

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**Fitonanotecnología en el tratamiento contra el cáncer: Síntesis y  
caracterización de compuestos activos**

Tesis para obtener el grado de:

**Doctorado en Ingeniería**

Presenta:

**Jorge Salomón Salvador Carlos**

Director de tesis:

**Dr. Benjamín Valdez Salas**

Co-Directores de Tesis:

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Dr. Ernesto Alonso Valdez Salas

Mexicali, Baja California, abril 2025

## **Agradecimientos**

*A mi familia, que son mi origen y destino; nada de lo que realice en mi vida estará ajeno a su influencia. Su presencia constante es mi pilar.*

*A mis amigos, que albergan para mí los deseos más sinceros de realización. Con su compañía, me recuerdan quien soy y hacia dónde debo dirigirme.*

*A los doctores, que más allá de los protocolos, me han brindado su apoyo sincero, tratándome como uno más en su familia y equipo.*

*Al Dr. Benjamín, que me ha brindado todas las herramientas y libertad para llegar a sentirme tan fuerte como me siento hoy en el campo de la ciencia. Su confianza y guía han sido fundamentales en este camino y en el que sigue por delante.*

## **Resumen**

La fitonanotecnología se antepone como una de las disciplinas que puede proporcionar un avance significativo en el tratamiento contra el cáncer. La obtención de nanoestructuras por síntesis verde o la conjugación de fitocompuesto-nanoestructura proporcionan ventajas respecto a estos elementos aislados. Esta tesis tiene como finalidad la exploración de los compuestos fitoquímicos de plantas encontradas en México y su conjugación con nanopartículas de diferentes elementos y compuestos aplicándolas a células cancerígenas, guiándonos de la vía de administración y características de la molécula. Esta tesis brindará un respaldo científico de las plantas como medicina alternativa y la nanotecnología como una alternativa eficaz en el tratamiento contra el cáncer.

# Tabla de contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen .....	3
Tabla de contenido.....	4
Capítulo 1 .....	15
Introducción/Planteamiento del problema.....	15
Justificación .....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Capítulo 2 Marco teórico.....	17
De las plantas y sus antecedentes etnofarmacobotánicos.....	17
De los metabolitos secundarios y su incorporación en la medicina general .....	22
De los medicamentos sintéticos y su dominio en la medicina .....	24
Del renacimiento de los compuestos naturales y su necesidad en la medicina moderna .	25
De los productos naturales y su incorporación para el tratamiento contra el cáncer.....	26
Vincristina o leurocristina como sulfato de vincristina (Oncovin®) y Vinblastina como sulfato de vinblastina (Velban®) proveniente de <i>Catharanthus roseus</i> (1961 y 1963)	26
Podofilotoxina como Etoposido y Teniposido proveniente de genero <i>Podophyllum</i> (1983 y 1990) .....	28
Paclitaxel (Taxol®) proveniente de <i>Taxus brevifolia</i> (1992).....	30
Mepesuccinato de omacetaxina (Synribo®) como homoharringtonina proveniente de <i>Cephalotaxus harringtonia</i> (2012).....	32
De los productos naturales y su incorporación en nanosistemas para el tratamiento contra el cáncer.....	34
Paclitaxel funcionalizado con albúmina (Abraxane®) (2012).....	35

Vincristina como sulfato de vincristina en liposomas (Marqibo®) (2012).....	36
Capítulo 3 Metodología.....	37
Elección y tratamiento de la planta.....	37
Selección de la planta .....	37
Preparación de material .....	37
Composición.....	37
Barrido fitoquímico .....	38
Cromatografía.....	39
Caracterización por FTIR.....	41
Caracterización por UV-Vis .....	42
Espectrometría de masas acoplado a cromatografía.....	42
Farmacológica de red.....	46
Moléculas-objetivos relacionados con el osteosarcoma.....	46
Identificación de genes sobre expresados en el osteosarcoma .....	47
Construcción y análisis de la red de interacción proteína-proteína .....	47
Enriquecimiento funcional y análisis de vías .....	48
Acoplamiento molecular.....	48
Nanosistema .....	50
Síntesis de nanosistemas.....	50
Búsqueda de estudios de nanosistemas inorgánicos en cáncer.....	50
Evaluación biológica .....	51
Capítulo 4 Resultados y discusión.....	52
Información de la planta.....	52
Identificación botánica .....	52
Extracción.....	55

Barrido fitoquímico .....	55
Cromatografía.....	57
Cromatografía de capa fina.....	57
Cromatografía de columna .....	59
UHPLC-MS/MS .....	63
Optimización del MS/MS.....	64
Optimización del UHPLC .....	66
Cuantificación.....	67
Síntesis de nanopartículas.....	68
Selección de nanopartícula para estudio en cáncer .....	71
Síntesis de As NPs.....	73
Pruebas biológicas .....	79
Scratch .....	79
Morfología.....	88
Farmacología en red .....	97
Genes sobre expresados en osteosarcoma .....	97
Genes objetivos para los metabolitos secundarios .....	97
Interacción proteína-proteína.....	97
Enriquecimiento funcional y análisis de vías .....	101
Acoplamiento molecular.....	105
Energía de enlace y residuos .....	105
Capítulo 5 Conclusiones.....	114
Etnofarmacobotánica vía nanotecnología.....	114
Referencias .....	116
Apéndice.....	132

Anexo ..... 195

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> El Tlalocan de Tepantitla, detalle. Imagen extraída de la Mediateca INAH .....	18
<b>Figura 2.</b> Ilustración de la leyenda del quetzal regalado a Moctezuma para su zoológico-jardín botánico. Ilustración extraída de la biblioteca digital del Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa.....	18
<b>Figura 3.</b> Extracto del volumen 3 del Códice Florentino. Imágenes extraídas de Library of Congress .....	19
<b>Figura 4.</b> Extracto del Códice Badiano. Imágenes obtenidas de la Mediateca INAH.....	20
<b>Figura 5.</b> Estructuras moleculares de la quinina (izquierda) y la morfina (derecha) .....	23
<b>Figura 6.</b> Estructura molecular de la salicina (izquierda) y el ácido salicílico (derecha)....	24
<b>Figura 7.</b> Estructura molecular de la fenazona (izquierda) y la aminofenazona (derecha) .	24
<b>Figura 8.</b> Tratamientos relacionados con cáncer más caros en el mercado (2024) .....	26
<b>Figura 9.</b> Estructura molecular de la leurocristina (izquierda) y vinblastina (derecha) .....	27
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de inhibición de alcaloides vinca en microtubulos. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 1TUB (RCSB PDB) (54) .....	28
<b>Figura 11.</b> Estructura molecular del etoposido (izquierda) y teniposido (derecha) .....	29
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de inhibición del etoposido y teniposido en la topoisomerasa II. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 5ZRF (RCSB PDB) (60,61): a) mecanismo tradicional, b) mecanismo bloqueado por anclaje del etoposido o teniposido..	30
<b>Figura 13.</b> Estructura molecular del taxol .....	31
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de inhibición del paclitaxel en microtubulos. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 1TUB (RCSB PDB) (54) .....	32
<b>Figura 15.</b> Estructura molecular de la hemoharringtonina .....	33
<b>Figura 16.</b> Mecanismo de inhibición del mepesuccinato de omacetaxina en el ribosoma. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 7TOS (RCSB PDB) (72): a) mecanismo tradicional, b) mecanismo bloqueado por anclaje del mepesuccinato de omacetaxina en el sitio A.....	34
<b>Figura 17.</b> Representación en 3D y composición del Abraxane. Ilustración creada en Chimera usando el cristal 1AO6 (RCSB PDB)(81) .....	35
<b>Figura 18.</b> Estrategia para la optimización de estudios de TLC y CC .....	39
<b>Figura 19.</b> Flujo para protocolo de farmacología en red .....	46

<b>Figura 20.</b> Ilustración botánica y taxonomía de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>denudata</i> , var. <i>subspicata</i> y var. <i>Jhonstonii</i> .....	54
<b>Figura 21.</b> Proceso de obtención de fracciones por CC .....	60
<b>Figura 22.</b> Espectros por FTIR de las fracciones obtenidas por CC: a) extracto concentrado; b) fracción 4-6; c) fracción 8-10; d) fracción 11-13; e) fracción 14-22 .....	62
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de las moléculas seleccionadas para estudios LC-MS/MS .....	67
<b>Figura 24.</b> Concentración de ácidos fenólicos de las hojas de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> .....	68
<b>Figura 25.</b> Elementos de sales precursores a partir de los cuales se obtuvieron NPs.....	69
<b>Figura 26.</b> Resumen del número de publicaciones en cáncer por nanopartículas .....	72
<b>Figura 27.</b> Procedimiento para la obtención de As NPs en estado coloidal .....	73
<b>Figura 28.</b> Registro de cambios de color y pH durante síntesis de As NPs .....	74
<b>Figura 29.</b> Caracterización fisicoquímica de As NPs: a) UV-Vis; b) DLS; y c) FTIR .....	77
<b>Figura 30.</b> Caracterización morfológica y composición de las As NPs: a) SEM 15kX; b) SEM 25kX; c) DLS; d) EDS; e) Raman; y XRD .....	78
<b>Figura 31.</b> Migración celular de MG-63 con extracto: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	80
<b>Figura 32.</b> Migración celular de MG-63 con extracto concentrado: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	80
<b>Figura 33.</b> Migración celular de MG-63 con extracto en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	81
<b>Figura 34.</b> Migración celular de MG-63 con extracto concentrado en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	81
<b>Figura 35.</b> Migración celular de MG-63 con As NPs: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	82
<b>Figura 36.</b> Migración celular de MG-63 con As NPs en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	83
<b>Figura 37.</b> Migración celular de MG-63 con colchicina: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día.....	84
<b>Figura 38.</b> Migración celular de MG-63 con colchicina en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	84

<b>Figura 39.</b> Migración celular de MG-63 con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	85
<b>Figura 40.</b> Migración celular de MG-63 con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	86
<b>Figura 41.</b> Migración celular de MG-63 con el control: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día.....	87
<b>Figura 42.</b> Migración celular de MG-63 con el control en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día .....	87
<b>Figura 43.</b> Caracterización ultra estructural de MG-63 con el control: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm .....	89
<b>Figura 44.</b> Caracterización ultraestructural de MG-63 con el extracto: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm .....	91
<b>Figura 45.</b> Caracterización ultra estructural de MG-63 con el extracto concentrado: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm.....	92
<b>Figura 46.</b> Caracterización ultraestructural de MG-63 con As NPs: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm .....	93
<b>Figura 47.</b> Caracterización ultra estructural de MG-63 con colchicina: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm .....	95
<b>Figura 48.</b> Caracterización ultra estructural de MG-63 con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm .....	96
<b>Figura 49.</b> Diagrama de Venn de los genes sobreexpresados y genes target para osteosarcoma .....	98
<b>Figura 50.</b> Interacción entre genes sobreexpresados en el osteosarcoma y genes objetivos	98
<b>Figura 51.</b> Genes centrales procedentes de la red de genes de la Figura 50.....	99
<b>Figura 52.</b> Ruta general del cáncer resaltado en rojo la acción de las 5 moléculas procedentes del extracto de planta.....	103
<b>Figura 53.</b> Predicción de ontología génica de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> : a) proceso biológico y b) KEGG.....	104
<b>Figura 54.</b> Interacciones y energías de enlace entre moléculas-AKT1: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 180°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones .....	109

**Figura 55.** Interacciones y energías de enlace entre moléculas-EGFR: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 90°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones ..... 111

**Figura 56.** Interacciones y energías de enlace entre moléculas-TP53: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 90°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones ..... 113

**Figura 57.** Interacción y resumen de los pilares de esta tesis ..... 115

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Nomenclatura y características estructurales de proteínas usadas en estudios de farmacología en red y acoplamiento molecular.....	49
<b>Tabla 2.</b> Tamaño del cuadro de la caja para el estudio de acoplamiento molecular.....	49
<b>Tabla 3.</b> Resultados morfológicos de la planta bajo estudio .....	53
<b>Tabla 4.</b> Ensayo y resultados del barrido fitoquímico .....	56
<b>Tabla 5.</b> Registro y resultados del estudio de TLC.....	57
<b>Tabla 6.</b> Bandas y asignaciones de espectros por FTIR de las fracciones obtenidas por CC .....	61
<b>Tabla 7.</b> Parámetros fisicoquímicos de moléculas elegidas para el estudio de LC-MS/MS	63
<b>Tabla 8.</b> Iones producto y fragmentos teóricos de los estándares seleccionados para estudio de LC-MS/MS .....	65
<b>Tabla 9.</b> Resultado de iones producto y fragmentos por MS/MS.....	66
<b>Tabla 10.</b> Descripción y funcionamiento del extracto en la síntesis de NPs .....	70

## Índice de Apéndices

<b>Apéndice 1.</b> Registro de barrido fitoquímico.....	132
<b>Apéndice 2.</b> Registro de cromatografía de capa fina .....	134
<b>Apéndice 3.</b> Registro de cromatografía de columna.....	135
<b>Apéndice 4.</b> Nanopartículas de MgO: Estudio de la reacción y caracterización .....	136
<b>Apéndice 5.</b> Nanopartículas de V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : Estudio de la reacción y caracterización .....	138
<b>Apéndice 6.</b> Nanopartículas de MnO: Estudio de la reacción y caracterización .....	140
<b>Apéndice 7.</b> Nanopartículas de Cu: Estudio de la reacción y caracterización.....	142
<b>Apéndice 8.</b> Nanopartículas de ZnO <sub>2</sub> : Estudio de la reacción y caracterización.....	144
<b>Apéndice 9.</b> Nanopartículas de Se: Estudio de la reacción y caracterización .....	146
<b>Apéndice 10.</b> Nanopartículas de Ag: Estudio de la reacción y caracterización.....	148
<b>Apéndice 11.</b> Nanopartículas de Pt: Estudio de la reacción y caracterización .....	150
<b>Apéndice 12.</b> Nanopartículas de Au: Estudio de la reacción y caracterización.....	152
<b>Apéndice 13.</b> Nanopartículas de CeO <sub>2</sub> : Estudio de la reacción y caracterización.....	154
<b>Apéndice 14.</b> Espectro de MS respecto al modo de escaneo para el ácido salicílico .....	156
<b>Apéndice 15.</b> Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la luteolina .....	157
<b>Apéndice 16.</b> Espectro de MS respecto al modo de escaneo para el kaempferol.....	158
<b>Apéndice 17.</b> Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la rutina.....	159
<b>Apéndice 18.</b> Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la escopoletina .....	160
<b>Apéndice 19.</b> Cromatograma con tiempos de retención para todas las moléculas analizadas por LC-MS/MS.....	161
<b>Apéndice 20.</b> Resultados proporcionados por ANALYST Software de curvas de calibración .....	163
<b>Apéndice 21.</b> Curvas de calibración para todas las moléculas analizadas por LC-MS/MS de 0.19 ppb a 200 ppb .....	164
<b>Apéndice 22.</b> Cálculo de concentración de las hojas de <i>Lonicera suspicata var. Jonstonii</i> en polvo 1 .....	165
<b>Apéndice 23.</b> Cálculo de concentración de las hojas de <i>Lonicera suspicata var. Jonstonii</i> en polvo 2 .....	167
<b>Apéndice 24.</b> Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) del kaempferol .....	169

<b>Apéndice 25.</b> Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la rutina.....	170
<b>Apéndice 26.</b> Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la escopoletina .....	171
<b>Apéndice 27.</b> Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la luteolina .....	172
<b>Apéndice 28.</b> Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) del ácido salicílico .....	173
<b>Apéndice 29.</b> Conformaciones y energías de enlace en AKT1 .....	174
<b>Apéndice 30.</b> Conformaciones y energías de enlace en EGFR .....	176
<b>Apéndice 31.</b> Conformaciones y energías de enlace en TP53 .....	178
<b>Apéndice 32.</b> Sitio activo de AKT1-kaempferol .....	180
<b>Apéndice 33.</b> Sitio activo AKT1-luteína .....	181
<b>Apéndice 34.</b> Sitio activo AKT1-rutina .....	182
<b>Apéndice 35.</b> Sitio activo AKT1-ácido salicílico .....	183
<b>Apéndice 36.</b> Sitio activo AKT1-escopoletina .....	184
<b>Apéndice 37.</b> Sitio activo EGFR-kaempferol .....	185
<b>Apéndice 38.</b> Sitio activo EGFR-luteína .....	186
<b>Apéndice 39.</b> Sitio activo EGFR-rutina .....	187
<b>Apéndice 40.</b> Sitio activo EGFR-ácido salicílico .....	188
<b>Apéndice 41.</b> Sitio activo EGFR-escopoletina .....	189
<b>Apéndice 42.</b> Sitio activo TP53-kaempferol.....	190
<b>Apéndice 43.</b> Sitio activo TP53-luteína.....	191
<b>Apéndice 44.</b> Sitio activo TP53-rutina.....	192
<b>Apéndice 45.</b> Sitio activo TP53-ácido salicílico.....	193
<b>Apéndice 46.</b> Sitio activo TP53-escopoletina.....	194

# Capítulo 1

## Introducción/Planteamiento del problema

El cáncer es un problema que ha afectado a los seres humanos durante siglos. De acuerdo al Foro Cáncer, Desafíos en México y América Latina realizado en el 8 de agosto de 2017, 14 de cada 100 fallecimientos de mexicanos es debido a algún tipo de cáncer, siendo los más frecuentes el cáncer de mama (20 mil casos), próstata y cervicouterino (14 mil casos), y colón y pulmón (8 mil casos) (1). Dentro de lo encontrado, se ha observado que los países de ingresos medios y bajos son los más afectados por causas como falta de servicios o falta de datos para incentivar políticas contra su lucha. De igual manera, en el 2015, la organización mundial de la salud (OMS) clasificó al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo, ocasionando 8.8 millones de defunciones (1 de cada seis muertes en el mundo) (2).

Aunque el cáncer ha sido extensamente estudiado aún no se conoce el origen de éste, pero se han encontrado factores que intervienen a la formación de éstos, como son la alimentación, la exposición a ciertos ambientes y la genética (3). Para combatir este problema de salud, se han creado diferentes tratamientos para prevenir e inclusive controlar esta enfermedad en distintas etapas. Ejemplo de estos tratamientos son la cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapias dirigidas molecularmente o terapia de hormonas (4). Sin embargo, estas terapias pueden tener efectos secundarios, que afectan los órganos y tejidos sanos. Algunos efectos secundario son la anemia, caída de pelo, cambios en la piel y uñas (5).

Debido a las limitaciones de los tratamientos tradicionales, la ciencia continúa estudiando nuevas alternativas que ayuden a brindar una cura o un tratamiento más ameno contra el cáncer (6). Una de las propuestas con mayor potencial es la utilización de plantas como fuente de nuevas drogas por medio de sus fitocompuestos (7,8). A pesar de que, las plantas fueron la principal forma de medicina en la historia, su uso fue eclipsado por medicamentos sintetizados que están presentes en la farmacología actual. No obstante, su resurgimiento es inminente debido a lo mencionado previamente.

En la actualidad, varios fitocompuestos o moléculas aisladas de éstos han sido utilizadas con éxito en el tratamiento contra el cáncer como compuestos fenólicos, terpenoides, compuestos

organonitrogenados y organosulfurados (9–12). A pesar de las ventajas del uso de fitocompuestos en el tratamiento contra el cáncer, existen limitaciones intrínsecas de la molécula, por ejemplo, baja solubilidad (administración oral), tiempo de vida corto en el cuerpo, y efectos secundarios relacionados a la interacción fitocompuesto-organismo. Soluciones a estos problemas pueden ser encontradas en la nanotecnología, ya que, entre muchas de sus aplicaciones, se encuentran los nanotransportadores, formándose así, un sistema de fitocompuesto-nanopartícula, que puede proporcionar estabilidad y protección dependiendo de la vía de administración, además de enlaces y sinergia (13).

## **Justificación**

México, al tener una tasa de mortalidad debido a algún tipo de cáncer, es fundamental explorar alternativas menos agresivas y efectivas para el tratamiento contra el cáncer. La exploración de los compuestos fitoquímicos de plantas encontradas en México y su incorporación en nanosistemas brindará un respaldo científico en su utilización como medicina alternativa o precursor de un compuesto activo.

## **Objetivo general**

Sintetizar un nanosistema (fitocompuesto-nanopartícula) con actividad anticancerígena para su aplicación en osteosarcoma.

## **Objetivos específicos**

- Caracterizar, extraer e identificar los compuestos fitoquímicos con actividad anticancerígena
- Sintetizar y caracterizar las nanopartículas
- Realizar la conjugación fitocompuesto-nanopartícula
- Evaluar la implementación en células cancerosas (osteosarcoma)

## **Hipótesis**

Los fitocompuestos de ciertas plantas, como las encontradas en la República Mexicana, con soporte de la nanotecnología, contienen actividad anticancerígena que puede ser implementada en el tratamiento contra el cáncer.

# Capítulo 2 Marco teórico

## De las plantas y sus antecedentes etnofarmacobotánicos

Existe un concepto acuñado por los naturalistas para designar a ciertos países que concentran los porcentajes más altos de la flora y fauna del mundo. Este concepto es la megadiversidad (14). Si se habla únicamente de la flora (plantas vasculares), los primeros 5 países son India, China, Venezuela, Colombia y México (15). Es interesante este porcentaje debido a que, es notorio la relación existente entre megadiversidad y sus antecedentes como fuente para los seres humanos. En otras palabras, resalta justamente el concepto de etnobotánica (16).

Si nos enfocamos únicamente en México, notaremos que el uso de plantas como remedio o medicamento se remonta hace más de 2 milenios, cuando México no estaba consolidado como el país que conocemos actualmente (prehispánico). Desde la cosmovisión de los pueblos indígenas, al igual que otras civilizaciones, la creación o surgimiento de la medicina se le atribuye en diversos casos a una fuente divina, donde la magia, religión y astronomía jugaban un papel importante en el diagnóstico y remedio de las enfermedades (17,18).

No se conocen las fuentes más antiguas de etnofarmacobotánica en México, diversos factores aportaron para que los conocimientos milenarios se perdieran a la llegada de la conquista. Sin embargo, se sabe que las plantas y los pueblos indígenas mexicanos tuvieron una gran conexión ya que formaban parte de sus tradiciones y creencias. Ejemplo temprano de esta importancia se puede observar en el mural de Tepantitla (450 y 650 d.C.), mostrando en el paraíso de Tláloc (Tlalocan), plantas de gran importancia como el cacao, maíz, chícharo y pericón (Figura 1) (19). Otro vestigio de la importancia de la etnofarmacobotánica en México son los jardines botánicos (Figura 2). Por ejemplo, el jardín botánico de Moctezuma Ilhuicamina en Huaxtepec llamado Oaxtepec, es considerado el primer jardín etnobotánico de América, el cual, estaba especializado en plantas medicinales (20,21).

Justo después de la conquista (siglo XVI), la importancia del conocimiento etnofarmacobotánico no fue menospreciado, e inclusive, se inició un esfuerzo en la recopilación de los conocimientos médicos de las plantas. Este esfuerzo estuvo en constante

desarrollo a lo largo de los siglos siguientes, y en la actualidad, forma parte de la historia e identidad de México.



**Figura 1.** El Tlalocan de Tepantitla, detalle. Imagen extraída de la Mediateca INAH



**Figura 2.** Ilustración de la leyenda del quetzal regalado a Moctezuma para su zoológico-jardín botánico. Ilustración extraída de la biblioteca digital del Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa

Posiblemente, la primera persona interesada en preservar la cultura y tradiciones de la llamada Nueva España, fue Fray Bernardino de Sahagún. A su llegada en 1529, Fray Bernardino de Sahagún invirtió su vida en el entendimiento de la cultura y las costumbres de los pueblos originarios de México (22). El esfuerzo de esta empresa concluyó en lo que Fray Bernardino de Sahagún nombró como *La Historia General de las Cosas de la Nueva España* (Figura 3), o conocido comúnmente como *Códice Florentino*, al estar resguardado en Florencia, Italia (23).



**Figura 3.** Extracto del volumen 3 del Códice Florentino. Imágenes extraídas de Library of Congress

Se cuenta que, la recopilación de información se llevaba a cabo mediante reuniones con los ancianos que contaban los conocimientos, mientras nativos trilingües lo documentaban con suma rapidez. Al terminar estos escritos, Fray Bernardino los rescribía para tenerlo en letra legible. La monumental obra consta de doce libros, abarcando las áreas fundamentales de la etnografía e historia de México, ordenados, desde su punto de vista, de lo profano a lo sagrado.

A lo largo de los volúmenes se hace mención a las plantas medicinales; no obstante, el libro 10 y sobre todo el 11, es donde se profundiza en esta aplicación (22). También, este libro es el que contiene el mayor número de ilustraciones botánicas, las cuales eran acompañadas de la localización, preparación, administración y dolencia. Aunque no se tiene el dato del número específico de plantas medicinales en el código florentino, destacan algunas de ellas,

que inclusive, se tiene sustento científico de las propiedades medicinales de aquel tiempo y aplicaciones como las que competen en esta tesis (cáncer). Dos importantes a mencionar son cacaloxochitl (*Plumeria rubra*) y zoapatle (*Montanoa tormentosa*) contra la leucemia (24,25).

Otro libro de importancia trascendental en la etnobotánica mexicana del siglo XVI es el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Figura 4), conocido como el *Librito de las Hierbas Medicinales de los Indios* o, más comúnmente, como el *Códice Badiano* (26). Este valioso manuscrito fue escrito por Martín de la Cruz y traducido por Juan Badiano. A lo largo de la historia, ha sido erróneamente denominado con otros nombres, como el Herbario Azteca de la Cruz-Badiano o el Manuscrito Badiano. El *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* tenía como propósito original la obtención de un apoyo anual por parte de la corona o, posiblemente, la documentación de plantas de interés médico para el comercio entre el Viejo y el Nuevo Mundo. A pesar del tiempo limitado que tuvo para su escritura (2 meses), Martín de la Cruz logró documentar un total de 251 plantas y 185 ilustraciones en un documento de 63 hojas divididas en trece capítulos. Los primeros ocho capítulos hacen referencia a las partes del cuerpo, comenzando desde la cabeza y avanzando hacia los pies (27).



**Figura 4.** Extracto del *Códice Badiano*. Imágenes obtenidas de la Mediateca INAH

Debido a la atención generada por las dos obras mencionadas anteriormente, el Rey Felipe II encomendó a Francisco Hernández de Toledo una expedición científica al Nuevo Mundo con el título de Protomédico General de Todas las Indias (28). Tras siete años de viajes por la Meseta Central de México, Oaxaca, Pánuco y Michoacán, culminó en una monumental obra de 17 volúmenes conocida como el *Tesoro de las Cosas Medicinales de la Nueva España*, en la que la sección botánica se tituló *Historia de las Plantas de la Nueva España*. Esta obra magistral recopiló e ilustró más de 3000 especies de plantas, proporcionándoles sus nombres indígenas, morfología, descripciones de su ecología y ubicación, así como los usos y efectos curativos asignados por las poblaciones indígenas. Sin embargo, debido a retrasos y tragedias, las obras completas de Francisco Hernández no se publicaron formalmente hasta el siglo XX siendo posible encontrarlas actualmente en internet (29).

Pasaron cerca de dos siglos para retomar el interés en las obras de Martín-Badiano, Sahagún y Toledo. Entre el siglo XVIII y el siglo XIX, bajo la Real Expedición Botánica a la Nueva España, Martín Sessé y Lacasta y José Mariano Mociño dejaron una huella imborrable en el campo de la botánica con la obra maestra *Flora Mexicana* (30). En su obra, se registraron más de 2000 especies de plantas (31). Además, la obra de Sessé y Mociño no solo se enfocó en la clasificación de plantas, sino que también incluyó valiosos estudios sobre sus propiedades medicinales y usos tradicionales entre las comunidades indígenas. La *Flora Mexicana* representó un avance significativo para la ciencia botánica en América, ya que integraba conocimientos europeos con el saber ancestral de los pueblos originarios de México. A pesar de que, la obra, *Flora Mexicana* representa una fracción de todo lo que registró Sessé y Mociño debido a guerras y falta de financiamiento, la influencia de esta obra perdura hasta hoy, sirviendo como base para investigaciones posteriores sobre la biodiversidad del continente.

Por último, han sido varios los investigadores que han reconocido la importancia de la flora mexicana, ayudando a expandir su carácter científico sin olvidar su origen ancestral. Ejemplo son José Antonio Alzate, Pablo de la Llave, Juan José Martínez Lejarza, y el explorador Alexander von Humboldt (entre siglos XVIII y XIX). No obstante, en el siglo XX, es de resaltar a Maximino Martínez (1888-1964), debido a que sus obras, “Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas”, “las Plantas más útiles que existen en la

República Mexicana” y “las Plantas Medicinales de México”, tienen fuerte inspiración en las obras magistrales de sus predecesores (32).

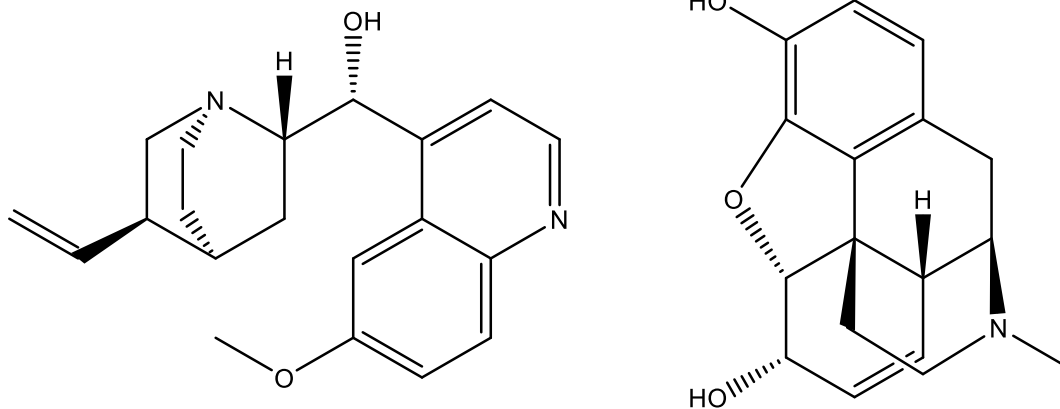
Enfocándose en la obra “las Plantas Medicinales de México”, Maximino Martínez divide la obra en tres secciones: plantas identificadas y caracterizadas, plantas identificadas y sin caracterizar y plantas sin identificación ni caracterización. Para todos los casos, se presenta su nombre vulgar, aplicación, partes utilizadas, forma de administración y ubicación. Por lo que, esta obra, es una fusión o transición de los primeros escritos etnofarmacobotánicos y los protocolos actuales, puesto que, ya se confirman la asignación de propiedades de ciertas plantas, así como los compuestos activos por métodos científicos avanzados para la época.

## **De los metabolitos secundarios y su incorporación en la medicina general**

El uso de las plantas como un agente médico va de la mano con los primeros registros escritos por el ser humano (hace más de 7000 años); lo que hace pensar que, su uso fue de la mano con la evolución del ser humano. En siglos más recientes, se tienen registros claros de las plantas y diferentes preparaciones para enfermedades o dolencias específicas. Sin embargo, la comprensión de los agentes activos en ciertas enfermedades no nació sino hasta el siglo XIX (33).

Los primeros metabolitos secundarios en ser catalogados como medicamentos fueron la quinina con aplicaciones contra la malaria y la morfina como sedante (34). En el caso de la quinina, antes de la conquista de América, los pueblos originarios de los Andes usaban extractos del árbol de quino para tratar la fiebre. La historia del descubrimiento de sus propiedades antipalúdicas está bien documentada con el testimonio de Pedro de Leyva (35).

Después, con la llegada de los españoles, los misioneros jesuitas notaron su importancia y la llevaron a Europa, incorporándola posteriormente en sus tratados de medicina. Este alcaloide ha sido extraído de diversas plantas del género *Cinchona* (36); no obstante, el quino (*Cinchona pubescens*) sigue siendo la fuente más importante. Fueron los químicos Franceses Pierre-Joseph Pelletier y Joseph-Bienaimé Caventou en 1820 los que descubrieron la quinina y demostraron que era el principio activo contra la malaria. En 1908, el químico alemán Paul Rabe describió la estructura química de la quinina (Figura 5) (37).

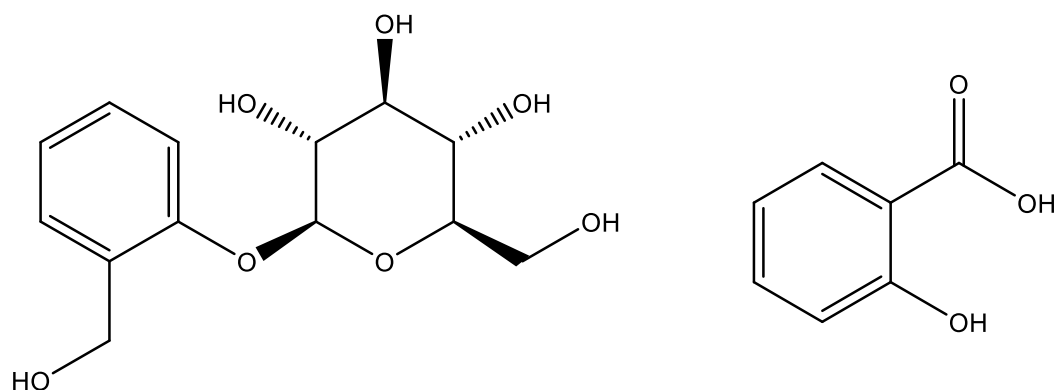


**Figura 5.** Estructuras moleculares de la quinina (izquierda) y la morfina (derecha)

En el caso de la morfina, como fuente principal la adormina o amapola común (*Papaver somniferum*), ha sido empleada por más de 7000 años, aunque no era entendida la razón de su efecto analgésico (38). Entre 1805 y 1817, Friedrich Wilhelm Adam Serturner aisló por primera vez la morfina, pero denominándola como morphium haciendo una relación entre el efecto de la sustancia con el dios griego de los sueños Morfeo (38). En 1819, Wilhelm Meissner clasificó al morphium como un alcaloide. Fue necesario más de medio siglo para que Sir Robert Robinson determinara la estructura de la morfina valiéndole el Premio Nobel en Química (Figura 5). Por último, en 1952, Marshall D. Gates Jr. y Gilg Tschudi para proponer la síntesis de la morfina. La importancia monumental de este alcaloide se ve reflejada hasta nuestros días. A pesar de que, la morfina es el alcaloide con mayor reconocimiento de la amapola, esta planta contiene otros de gran importancia para la farmacéutica, como son la codeína, papaverina y noscapina (39).

El descubrimiento de estos metabolitos secundarios representó una revolución en la medicina y otras áreas como la de los colorantes y con esto la creación de la farmacéutica como la conocemos hoy en día (40). La quinina y la morfina abrieron paso a intensificar las investigaciones en otras plantas y sus metabolitos secundarios.

Con la misma suerte, en el siglo XIX, fue aislado de brotes de la ulmaria o también conocida como reina de los prados (*Filipendula ulmaria*) el ácido salicílico. Testimonios del uso de la salicina (precursor del ácido salicílico) se encuentran en Egipto y Grecia por los efectos analgésicos de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*) (Figura 6). El ácido salicílico dio paso al ácido acetil salicílico (aspirina), un medicamento que es utilizado en la actualidad.

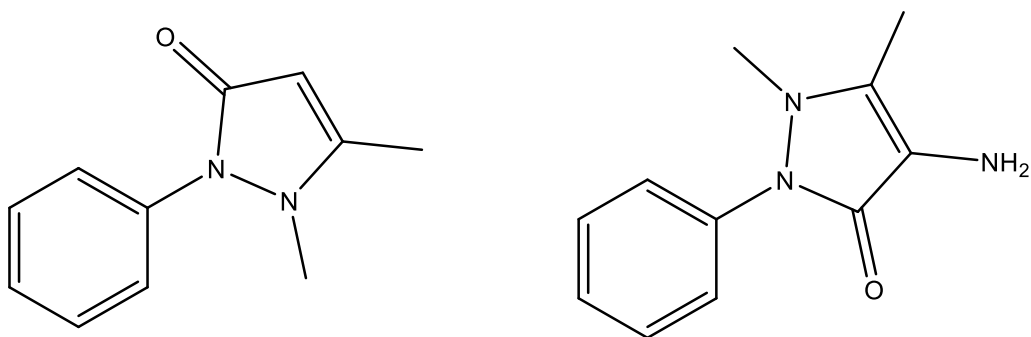


**Figura 6.** Estructura molecular de la salicina (izquierda) y el ácido salicílico (derecha)

En el siglo XX, a pesar del dominio de los medicamentos sintéticos, hubo aún avances en los productos naturales obtenidos de plantas. Algunos ejemplos notorios son la artemisina, paclitaxel, vincristina, vinblastina, atropina, digoxina, colchicina, capsicina y reserpina.

## De los medicamentos sintéticos y su dominio en la medicina

No muy distante al descubrimiento de los metabolitos secundarios como medicamentos surgieron los primeros medicamentos sintéticos. Los primeros en ser desarrollados fueron la fenazona y la aminofenazona. De igual manera, se obtuvieron de forma sintética metabolitos secundarios, como es el caso de la ya mencionada morfina.



**Figura 7.** Estructura molecular de la fenazona (izquierda) y la aminofenazona (derecha)

La explosión del desarrollo de los medicamentos sintéticos, y con ello el nacimiento de la industria farmacéutica, fue posible debido a la relativa facilidad de producción a gran escala y tamaño de dosis. Desde este punto, la creación de medicamentos sintéticos ha aumentado a ritmos impresionantes.

No hay duda que, los avances de la ciencia en el desarrollo de medicamentos han logrado aumentar la calidad y esperanza de vida en los seres humanos y otros seres vivos. Enfermedades que arrasaban con poblaciones, ahora son fácilmente erradicadas. Ejemplos de esto es la polio, tétanos, y VIH.

## **Del renacimiento de los compuestos naturales y su necesidad en la medicina moderna**

A pesar de que, han pasado casi dos siglos desde la creación del primer medicamento sintético, los efectos colaterales del uso de estos son cada vez más visibles en la sociedad. Existen diversos factores que han llevado a efectos colaterales de los medicamentos sintéticos.

Posiblemente, el más relevante es el uso incorrecto e indiscriminado de los medicamentos sintéticos. El aumento de las redes sociales y la facilidad en la búsqueda de información de carácter médico ha hecho que el autodiagnóstico sea parte de la vida de las personas. Aunque, sin duda, el darles nombre a nuestros padecimientos es una ventaja tanto para el paciente como el médico, los problemas surgen al uso desmedido de éstos. El caso más claro, es la resistencia a los antibióticos, debida fuertemente al uso incorrecto de éstos (41,42).

Otro aspecto que promueve a la fiabilidad de los medicamentos sintéticos es la competencia de la industria farmacéutica (43). Con el afán de llegar primero al mercado o monopolizar una molécula se llega al punto de alterar resultados o de omitir evaluaciones en el proceso de desarrollo del fármaco (44). Esto da como resultado graves problemas en la salud pública, que no sólo perjudican la salud, sino que se trasladan en la confianza de las personas frente a los medicamentos. El ejemplo más citado es la catástrofe de la talidomida, que resultó en una generación de bebés con malformaciones irreversibles (45).

Algo que también se vincula con la monopolización de los fármacos, es el precio desorbitante de muchos tratamientos, sobre todo en el tratamiento contra el cáncer. Por esa razón, no es de extrañar que, entre los medicamentos más caros en el mercado (entre \$700,000 a \$1,200,000 dólares americanos por año) tienen como fin combatir el cáncer (Figura 8) (46).



**Precio:** \$1,200,000 dólares/año

**Cáncer:** Neuroblastoma

**Incidencia en los EUA:** 1000 casos/año



**Precio:** \$1,100,000 dólares/año

**Cáncer:** Melanoma uveal

**Incidencia en los EUA:** 5000 casos/año

**Figura 8.** Tratamientos relacionados con cáncer más caros en el mercado (2024)

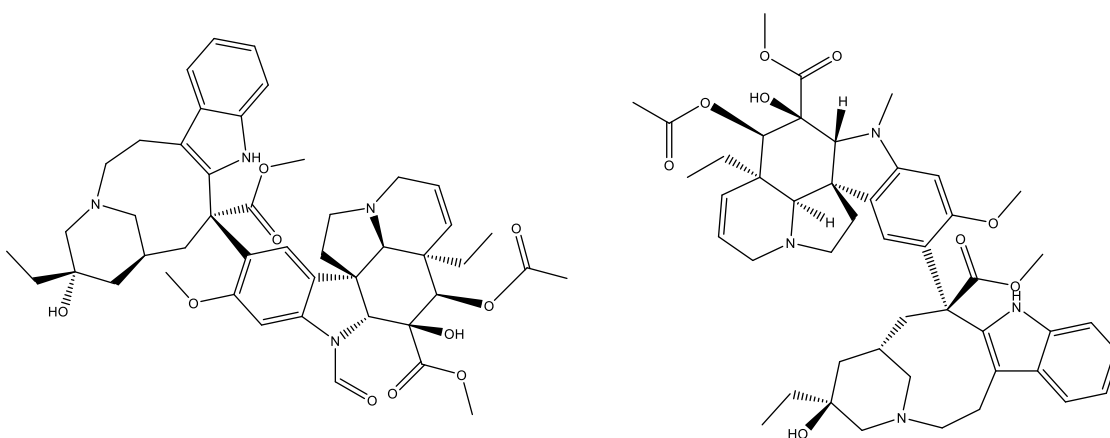
Por último, los medicamentos sintéticos carecen de una evolución a la par con los organismos vivos. Resaltando las plantas, es lógico relacionarlas como reactores naturales donde sus compuestos actúan sinérgicamente para su defensa (47). Un fitocompuesto que ejemplifica la ventaja de los productos naturales frente a los sintéticos respecto a la resistencia de los medicamentos es la antes mencionada quinina. La quinina toma relevancia nuevamente, puesto que, los medicamentos sintéticos contra la malaria también han sido afectados por la resistencia de los medicamentos (37).

## **De los productos naturales y su incorporación para el tratamiento contra el cáncer**

### **Vincristina o leurocristina como sulfato de vincristina (Oncovin®) y Vinblastina como sulfato de vinblastina (Velban®) proveniente de *Catharanthus roseus* (1961 y 1963)**

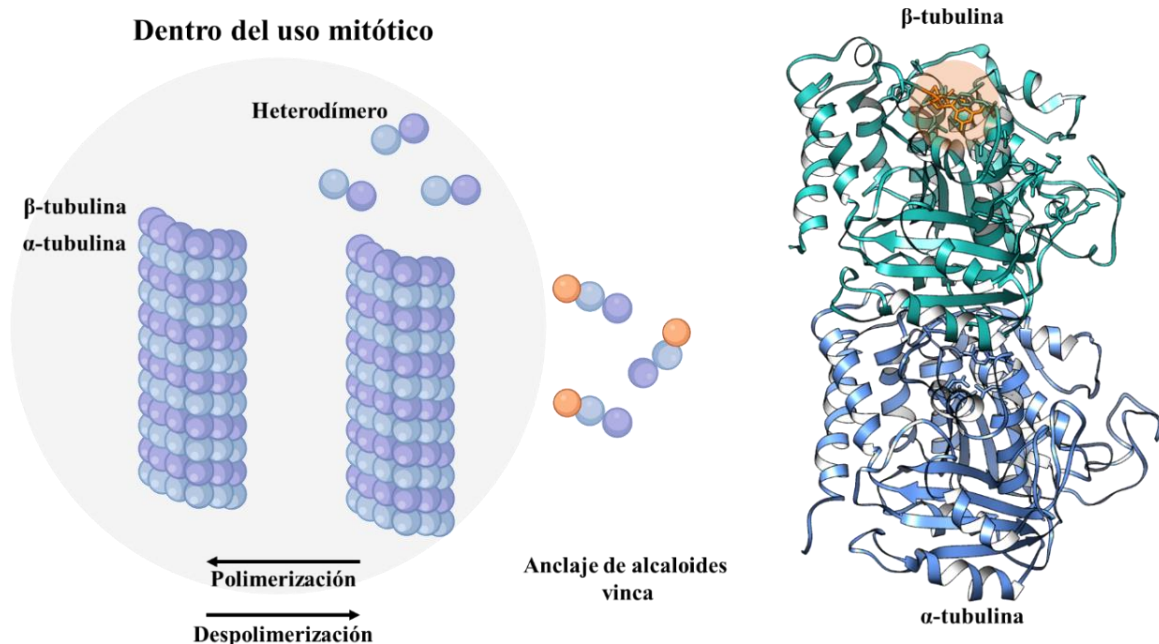
El primer metabolito secundario en ser registrado por la FDA como un medicamento contra el cáncer fue la vincristina, extraída de las hojas del *Catharanthus roseus* (anteriormente conocido como *Vinca rosea*). Antes de este suceso, el *Catharanthus roseus* fue usado por siglos en diferentes países por sus propiedades medicinales, asignándola en el tratamiento contra la diabetes, la malaria y las infecciones bacterianas (48). No obstante, su estudio

formal no comenzaría hasta el siglo XX a cargo del grupo de trabajo del Profesor Robert Noble. Noble comenzó investigaciones para su aplicación contra la diabetes, pero su observación en trabajos in vivo con ratones lo llevó a ver su potencial anticancerígeno (49,50). No fue hasta 1958 cuando se realizaron estudios en células leucémicas, y posteriormente con pacientes humanos. Su aprobación por la FDA tuvo un lapso largo debido a la complejidad de encontrar el mecanismo de acción, puesto que nunca se había presentado un compuesto que atacara el ordenamiento de los microtúbulos. Debido a los resultados obtenidos, en 1963 la FDA lo aprobó como tratamiento para el cáncer de leucemia linfocítica aguda.



**Figura 9.** Estructura molecular de la leurocristina (izquierda) y vinblastina (derecha)

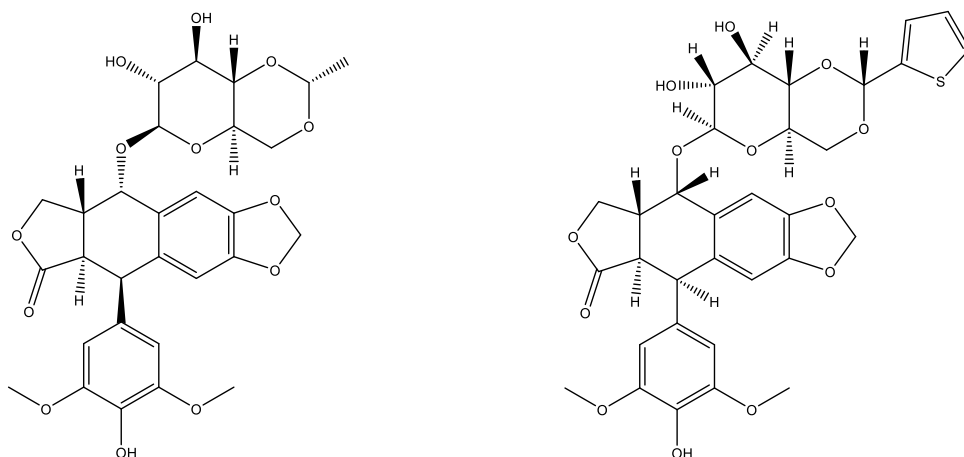
Los alcaloides vinca son fármacos que afectan la red de fibras proteicas dentro de las células (citoesqueleto). Estos alcaloides se anclan a la tubulina, la cual, es un componente básico de los microtúbulos (Figura 10) (51). Dentro del uso mitótico, los microtúbulos ayudan a la división celular, por lo que son estructuras fundamentales en las células. Los alcaloides vinca interrumpen el montaje y desmontaje de los microtúbulos, lo que impide que las células se dividan correctamente (52). Cuando las células se tratan, por ejemplo, con vincristina y vinplastina, quedan atrapadas en una fase de división celular llamada metafase por medio de un anclaje en la  $\beta$ -tubulina. Esto hace que sufran un proceso llamado apoptosis o muerte celular programada (53). La vincristina y vinplastina son particularmente eficaces para detener el crecimiento de las células cancerosas, que se dividen rápidamente.



**Figura 10.** Mecanismo de inhibición de alcaloides vinca en microtubulos. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 1TUB (RCSB PDB) (54)

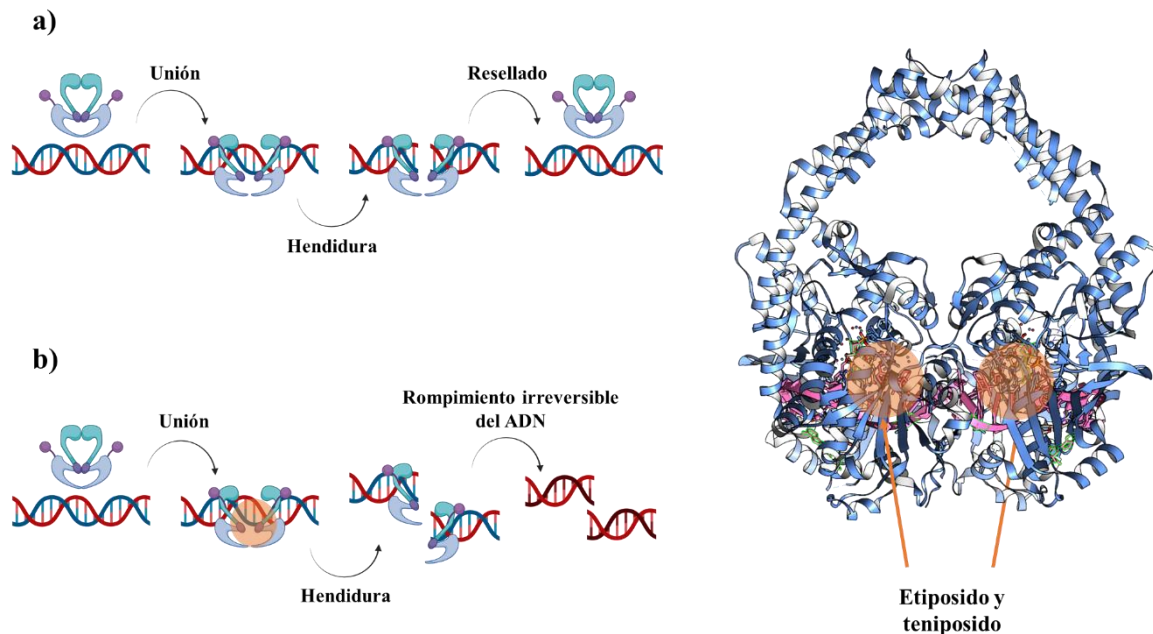
## **Podofilotoxina como Etoposido y Teniposido proveniente de genero *Podophyllum* (1983 y 1990)**

El etoposido y teniposido tienen una rica historia en la medicina tradicional. Las comunidades indígenas, en particular los grupos indígenas americanos, han utilizado extractos de la planta *Podophyllum peltatum* con diversos fines medicinales (Figura 11) (55). Como resultado, estas moléculas ganaron prominencia en la medicina occidental cuando los científicos comenzaron a aislar y estudiar sus propiedades químicas (51). La identificación del etoposido y teniposido marcó un punto de inflexión a mediados del siglo XX cuando los investigadores reconocieron su potencial como compuesto citotóxico con importantes implicaciones para el tratamiento del cáncer (56).



**Figura 11.** Estructura molecular del etoposido (izquierda) y teniposido (derecha)

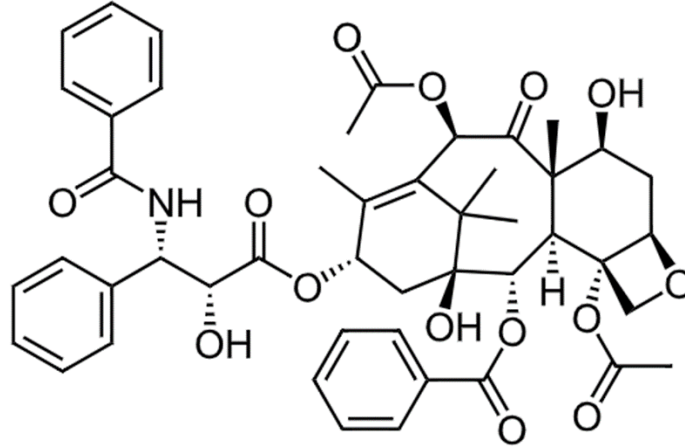
La podofilotoxina y sus derivados como el etopósido y el tenipósido son conocidos por su mecanismo de acción en la lucha contra el cáncer. Interfieren con las topoisomerasas del ADN, que son enzimas que desempeñan un papel crucial en la replicación y reparación del ADN (Figura 12) (57). Estas enzimas gestionan los cambios en la estructura del ADN durante procesos como la replicación, la transcripción y la recombinación, y alivian la tensión torsional generada durante estos procesos mediante la introducción de roturas transitorias en las cadenas de ADN (58). Los derivados de podofilotoxina forman un complejo ternario con el ADN topoisomerasa II y el ADN. Este complejo estabiliza la escisión del ADN mediada por enzimas, evitando la nueva ligadura de las cadenas de ADN rotas. Al estabilizar el complejo de escisión, los derivados de podofilotoxina inhiben el paso de replicación del ADN, lo que lleva a la acumulación de roturas de doble hebra en el ADN. La acumulación de roturas de doble hebra desencadena la detención del ciclo celular, particularmente en la fase G2/M, donde se evalúa el daño del ADN antes de la división celular. Esta detención permite a la célula reparar el ADN dañado antes de avanzar en el ciclo celular (59). El etopósido y el tenipósido inducen la apoptosis al alterar la integridad del material genético de la célula.



**Figura 12.** Mecanismo de inhibición del etoposido y teniposido en la topoisomerasa II. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 5ZRF (RCSB PDB) (60,61): a) mecanismo tradicional, b) mecanismo bloqueado por anclaje del etoposido o teniposido

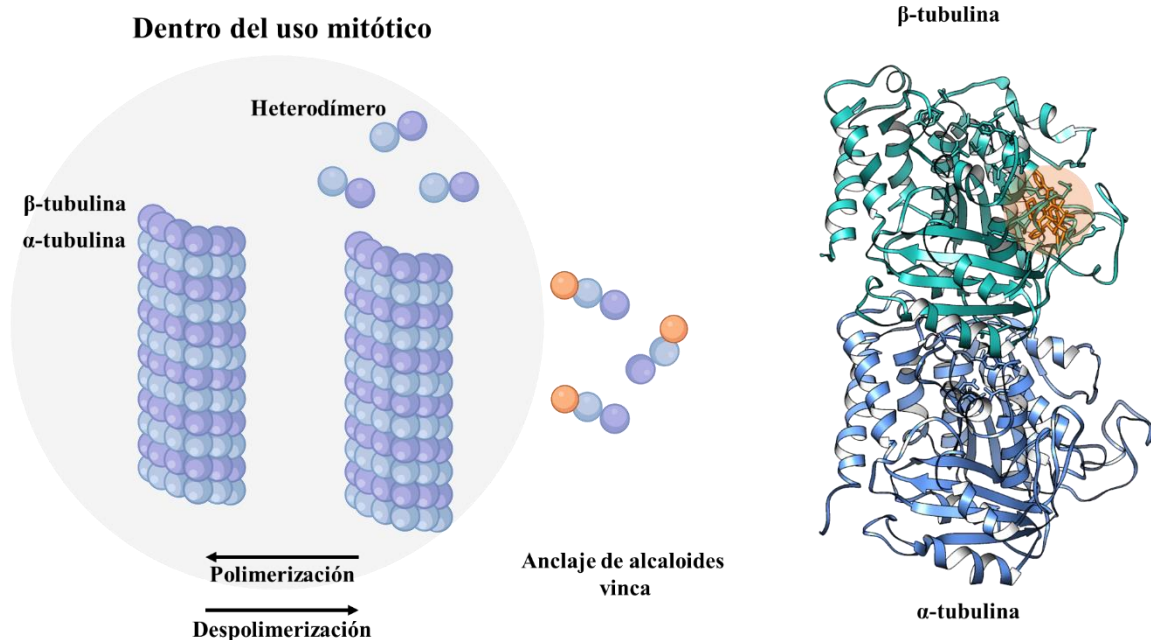
## **Paclitaxel (Taxol®) proveniente de *Taxus brevifolia* (1992)**

El taxol, también conocido como Paclitaxel, se descubrió a principios de la década de 1970 durante un programa de detección para encontrar posibles fármacos anticancerígenos de fuentes naturales (Figura 13) (62). El compuesto se aisló por primera vez de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). En 1971, investigadores dirigidos por el Dr. Monroe E. Wall y el Dr. Mansukh C. Wani del Research Triangle Institute (RTI) en Carolina del Norte dilucidaron la compleja estructura del Taxol, revelando una estructura molecular única (63). El taxol es relevante principalmente por sus potentes propiedades anticancerígenas. Su mecanismo de acción es parecido al mostrado en los alcaloides vinca, con la diferencia de la posición de su sitio activo. No obstante, también actúan con una estabilización de los microtúbulos durante la división celular, lo que provoca la detención del ciclo celular y la apoptosis (64).



