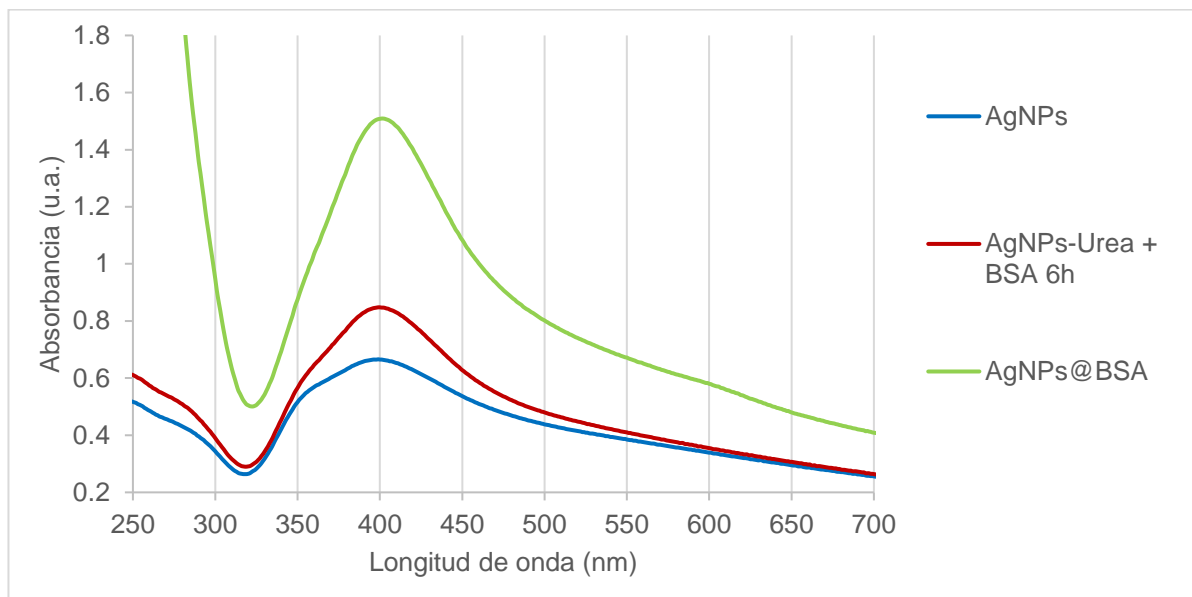


Figura 20. Espectro UV-Vis del nanocomposito AgNPs@BSA. Entrecruzamiento con pretratamiento de urea al 1 % de las AgNPs, adicionando Gnp y BSA al mismo tiempo, genipino al 1 % y mezclando durante 6 h.

5.4. Optimización del entrecruzamiento de nanopartículas de plata con BSA.

Las nanopartículas de plata biosíntetizadas con la infusión de *O. basilicum* se entrecruzaron con BSA utilizando un diseño factorial 2^k . Los modelos de predicción para el efecto de la concentración de genipino, AgNPs y BSA se ajustaron a una ecuación polinomial de primer grado con una $R^2 = 99.22$ para la absorbancia a 600 nm que indica entrecruzamiento y $R^2 = 97.77$ para la concentración de AgNPs. Las condiciones de soluciones globales en ambos casos tanto para maximizar la banda a 600 nm y la concentración de AgNPs en el nanocomposito fueron las mismas, genipino al 1 %, 0.3 mM $-NH_2$ en BSA y 0.3 mM $-NH_2$ en AgNPs.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados promedio obtenidos del diseño experimental 2^3 de las dos respuestas, la absorbancia máxima a 600 nm (A_{600}) y la concentración de nanopartículas en el entrecruzado (AgNPs g/L sobrenadante). Las combinaciones con la mayor absorbancia a 600 nm son las que se realizaron con 0.3 mM $-NH_2$ AgNPs y BSA mientras que la combinación con mayor concentración de AgNPs en el entrecruzado fue con genipino 1 %, BSA 0.3 $-NH_2$ mM y AgNPs 0.3 $-NH_2$ mM.

Cuadro 3. Resultado de las variables experimentales en el diseño experimental factorial 2^3 de la optimización del entrecruzamiento de AgNPs con BSA por genipino.

Corrida	Valores de variable	Promedio de la concentración de AgNPs en sobrenadante (g/L)	Desviación estándar	Promedio de absorbancia a 600 nm (u.a.)	Desviación estándar
1	Genipino 1 %, BSA 0.1 NH_2 mM, AgNPs 0.1 NH_2 mM	0.014	0.0012	0.086	0.0029
2	Genipino 1.5 %, BSA 0.1 NH_2 mM, AgNPs 0.1 NH_2 mM	0.002	0.0001	0.081	0.0017

Continuación del Cuadro 3.

Corrida	Valores de variable	Promedio de la concentración de AgNPs en sobrenadante (g/L)	Desviación estándar	Promedio de absorbancia a 600 nm (u.a.)	Desviación estándar
3	Genipino 1 %, BSA 0.3 NH ₂ mM, AgNPs 0.1 NH ₂ mM	0.020	0.0030	0.201	0.0141
4	Genipino 1.5 %, BSA 0.3 NH ₂ mM, AgNPs 0.1 NH ₂ mM	0.008	0.0011	0.210	0.0045
5	Genipino 1 %, BSA 0.1 NH ₂ mM, AgNPs 0.3 NH ₂ mM	0.023	0.0011	0.101	0.0031
6	Genipino 1.5 %, BSA 0.1 NH ₂ mM, AgNPs 0.3 NH ₂ mM	0.006	0.0013	0.090	0.0031

Continuación del Cuadro 3.

Corrida	Valores de variable	Promedio de la concentración de AgNPs en sobrenadante (g/L)	Desviación estándar	Promedio de absorbancia a 600 nm (u.a.)	Desviación estándar
7	Genipino 1 %, BSA 0.3 NH ₂ mM, AgNPs 0.3 NH ₂ mM	0.025	0.0005	0.228	0.0095
8	Genipino 1.5 %, BSA 0.3 NH ₂ mM, AgNPs 0.3 NH ₂ mM	0.008	0.0008	0.222	0.0044

El Cuadro 4 muestra el análisis de varianza (ANOVA) del entrecruzamiento medido como absorbancia a 600 nm. La concentración de grupos amino en el BSA y las AgNPs tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta A600; de manera similar a lo observado para la concentración de AgNPs en el sobrenadante. El porcentaje de genipino tuvo significancia al usar la concentración de AgNPs en el sobrenadante como variable de respuesta como se muestra en el Cuadro 5. Las interacciones AgNPs - BSA y AgNPs – Genipino tuvieron un efecto significativo en la concentración de AgNPs en el nanocomposito. En cuanto a las interacciones de dos términos en A600 ninguna tuvo efecto significativo y en ambos casos la interacción triple no tuvo efecto significativo en la respuesta.

Cuadro 4. Análisis de varianza del nivel de entrecruzamiento medido como la absorbancia a 600 nm del sobrenadante de las muestras del diseño experimental.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0.095815	0.013688	290.46	0.000
Lineal	3	0.095389	0.031796	674.72	0.000
% Genipino	1	0.000057	0.000057	1.21	0.288
mM -NH ₂ BSA	1	0.093875	0.093875	1992.04	0.000
mM -NH ₂ AgNPs	1	0.001457	0.001457	30.92	0.000
Interacciones de 2 términos	3	0.000404	0.000135	2.86	0.070
% Genipino*mM -NH ₂ BSA	1	0.000108	0.000108	2.30	0.149
% Genipino*mM -NH ₂ AgNPs	1	0.000187	0.000187	3.97	0.064
mM NH ₂ BSA*mM -NH ₂ AgNPs	1	0.000108	0.000108	2.30	0.149
Interacciones de 3 términos	1	0.000022	0.000022	0.47	0.504
% Genipino*mM -NH ₂ BSA*mM -NH ₂ AgNPs	1	0.000022	0.000022	0.47	0.504
Error	16	0.000754	0.000047		
Total	23	0.096569			

GL: grados de libertad, SC Ajust.: suma de cuadrados ajustada, MC Ajust.: media de los cuadrados ajustada, nivel de significancia: $p < 0.05$

Cuadro 5. Análisis de varianza de la concentración de nanopartículas de plata entrecruzadas al nanocomposito medidas en el sobrenadante a 395 nm.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0.001488	0.000213	100.03	0.000
Lineal	3	0.001424	0.000475	223.44	0.000
% Genipino	1	0.001190	0.001190	560.02	0.000
mM -NH ₂ BSA	1	0.000108	0.000108	51.00	0.000
mM -NH ₂ AgNP	1	0.000126	0.000126	59.31	0.000
Interacciones de 2 términos	3	0.000063	0.000021	9.90	0.001
% Genipino*mM -NH ₂ BSA	1	0.000001	0.000001	0.49	0.494
% Genipino*mM -NH ₂ AgNP	1	0.000040	0.000040	18.84	0.001
mM NH ₂ BSA*mM -NH ₂ AgNP	1	0.000022	0.000022	10.37	0.005
Interacciones de 3 términos	1	0.000000	0.000000	0.18	0.680
% Genipino*mM -NH ₂ BSA*mM NH ₂ AgNP	1	0.000000	0.000000	0.18	0.680
Error	16	0.000034	0.000002		
Total	23	0.001522			

GL: grados de libertad, SC Ajust.: suma de cuadrados ajustada, MC Ajust.: media de los cuadrados ajustada, nivel de significancia: $p < 0.05$

La ecuación de la variable respuesta A600 (ecuación 2) sugiere que la interacción entre las AgNPs y el BSA tiene el mayor impacto positivo en la reacción de entrecruzamiento y la triple interacción % Gnp, mM -NH₂ BSA y mM -NH₂ AgNPs corresponde al mayor impacto negativo en la respuesta del entrecruzamiento. La ecuación 3 de la variable respuesta AgNPs g/L en sobrenadante muestra que mM -

NH₂ AgNPs es la variable con mayor impacto positivo en la concentración de AgNPs en el entrecruzado mientras que la interacción doble mM -NH₂ BSA, mM -NH₂ AgNPs expresa el mayor impacto negativo. El genipino presentó la variable con el menor impacto y en partículas con un impacto negativo en ambas ecuaciones por lo que la concentración se mantendrá fija en 1 %.

$$A_{600} = 0.0408 - 0.0162 x_1 + 0.381 x_2 + 0.079 x_3 + 0.162 x_1 * x_2 - 0.035 x_1 * x_3 + 0.692 x_2 * x_3 - 0.383 x_1 * x_2 * x_3$$

Ecuación 2

$$\text{Concentración de AgNPs (g/L) en nanocomposito} = 0.02242 - 0.01750 x_1 + 0.0425 x_2 + 0.1192 x_3 - 0.0017 x_1 * x_2 - 0.0617 x_1 * x_3 - 0.158 x_2 * x_3 + 0.050 x_1 * x_2 * x_3$$

Ecuación 3

Dónde x_1 = % Genipino, x_2 = mM -NH₂ BSA y x_3 = mM -NH₂ AgNPs

La Figura 21 muestra la gráfica de la respuesta de entrecruzamiento, medido como absorbancia a 600 nm y la respuesta concentración de nanopartículas en el nanocomposito (sobrenadante). Se observa que dichas graficas coinciden con el modelo predicho para maximizar las variables de respuesta que es 0.3 mM -NH₂ de BSA, y 0.3 mM -NH₂ de AgNPs que estimó una respuesta de 24.67 mg AgNPs/ L sobrenadante y absorbancia de 0.1878 u.a. a 600 nm.

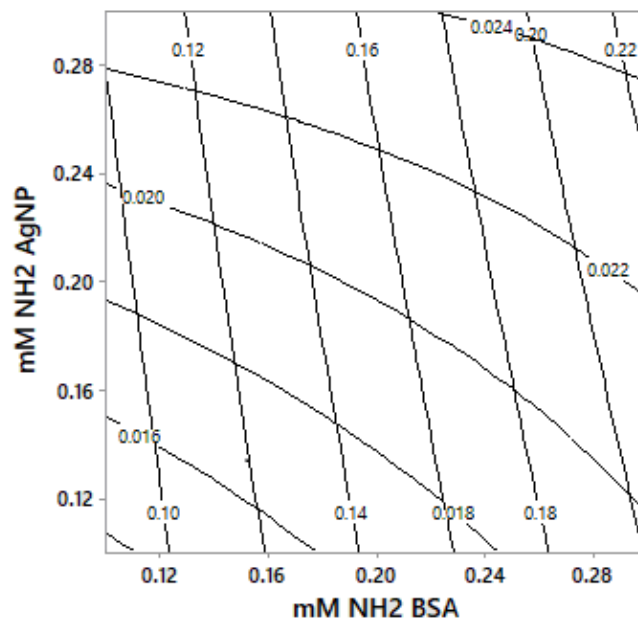


Figura 21. Grafica de contorno para el entrecruzamiento de mM -NH₂ AgNPs, mM -NH₂ BSA maximizando la respuesta A600 de entrecruzamiento y la concentración de AgNPs en el entrecruzado como AgNPs g/L sobrenadante. Valores fijos genipino 1 %. Las líneas diagonales muestran el incremento en el grado de entrecruzamiento y las líneas curvas muestran la concentración de nanopartículas de plata en el nanocomposito.

La Figura 22 muestra la electroforesis desnaturizante dodecilsulfato sódico en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los niveles del diseño experimental. En este gel se puede observar que la banda del BSA no aparece en ninguna de las muestras entrecruzadas reafirmando que la diferencia de concentración de 1 a 1.5 % de genipino no influyó de forma significativa en el nivel de entrecruzamiento. Teimouri y Kasapis (2020) obtuvieron resultados similares evaluando el porcentaje de entrecruzamiento del BSA usando de 0 a 4 % de genipino. La diferencia del porcentaje de entrecruzamiento entre el 1 y 1.5 % que obtuvieron es de 83 a 86 %, respectivamente.

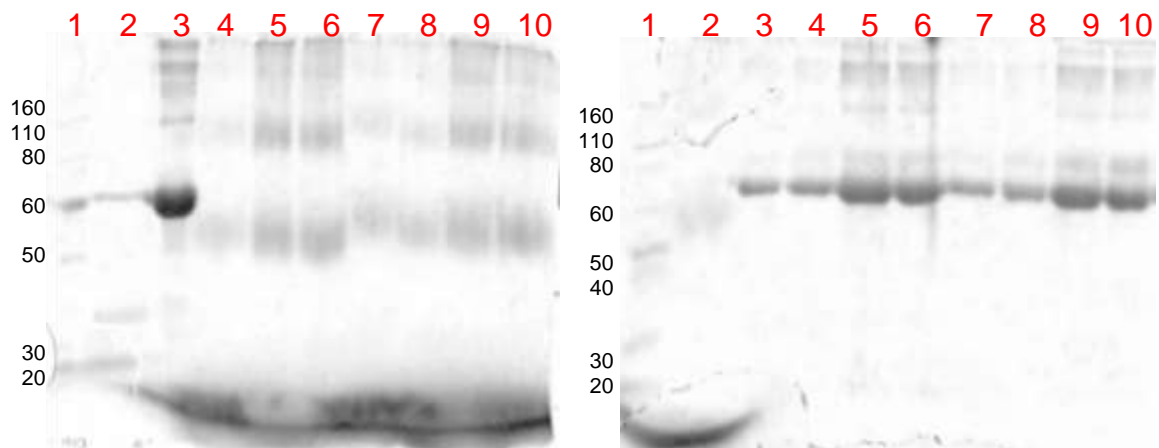


Figura 22. SDS-PAGE al 10 % del diseño experimental 2³. Gel izquierdo, carril 1 marcador de peso molecular (MPM), carril 2 Lr, carril 3 BSA, carril 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 nanocomposito de la corrida 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, respectivamente. Gel derecho, carril 1 MPM, carril 2 nanocomposito de la corrida 2, carril 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 control negativo de la corrida 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.

5.5. Caracterización de las nanopartículas de plata entrecruzadas con BSA y lectina recombinante.

5.5.1. Análisis por espectroscopia UV-Vis

Una vez evaluadas las condiciones de entrecruzamiento y optimizado la concentración de AgNPs, BSA y genipino se realizó el entrecruzamiento con la lectina recombinante. La Figura 23 muestra el espectro UV-Vis del entrecruzado AgNPs@Lr que muestra la banda a 600 nm que indica el entrecruzamiento (Neves y col., 2022), además de la banda de las AgNPs a 395 nm y otra distribución de tamaño de nanopartículas más pequeñas a 344 nm similar a lo reportado por (González y col., 2014).