**Figura 13.** Estructura molecular del taxol

Con más detalle, el Taxol se une a las subunidades de  $\beta$ -tubulina presentes en los microtúbulos, que son un componente fundamental del citoesqueleto (Figura 14). Esta unión permite la estabilización de los microtúbulos evitando su desmontaje, lo que en última instancia interfiere con el uso mitótico. Como resultado, se inhibe la segregación adecuada de los cromosomas durante la mitosis, lo que lleva a un estado de detención mitótica (65). Cuando las células se tratan con Taxol, no pueden pasar de la etapa metafase de la mitosis, lo que resulta en una parada mitótica prolongada. El Taxol activa el punto de control del ensamblaje del huso, que es un mecanismo de vigilancia celular que garantiza que todos los cromosomas estén alineados y unidos adecuadamente al huso mitótico antes de permitir que continúe la división celular (66). Finalmente, la parada mitótica prolongada causada por Taxol conduce a la activación de la apoptosis. Este mecanismo convierte al Taxol en un aliado en el tratamiento de estadios avanzados de cáncer de mama, particularmente en pacientes que pueden no responder a otros tratamientos (66).

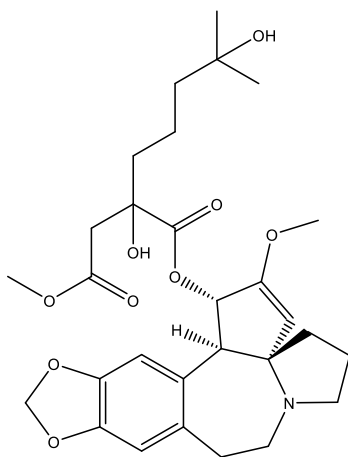


**Figura 14.** Mecanismo de inhibición del paclitaxel en microtubulos. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 1TUB (RCSB PDB) (54)

## **Mepesuccinato de omacetaxina (Synribo®) como homoharringtonina proveniente de *Cephalotaxus harringtonia* (2012)**

El mepesuccinato de omacetaxina, conocido comercialmente como Synribo®, es un derivado semisintético de un alcaloide natural llamado homoharringtonina (Figura 15). Este compuesto se aisló originalmente de la corteza del árbol *Cephalotaxus harringtonia* en la década de 1960, originario de China (67).

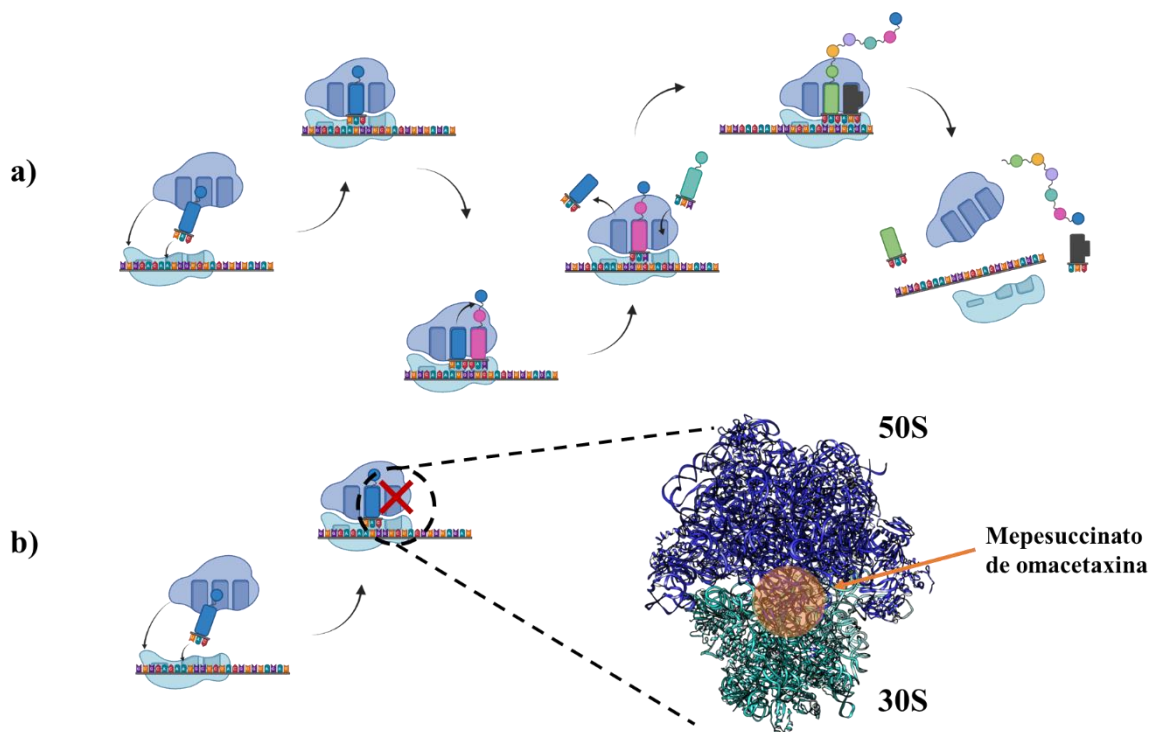
Inicialmente estudiado por su potencial como agente antileucémico, el desarrollo de la omacetaxina progresó con los años debido a su mecanismo de acción único y su eficacia contra las neoplasias hematológicas, especialmente la leucemia mieloide crónica (68). Obtuvo la aprobación de la FDA de EE. UU. en 2012 para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica que se han vuelto resistentes a los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), la terapia estándar (69).



**Figura 15.** Estructura molecular de la hemoharringtonina

La omacetaxina funciona de manera diferente a la mayoría de las terapias tradicionales contra el cáncer. Actúa como un inhibidor de la traducción de proteínas, específicamente dirigido al ribosoma (Figura 16) (70). Al unirse a la hendidura del sitio A de la subunidad ribosómica, la omacetaxina interfiere con la elongación durante la traducción, impidiendo la síntesis adecuada de proteínas que son esenciales para la supervivencia de las células cancerosas.

El mepesuccinato de omacetaxina representa un avance importante en el tratamiento del cáncer, en particular para los pacientes con leucemia mieloide crónica resistente a los fármacos. Su mecanismo de acción único, que se centra en la síntesis de proteínas en lugar de la actividad de las cinasas, le permite superar los desafíos asociados con la resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa, lo que ofrece esperanza a los pacientes con opciones de tratamiento limitadas (71).



**Figura 16.** Mecanismo de inhibición del mepesuccinato de omacetaxina en el ribosoma. Ilustración creada con Biorender y Chimera usando el cristal 7TOS (RCSB PDB) (72): a) mecanismo tradicional, b) mecanismo bloqueado por anclaje del mepesuccinato de omacetaxina en el sitio A.

## De los productos naturales y su incorporación en nanosistemas para el tratamiento contra el cáncer

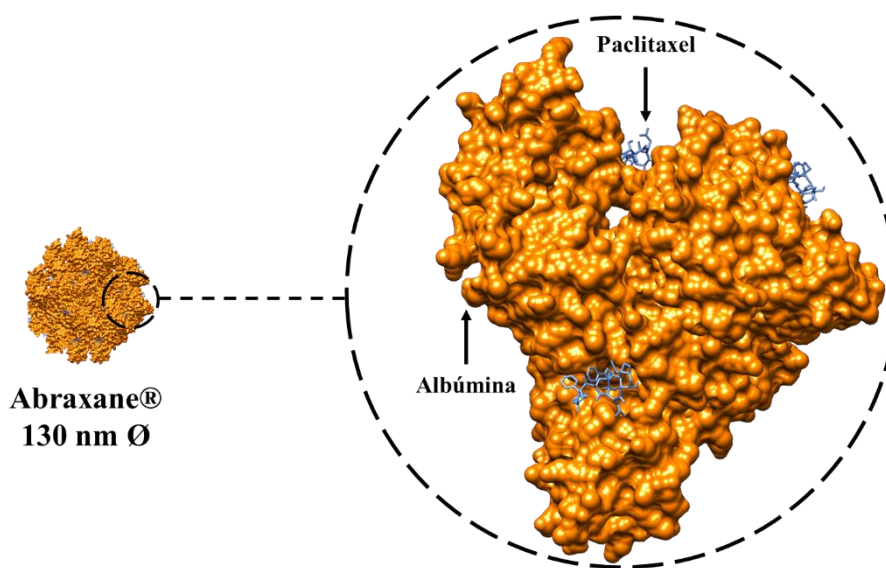
Los metabolitos secundarios, aunque poderosos, pueden presentar inconveniencias dependiendo de la ruta empleada para su transporte. Por ejemplo, son bien conocidas las cinco reglas de Lipinski para la ruta oral, y la mayoría de metabolitos secundarios prometedores violan una o más de las cinco reglas debido a la complejidad de su estructura (73). Inclusive, existen inconvenientes al seleccionar otra ruta, debido a las diferentes barreras que presenta el cuerpo humano. Por esta razón, el encontrar una forma de transportar estos metabolitos a un sitio específico, es un desafío para la ciencia (74).

Por todo lo anterior, en la actualidad se han propuesto y se han registrado medicamentos que combinan con éxito metabolitos secundarios conocidos por su actividad anticancerígena y nanosistemas, demostrando que es un camino a seguir para la medicina. Ejemplo de estos sistemas son el Abraxane y Maeqibo.

## Paclitaxel funcionalizado con albúmina (Abraxane®) (2012)

Abraxane representa un avance significativo en el uso de nanotecnología para mejorar la administración de medicamentos quimioterapéuticos (Figura 17) (75). Su desarrollo está directamente relacionado con la necesidad de superar las limitaciones del paclitaxel en su forma convencional, que requiere solventes como el cremofor para su disolución, generando efectos secundarios severos como reacciones alérgicas y neuropatías. Abraxane fue aprobado por la FDA en 2012 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, y posteriormente se amplió su uso para otros tipos de cáncer como el de páncreas y pulmón (76,77).

El mecanismo central de Abraxane se basa en la formación de nanopartículas de albúmina (proteína endógena) y paclitaxel resultando en un nanosistema de 130 nm (aproximadamente 66 kDa) (78). El rol de la albúmina es crucial, ya que permite una distribución eficiente del paclitaxel en el cuerpo mediante el mecanismo de transcitosis anclándose a la gp60, una proteína de superficie en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (79). Esta vía de transporte favorece el paso a través de los vasos sanguíneos hacia el microambiente tumoral, donde el efecto mejorado de permeabilidad y retención en tumores permite que Abraxane se acumule preferentemente en las células cancerosas. A diferencia de las formulaciones tradicionales de paclitaxel, Abraxane evita el uso de surfactantes tóxicos, permitiendo una mayor dosis terapéutica con menor toxicidad sistémica (80).



**Figura 17.** Representación en 3D y composición del Abraxane. Ilustración creada en Chimera usando el cristal 1AO6 (RCSB PDB)(81)

Abraxane es un ejemplo sofisticado de cómo la nanotecnología puede mejorar la farmacocinética y farmacodinámica de los agentes quimioterapéuticos, superando las limitaciones de formulaciones convencionales y dirigiéndose eficientemente al sitio del tumor mediante mecanismos biológicos como la transcitosis mediada por albúmina y la acumulación selectiva en el microambiente tumoral.

## **Vincristina como sulfato de vincristina en liposomas (Marqibo®) (2012)**

Marqibo, al igual que Abraxane, es un ejemplo innovador de cómo la nanotecnología puede optimizar la administración de fármacos, mejorando su eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios (82). De forma innovadora, en lugar de usar albúmina como vehículo de transporte, Marqibo utiliza un nanosistema basado en liposomas el cual encapsula el sulfato de vincristina, lo que le otorga características únicas que favorecen el transporte y la focalización del fármaco en los tejidos.

El liposoma de Maeqibo tiene un diámetro aproximado de 100 nm y está compuesto principalmente de esfingomielina y colesterol. Estos componentes lipídicos son fundamentales para su estabilidad estructural y funcionalidad, ya que ayuda a mantener la integridad del nanosistema en el torrente sanguíneo(83).

El tamaño del liposoma de Maeqibo, alrededor de 100 nm, es ideal para aprovechar el efecto mejorado de permeabilidad y retención en los tumores. Los tumores suelen tener una vasculatura anormal con poros más grandes que los tejidos sanos, lo que permite que las nanopartículas, como los liposomas, se acumulen en el sitio tumoral de manera más selectiva. Este proceso reduce la exposición del fármaco a los tejidos sanos y, por lo tanto, minimiza los efectos adversos (84).

# Capítulo 3 Metodología

## Elección y tratamiento de la planta

### Selección de la planta

La selección de la planta a evaluar en esta tesis tuvo que cumplir con los siguientes criterios:

- Planta con antecedentes etnobotánicos
- Planta con uso vulgar contra el cáncer
- Fácil acceso

### Preparación de material

#### *Preparación del extracto*

Se incorporaron 10 g de hojas secas en polvo a 100 ml de agua desionizada. La muestra se agitó a 300 rpm a una temperatura de 60°C durante 1 hora, seguida de un período de reposo a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, el extracto se filtró mediante papel Whatman #42 y se almacenó a 4°C.

#### *Preparación del extracto concentrado*

El extracto se depositó en un matraz bola incorporado a un sistema de evaporación rotatoria (DLAB Rotavapor RE100-Pro). Los parámetros usados para la extracción de solvente fueron 55°C y 75mbar. El tiempo de extracción de todo el solvente fue 1h 15min. Posterior a la extracción, el matraz bola con el extracto concentrado fue puesto en desecador por 24h.

#### *Peso del extracto concentrado*

El matraz bola usado en la preparación del extracto concentrado fue pesado antes y después de la extracción del solvente por medio de una balanza analítica. La diferencia de peso fue expresada en peso recolectado/peso de hojas secas usadas para realizar el extracto.

### Composición

El análisis de la composición del extracto se llevó a cabo comenzando con análisis cualitativo y finalizando con análisis cuantitativos.

## **Barrido fitoquímico**

Para el barrido fitoquímico se usaron diferentes soluciones y procedimientos dependiendo del metabolito a identificar siguiendo los protocolos de diferentes fuentes (85–87).

***Prueba de alcaloides (prueba de Hager):*** Se añadieron unas gotas del reactivo de Hager (ácido pícrico) a 2 ml de extracto mezclando fuertemente. La formación de un precipitado cristalino de color amarillo indica la presencia de alcaloides.

***Terpenoides (prueba de Salkowski):*** Se añadieron 2 ml de cloroformo y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado a 5 ml de extracto acuoso. Un resultado positivo se indica por la aparición de un anillo de color marrón rojizo en la capa inferior de cloroformo.

***Saponinas (prueba de espuma):*** Se agitaron vigorosamente 5 ml de extracto y se dejaron reposar durante 10 minutos. La presencia de espuma estable indica la existencia de saponinas en el extracto.

***Flavonoides:*** En dos tubos de ensayo, se añadieron 2 ml de extracto. Para el blanco, se añadieron 2 ml de agua destilada y se agitó durante unos segundos. Para la muestra comparativa, se añadieron 2 ml de NaOH. La aparición de un color amarillo indica un resultado positivo para flavonoides.

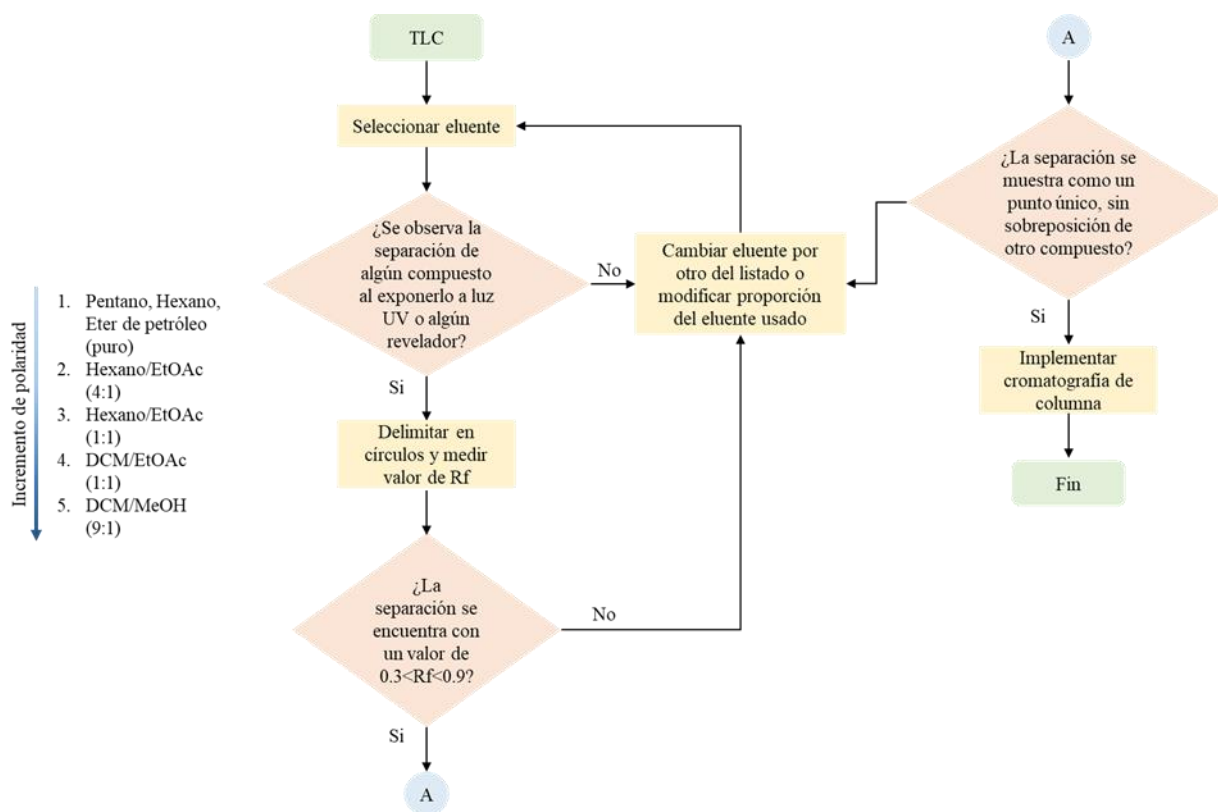
***Antraquinonas (prueba alcalina):*** Se añadió 1 ml de solución de hidróxido de amonio diluido a 2 ml de extracto, seguido de la adición de gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La aparición de un color rosa indica la presencia de antraquinonas.

***Carbohidratos (prueba de Benedict):*** Se añadieron 2 ml del reactivo de Benedict a 1 ml de extracto y se hirvieron durante 5 minutos. La formación de un precipitado de color rojo ladrillo indica la presencia de carbohidratos.

***Esteroides:*** Se añadieron 2 ml de cloroformo y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 5 ml de extracto acuoso. Un resultado positivo se indica por la aparición de un anillo de color marrón rojizo en la capa inferior de cloroformo.

## Cromatografía

El proceso de separación de compuestos para su posterior caracterización es un proceso largo y costoso, donde intervienen variables como la parte de la planta, tipo de solvente, cantidad de materia prima, y método de extracción. Toda esta complejidad es aplicable para la separación por métodos cromatográficos. Por lo que, se estableció una estrategia para optimizar el proceso de fraccionamiento del extracto, teniendo en cuenta el tiempo, eluyente y otros utensilios de cromatografía de capa fina y de columna (Figura 18) (88,89).



**Figura 18.** Estrategia para la optimización de estudios de TLC y CC

### *Cromatografía de capa fina*

Con el fin de separar los compuestos en el extracto de la planta se llevó a cabo un estudio de cromatografía de capa fina (TLC). Para la fase estacionaria, se utilizaron placas de silica gel (60 F254) sobre bases de aluminio de 10 x 20 cm (MERCK MILLIPORE). Estas placas se cortaron en rectángulos de 2 x 5 cm para su uso en las pruebas de TLC.

En cuanto a la fase móvil, se evaluaron diferentes solventes y combinaciones de ellos, como se muestra en la Figura 18. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC

(FERMONT). La selección de la fase móvil se realizó considerando la polaridad de los compuestos a separar, basada en estudios preliminares de cromatografía de capa fina.

Para la preparación de las placas de TLC, se marcaron las líneas de inicio y terminación utilizando un lápiz y regla, dejando un margen de 1 cm en el borde inferior y superior de la placa. La muestra se aplicó dos veces en cada placa utilizando un tubo capilar para propósitos de comparación.

La separación se realizó en una cámara de cromatografía de vidrio, en la cual, se añadieron 5 ml de fase móvil y se tapó con la intención de saturar la atmósfera de la cámara con la fase móvil. Por consiguiente, las placas se introdujeron cuidadosamente con pinzas, manteniendo la cámara cerrada para evitar la evaporación de los solventes. Cuando la fase móvil alcanzó aproximadamente 0.5 cm antes de la marca final, las placas se retiraron y se dejaron secar en una campana extractora durante 5 minutos para su posterior análisis.

La evaluación de las placas se realizó mediante técnicas de revelado por luz UV-A, UV-B y una cámara de yodo. Para la detección bajo UV, se utilizó una lámpara multibanda UV (UVGL-25 MINERALIGHT UV-254/366 nm). En el caso del revelado con yodo, se colocó 1 g de yodo granulado (reactivo analítico Monterrey) en un recipiente plástico de 500 mL. En ambos métodos de revelado, los compuestos retenidos fueron marcados con lápiz y se midió la distancia recorrida por las manchas usando una regla para calcular los factores de retención ( $R_f$ ) mediante la siguiente ecuación (90).

$$R_f = \frac{\text{Distancia del punto respecto al inicio}}{\text{Distancia de la fase móvil respecto al inicio}} \quad (\text{entre } 0 \text{ y } 1)$$

Las condiciones de las muestras que presentaron un  $R_f$  entre 0.2 y 0.8 (0.5, ideal) fueron las seleccionadas para la cromatografía de columna.

### ***Cromatografía de columna***

Con base en los resultados de los factores de retención obtenidos mediante TLC, se seleccionó la fase móvil para su uso en la cromatografía en columna. La columna fue empacada usando gel de sílica de alta pureza, con un tamaño de poro promedio de 60 Å (53-73 Å) y un mallado de 70-230. Se utilizaron 10 g de gel de sílica, los cuales fueron

impregnados con la fase móvil hasta formar una pasta homogénea. Esta mezcla se depositó en la columna, asegurando la nivelación y evitando la formación de espacios vacíos.

Para la preparación de la muestra, el extracto de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* fue previamente impregnado con gel de sílica, formando una cabeza de columna, que se colocó cuidadosamente sobre la sílica en la columna. Para evitar el desempaqueado durante la adición de la fase móvil, la parte superior de la columna se selló con una capa de arena purificada (Mallinckrodt Chemicals).

La fase móvil seleccionada a partir de los ensayos de TLC se añadió con cuidado mediante una pipeta, hasta completar aproximadamente un tercio del volumen de la columna. Posteriormente, se abrió la válvula y se recolectaron las fracciones en tubos de ensayo de vidrio de 10 mL.

Las fracciones recolectadas se evaluaron nuevamente por cromatografía de capa fina, agrupándose aquellas que presentaron factores de retención similares, para su posterior caracterización.

## **Caracterización por FTIR**

El extracto concentrado, las fracciones obtenidas por cromatografía de columna, y todas las síntesis de nanopartículas fueron caracterizadas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo PerkinElmer Frontier con reflectancia total atenuada (ATR). El objetivo fue identificar los grupos funcionales presentes en las muestras y proponer una aproximación a los metabolitos presentes en la planta y en las nanopartículas.

Para la obtención del espectro del extracto concentrado, se depositó una gota directamente sobre el cristal del ATR, asegurando una cobertura uniforme para una correcta adquisición del espectro. En el caso de las fracciones cromatográficas y las nanopartículas, las muestras se concentraron mediante evaporación al ambiente directamente sobre el ATR, logrando un depósito suficiente para el análisis.

El rango espectral seleccionado para todas las mediciones fue de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Todos los espectros fueron registrados y almacenados en formato .xlsx para su posterior procesamiento y análisis en OriginPro.

## **Caracterización por UV-Vis**

El extracto acuoso de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* y las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo Shimadzu UV-2600. El análisis del extracto acuoso tuvo como objetivo identificar posibles interacciones moleculares, mientras que para las nanopartículas se buscó determinar el plasmón de resonancia superficial (SPR) característico de cada muestra, así como evaluar la incorporación de los compuestos activos, ya sea como agentes reductores o estabilizadores.

El barrido se realizó en un rango de 200 nm a 800 nm, con una velocidad de adquisición de 0.5 nm por punto. Las muestras fueron depositadas en una celda de cristal, utilizando un volumen de 3 mL para cada medición tomando como referencia agua desionizada.

## **Espectrometría de masas acoplado a cromatografía**

En base a los resultados de las caracterizaciones anteriores, se seleccionó un grupo de moléculas pertenecientes a los compuestos fenólicos y se prosiguió a determinar su presencia y concentración mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). El equipo utilizado fue un Sciex 3200 QTRAP LC/MS/MS System con Agilent 1200 HPLC. El tratamiento de todos los datos fue realizado en el software Analyst.

### ***Preparación de estándares***

La preparación inicial de las soluciones estándares consistió en la preparación de una solución madre mixta de 10 ppm que contenida kaempferol, luteolina, rutina, ácido salicílico y escopoletina. Esta solución madre mixta fue diluida usando una mezcla de metanol al 20 % y ácido acético al 1 % v/v, hasta alcanzar un volumen final de 1000  $\mu$ L para obtener una de dilución de 800 ppb.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a partir del estándar de la dilución de 800 ppb, para obtener un rango de concentraciones que incluyó: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 y 0.19 ppb. En cada paso de la dilución se mezclaron las soluciones adecuadamente por medio de un vortex para garantizar la homogeneidad en las concentraciones.

Además, se prepararon soluciones estándares individuales a 500 ppb para los cinco compuestos antes mencionados con el objetivo de determinar sus tiempos de retención individuales que funcionarán como referencia para el análisis cromatográfico.

### ***Extracción por ultrasonicador***

Para este estudio, se empleó el polvo de hojas secas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* usadas en la caracterización anterior. Inicialmente, se pesaron cuidadosamente 25 mg del material de muestra y se registró el peso exacto. La muestra fue transferida a un tubo Eppendorf de 2 ml, al cual se le añadió 1 ml de solvente de extracción, compuesto por 80 % de metanol y 1 % de ácido acético.

Los tubos se colocaron en una rejilla flotante de espuma y se sumergieron en un baño ultrasónico a temperatura ambiente durante 45 minutos. Tras la sonicación, los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. El sobrenadante resultante fue recolectado cuidadosamente en un vial ámbar de 12 ml.

El precipitado en el tubo Eppendorf se resuspendió con 1 ml adicional del mismo solvente de extracción y se sometió a una segunda ronda de extracción por ultrasonido bajo las mismas condiciones de sonicación (45 minutos) y centrifugado (4000 rpm por 10 minutos a 20 °C). Los sobrenadantes de ambas extracciones fueron combinados en el mismo vial ámbar de 12 ml y almacenados a -18 °C hasta su posterior análisis. Este procedimiento se realizó en cuatro réplicas por cada grupo experimental para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

### ***Optimización de cromatografía líquida***

Para la optimización de las condiciones de cromatografía líquida, se evaluaron de manera sistemática varios parámetros críticos para mejorar la separación y la reproducibilidad de las muestras como son el tipo de columna, la composición de la fase móvil, y el tiempo de la corrida. La selectividad de la columna se exploró mediante la prueba de fases estacionarias con diferentes químicas, como C18 y F5, buscando la mejor separación posible entre los compuestos de interés, la cual resultó en la selección de una columna C18 gemini (Phenomenex).

La composición de la fase móvil fue ajustada mediante la evaluación de diferentes solventes orgánicos, principalmente acetonitrilo y metanol, con el objetivo de mejorar tanto la

selectividad como la forma de los picos cromatográficos. Asimismo, se seleccionaron diferentes tampones, incluyendo ácidos acético y fórmico, con el fin de mantener un pH estable y optimizar las formas de los picos. Estos tampones se probaron para evaluar sus efectos sobre la retención y la reproducibilidad de las muestras.

La optimización del gradiente consistió en ajustar la pendiente del mismo, variando el porcentaje de la fase móvil en intervalos regulares para lograr una separación completa de los compuestos, al mismo tiempo que se minimizaba el tiempo total de análisis. Se realizaron ajustes a la velocidad de flujo, balanceando la resolución y el tiempo de ejecución sin exceder los límites de presión del sistema.

El volumen de inyección también fue optimizado al evaluar diferentes volúmenes para maximizar la sensibilidad analítica sin comprometer la integridad de los picos cromatográficos. Finalmente, el método optimizado fue validado mediante inyecciones repetidas, lo que permitió confirmar la consistencia del rendimiento y la reproducibilidad del sistema.

### ***Optimización manual y automática del MS/MS***

Para la optimización manual, se utilizó una jeringa con una solución estándar de 500 ppb del estándar individual de las cinco moléculas. El proceso de optimización comenzó con el escaneo en modo Q1 para identificar posibles picos correspondientes al ion precursor. En esta etapa, se seleccionaron el modo de ionización y la duración del escaneo. El rango de escaneo se ajustó para cubrir completamente el peso molecular del compuesto de interés. Para mejorar la intensidad de la señal, se habilitó la opción MCA (Analizador Multicanal).

Los picos más intensos, cercanos a la masa teórica del compuesto, fueron seleccionados como el ion precursor. Posteriormente, se realizó un estudio de diferentes tipos de escaneo (Product ion, Q3, MS2, y MSM) con la finalidad de obtener los iones precursores. Tras la identificación de los iones precursores y producto, se transfirió la muestra a un vial de vidrio y se ajustó la configuración del software para la optimización del análisis en modo FIA (Análisis de Inyección de Flujo) MS acoplado a HPLC.

Durante la optimización del FIA, varios parámetros fueron ajustados para mejorar la detección y la fragmentación de los iones. Los parámetros optimizados fueron el potencial

de desagrupamiento (DP), el potencial de Entrada (EP), el potencial de salida de la celda de colisión (CXP), el potencial de la celda de colisión (CP), la energía de colisión (CE), y el potencial de salida de la colisión (CEP).

Cada parámetro fue ajustado de manera iterativa, monitorizando cuidadosamente sus efectos sobre la intensidad de la señal y la calidad de los picos cromatográficos, asegurando así las condiciones óptimas para una detección de MS precisa y sensible.

### ***Puesta en marcha del UHPLC-MS/MS***

Las muestras diluidas (diluidas cuatro veces con agua Milli-Q) y las soluciones estándar preparadas se introdujeron en el sistema HPLC-MS/MS. Se configuraron un método de adquisición y un lote mediante el software Analyst. Para cada muestra, se monitorearon dos iones: uno utilizado como cuantificador y el otro como calificador, de acuerdo a la molécula para asegurar la precisión y la confirmación de la identidad del compuesto.

Antes del análisis de las muestras, la columna cromatográfica fue equilibrada durante 10 minutos, con el fin de estabilizar el sistema y garantizar la reproducibilidad de los tiempos de retención. Como medida de control de calidad, se inyectó un estándar de 0.25 ppb al inicio, a la mitad y al final del ciclo analítico, permitiendo el monitoreo continuo del rendimiento del sistema.

Primero se analizaron soluciones estándar mixtas a concentraciones intermedias (3.125, 6.25 y 12.5 ppb) para detectar posibles errores del sistema después del equilibrio, seguidas del análisis de los estándares restantes en orden ascendente de concentración, desde 0.19 ppb hasta 100 ppb.

### ***Análisis de datos y cuantificación***

La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el método de cuantificación y las herramientas del asistente del software Analyst. La integración de los picos cromatográficos se llevó a cabo de manera cuidadosa para asegurar la correcta identificación de los picos correspondientes a cada muestra y para minimizar el impacto del ruido de fondo en los resultados.

La calibración se realizó utilizando un ajuste cuadrático con ponderación  $1/x$ , empleando el área de los picos como parámetro de regresión. Este enfoque permitió generar una curva de

calibración robusta y precisa, garantizando una cuantificación fiable incluso en concentraciones bajas de las muestras.

## Farmacológica de red

Para explicar las vías y mecanismos de acción de los compuestos identificados por UHPLC-MS/MS, se propuso un estudio de farmacología en red siguiendo el protocolo mostrado en la Figura 19.

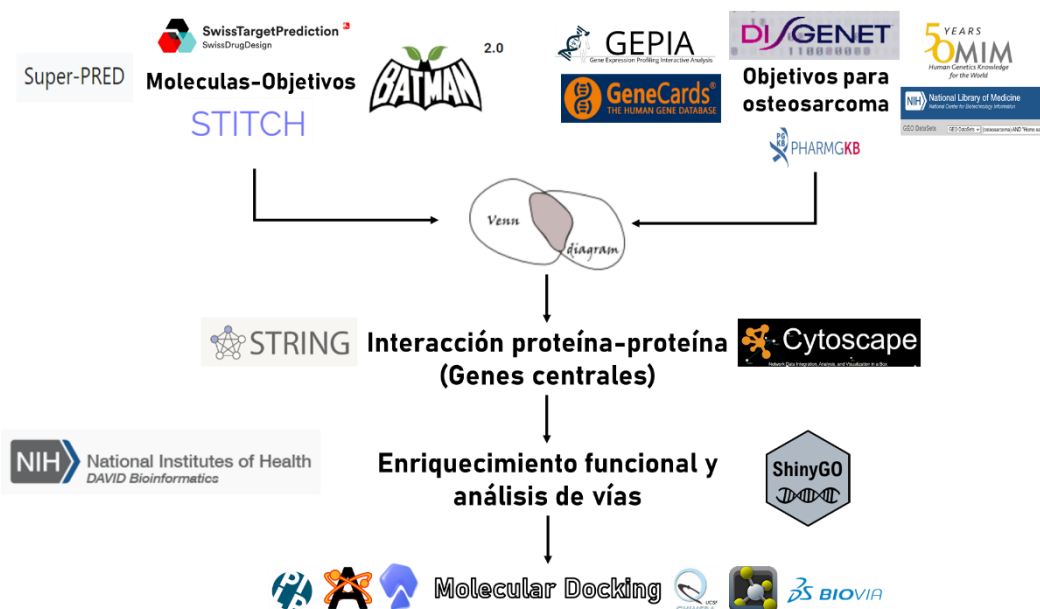


Figura 19. Flujo para protocolo de farmacología en red

## Moléculas-objetivos relacionados con el osteosarcoma

La obtención de objetivos (genes) con gran afinidad con las moléculas identificadas se llevó a cabo mediante un exhaustivo análisis en base de datos genética de diferentes fuentes.

- Swiss Target Prediction (91)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- STITCH (92)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- SUPER PRED (93)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- BATMAN (94)(acceso: 23 de octubre de 2024)

Los criterios de filtrado y selección fueron los siguientes:

- Nombre de la molécula: kampferol, luteolina, rutina, ácido salicílico y escopoletina

- Organismo: *Homo sapiens*
- Confianza:  $p < 0.05$

## Identificación de genes sobre expresados en el osteosarcoma

Los genes sobre expresados en el osteosarcoma se identificaron mediante un análisis de la base de datos genética de las siguientes fuentes.

- GEPIA (95)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- GeneCards ® (96)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- DISGENET (97)(acceso: 23 de octubre de 2024)
- OMIM (<https://omim.org/>; acceso: 23 de octubre de 2024)
- PHARMGKB (98) (acceso: 23 de octubre de 2024)

Los criterios de filtrado fueron los siguientes:

- Nombre del cáncer: osteosarcoma
- Tipo de genes: sobre expresados
- Confianza:  $p < 0.05$

## Construcción y análisis de la red de interacción proteína-proteína

La lista de genes recogidos de los estudios “molécula-objetivos” y “genes sobre expresados” fueron relacionados mediante el uso de un diagrama de Venn (acceso: 23 de octubre 2024; <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), seleccionando los genes en común. Éstos genes se evaluaron en la base de datos de STRING (99)(acceso: 23 de octubre de 2024) con la intención de investigar los posibles objetivos terapéuticos para el osteosarcoma generando una red de interacción proteína-proteína. La red utilizó lo siguientes criterios para su evaluación:

- Especie: *Homo sapiens*
- Confianza:  $p < 0.05$

Una vez creada la red de interacción proteína-proteína, ésta se estudió y ordenó mediante el software Cytoscape 3.10.2 (100) para obtener los parámetros topológicos de cada nodo como son la centralidad de intermediación y la centralidad de cercanía. En base a estos parámetros

se llevó a cabo la agrupación de módulos de regiones altamente conectadas dentro de la red, resaltando los 10 genes centrales.

## **Enriquecimiento funcional y análisis de vías**

Los genes centrales se evaluaron mediante análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a través de la base de datos de ShinyGO v0.741(101) resaltando los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. Los criterios de filtrado fueron:

Especie: Homo sapiens

Confianza: 0.05

Número de rutas a mostrar: 10 para GO y 20 para KEGG

## **Acoplamiento molecular**

### ***Preparación del ligando***

Los ligandos utilizados para el estudio de acoplamiento molecular fueron las cinco moléculas determinadas por UHPLC-MS/MS. La estructura 3D de estas moléculas se descargaron de PubChem en formato SDF. La molécula se optimizó utilizando el programa Avogadro (102), eligiendo la herramienta Auto Optimization Tool, el campo de fuerza MMFF94s, cuatro pasos por actualización y el algoritmo Gradient Descent. La estructura optimizada se guardó en formato mol2 para evitar problemas de coordenadas.

Los ligandos se prepararon en el software AutoDockTools (103), siguiendo el protocolo propuesto por Rivzi et al (104). Brevemente, se calcularon las cargas de Gasteiger, se seleccionó y detectó la raíz en el árbol de torsión y se definieron las torsiones. Finalmente, los ligandos se guardaron en formato pdbqt.

### ***Preparación del receptor***

Para evaluar el potencial inhibitorio de las cinco moléculas, se utilizaron diferentes estrategias de acuerdo a los genes centrales obtenidos de la farmacología en red basadas en los sitios activos de cada proteína.

Los cristales se obtuvieron de la página web del RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB). En la Tabla 1 se describe cada cristal para cada variante. En todos los casos, el criterio de selección se llevó a cabo mediante la resolución de los cristales, donde se priorizan que tienen definición menor a 5.0 Å (105). Todos los cristales se guardaron en formato PDB para posteriores estudios *in silico*.

La preparación de las macromoléculas se llevó a cabo en el software AutoDockTools 1.5.6 siguiendo el protocolo propuesto por Rizvi et al (104). Brevemente, se agregaron todos los hidrógenos, se añadieron las cargas Kollman, se eliminaron las moléculas de agua y se guardaron en formato pdbqt.

**Tabla 1.** Nomenclatura y características estructurales de proteínas usadas en estudios de farmacología en red y acoplamiento molecular

<b>Proteína</b>	<b>Cristal</b>	<b>Resolución (Å)</b>	<b>Obtención</b>	<b>Referencias</b>
TP53	8F2I	5.0	Cryo-EM	(106)
AKT1	4EKK	2.8	XRD	(107)
EGFR	2GS2	2.8	XRD	(108)

### ***Interacciones y energía de enlace***

Los resultados del acoplamiento molecular se evaluaron en AutoDockTools. El cuadro de la cuadrícula para el acoplamiento molecular dependió de los genes centrales obtenidos por la farmacología en red. Un resumen de las coordenadas del cuadro de cuadrícula se muestra en la Tabla 2. Finalmente, para el acoplamiento, se realizó GA(4.2) lamarckiano.

**Tabla 2.** Tamaño del cuadro de la caja para el estudio de acoplamiento molecular

<b>Proteína</b>	<b>Puntos (x, y, z)</b>	<b>Coordenadas (x, y, z)</b>
AKT1	126, 126, 126	65.862, 3.978, 23.369
EGFR	126, 126, 126	58.686, 8.531, -25.356
TP53	126, 126, 126	43.312, 43.172, 41.872

La energía libre de enlace se calculó realizando cada estudio por triplicado en el programa AutoDockTools. La interacción con la energía libre más baja se seleccionó de las conformaciones de acoplamiento (10 conformaciones). Se utilizaron LigPlot+, Chimera y BIOVIA Discovery Studio Visualizer para dilucidar las interacciones y los residuos en 2D y 3D.

## **Nanosistema**

### **Síntesis de nanosistemas**

Para demostrar la función del extracto concentrado en la síntesis de nanopartículas, se utilizó un método químico y verde. El procedimiento para la obtención de NPs varió dependiendo el precursor utilizado, pero manteniendo como constantes la concentración del precursor (5 mM), estabilizador (20  $\mu$ l, extracto concentrado), la temperatura (24°C), y agitación (300 rpm).

### **Búsqueda de estudios de nanosistemas inorgánicos en cáncer**

Como un criterio para selección de la nanopartícula a utilizar para los estudios in vitro se elaboró una revisión de la base de datos en ScienceDirect, donde el criterio se basa en la cantidad de publicaciones totales, además de su justificación como transporte. La búsqueda Booleana fue llevada a cabo usando la combinación de “palabras clave primarias y secundarias o terciarias como se muestra en los siguientes puntos:

- Palabra clave primaria: Elemento u óxido
- Palabra clave secundaria: Nanopartícula
- Palabra clave terciaria: Tratamiento contra el cáncer

La búsqueda fue elaborada usando criterios de exclusión. El criterio de exclusión fue el siguiente:

- Búsqueda: Título, Resumen y Palabras clave
- Año: de 2000 a 2023
- Área de estudio: Ingeniería química, Ciencia de los Materiales, Medicina
- Tipo de documento: Artículo, Capítulo, y Review
- Tipo de fuente: Revista

- Idioma: inglés

## **Evaluación biológica**

### ***Ensayo de scratch***

Para el ensayo de raspado in vitro, las células de osteosarcoma MG-63 se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y se incubaron en placas de 6 pocillos a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 90-100% (109). Se realizó un raspado en la monocapa utilizando una punta de pipeta estéril de 200 µL, asegurando una presión uniforme. Las células se lavaron con PBS para eliminar los residuos, seguido de la adición de DMEM sin suero para minimizar la proliferación. Las imágenes del raspado se capturaron a las 0 horas y posteriormente a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas utilizando un microscopio invertido.

### ***Morfología***

Para la caracterización de la morfología celular mediante SEM, las células MG-63 se fijaron en cubreobjetos de vidrio y se mantuvieron durante 24 horas en una incubadora humidificada a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de las 24 horas, las células se fijaron utilizando glutaraldehído al 2.5 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por consiguiente, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se fijaron posteriormente dejándolas en el desecador por 24 horas. Después de la fijación, las células se deshidrataron mediante una serie de baños con etanol (30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 %; v/v), con un tiempo de 10 minutos en cada baño. Una vez secas, las muestras se fijaron en un portaobjetos de SEM utilizando cinta de carbono.

La obtención de imágenes se realizó con un SEM (Tescan-Lyra3) a un voltaje de aceleración de 15 kV y distancia de trabajo de 9 mm para visualizar la morfología de la superficie de las células fijadas.

# Capítulo 4 Resultados y discusión

## Información de la planta

En el estado de Baja California, especialmente en el municipio de Ensenada, existe una planta que ha disparado su fama en los últimos años por las propiedades medicinales que se le atribuyen. Conocida comúnmente como moronel, esta planta es fácil de encontrar en los municipios de Baja California, ya sea en forma de infusiones o concentrados, disponibles en una amplia variedad de presentaciones, desde pequeños goteros hasta envases de varios litros. También es común ver a la venta la planta recién cortada o seca, representando un gran peligro para la biodiversidad de la región.

Si nos remitimos a los antecedentes históricos, esta planta era de importancia para los pueblos indígenas de la región, especialmente para los Kumiai. De acuerdo a Wilken-Robertson, los Kumiais nombraron a esta planta “KUAK UYULH” que tendría como traducción “el venado juega ahí con sus astas” puesto que, de acuerdo a los Kumiai, los venados se valían del arbusto del moronel para remover el terciopelo de sus astas (110). Seguramente, refiriéndose a los venados Bura (*Odocoileus hemionus*). También, si observamos y tocamos las hojas, notaremos que tienen una textura aterciopelada, haciendo referencia a la cornamenta del venado.

En el pasado, los Kumiai utilizaban el moronel para diversos padecimientos, especialmente la fiebre. A diferencia de las aplicaciones que se buscaban en la antigüedad, actualmente el moronel se le atribuyen propiedades para el tratamiento de enfermedades más complejas, como son la diabetes y el cáncer.

Por estos antecedentes etnobotánicos, la demanda actual, y el peligro que está corriendo la planta, se ha decidido englobar esta tesis para su causa. Y, a su vez, estandarizar un protocolo de análisis y caracterización para próximas plantas.

## Identificación botánica

La recolección de hojas y su estudio químico se ha realizado por una planta que se ha ambientado en el invernadero del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja

California. Esta planta desde su llegada se le ha llamado moronel, pero fue necesario la aplicación de protocolos botánicos para confirmar si se trataba de la planta con historia etnobotánica.

De manera vulgar, la planta se le han asignado diferentes nombres, los más usados son moronel, madreSelva o planta de la vida. Desafortunadamente, si nos guiamos únicamente por el nombre más usado (moronel), la identificación botánica no es clara y la credibilidad se ve reducida con la modalidad más común de encontrar, que son los troncos. La única referencia clara para su identificación rápida es proporcionada por Wilken-Robertson, el cual la identifica como *Lonicera subspicata* var. *denudata* (110).

Es conocido que el género *Lonicera* es amplio y se extiende en la región donde fue obtenida la planta (Ensenada, Baja California, México). Entre las especies que se encuentran en California y Baja California son *L. hispídula*, *L. interrúpta*, *L. involucrata*, *L. japónica*, y *L. suspicata*, por lo que fue imprescindible confirmar de qué planta se trataba (111).

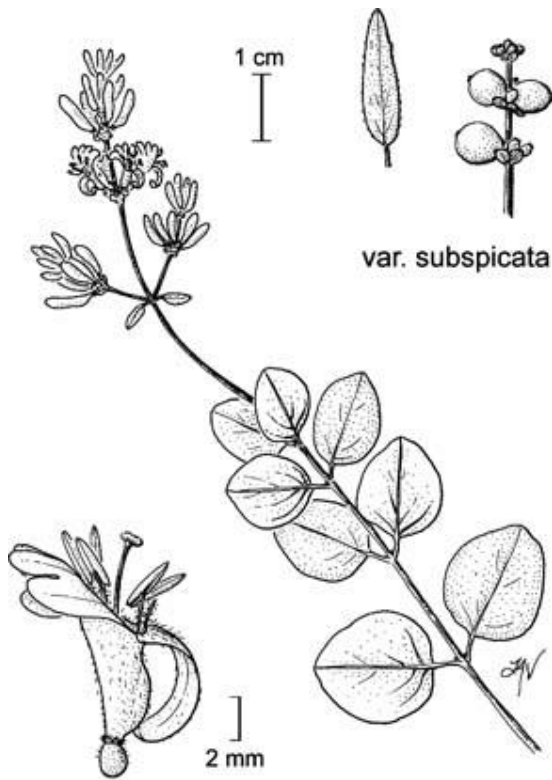
La descripción de la planta se llevó a cabo comparando las descripciones de los libros “A Flora of Southern California” y “The Jepson Manual Vascular Plants of California” como se ha descrito en el Capítulo de Metodología (111,112). Los resultados de la caracterización morfológica son mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Resultados morfológicos de la planta bajo estudio

<b>Características</b>	<b>Descripción</b>
<b>Hábito</b>	Gen entrelazado o reclinado sobre arbustos, 9-24dm, forraje glabro a puberulento
<b>Hoja</b>	
Forma	Elíptica ancha a redonda
Tamaño	<2cm más larga que ancha
<b>Inflorescencia</b>	Espiga, larga, interrumpida, glandular-pilosa
<b>Flores</b>	
Tamaño	8-12mm
Color	Amarillo pálido

<b>Otros</b>	Peluda, con estambres, 2 labios y estigma ejercido
<b>Fruta</b>	
<b>Tamaño</b>	8mm
<b>Color</b>	Amarilla o roja
<b>Distribución</b>	California y Baja California (Chaparral; <1800m)

De acuerdo a las características morfológicas y distribución, el nombre científico del moronel es *Lonicera subspicata* var *Johnstonii* (Figura 20).



**Reino:** vegetal  
**Filo:** traqueofitas  
**Clase:** dipsacales  
**Orden:** dispsacales  
**Familia:** caprofoliaceas  
**Género:** lonicera  
**Especie:** lonicera subspicata  
**Variante:** johnstonii  
**Nombre común:** Moronel o chaparral honeysuckle

*Lonicera subspicata* var. *denudata*  
 © Regents of the University of California

**Figura 20.** Ilustración botánica y taxonomía de *Lonicera suspicata* var. *denudata*, var. *subspicata* y var. *Jhonstonii*

## Extracción

Con la identificación de la planta, se prosiguió al estudio químico de sus compuestos. Como se explicó con anterioridad, se utilizan todas las partes del arbusto en forma de infusiones. Por las condiciones particulares del invernadero, no fue posible el estudio de las flores y el fruto, por lo que se optó por el estudio de las hojas. De igual manera, se ha comprobado que, la composición química de las diferentes partes del género *Lonicera* es similar, encontrándose mayor cantidad en las hojas.

En base al protocolo establecido en la metodología, la muestra final es un extracto concentrado. Con la repetición por triplicado del extracto concentrado se obtuvo que la obtención de extracto concentrado por 100g de hojas es  $2.71 \pm 0.56$  g.

## Barrido fitoquímico

El barrido fitoquímico ofrece los primeros indicios sobre los compuestos presentes en *Lonicera subspicata var johnstonii*. La Tabla 4 muestra que el extracto acuoso de las hojas es rico en diversos metabolitos, incluidos alcaloides, compuestos fenólicos, terpenoides, y saponinas. Sin embargo, algunos ensayos arrojaron resultados negativos debido a que se enfocan en compuestos muy específicos, como las quininas y antraquinonas, o en sustancias típicas de plantas con colores llamativos, como las antocianinas. Estas características no están presentes en la planta bajo estudio.

En el caso de los alcaloides, si bien, es un grupo de metabolitos secundarios más importantes en las plantas, no es usual encontrarlo en el género *Lonicera*. Yu et al. (113) encontró 3 alcaloides en una extracción etanólica de las hojas de *Lonicera japonica* bajo los nombres de (5R, 6R)-5-(1,2-dihydroxyethyl)-[3,3'-bioxazolidine]-2,2'-dione, (5S, 6R)-5-(1,2-dihydroxyethyl)-[3,3'-bioxazolidine]-2,2'-dione, y (2S)-6-(hydroxymethyl)pyridin-3-yl 2,3-dihydroxypropanoate. Por su parte, Khan et al. (114) encontraron dos alcaloides de furucarbazol por medio de una fracción de acetato de etilo proveniente de las hojas de *Lonicera quinquelocularis*.

En el caso de los compuestos fenólicos, está demostrado que es el grupo de los metabolitos secundarios con mayor riqueza en el género *Lonicera* (115). En la actualidad, hay diversos

estudios que han identificado y cuantificado una amplia variedad de compuestos fenólicos como son falvonoides, flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, y biflavonoides.

**Tabla 4.** Ensayo y resultados del barrido fitoquímico

<b>Metabolitos</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Extracto acuoso</b>
Alcaloides	Wagner	-
	Hager	+
	Ácido tánico	+
Flavonoides	NaOH	-
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+
	NH <sub>4</sub> OH	+
Saponinas	Froth	+
Fenoles	Brayer	+
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+
Esteroides	Salkowski	-
Antraquinonas	Borntrager	-
Glucósidos cardiacos	Keller-Killani	+
Quinona	NaOH	-
	HCl	-
Antocianinas	Antocianinas	-
Carbohidratos	Benedict	+

De igual manera, los terpenoides, terpenos y sesquiterpenos se encuentran en abundancia en el género *Lonicera*, por lo que, su resultado en el barrido fitoquímico era esperado (116).

Las saponinas son metabolitos secundarios complejos, siendo glucósidos de esteroides o glucósidos de triterpenoides. Corroborando lo obtenido en el barrido fitoquímico, las saponinas identificadas en el género *Lonicera* han sido de triterpenoides (117,118).

## Cromatografía





Con afán de precisar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso del moronel, se realizaron estudios de cromatografía de capa fina y cromatografía de columna. Las fracciones obtenidas se analizaron por FTIR.