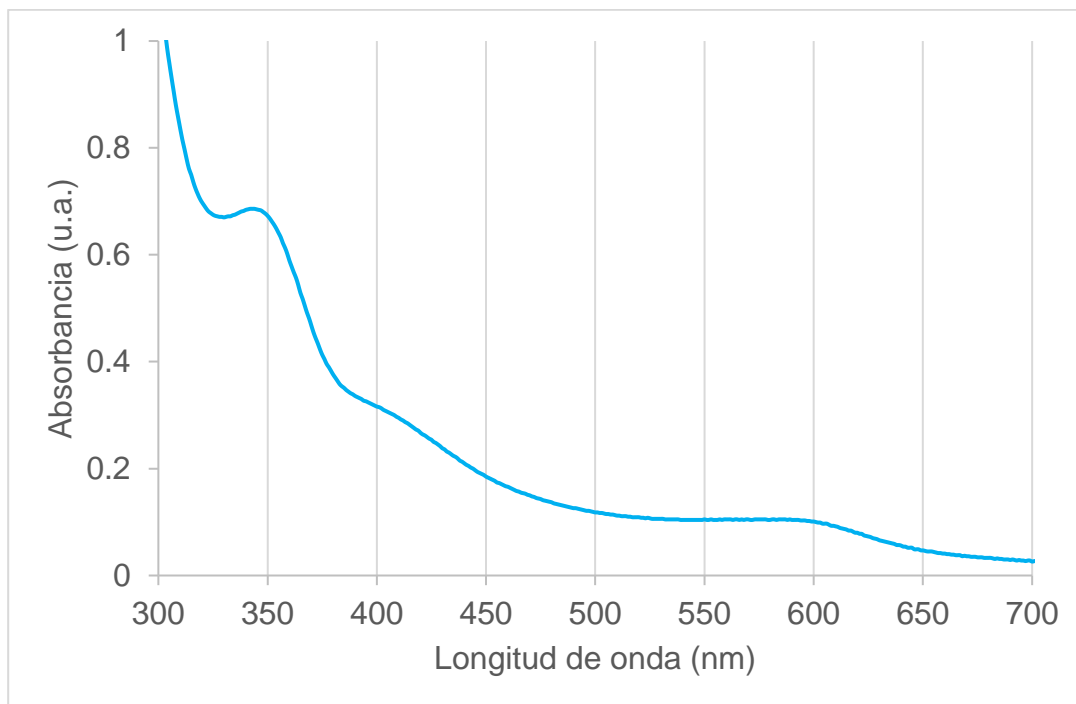


Figura 23. Espectro UV-Vis del entrecruzamiento de 0.3 mM -NH₂ AgNPs y Lr con genipino al 1 %. Barrido de absorbancia de 300 a 700 nm del sobrenadante de la solución de entrecruzamiento AgNPs@Lr. La solución del entrecruzado se diluyó ¼ veces en agua.

5.5.2. Análisis de geles de electroforesis SDS-PAGE.

La Figura 24 muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE al 13 % con muestras de BSA, Lr, AgNPs@BSA y AgNPs@Lr. La muestra de Lr (carril 2) mostró dos bandas, la primera de 33 kDa correspondiente a la Lr y la segunda a 28 kDa, se observa sobrelapada con la de 33 kDa, pero se puede observar más claramente en la Figura 22, corresponde a una proteína co-purificada que se obtiene cuando la levadura crece en un medio que se usa glicerol crudo como fuente de carbono (Palmerín-Carreño y col., 2021). En el carril 3 del entrecruzado AgNPs@Lr se observaron dos bandas. La banda observada a 30 kDa se atribuyó a los siguientes entrecruzados: AgNPs@Lr, AgNPs@proteína copurificada. La formación del entrecruzado Lr@proteína copurificada se descartó ya que el peso molecular esperado sería de alrededor de 60 kDa, dicha banda no se observó en el gel. La banda a 26.5 kDa se

atribuyó al entrecruzamiento AgNPs@AgNPs, la banda se observó claramente con el color café de las AgNPs antes de la tinción con azul de bromofenol donde la banda es apenas perceptible.

La banda del monómero de BSA en el carril 4 se observó a 63 kDa, dicha banda ya no se observa en el carril 5 correspondiente al entrecruzado AgNPs@BSA lo que indicó que toda la proteína BSA se entrecruzó. La banda de 50 kDa en el carril 4 se atribuyó al entrecruzado AgNPs@BSA, específicamente al monómero de BSA entrecruzado con AgNPs; el menor tamaño de esta banda respecto al BSA se atribuyó a las cargas negativas de las AgNPs (Deepa y col., 2017), lo cual incrementó la migración de las proteínas hacia el polo positivo. Lo anterior coincide con lo reportado por Lee y col. (2019) quienes demostraron que la migración de una proteína puede aumentar dependiendo de la cantidad de cargas negativas que el SDS le aporte. Las bandas alrededor de 94, 165 kDa así como el barrido de mayor tamaño observado en el carril 5 se atribuyeron a dímeros, trímeros y agregados de BSA entrecruzados con AgNPs similar a lo obtenido por Schakowski y col., (2019). Las AgNPs en el carril 6 mostraron una banda a 35 kDa de color café, debido al color tan intenso de las AgNPs no se observó una banda azul atribuible a proteínas en su recubrimiento.

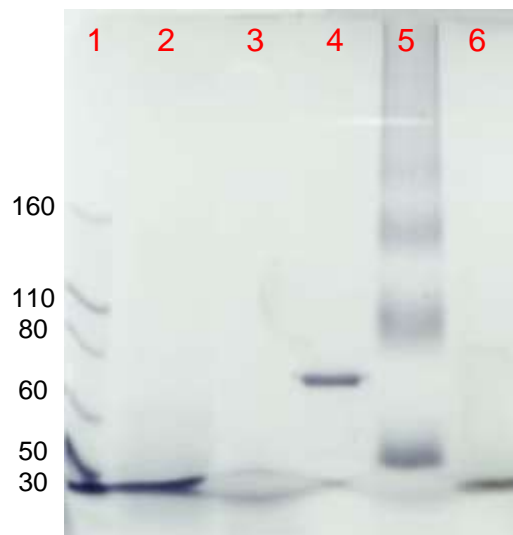


Figura 24. SDS-PAGE al 13 %, carril 1 marcador de peso molecular (MPM), 2 Lr, 3 AgNPs@Lr, 4 BSA, 5 AgNPs@BSA, 6 AgNPs.

5.5.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión

La Figura 25 muestra la micrografía del nanocomposito AgNPs@BSA. Las AgNPs@BSA mostraron formas esféricas, tamaño medio de $55.18 \text{ nm} \pm 37.25 \text{ nm}$. El análisis de varianza de un solo factor que se muestra en la Cuadro 6 mostró diferencia significativa entre las tres muestras; siendo las de mayor tamaño las AgNPs@BSA seguidas por las AgNPs@Lr y al final las AgNPs. El incremento en el tamaño de las AgNPs se debió a la unión del BSA y Lr a las AgNPs (Kota y col., 2017). La Figura 26 muestra la micrografía del entrecruzado AgNPs@Lr. Las AgNPs@Lr mostraron formas esféricas, tamaño medio de $12.176 \pm 7.036 \text{ nm}$. Las AgNPs@BSA son de mayor tamaño que las AgNPs@Lr porque el BSA de 63 kDa es más grande que la Lr de 33 kDa, además la Lr en AgNPs@Lr no se entrecruzó con otras Lr como se observó en el SDS-PAGE en la Figura 24, mientras que el nanocomposito AgNPs@BSA si mostró bandas de mayor tamaño que indicaron el entrecruzamiento de aglomerados de BSA. Sin embargo, el nanocomposito AgNPs@Lr se acumuló en agregados de alrededor de 55 nm.

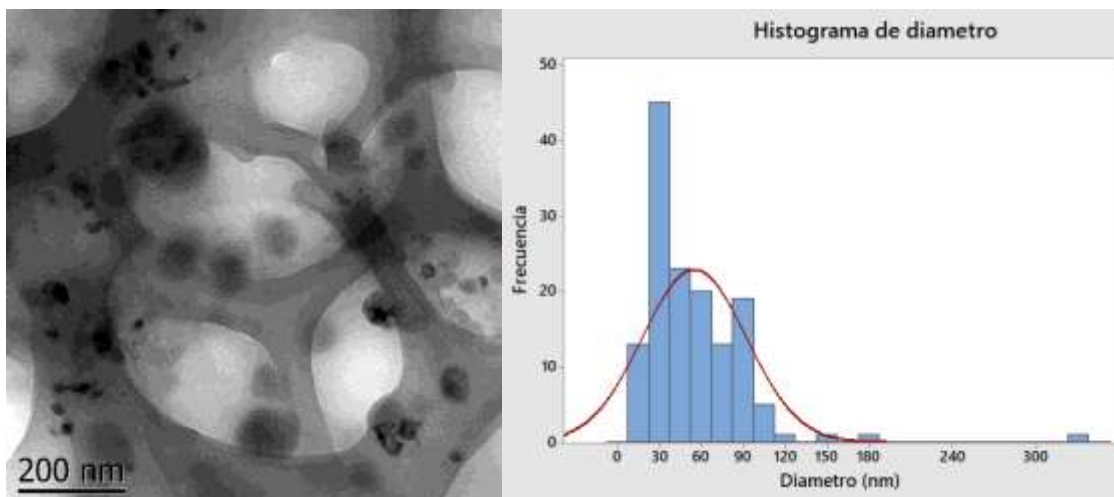


Figura 25. Izquierda: Micrografía obtenida por TEM del nanocomposito AgNPs@BSA en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g. Derecha: Histograma de distribución de 142 partículas de tamaño medio de 55.18 nm \pm 37.25.

Cuadro 6. Análisis de varianza de un solo factor de los tamaños de partícula de las nanopartículas de plata y los nanocompositos con lectina recombinante y albúmina sérica bovina. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Factor	N	Media	Desviación estándar	Agrupación		
AgNPs@BSA	142	55.18	37.25	A		
AgNPs@Lr	1,152	12.176	7.036		B	
AgNPs	355	3.2959	0.9646			C

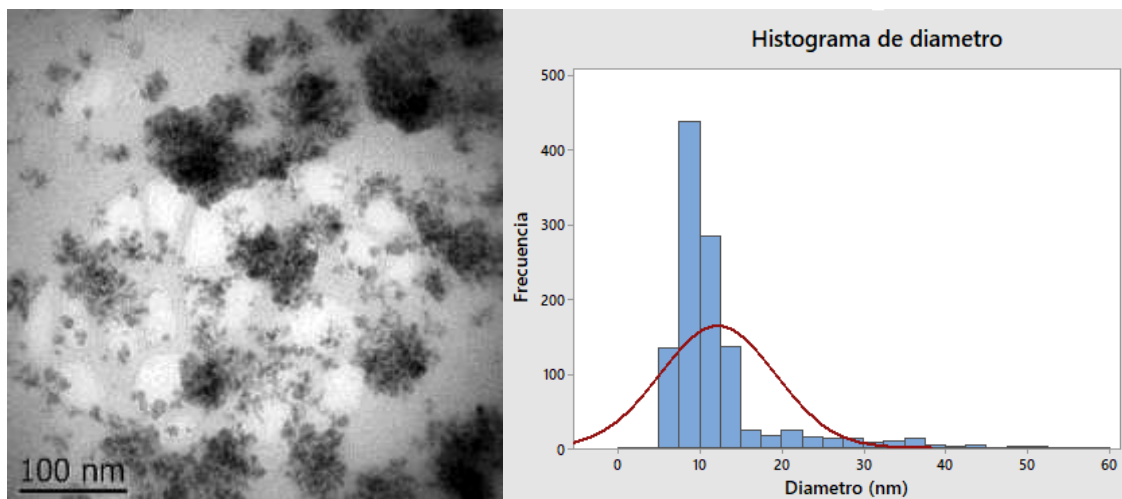


Figura 26. Micrografía obtenida por TEM del nanocomposito AgNPs@Lr en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g. Derecha: Histograma de distribución de 1,152 partículas de tamaño medio de 12.176 ± 7.036 nm.

5.5.4. Análisis FTIR

La Figura 27 muestra el espectro FTIR de las AgNPs, BSA y el entrecruzado AgNPs@BSA. El espectro del BSA mostró bandas a los 3277 y 3151 cm^{-1} correspondientes a la tensión N-H y O-H. Las bandas a 2960 , 2929 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} se atribuyeron a la tensión C-H de CH_2 y CH_3 , respectivamente. Las bandas a 1640 y 1535 cm^{-1} se atribuyeron a amidas I y II, respectivamente. La banda a 1259 cm^{-1} indicó el estiramiento del enlace C-O de fenoles y la banda a 1053 cm^{-1} mostró el estiramiento de un alcohol primario. La banda a 850 cm^{-1} indicó la presencia de compuestos aromáticos fuera del plano de tensión y la banda a 698 cm^{-1} mostró el aleteo fuera de plano de grupos NH_2 y NH (Alhazmi, 2019; Emadi y col., 2017; Guo y col., 2019). El espectro de AgNPs@BSA mostró una reducción en la intensidad de las bandas de tensión N-H a 3293 cm^{-1} así como en la banda amida I a 1634 cm^{-1} . Este espectro mostró dos bandas no observadas en las muestras de AgNPs y BSA que se atribuyeron al entrecruzamiento. La primera a 1011 cm^{-1} , la cual representa la tensión del enlace C-N, donde el N esta de forma terciaria debido a la reacción de la lisina con el genipino. La segunda banda a 950 cm^{-1} se atribuyó a la tensión C-H en el anillo heterocíclico producido en el entrecruzamiento (Wang y col., 2013).

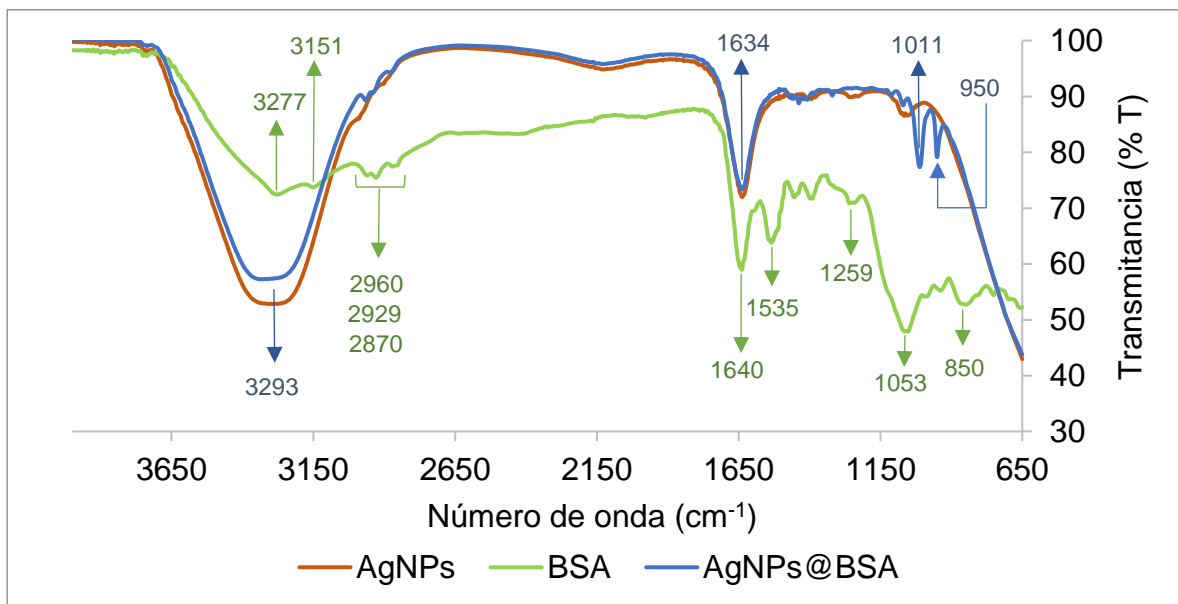


Figura 27. Espectro FTIR de AgNPs (naranja), BSA (verde) y AgNPs@BSA (azul) presente en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g.

La Figura 28 muestra el espectro FTIR de la Lr, AgNPs y AgNPs@Lr. El espectro FTIR de la Lr mostró las siguientes bandas: 3147 cm^{-1} correspondiente a la tensión N-H y O-H, 2925 cm^{-1} atribuida al estiramiento del enlace O-H de alcohol, 2852 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento de CH_2 y CH_3 , 2406 y 1646 cm^{-1} correspondientes a la vibración de flexión de N-H y C=O, 1593 cm^{-1} atribuido a la vibración de estiramiento N-H y grupos aromáticos, 1456 cm^{-1} correspondiente al grupo CH_3 en lípidos/proteínas y COO^- de aminoácidos, 1260 cm^{-1} atribuido a vibraciones de estiramiento C-O; 1051, 939 y 859 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de estiramiento C-O de alcohol primario y vibraciones de flexión C-H respectivamente (Thummajitsakul y col., 2023). El espectro del entrecruzado AgNPs@Lr, de forma similar a AgNPs@BSA, mostró una menor intensidad de las bandas a de tensión N-H/O-H a 3338 cm^{-1} y la banda amida I a 1638 cm^{-1} . También se observó el surgimiento de bandas a 1011 y 951 cm^{-1} mencionadas anteriormente.