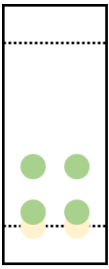
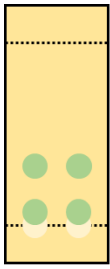

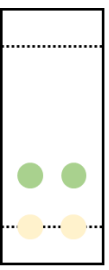
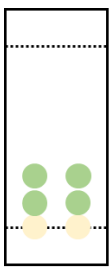
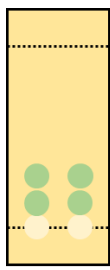
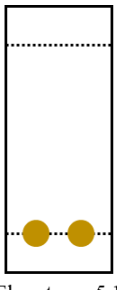
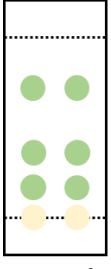
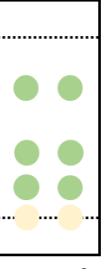

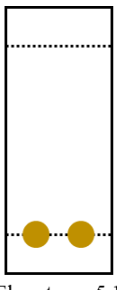
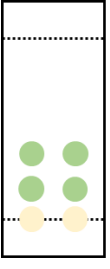
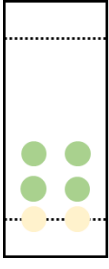
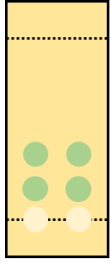
### Cromatografía de capa fina

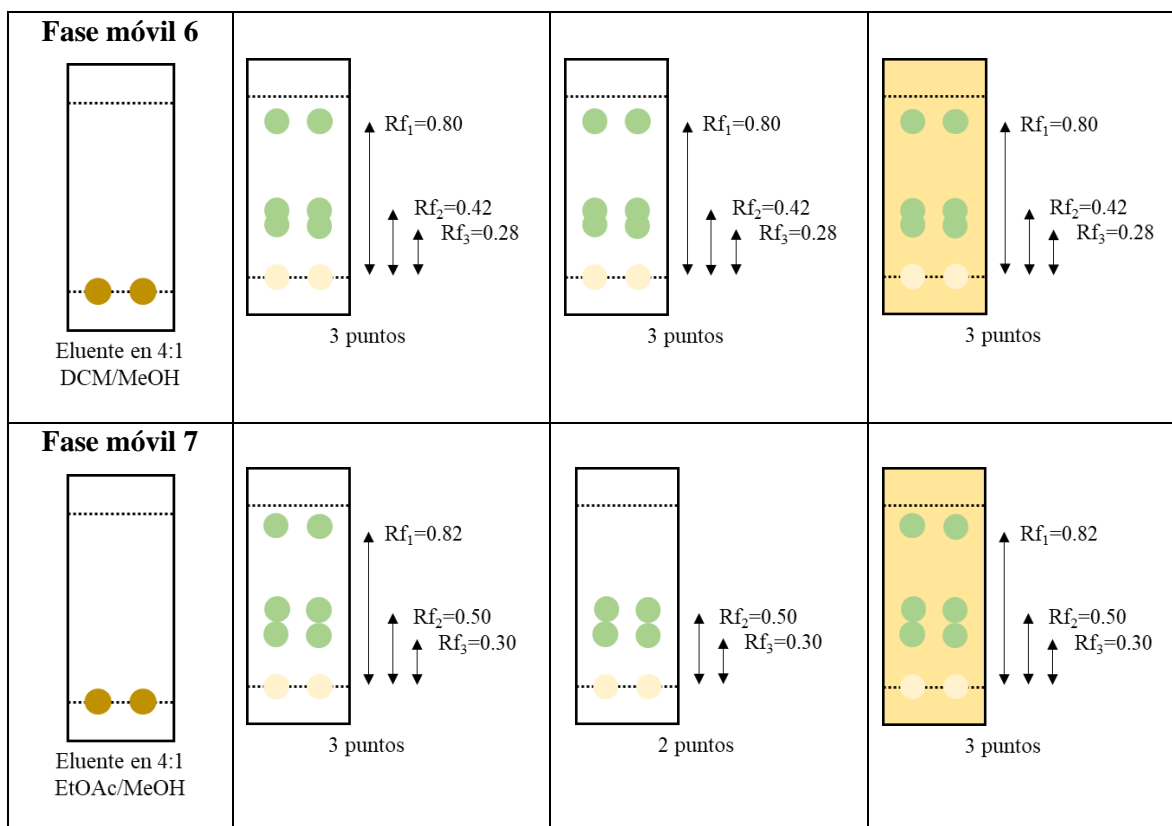
Como se mencionó en el Capítulo II, la estrategia en la separación cromatográfica consistió en realizar mezclas de solventes partiendo de los no polares a los polares. Como se observa en la Tabla 5, en total se usaron 6 eluentes, los cuales, a partir del eluyente 2 se observaron separación de compuestos observables bajo la luz UV-B y la cámara de yodo. No obstante, la posición de los compuestos separados no fue óptima. La separación se logró mejorar con el uso de una fase móvil completamente polar (fase móvil 7), obteniéndose 3 compuestos con factor de retención 0.32, 0.5, 0.82.

La separación de los compuestos basada en el factor de retención, la fase móvil utilizada y la técnica de revelado permite acotar los fitocompuestos que podrían estar involucrados en la posterior síntesis del nanosistema y evaluación biológica. Bajo luz UV-A y UV-B, se pueden observar claramente metabolitos secundarios aromáticos, como las cumarinas y los estilbenos (119). Al utilizar la cámara de yodo, se revela un amplio espectro de metabolitos secundarios que contienen grupos funcionales como alquenos, fenoles y carboxilos, lo que facilita la identificación de compuestos clave en el proceso.

**Tabla 5.** Registro y resultados del estudio de TLC

	UV-A	UV-B	Yodo
<b>Fase móvil 1</b>  Eluyente en 1:1 DCM/EtOAc	 No se observa separación	 No se observa separación	 No se observa separación

<p><b>Fase móvil 2</b></p>  <p>Eluente en 9:1 DCM/MeOH</p>	 <p>No se observa separación</p>	 <p><math>Rf_1=0.34</math> <math>Rf_2=0.085</math></p> <p>2 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.34</math> <math>Rf_2=0.085</math></p> <p>2 puntos</p>
<p><b>Fase móvil 3</b></p>  <p>Eluente en 9:1 EtOAc/MeOH</p>	 <p><math>Rf_1=0.21</math></p> <p>1 punto</p>	 <p><math>Rf_1=0.21</math> <math>Rf_2=0.12</math></p> <p>2 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.21</math> <math>Rf_2=0.12</math></p> <p>2 puntos</p>
<p><b>Fase móvil 4</b></p>  <p>Eluente en 5:1 DCM/MeOH</p>	 <p><math>Rf_1=0.62</math> <math>Rf_2=0.34</math> <math>Rf_3=0.22</math></p> <p>3 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.62</math> <math>Rf_2=0.34</math> <math>Rf_3=0.22</math></p> <p>3 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.62</math> <math>Rf_2=0.34</math> <math>Rf_3=0.22</math></p> <p>3 puntos</p>
<p><b>Fase móvil 5</b></p>  <p>Eluente en 5:1 EtOH/MeOH</p>	 <p><math>Rf_1=0.29</math> <math>Rf_2=0.20</math></p> <p>2 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.29</math> <math>Rf_2=0.20</math></p> <p>2 puntos</p>	 <p><math>Rf_1=0.29</math> <math>Rf_2=0.20</math></p> <p>2 puntos</p>



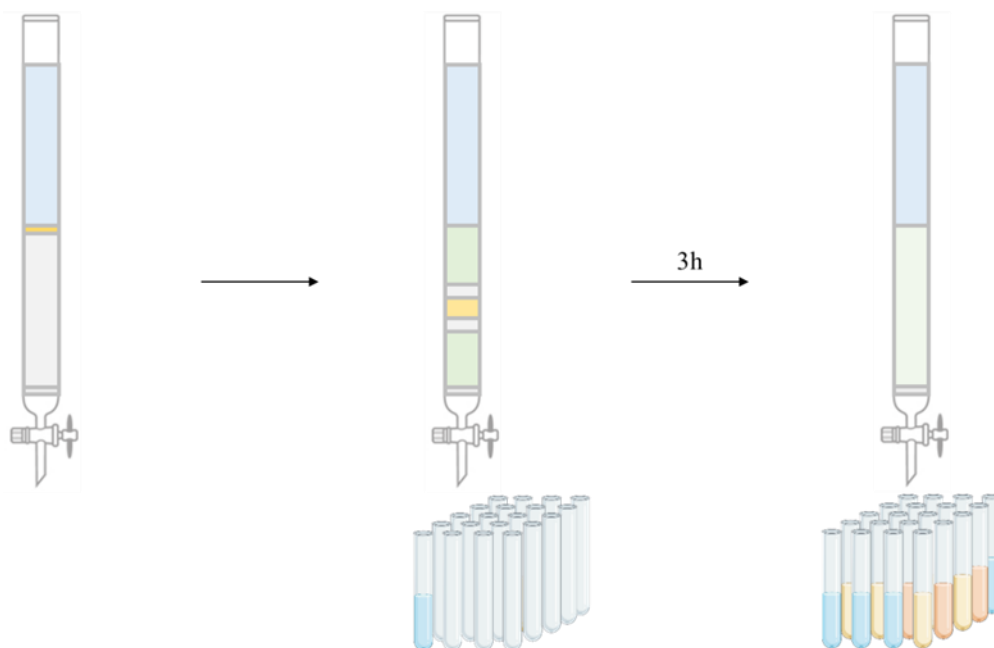
## Cromatografía de columna

La optimización y la correcta separación en la cromatografía de capa fina fueron fundamentales para la implementación exitosa de la cromatografía de columna. El objetivo del fraccionamiento del extracto es obtener la cantidad suficiente de cada fracción para su posterior caracterización mediante FTIR.

El fraccionamiento de compuestos duró un total de 3h. En estas tres horas, se recuperaron 22 tubos con un contenido aproximado de 10ml. Cada tubo fue evaluado por cromatografía de capa fina para juntar los tubos que tuvieran mismo factor de retención. De los 22 tubos iniciales se obtuvieron 4 muestras, siendo los tubos mezclados los siguientes:

- Mezcla 1: tubos del 4 al 6
- Mezcla 2: tubos del 8 al 10
- Mezcla 3: tubos del 11 al 13
- Mezcla 4: tubos del 14-22

Con los tubos mezclados, se prosiguió con la caracterización por FTIR. Los espectros FTIR para cada una de las muestras son mostrados en la Figura 21.



**Figura 21.** Proceso de obtención de fracciones por CC

### ***Caracterización de las fracciones***

El análisis FTIR del extracto de la planta y sus fracciones revela información clave sobre los grupos funcionales presentes en cada uno, por ende, los metabolitos presentes en la fracción. En general, los grupos funcionales y la huella digital muestran que las fracciones son parecidas, sólo visible la diferencia con un análisis detallado a cada banda (Tabla 6 y Figura 22 a-e).

Las bandas de estiramiento O-H ( $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ) presentes en todas las muestras sugiere una cantidad significativa de compuestos que contienen hidroxilo, como fenoles, alcoholes o ácidos carboxílicos. Esto es consistente con los análisis de composición de las plantas del género *Lonicera*, que a menudo contienen compuestos fenólicos (120).

Las bandas de estiramiento C-H alrededor de  $2930\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  tanto en el extracto de la planta como en las fracciones indican la presencia de hidrocarburos alifáticos, como terpenos, terpenoides y saponinas. Compuestos antes identificados en la planta debido al barrido fitoquímico del extracto (117,118).

La aparición de fuertes bandas de estiramiento C=O ( $1700\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ ) en las fracciones 4-6, 8-10 y 11-13 sugiere la presencia de compuestos que contienen carbonilo, como aldehídos, cetonas, ésteres o ácidos carboxílicos, complementando las bandas de estiramiento O-H.

Las bandas de estiramiento C=C alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  en el extracto de la planta y las fracciones sugieren la presencia de anillos aromáticos, que podrían ser indicativo de compuestos polifenólicos como flavonoides (121). Estos compuestos son conocidos por sus propiedades antioxidantes y sus posibles beneficios terapéuticos, en consonancia con los usos medicinales tradicionales de las plantas del género *Lonicera* (122).

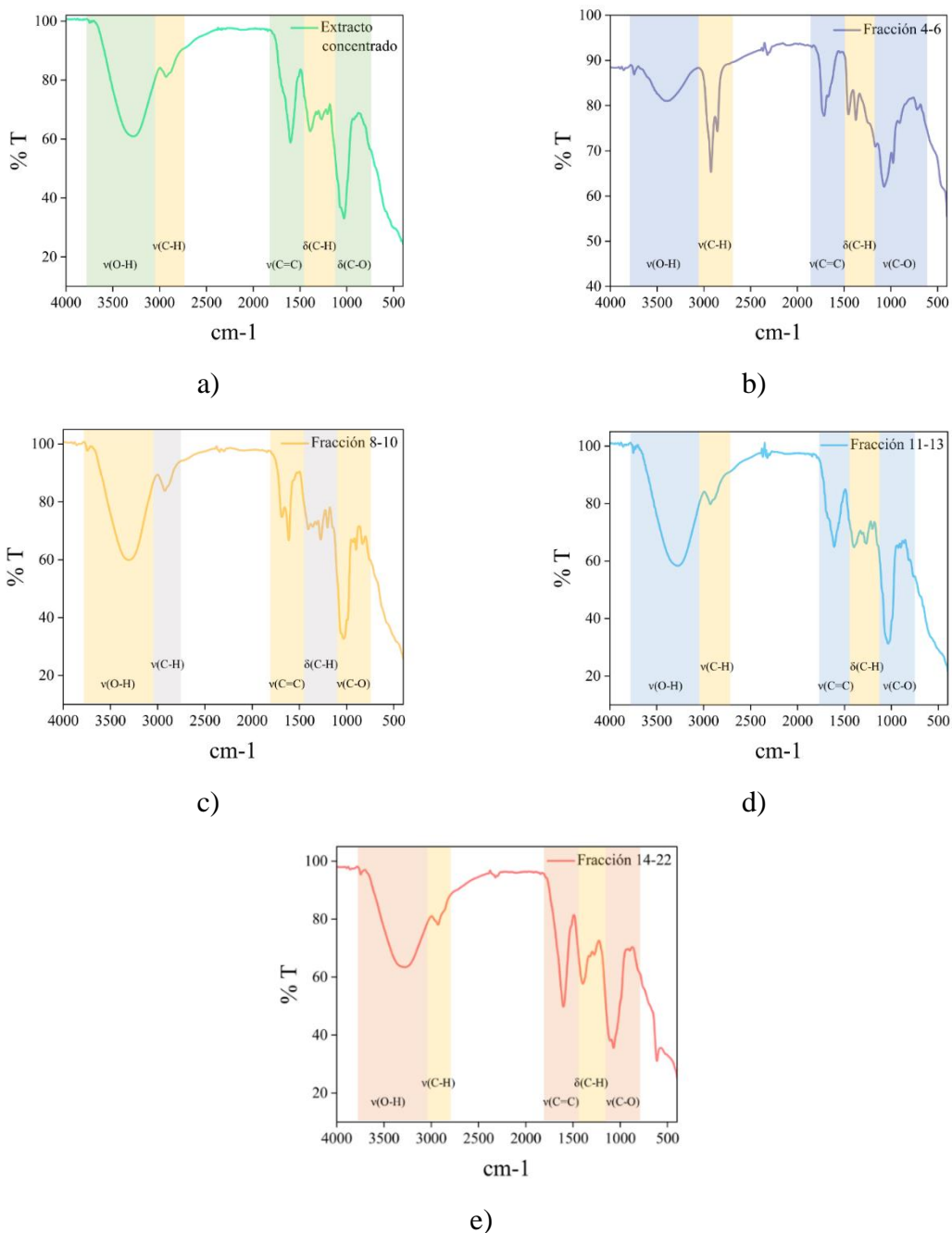
La presencia de bandas de estiramiento de C-O ( $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ) en todas las fracciones, particularmente en el extracto de la planta y las fracciones 4-6 y 8-10, sugiere la presencia de alcoholes, éteres o carbohidratos de estiramiento C=O.

**Tabla 6.** Bandas y asignaciones de espectros por FTIR de las fracciones obtenidas por CC

Extracto cm-1	F 4-6 cm-1	F 8-10 cm-1	F 11-13 cm-1	F 14-22 cm-1	Asignación
3288	3400	3302	3272	3294	v(O-H); alcoholes, fenoles, y ácidos carboxílicos
2932	2924	2926	2930	2932	vs(C-H); alcanos
2874	2856	2874	2874	-	vas(C-H); grupos metilo
-	1714	1684	1680	-	v(C=O); aldehídos, cetonas, ésteres o ácidos carboxílicos
1604	-	1614	1610	1606	v(C=C); anillos aromáticos o alquenos
-	1456	-	-	-	$\delta$ (C-H); hidrocarburos alifáticos
1388	1374	1404	1406	1398	$\delta$ (C-H); grupos metilo
1270	-	1280	1264	-	v(C-O); ésteres, éteres o ácidos carboxílicos
1028	1072	1044	1038	1070	v(C-O); carbohidratos o éteres

En resumen, los espectros FTIR indican que el extracto de la planta contiene una amplia gama de grupos funcionales, incluidos hidroxilo, carbonilo y compuestos aromáticos, que los vuelven potenciales en la síntesis de nanosistemas y en actividades biológicas. Las fracciones muestran ciertas variaciones en la intensidad de estos grupos funcionales, lo que sugiere

diferencias en su composición química, siendo algunas fracciones más ricas en compuestos carboxílicos (en fracciones 4-6 y 8-10), mientras que otras muestran un mayor contenido aromático o de hidroxilo (en fracciones 11-13 y 14-22).



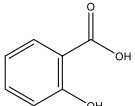
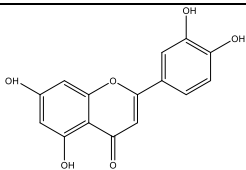
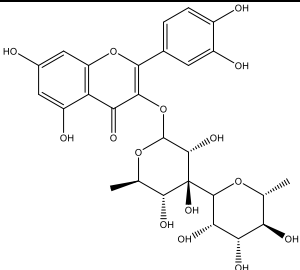
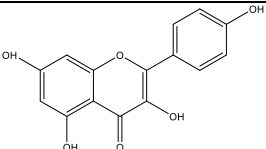
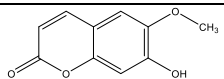
**Figura 22.** Espectros por FTIR de las fracciones obtenidas por CC: a) extracto concentrado; b) fracción 4-6; c) fracción 8-10; d) fracción 11-13; e) fracción 14-22

## UHPLC-MS/MS

En base a los resultados de barrido fitoquímico, cromatografía de capa fina, cromatografía de columna, y FTIR se demostró que el moronel es rico principalmente en compuestos fenólicos. Por lo que, se priorizó la identificación y cuantificación de éstos.

El uso del UHPLC-MS/MS estuvo limitado a un número de muestras fijo, el tiempo del uso del equipo y la disponibilidad de estándares en el laboratorio. Por lo que, se decidió enfocarse en compuestos fenólicos, ya que, es el grupo más estudiado en el género *Lonicera*, y, sobre todo, el grupo más empleado para evaluaciones en cáncer. Las moléculas propuestas y algunas de sus características fisicoquímicas se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Parámetros fisicoquímicos de moléculas elegidas para el estudio de LC-MS/MS

Molécula	Peso molecular (g/mol)	LogP	Estructura
Ácido 2-hidroxibenzoico	138.12	1.13	
Luteolina	286.24	1.86	
Rutina	610.51	1.58	
Kaempferol	286.23	1.70	
Escopolotina	192.16	1.86	

Las elecciones de moléculas están tomadas en base a la importancia de éstos metabolitos secundarios en sus respectivos grupos y sus antecedentes en el cáncer. Algunas características se describen en los siguientes párrafos.

Ácido salicílico: es un ácido fenólico que reduce la producción de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, que están vinculadas al desarrollo del cáncer. Además, los estudios sugieren que los derivados del ácido salicílico pueden ralentizar el crecimiento tumoral y prevenir la aparición de ciertos tipos de cáncer (123,124).

Luteolina: es un flavonoide ampliamente reconocido por sus propiedades anticancerígenas. Se ha demostrado que induce la apoptosis (muerte celular programada) e inhibe la proliferación de células cancerosas, particularmente en cánceres de mama, próstata y colon (125,126). La luteolina también interfiere con las vías de señalización clave involucradas en la progresión del cáncer, como las vías NF- $\kappa$ B y MAPK, y actúa como antioxidante, reduciendo el estrés oxidativo en las células cancerosas (127).

Scopoletina: es una cumarina que ejerce efectos anticancerígenos al modular la respuesta inmunitaria e inducir la apoptosis en las células cancerosas. Ha demostrado actividad contra múltiples líneas celulares cancerosas, incluidos los cánceres de mama, hígado y pulmón, al interferir con la regulación del ciclo celular y promover el estrés oxidativo en las células cancerosas (128,129).

Rutina: un flavonoide glucósido que tiene fuertes propiedades antioxidantes y protege contra el daño del ADN causado por el estrés oxidativo. También exhibe efectos citotóxicos en las células cancerosas y puede mejorar la eficacia de otros agentes anticancerígenos a través de su acción antiinflamatoria y la modulación de los genes supresores de tumores (130,131).

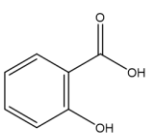
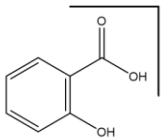
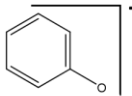
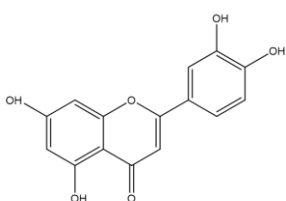
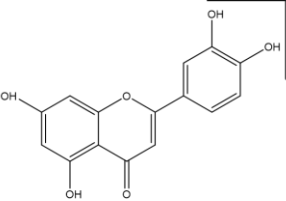
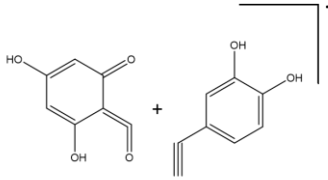
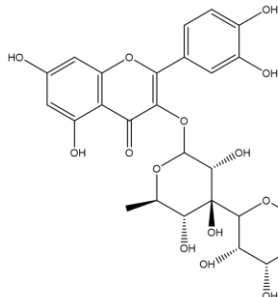
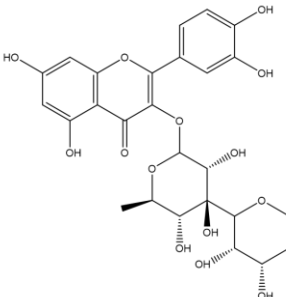
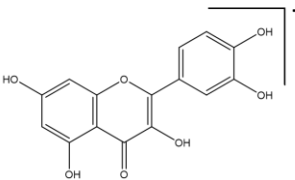
Kaempferol: un flavonoide conocido por su capacidad para inhibir el crecimiento y la propagación de varios tipos de cáncer, incluidos los de hígado, mama y ovario (132). Actúa dirigiéndose a múltiples vías relacionadas con el cáncer, como la supresión de la vía PI3K/Akt y la promoción de la apoptosis (133).

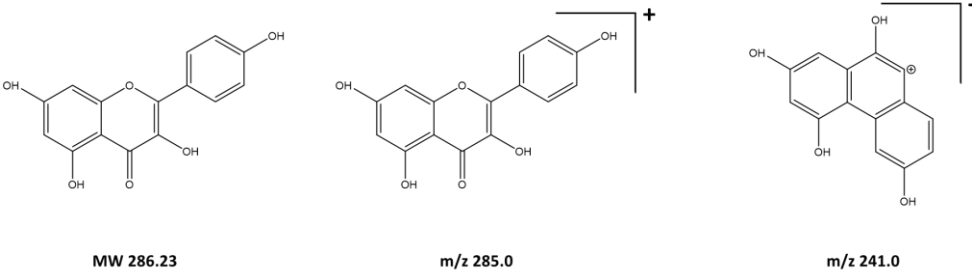
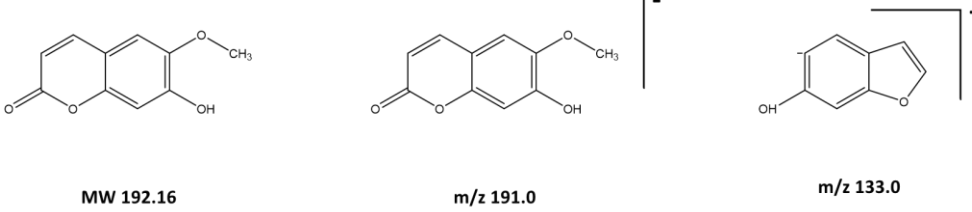
## **Optimización del MS/MS**

La fuente MS se seleccionó de acuerdo con el peso molecular y la polaridad de los compuestos probados. Con excepción de la rutina, todas las moléculas tienen un peso molecular bajo. No obstante, el peso molecular de la rutina todavía está en el rango de la fuente ESI. Por esta razón, seleccionamos esta fuente.

Probamos las moléculas en modo negativo; sin embargo, según las referencias, el kaempferol se prueba generalmente en modo positivo como se muestra en la Tabla 8. Utilizamos tres tipos de escaneos para determinar la masa exacta y los fragmentos en los espectros MS. En general, utilizamos los modos Q1 scan, Q3 scan y Product Ion scan. Los resultados de la masa exacta y los fragmentos se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Iones producto y fragmentos teóricos de los estándares seleccionados para estudio de LC-MS/MS

 <p>MW 138.12</p>	 <p>m/z 137.1</p>	<p style="text-align: center;">-CO<sub>2</sub></p>  <p>m/z 93.1</p>	(134)
Ácido 2-hidroxibenzoico			
 <p>MW 286.24</p>	 <p>m/z 285.0</p>	 <p>m/z 133.0</p>	(135)
Luteolina			
 <p>MW 610.51</p>	 <p>m/z 609.0</p>	 <p>m/z 301.0</p>	(136)
Rutina			

 <p>MW 286.23                      m/z 285.0                      m/z 241.0</p>	(137)
<b>Kaempferol</b>	
 <p>MW 192.16                      m/z 191.0                      m/z 133.0</p>	(138)
<b>Escopoletina</b>	

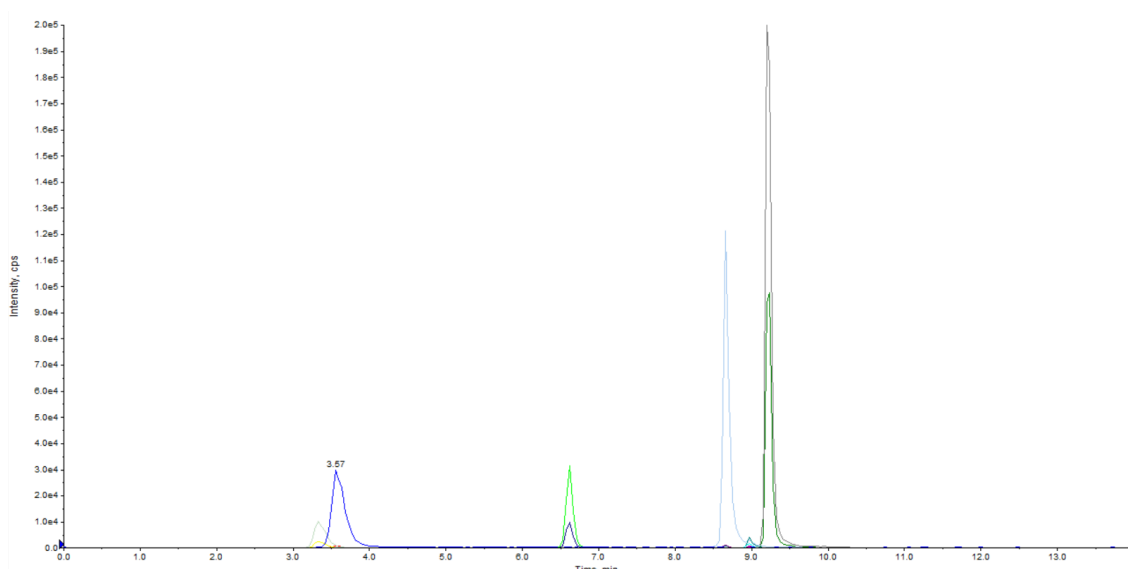
Al comparar los picos de los espectros MS de Q1 y Q3, observamos que los picos corresponden a los fragmentos potenciales que se muestran en la Figura 23. Este resultado confirma que los parámetros establecidos en el MS y el uso del modo negativo en la fuente ESI fueron apropiados para analizar estas moléculas.

**Tabla 9.** Resultado de iones producto y fragmentos por MS/MS

Molécula	Q1	Q3
Ácido salicílico	137.10	93.10
Luteolina	285.10	133.10
Rutína	609.10	300.10
Kaempferol	285.10	239.10
Escopoletina	191.10	148.10

## Optimización del UHPLC

De la mano con una buena cuantificación de las moléculas seleccionada va con la separación y definición de los picos en el cromatograma. La Figura 23 muestra que los cinco compuestos analizados tienen una definición, separación e intensidad apropiadas para la correcta cuantificación, debido a que, ésta se lleva a cabo al analizar el área bajo los picos.



**Figura 23.** Cromatograma de las moléculas seleccionadas para estudios LC-MS/MS

## Cuantificación

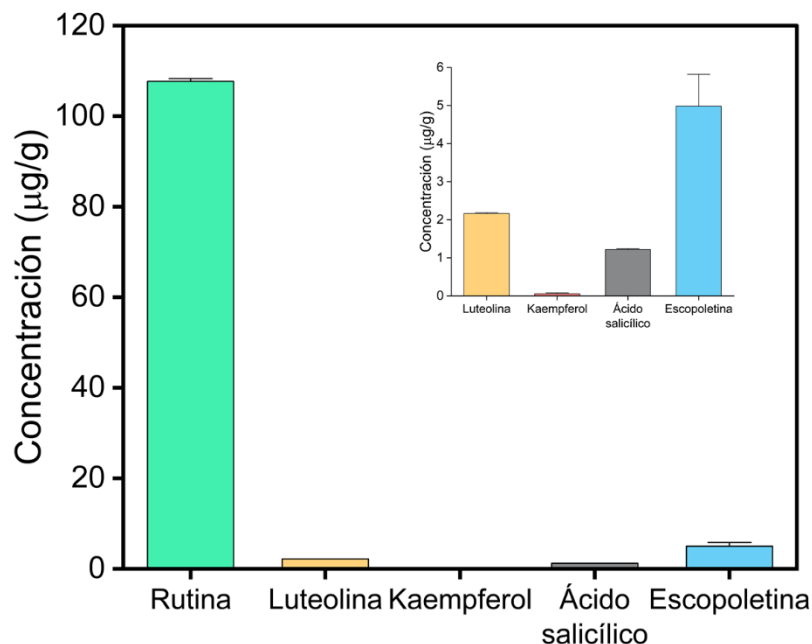
Como se ha comentado anteriormente, estudios previos han demostrado el alto contenido de compuestos fenólicos en el género *Lonicera* (115,120). En nuestro estudio (Figura 24 y Apéndices 22 y 23), el contenido de rutina ( $107.71 \pm 0.87 \mu\text{g/g}$ ) fue considerablemente mayor que el de las otras moléculas, seguido en concentración la escopoletina ( $4.98 \pm 1.18 \mu\text{g/g}$ ), luteolina ( $2.16 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ ), ácido salicílico ( $1.22 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ) y kaempferol ( $0.05 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ ) (Figura X).

La alta concentración de rutina es consistente con otros estudios del género *Lonicera*. Sip et al. en su estudio en las hojas de *Lonicera caerulea L.* determinó una concentración de rutina entre 125 y 879  $\mu\text{g/g}$  de hoja; una concentración similar a nuestro estudio (139). De igual manera, la concentración de escopoletina en nuestra planta es consistente con otro estudio. Feng et al. encontró una concentración de 36.47  $\mu\text{g/g}$  de hoja en *Lonicera hypoglauca Miq.* y 0.09  $\mu\text{g/g}$  de hoja en *Lonicera dasystyla via.* (140).

La luteolina es otra molécula que ha sido determinada en *Lonicera japónica*. Lee et al. determinaron la concentración entre 0.09 y 0.21  $\mu\text{g/g}$  (141). La concentración de ácido salicílico no pudo ser comparada, ya que no existen estudios previos en el género *Lonicera*. No obstante, debido al efecto antioxidante de las moléculas de este género y a la

identificación del ácido p-cumárico en estudios previos, una molécula precursora en la ruta metabólica del ácido salicílico, su determinación no es inusual (120,142).

Por último, la molécula en menor contenido fue el kaempferol. Con la misma tendencia que el ácido salicílico, el kaempferol es una molécula que no ha sido estudiada para éste género, pero resulta interesante, ya que, como se mencionó en el Capítulo II, es prometedora para el tratamiento contra el cáncer.



**Figura 24.** Concentración de ácidos fenólicos de las hojas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii*

## Síntesis de nanopartículas

En términos generales, la síntesis de nanosistemas se puede dividir en dos, tomando en cuenta si se parte de un material en escala macrométrica (top-down) o a partir de sales (bottom-up) (143). En las subdivisiones se encuentra la síntesis verde, la cual se aprovecha el repertorio de compuestos presentes en organismos como plantas y fungi. En esta tesis se centró únicamente en la síntesis a partir de sales inorgánicas usando los fitocompuestos del extracto acuoso concentrado de las hojas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii*.

La Figura 25 muestra los elementos los cuales se logró la obtención de nanopartículas. Cabe resaltar que, y como se muestra en la Tabla 10, las nanopartículas resultantes fueron en estado elemental u óxido, lo cual es un resultado sumamente interesante.

1																	18		
1																	2		
H 1.01																	He 4.00		
3	2													13	14	15	16	17	18
Li 6.94	Be 9.01													B 10.81	C 12.01	N 14.01	O 16.00	F 19.00	Ne 20.18
11	12													13	14	15	16	17	18
Na 22.99	Mg 24.31													Al 26.98	Si 28.09	P 30.97	S 32.07	Cl 35.45	Ar 39.95
19	20	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
K 39.10	Ca 40.08	Sc 44.96	Ti 47.87	V 50.94	Cr 51.99	Mn 54.94	Fe 55.85	Co 58.93	Ni 58.69	Cu 63.55	Zn 65.38	Ga 69.72	Ge 72.63	As 74.92	Se 78.97	Br 79.90	Kr 83.80		
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54		
Rb 85.47	Sr 87.62	Y 88.91	Zr 91.22	Nb 92.91	Mo 95.95	Tc 98.91	Ru 101.07	Rh 102.91	Pd 106.42	Ag 107.87	Cd 112.41	In 114.82	Sn 118.71	Sb 121.76	Te 127.6	I 126.90	Xe 131.29		
55	56	57-71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86		
Cs 132.91	Ba 137.33		Hf 178.49	Ta 180.95	W 183.84	Re 186.21	Os 190.23	Ir 192.22	Pt 195.09	Au 196.97	Hg 200.59	Tl 204.38	Pb 207.2	Bi 208.98	Po [208.98]	At 209.99	Rn 222.02		
87	88	89-103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118		
Fr 223.02	Ra 226.03		Rf [261]	Db [262]	Sg [266]	Bh [264]	Hs [269]	Mt [278]	Ds [281]	Rg [280]	Cn [285]	Nh [286]	Fl [289]	Mc [289]	Lv [293]	Ts [294]	Og [294]		
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71					
La 138.91	Ce 140.12	Pr 140.91	Nd 144.24	Pm 144.91	Sm 150.36	Eu 151.96	Gd 157.25	Tb 158.93	Dy 162.50	Ho 164.93	Er 167.26	Tm 168.93	Yb 173.06	Lu 174.97					
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103					
Ac 227.03	Th 232.04	Pa 231.04	U 238.03	Np 237.05	Pu 244.06	Am 243.06	Cm 247.07	Bk 247.07	Cf 251.08	Es [254]	Fm 257.10	Md 258.1	No 259.10	Lr [262]					

**Figura 25.** Elementos de sales precursoras a partir de los cuales se obtuvieron NPs

Diversos parámetros fisicoquímicos están involucrados en la reducción y oxidación de los elementos. Parámetros como las sales empleadas, el pH de la solución, y la temperatura. No obstante, el término potencial óxido-reducción es el primero que debemos basarnos para explicar por qué unas nanopartículas se encuentran en forma de óxido y otras cero-valentes (144). El potencial óxido-reducción se define como la tendencia de un reactivo a oxidarse o reducirse. También es importante mencionar que durante la reacción existen productos intermedios, los cuales cambian las propiedades fisicoquímicas en la solución (145,146).

Por lo tanto, las sales de cualquier elemento, al ser disociadas en iones, éstos iones se encuentran en un estado específico, lo cual, es necesaria una cantidad específica de energía para cambiar este estado. Agentes con estas cualidades son llamados agentes reductores si tienen la capacidad de reducir o agentes oxidantes si tienen la capacidad de oxidar. No obstante, en esta tesis también se hizo énfasis en la obtención en estado coloidal de cada una de las nanopartículas, por lo tanto, el otro agente de importancia es el agente estabilizador.

**Tabla 10.** Descripción y funcionamiento del extracto en la síntesis de NPs

<b>Elementos</b>	<b>Precursores</b>	<b>Función del extracto concentrado (R o E)</b>	<b>Estado de la nanopartícula</b>
Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Estabilizador	MgO
Mn	MnCl <sub>2</sub>	Estabilizador	MnO <sub>2</sub>
Fe	FeCl <sub>3</sub>	Estabilizador	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
V	VOSO <sub>4</sub>	Reductor y estabilizador	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Cu	CuSO <sub>4</sub>	Reductor y estabilizador	Cu
Zn	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Reductor y estabilizador	ZnO <sub>2</sub>
As	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Estabilizador	As
Se	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Reductor y estabilizador	Se
Ag	AgNO <sub>3</sub>	Reductor y Estabilizador	Ag
Pt	H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> ·(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	Estabilizador	Pt
Au	HAuCl <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Estabilizador	Au
Ce	Ce(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Estabilizador	CeO <sub>2</sub>

En teoría, cuando se emplea la síntesis verde por fitocompuestos, la mayoría de publicaciones habla de que el extracto funciona como un agente reductor y estabilizador, y todo esto depende de los fitocompuestos de la planta, el método de preparación empleado, y tiempo de reacción (147,148). En esta tesis, de las doce sales empleadas, el extracto concentrado actuó como agente reductor y estabilizador en seis casos. En los seis restantes, el extracto concentrado funcionó únicamente como estabilizador.

Este resultado abre un debate respecto a lo mencionado en la literatura. Generalmente, cuando se habla de síntesis verde, al extracto, se le asigna el rol de agente reductor y estabilizador. Sin embargo, esta función depende de diversos medios, como son la

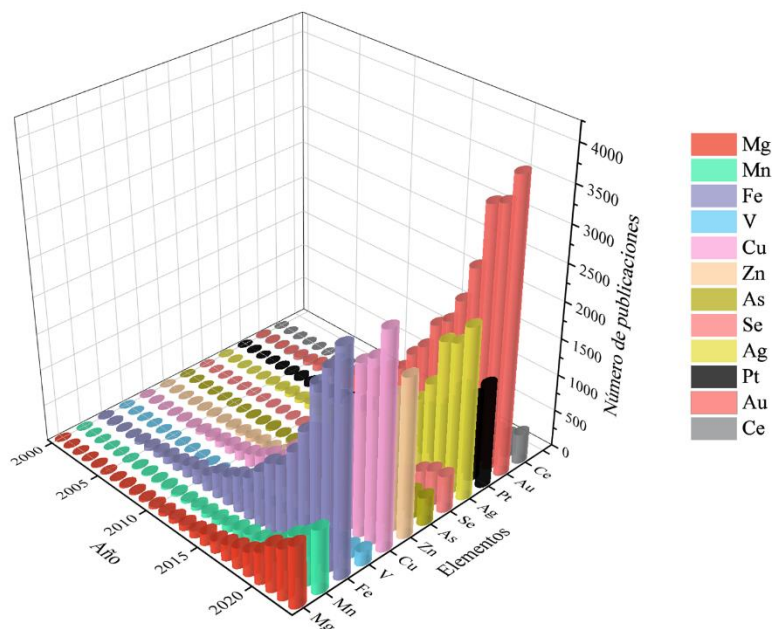
estrategia/procedimiento utilizado, tiempo de reacción, temperatura y la intervención de otros reactivos (149).

Adicionalmente a estos dos roles, esta tesis propone un tercero que no ha sido nombrado, pero puede atribuírselo como estabilizador. Este rol sería el de coordinación, que se observa en las nanopartículas de óxidos metálicos. Describiendo la síntesis tradicional por precipitación usando NaOH o KOH para sales precursoras de SiO<sub>2</sub>, MgO, ZnO, se conoce que el pH modifica el estado del ion. Pero también existe una coordinación entre el ion de la sal precursora y el anión resultante de la base. Esta coordinación controla la nucleación de los átomos del metal brindando nanopartículas con formas y tamaños potencialmente controlables por medio de las concentraciones de las sales precursoras y bases, siguiendo de una usual calcinación. Este mecanismo es observable de igual manera para los extractos de las plantas, siendo sustituida las bases (NaOH o KOH) por los fitocompuestos del extracto, ya que éstos pueden influenciar en el pH de la reacción y el control de la nucleación por medio de coordinación con los metabolitos del extracto.

## **Selección de nanopartícula para estudio en cáncer**

Innumerables nanosistemas han sido propuestos para el tratamiento contra el cáncer. Como se escribió en el Capítulo II, algunos de estos nanosistemas ya han sido aprobados por la FDA. Solas o en combinación de n número de elementos se pueden encontrar en la literatura, mostrando su potencial aplicación a diferentes líneas de cáncer, así como diferentes mecanismos por los cuáles actúan.

Los resultados de una búsqueda booleana (Figura 26) muestran, sin duda, que las nanopartículas más estudiadas son las de Au, Cu, Fe y Ag, respectivamente. Esto resulta esperable, debido a la sinergia existente entre las propiedades intrínsecas de los elementos y las estrategias para el tratamiento contra el cáncer. El Au con su estabilidad, plasmón de resonancia y ser inerte, y el Cu con su abundancia.



**Figura 26.** Resumen del número de publicaciones en cáncer por nanopartículas

También importante resaltar que, los nanosistemas básicos de estos elementos son relativamente sencillos de sintetizar obteniendo formas y tamaños deseados en la nanomedicina. Por el contrario, la misma búsqueda booleana muestra que las nanopartículas menos estudiadas en cáncer son las de Ce, V, y As.

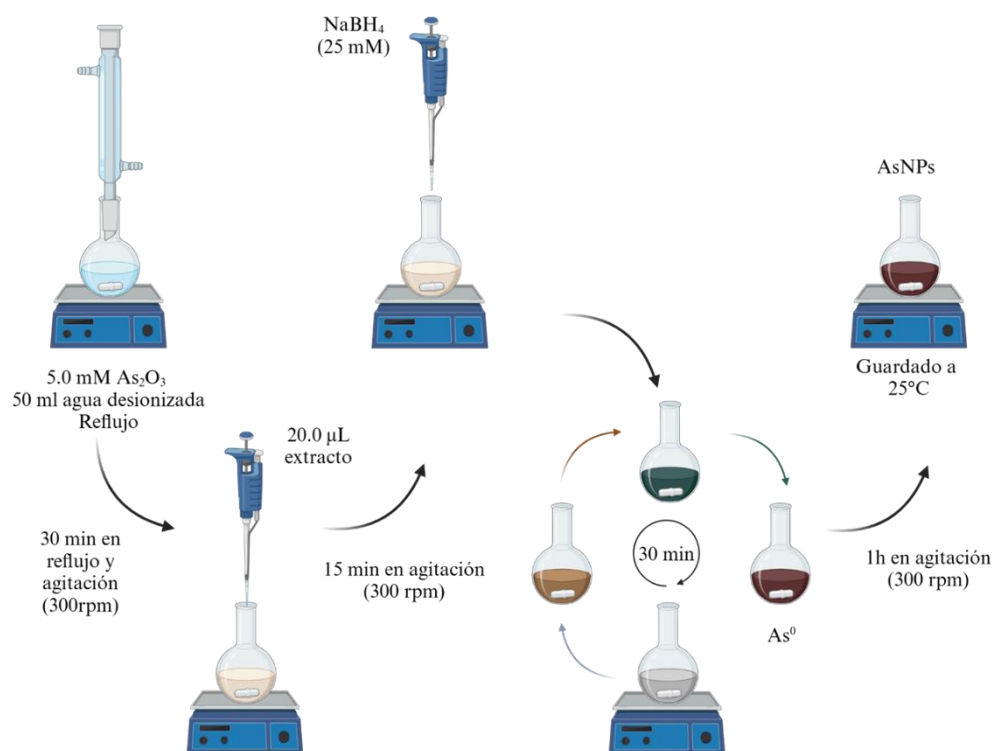
De los elementos buscados, el que resalta es el As. El As es un elemento que ha estado un largo tiempo en la historia de la salud. Principalmente, el As y sus compuestos están relacionados con la toxicidad y muerte. Esta relación no es descabellada, ya que, se le atribuye cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad renal, toxicidad testicular, carcinogénico, y alteración del ADN (150,151). No obstante, se debe resaltar, que la concentración y exposición son clave para lograr esos efectos adversos en la salud.

Paradójicamente, el As también forma parte de los elementos necesarios para la vida, y, un hecho trascendental es que, el As también ha formado parte de la historia de la medicina logrando curar enfermedades como la sífilis y ciertos tipos de cáncer (152). Inclusive, varios de estos compuestos se encuentran aún en el arsenal para el tratamiento contra el cáncer como es el  $As_2O_3$  para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (153).

Por esta razón, es imprescindible explorar la eficacia de las As NPs en el tratamiento del osteosarcoma, aprovechando la síntesis verde como una ruta que logró el estado coloidal y la sinergia de los fitocompuestos. La utilización de métodos de síntesis verde no solo optimiza las propiedades terapéuticas de las As NPs, sino que también minimiza los riesgos ambientales y toxicológicos asociados con los enfoques tradicionales. Esta estrategia se basa en la interacción bioactiva de las nanopartículas con procesos celulares clave en el cáncer, como la modulación de señales oxidativas y la regulación de mecanismos de apoptosis, lo que sugiere un potencial prometedor en la lucha contra este tipo de cáncer óseo.

## Síntesis de As NPs

Contados estudios han demostrado la obtención de As NPs, y esta lista se ve reducida si las As NPs son orientadas en aplicaciones biológicas como cáncer. No obstante, parte fundamental de su síntesis, así como la de las otras NPs, es el potencial redox (154,155).

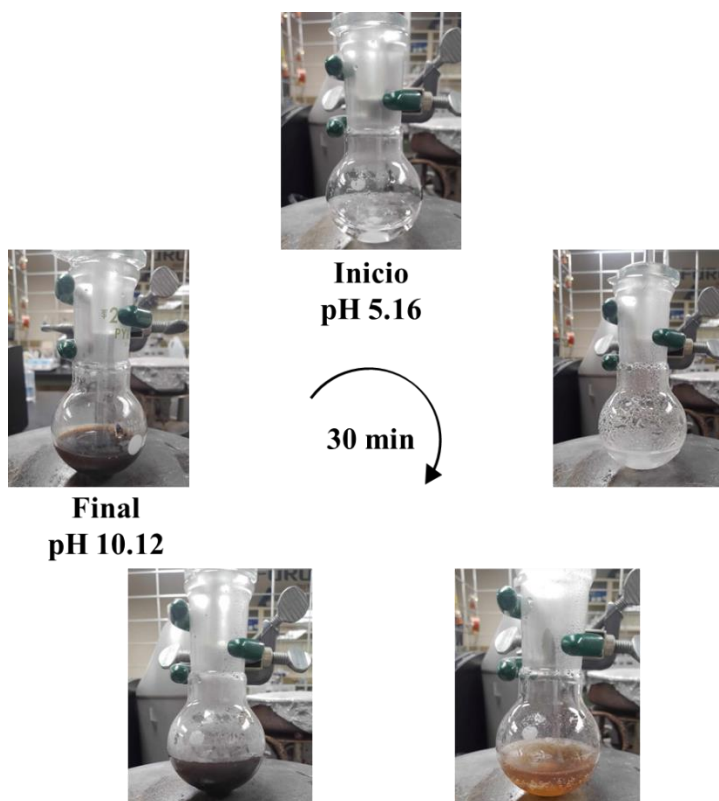


**Figura 27.** Procedimiento para la obtención de As NPs en estado coloidal

Un hecho a resaltar en las As NPs reportadas es la concentración alta de  $\text{NaBH}_4$  en contraste con la concentración del precursor. En un estudio previo demostramos que la concentración apropiada (25 mM) y que va acorde con la ecuación de balance propuesta se encuentra inferior a la concentración utilizada en los reportes previos.

Otro aspecto importante y que fue resuelto, es la estabilidad de As NPs. Un artículo destacó que, la obtención de As NPs con únicamente el precursor y reductor, involucraba la precipitación de las As NPs (156). A pesar de que esta precipitación tuvo como resultado nanopartículas de un tamaño razonable ( $<80$  nm) con formas interesantes, tienen las desventajas de no tener todas las propiedades de los sistemas coloidales.

En esta tesis se optimizaron los usos del precursor y reductor, además de lograr el estado coloidal por medio del extracto concentrado de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii*. El procedimiento se muestra en la Figura 27.



**Figura 28.** Registro de cambios de color y pH durante síntesis de As NPs

Como se muestra en la Figura 28, durante la reacción se observaron cambios de color que están estrechamente relacionados con las fases de formación de nanopartículas, siguiendo la teoría de Ostwald (157). Los cambios de color se encontraron en un intervalo de 30 min hasta obtener un color constante, casi de color negro, que indica la obtención de  $As^0$ . Interesantemente, el cambio de conjugación con lo reportado por Kaña et al. que denota el medio básico para la obtención de  $As^0$  (158).

La incorporación de los metabolitos procedentes del extracto acuoso se caracterizó por FTIR y UV-Vis (Figura 29 a y c). Describiendo al precursor, es notorio que hubo un cambio cuando se solubilizó en el  $As_2O_3$ . Los cambios más relevantes se encuentran entre  $4000-2950\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al medio acuoso. También las disposiciones de los enlaces con el As cambiaron, mostrándose ahora 3 picos intensos debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , los cuales demuestran la obtención de  $H_3AsO_3$ .

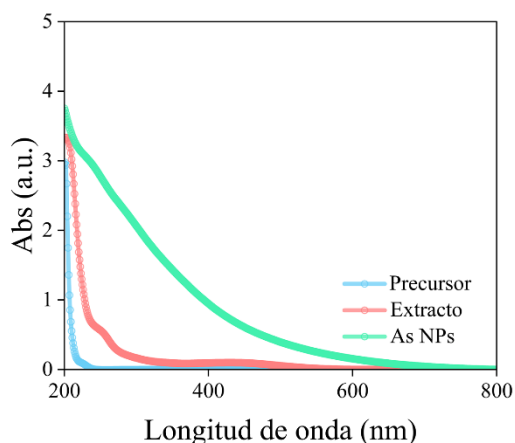
El espectro del extracto concentrado de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* muestra bandas en  $3320\text{ cm}^{-1}$  y  $2928\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a vibraciones de estiramiento de O-H y C-H. Las bandas a  $1612\text{ cm}^{-1}$  y  $1402\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a vibraciones de estiramiento de C=C y  $COO^-$ , así como a vibraciones de flexión de O-H. Por último, los picos a  $1270\text{ cm}^{-1}$  y  $1052\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de estiramiento de C-O y C-C-O. Estas bandas son características de compuestos fenólicos, como fenoles y flavonoides en el género *Lonicera*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en barrido fitoquímico. Además, el espectro UV-Vis de absorbancia en la Figura 29 a muestra un pico en 250 nm correspondiente a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  característica a los compuestos fenólicos como flavonoides.

Por último, el espectro FTIR de la muestra de As NPs estabilizadas con el extracto acuoso presenta las bandas más relevantes de la planta con una intensidad menor. Además, una banda  $736\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a As-O. Relacionando el espectro UV-Vis de las As NPs, observamos que no hay un pico característico; algo esperado para As NPs.

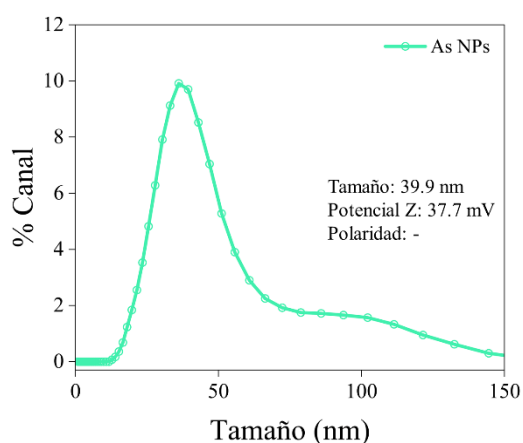
Para determinar el tamaño, distribución, forma y polaridad de las As NPs, realizamos un estudio DLS. La Figura 29 b muestra que las As NPs tienen una distribución uniforme con un tamaño de partícula de 39.9 nm. El tamaño de las partículas es un factor fundamental en aplicaciones biológicas, sobre todo en cáncer. Aunque existen diversas opiniones y resultados, se ha llegado a un consenso de que, a tamaños inferiores a 100 nm, las partículas

presentan una relación superficie-volumen significativamente mayor. Esto se traduce en una mayor actividad biológica, ya que una mayor área superficial permite una mayor interacción con las células y tejidos (159). Además, las nanopartículas de pequeño tamaño son más eficaces para penetrar en las células cancerígenas y evadir las barreras biológicas, como las membranas celulares y las estructuras extracelulares, facilitando su entrega dirigida al sitio tumoral (160). Este fenómeno es clave para mejorar la biodisponibilidad y la especificidad terapéutica de las nanopartículas en el tratamiento del cáncer, minimizando los efectos secundarios y potenciando la eficacia del tratamiento.