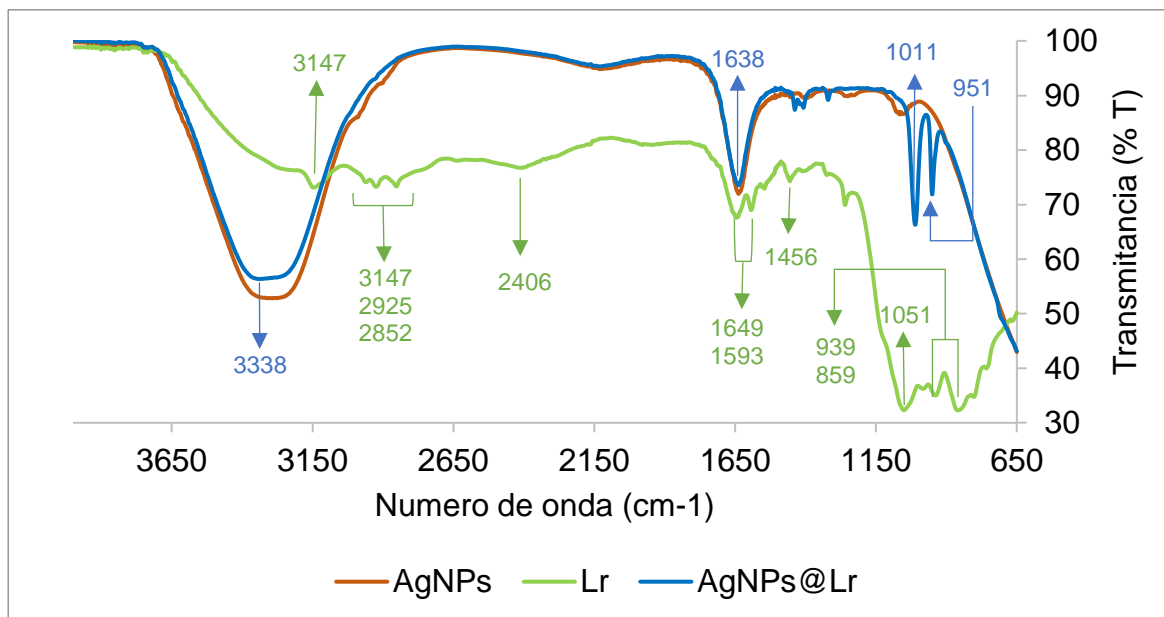


Figura 28. Espectro FTIR de AgNPs (naranja), Lr (verde) y AgNPs@Lr (azul) presente en el sobrenadante de la solución centrifugada a 11,650 x g.

5.5.5. Calorimetría diferencial de barrido.

La estabilidad térmica del entrecruzado fue determinada usando calorimetría diferencial de barrido. La Figura 29 muestra el termograma de la Lr, AgNPs, Gnp y el entrecruzado AgNPs@Lr. La transición vítrea en la Lr tiene lugar a los 151.98 °C, el pico endotérmico a 154.44 °C se atribuye a la temperatura de fusión de la proteína co-purificada con la Lr, la baja intensidad del pico refiere al componente menor, y a 188.3 °C se determinó la temperatura de fusión de la Lr.

El termograma de las AgNPs muestra 3 picos endotérmicos a 41.48, 89.97 y 103.05 °C. Los 3 picos se atribuyen al punto de fusión de compuestos termolábiles en el recubrimiento de las AgNPs como aceites esenciales en los que se encuentran terpenos como el linalool que es el principal aceite esencial de *O. basilicum* en hojas (Slougui y col., 2022). Ninguno de estos picos se atribuyó a cambios de la plata en las nanopartículas porque la temperatura de fusión de la plata se observa a 960 °C (Rodríguez-Félix y col., 2022).

El termograma del genipino mostró un pico endotérmico a 123.4 °C similar a lo reportado por Mallick y col. (2015) que reportó el pico endotérmico de la temperatura de fusión del genipino a los 120 °C. La señal observada entre 200 y 250 °C se asocia al reordenamiento térmico de los anillos cíclicos del genipino (Dimida y col., 2015).

La temperatura de fusión en AgNPs@Lr se observó con un pico endotérmico a los 134.8 °C. Los picos endotérmicos observados en el termograma de las AgNPs y Lr desaparecen, lo que indica que dichos compuestos no se encuentran de forma independiente. La temperatura de fusión del nanocomposito Lr@AgNPs se desplazó a menor temperatura con respecto a la de la Lr a 188.3 °C. La temperatura de fusión de la Lr en AgNPs@Lr disminuyó debido a la presencia de DMSO que actúa como agente desnaturizante provocando dicho desplazamiento (Magsumov y col., 2019). Resultados similares fueron obtenidos por Rossos y col. (2021) al desplazarse el pico endotérmico de la temperatura de fusión del hidrogel polimérico a menores temperaturas después del entrecruzamiento con AgNPs.

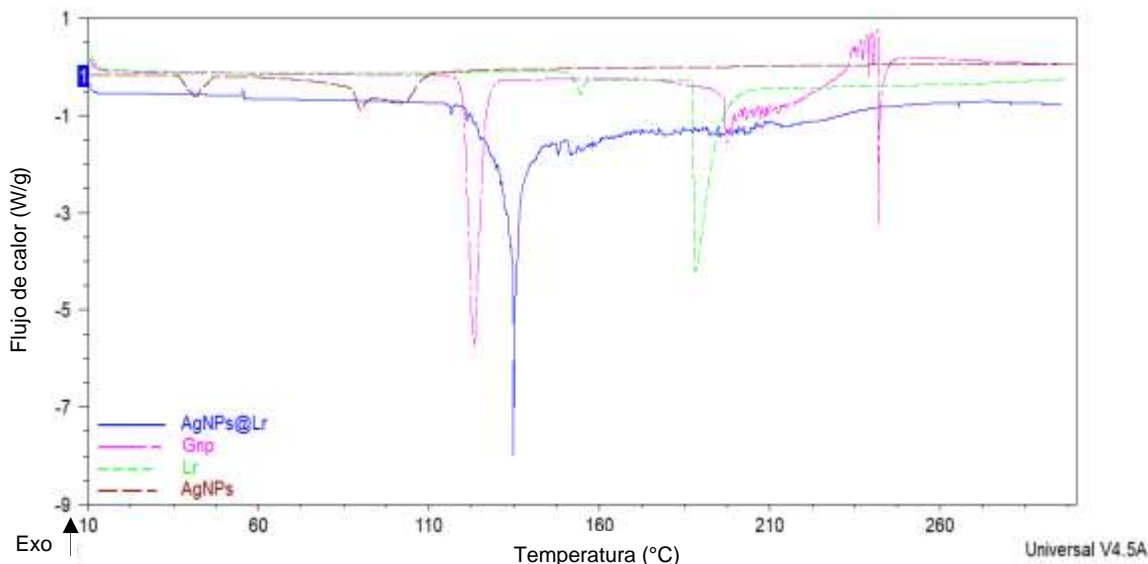


Figura 29. Termograma DSC de 5 mg de Lr (verde), 6.5 mg de AgNPs (café), 4.6 mg de Gnp (rosa) y 6.6 mg del entrecruzado AgNPs@Lr (azul) secado a 35 °C por 72 h. Las muestras se depositaron en celdas de aluminio, atmosfera N₂, rampa de calentamiento de 10 a 300 °C con incremento de 10 °C/min.

La Figura 30 muestra los termogramas del BSA, AgNPs, y el entrecruzado AgNPs@BSA. El termograma de la BSA presenta la transición vítrea a 128.39 °C, un pico endotérmico a 188.47 °C correspondiente a la temperatura de fusión y la señal endotérmica a los 258.03 °C corresponde a la temperatura de degradación. La temperatura de fusión del BSA se encuentra alrededor de los 220°C sin embargo, esto pudo cambiar por la interacción del BSA con los agregados de mayor tamaño que se pueden observar en la Figura 22 (Kim y col., 2019).

El termograma de AgNPs@BSA mostró cinco picos endotérmicos a 90.68, 129.33, 183.99, 215.11 y 226.54 °C. Los 5 picos se atribuyen a la temperatura de fusión de los diferentes entrecruzados obtenidos como se muestran en el SDS-PAGE en la Figura 24, siendo los picos a 90.68, 129.33 y 183.99 °C las temperaturas de fusión correspondientes a las bandas de 50, 94 y 165 kDa y los picos a 215.11 y 226.54 °C las temperaturas de fusión correspondientes a los agregados de tamaños mayores a 165 kDa.

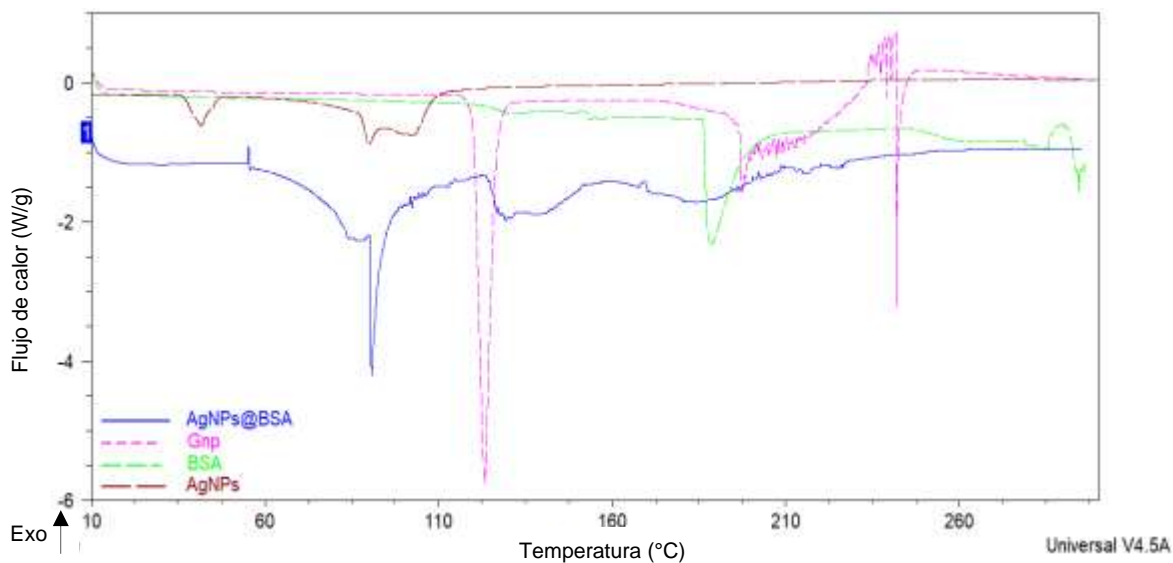


Figura 30. Termograma DSC de 9.1 mg de BSA (verde), 6.5 mg de AgNPs (café), 4.6 mg de Gnp (rosa) y 4.8 mg del entrecruzado AgNPs@BSA (azul) secado a 35 °C por 72 h. Las muestras se depositaron en celdas de aluminio, atmosfera N₂, rampa de calentamiento de 10 a 300 °C con incremento de 10 °C/min.

La citotoxicidad de las AgNPs depende de la concentración administrada, por lo que se deben realizar estudios en torno a la concentración administrada. Las AgNPs sintetizadas por vía verde presentan biocompatibilidad y excelente selectividad hacia células cancerígenas, lo que las hace candidatos potenciales para el tratamiento de diferentes cánceres (Tadele y col., 2021).

La investigación *in vitro* de Vega-Rojas y col., (2021) indica que la lectina recombinante, o péptidos derivados de la digestión de la proteína, interactúan con la membrana intestinal, lo que permite su internalización o absorción parcial. Las AgNPs presentes en el nanocomposito AgNPs@Lr podrían aumentar, en células de cáncer de colon, la absorción y acumulación de la Lr, reduciendo la viabilidad celular a comparación de la capacidad citotóxica específica de la lectina o las AgNPs por si solas (Miranda y col., 2022; Siddiqi y col., 2018). Las AgNPs sintetizadas a partir de *Ocimum americanum* incrementaron la cantidad de células de cáncer en la fase G₀/G₁ del ciclo celular (Manikandan y col., 2021), de forma similar al mecanismo reportado por Dena-Beltrán y col., (2023) de la Lr. Por lo anterior se espera que la unión de las AgNPs sintetizadas a partir de *Ocimum basilicum* a la Lr incremente su efecto antiproliferativo ante células de cáncer.

La citotoxicidad de las AgNPs es inversamente proporcional a su tamaño induciendo mayor estrés oxidativo en células tumorales a menores concentraciones (Miranda y col., 2022; Siddiqi y col., 2018). El tamaño de 12.176 ± 7.036 nm del nanocomposito AgNPs@Lr incrementa la superficie de contacto respecto a partículas de mayor tamaño, por lo que se esperaría un aumento en su capacidad citotóxica. También se ha reportado que la actividad anticancerígena de las AgNPs incluye disfunción de proteínas de membrana, estrés del retículo endoplásmico, apoptosis por disrupción de la membrana, disfunción de la mitocondria, daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) e inhibición del ciclo celular (Miranda y col., 2022). El aumento de la citotoxicidad de la lectina recombinante por su unión a las AgNPs significaría que se puede reducir la concentración de lectina administrada para obtener los mismos resultados reduciendo algunos efectos secundarios en el tracto digestivo que se

reportaron al administrar la fracción concentrada de lectina, como la hipertrofia pancreática y la atrofia de las vellosidades y criptas intestinales (Pita-López y col., 2020). Es necesario evaluar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* del nanocomposito AgNPs@Lr.

6. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de plata se pueden sintetizar a partir de una infusión de *Ocimum basilicum* que poseen grupos amino en su superficie necesarios para el entrecruzamiento por genipino con otras proteínas. La cantidad de grupos amino puede variar entre los diferentes lotes de síntesis de nanopartículas de plata. El método de síntesis produjo nanopartículas con tamaño de 3.4 nm. La cantidad de grupos amino es directamente proporcional al entrecruzamiento, resultando en mayor producción de nanocompositos. El entrecruzamiento a 37 °C y la adición por separado de las nanopartículas de plata, la albúmina sérica bovina y el genipino, no incrementan la producción de nanocompositos. El tiempo de entrecruzamiento aumenta la cantidad de nanocomposito producido. La concentración de grupos amino en la albúmina sérica bovina fue la variable con mayor efecto sobre el entrecruzamiento seguido de la concentración de grupos amino en las nanopartículas de plata. El incremento en la concentración de genipino de 0.01 a 1 % favorece el entrecruzamiento mientras que de 1 a 1.5 % no incrementa el entrecruzamiento. La adición de urea al 1 % en las nanopartículas de plata incrementa la concentración de nanopartículas de plata, reduce la agregación y favorece el entrecruzamiento con la albúmina de suero bovino y la lectina recombinante. Los nanocompositos muestran enlaces genipino-grupo amino. El entrecruzamiento reduce la estabilidad térmica de la proteína debido a la presencia de dimetilsulfóxido que actúa como agente desnaturizante. Las nanopartículas de plata sintetizadas por vía verde y la lectina recombinante como componentes activos del nanocomposito le brindan potencial para su uso médico, ya que de forma individual tienen actividad citotóxica selectiva y biocompatibilidad. El entrecruzamiento produce un nanocomposito de mayor

tamaño al de las nanopartículas de plata; sin embargo, su tamaño es menor a 20 nm, haciéndolo candidato para inducir citotoxicidad selectiva.

7. REFERENCIAS

- Adelere I**, Aboyeji D, Akindurodoye F, Adabara N. Cashew plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their applications as antimicrobial additive for consumer care products. *Tanzania Journal of Science* **2020**; 46: 768–778.
- Alhazmi H**. FT-IR spectroscopy for the identification of binding sites and measurements of the binding interactions of important metal ions with bovine serum albumin. *Scientia Pharmaceutica* **2019**; 87: 1–13.
- Alhosseini S**, Moztarzadeh F, Karkhaneh A. Genipin-cross-linked poly (Vinyl alcohol) for neural scaffold. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **2017**; 6: 191–198.
- Ali N**, Ismail M, Khan A, Khan H, Haider S, Kamal T. Spectrophotometric methods for the determination of urea in real samples using silver nanoparticles by standard addition and 2nd order derivative methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**; 189: 110–115.
- Al-Khafaji Z**, Salman J, A-Yaseen B. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNPs) from basil (*Ocimum basilicum*) seeds and its effects on wastewater nutrient removal by constructed wetlands. *Ann. For. Res* **2023**; 66: 607–620.
- Ashraf S**, Abbasi A, Pfeiffer C, Hussain S, Khalid Z, Gil P, Parak W, Hussain I. Protein-mediated synthesis, pH-induced reversible agglomeration, toxicity and cellular interaction of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**; 102: 511–518.
- Barbir R**, Capjak I, Crnković T, Debeljak Ž, Domazet Jurašin D, Ćurlin M, Sinko G, Weitner T, Vrcek I. Interaction of silver nanoparticles with plasma transport proteins: a systematic study on impacts of particle size, shape and surface functionalization. *Chemico-Biological Interactions* **2021**; 335: 1–11.