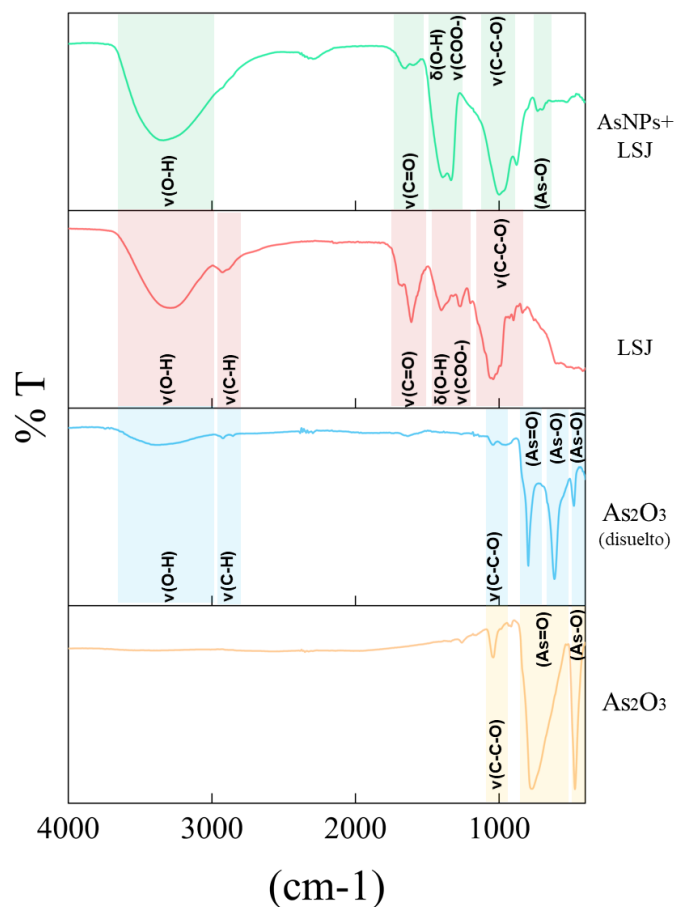
Respecto a la polaridad, las As NPs presentaron una carga negativa. Esta carga está relacionada a los metabolitos que brindan estabilidad a la partícula y se encuentran en la superficie de ésta. Al tener carga negativa, suele asignarse a los compuestos fenólicos. Al igual que el tamaño, la polaridad es otro parámetro que se tienen diferentes hipótesis. Si nos enfocamos en los sarcomas, se han realizado estudios que se han enfocado en las diferencias en la carga eléctrica en la superficie de las células sanas respecto a las tumorosas (161,162).



a)



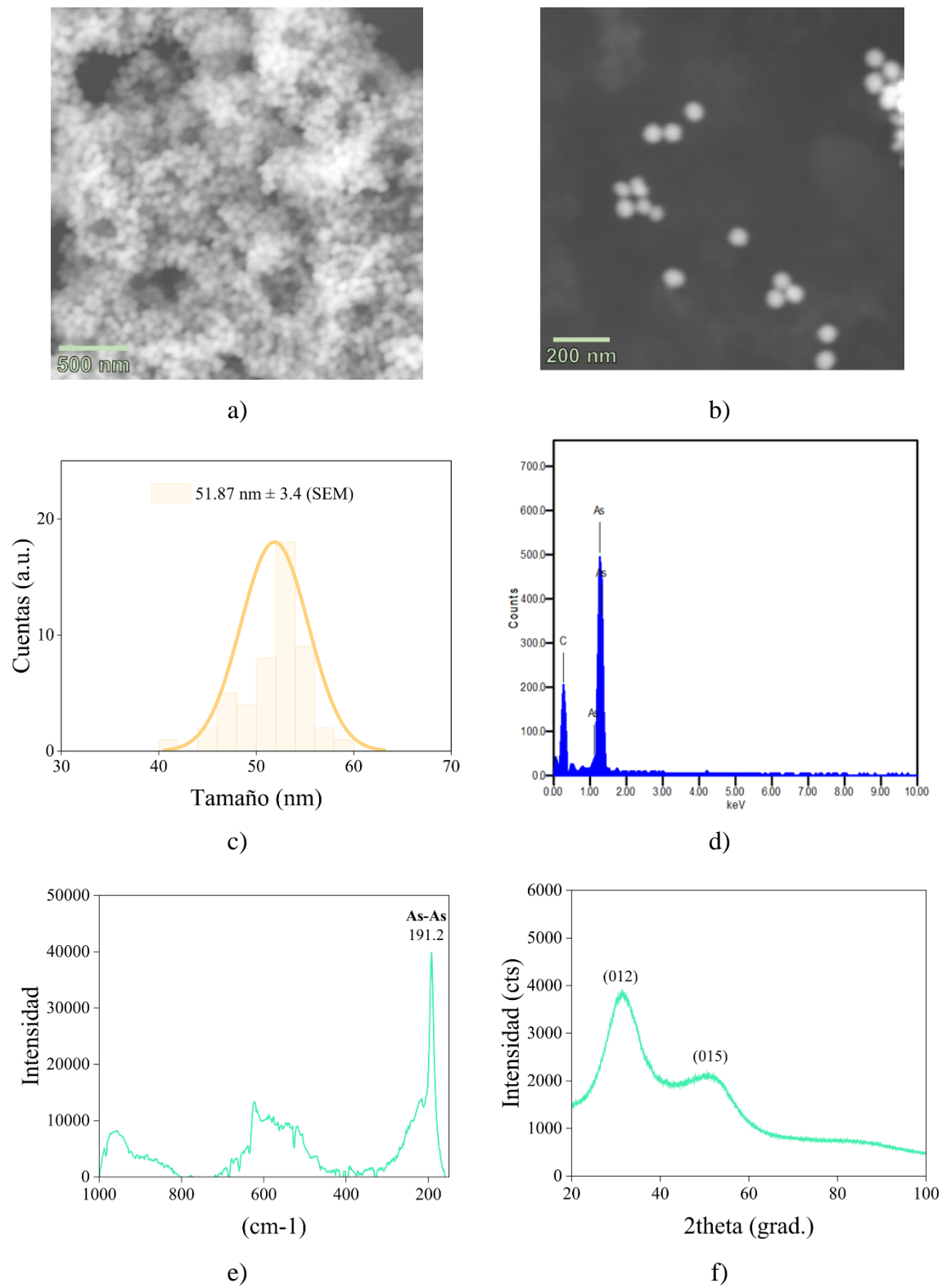
b)



c)

**Figura 29.** Caracterización fisicoquímica de As NPs: a) UV-Vis; b) DLS; y c) FTIR

Por SEM, también se demostró el tamaño, forma y distribución de las As NPs. En las Figuras 30 a-c se aprecian partículas esféricas con un tamaño promedio de  $51.87 \pm 3.4$  nm, siendo un valor muy aproximado a los resultados por DLS. En el espectro EDS (Figura 30 d) confirma que las partículas presentes en las micrografías son As con C, donde el C es procedente del envolvimiento de los metabolitos del moronel. Por último, la caracterización por Raman y XRD (Figura 30 e y f) muestra que las As NPs cuentan con una estructura policristalina donde la parte cristalina corresponde a As hexagonal (JCPDS 98-001-6516).



**Figura 30.** Caracterización morfológica y composición de las As NPs: a) SEM 15kX; b) SEM 25kX; c) DLS; d) EDS; e) Raman; y XRD

## Pruebas biológicas

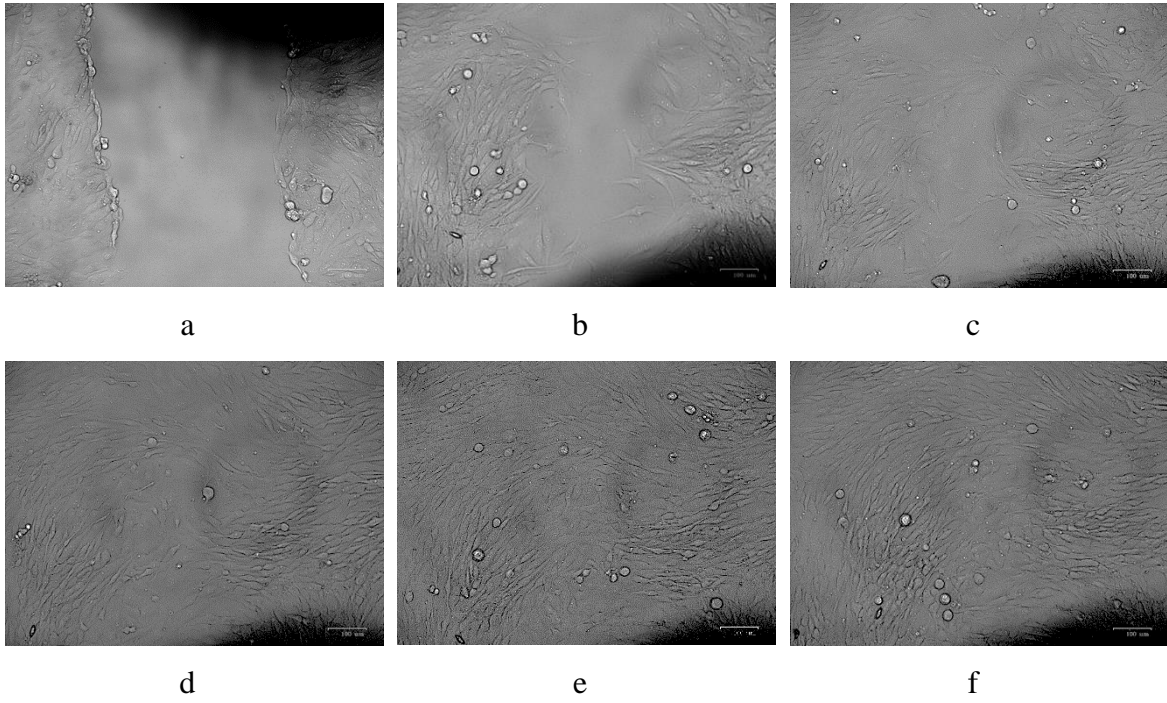
### Scratch

Se evaluó el efecto de seis muestras (extracto acuoso, extracto acuoso concentrado, As NPs, colchicina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) sobre la migración de células de osteosarcoma MG-63 mediante el método de scratch. La migración celular se controló en tres etapas clave: después del tratamiento inicial, cinco días durante el tratamiento y cinco días después del tratamiento con un medio nutritivo al 10%.

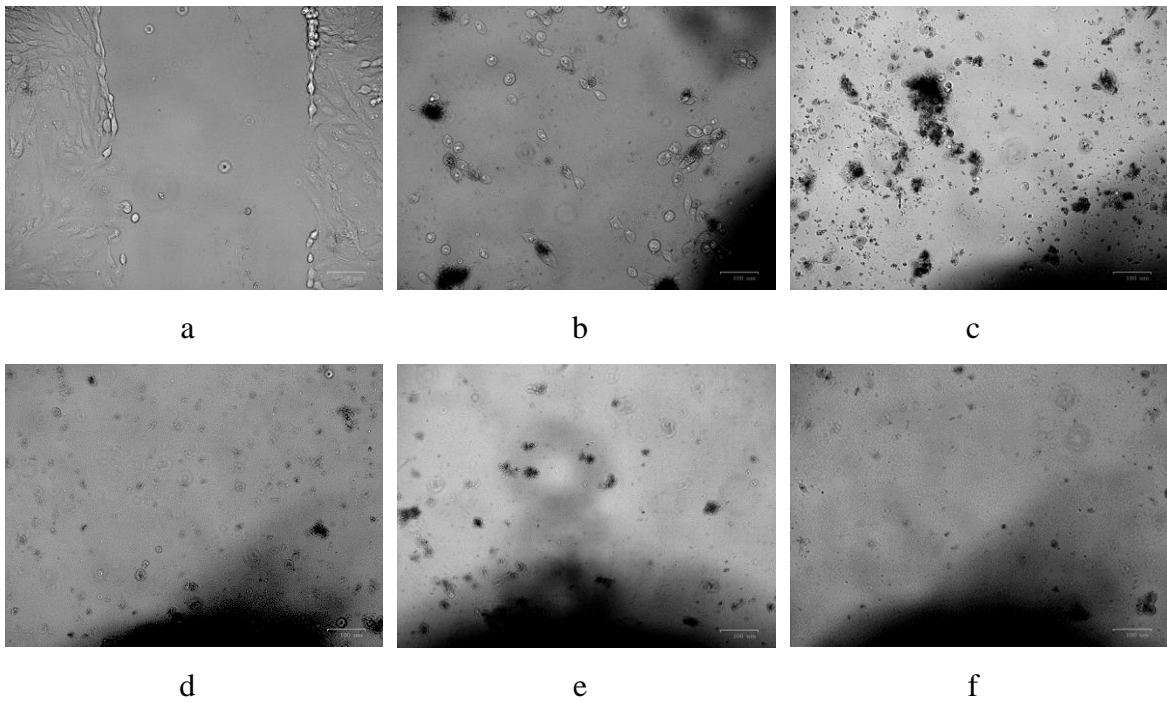
#### *Extracto de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* y extracto concentrado*

Tanto el extracto como el extracto concentrado mostraron una inhibición moderada de la migración celular (Figura 31 y 32). Inicialmente, el extracto concentrado mostró un efecto más pronunciado que el extracto, notándose únicamente crecimiento celular en algunas zonas de la muestra. Este comportamiento era esperado, ya que, al estar concentrado, existe una mayor disposición de metabolitos ejerciendo efectos citotóxicos sobre las células MG-63. Realizando un rastreo en los cinco días de exposición, el extracto acuoso tuvo limitaciones al mantener el scratch, mostrando el cierre completo de la ranura en el cuarto día, lo que indica que su eficacia disminuyó con el tiempo, probablemente debido a limitaciones en la biodisponibilidad, difusión y estabilidad de los metabolitos en el entorno celular.

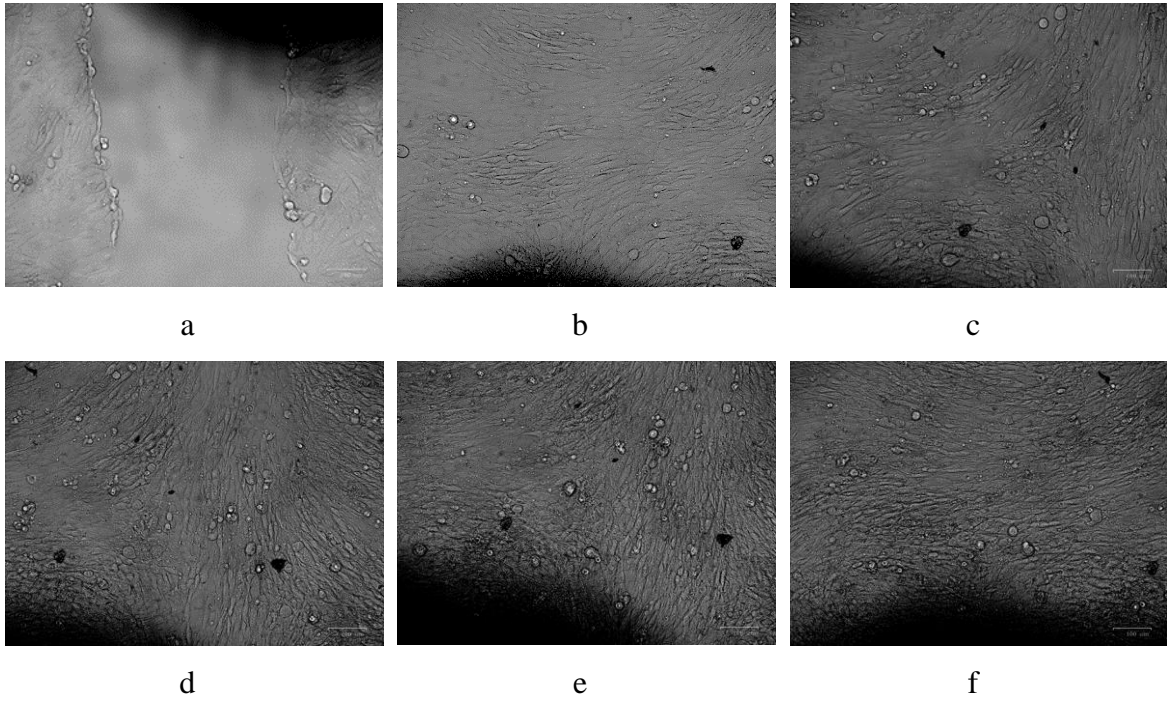
Por otra parte, la migración celular en los tratamientos con un medio nutritivo al 10% tuvieron un comportamiento parecido que la prueba anterior (Figura 33 y 34). No obstante, en el caso del extracto, el cierre completo surgió en el día tres. Más sorprendente son los resultados del extracto concentrado, ya que, se observa presencia de células a partir del día tres, pero las células muestran un deterioro morfológico radical. El color y tamaño de las células se vio afectado, dando indicios de necrosis.



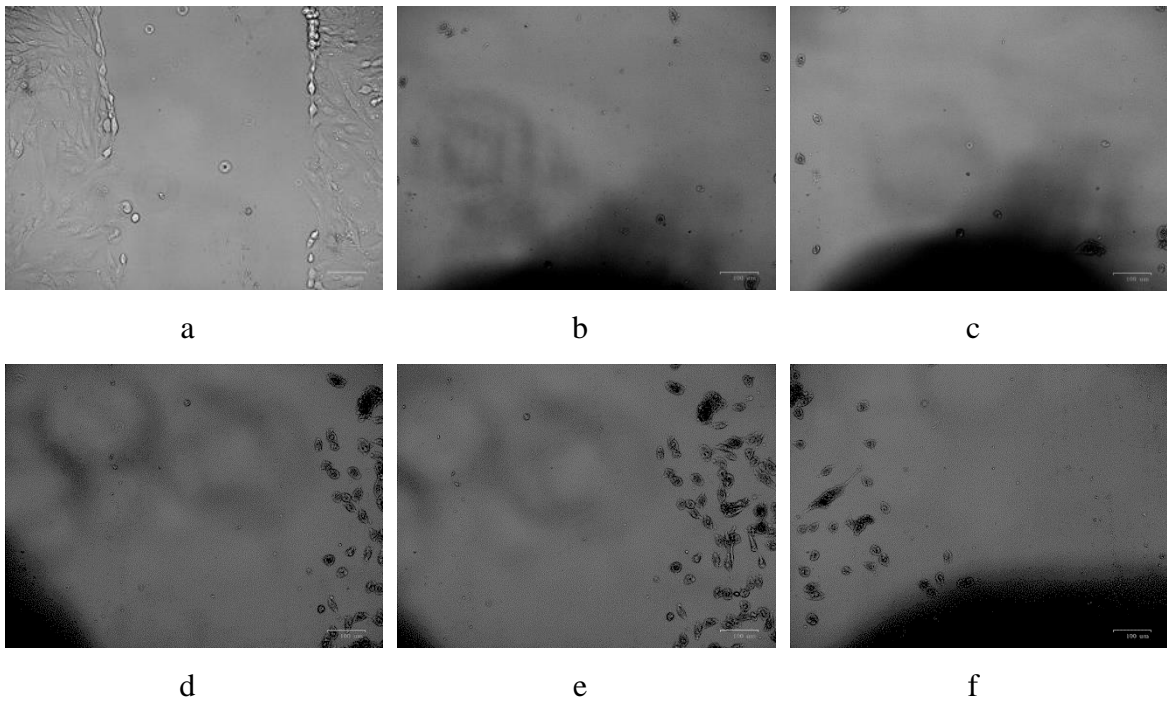
**Figura 31.** Migración celular de MG-63 con extracto: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día



**Figura 32.** Migración celular de MG-63 con extracto concentrado: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día



**Figura 33.** Migración celular de MG-63 con extracto en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

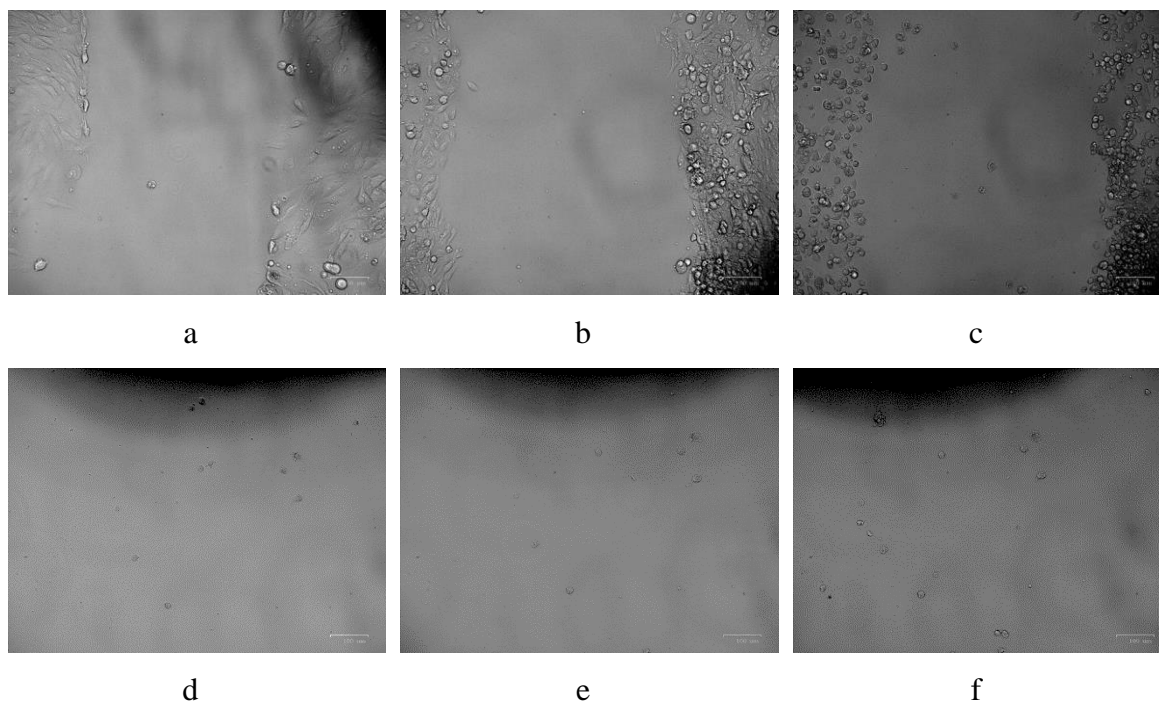


**Figura 34.** Migración celular de MG-63 con extracto concentrado en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

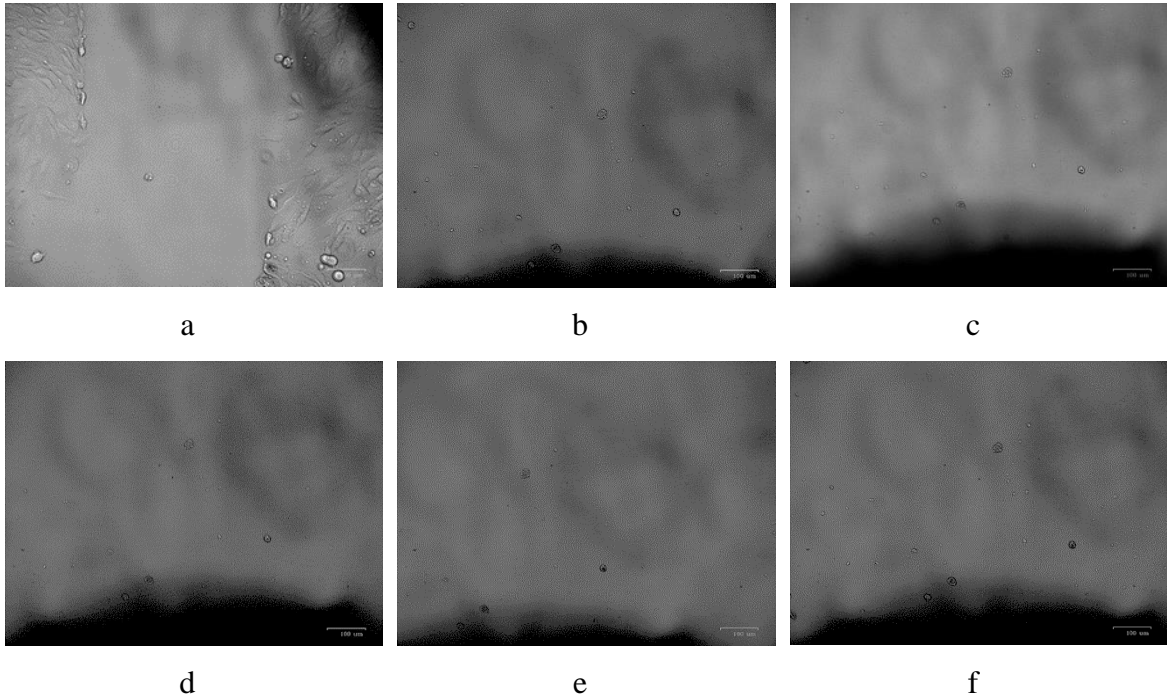
### *Nanopartículas de As*

Las As NPs exhibieron consistentemente los efectos inhibitorios más potentes sobre la migración celular de todas las muestras, tanto durante la fase de tratamiento como después del cambio a un medio nutritivo al 10% (Figura 35 y 36). Desde el día uno, es notorio que la ranura en vez de cerrarse por la migración celular, las células en los extremos van siendo alteradas hasta su completa disrupción en el día tres, lo que indica un efecto prolongado del tratamiento con As NPs.

Estos resultados demuestran que, las As NPs no sólo mejoraron la biodisponibilidad y la liberación sostenida de los metabolitos secundarios del extracto de la planta, sino que funcionan como entrada para las mismas As NPs. Incluso en condiciones limitadas de nutrientes, las nanopartículas mantuvieron sus efectos antiproliferativos, lo que sugiere un impacto duradero en el metabolismo celular y las vías de migración. La dupla fitocompuesto-nanosistema toma la actividad de los metabolitos de la planta demostrados con el tratamiento de únicamente el extracto y la actividad del As en su estado nanoparticulado, lo que explica los resultados superiores en comparación con los extractos de plantas libres.



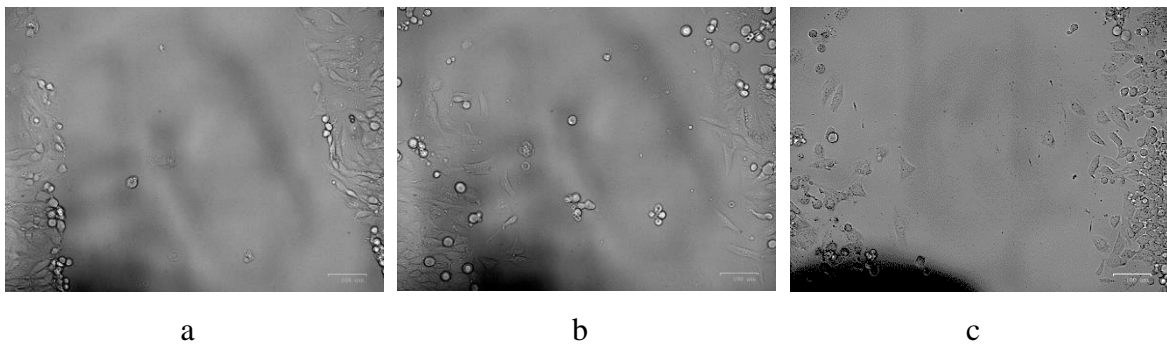
**Figura 35.** Migración celular de MG-63 con As NPs: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

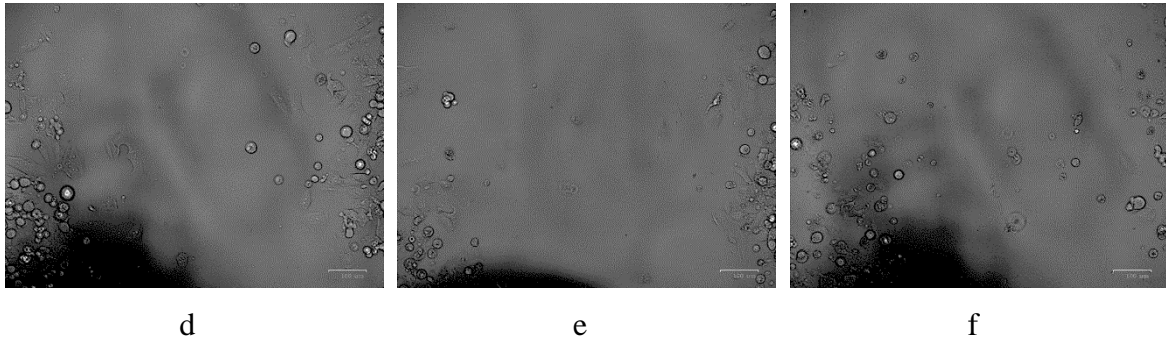


**Figura 36.** Migración celular de MG-63 con As NPs en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

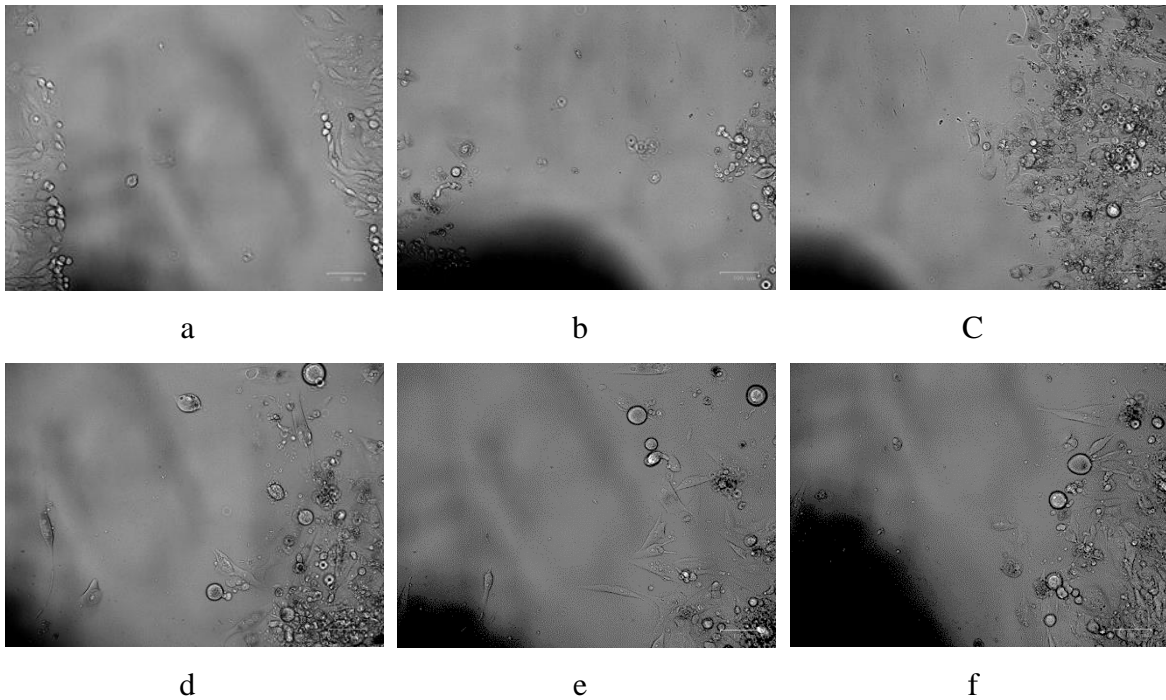
### *Colchicina*

Como era esperado, la colchicina demostró inhibición de la migración celular durante el experimento para el tratamiento normal, pero se vio reducido en el tratamiento limitado en nutrientes (Figura 37). Sin embargo, después de cambiar a un medio nutritivo al 10 %, se observó una recuperación modesta en la migración celular, aunque se mantuvo más lenta que en el grupo de control (Figura 38). Esta recuperación parcial sugiere que, si bien la colchicina es efectiva, es posible que no proporcione la inhibición sostenida observada con las nanopartículas de As, en particular en un entorno menos nutritivo.





**Figura 37.** Migración celular de MG-63 con colchicina: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día



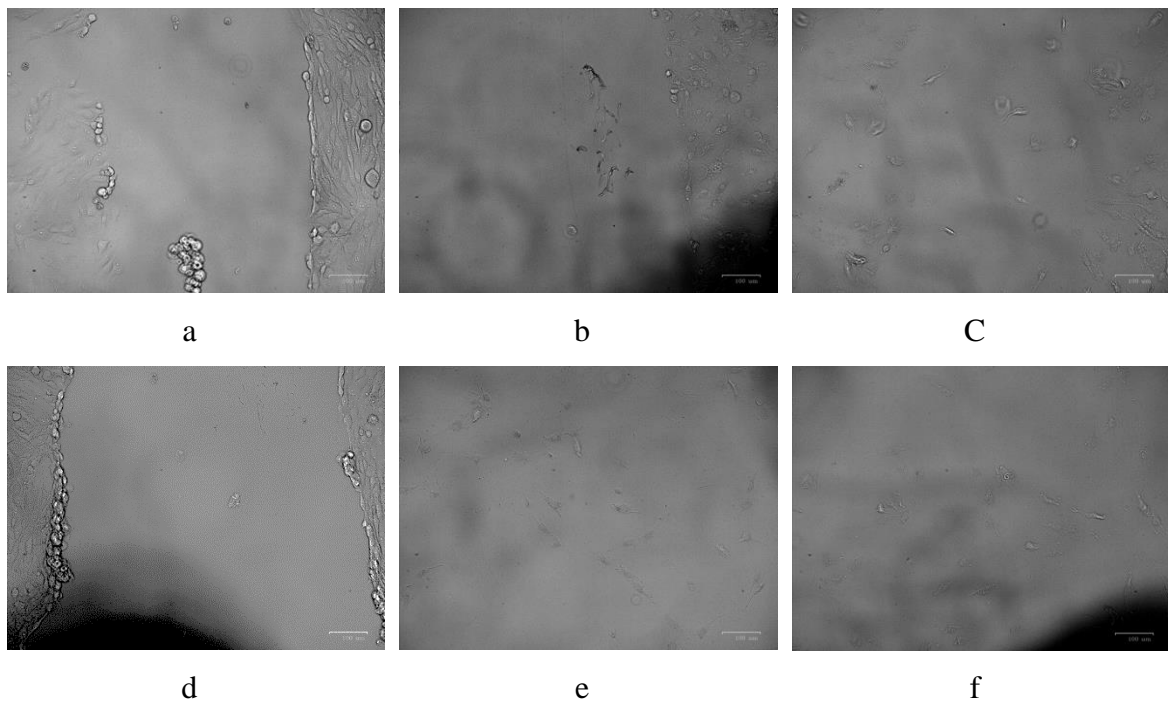
**Figura 38.** Migración celular de MG-63 con colchicina en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

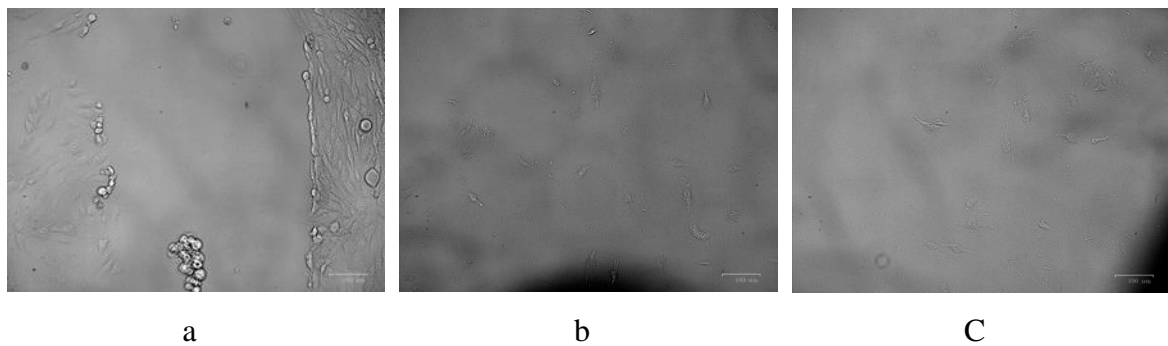
El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizado para inducir el estrés oxidativo, promovió inicialmente la migración celular, mostrando un cierre más rápido de la ruptura durante los primeros cinco días de tratamiento (Figura 39). La respuesta proliferativa inducida por el estrés oxidativo fue evidente, ya que las células probablemente intentaron reparar el daño causado por las ROS. Sin embargo, durante la fase posterior al tratamiento con un medio nutritivo al 10 %, la tasa de migración de las células se redujo significativamente, lo que indica que la exposición

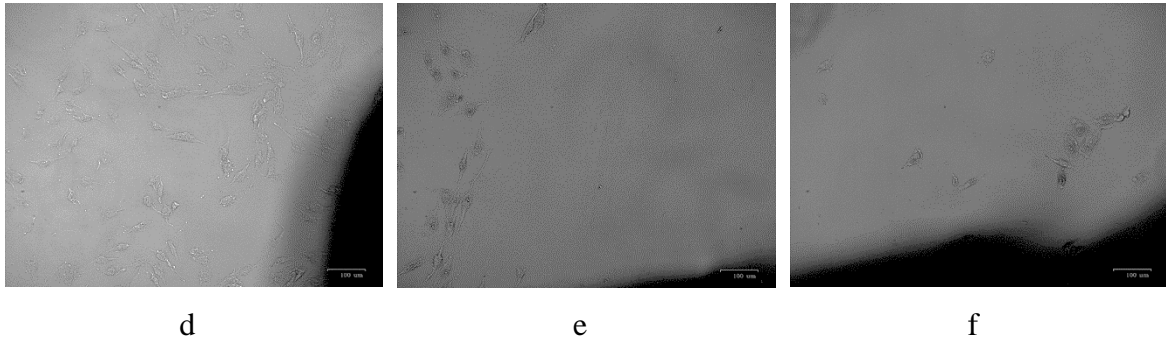
prolongada al estrés oxidativo tuvo un efecto perjudicial sobre su capacidad proliferativa (Figura 40).

Esta respuesta bifásica es coherente con el papel dual de las ROS en la promoción de la supervivencia y la muerte celular, dependiendo del contexto celular y la duración de la exposición. Inicialmente, el estrés oxidativo en dosis bajas estimuló los mecanismos de reparación, pero con el tiempo, las células se volvieron menos viables, particularmente en condiciones de nutrientes reducidos.



**Figura 39.** Migración celular de MG-63 con  $H_2O_2$ : a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día



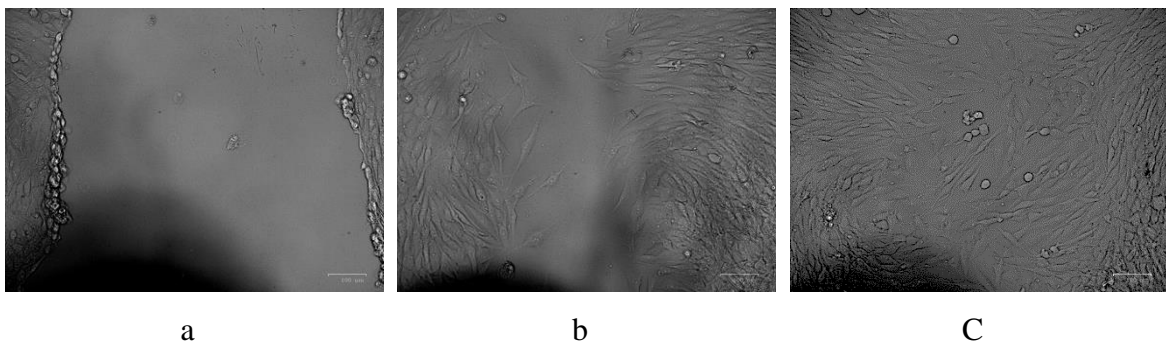


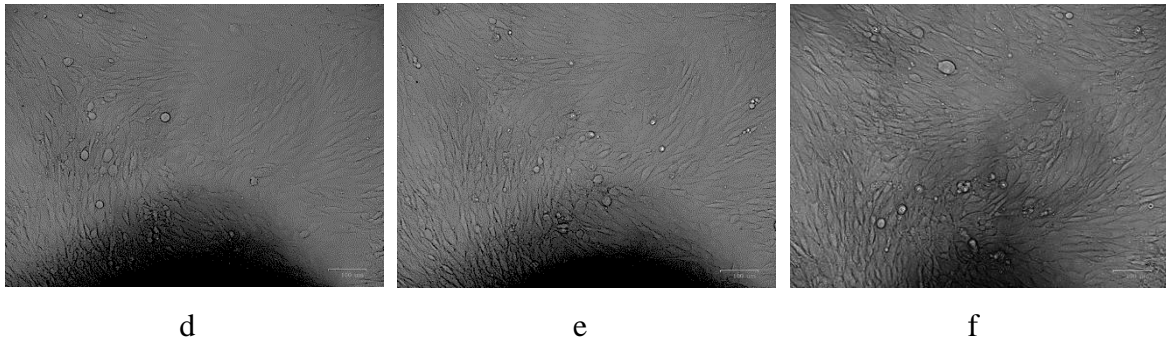
**Figura 40.** Migración celular de MG-63 con  $H_2O_2$  en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

### ***Control***

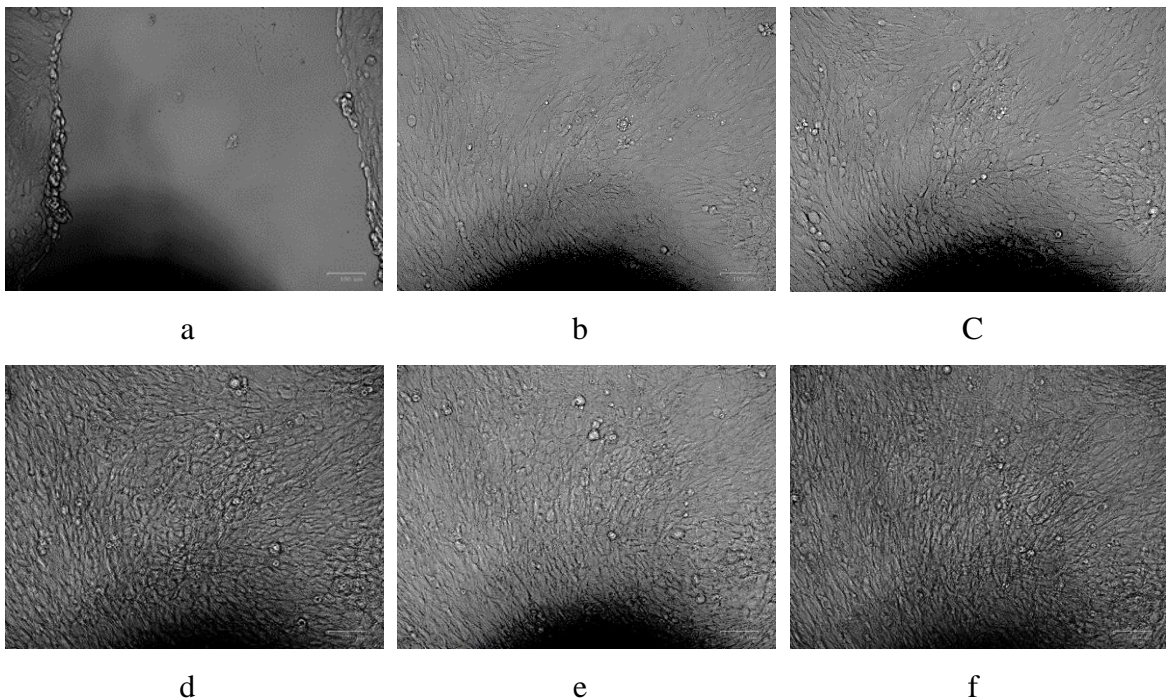
El grupo de control, que no recibió tratamiento, mostró una tasa constante de cierre de la ruptura durante todo el experimento (Figura 41). Como se esperaba, las células continuaron migrando y proliferando en condiciones normales, y la transición al medio nutritivo al 10 % condujo a una reducción menor en la velocidad de migración, aunque el cierre de la ruptura se completó dentro del cronograma experimental (Figura 42).

Entre los seis grupos de tratamiento, las nanopartículas de As proporcionaron la inhibición más efectiva y sostenida de la migración celular en las células MG63. Este tratamiento siguió siendo muy eficaz durante las fases de tratamiento y postratamiento, incluso en condiciones de limitación de nutrientes. Por el contrario, los extractos de *Lonicera suspicata var. Jonstonii* y concentrado mostraron una eficacia limitada, y el cierre de la ruptura se reanudó durante la fase de postratamiento, mientras que la colchicina, aunque potente, mostró una ligera disminución de la eficacia después del cambio a medios reducidos.





**Figura 41.** Migración celular de MG-63 con el control: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día



**Figura 42.** Migración celular de MG-63 con el control en medio al 10%: a) antes del tratamiento; b) 1er día; c) 2do día; d) 3er día; e) 4to día; f) 5 día

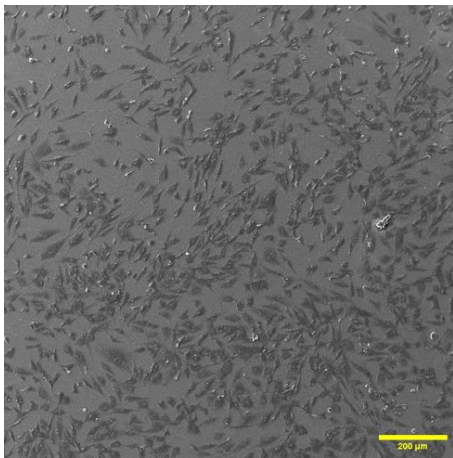
Estos resultados subrayan la ventaja de los sistemas de administración basados en nanopartículas en la terapia del cáncer, en particular para mejorar la biodisponibilidad y la liberación sostenida de compuestos derivados de plantas. Las nanopartículas de As son una estrategia terapéutica prometedora para la inhibición a largo plazo de la migración de células tumorales, superando a los agentes tradicionales como la colchicina en condiciones de restricción de nutrientes.

## Morfología

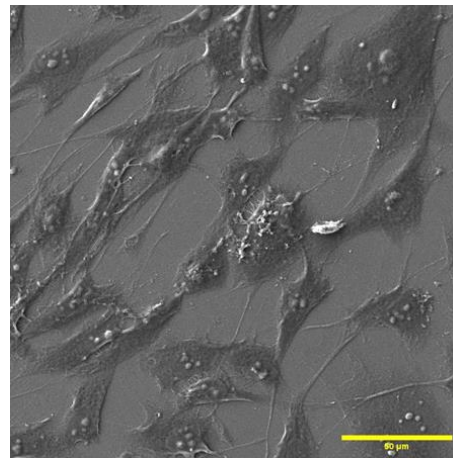
Se empleó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar los cambios morfológicos en la línea celular de osteosarcoma MG-63 tras la exposición a diversos tratamientos, incluidos un extracto vegetal concentrado, As NPs, colchicina, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y un grupo de control tratado con agua. Las alteraciones morfológicas inducidas por cada tratamiento son indicativas de sus efectos sobre los procesos celulares, como la apoptosis, la necrosis y el arresto mitótico.

### *Control*

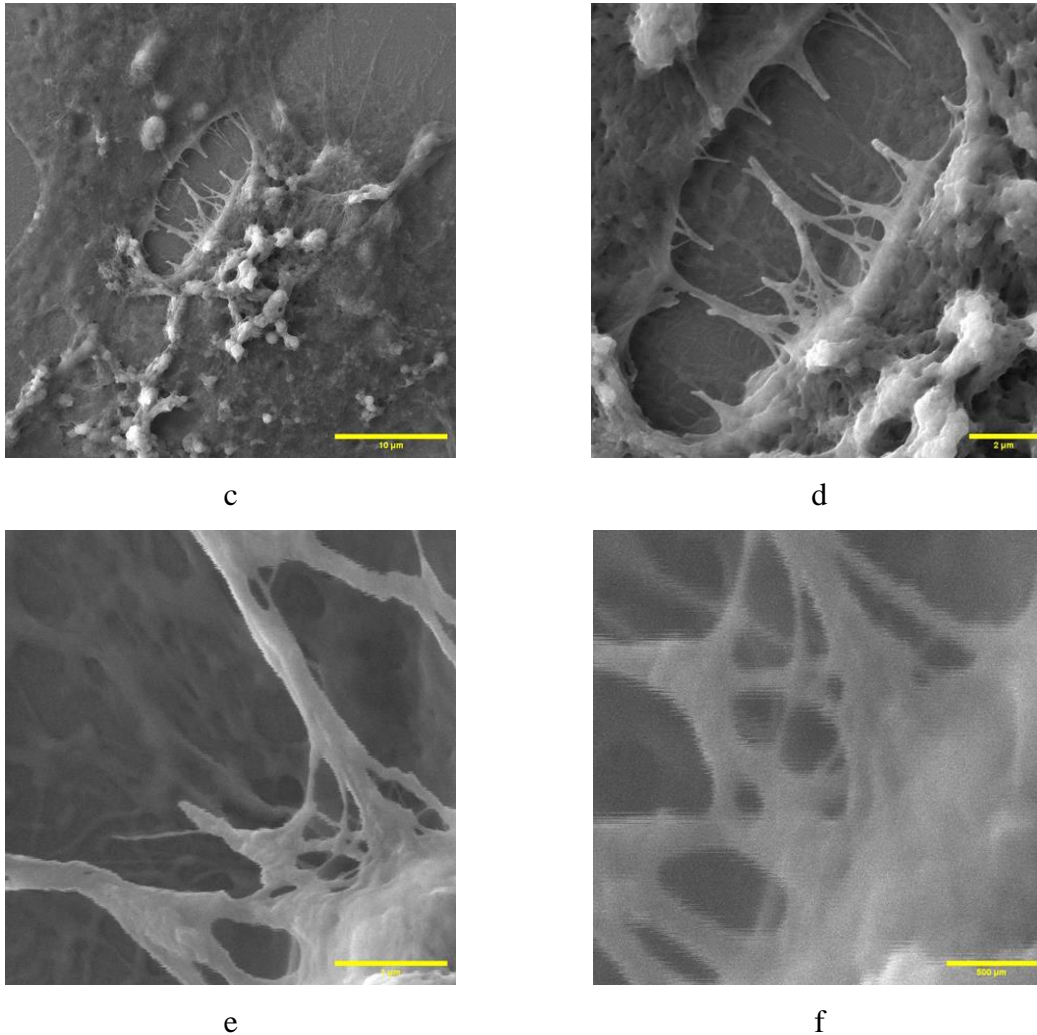
Las células MG-63 del control mostraron una morfología característica típica del osteosarcoma. Las células exhibieron una forma fusiforme o irregularmente alargada, con membranas celulares bien definidas y protuberancias superficiales como lamelipodios y filopodios (Figura 43 d-f) (163). También, las células aparecieron bien esparcidas y adheridas al sustrato. Todos estos factores ultra estructurales están asociados con la motilidad y la adhesión celular, esenciales para la migración de células cancerosas (164).



a



b

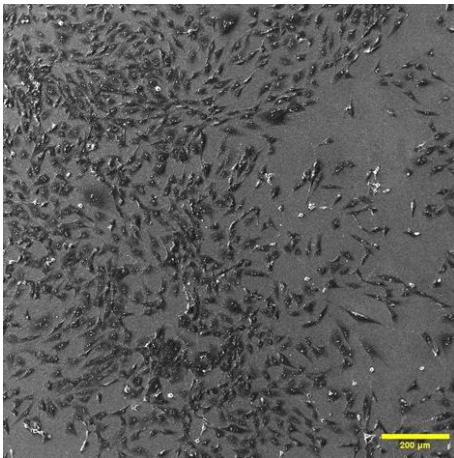


**Figura 43.** Caracterización ultra estructural de MG-63 con el control: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm

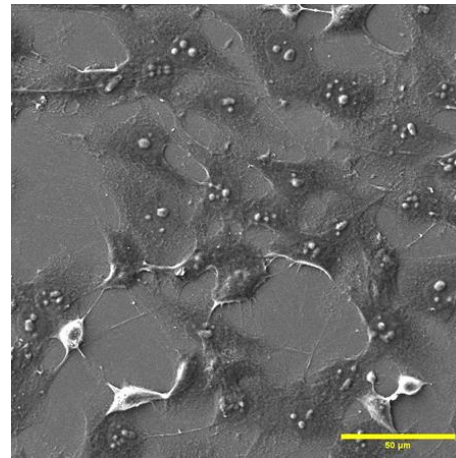
### ***Extracto y extracto concentrado***

Las células MG-63 tratadas con extracto concentrado mostraron cambios morfológicos significativos en comparación con el grupo de control. Las imágenes SEM (Figura 45 a-f) revelaron evidencia de encogimiento y redondeo celular, con una moderada reducción en la propagación celular. Esto indica una pérdida de propiedades de adhesión, probablemente debido al estrés citotóxico inducido por los compuestos activos en el extracto. Además, se observó la presencia de ampollas en el contorno celular, un sello distintivo de las etapas de la apoptosis (165). Estas alteraciones morfológicas sugieren que el extracto vegetal induce vías apoptóticas en las células de osteosarcoma, lo que podría atribuirse a alterar vías de transducción de señales oncogénicas y afección de macromoléculas como el ADN y

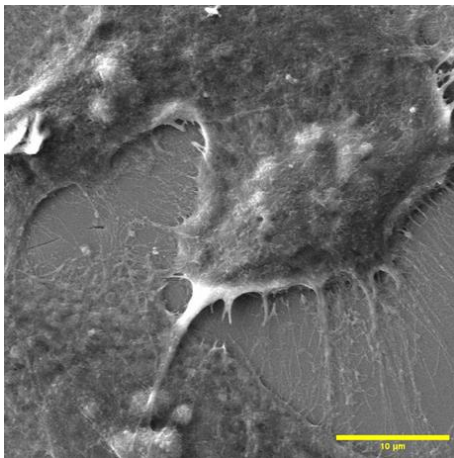
microtubulos (166). Otra observación a resaltar, es que, algunas células aparecieron agrupadas (Figura 44 a), lo que sugiere además una motilidad y adhesión deterioradas, ambas fundamentales en la progresión del cáncer. Estos hallazgos son consistentes con las propiedades anticancerígenas reportadas de compuestos bioactivos derivados de plantas, como compuestos fenólicos y alcaloides (166).



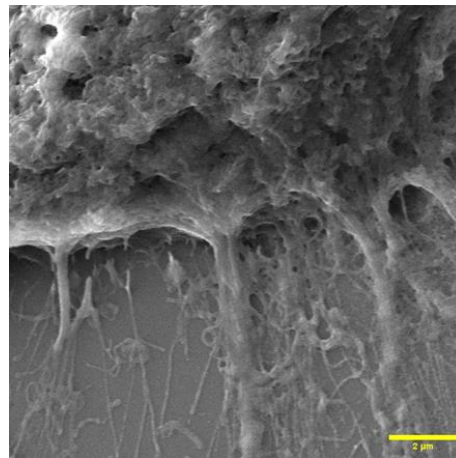
a



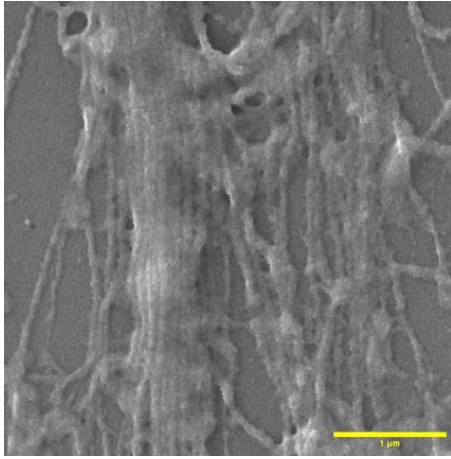
b



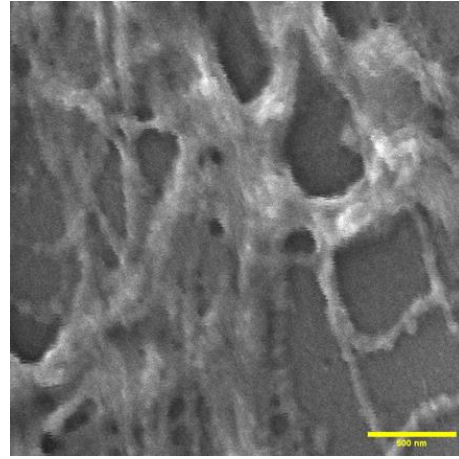
c



d

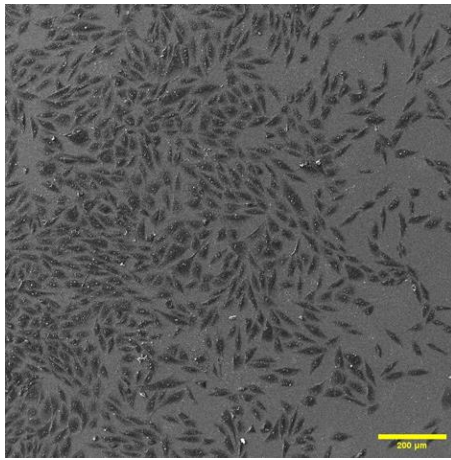


e

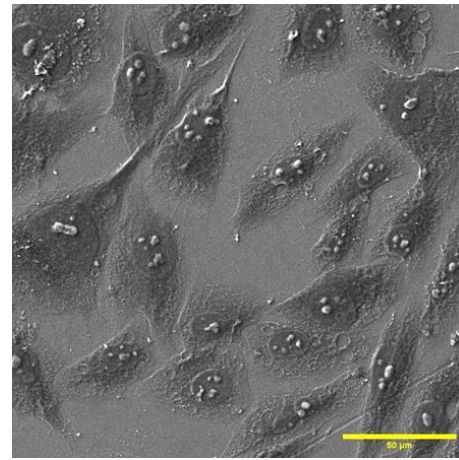


f

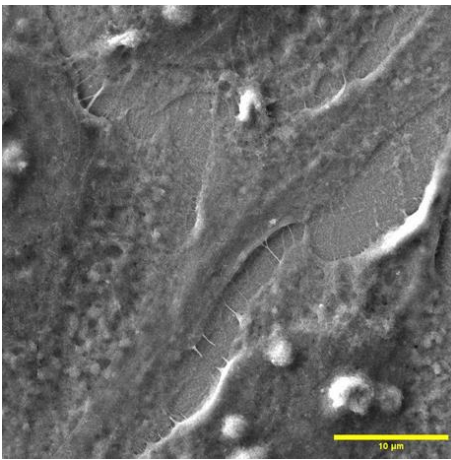
**Figura 44.** Caracterización ultraestructural de MG-63 con el extracto: a) 200 μm; b) 50 μm; c) 10 μm; d) 2 μm; e) 1 μm; f) 500 nm



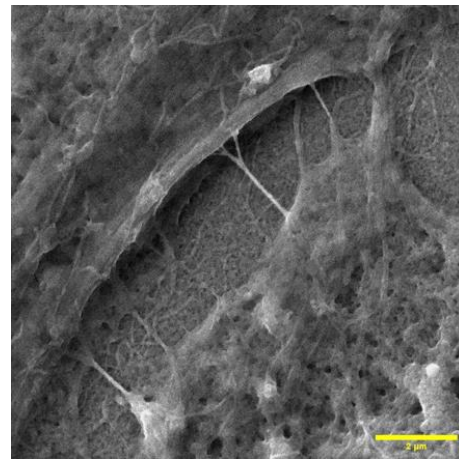
a



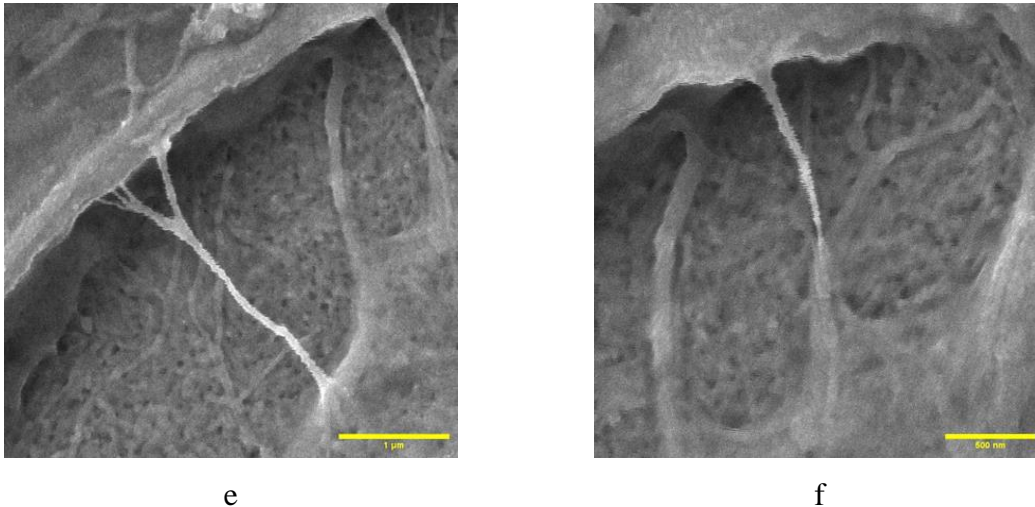
b



c



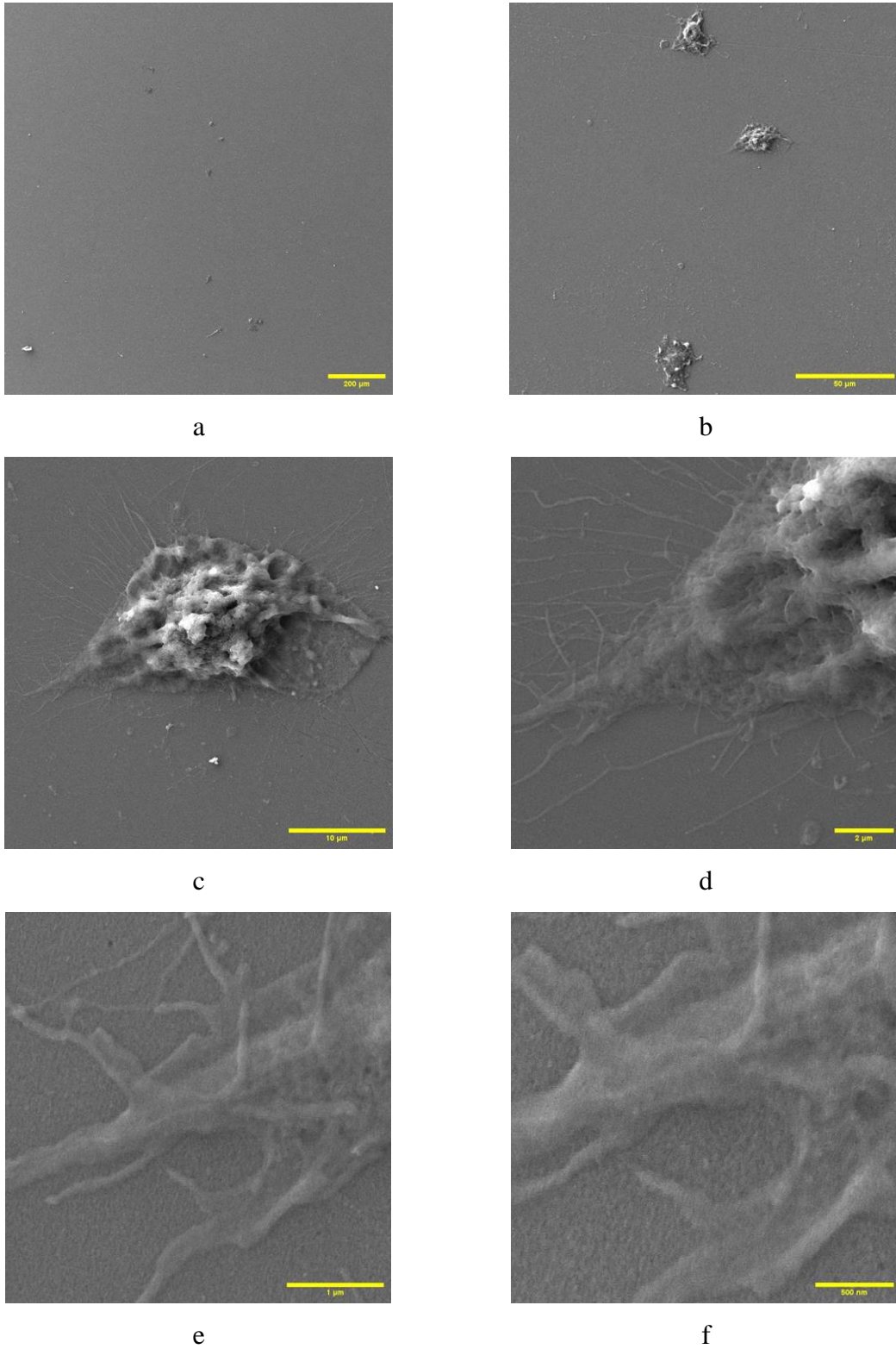
d



**Figura 45.** Caracterización ultra estructural de MG-63 con el extracto concentrado: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm

### *As NPs*

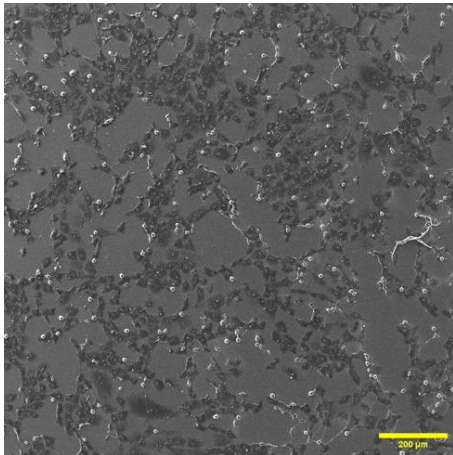
Sin duda, los resultados más sobresalientes fueron obtenidos con las As NPs. Las NPs exhibieron un profundo efecto citotóxico en las células MG-63, encontrándose unas cuantas en el cultivo realizado (Figura 46 a-f). Las células encontradas mostraron graves alteraciones morfológicas, incluyendo daño extenso de la membrana, encogimiento celular y la presencia de cuerpos apoptóticos. Los restos celulares dispersos en las micrografías son indicativos de apoptosis o necrosis avanzada, probablemente desencadenada por el efecto sinérgico del As y los fitocompuestos. Los tamaños celulares más pequeños y las formas irregulares observadas sugieren que las As NPs penetran efectivamente en las células e inducen efectos citotóxicos, probablemente a través de vías de transducción de señales oncogénicas y composición celular (daño en el ADN). Estas NPs, estabilizadas por extracto de planta, también se beneficiaron de una biodisponibilidad mejorada y una administración dirigida, lo que contribuye a sus efectos pronunciados en la viabilidad celular.



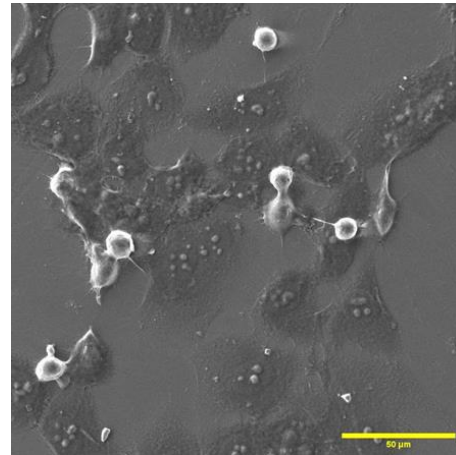
**Figura 46.** Caracterización ultraestructural de MG-63 con As NPs: a) 200 μm; b) 50 μm; c) 10 μm; d) 2 μm; e) 1 μm; f) 500 nm

## ***Colchicina***

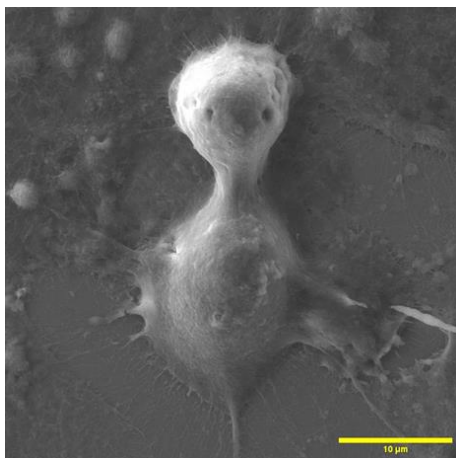
Las células tratadas con colchicina exhibieron cambios en las características morfológicas similares al extracto de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* (Figura 47 a-f). La colchicina, un conocido inhibidor de microtúbulos, interrumpe la polimerización de la tubulina, lo que lleva a la inhibición de la mitosis (167). El análisis SEM reveló que las células MG-63 tratadas con colchicina muestran una morfología predominantemente redondeada, lo que refleja una falta de formación normal del huso durante la división celular. Además de la redondez, algunas células mostraron ampollas en la pared celular, lo que indica una de las fases de la apoptosis. Estos resultados corroboran la acción de la colchicina en la focalización de las células que se dividen rápidamente al interferir con su maquinaria mitótica, lo que la convierte en un agente valioso de origen natural en el tratamiento del cáncer.



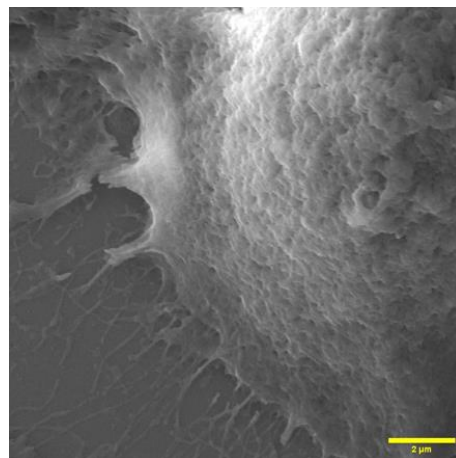
a



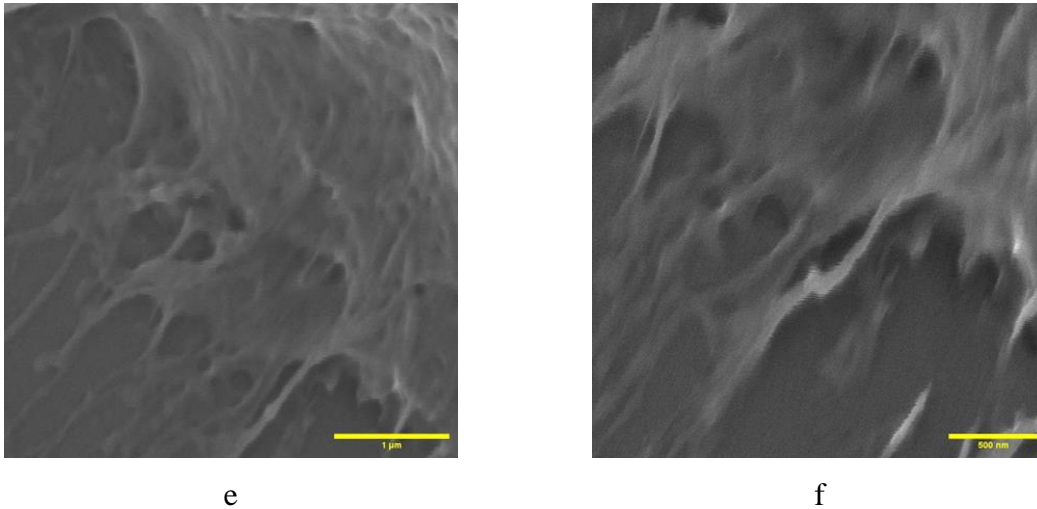
b



c



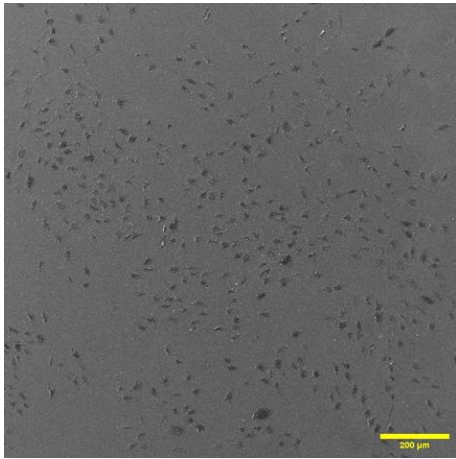
d



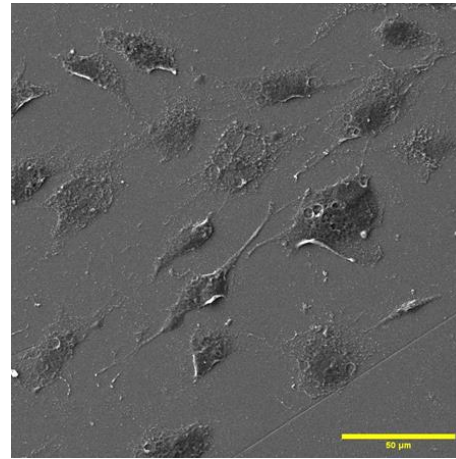
**Figura 47.** Caracterización ultra estructural de MG-63 con colchicina: a) 200 µm; b) 50 µm; c) 10 µm; d) 2 µm; e) 1 µm; f) 500 nm

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

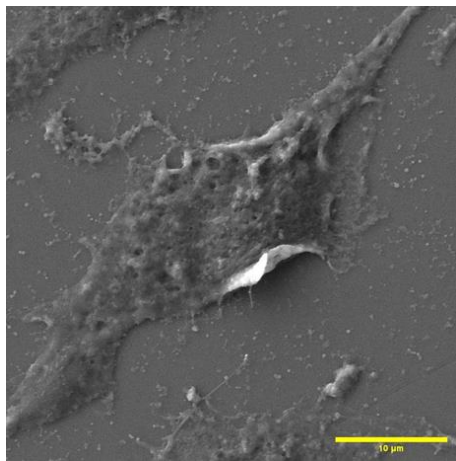
Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 48 a-f) exhibieron un daño morfológico significativo consistente con la senescencia celular inducida por estrés oxidativo, pero a menor escala que las As NPs (168). Muchas de las células aparecieron hinchadas, con membranas rotas, lo que indica necrosis, mientras que otras mostraron signos de apoptosis, como vesículas y encogimiento de la membrana. Los restos celulares observados y las estructuras celulares desintegradas sugieren que la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó un daño oxidativo, que abrumó las defensas antioxidantes de las células. Este estrés oxidativo puede dañar componentes celulares clave, incluidos lípidos, proteínas y ADN, lo que en última instancia conduce a la muerte celular (169). La variabilidad en la morfología celular, con algunas células que experimentan apoptosis y otras necrosis, es probablemente un reflejo de la concentración y la duración de la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



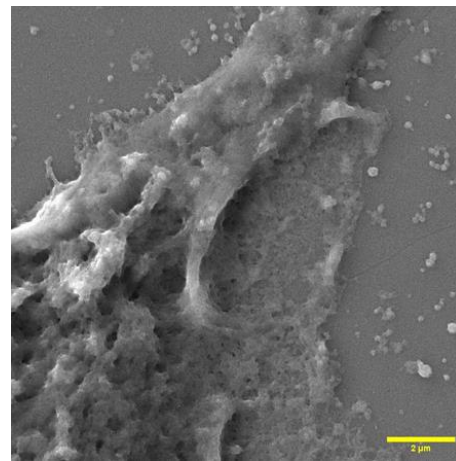
a



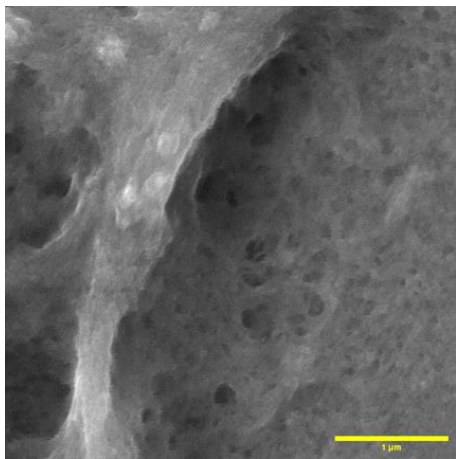
b



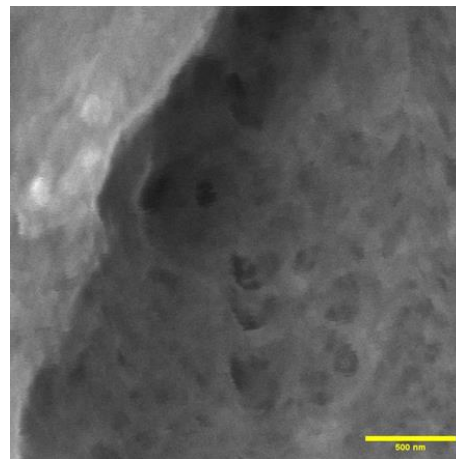
c



d



e



f

**Figura 48.** Caracterización ultra estructural de MG-63 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a) 200 μm; b) 50 μm; c) 10 μm; d) 2 μm; e) 1 μm; f) 500 nm

Los resultados del SEM proporcionan evidencia convincente de los efectos diferenciales de los tratamientos en las células de MG-63. El grupo de control mostró una morfología de osteosarcoma normal, con células sanas adhesión y propagación, mientras que los grupos tratados exhibieron daños significativos debido a los efectos citotóxicos de las sustancias utilizadas. El extracto de planta concentrado indujo apoptosis, como se evidenció por la contracción celular y la formación de ampollas en la membrana. La colchicina detuvo eficazmente la división celular, causando un arresto mitótico y una apoptosis posterior, como se vio en la morfología celular redondeada. Por último, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un estrés oxidativo severo, causando muerte celular tanto apoptótica como necrótica. Por último, las As NPs tuvieron el efecto citotóxico más pronunciado, lo que llevó a una apoptosis o necrosis avanzada superando a la colchicina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dos moléculas utilizadas actualmente en el tratamiento contra el cáncer y con mecanismos bien estudiados.

## **Farmacología en red**

### **Genes sobre expresados en osteosarcoma**

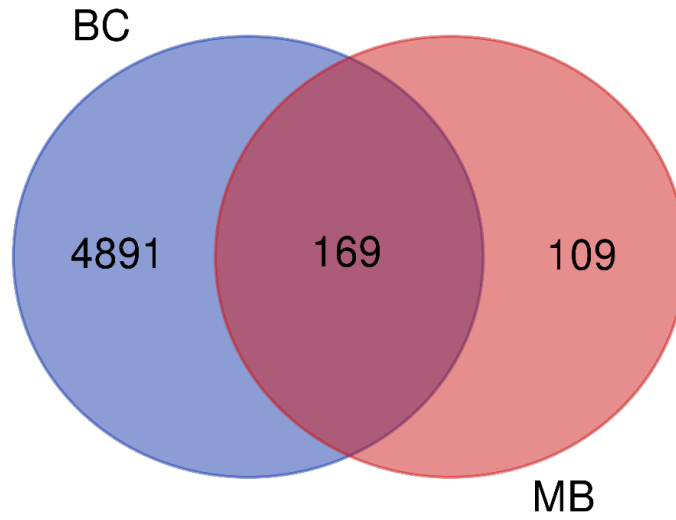
Las diferentes bases de datos proporcionaron un número considerable de genes sobre expresados para el osteosarcoma. La sumatoria de todos los genes sin repetir y con una  $p < 0.05$  fue de 5060.

### **Genes objetivos para los metabolitos secundarios**

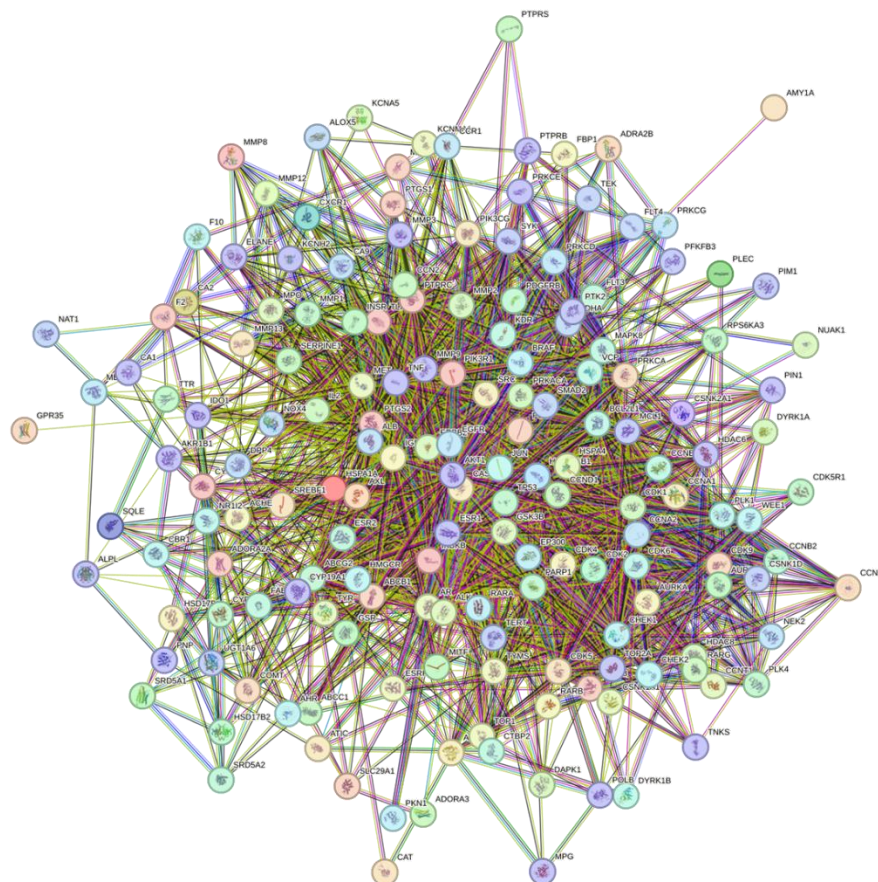
Debido a las propiedades fisicoquímicas de las moléculas identificadas en la planta bajo estudio, un número considerable de genes son afines a estas moléculas. La sumatoria de todos estos genes objetivo fue de 278.

### **Interacción proteína-proteína**

Determinados los genes sobre expresados en el osteosarcoma y los genes objetivos afines a las moléculas identificadas por LC-MS/MS, se aplicó un diagrama de Venn con la intención de conocer los genes que había en común (Figura 49). En total, 169 genes se interceptaron de los dos conjuntos de datos. Con estos datos, fue posible formar una red de genes y apreciar las interacciones entre ellos. En la Figura 50 se muestra la red de genes que involucra los 169 genes filtrados.

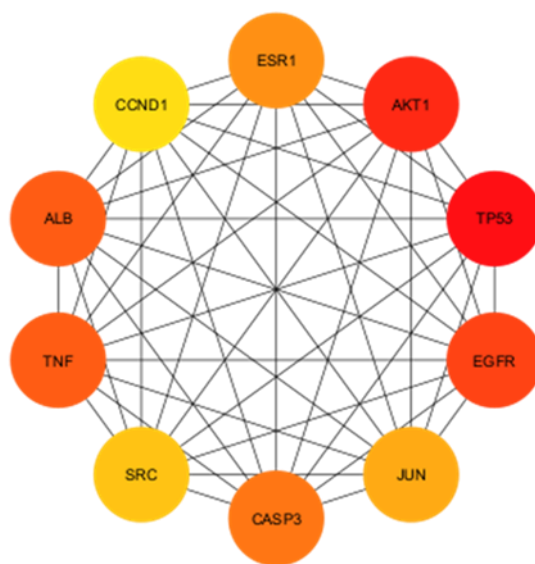


**Figura 49.** Diagrama de Venn de los genes sobreexpresados y genes target para osteosarcoma



**Figura 50.** Interacción entre genes sobreexpresados en el osteosarcoma y genes objetivos

En base a estas interacciones, hay proteínas que tienen más conexiones con otras proteínas. Estos genes son llamados genes centrales (Hub genes). En esta tesis, se resaltó 10 genes centrales y fueron utilizados para los análisis posteriores. Los 10 genes centrales resultantes se muestran en la Figura 51, donde la relevancia (conexiones) está plasmada en un gradiente de rojo a amarillo, donde el rojo es el de mayor relevancia.



**Figura 51.** Genes centrales procedentes de la red de genes de la Figura 50

La TP53 (proteína tumoral p53) es un supresor de tumores bien conocido, cuya función principal es regular el ciclo celular, reparar el ADN dañado y promover la apoptosis en respuesta al estrés genotóxico (170). Las mutaciones en TP53 son comunes en una amplia gama de cánceres, incluido el osteosarcoma, lo que conduce a la pérdida de control sobre el ciclo celular, la evasión de la apoptosis y, a menudo, una mayor resistencia a las terapias quimioterapéuticas (171).

AKT1 (alfa serina/treonina-proteína quinasa) es un componente clave de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, que desempeña un papel fundamental en la regulación de la supervivencia celular, el crecimiento y el metabolismo (172). La sobreexpresión o activación aberrante de AKT1 puede llevar a la evasión de la apoptosis, promoviendo la supervivencia de células cancerígenas y contribuyendo a la progresión del cáncer (173).

EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) es un receptor tirosina quinasa involucrado en las vías MAPK y PI3K/AKT, las cuales son fundamentales en la regulación de la proliferación celular y la supervivencia. Su activación descontrolada, ya sea por mutaciones o sobreexpresión, está relacionada con diversos tipos de cáncer, convirtiéndose en una diana terapéutica clave en los tratamientos antineoplásicos (174). Inhibidores del EGFR se han utilizado exitosamente para tratar cánceres dependientes de esta ruta, como el cáncer de pulmón y colorectal (175).

TNF (factor de necrosis tumoral) es una citocina proinflamatoria que juega un papel en inducir apoptosis en células tumorales y promover la inflamación crónica, que facilita la progresión tumoral y la metástasis (176). Su papel en la activación de la apoptosis o en la promoción de la supervivencia depende del contexto celular y de las interacciones con otras moléculas de señalización.

ALB (albúmina), una proteína plasmática clave, a menudo se encuentra alterada en condiciones de cáncer, aunque no actúa directamente en las rutas de señalización (177). La albúmina puede unirse a diversos fármacos, lo que ha llevado a su uso como vehículo de entrega de medicamentos en terapias contra el cáncer (178). Su implicación en el contexto de la progresión tumoral radica en su capacidad de transportar ligandos y mediar en el metabolismo de moléculas bioactivas como es el caso del Abraxane®.

CASP3 (Caspasa-3) es una proteasa crucial en la ejecución de la apoptosis. Activada a través de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, CASP3 descompone proteínas celulares clave para provocar la muerte celular programada (179). Su inactivación o inhibición, a menudo observada en cánceres resistentes a la apoptosis, favorece la supervivencia de células malignas y dificulta el tratamiento.

JUN (proteína c-Jun) es un componente del complejo de factores de transcripción AP-1 y está involucrado en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la transformación celular (180). La sobreexpresión de c-Jun promueve el crecimiento tumoral al facilitar la evasión de la apoptosis y la proliferación descontrolada.

SRC (protooncogén tirosina-proteína quinasa SRC) es un oncogén no receptor que participa en diversas rutas de señalización, incluidas las asociadas con la supervivencia celular, la

proliferación y la migración. Su activación aberrante ha sido implicada en la progresión tumoral y la metástasis, especialmente en cánceres de mama, colon y pulmón. Inhibidores de SRC están siendo explorados como posibles terapias en cánceres con activación excesiva de esta quinasa.

CCND1 (Ciclina D1) es un regulador crítico del ciclo celular que facilita la transición de la fase G1 a la fase S al formar complejos con las quinasas dependientes de ciclinas (CDK4/6) (181). La sobreexpresión de CCND1 se ha asociado con el crecimiento tumoral descontrolado, ya que impulsa la proliferación celular y contribuye a la resistencia a la apoptosis (182).

La presencia de algunos de estos genes era esperada, dado que participan en rutas moleculares asociadas con diversos tipos de cáncer. Esta relevancia se aprecia claramente en la Figura 52, que muestra la ruta general del cáncer, destacando en rojo los genes clave. La figura es crucial, ya que revela cómo solo cinco moléculas interactúan para bloquear diferentes vías implicadas en el desarrollo del cáncer. Los cuatro mecanismos principales involucrados son la apoptosis, la proliferación, la angiogénesis y la inestabilidad genómica.

Los genes señalados en rojo relacionados con la apoptosis incluyen TP53, CASP3, CCND1 y AKT1. En cuanto a la proliferación, los genes destacados fueron AKT1, CCND1 y CASP3. Para la angiogénesis, los genes involucrados fueron AKT1, EGFR y JUN. Finalmente, en la estabilidad genómica, el gen central fue TP53. Esta clasificación de genes en las principales vías del cáncer subraya la interconexión de los mecanismos celulares clave y la participación de moléculas específicas en más de un proceso.

## **Enriquecimiento funcional y análisis de vías**

### ***Proceso biológico***

El análisis de enriquecimiento destaca varias vías críticas implicadas en el osteosarcoma (Figura 53 a). Los resultados muestran un fuerte énfasis en la regulación del ciclo celular a través de las quinasas dependientes de ciclina (CDK), siendo las cuatro primeras posiciones relacionadas a estas quinasas. Estas quinasas son esenciales para la proliferación descontrolada observada en el osteosarcoma, y su regulación positiva surge como una estrategia para su tratamiento (183). Los metabolitos secundarios, conocidos por sus diversas

propiedades activas, podrían aprovecharse para modular la actividad de las CDK y restablecer el control adecuado del ciclo celular, inhibiendo potencialmente la progresión tumoral (184). Además, los datos indican un papel significativo para el estrés oxidativo y las respuestas al estrés químico, que son vulnerabilidades explotables en el osteosarcoma.

La combinación de inhibidores de CDK derivados de fuentes naturales con compuestos que modulan las respuestas al estrés oxidativo y al estrés químico (los siguientes resultados del proceso biológico) podría ofrecer un enfoque multifacético para el tratamiento del osteosarcoma (185). Esta estrategia no solo limitaría la proliferación celular, sino que también mejoraría la susceptibilidad de las células tumorales a la muerte celular inducida por estrés, proporcionando una alternativa dirigida y menos tóxica a los tratamientos convencionales.

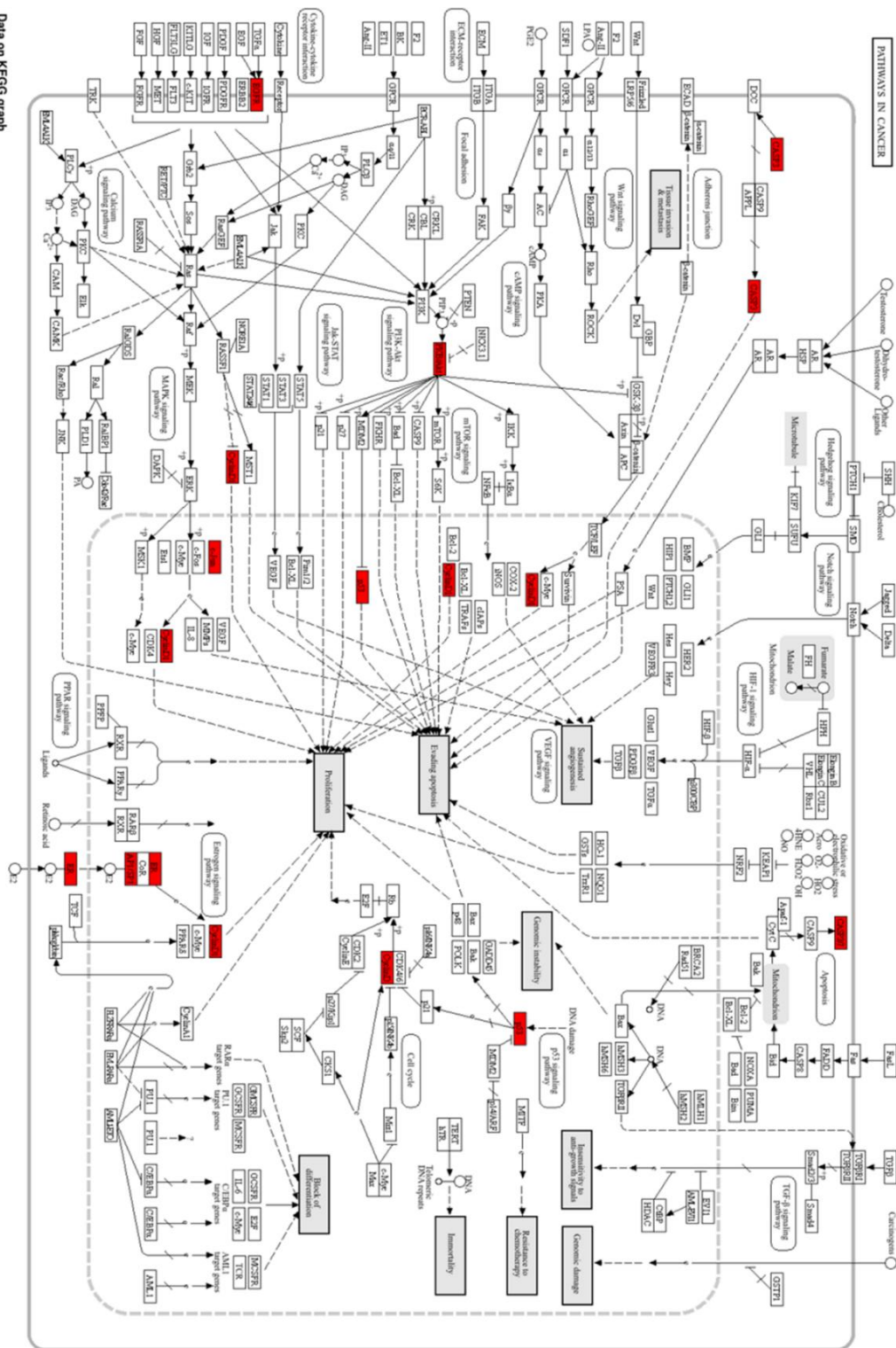
El enriquecimiento de los procesos relacionados con la regulación de las CDK, el estrés oxidativo y la respuesta al estrés subraya su importancia en el osteosarcoma. Los metabolitos secundarios que actúan sobre estas vías podrían ser candidatos prometedores para futuras terapias contra el osteosarcoma, mejorando potencialmente los resultados de los pacientes y minimizando los efectos secundarios asociados con los tratamientos quimioterapéuticos tradicionales.

### ***KEGG***

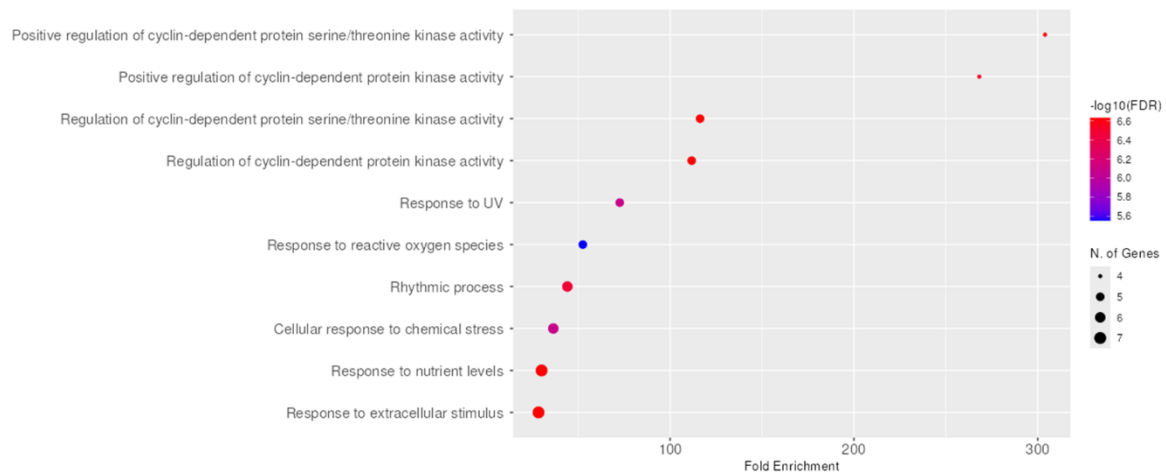
El análisis de enriquecimiento de la vía KEGG revela múltiples vías relevantes tanto para el osteosarcoma como para los posibles efectos de los metabolitos secundarios. Las vías más significativas se destacan por su alto enriquecimiento y  $-\log_{10}(\text{FDR})$ , lo que indica su relevancia estadística, pero, también es de suma relevancia el número de genes envueltos en dichas vías.

La Figura 53 b revela varias vías clave (resistencia endocrina, proteoglicanos en el cáncer, cáncer colorectal, apoptosis y señalización MAPK) que son muy relevantes para el desarrollo y la progresión del osteosarcoma (186). Estas vías no solo son fundamentales en el osteosarcoma, sino que también comparten mecanismos con otros tipos de cáncer, lo que proporciona un contexto más amplio para abordarlas con terapias.

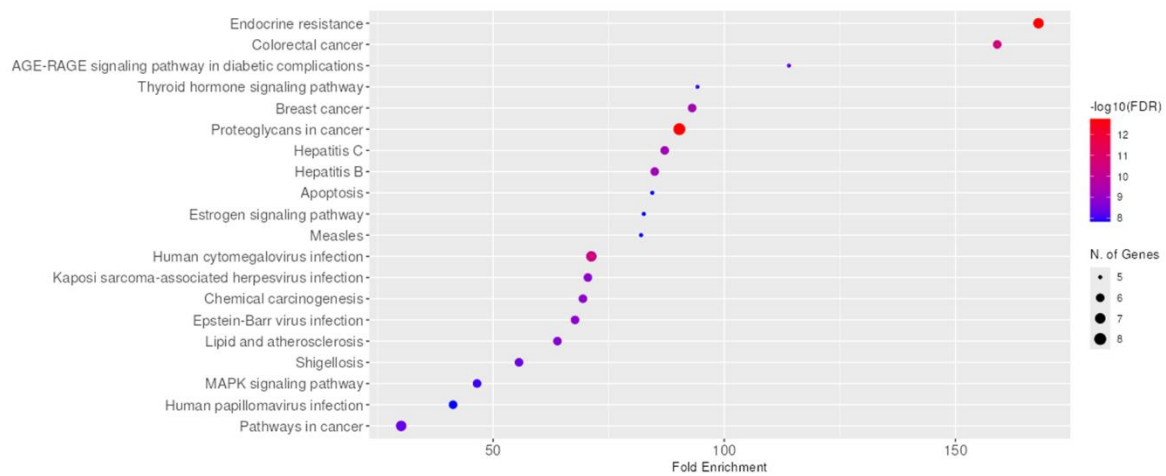
Data on KEGG graph  
Downloaded from DrugBank.com



**Figura 52.** Ruta general del cáncer resultado en rojo la acción de las 5 moléculas procedentes del extracto de planta



a)



b)

**Figura 53.** Predicción de ontología génica de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii*: a) proceso biológico y b) KEGG

Los metabolitos secundarios analizados en esta tesis demuestran ser candidatos prometedores para la intervención en el osteosarcoma. La integración de productos naturales en los regímenes de tratamiento del osteosarcoma puede ofrecer nuevas vías para reducir la progresión tumoral, promover la apoptosis y abordar vías de señalización aberrantes.

## **Acoplamiento molecular**

Para el estudio de acoplamiento molecular, se tomaron los tres genes centrales de mayor relevancia debido a que, se encuentran en rutas relevantes como son la evasión de la apoptosis, proliferación e invasión de tejidos.

## **Energía de enlace y residuos**

Las proteínas clave obtenidas por farmacología en red conjugan con estudios previos. Particularmente para el osteosarcoma, las rutas centradas en atacar a proteínas clave como AKT1, EGFR y TP53 tienen como intención alterar el crecimiento, la supervivencia y la metástasis del tumor (173,187,188). Por lo que, explorar la afinidad y las interacciones moleculares de compuestos previamente identificado por UHPLC-MS/MS con las proteínas mencionadas con anterioridad abre paso a desarrollar propuestas innovadoras como estrategia terapéutica. Cada compuesto interactúa con residuos específicos a través de varios tipos de interacción, lo que proporciona información sobre posibles afinidades de unión y mecanismos de inhibición para rutas particulares.

### ***Interacciones del kaempferol***

El kaempferol es un flavonoide con propiedades anticancerígenas conocidas que ya se ha evaluado su interacción con AKT1, EGFR, y TP53, en diferentes tipos de cáncer como de pulmón, esófago y mama (189–191). En nuestro estudio, las conformaciones para los tres cristales presentaron una energía de enlace inferior a -4.6 kcal/mol, teniendo una afinidad parecida para las conformaciones más apropiadas: -6.8 kcal/mol en AKT1, -5.9 kcal/mol en EGFR y -6.3 kcal/mol en TP53 (Figura 54).

Estos valores de energía de enlace son relevantes, puesto que se encuentran inferiores a -5.0 kcal/mol; una energía usada como parámetro en el acoplamiento molecular. Las interacciones de la proteína AKT1 muestran varias interacciones hidrofóbicas y relacionadas con  $\pi$  en residuos como 156 ( $\pi$ -alquilo) y 281 ( $\pi$ -azufre), que pueden estabilizar el kaempferol dentro del sitio de unión, inhibiendo potencialmente la actividad de fosforilación de AKT1. La unión al EGFR incluye interacciones en residuos como 694 ( $\pi$ -sigma) y 719 ( $\pi$ -alquilo), que son cruciales para las funciones de señalización del EGFR en el osteosarcoma. Para TP53, los enlaces de hidrógeno convencionales en los residuos 176 y 174 pueden reforzar la unión del

compuesto, posiblemente estabilizando TP53 para promover sus funciones supresoras de tumores.

### ***Interacciones con luteolina***

Similar al kaempferol, la luteolina obtuvo una energía de enlace sobresaliente para todos los cristales evaluados. Revisando sus conformaciones todas fueron inferiores a -4.6 kcal/mol. Las conformaciones más afines mostraron energías de enlace de -6.9 kcal/mol, -6.3 kcal/mol, y -6.3 kcal/mol para AKT1, EGFR y TP53, respectivamente. Estos resultados muestran que la luteolina es ligeramente más afín a las proteínas evaluadas que el kaempferol.

En el caso de los residuos, la luteolina demuestra un patrón similar de interacciones, especialmente con AKT1 y EGFR, que involucra interacciones tanto hidrofóbicas (van der Waals) como polares. En AKT1, los residuos 156 y 228 son obtenidos debido a enlaces de van der Waals y de hidrógeno, lo que puede obstaculizar la señalización de supervivencia de AKT1. Dentro del EGFR, las interacciones clave ocurren en residuos como 832 y 830 (van der Waals), que contribuyen en la capacidad de la luteolina para interrumpir la dimerización del receptor y las vías de señalización posteriores. Por último, la interacción de la luteolina con TP53 incluye enlaces de hidrógeno en el residuo 171 e interacciones  $\pi$ -alquilo en 173, lo que potencialmente contribuye a la reactivación de la actividad supresora de tumores de TP53 en células de osteosarcoma.

### ***Interacciones con la rutina***

La rutina, un flavonoide glicosilado, interactúa ampliamente con las proteínas examinadas, demostrando una variedad de tipos de unión que mejoran su estabilidad en el sitio de unión de cada proteína. Estas interacciones se deben a la complejidad de la molécula. Las interacciones notables con AKT1 incluyen los residuos 160 (enlace de hidrógeno convencional) y 189 (van der Waals), que podrían influir en la configuración estructural de AKT1 e inhibir su actividad. La interacción con EGFR implica la formación de enlaces de hidrógeno en el residuo 721 y la interacción  $\pi$ -alquilo en 702, alineándose con regiones críticas para la actividad quinasa de EGFR. Dentro de TP53, la unión de Rutin incluye una interacción apilada  $\pi$ -alquilo en el residuo 23, que puede ayudar en la estabilización de TP53 y su papel regulador transcripcional en la apoptosis.

### ***Interacciones con ácido salicílico***

El ácido salicílico, conocido por sus propiedades antiinflamatorias, muestra interacciones específicas de enlaces de hidrógeno con residuos de AKT1 como 180 y 163, lo que indica un posible mecanismo para la modulación del sitio activo de AKT1. Con EGFR, el residuo 982 (enlace de hidrógeno convencional) puede ser crucial para anclar el ácido salicílico, lo que potencialmente afecta la afinidad de unión de EGFR con los socios de señalización descendentes. En TP53, el residuo 131 muestra un enlace de hidrógeno, que puede favorecer la reactivación de la función apoptótica de TP53, promoviendo así la muerte celular en el osteosarcoma.

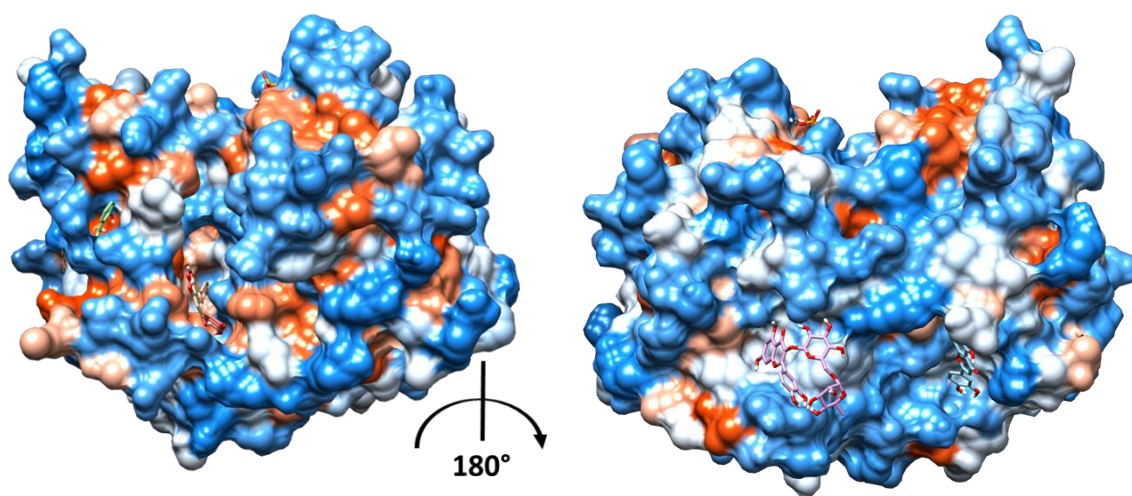
### ***Interacciones con escopoletina***

Las interacciones de la escopoletina en AKT1, EGFR y TP53 incluyen varias interacciones relacionadas con van der Waals y  $\pi$ , lo que sugiere un patrón de unión estable. En AKT1, el residuo 281 (van der Waals) y 234 (enlace de hidrógeno convencional) son notables por su potencial para interrumpir la activación de AKT1. Con EGFR, la escopoletina se une a residuos como 963 ( $\pi$ -sigma) y 951 ( $\pi$ -alquilo), posiblemente influyendo en la dinámica conformacional de EGFR y reduciendo la señalización. Dentro de TP53, las interacciones en los residuos 171 y 236 sugieren el papel de la escopoletina en el refuerzo de la estabilidad estructural de TP53, lo que podría ayudar a contrarrestar la desregulación característica de TP53 del osteosarcoma.

Las interacciones de unión reveladas en este estudio resaltan el potencial de estos compuestos para modular las proteínas clave involucradas en la progresión del osteosarcoma. Las interacciones hidrofóbicas y  $\pi$ , como se observa predominantemente en la unión de AKT1 y EGFR, indican una unión estable que puede bloquear las vías de señalización, mientras que los enlaces de hidrógeno, especialmente en TP53, sugieren efectos de estabilización beneficiosos para reactivar las funciones supresoras de tumores. Estos conocimientos moleculares podrían guiar el desarrollo de terapias combinadas que exploten estos mecanismos de unión para superar la resistencia terapéutica en el osteosarcoma.

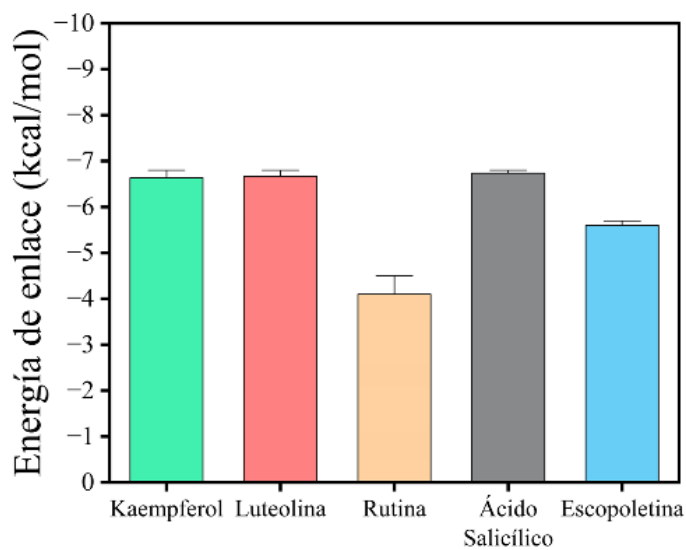
En base a los resultados de energía de enlace y residuos, las moléculas con mayor capacidad fueron el kaempferol y la luteolina. Un hecho a resaltar, son los resultados de concentración y acoplamiento molecular, ya que, las hojas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* contuvieron

una cantidad significativa de rutina respecto a las otras moléculas analizadas. No obstante, de acuerdo a los resultados de energía de enlace y residuos, otros metabolitos secundarios en menor proporción mostraron tener un mayor impacto en las proteínas evaluadas. Este resultado es de sumo interés, ya que demuestra uno de los puntos clave de la tesis, que es, la acción del conjunto de compuestos activos en una o varias vías.