- Bekdemir A**, Liao S, Stellacci F. On the effect of ligand shell heterogeneity on nanoparticle/protein binding thermodynamics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**; 174: 367–373.
- Buszewski B**, Rafińska K, Pomastowski P, Walczak J, Rogowska A. Novel aspects of silver nanoparticles functionalization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**; 506: 170–178.
- Caba-Flores M**, Achilli C. Preparacion de nanoparticulas oro/albúmina mediante radiacion ionizante **2020**; 1–12.
- Cristian T**, Lu L, Bert V. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* **2017**; 355: 1330–1334.
- Deepa M**, Suryaprakash T, Kumar P. Eco friendly green synthesized silver nanoparticle with *Ocimum basilicum* leaves aqueous extract. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences* **2017**; 4: 75–79.
- Dena-Beltrán J**, Nava-Domínguez P, Palmerín-Carreño D, Martínez-Alarcón D, Moreno-Celis U, Valle-Pacheco M, Castro-Guillén J, Blanco-Labra A, García-Gasca T. EGFR and p38MAPK contribute to the apoptotic effect of the recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) in colon cancer cells. *Pharmaceuticals* **2023**; 16: 1-22.
- Díaz-Hernández A**, Gracida J, García-Almendárez B, Regalado C, Núñez R, Amaro-Reyes A. Characterization of magnetic nanoparticles coated with chitosan: a potential approach for enzyme immobilization. *Journal of Nanomaterials* **2018**; 2018: 1–11.
- Dimida S**, Demitri C, De Benedictis V, Scalera F, Gervaso F, Sannino A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**; 132: 1–8.

- Durai P**, Arulvasu C, Gajendran B, Ramar M, Pappu S, Kasivelu G, Thirunavukkarasu A. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using crystal compound of sodium para-hydroxybenzoate tetrahydrate isolated from *Vitex negundo*. L leaves and its apoptotic effect on human colon cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**; 84: 90–99.
- Ebrahimzadeh Z**, Salehzadeh A, Naeemi A, Jalali A. Silver nanoparticles biosynthesized by *Anabaena flos-aquae* enhance the apoptosis in breast cancer cell line. *Bulletin of Materials Science* **2020**; 43: 1–7.
- Emadi F**, Amini A, Gholami A, Ghasemi Y. Functionalized graphene oxide with chitosan for protein nanocarriers to protect against enzymatic cleavage and retain collagenase activity. *Scientific Reports* **2017**; 7: 1–13.
- Ferriz-Martínez R**, García-García K, Torres-Arteaga I, Rodríguez-Mendez A, Guerrero-Carrillo M, Moreno-Celis U, Ángeles-Zaragoza M, Blanco-Labra A, Gallegos-Corona M, Robles-Álvarez J, Mendiola-Olaya E, Andrade-Montemayor H, García O, García-Gasca T. Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports* **2015**; 2: 63–69.
- García-Gasca T**, García-Cruz M, Hernandez-Rivera E, López-Matínez J, Castañeda-Cuevas A, Yllescas-Gasca L, Mendiola-Olaya E, Castro-Guillén J, Blanco-Labra A. Effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and Semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and Cancer* **2012**; 64: 1269–1278.
- González A**, Noguez C, Beránek J, Barnard A. Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **2014**; 118: 9128–9136.
- Guo C**, Guo X, Chu W, Jiang N, Li H. Spectroscopic study of conformation changes of bovine serum albumin in aqueous environment. *Chinese Chemical Letters* **2019**; 30(6): 1302–1306.

- Hemlata**, Meena P, Singh A, Tejavath K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *cucumis prophetarum* aqueous leaf extract and their antibacterial and antiproliferative activity against cancer cell lines. ACS Omega **2020**; 5: 5520–5528.
- Hillegass J**, Shukla A, Lathrop S, MacPherson M, Fukagawa N, Mossman B. Assessing nanotoxicity in cells *in vitro*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **2010**; 2: 219–231.
- Hussain S**, Hess K, Gearhart J, Geiss K, Schlager J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology *in Vitro* **2005**; 19: 975–983.
- International Agency for Research on Cancer**. Cancer Today **2020** [consultado 2020 enero 17] Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=0&i
- Ismail M**, Xianfke W, Cazzato G, Saleemi H, Khan A, Ismail A, Zahid M, Khan M. Role of silver nanoparticles in fluorimetric determination of urea in urine samples. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **2022**; 271: 1–10.
- Jacob J**, John M, Jacob A, Abitha P, Kumar S, Rajan R, Natarajan S, Pugazhendhi A. Bactericidal coating of paper towels via sustainable biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* leaf extract. Materials Research Express **2019**; 6: 1-12.
- Jeyaraj M**, Sathishkumar G, Sivanandhan G, MubarakAli D, Rajesh M, Arun R, Kapildev G, Manickavasagam M, Thajuddin N, Premkumar K, Ganapathi A. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **2013**; 106: 86–92.

- Jo M**, Jeong S, Yun H, Kim D, Kim B, Kim J, Et al. Genipin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis via downregulation of Stat3/mcl-1 pathway in gastric cancer. *BMC Cancer* **2019**; 19: 1–12.
- Joshi N**, Jain N, Pathak A, Singh J, Prasad R, Upadhyaya C. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Carissa carandas* berries and its potential antibacterial activities. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2018**; 86: 682–689.
- Kahoush M**, Behary N, Guan J, Cayla A, Mutel B, Nierstrasz V. Genipin-mediated immobilization of glucose oxidase enzyme on carbon felt for use as heterogeneous catalyst in sustainable wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2021**; 9: 1–11.
- Kanchi S**, Ahmed S. Green metal nanoparticles: Synthesis, characterization and their applications. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* **2018**; 113–408.
- Kim C**, Castro-Aceituno V, Abbai R, Lee H, Simu S, Han Y, Hurh J, Kim J, Yang D. Caspase-3/MAPK pathways as main regulators of the apoptotic effect of the phyto-mediated synthesized silver nanoparticle from dried stem of *Eleutherococcus senticosus* in human cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2018**; 99: 128–133.
- Kim D**, Maharjan P, Jin M, Park T, Maharjan A, Amatya R, Yang J, Min K, Shin M. Potential albumin-based antioxidant nanoformulations for ocular protection against oxidative stress. *Pharmaceutics* **2019**; 11: 1-16.
- Kora A**, Beedu S, Jayaraman A. Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles mediated by gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its biological activity. *Organic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**; 2: 1–17.
- Kota S**, Dumpala P, Anantha R, Verma M, Kandepu S. Evaluation of therapeutic potential of the silver/silver chloride nanoparticles synthesized with the aqueous leaf extract of *Rumex acetosa*. *Scientific Reports* **2017**; 7: 1–11.

- Krohn R.** The colorimetric detection and quantitation of total protein. *Current Protocols in Cell Biology* **2011**; Wiley Onli: A.3.H1-A.3.H28.
- Kumar I, Bhattacharya J, Das B.** Dispersion, availability, and antimicrobial activity of silver nanoparticles during application to drinking water of the poultry. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* **2020**; 14: 1–11.
- Lee C, Park Y, Min H, Kim Y, Seok Y.** Determination of protein phosphorylation by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Microbiology* **2019**; 57: 93–100.
- Liu L, Chang Y, Xia N, Peng P, Zhang L, Jiang M, Zhang J, Liu L.** Simple, sensitive and label-free electrochemical detection of microRNAs based on the *in situ* formation of silver nanoparticles aggregates for signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**; 94: 235–242.
- Liu Y, Zhou H, Wang L, Wang S.** Stability and catalytic properties of lipase immobilized on chitosan encapsulated magnetic nanoparticles cross-linked with genipin and glutaraldehyde. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2016**; 91: 1359–1367.
- Magsumov T, Fatkhutdinova A, Mukhametzyanov T, Sedov I.** The effect of dimethyl sulfoxide on the lysozyme unfolding kinetics, thermodynamics, and mechanism. *Biomolecules* **2019**; 9: 1–16.
- Malapermal V, Botha I, Krishna S B N, Mbatha J N.** Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum sanctum* (L.) using silver nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2017**; 24: 1294–1305.
- Malik P, Shankar R, Malik V, Sharma N, Mukherjee T K.** green chemistry based benign routes for nanoparticle synthesis. *Journal of Nanoparticles* **2014**; 2014: 1–14.