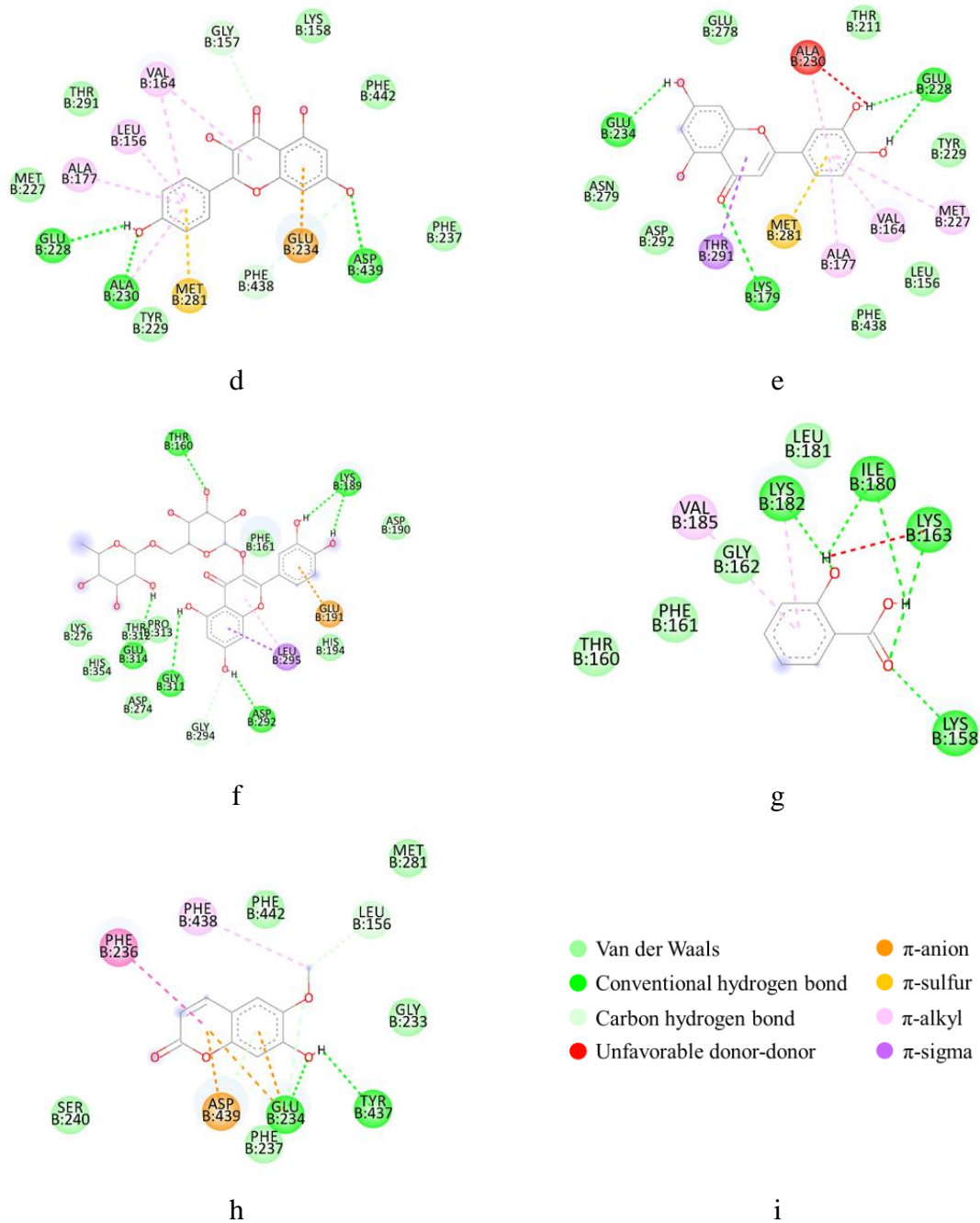


a

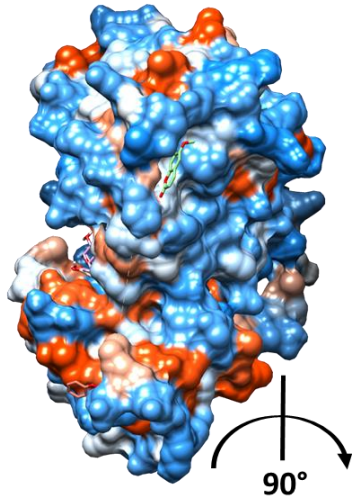
b



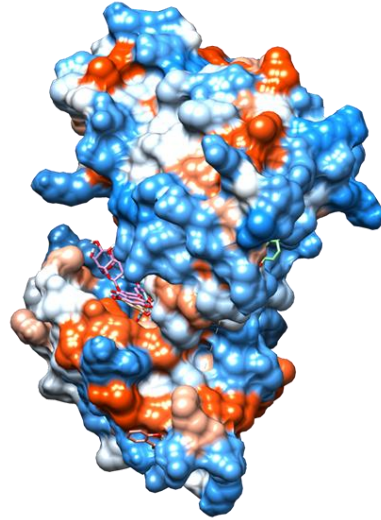
c



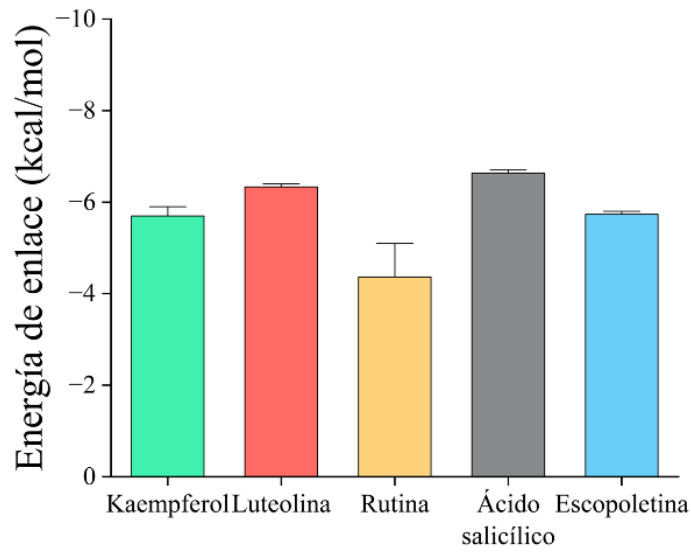
**Figura 54.** Interacciones y energías de enlace entre moléculas-AKT1: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 180°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones



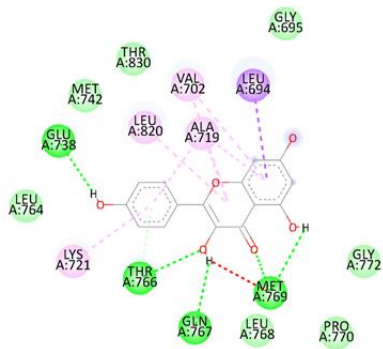
a



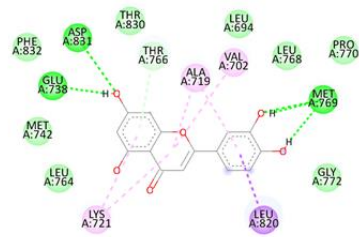
b



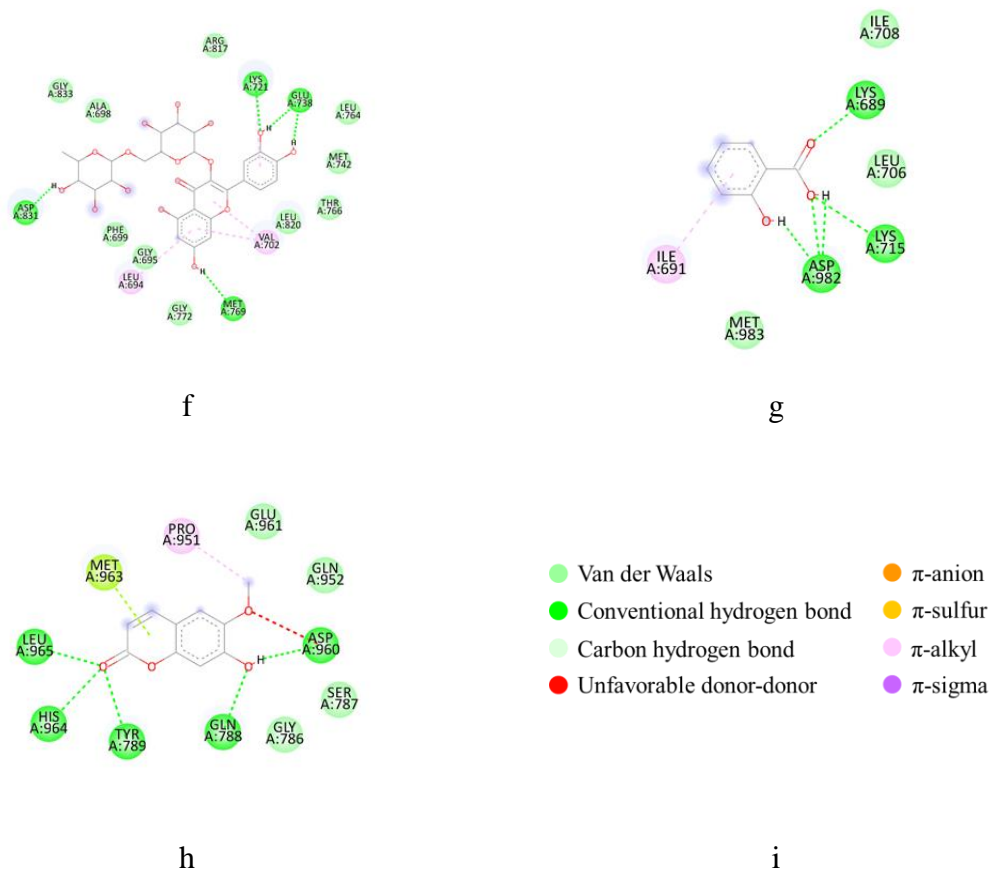
c



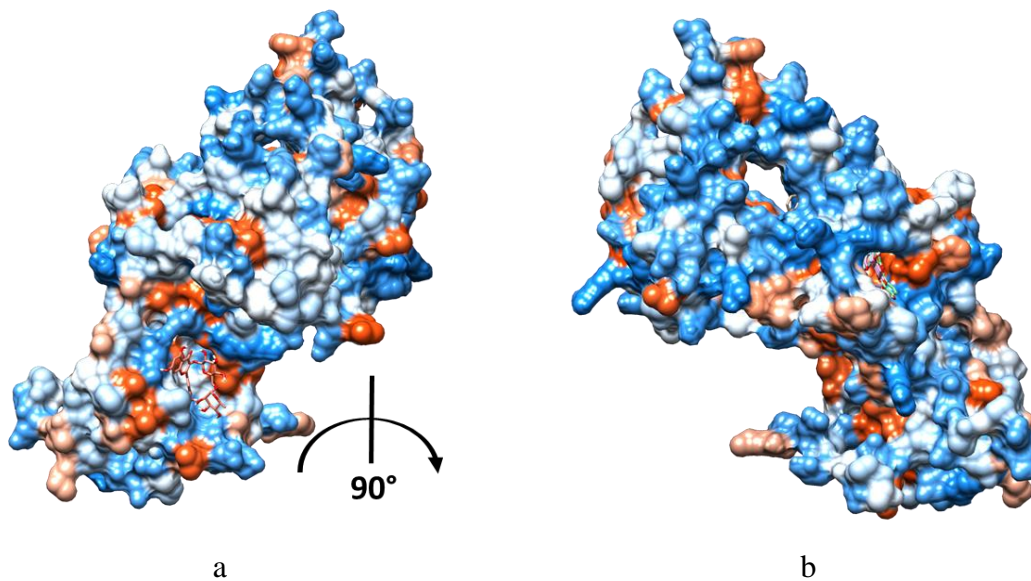
d

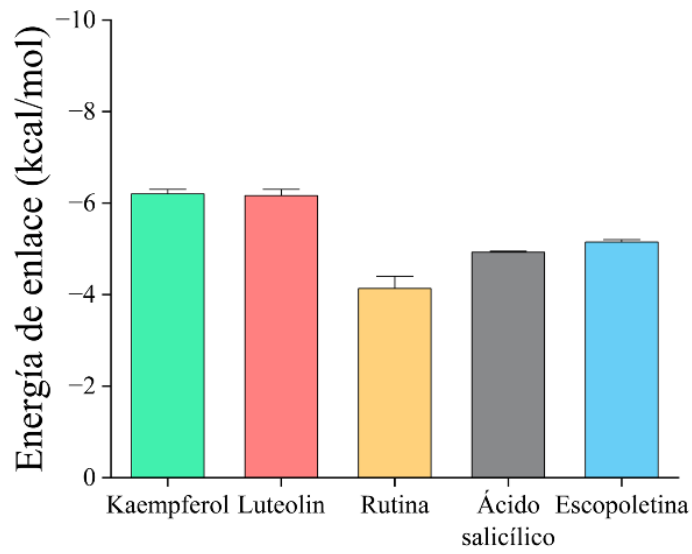


e

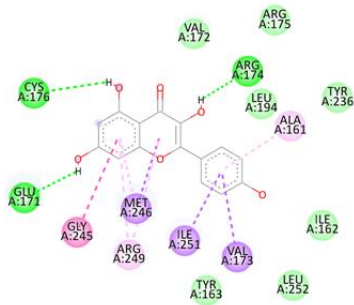


**Figura 55.** Interacciones y energías de enlace entre moléculas-EGFR: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 90°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones

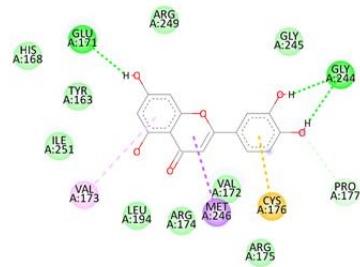




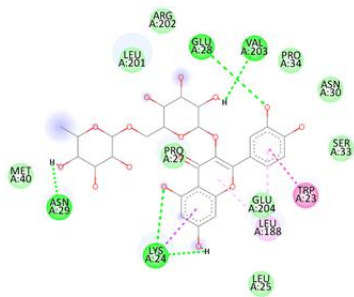
c



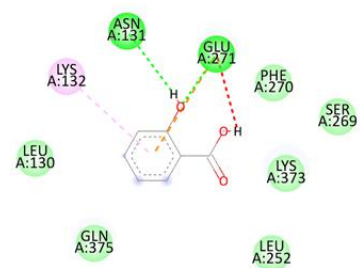
d



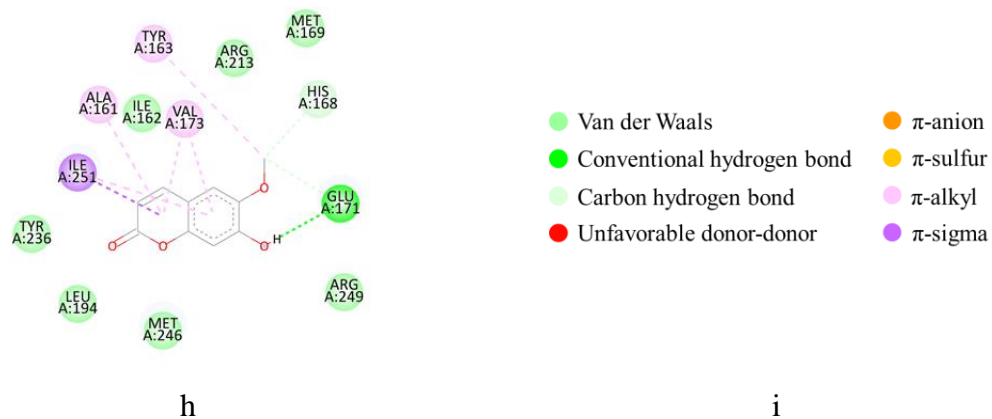
e



f



g



**Figura 56.** Interacciones y energías de enlace entre moléculas-TP53: a) representación 3D, b) representación 3D giro de 90°, c) energías de enlace, d) kaempferol, e) luteolina, f) rutina, g) ácido salicílico, h) escopoletina, i) nomenclatura de interacciones

# Capítulo 5 Conclusiones

## Etnofarmacobotánica vía nanotecnología

No es sorprendente que un gran número de medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades tenga sus raíces en la etnobotánica. En sus primeros usos, muchos compuestos naturales fueron aplicados a dolencias comunes; sin embargo, estas observaciones iniciales ofrecieron indicios clave para descartar, confirmar o predecir el potencial terapéutico de estas sustancias, en gran medida gracias a los avances de la ciencia moderna.

Esta tesis presenta un caso adicional en el que una planta, bajo un uso adecuado y responsable, muestra un potencial prometedor en el tratamiento del osteosarcoma, un tipo de cáncer que afecta principalmente a niños y jóvenes. Como se mencionó previamente, esta planta cuenta con un largo recorrido histórico de uso, y el reconocimiento de su capacidad medicinal se debe, en gran parte, al conocimiento de los grupos Yumanos, en particular de los Kumiai.

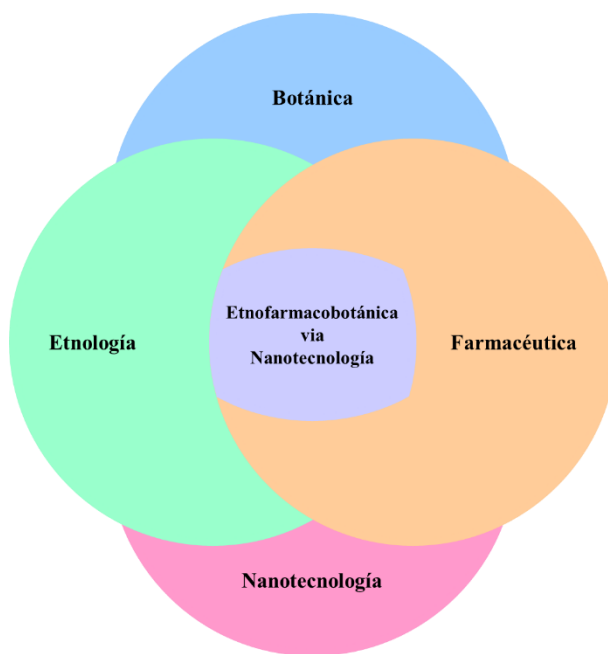
El concepto de “uso adecuado” es una enseñanza central que esta tesis busca transmitir. Tal como se discutió en la sección de identificación de la planta, actualmente se enfrenta un reto crítico: la explotación desmedida de esta especie, arrancada de su entorno natural y empleada de manera que solo fomenta su extinción. A lo largo de esta investigación, se ha mantenido un profundo respeto por la planta, utilizando únicamente 30 g de hojas secas para todos los análisis y pruebas. Esto evidencia que, cuando se actúa con conciencia y rigor, las plantas, verdaderos reactores químicos naturales, y sus productos (metabolitos primarios y secundarios) pueden continuar ofreciendo soluciones terapéuticas para una variedad de enfermedades. No obstante, es esencial que estas investigaciones vayan siempre acompañadas del rigor científico y la experiencia de expertos.

Otro aspecto disruptivo es el estudio de los compuestos como un conjunto y no de manera aislada. Es comprensible el enfoque tradicional de aislar y elucidar una molécula que tenga el efecto anticancerígeno deseado. No obstante, parte del éxito de la naturaleza radica en el trabajo conjunto de sus moléculas. Aquí demostramos cómo únicamente cinco compuestos

atacan de manera efectiva diferentes rutas del cáncer. Es de esperarse que, entre más compuestos se identifiquen y evalúen, más rutas serán intervenidas por las moléculas.

Como analogía a la tendencia de volver a considerar los productos naturales, en esta tesis también reivindicamos el papel crucial del arsénico (As) en el tratamiento contra el cáncer. Casi como presagio de Paul Ehrlich y su concepto de "magic bullet", que hoy en día denominamos terapia dirigida, empleamos precisamente ese concepto en esta tesis al usar un nanosistema (As NPs) conjugado con fitocompuestos. Los resultados de esta estrategia proporcionaron un potencial tratamiento contra el osteosarcoma, donde solo las etapas siguientes dirán si se convierte en una esperanza para las personas que sufren de cáncer.

Finalmente, cabe destacar la dualidad que subyace en esta investigación: un puente entre pasado y futuro. El pasado, representado por los antecedentes etnobotánicos, y el futuro, marcado por las pruebas, caracterizaciones y análisis modernos, con especial énfasis en el uso de nanotecnología y herramientas bioinformáticas. Esta conjunción es un claro ejemplo de cómo el conocimiento ancestral, en combinación con la ciencia contemporánea, puede abrir nuevas vías en la búsqueda de tratamientos efectivos contra enfermedades tan complejas como el cáncer.



**Figura 57.** Interacción y resumen de los pilares de esta tesis

## Referencias

1. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. octubre de 2016;388(10053):1659-724.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. noviembre de 2018;68(6):394-424.
3. Sharman R, Harris Z, Ernst B, Mussallem D, Larsen A, Gowin K. Lifestyle Factors and Cancer: A Narrative Review. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. abril de 2024;8(2):166-83.
4. Liu B, Zhou H, Tan L, Siu KTH, Guan XY. Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 17 de julio de 2024;9(1):175.
5. Van Ballegoie C, Man A, Win M, Yapp D. Spatially Specific Liposomal Cancer Therapy Triggered by Clinical External Sources of Energy. *Pharmaceutics*. 16 de marzo de 2019;11(3):125.
6. Hoeben A, Joosten EAJ, Van Den Beuken-van Everdingen MHJ. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers*. 11 de enero de 2021;13(2):242.
7. Naeem A, Hu P, Yang M, Zhang J, Liu Y, Zhu W, et al. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*. 30 de noviembre de 2022;27(23):8367.
8. the International Natural Product Sciences Taskforce, Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. marzo de 2021;20(3):200-16.
9. Wahle KWJ, Brown I, Rotondo D, Heys SD. Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. En: Giardi MT, Rea G, Berra B, editores. *Bio-Farms for Nutraceuticals* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010 [citado 24 de enero de 2024]. p. 36-51. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 698). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7347-4\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7347-4_4)
10. Ansari IA, Akhtar MS. Current Insights on the Role of Terpenoids as Anticancer Agents: A Perspective on Cancer Prevention and Treatment. En: Swamy MK, Akhtar MS, editores. *Natural Bio-active Compounds* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [citado 24 de enero de 2024]. p. 53-80. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-7205-6\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-7205-6_3)

11. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur J Pharmacol.* septiembre de 2019;858:172472.
12. Oommen S, Anto RJ, Srinivas G, Karunakaran D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol.* febrero de 2004;485(1-3):97-103.
13. Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol.* 28 de enero de 2020;10:1614.
14. Scarano FR, Fornero Aguiar AC, Mittermeier RA, Rylands AB. Megadiversity. En: *Encyclopedia of Biodiversity* [Internet]. Elsevier; 2024 [citado 24 de enero de 2024]. p. 868-84. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012822562200013X>
15. Raven PH, Gereau RE, Phillipson PB, Chatelain C, Jenkins CN, Ulloa Ulloa C. The distribution of biodiversity richness in the tropics. *Sci Adv.* 11 de septiembre de 2020;6(37):eabc6228.
16. Nolan JM, Turner NJ. Ethnobotany: The Study of People–Plant Relationships. En: Anderson EN, Pearsall D, Hunn E, Turner N, editores. *Ethnobiology* [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Wiley; 2011 [citado 8 de octubre de 2024]. p. 133-47. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118015872.ch9>
17. Waddell MA. Magic, Science, and Religion in Early Modern Europe [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press; 2021 [citado 8 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/product/identifiser/9781108348232/type/book>
18. Luiker H. The persistence of magic and religion in contemporary medicine and psychotherapy. *Group Anal.* diciembre de 2019;52(4):532-43.
19. Carod-Artal FJ. Alucinógenos en las culturas precolombinas mesoamericanas. *Neurología.* enero de 2015;30(1):42-9.
20. Roberto Rodríguez Soriano. ¿Jardines «botánicos» prehispánicos? Naturaleza como discurso histórico en los casos de Tetzcotzingo y Oaxtepec, México. *Cienc Nueva Rev Hist Política.* 2022;
21. -, Linares E. Los jardines botánicos de México, su historia, situación actual y retos futuros. *Rev Chapingo Ser Hortic.* febrero de 1994;I(02):29-42.
22. Barbero-Richart M. Los Códices Etnográficos: El «Códice Florentino». (14):349-79.
23. Solórzano Fonscea JC. La conservación de la memoria histórica de los pueblos del Anáhuac en los códices prehispánicos y manuscritos pictográficos coloniales de México:

- Del siglo XVI al siglo XXI. De Bernardino de Sahagún a Miguel León Portilla. *Rev Hist.* 1 de enero de 2023;(87):1-58.
24. Chatterjee A, Pal A, Paul S. A Novel Compound Plumercine from *Plumeria alba* Exhibits Promising Anti-Leukemic Efficacies against B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nutr Cancer.* 9 de agosto de 2022;74(7):2565-80.
  25. Topcu G, Cordell GA, Farnsworth NR, Fong HHS. Studies on Zoapatle VIII: Novel Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Montanoa tomentosa* ssp. *microcephala*. *J Pharm Sci.* junio de 1988;77(6):553-6.
  26. Hernández-Ramírez AM. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis: Códice de la Cruz-Badiano.* *Cuad Biodivers.* 15 de julio de 2020;(58):1.
  27. Basurto Peña FA, García Rivas I, Carrión Santos L, Orozco Almanza MS. Uso actual de las plantas del *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* o *Códice de la Cruz-Badiano* en México. *An Jardín Botánico Madr.* 18 de agosto de 2023;80(1):e135.
  28. Carlos Viesca Treviño. Francisco Hernández, Protomédico de Felipe II. *Rev Fav Med UNAM.* 1988;31(1):17-20.
  29. Tirso Ríos Castillo, Leovigildo Quijano, Ricardo Reyes Chilpa. Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Rev latinoam quím.* 2012;40(2).
  30. Luis Maldonado Polo. La expedición botánica a Nueva España, 1786-1803: el Jardín Botánico y la cátedra de botánica. *Historia Mexicana.* 2000;50(1):5-56.
  31. McVaugh R. El itinerario y las colectas de Sesse y Mociño en México. *Bot Sci.* 15 de mayo de 1969;(30):137-42.
  32. Rzedowski J. Maximino Martínez (1888-1964). *Bot Sci.* 15 de mayo de 1969;(30):23-9.
  33. Wang ML. The Modern Pharmaceutical Industry: History, Current Position and Challenges. En: *Global Health Partnerships* [Internet]. London: Palgrave Macmillan UK; 2009 [citado 8 de octubre de 2024]. p. 33-80. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1057/9780230582873\\_2](http://link.springer.com/10.1057/9780230582873_2)
  34. Bloom B, Ulliyot GE, editores. *Drug Discovery: Science and Development in a Changing Society* [Internet]. WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1971 [citado 8 de octubre de 2024]. (Advances in Chemistry; vol. 108). Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/book/10.1021/ba-1971-0108>
  35. Amurrio D. La quinina. Historia y Síntesis. *RevActaNova.* 2001;1(3).

36. Miller LH, Rojas-Jaimes J, Low LM, Corbellini G. What Historical Records Teach Us about the Discovery of Quinine. *Am J Trop Med Hyg.* 11 de enero de 2023;108(1):7-11.
37. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J.* diciembre de 2011;10(1):144.
38. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist.* abril de 2017;3(2):50-5.
39. Vadhel A, Bashir S, Mir AH, Girdhar M, Kumar D, Kumar A, et al. Opium alkaloids, biosynthesis, pharmacology and association with cancer occurrence. *Open Biol.* mayo de 2023;13(5):220355.
40. Wainwright M. Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes Pigments.* enero de 2008;76(3):582-9.
41. Rather IA, Kim BC, Bajpai VK, Park YH. Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J Biol Sci.* mayo de 2017;24(4):808-12.
42. Haque M, Rahman NAA, McKimm J, Kibria GM, Azim Majumder MA, Haque SZ, et al. Self-medication of antibiotics: investigating practice among university students at the Malaysian National Defence University. *Infect Drug Resist.* mayo de 2019;Volume 12:1333-51.
43. Astărăstoae V, Rogozea LM, Leășu FG, Roșca S. Drug Promotions Between Ethics, Regulations, and Financial Interests. *Am J Ther.* mayo de 2024;31(3):e268-79.
44. Eaton ML. Ethical Issues Associated with Pharmaceutical Innovation. En: Hanekamp G, Wütscher F, editores. *Business Ethics of Innovation* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [citado 15 de noviembre de 2024]. p. 39-62. (Ethics of Science and Technology Assessment; vol. ^31). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-72310-3\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-72310-3_4)
45. Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol Sci.* julio de 2011;122(1):1-6.
46. Anderson L. 10 of the Most Expensive Drugs in the U.S. [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.drugs.com/article/top-10-most-expensive-drugs.html>
47. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* diciembre de 2015;33(8):1582-614.
48. Kumar S, Singh B, Singh R. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. *J Ethnopharmacol.* febrero de 2022;284:114647.

49. Noble RL. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol.* 1 de diciembre de 1990;68(12):1344-51.
50. Taub JW, Buck SA, Xavier AC, Edwards H, Matherly LH, Ge Y. The evolution and history of *Vinca* alkaloids: From the Big Bang to the treatment of pediatric acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* noviembre de 2024;71(11):e31247.
51. Avendaño C, Menéndez JC. Medicinal chemistry of anticancer drugs. 2è édition. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier; 2015.
52. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett.* septiembre de 2018;28(17):2816-26.
53. Barbier P, Tsvetkov PO, Breuzard G, Devred F. Deciphering the molecular mechanisms of anti-tubulin plant derived drugs. *Phytochem Rev.* marzo de 2014;13(1):157-69.
54. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 8 de enero de 1998;391(6663):199-203.
55. Singh N, Agrawal P. A comprehensive review on the pharmacognostic and toxicological profile of *Podophyllum peltatum* (Bajiaolian). *Pharmacol Res - Mod Chin Med.* marzo de 2024;10:100353.
56. Motyka S, Jaferník K, Ekiert H, Sharifi-Rad J, Calina D, Al-Omari B, et al. Podophyllotoxin and its derivatives: Potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy. *Biomed Pharmacother.* febrero de 2023;158:114145.
57. Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, et al. Structural Basis of Type II Topoisomerase Inhibition by the Anticancer Drug Etoposide. *Science.* 22 de julio de 2011;333(6041):459-62.
58. Le TT, Wu M, Lee JH, Bhatt N, Inman JT, Berger JM, et al. Etoposide promotes DNA loop trapping and barrier formation by topoisomerase II. *Nat Chem Biol.* mayo de 2023;19(5):641-50.
59. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* mayo de 2009;9(5):338-50.
60. Chen SF, Huang NL, Lin JH, Wu CC, Wang YR, Yu YJ, et al. Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II DNA-gate. *Nat Commun.* 6 de agosto de 2018;9(1):3085.
61. Zhang W, Gou P, Dupret JM, Chomienne C, Rodrigues-Lima F. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Transl Oncol.* octubre de 2021;14(10):101169.

62. Wani MC, Horwitz SB. Nature as a remarkable chemist: a personal story of the discovery and development of Taxol. *Anticancer Drugs*. junio de 2014;25(5):482-7.
63. Miller HI. The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug. *Nat Med*. febrero de 2001;7(2):148-148.
64. Lim PT, Goh BH, Lee WL. Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. En: *Paclitaxel* [Internet]. Elsevier; 2022 [citado 7 de noviembre de 2024]. p. 47-71. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323909518000072>
65. Kellogg EH, Hejab NMA, Howes S, Northcote P, Miller JH, Díaz JF, et al. Insights into the Distinct Mechanisms of Action of Taxane and Non-Taxane Microtubule Stabilizers from Cryo-EM Structures. *J Mol Biol*. marzo de 2017;429(5):633-46.
66. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. abril de 2008;1785(2):96-132.
67. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J. Homoharringtonine/Omacetaxine Mepesuccinate: The Long and Winding Road to Food and Drug Administration Approval. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. octubre de 2013;13(5):530-3.
68. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Homoharringtonine, omacetaxine mepesuccinate, and chronic myeloid leukemia circa 2009. *Cancer*. diciembre de 2009;115(23):5382-93.
69. Alvandi F, Kwitkowski VE, Ko CW, Rothmann MD, Ricci S, Saber H, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Omacetaxine Mepesuccinate as Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *The Oncologist*. 1 de enero de 2014;19(1):94-9.
70. Li S, Chen Y. Omacetaxine mepesuccinate in the treatment of intractable chronic myeloid leukemia. *OncoTargets Ther*. enero de 2014;177.
71. Kim JC, Chan-Seng-Yue M, Ge S, Zeng AGX, Ng K, Gan OI, et al. Transcriptomic classes of BCR-ABL1 lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. julio de 2023;55(7):1186-97.
72. Loveland AB, Svidritskiy E, Susorov D, Lee S, Park A, Zvornicanin S, et al. Ribosome inhibition by C9ORF72-ALS/FTD-associated poly-PR and poly-GR proteins revealed by cryo-EM. *Nat Commun*. 19 de mayo de 2022;13(1):2776.
73. Baell J, Congreve M, Leeson P, Abad-Zapatero C. Ask the Experts: Past, Present and Future of the Rule of Five. *Future Med Chem*. mayo de 2013;5(7):745-52.
74. Yuan S, Ma T, Zhang YN, Wang N, Baloch Z, Ma K. Novel drug delivery strategies for antidepressant active ingredients from natural medicinal plants: the state of the art. *J Nanobiotechnology*. 27 de octubre de 2023;21(1):391.

75. Sofias AM, Dunne M, Storm G, Allen C. The battle of “nano” paclitaxel. *Adv Drug Deliv Rev.* diciembre de 2017;122:20-30.
76. Tomao S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®; ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine.* abril de 2009;99.
77. Liu Y, Li Y, Shen W, Li M, Wang W, Jin X. Trend of albumin nanoparticles in oncology: a bibliometric analysis of research progress and prospects. *Front Pharmacol.* 12 de julio de 2024;15:1409163.
78. Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P, et al. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* agosto de 2006;17(8):1263-8.
79. Yardley DA. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J Controlled Release.* septiembre de 2013;170(3):365-72.
80. Iglesias J. nab-Paclitaxel (Abraxane®): an albumin-bound cytotoxic exploiting natural delivery mechanisms into tumors. *Breast Cancer Res.* junio de 2009;11(S1):S21.
81. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng Des Sel.* junio de 1999;12(6):439-46.
82. Silverman JA, Deitcher SR. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol.* marzo de 2013;71(3):555-64.
83. Shah NN, Schafer ES, Heym KM, Place AE, Burns MA, Gossai N, et al. Vincristine Sulfate Liposome Injection (VSLI, Marqibo®) in Combination with UK ALL-R3 Induction Chemotherapy for Children, Adolescents and Young Adults with Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): A Therapeutic Advances in Childhood Leukemia and Lymphoma (TACL) Consortium Trial. *Blood.* 5 de noviembre de 2021;138(Supplement 1):3402-3402.
84. Gao W, Hu CMJ, Fang RH, Zhang L. Liposome-like nanostructures for drug delivery. *J Mater Chem B.* 2013;1(48):6569.
85. PHARMACOGNOSY: fundamentals, applications and strategies. S.l.: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2023. 1 p.
86. Evans WC, Evans D, Trease GE. Trease and Evans pharmacognosy. 16th ed. Edinburgh ; New York: Saunders/Elsevier; 2009. 603 p.
87. Harborne JB. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. 1 p.

88. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T, editores. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry [Internet]. 0 ed. CRC Press; 2008 [citado 8 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420046786>
89. Hahn-Deinstrop E. Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes. 2nd revised and enlarged ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. 314 p.
90. Meyers CLF. Thin-Layer Chromatography. Curr Protoc Nucleic Acid Chem [Internet]. diciembre de 2000 [citado 8 de noviembre de 2024];3(1). Disponible en: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142700.nca03ds03>
91. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. Nucleic Acids Res. 2 de julio de 2019;47(W1):W357-64.
92. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. Nucleic Acids Res. 4 de enero de 2016;44(D1):D380-4.
93. Nickel J, Gohlke BO, Erehman J, Banerjee P, Rong WW, Goede A, et al. SuperPred: update on drug classification and target prediction. Nucleic Acids Res. 1 de julio de 2014;42(W1):W26-31.
94. Liu Z, Guo F, Wang Y, Li C, Zhang X, Li H, et al. BATMAN-TCM: a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine. Sci Rep. 16 de febrero de 2016;6(1):21146.
95. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. Nucleic Acids Res. 3 de julio de 2017;45(W1):W98-102.
96. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. Curr Protoc Bioinforma [Internet]. junio de 2016 [citado 13 de noviembre de 2024];54(1). Disponible en: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpbi.5>
97. Piñero J, Ramírez-Anguita JM, Saüch-Pitarch J, Ronzano F, Centeno E, Sanz F, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. Nucleic Acids Res. 4 de noviembre de 2019;gkz1021.
98. Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. Clin Pharmacol Ther. septiembre de 2021;110(3):563-72.
99. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional

- enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 6 de enero de 2023;51(D1):D638-46.
100. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* noviembre de 2003;13(11):2498-504.
  101. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. Valencia A, editor. *Bioinformatics.* 15 de abril de 2020;36(8):2628-9.
  102. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminformatics.* diciembre de 2012;4(1):17.
  103. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* diciembre de 2009;30(16):2785-91.
  104. Rizvi SMD, Shakil S, Haneef M. A simple click by click protocol to perform docking: AutoDock 4.2 made easy for non-bioinformaticians. *EXCLI J.* 2013;12:831-57.
  105. Holt PA, Chaires JB, Trent JO. Molecular docking of intercalators and groove-binders to nucleic acids using Autodock and Surfex. *J Chem Inf Model.* agosto de 2008;48(8):1602-15.
  106. Solares MJ, Jonaid GM, Luqiu WY, Berry S, Khadela J, Liang Y, et al. High-Resolution Imaging of Human Cancer Proteins Using Microprocessor Materials. *ChemBioChem.* 5 de septiembre de 2022;23(17):e202200310.
  107. Lin K, Lin J, Wu WI, Ballard J, Lee BB, Gloor SL, et al. An ATP-Site On-Off Switch That Restricts Phosphatase Accessibility of Akt. *Sci Signal [Internet].* 8 de mayo de 2012 [citado 8 de noviembre de 2024];5(223). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2002618>
  108. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell.* junio de 2006;125(6):1137-49.
  109. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* febrero de 2007;2(2):329-33.
  110. Wilken-Robertson M. Etnobotánica kumiai: el conocimiento sobre las plantas nativas de un pueblo indígena de Baja California. San Diego: Sunbelt Publications, Inc.; 2020.
  111. MUNZ PA. FLORA OF SOUTHERN CALIFORNIA. S.I.: UNIV OF CALIFORNIA PRESS; 2022.

112. The Jepson manual: vascular plants of California. 2nd ed. Berkeley: University of California press; 2012.
113. Yu J, Wang K, Zhao H, Chen L, Wang X. Bioactive constituents from the leaves of *Lonicera japonica*. *Fitoterapia*. octubre de 2022;162:105277.
114. Khan D, Khan S, Badshah S, Ali H, Ullah H, Muhammad Z, et al. New furocarbazole alkaloids from *Lonicera quinquelocularis*. *Nat Prod Res*. 2 de enero de 2016;30(1):74-8.
115. Ge L, Xie Q, Jiang Y, Xiao L, Wan H, Zhou B, et al. Genus *Lonicera*: New drug discovery from traditional usage to modern chemical and pharmacological research. *Phytomedicine*. febrero de 2022;96:153889.
116. Ge L, Xiao L, Wan H, Li J, Lv K, Peng S, et al. Chemical constituents from *Lonicera japonica* flower buds and their anti-hepatoma and anti-HBV activities. *Bioorganic Chem*. noviembre de 2019;92:103198.
117. Fang Z, Li J, Yang R, Fang L, Zhang Y. A Review: The Triterpenoid Saponins and Biological Activities of *Lonicera* Linn. *Molecules*. 19 de agosto de 2020;25(17):3773.
118. Ho Son K, Young Jung K, Wook Chang H, Pyo Kim H, Sik Kang S. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica*. *Phytochemistry*. marzo de 1994;35(4):1005-8.
119. Kumokita R, Yoshida T, Shirai T, Kondo A, Hasunuma T. Aromatic secondary metabolite production from glycerol was enhanced by amino acid addition in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. diciembre de 2023;107(24):7391-401.
120. Jurikova T, Rop O, Mlcek J, Sochor J, Balla S, Szekeres L, et al. Phenolic Profile of Edible Honeysuckle Berries (Genus *Lonicera*) and Their Biological Effects. *Molecules*. 22 de diciembre de 2011;17(1):61-79.
121. Liu X, Lv Y, Zheng M, Yin L, Wang X, Fu Y, et al. Polyphenols from blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis*) berry inhibit lipid accumulation in adipocytes by suppressing lipogenesis. *J Ethnopharmacol*. octubre de 2021;279:114403.
122. Shang X, Pan H, Li M, Miao X, Ding H. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol*. 31 de octubre de 2011;138(1):1-21.
123. Imai A, Horinaka M, Aono Y, Iizumi Y, Takakura H, Ono H, et al. Salicylic acid directly binds to ribosomal protein S3 and suppresses CDK4 expression in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. noviembre de 2022;628:110-5.
124. Nounu A, Richmond R, Stewart I, Surendran P, Wareham N, Butterworth A, et al. Salicylic Acid and Risk of Colorectal Cancer: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *Nutrients*. 21 de noviembre de 2021;13(11):4164.

125. Prasher P, Sharma M, Singh SK, Gulati M, Chellappan DK, Zacconi F, et al. Luteolin: a flavonoid with a multifaceted anticancer potential. *Cancer Cell Int.* 8 de diciembre de 2022;22(1):386.
126. Rauf A, Wilairatana P, Joshi PB, Ahmad Z, Olatunde A, Hafeez N, et al. Revisiting luteolin: An updated review on its anticancer potential. *Heliyon.* marzo de 2024;10(5):e26701.
127. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother.* abril de 2019;112:108612.
128. Parama D, Girisa S, Khatoon E, Kumar A, Alqahtani MS, Abbas M, et al. An overview of the pharmacological activities of scopoletin against different chronic diseases. *Pharmacol Res.* mayo de 2022;179:106202.
129. Gao XY, Li XY, Zhang CY, Bai CY. Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity. *Front Pharmacol.* 23 de febrero de 2024;15:1268464.
130. Satari A, Ghasemi S, Habtemariam S, Asgharian S, Lorigooini Z. Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2021;2021:9913179.
131. Imani A, Maleki N, Bohlouli S, Kouhsoltani M, Sharifi S, Maleki Dizaj S. Molecular mechanisms of anticancer effect of rutin. *Phytother Res.* mayo de 2021;35(5):2500-13.
132. Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aslam Gondal T, Saeed F, Imran A, et al. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Mol Basel Switz.* 19 de junio de 2019;24(12):2277.
133. Amjad E, Sokouti B, Asnaashari S. A systematic review of anti-cancer roles and mechanisms of kaempferol as a natural compound. *Cancer Cell Int.* 20 de agosto de 2022;22(1):260.
134. Vonaparti A, Lyris E, Panderi I, Koupparis M, Georgakopoulos C. Direct injection horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. III. Determination of salicylic acid by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* noviembre de 2009;395(5):1403-10.
135. Ding Y, Chen S, Wang H, Li S, Ma C, Wang J, et al. Identification of Secondary Metabolites in *Flammulina velutipes* by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS. Tang X zhi, editor. *J Food Qual.* 26 de julio de 2021;2021:1-8.
136. Kumar S, Singh A, Kumar B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J Pharm Anal.* agosto de 2017;7(4):214-22.

137. March RE, Miao XS. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Int J Mass Spectrom.* febrero de 2004;231(2-3):157-67.
138. Zeng Y, Li S, Wang X, Gong T, Sun X, Zhang Z. Validated LC-MS/MS Method for the Determination of Scopoletin in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetic Studies. *Molecules.* 19 de octubre de 2015;20(10):18988-9001.
139. Sip S, Sip A, Szulc P, Cielecka-Piontek J. Haskap Berry Leaves (*Lonicera caerulea* L.)-The Favorable Potential of Medical Use. *Nutrients.* 21 de septiembre de 2022;14(19):3898.
140. Feng YH, Zhang GD, Zhu PC, Zhu WH, Li YZ, Fan XW. Metabolite profiles and antibacterial and antioxidant activities of leaf extracts of five *Lonicera* species: a comparative study. *Chem Biol Technol Agric.* 12 de septiembre de 2023;10(1):91.
141. Lee J, Park G, Chang YH. Nutraceuticals and antioxidant properties of *Lonicera japonica* Thunb. as affected by heating time. *Int J Food Prop.* enero de 2019;22(1):630-45.
142. Wahidullah S, Naik DN, Devi P. Fermentation Products of Solvent Tolerant Marine Bacterium *Moraxella* spp. MB1 and Its Biotechnological Applications in Salicylic Acid Bioconversion. Strack S, editor. *PLoS ONE.* 31 de diciembre de 2013;8(12):e83647.
143. Kumari S, Raturi S, Kulshrestha S, Chauhan K, Dhingra S, András K, et al. A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles. *J Mater Res Technol.* noviembre de 2023;27:1739-63.
144. Savchenko P, Zelikovich D, Elgavi Sinai H, Baer R, Mandler D. The Effect of the Capping Agents of Nanoparticles on Their Redox Potential. *J Am Chem Soc.* 14 de agosto de 2024;146(32):22208-19.
145. Chandra K, Rugg BK, Ratner MA, Wasielewski MR, Odom TW. Detecting and Visualizing Reaction Intermediates of Anisotropic Nanoparticle Growth. *J Am Chem Soc.* 7 de marzo de 2018;140(9):3219-22.
146. Lojudice A, Buonsanti R. Reaction intermediates in the synthesis of colloidal nanocrystals. *Nat Synth.* 9 de mayo de 2022;1(5):344-51.
147. Gunasekaran V, Venkatesan LS, Sathishkumar P. How natural products involved in the 'green' synthesis of metallic nanoparticle? *Nat Prod Res.* 20 de octubre de 2024;1-2.
148. Lv Y, Li W, Liao W, Jiang H, Liu Y, Cao J, et al. Nano-Drug Delivery Systems Based on Natural Products. *Int J Nanomedicine.* enero de 2024;Volume 19:541-69.
149. Azad A, Zafar H, Raza F, Sulaiman M. Factors Influencing the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Extracts: A Comprehensive Review. *Pharm Fronts.* septiembre de 2023;05(03):e117-31.

150. Hong YS, Song KH, Chung JY. Health effects of chronic arsenic exposure. *J Prev Med Public Health Yebang Uihakhoe Chi.* septiembre de 2014;47(5):245-52.
151. Fatoki JO, Badmus JA. Arsenic as an environmental and human health antagonist: A review of its toxicity and disease initiation. *J Hazard Mater Adv.* febrero de 2022;5:100052.
152. Paul NP, Galván AE, Yoshinaga-Sakurai K, Rosen BP, Yoshinaga M. Arsenic in medicine: past, present and future. *BioMetals.* abril de 2023;36(2):283-301.
153. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 26 de febrero de 2009;113(9):1875-91.
154. Subastri A, Arun V, Sharma P, Preedia Babu E, Suyavaran A, Nithyananthan S, et al. Synthesis and characterisation of arsenic nanoparticles and its interaction with DNA and cytotoxic potential on breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* noviembre de 2018;295:73-83.
155. Satarzadeh N, Shakibaie M, Adeli-Sardou M, Jabari-Morouei F, Forootanfar H, Sadeghi-Dousari A. Facile Microwave-Assisted Biosynthesis of Arsenic Nanoparticles and Evaluation their Antioxidant Properties and Cytotoxic Effects: A Preliminary in Vitro Study. *J Clust Sci.* julio de 2023;34(4):1831-9.
156. Natasha, Shahid M, Dumat C, Khalid S, Rabbani F, Farooq ABU, et al. Foliar uptake of arsenic nanoparticles by spinach: an assessment of physiological and human health risk implications. *Environ Sci Pollut Res.* julio de 2019;26(20):20121-31.
157. Ostwald W. Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper. *Z Für Phys Chem.* 1900;34:495-503.
158. Kaňa A, Loula M, Mestek O. Controlled preparation of arsenic nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* noviembre de 2021;23(11):239.
159. Yu W, Liu R, Zhou Y, Gao H. Size-Tunable Strategies for a Tumor Targeted Drug Delivery System. *ACS Cent Sci.* 26 de febrero de 2020;6(2):100-16.
160. Xu J, Song M, Fang Z, Zheng L, Huang X, Liu K. Applications and challenges of ultra-small particle size nanoparticles in tumor therapy. *J Controlled Release.* enero de 2023;353:699-712.
161. Ambrose EJ, James AM, Lowick JHB. Differences between the Electrical Charge carried by Normal and Homologous Tumour Cells. *Nature.* marzo de 1956;177(4508):576-7.
162. Moleón Baca JA, Ontiveros Ortega A, Aránega Jiménez A, Granados Principal S. Cells electric charge analyses define specific properties for cancer cells activity. *Bioelectrochemistry.* abril de 2022;144:108028.



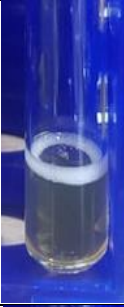


163. Chatree K, Sriboonaied P, Phetkong C, Wattananit W, Chanchao C, Charoenpanich A. Distinctions in bone matrix nanostructure, composition, and formation between osteoblast-like cells, MG-63, and human mesenchymal stem cells, UE7T-13. *Heliyon*. mayo de 2023;9(5):e15556.
164. Pratiwi L, Elisa E, Sutanto H. Probing the protrusions: lamellipodia and filopodia in cancer invasion and beyond. *Mechanobiol Med*. junio de 2024;2(2):100064.
165. Yu L, Zhu G, Zhang Z, Yu Y, Zeng L, Xu Z, et al. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *J Nanobiotechnology*. 12 de julio de 2023;21(1):218.
166. Tobeiha M, Rajabi A, Raisi A, Mohajeri M, Yazdi SM, Davoodvandi A, et al. Potential of natural products in osteosarcoma treatment: Focus on molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. diciembre de 2021;144:112257.
167. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine--Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum*. diciembre de 2015;45(3):341-50.
168. Hahn HJ, Kim KB, An IS, Ahn KJ, Han HJ. Protective effects of rosmarinic acid against hydrogen peroxide-induced cellular senescence and the inflammatory response in normal human dermal fibroblasts. *Mol Med Rep*. diciembre de 2017;16(6):9763-9.
169. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. agosto de 2020;38(2):167-97.
170. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*. diciembre de 2021;21(1):703.
171. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 1 de marzo de 2023;8(1):92.
172. Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol*. 24 de marzo de 2022;12:819128.
173. Zhang J, Yu XH, Yan YG, Wang C, Wang WJ. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta*. abril de 2015;444:182-92.
174. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers*. 1 de junio de 2021;13(11):2748.
175. Troiani T, Napolitano S, Della Corte CM, Martini G, Martinelli E, Morgillo F, et al. Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. *ESMO Open*. 2016;1(5):e000088.



176. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol.* febrero de 2020;43(1):1-18.
177. Yang Z, Zheng Y, Wu Z, Wen Y, Wang G, Chen S, et al. Association between pre-diagnostic serum albumin and cancer risk: Results from a prospective population-based study. *Cancer Med.* junio de 2021;10(12):4054-65.
178. Qu N, Song K, Ji Y, Liu M, Chen L, Lee R, et al. Albumin Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. *Int J Nanomedicine.* julio de 2024;Volume 19:6945-80.
179. Eskandari E, Negri GL, Tan S, MacAldaz ME, Ding S, Long J, et al. Dependence of human cell survival and proliferation on the CASP3 prodomain. *Cell Death Discov.* 6 de febrero de 2024;10(1):63.
180. Blau L, Knirsh R, Ben-Dror I, Oren S, Kuphal S, Hau P, et al. Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 16 de octubre de 2012 [citado 22 de noviembre de 2024];109(42). Disponible en: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1203659109>
181. Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol.* abril de 2010;223(1):14-26.
182. Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The Role of Src in Solid Tumors. *The Oncologist.* 1 de julio de 2009;14(7):667-78.
183. Ghafouri-Fard S, Khoshbakht T, Hussen BM, Dong P, Gassler N, Taheri M, et al. A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers. *Cancer Cell Int.* 20 de octubre de 2022;22(1):325.
184. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem Rev.* 8 de julio de 2009;109(7):3012-43.
185. Li K, Deng Z, Lei C, Ding X, Li J, Wang C. The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression. *Cells.* 2 de marzo de 2024;13(5):441.
186. Ji Z, Shen J, Lan Y, Yi Q, Liu H. Targeting signaling pathways in osteosarcoma: Mechanisms and clinical studies. *MedComm.* agosto de 2023;4(4):e308.
187. Saba KH, Difilippo V, Kovac M, Cornmark L, Magnusson L, Nilsson J, et al. Disruption of the *TP53* locus in osteosarcoma leads to *TP53* promoter gene fusions and restoration of parts of the *TP53* signalling pathway. *J Pathol.* febrero de 2024;262(2):147-60.
188. Borgatti A, Koopmeiners JS, Sarver AL, Winter AL, Stuebner K, Todhunter D, et al. Safe and Effective Sarcoma Therapy through Bispecific Targeting of EGFR and uPAR. *Mol Cancer Ther.* 1 de mayo de 2017;16(5):956-65.

189. Jo E, Park SJ, Choi YS, Jeon WK, Kim BC. Kaempferol Suppresses Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Migration of A549 Lung Cancer Cells by Inhibiting Akt1-Mediated Phosphorylation of Smad3 at Threonine-179. *Neoplasia* N Y N. julio de 2015;17(7):525-37.
190. Yao S, Wang X, Li C, Zhao T, Jin H, Fang W. Kaempferol inhibits cell proliferation and glycolysis in esophagus squamous cell carcinoma via targeting EGFR signaling pathway. *Tumor Biol.* agosto de 2016;37(8):10247-56.
191. Nandi SK, Pradhan A, Das B, Das B, Basu S, Mallick B, et al. Kaempferol attenuates viability of ex-vivo cultured post-NACT breast tumor explants through downregulation of p53 induced stemness, inflammation and apoptosis evasion pathways. *Pathol - Res Pract.* septiembre de 2022;237:154029.

# Apéndice

## Apéndice 1. Registro de barrido fitoquímico

Metabolitos	Evaluación	Resultado
Alcaloides	-	
Terpenoides	+	
Saponinas	+	
Flavonoides	+	
Antraquinonas	+	

Carbohidratos	+	
Esteroides	+	

**Apéndice 2.** Registro de cromatografía de capa fina

Fase móvil	UV-A	UV-B	Yodo
DCM/EtOAc 1:1			
DCM/MeOH 9:1			
EtOAc/MeOH 9:1			
DCM/MeOH 5:1			
EtOAc/MeOH 5:1			
DCM/MeOH 4:1			
EtOAc/MeOH 4:1			

### Apéndice 3. Registro de cromatografía de columna



a)



b)



c)



d)

**Figura A1.** Registro del proceso de obtención de fracciones por CC: a) inicio del fraccionamiento, b) después de 1h del fraccionamiento, c) después de 1h del fraccionamiento y bajo luz UV-B, y d) final del fraccionamiento

## Apéndice 4. Nanopartículas de MgO: Estudio de la reacción y caracterización

### Procedimiento

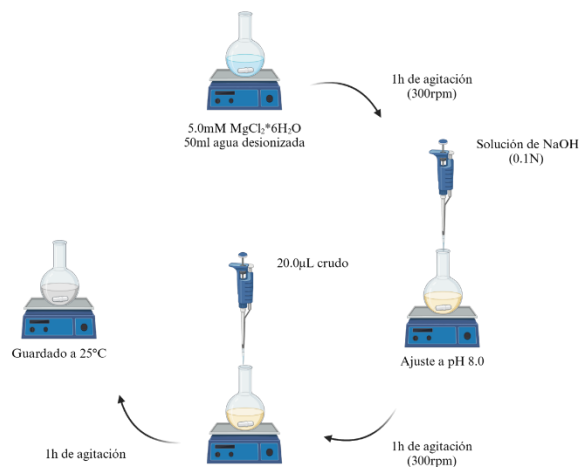
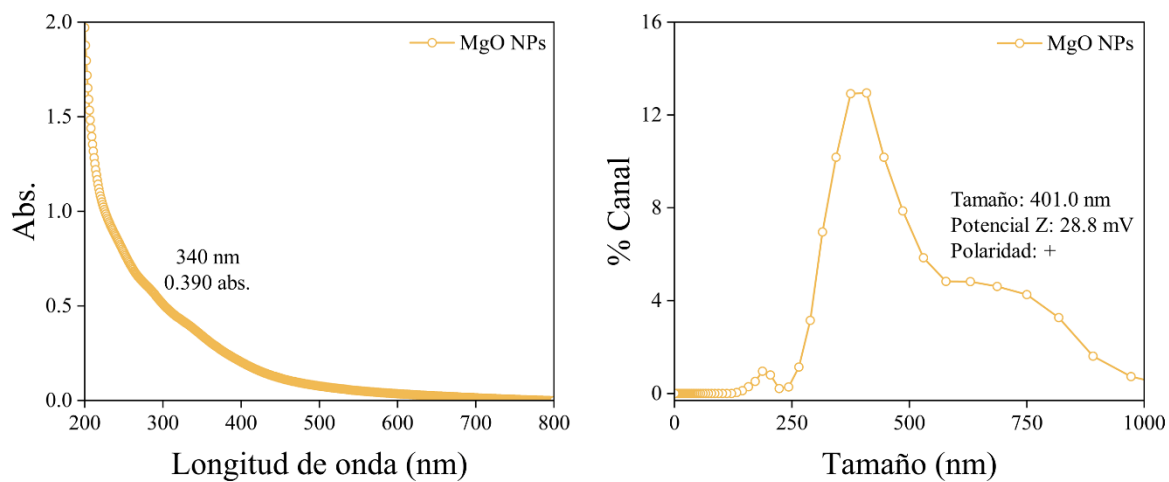
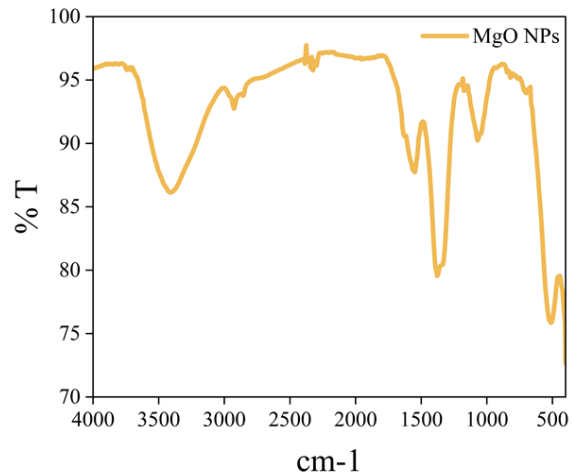


Figura A2. Síntesis de MgO NPs

### Caracterización





**Figura A3.** Caracterización fisicoquímica de MgO NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A1.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3412	$\nu(\text{O-H})$
2926	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2856	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1550	$\nu(\text{C=C})$
1380	$\nu_{\text{s}}(-\text{COO}^-)$
1070	$\nu(\text{C-O})$
512	Mg-O

## Apéndice 5. Nanopartículas de $V_2O_5$ : Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

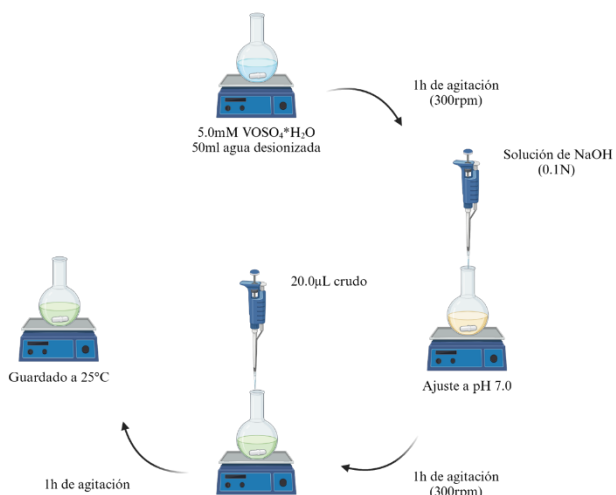
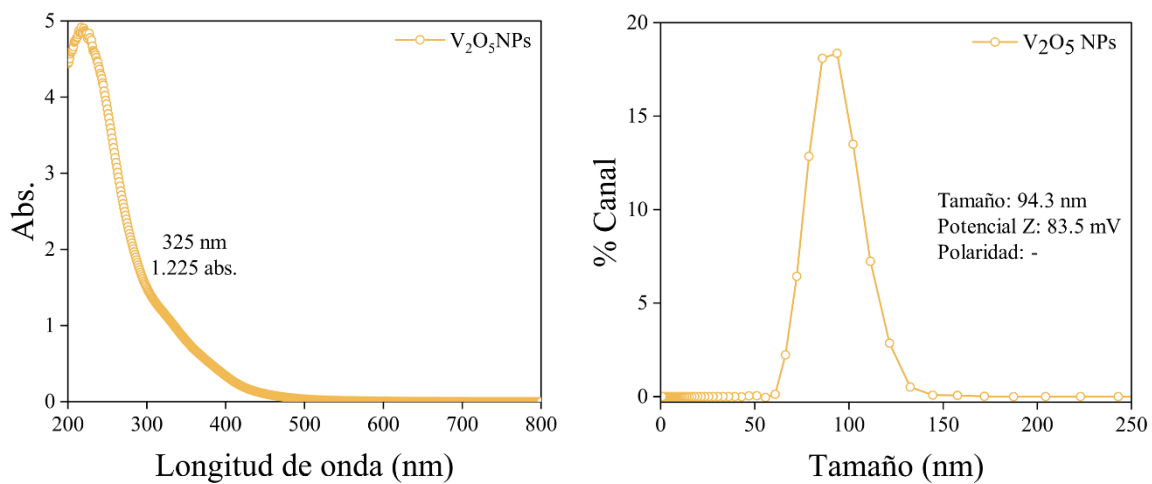
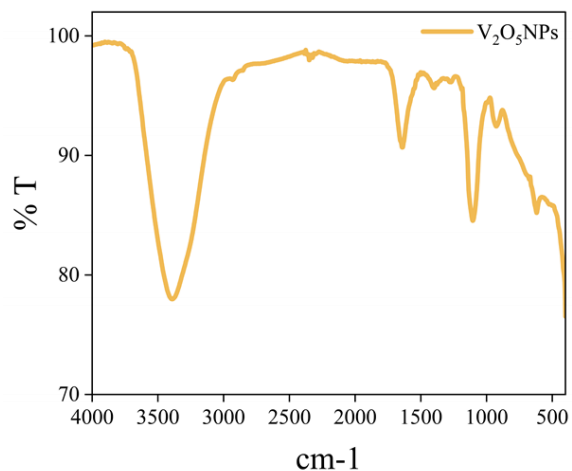


Figura A4. Síntesis de  $V_2O_5$  NPs

### Caracterización





**Figura A5.** Caracterización fisicoquímica de  $V_2O_5$  NPs, a) UV-Vis, b) DLS, c) FTIR

**Tabla A2.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3388	$\nu(\text{O-H})$
2926	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2856	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1640	$\nu(\text{C=C})$
1400	$\delta(\text{C-H})$
1106	$\nu(\text{C-O})$
928	$\nu(\text{V-O-V})$
618	$\nu(\text{V-O-V})$

## Apéndice 6. Nanopartículas de MnO: Estudio de la reacción y caracterización

### Procedimiento

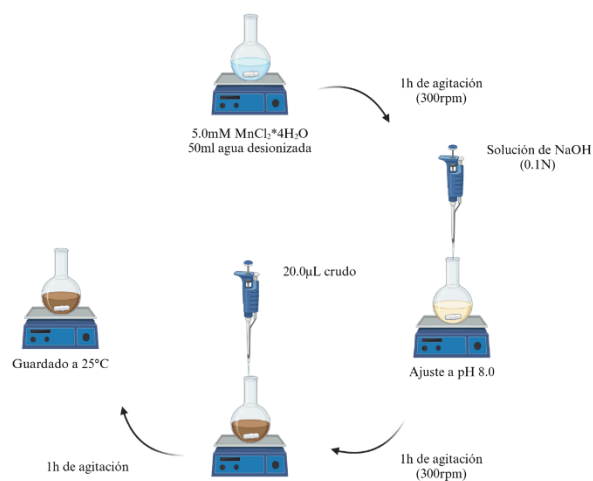
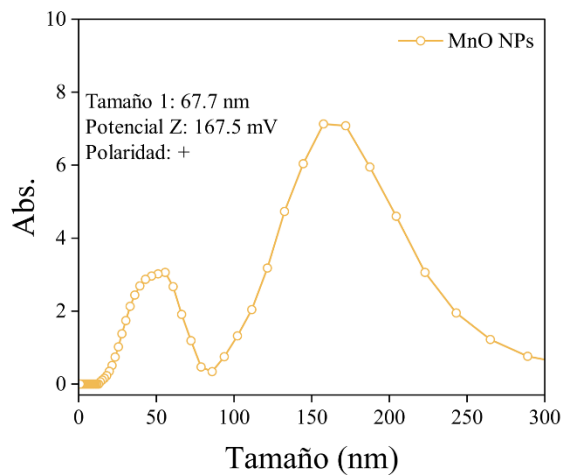
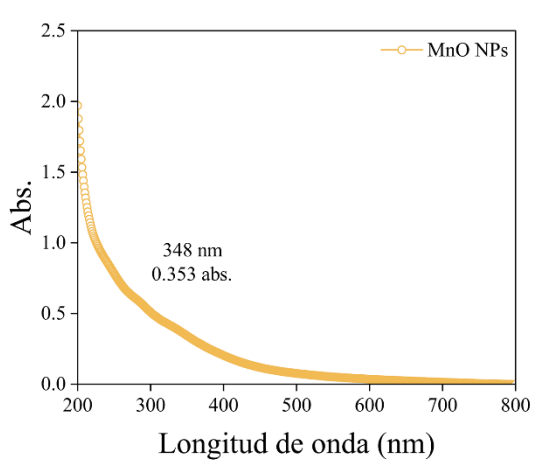
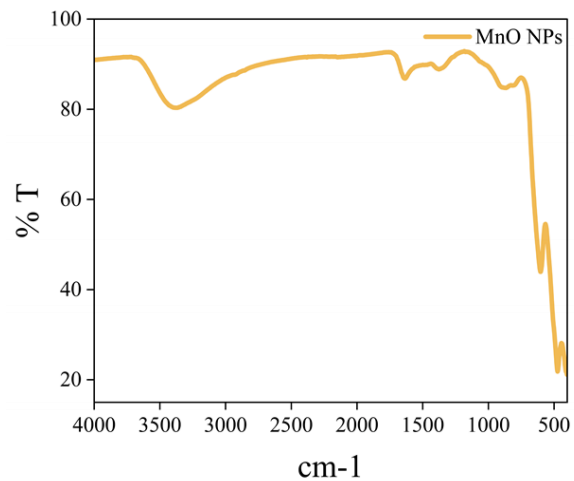


Figura A6. Síntesis de MnO NPs

### Caracterización





**Figura A7.** Caracterización fisicoquímica de MnO NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A3.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3392	$\nu(\text{O-H})$
1636	$\nu(\text{C=O})$
1376	$\nu_s(-\text{COO}^-)$
878	Mn-O
602	Mn-O
474	Mn-O

## Apéndice 7. Nanopartículas de Cu: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

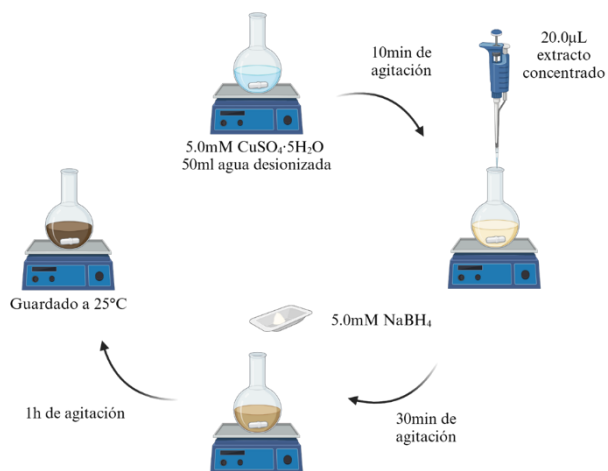
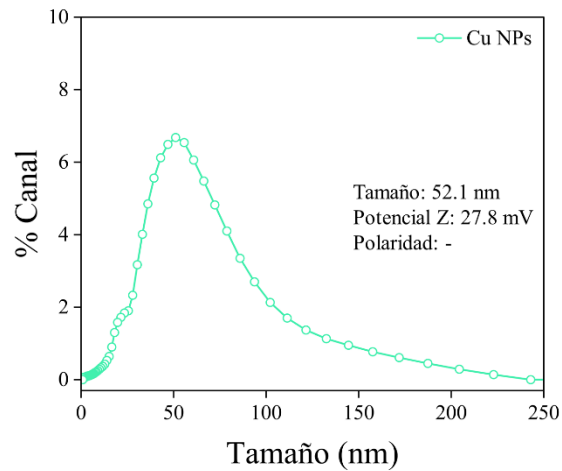
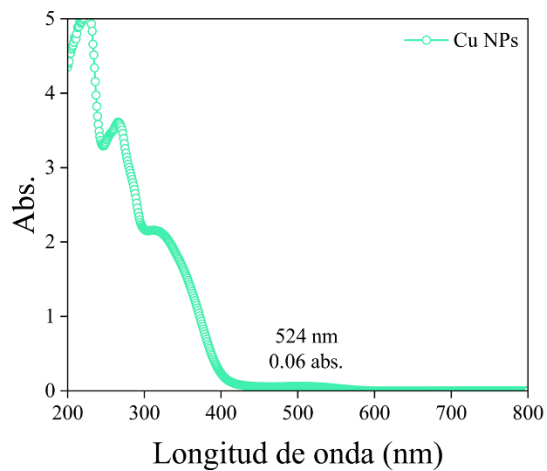
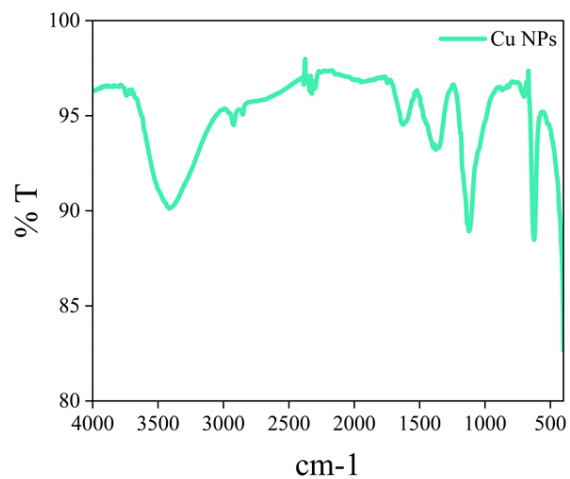


Figura A8. Síntesis de Cu NPs

### Caracterización





**Figura A9.** Caracterización fisicoquímica de Cu NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A4.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3412	$\nu(\text{O-H})$
2922	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2856	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1628	$\nu(\text{C=O})$
1376	$\nu(-\text{COO}^-)$
1124	$\nu(\text{C-O})$
626	Cu-O

## Apéndice 8. Nanopartículas de ZnO<sub>2</sub>: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

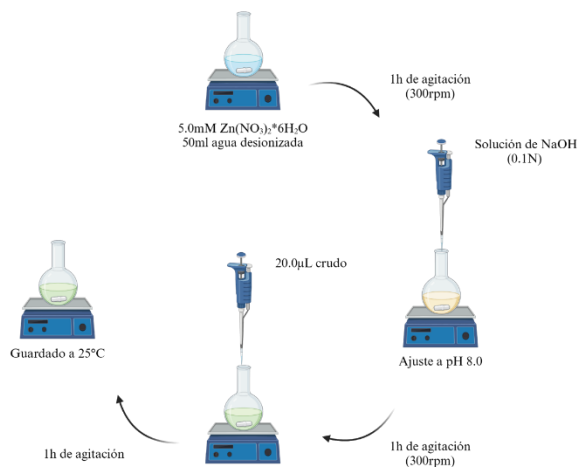
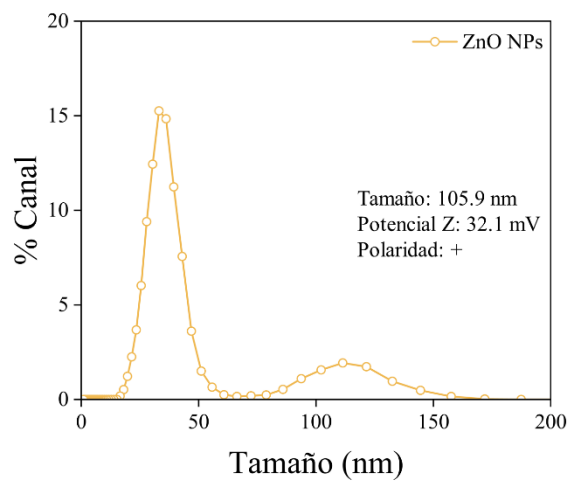
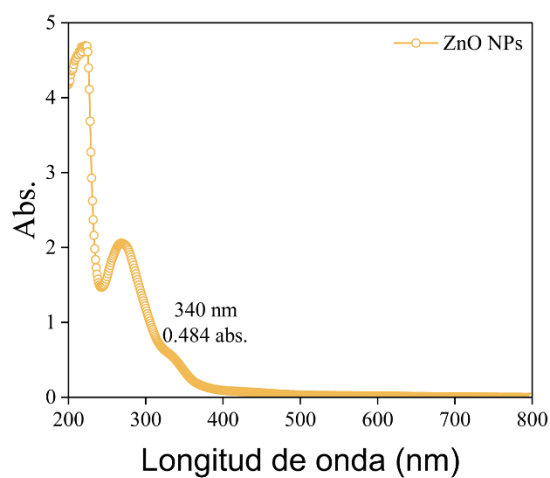
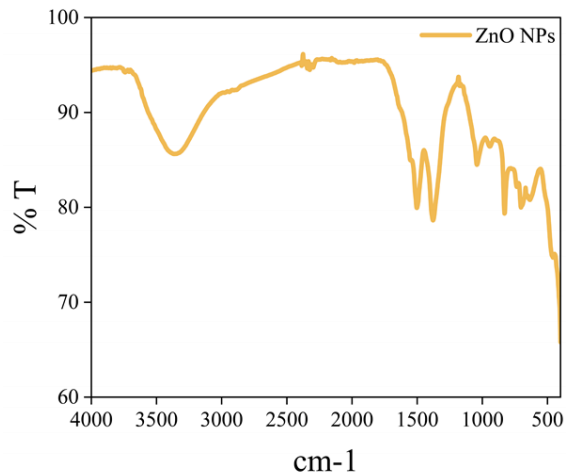


Figura A10. Síntesis de ZnO NPs

### Caracterización





**Figura A11.** Caracterización fisicoquímica de ZnO NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A5.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3366	$\nu(\text{O-H})$
2976	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2880	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1502	$\nu(\text{C=C})$
1378	$\nu(\text{-COO}^-)$
1042	$\nu(\text{C-O})$
830	$\delta(\text{C-H})$
704	$\nu(\text{Zn-O})$
634	$\nu(\text{Zn-O})$
462	$\nu(\text{Zn-O})$

## Apéndice 9. Nanopartículas de Se: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

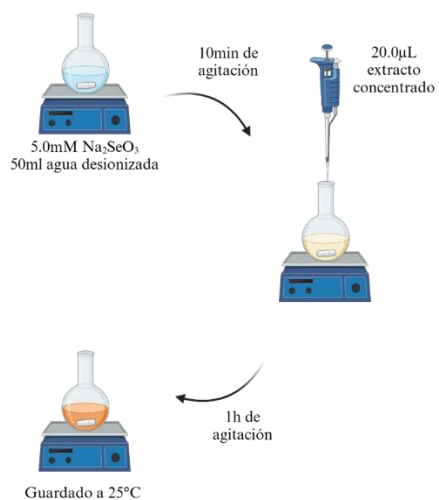
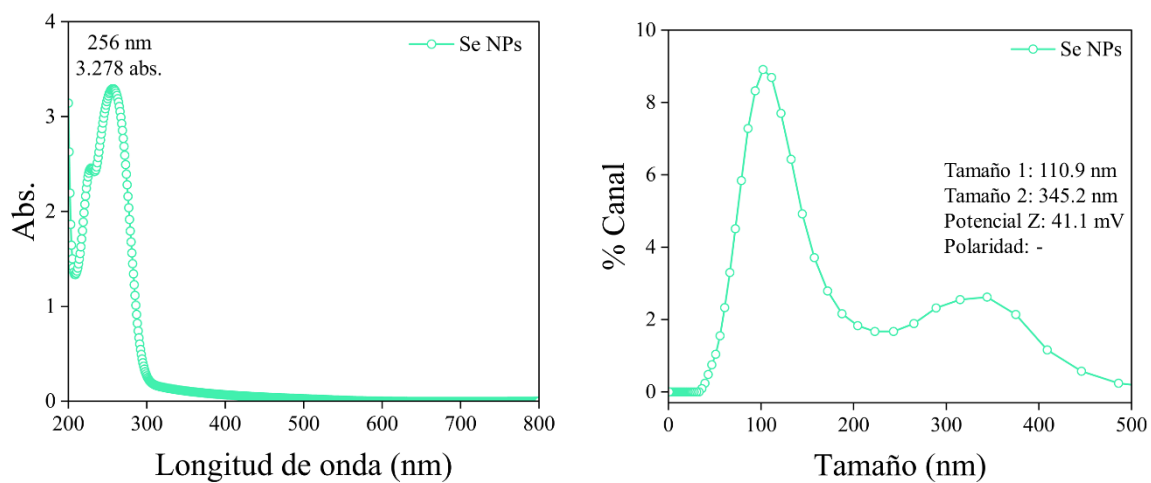
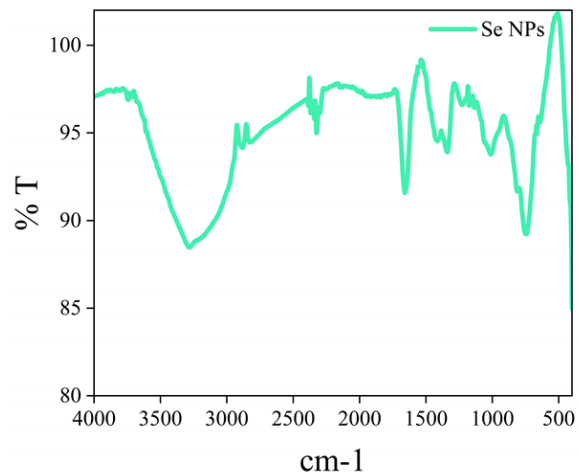


Figura A12. Síntesis de Se NPs

### Caracterización





**Figura A13.** Caracterización fisicoquímica de Se NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A6.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3286	$\nu(\text{O-H})$
1660	$\nu(\text{C=O})$
1416	$\nu(\text{COO}^-)$
1338	$\delta(\text{O-H})$
1012	$\nu(\text{C-O})$
744	Se-O; Se-C

## Apéndice 10. Nanopartículas de Ag: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

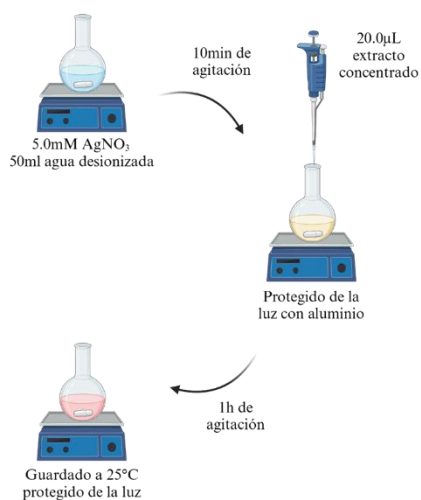
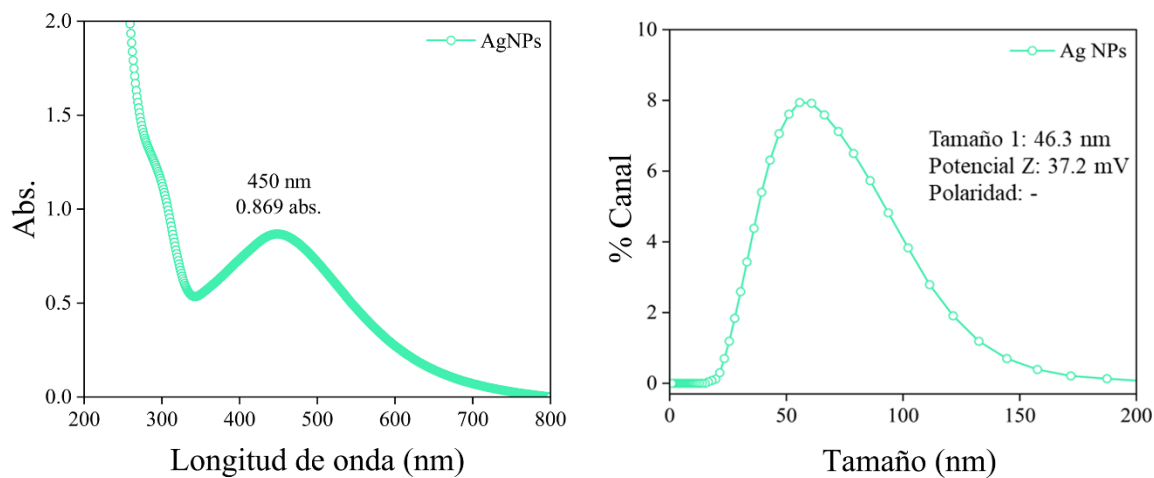
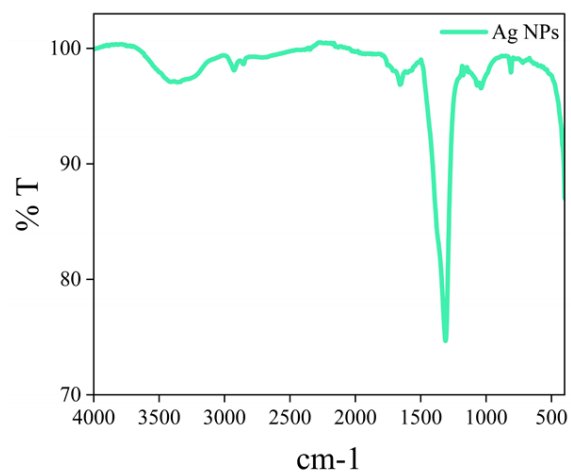


Figura A14. Síntesis de Ag NPs

### Caracterización





**Figura A15.** Caracterización fisicoquímica de Ag NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A7.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3404	$\nu(\text{O-H})$
2926	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2856	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$
1658	$\nu(\text{C=O})$
1310	$\delta(\text{O-H})$
1040	$\nu(\text{C-O})$
810	Ag-C

## Apéndice 11. Nanopartículas de Pt: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

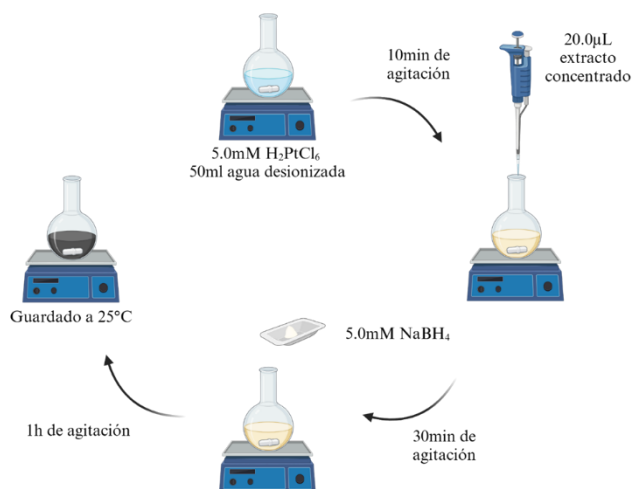
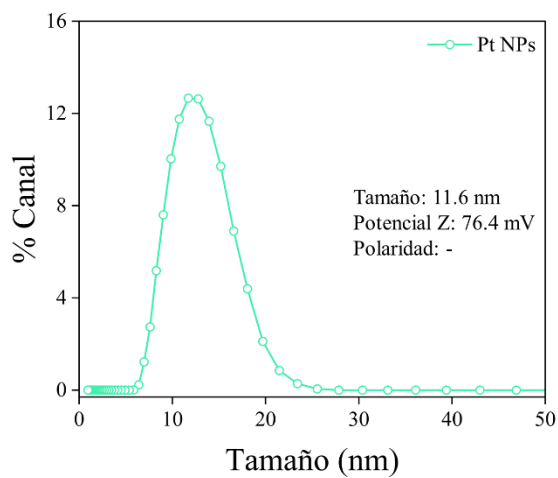
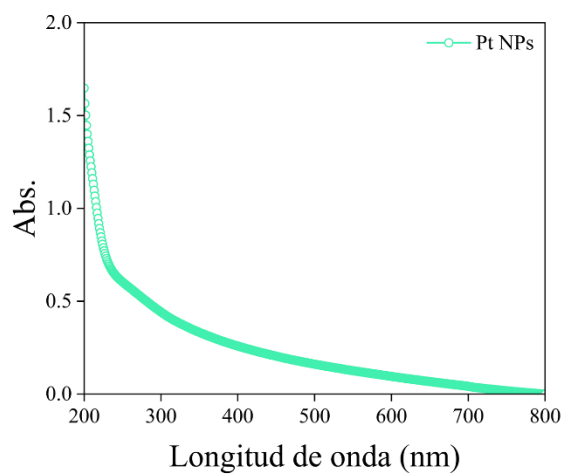
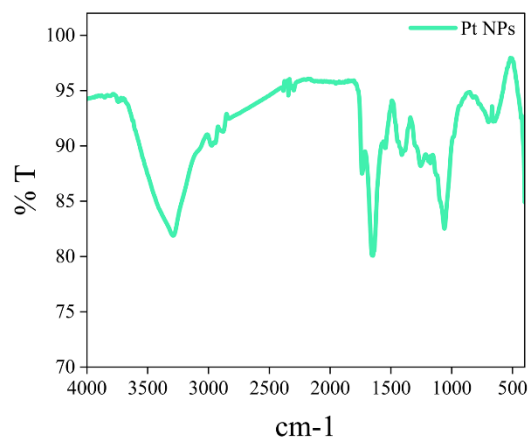


Figura A16. Síntesis de Pt NPs

### Caracterización





**Figura A17.** Caracterización fisicoquímica de Pt NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A8.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3293	$\nu(\text{O-H})$
2982	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2880	$\delta(\text{C-H})$
1732	$\nu(\text{C=O})$
1650	$\nu(\text{C=C})$
1410	$\nu(\text{C-C})$
1256	$\nu(\text{C-O})$
1060	$\nu(\text{C-O})$
695	Pt-C
638	Pt-C

## Apéndice 12. Nanopartículas de Au: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

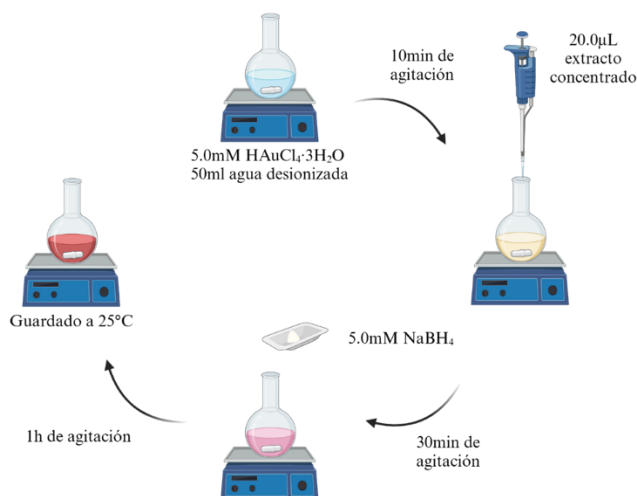
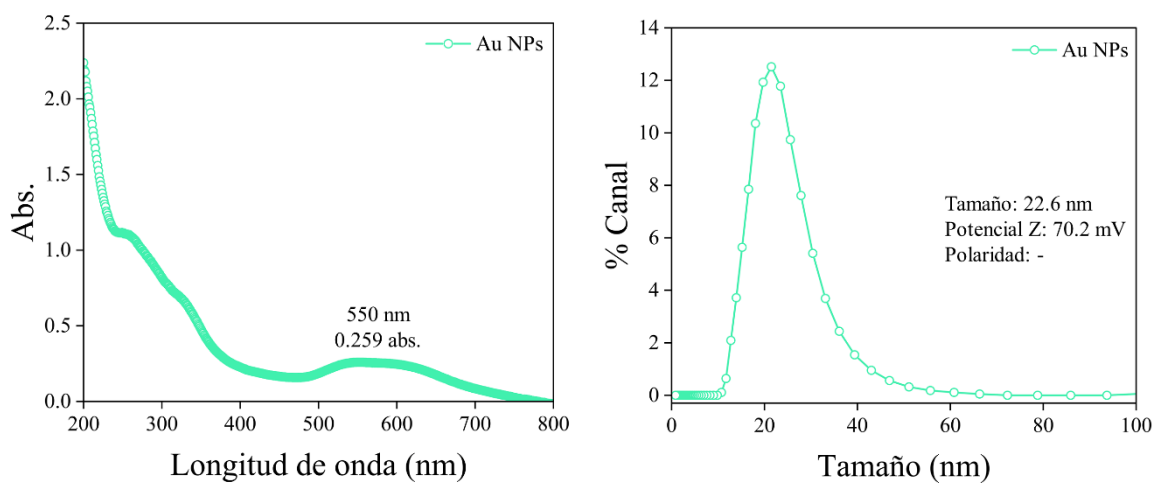
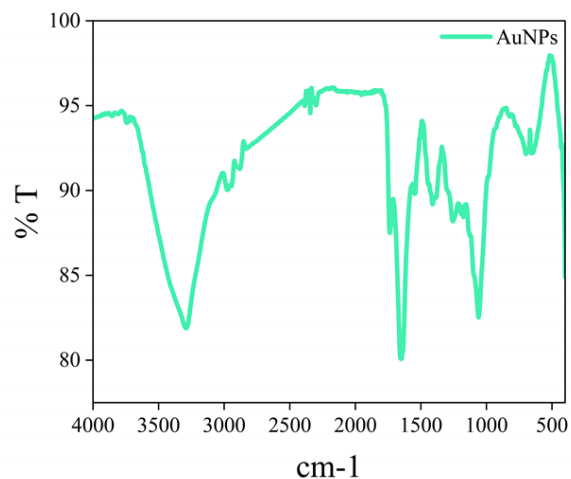


Figura A18. Síntesis de Au NPs

### Caracterización





**Figura A19.** Caracterización fisicoquímica de Au NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A9.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

Número de onda (cm-1)	Asignación
3292	$\nu(\text{O-H})$
2976	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$
2880	$\delta(\text{C-H})$
1738	$\nu(\text{C=O})$
1650	$\nu(\text{C=C})$
1410	$\nu(\text{C-C})$
1256	$\nu(\text{C-O})$
1060	$\nu(\text{C-O})$
698	Au-C
642	Au-C

## Apéndice 13. Nanopartículas de CeO<sub>2</sub>: Estudio de la reacción y caracterización

### Síntesis

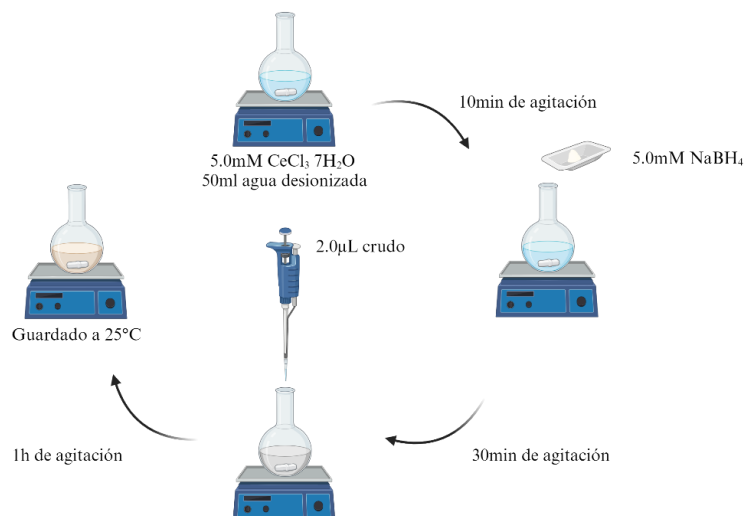
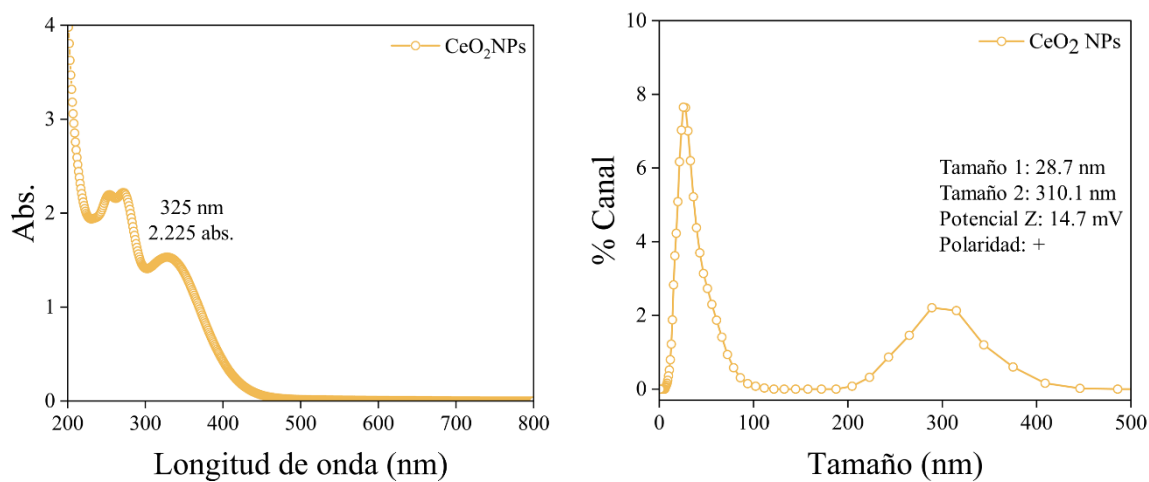
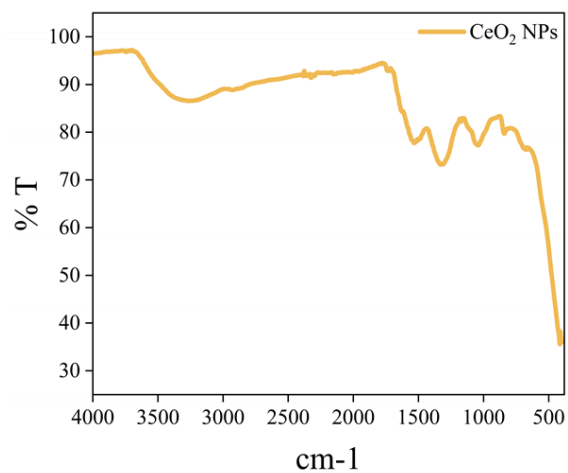


Figura A20. Síntesis de CeO<sub>2</sub> NPs

### Caracterización



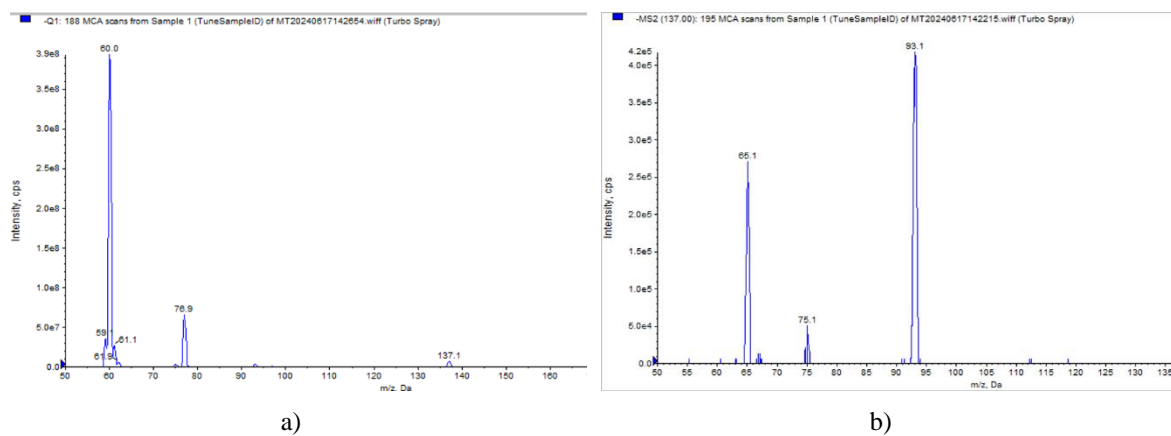


**Figura A21.** Caracterización fisicoquímica de CeO<sub>2</sub> NPs: a) UV-Vis; b) DLS; c) FTIR

**Tabla A10.** Bandas y asignación del espectro por FTIR

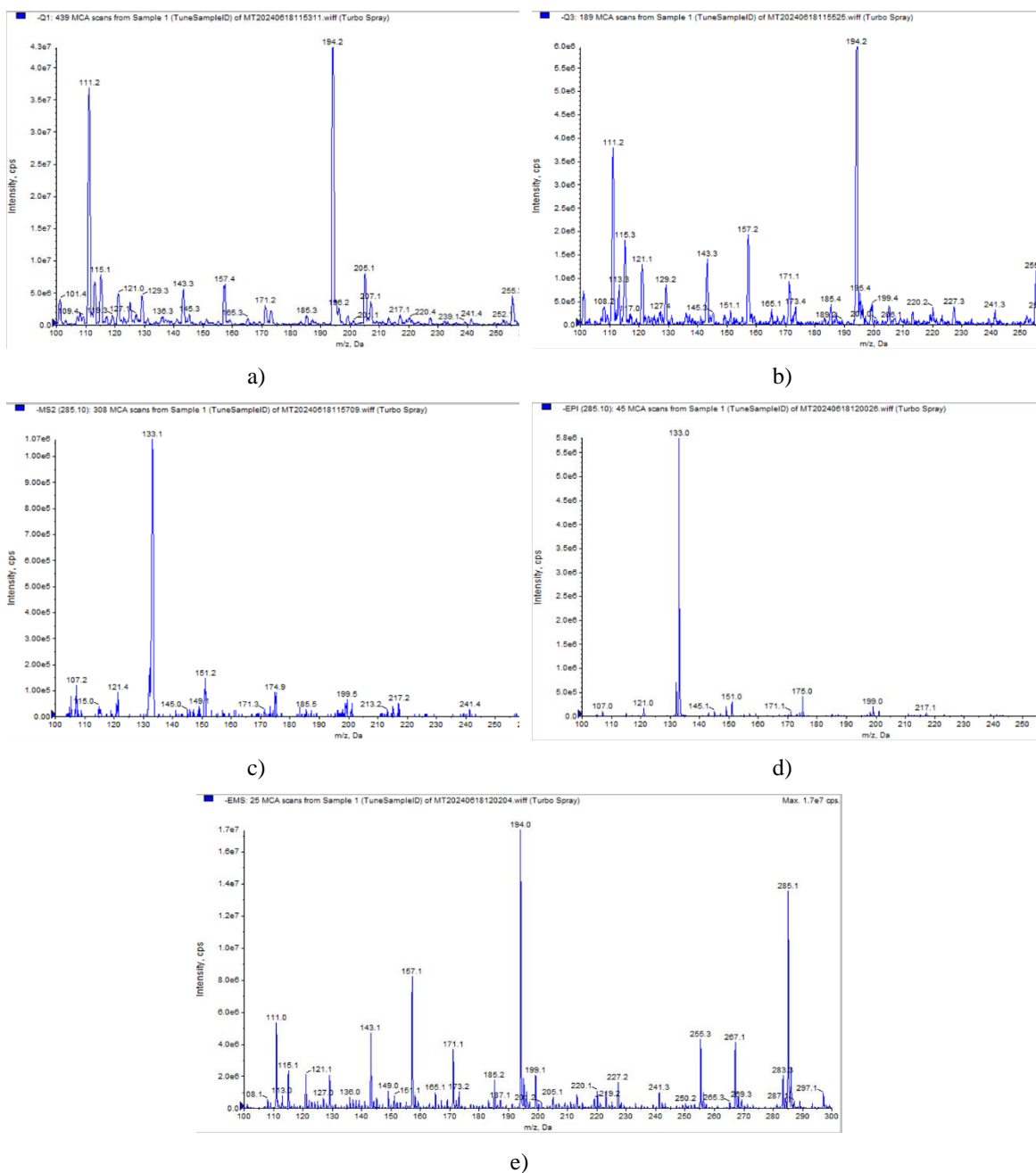
Número de onda (cm-1)	Asignación
3280	v(O-H)
1532	v(C=C)
1324	δ(O-H)
1044	v(C-O)
840	v(Ce-O)
414	v(Ce-O)

## Apéndice 14. Espectro de MS respecto al modo de escaneo para el ácido salicílico



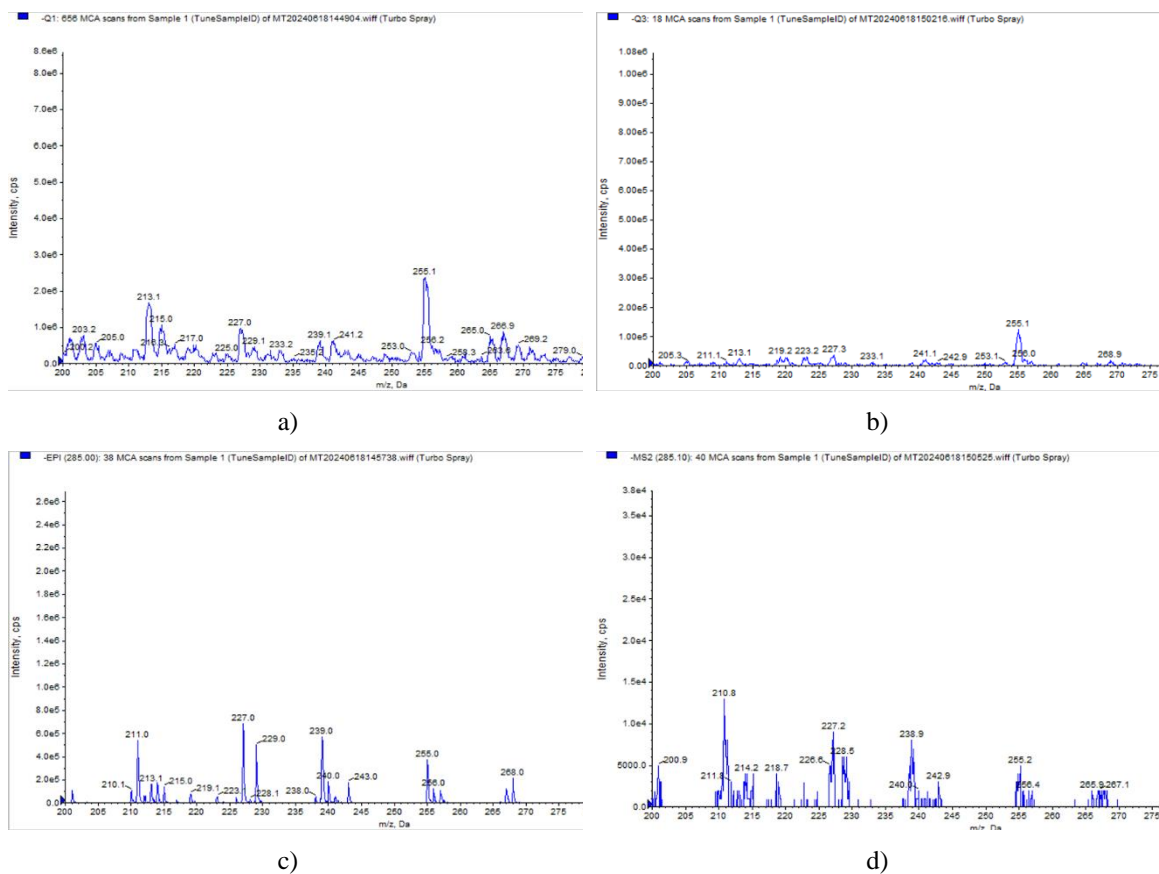
**Figura A22.** Espectro de masas con diferentes tipos de escaneo para el ácido salicílico: a) Q1 scan y b) MS2 scan

## Apéndice 15. Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la luteolina



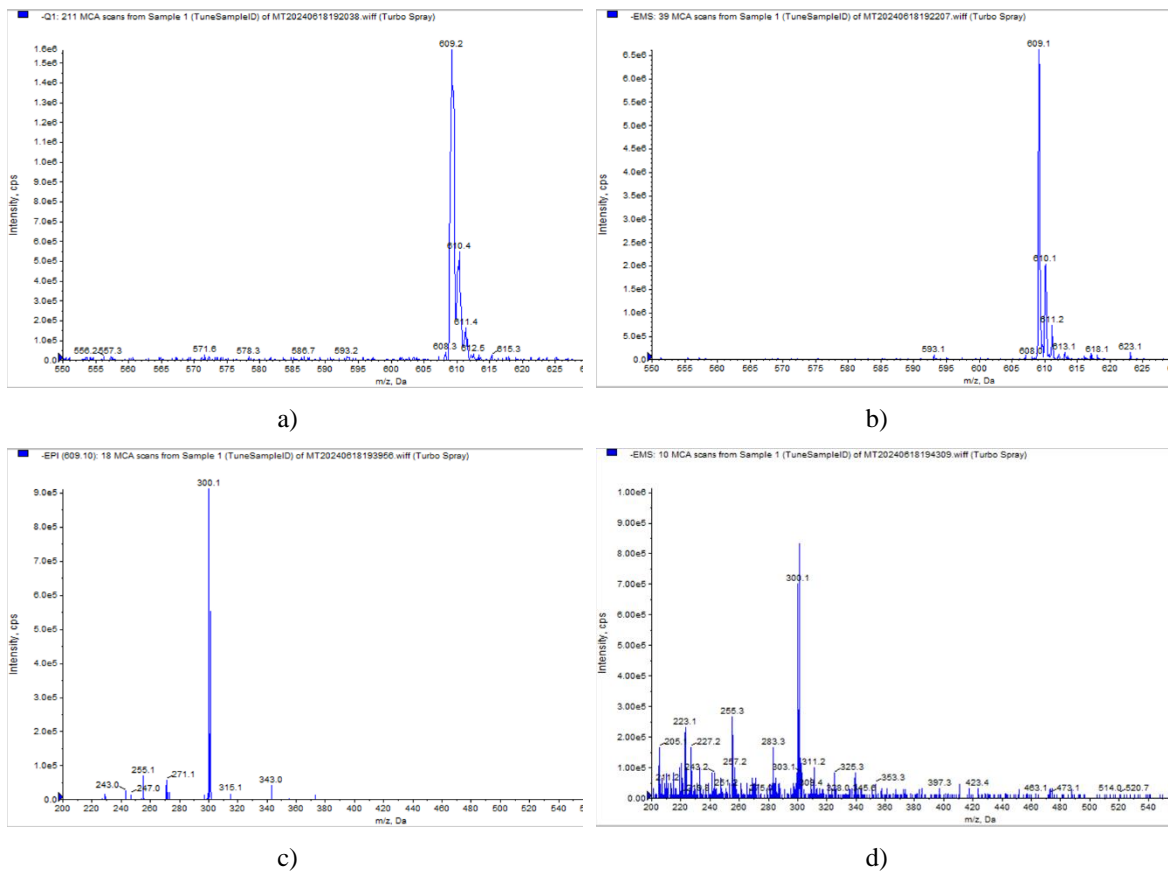
**Figura A23.** Espectro de masas con diferentes tipos de escaneo para la luteolina: a) Q1 scan, b) Q3 scan; c) MS2 scan; d) EPI scan; e) EMS scan

## Apéndice 16. Espectro de MS respecto al modo de escaneo para el kaempferol



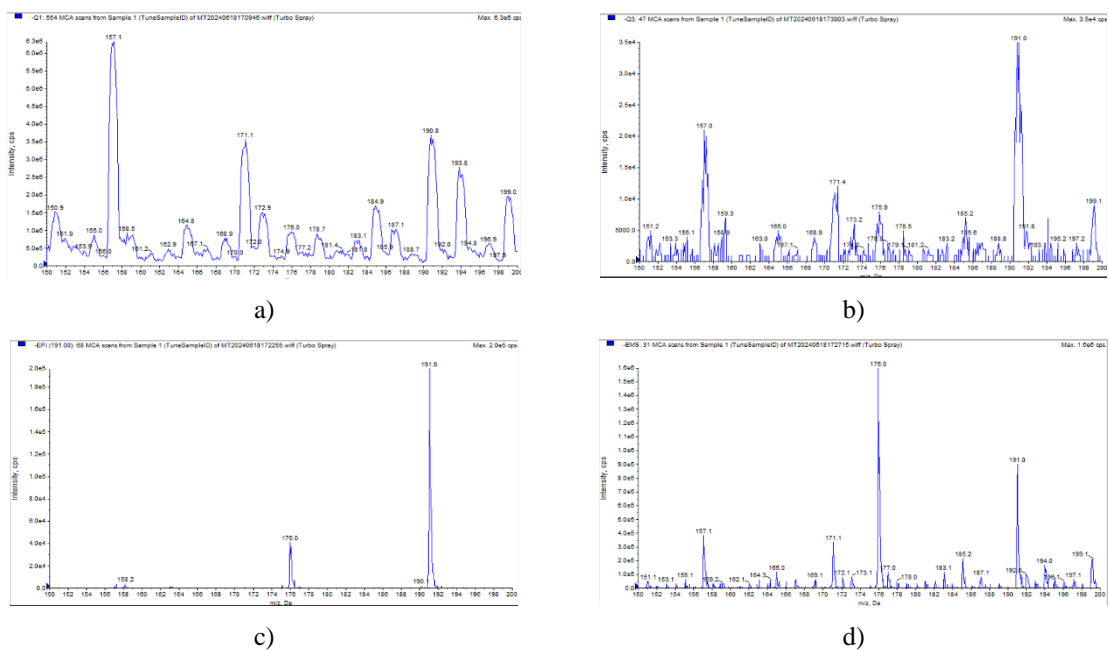
**Figura A24.** Espectro de masas con diferentes tipos de escaneo para el kaempferol: a) Q1 scan, b) Q3 scan; c) EPI scan; d) MS2 scan

## Apéndice 17. Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la rutina



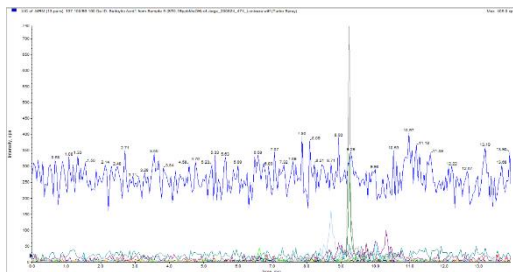
**Figura A25.** Espectro de masas con diferentes tipos de escaneo para la rutina: a) Q1 scan, b) Q3 scan; c) EPI scan; d) EMS scan

## Apéndice 18. Espectro de MS respecto al modo de escaneo para la escopoletina

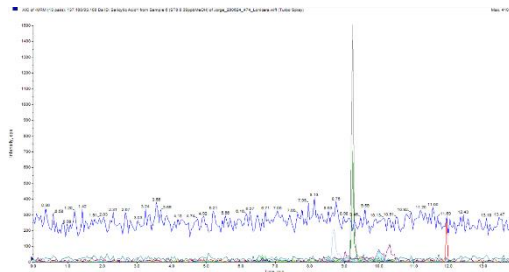


**Figura A26.** Espectro de masas con diferentes tipos de escaneo para la escopoletina: a) Q1 scan, b) Q3 scan; c) EPI scan; d) EMS scan

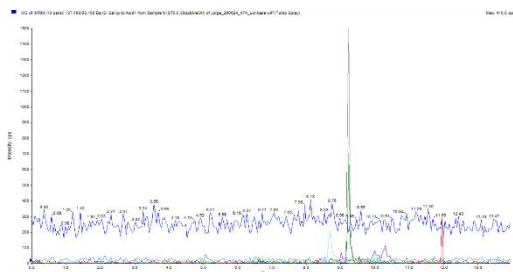
**Apéndice 19.** Cromatograma con tiempos de retención para todas las moléculas analizadas por LC-MS/MS