- Mallick S**, Sagiri S, Singh V, Behera B, Thirugnanam A, Pradhan D, et al. Genipin-crosslinked gelatin-based emulgels: an insight into the thermal, mechanical, and electrical studies. *AAPS PharmSciTech* **2015**; 16: 1254–1262.
- Manikandan D**, Sridhar A, Sekar R, Perumalsamy B, Veeran S, Arumugam M, Karuppaiah P, Ramasamy T. Green fabrication, characterization of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum americanum* (Hoary Basil) and investigation of its *in vitro* antibacterial, antioxidant, anticancer and photocatalytic reduction. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2021**; 9: 1-55.
- Martínez-Alarcón D**, Varrot A, Fitches E, Gatehouse J, Cao M, Pyati P, Blanco-Labra A, Garcia-Gasca T. Recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) with specific recognition for cancer-associated glycans: Production, structural characterization, and target identification. *Biomolecules* **2020**; 10: 1-16.
- Mehata M**. Green route synthesis of silver nanoparticles using plants/ginger extracts with enhanced surface plasmon resonance and degradation of textile dye. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* **2021**; 273: 1–9.
- Miranda R**, Sampaio I, Zucolotto V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2022**; 210: 1-13.
- Moreno-Celis U**, López-Martínez J, Blanco-Labra A, Cervantes-Jiménez R, Estrada-Martínez L, García-Pascalín A E, De Jesús Guerrero-Carrillo M, Rodríguez-Méndez A, Mejía C, Ferríz-Martínez R, García-Gasca T. *Phaseolus acutifolius* lectin fractions exhibit apoptotic effects on colon cancer: preclinical studies using dimethylhydrazine or azoxi-methane as cancer induction agents. *Molecules* **2017**; 22: 2–17.
- Mousavi S**, Mirhosseini S, Panahi M, Mahmoodzadeh H. Characterization of Biosynthesized silver nanoparticles using *Lactobacillus rhamnosus* GG and its *in*

vitro assessment against colorectal cancer cells. Probiotics and Antimicrobial Proteins **2020**; 12: 740–746.

Munger M, Radwanski P, Hadlock G, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, Grainger D, Deering-Rice C. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticle. Nanomedicine **2014**; 10: 1–18.

Neves M, Valdés A, Silva E, Meireles M, Ibáñez E, Cifuentes A. Study of the reaction between genipin and amino acids, dairy proteins, and milk to form a blue colorant ingredient. Food Research International **2022**; 157: 1–12.

Palmerín-Carreño D, Martínez-Alarcón D, Dena-Beltrán J, Vega-Rojas L, Blanco-Labra A, Escobedo-Reyes A, García-Gasca T. Optimization of a recombinant lectin production in *pichia pastoris* using crude glycerol in a fed-batch. Processes **2021**; 9: 1–16.

Pan P, Yu J, Wang L. Diet and colon: what matters? Physiology & Behavior **2019**; 35: 101–106.

Pirtarighat S, Ghannadnia M, Baghshahi S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application. Materials Science and Engineering C **2019**; 98: 250–255.

Pita-López W, Gomez-Garay M, Blanco-Labra A, Aguilera-Barreyro A, Reis-De Souza T C, Olvera-Ramírez A, Ferriz-Martinez R, García-Gasca T. Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectin fraction provokes reversible adverse effects on rats' digestive tract. Toxicology Research **2020**; 9: 714–725.

Pizzolitto C, Cok M, Asaro F, Scognamiglio F, Marsich E, Lopez F, Donati I, Sacco P. On the mechanism of genipin binding to primary amines in lactose-modified chitosan at neutral pH. International Journal of Molecular Sciences **2020**; 21: 1–17.

- Rajabnia T**, Meshkini A. Fabrication of adenosine 5'-triphosphate-capped silver nanoparticles: enhanced cytotoxicity efficacy and targeting effect against tumor cells. *Process Biochemistry* **2018**; 65: 186–196.
- Razi M**, Wakabayashi R, Tahara Y, Goto M, Kamiya N. Genipin-stabilized caseinate-chitosan nanoparticles for enhanced stability and anti-cancer activity of curcumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**; 164: 308–315.
- Reddy N**, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology* **2015**; 33: 362–369.
- Rodríguez-Félix F**, Graciano-Verdugo A, Moreno-Vásquez M, Lagarda-Díaz I, Barreras-Urbina C, Armenta-Villegas L, Olguín-Moreno A, Tapia-Hernández J. Trends in sustainable green synthesis of silver nanoparticles using agri-food waste extracts and their applications in health. *Journal of Nanomaterials* **2022**; 2022: 1–37.
- Rossos A**, Banti C, Raptis P, Papachristodoulou C, Sainis I, Zoumpoulakis P, Mavromoustakos T, Hadjikakou S. Silver nanoparticles using eucalyptus or willow extracts (AgNPs) as contact lens hydrogel components to reduce the risk of microbial infection. *Molecules* **2021**; 26: 2–14.
- Sambalova O**, Thorwarth K, Heeb N, Bleiner D, Zhang Y, Borgschulte A, Kroll A. Carboxylate functional groups mediate interaction with silver nanoparticles in biofilm matrix. *ACS Omega* **2017**; 3: 724–733.
- Schakowski K**, Linders J, Ferez B, Kirsch M. Synthesis and characterisation of aqueous haemoglobin-based microcapsules coated by genipin-cross-linked albumin. *BioRxiv* **2019**
- Shahgholian N**, Rajabzadeh G, Malaekheh-Nikouei B. Preparation and evaluation of BSA-based hydrosol nanoparticles cross-linked with genipin for oral administration of poorly water-soluble curcumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**; 104: 788–798.

- Shawki S**, Ashburn J, Signs S, Huang E. Colon cancer inflammation-associated cancer. *Surgical Oncology Clinics of NA* **2017**; 27: 269–287.
- Siddiqi K**, Husen A, Rao R. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology* **2018**; 16: 1-28
- Slougui N**, Slama M, Boudaoud Y, Bendrihem A. Optimization of GC-MS method for analysis of basil essential oils from algeria: design of experiments and exploratory pattern recognition. *Journal of Chemistry* **2022**; 2022: 1–14.
- Solgi M**. Evaluation of plant-mediated Silver nanoparticles synthesis and its application in postharvest physiology of cut Flowers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **2014**; 20: 279–285.
- Srikar S**, Giri D, Pal D, Mishra P, Upadhyay S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A review. *Green and Sustainable Chemistry* **2016**; 6: 34–56.
- Tadele K**, Yai T, Orebo T. Green synthesized silver nanoparticles using plant extracts as promising prospect for cancer therapy: a review of recent findings. *Journal of Nanomedicine* **2021**; 4: 1–12.
- Teimouri S**, Kasapis S. Morphology of genipin-crosslinked BSA networks yields a measurable effect on the controlled release of vitamin B6. *Food Chemistry* **2020**; 314: 1–8.
- Teofilović B**, Grujić-Letić N, Karadžić M, Kovačević S, Podunavac-Kuzmanović S, Gligorić E, Gadžurić S. Analysis of functional ingredients and composition of *Ocimum basilicum*. *South African Journal of Botany* **2021**; 141: 227–234.
- Thummajitsakul S**, Piyaphan P, Khamthong S, Unkam M, Silprasit K. Comparison of FTIR fingerprint, phenolic content, antioxidant and anti-glucosidase activities among *Phaseolus vulgaris L.*, *Arachis hypogaea L.* and *Plukenetia volubilis L.* *Electronic Journal of Biotechnology* **2023**; 61: 14–23.

- Tokareva M**, Ivantsova M, Mironov M. Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking of proteins and polysaccharides. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2017**; 53: 21–35.
- Vega-Rojas L**, Luzardo-Ocampo I, Mosqueda J, Palmerín-Carreño D, Escobedo-Reyes A, Blanco-Labra A, Escobar-García K, García-Gasca T. Bioaccessibility and *in vitro* intestinal permeability of a recombinant lectin from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) using the everted intestine assay. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**; 22: 1–22.
- Vlăsceanu G**, Marin Ș, Țiplea R, Bucur I, Lemnaru M, Marin M, Grumezescu A, Andronescu E. Silver nanoparticles in cancer therapy. *Nanobiomaterials in Cancer Therapy: Applications of Nanobiomaterials* **2016**; 29–56.
- Wang L**, Wang Y, Qu J, Hu Y, You R, Li M. The Cytocompatibility of genipin-crosslinked silk fibroin films. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2013**; 04: 213–221.
- Yang J**, Yu J. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein and Cell* **2018**; 9: 474–487.
- Zatorski J**, Montalbini A, Ortiz-Cárdenas J, Pompano R. Quantification of fractional and absolute functionalization of gelatin hydrogels by optimized ninhydrin assay and ¹H NMR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**; 412: 6211–6220.
- Zeng S**, Ye M, Qiu J, Fang W, Rong M, Guo Z G, Gao W. Preparation and characterization of genipin-cross-linked silk fibroin / chitosan sustained-release microspheres. *Drug Design, Development and Therapy* **2015**; 9: 2501–2514.