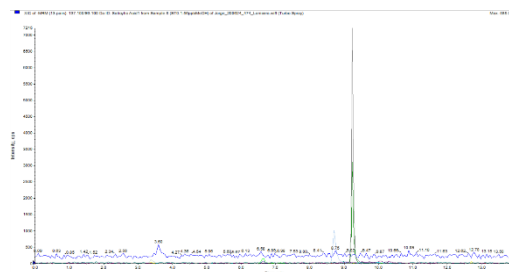
0.19 ppb



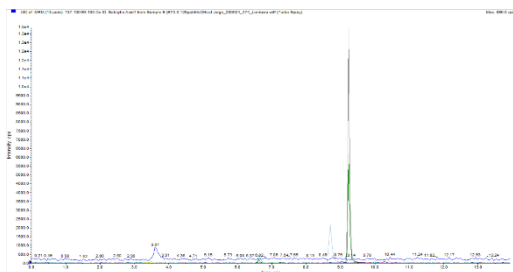
0.39 ppb



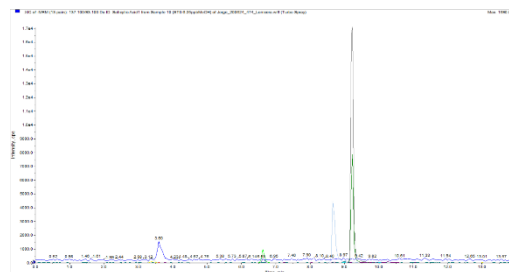
0.78 ppb



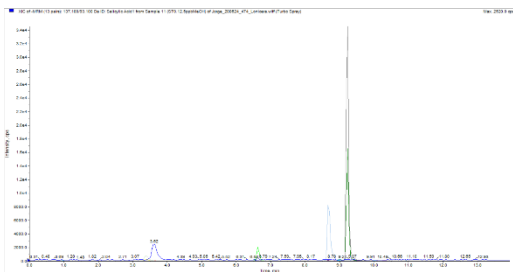
1.56 ppb



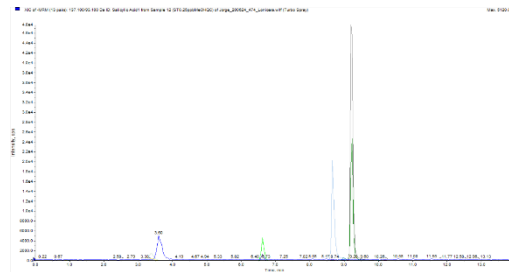
3.125 ppb



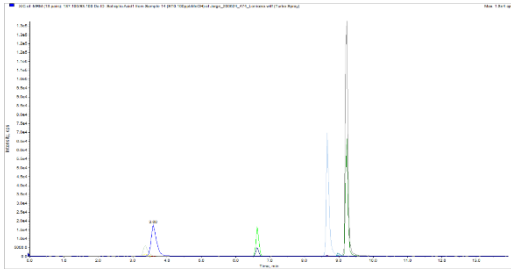
6.25 ppb



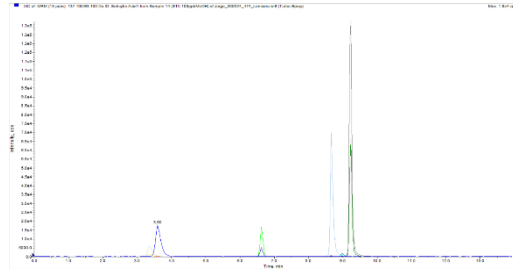
12.5 ppb



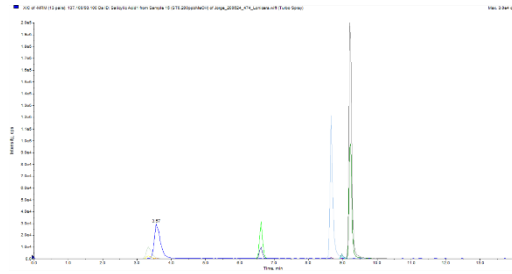
25 ppb



50 ppb



100 ppb

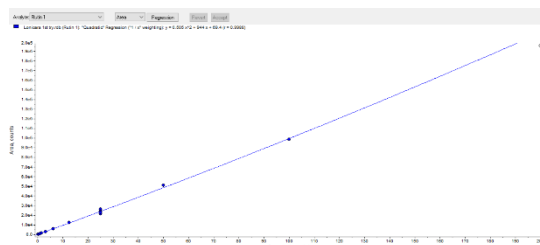
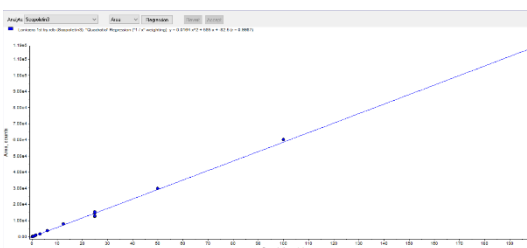
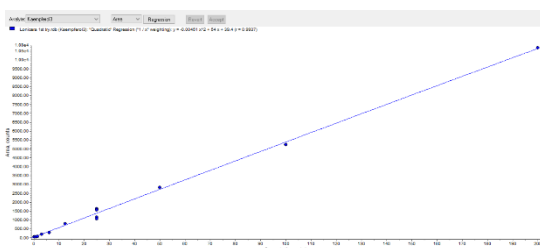
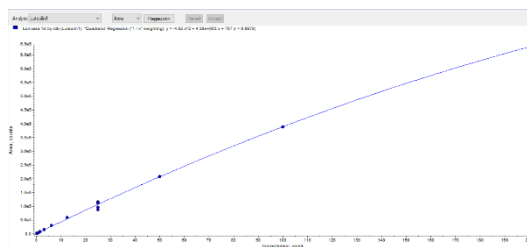
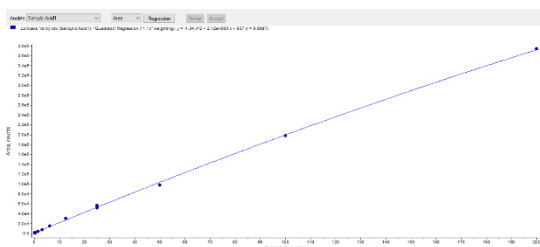


200 ppb

**Apéndice 20.** Resultados proporcionados por ANALYST Software de curvas de calibración

Nombre	Ác. Salicílico	Luteolina	Kaempferol	Escopoletina	Rutina
ST0.19ppbMeOH	0.349	0.223	0.505	0.263	0.209
ST0.0.39ppbMeOH	0.0451	0.282	0.258	0.355	0.364
ST0.0.78ppbMeOH	0.384	0.741	0.258	0.723	0.815
ST0.1.56ppbMeOH	1.38	1.51	0.752	1.09	1.46
ST0.3.125ppbMeOH	3.08	3.34	2.98	3.2	3.07
ST0.6.25ppbMeOH	6.74	6.99	4.46	6.38	6.33
ST0.12.5ppbMeOH	14.2	13.5	14	14.4	12.9
ST0.25ppbMeOHQC	24.2	27.1	28.6	26.7	27.3
ST0.50ppbMeOH	47.2	50.3	52.2	52.8	52.3
ST0.100ppbMeOH	99	99.9	97.1	101	99.3
ST0.200ppbMeOH	201	200	201	199	188
ST0.25ppbMeOHQC	26.5	26.2	29.7	23.8	25.1
ST0.25ppbMeOHQC	24.4	26.9	28.2	27	24.2
J1 1/1	3.86	6.87	0.258	18.7	348
J1 1/2	2.36	5.52	0.752	12.5	255
J1 1/3	2.06	4.35	< 0	11.2	211
J1 1/4	2.87	3.82	1.49	10.5	177
J2 1/1	3.98	7.03	0.0113	13.3	344
J2 1/2	2.81	5.58	0.999	11.5	272
J2 1/3	2.51	4.96	0.999	10	230
J2 1/4	2.62	4.42	0.999	9.19	195
ST0.25ppbMeOHQC	26.5	20.2	20.8	21.6	22.6
ST0.25ppbMeOHQC	24.3	22.4	19.3	21.5	23.9

**Apéndice 21.** Curvas de calibración para todas las moléculas analizadas por LC-MS/MS de 0.19 ppb a 200 ppb



Rutina

**Apéndice 22.** Cálculo de concentración de las hojas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* en polvo 1

<b>1 ppb = 1 µg/L = 1 ng/mL</b>	<b>Unidades</b>	<b>Rutina</b>	<b>Luteolina</b>	<b>Kaempferol</b>	<b>Ácido salicílico</b>	<b>Escopoletina</b>
Tiempo de retención	min	6.6190	8.6620	8.9730	3.5700	3.3310
Concentración del compuesto en el extracto diluido según la curva de calibración de Analyst	ng/mL	348.0000	6.8700	0.2580	3.8600	18.7000
Factor de dilución		4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000
Concentración del compuesto en el extracto antes de dilución	ng/mL	1392.0000	27.4800	1.0320	15.4400	74.8000
Volumen total del extracto producido durante la extracción por ultrasónico	mL	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
Densidad del solvente usado en la extracción (80%MeOH + 1% AcOH)	g/mL	0.8590	0.8590	0.8590	0.8590	0.8590
Gramos total del extracto producido durante la extracción por ultrasónico	g	1.7180	1.7180	1.7180	1.7180	1.7180
Cantidad total de compuesto extraído a partir del polvo de	ng	2784.0000	54.9600	2.0640	30.8800	149.6000

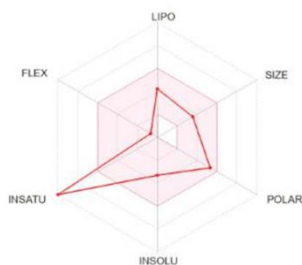
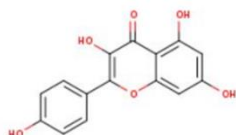
<i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i>						
Peso del polvo de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i>	g	0.0257	0.0257	0.0257	0.0257	0.0257
Concentración del compuesto en el polvo de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> en ng/g	ng/g DW	108326.848 2	2138.521 4	80.3113	1201.556 4	5821.0117
Concentración del compuesto en el polvo de <i>Lonicera suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> en µg/g	µg/g DW	108.3268	2.1385	0.0803	1.2016	5.8210

**Apéndice 23.** Cálculo de concentración de las hojas de *Lonicera suspicata* var. *Jonstonii* en polvo 2

<b>1 ppb = 1 µg/L = 1 ng/mL</b>	<b>Unidades</b>	<b>Rutina</b>	<b>Luteolina</b>	<b>Kaempferol</b>	<b>Ácido salicílico</b>	<b>Escopoletina</b>
Tiempo de retención	min	6.6190	8.6620	8.9730	3.5700	3.3310
Concentración del compuesto en el extracto diluido según la curva de calibración de Analyst	ng/mL	344.0000	7.0300	0.0113	3.9800	13.3300
Factor de dilución		4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000
Concentración del compuesto en el extracto antes de dilución	ng/mL	1376.0000	28.1200	0.0452	15.9200	53.3200
Volumen total del extracto producido durante la extracción por ultrasónico	mL	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
Densidad del solvente usado en la extracción (80%MeOH + 1% AcOH)	g/mL	0.8590	0.8590	0.8590	0.8590	0.8590
Gramos total del extracto producido durante la extracción por ultrasónico	g	1.7180	1.7180	1.7180	1.7180	1.7180
Cantidad total de compuesto extraído a partir del polvo de <i>Lonicera</i>	ng	2752.0000	56.2400	0.0904	31.8400	106.6400

<i>suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i>						
Peso del polvo de <i>Lonicera</i> <i>suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i>	g	0.0257	0.0257	0.0257	0.0257	0.0257
Concentración del compuesto en el polvo de <i>Lonicera</i> <i>suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> en ng/g	ng/g DW	107081.7121	2188.3268	3.5175	1238.9105	4149.4163
Concentración del compuesto en el polvo de <i>Lonicera</i> <i>suspicata</i> var. <i>Jonstonii</i> en µg/g	µg/g DW	107.0817	2.1883	0.0035	1.2389	4.1494

## Apéndice 24. Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) del kaempferol



SMILES Oc1ccc(cc1)c1oc2cc(O)cc(c2c(=O)c1O)O

### Physicochemical Properties

Formula	C15H10O6
Molecular weight	286.24 g/mol
Num. heavy atoms	21
Num. arom. heavy atoms	16
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	6
Num. H-bond donors	4
Molar Refractivity	76.01
TPSA	111.13 Å <sup>2</sup>

### Lipophilicity

Log $P_{ow}$ (iLOGP)	1.70
Log $P_{ow}$ (XLOGP3)	1.90
Log $P_{ow}$ (WLOGP)	2.28
Log $P_{ow}$ (MLOGP)	-0.03
Log $P_{ow}$ (SILICOS-IT)	2.03
Consensus Log $P_{ow}$	1.58

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-3.31
Solubility	1.40e-01 mg/ml ; 4.90e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.86
Solubility	3.98e-02 mg/ml ; 1.39e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.82
Solubility	4.29e-02 mg/ml ; 1.50e-04 mol/l
Class	Soluble

### Pharmacokinetics

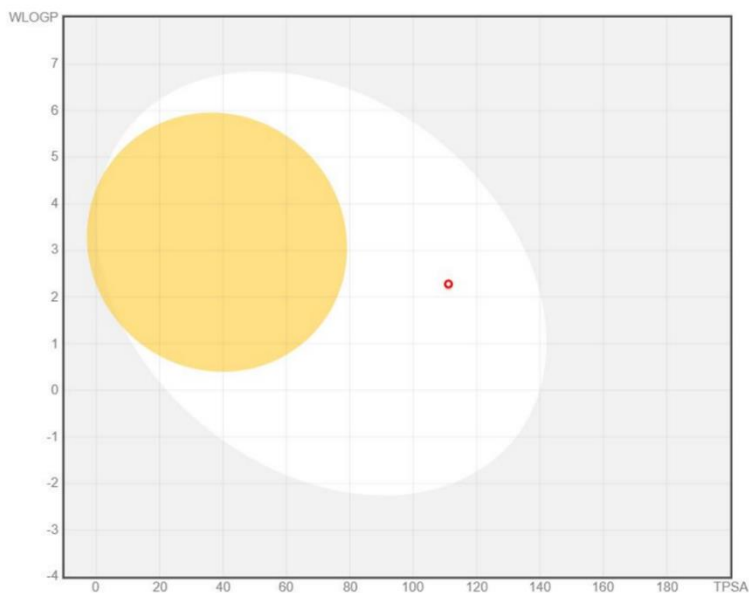
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log $K_p$ (skin permeation)	-6.70 cm/s

### Druglikeness

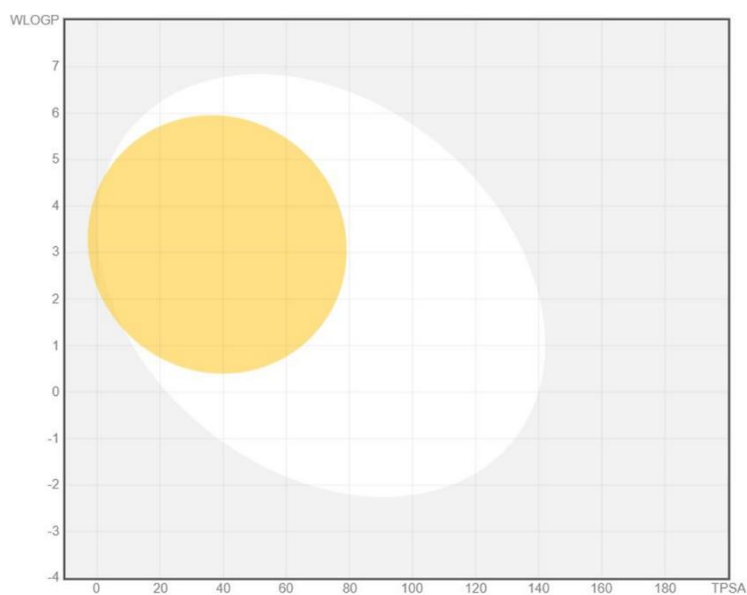
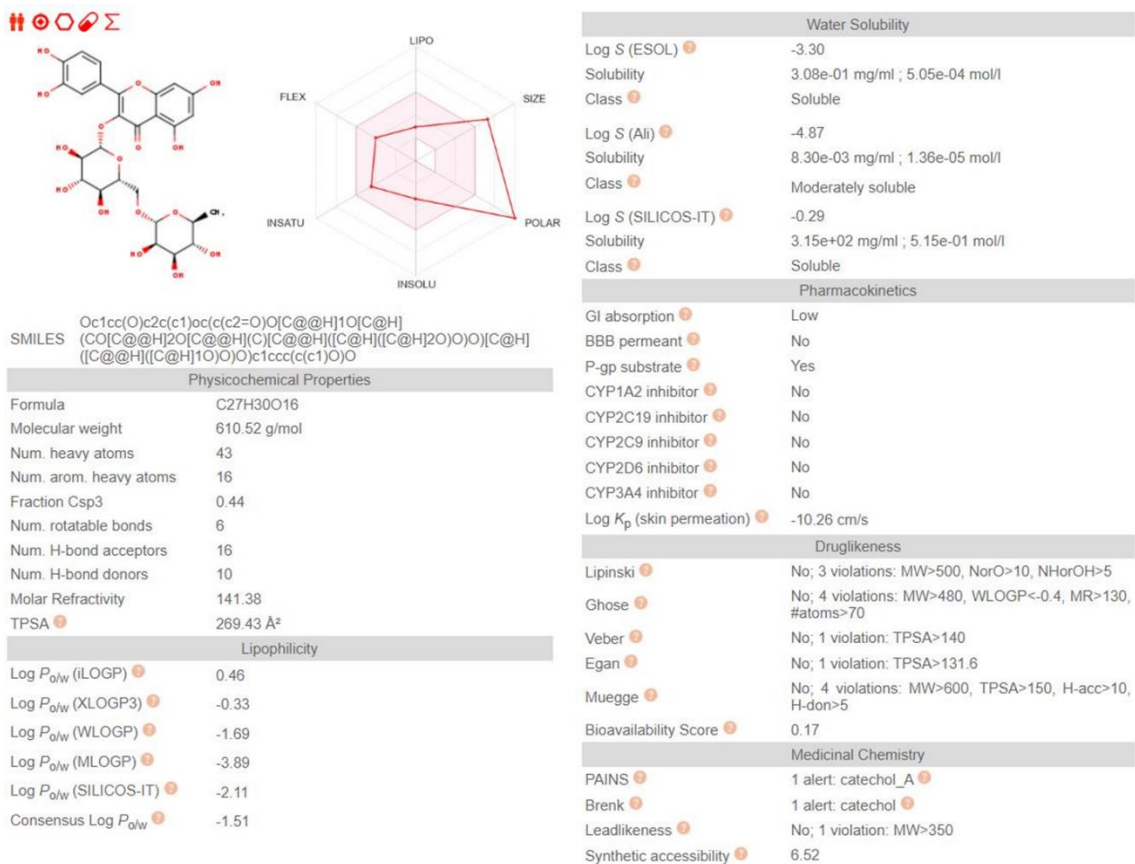
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

### Medicinal Chemistry

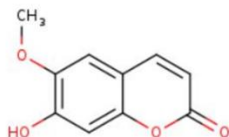
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	3.14



## Apéndice 25. Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la rutina



## Apéndice 26. Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la escopoletina



SMILES COc1cc2ccc(=O)oc2cc1O

### Physicochemical Properties

Formula	C10H8O4
Molecular weight	192.17 g/mol
Num. heavy atoms	14
Num. arom. heavy atoms	10
Fraction Csp3	0.10
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	51.00
TPSA	59.67 Å <sup>2</sup>

### Lipophilicity

Log $P_{ow}$ (iLOGP)	1.86
Log $P_{ow}$ (XLOGP3)	1.53
Log $P_{ow}$ (WLOGP)	1.51
Log $P_{ow}$ (MLOGP)	0.76
Log $P_{ow}$ (SILICOS-IT)	1.94
Consensus Log $P_{ow}$	1.52

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-2.46
Solubility	6.70e-01 mg/ml ; 3.48e-03 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-2.39
Solubility	7.79e-01 mg/ml ; 4.06e-03 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.17
Solubility	1.31e-01 mg/ml ; 6.81e-04 mol/l
Class	Soluble

### Pharmacokinetics

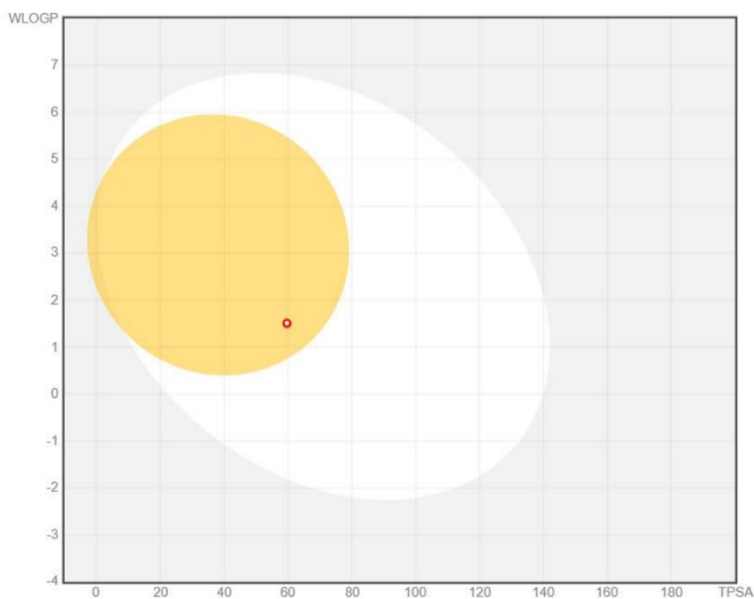
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log $K_p$ (skin permeation)	-6.39 cm/s

### Druglikeness

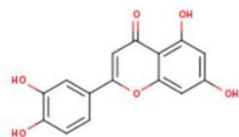
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: MW<200
Bioavailability Score	0.55

### Medicinal Chemistry

PAINS	0 alert
Brenk	1 alert: cumarine
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250
Synthetic accessibility	2.62



## Apéndice 27. Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) de la luteolina



SMILES Oc1cc(O)c2c(c1)oc(cc2=O)c1ccc(c(c1)O)O

### Physicochemical Properties

Formula	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
Molecular weight	286.24 g/mol
Num. heavy atoms	21
Num. arom. heavy atoms	16
Fraction Csp <sup>3</sup>	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	6
Num. H-bond donors	4
Molar Refractivity	76.01
TPSA	111.13 Å <sup>2</sup>

### Lipophilicity

Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (ILOGP)	1.86
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (XLOGP3)	2.53
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (WLOGP)	2.28
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (MLOGP)	-0.03
Log <i>P</i> <sub>ow</sub> (SILICOS-IT)	2.03
Consensus Log <i>P</i> <sub>ow</sub>	1.73

### Water Solubility

Log S (ESOL)	-3.71
Solubility	5.63e-02 mg/ml ; 1.97e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-4.51
Solubility	8.84e-03 mg/ml ; 3.09e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.82
Solubility	4.29e-02 mg/ml ; 1.50e-04 mol/l
Class	Soluble

### Pharmacokinetics

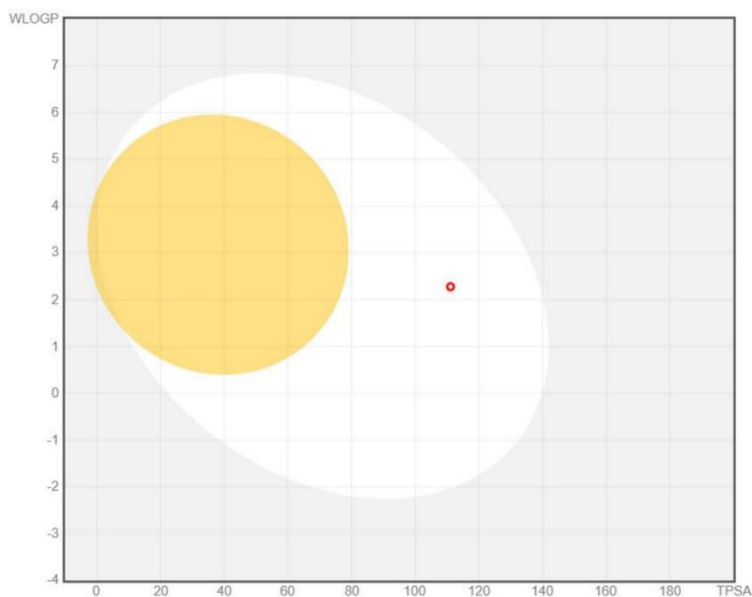
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log <i>K</i> <sub>p</sub> (skin permeation)	-6.25 cm/s

### Druglikeness

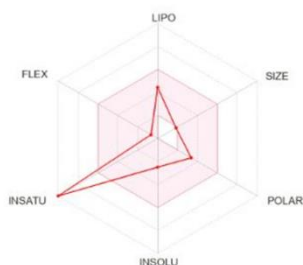
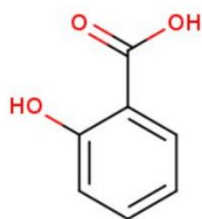
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

### Medicinal Chemistry

PAINS	1 alert: catechol_A
Brenk	1 alert: catechol
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	3.02



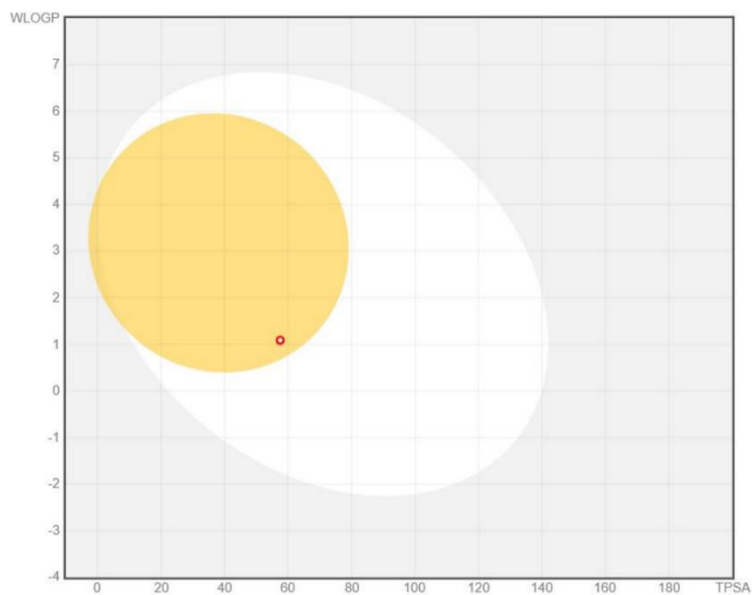
## Apéndice 28. Absorción-distribución-metabolismo-excreción-toxicidad (ADMET) del ácido salicílico



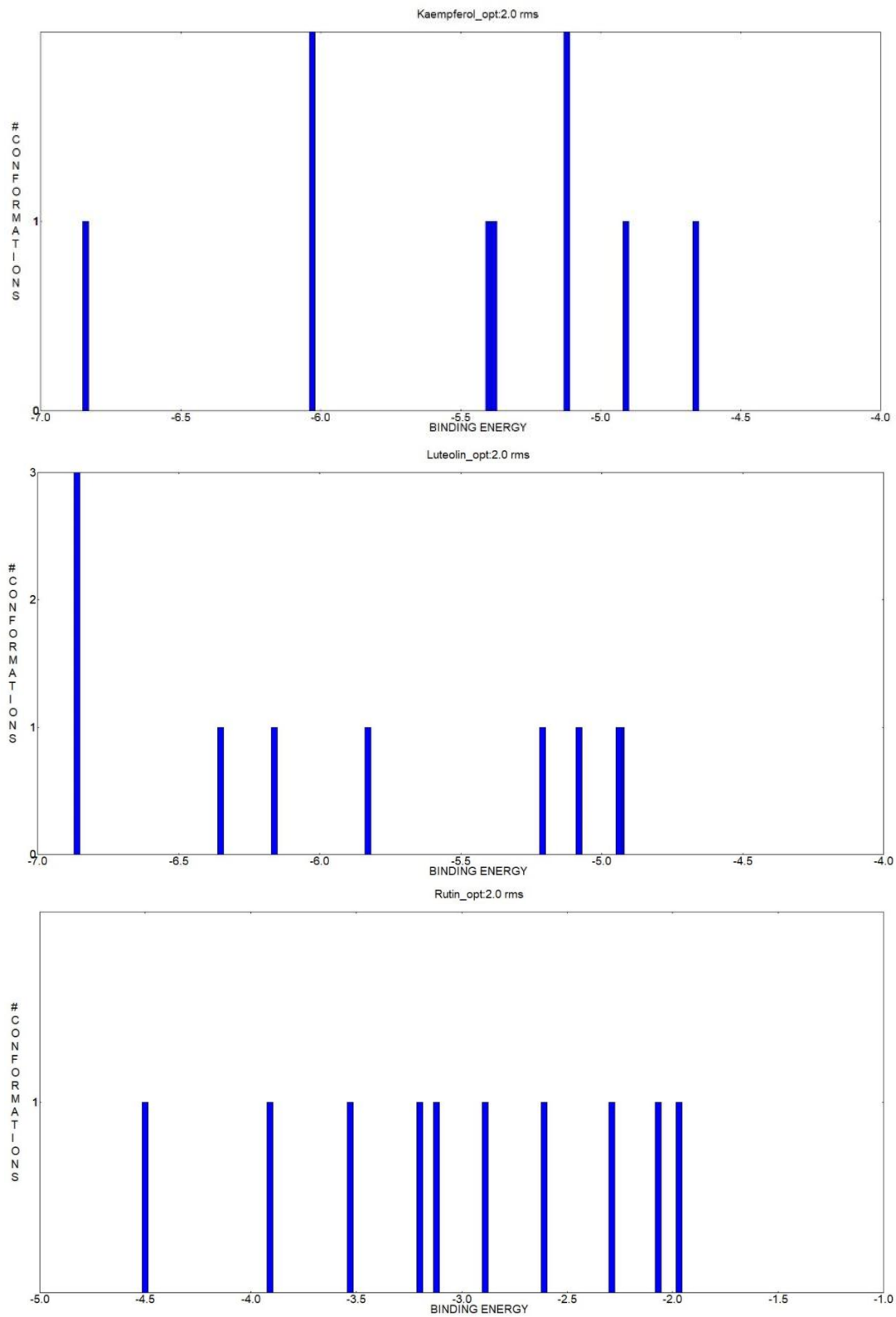
SMILES OC(=O)c1ccccc1O

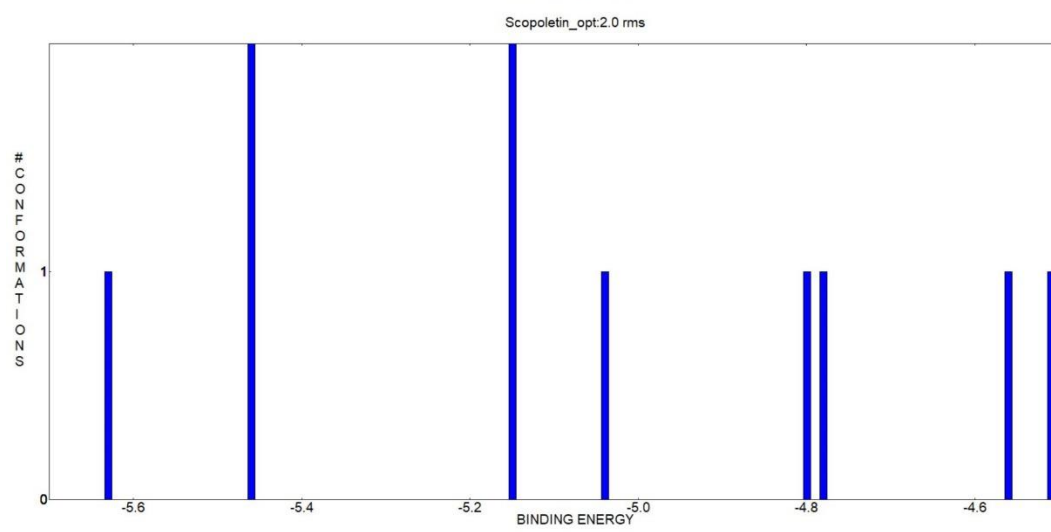
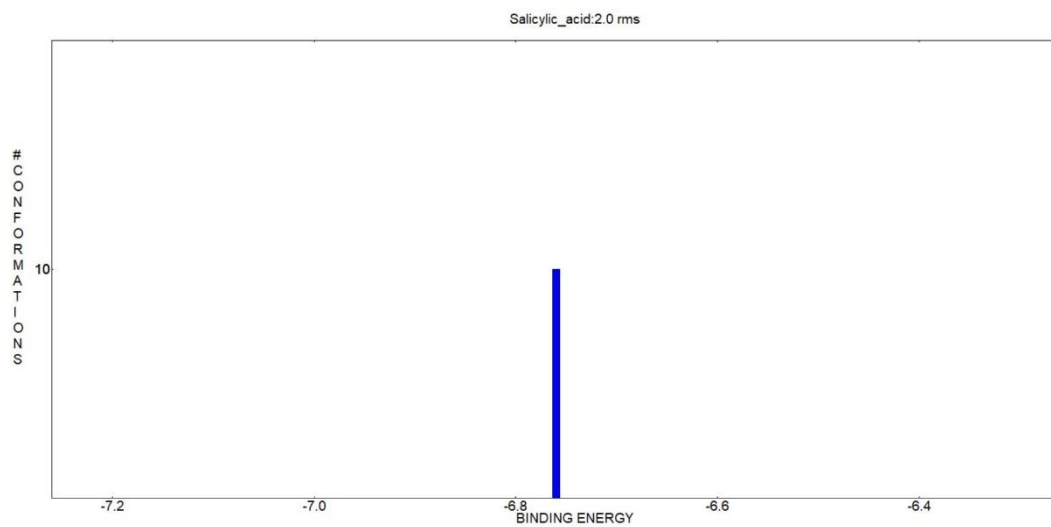
Physicochemical Properties	
Formula	C7H6O3
Molecular weight	138.12 g/mol
Num. heavy atoms	10
Num. arom. heavy atoms	6
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	3
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	35.42
TPSA	57.53 Å <sup>2</sup>
Lipophilicity	
Log $P_{ow}$ (iLOGP)	1.13
Log $P_{ow}$ (XLOGP3)	2.26
Log $P_{ow}$ (WLOGP)	1.09
Log $P_{ow}$ (MLOGP)	0.99
Log $P_{ow}$ (SILICOS-IT)	0.74
Consensus Log $P_{ow}$	1.24

Water Solubility	
Log S (ESOL)	-2.50
Solubility	4.39e-01 mg/ml ; 3.18e-03 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.10
Solubility	1.09e-01 mg/ml ; 7.86e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-1.17
Solubility	9.40e+00 mg/ml ; 6.81e-02 mol/l
Class	Soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	Yes
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log $K_p$ (skin permeation)	-5.54 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 3 violations: MW<160, MR<40, #atoms<20
Weber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: MW<200
Bioavailability Score	0.85
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250
Synthetic accessibility	1.00

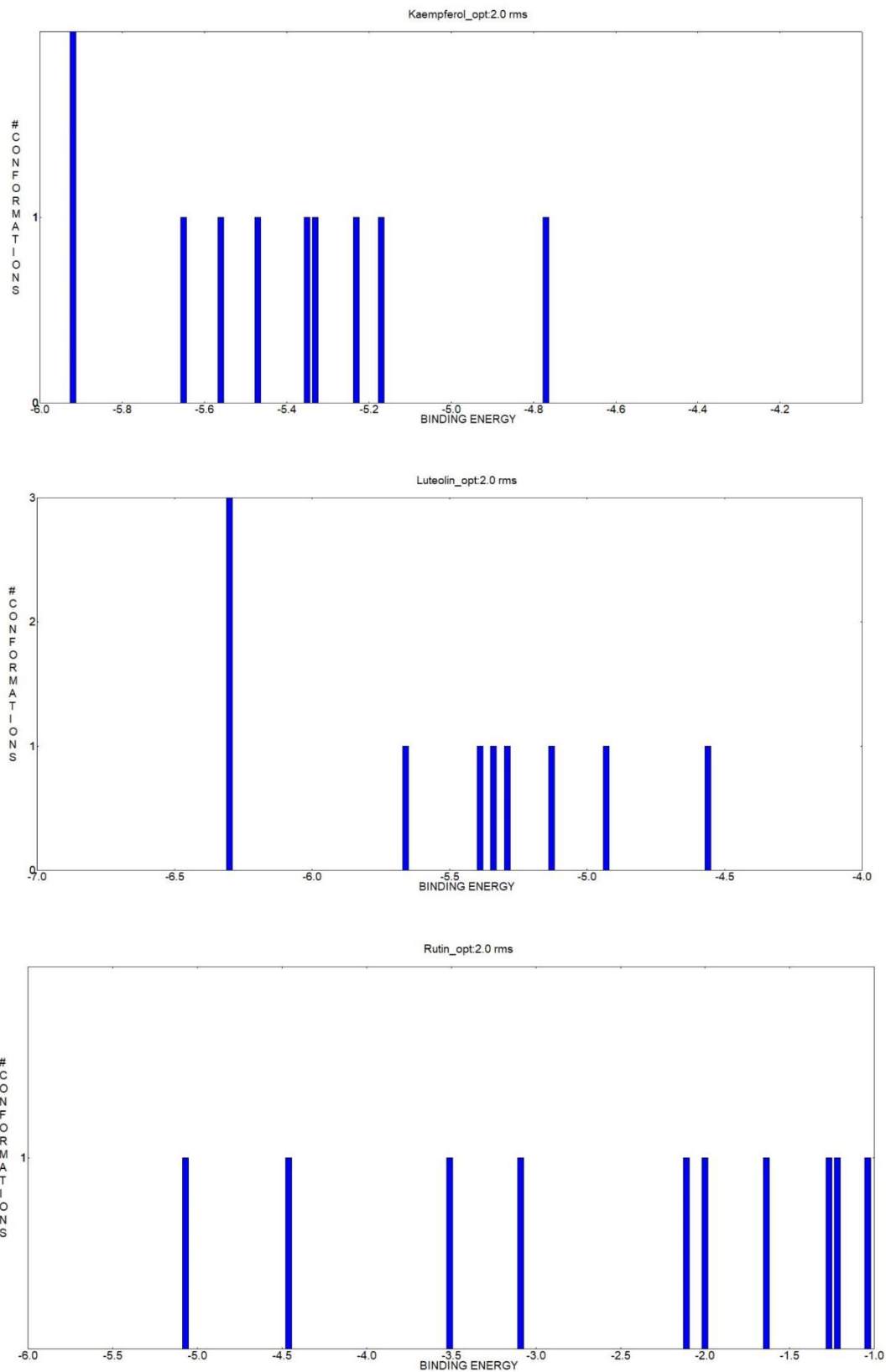


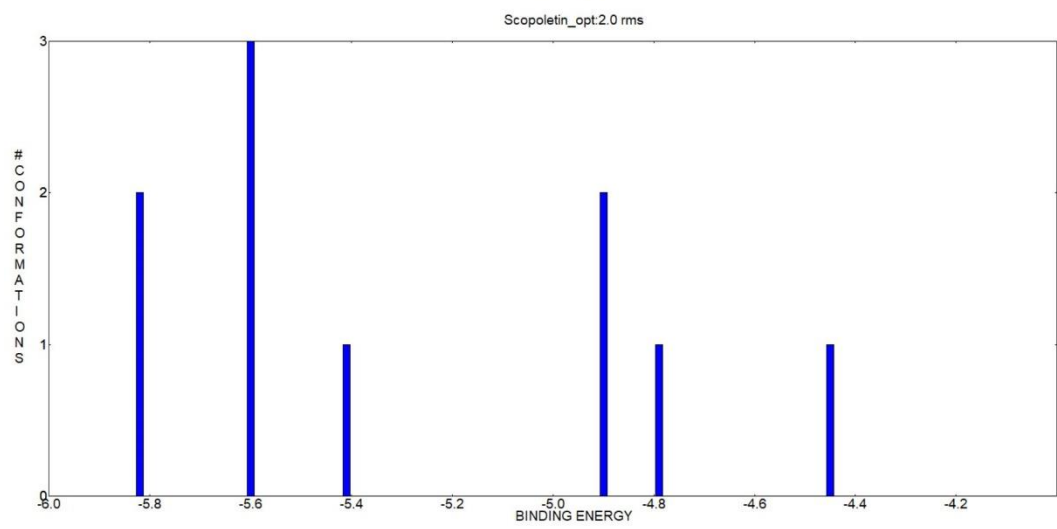
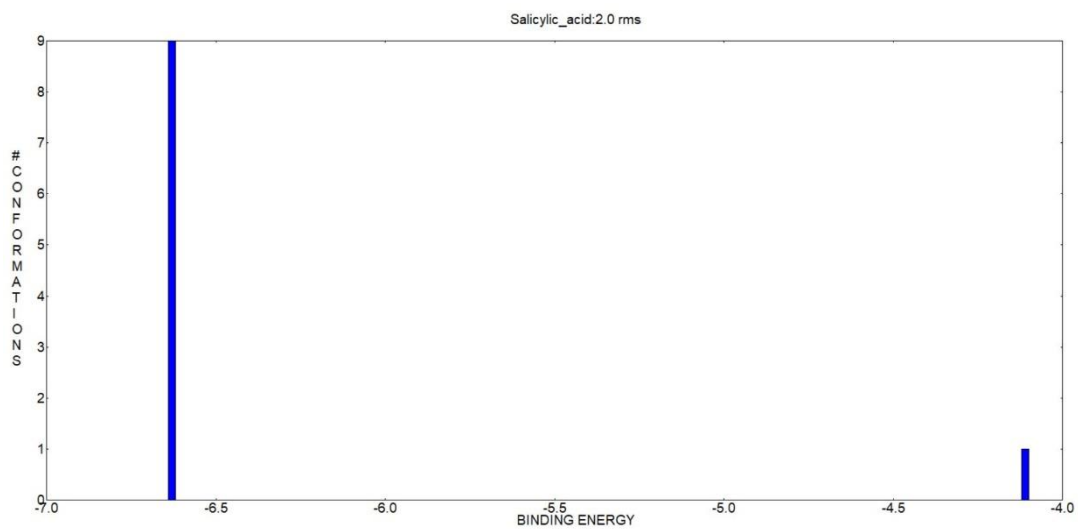
## Apéndice 29. Conformaciones y energías de enlace en AKT1



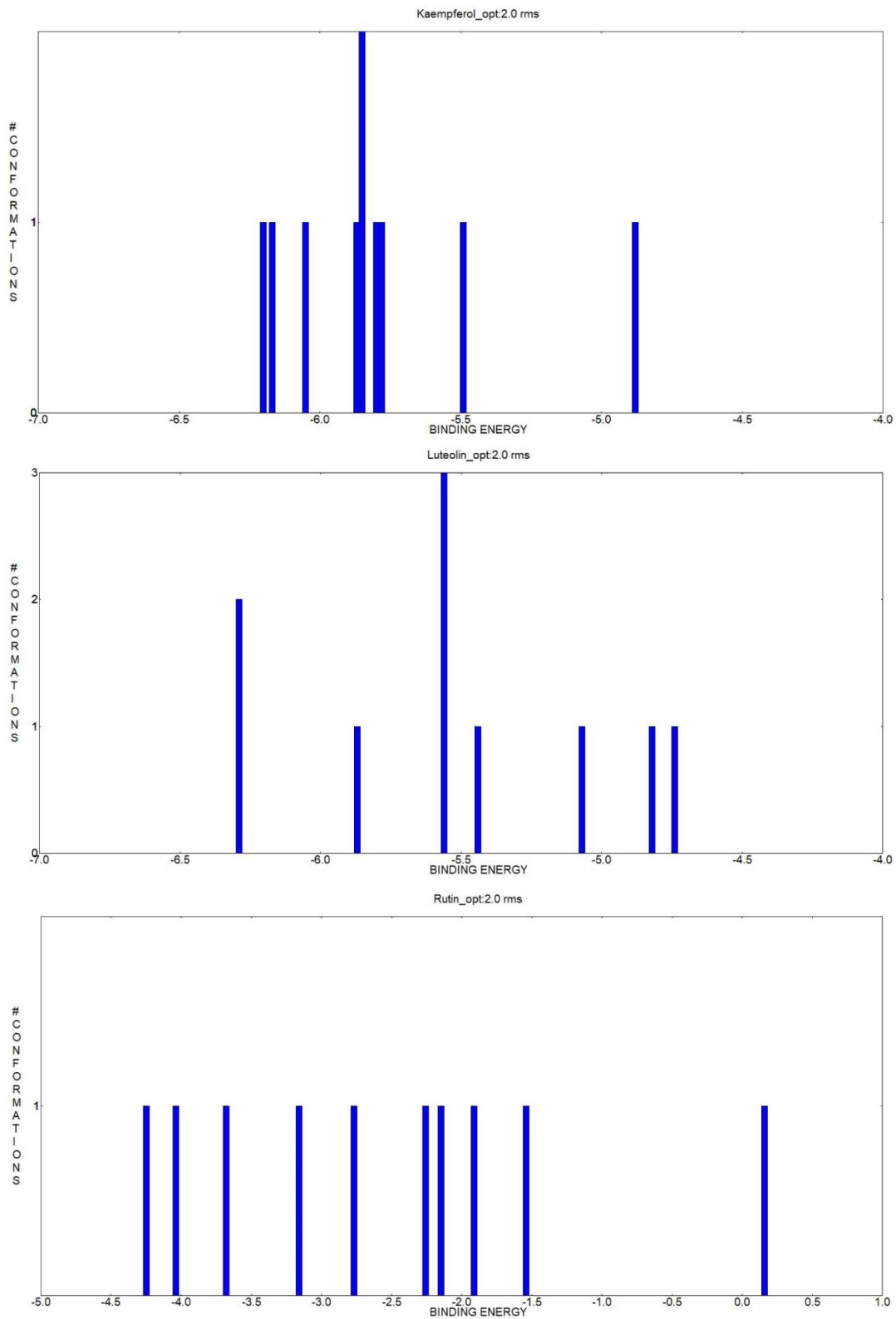


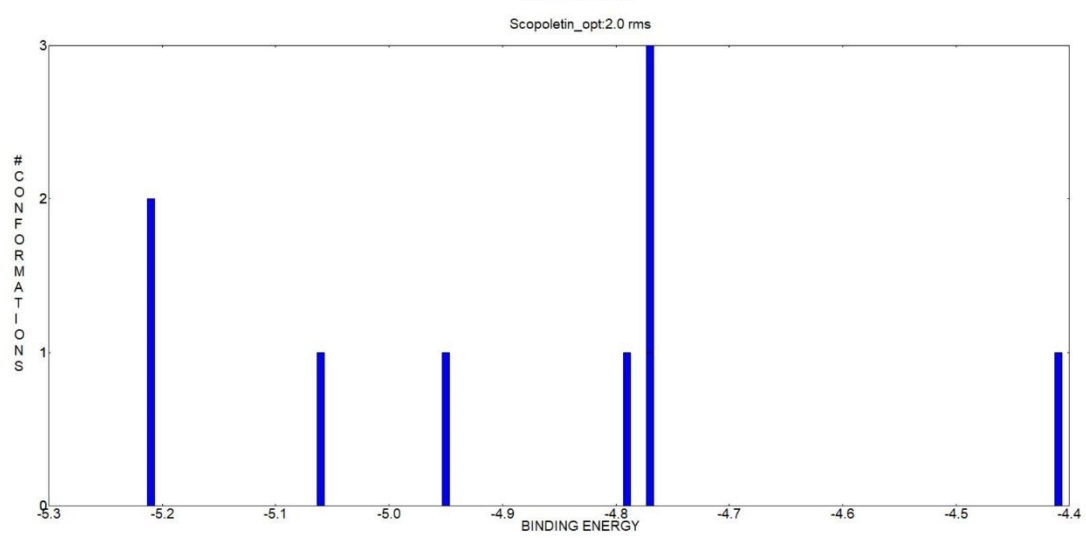
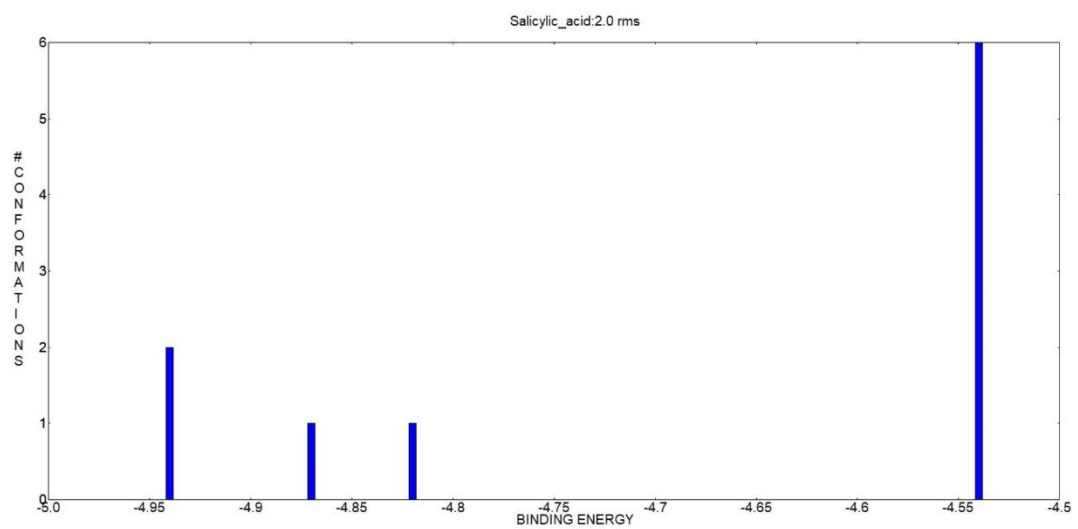
### Apéndice 30. Conformaciones y energías de enlace en EGFR



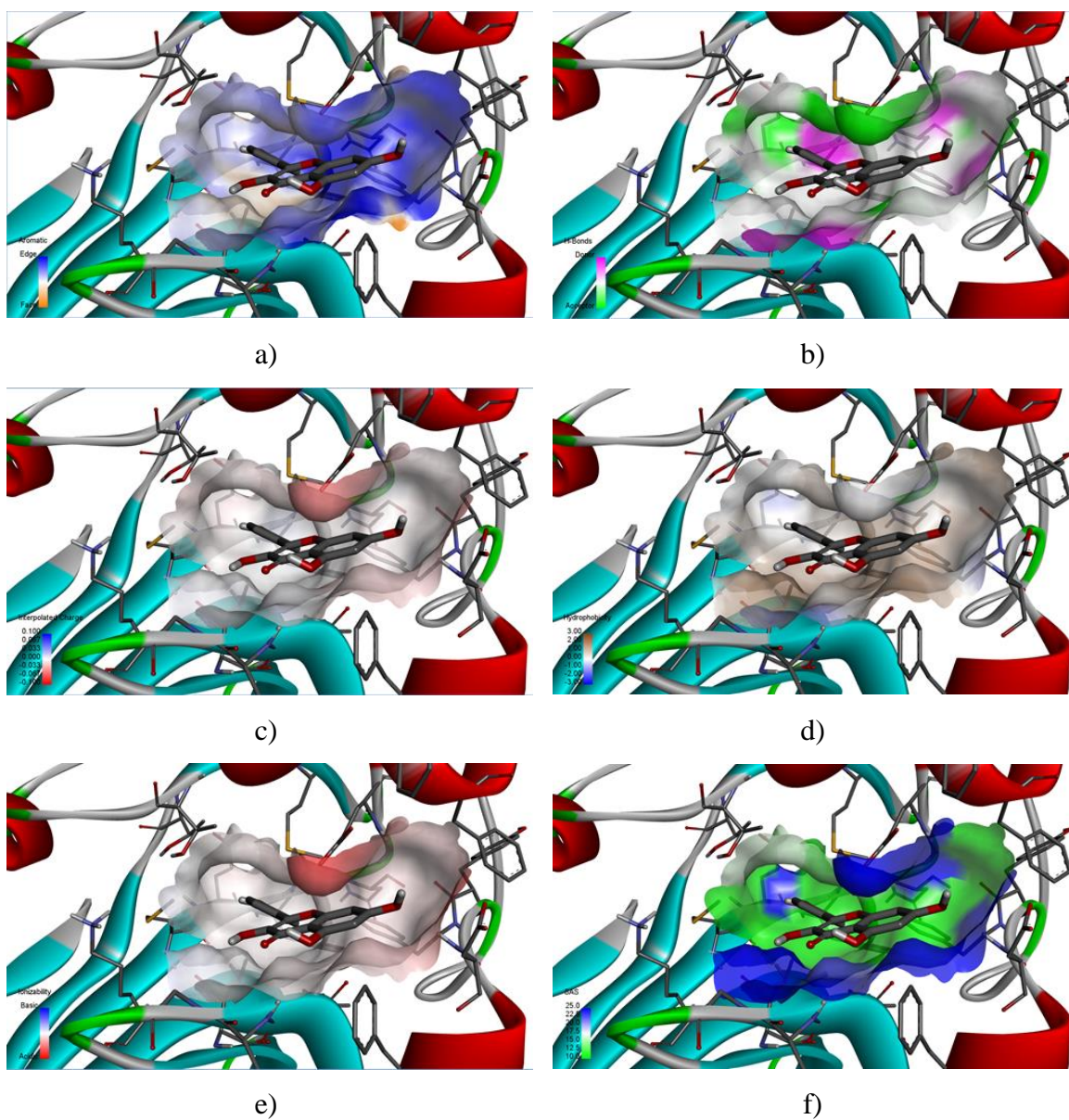


### Apéndice 31. Conformaciones y energías de enlace en TP53



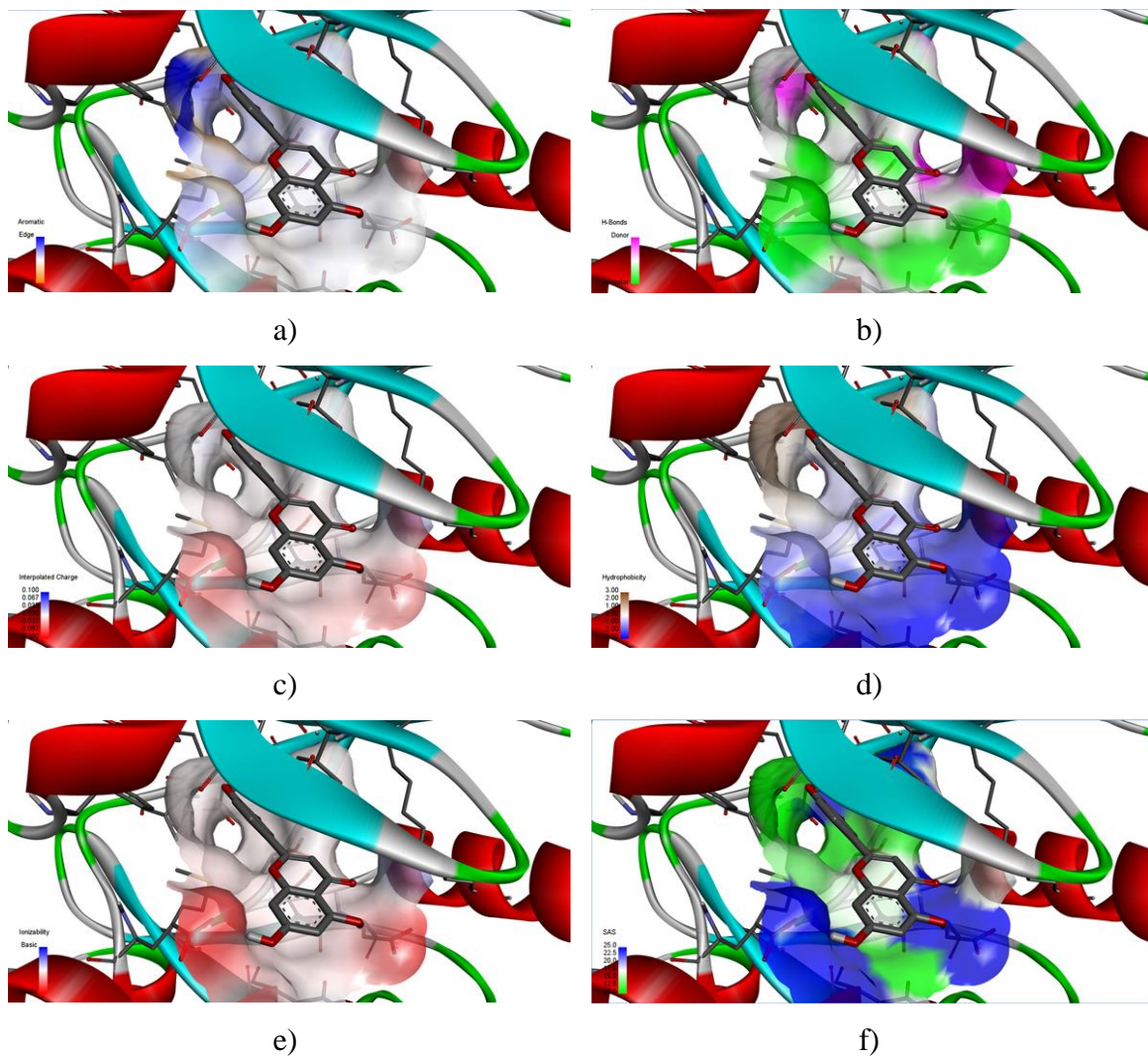


### Apéndice 32. Sitio activo de AKT1-kaempferol



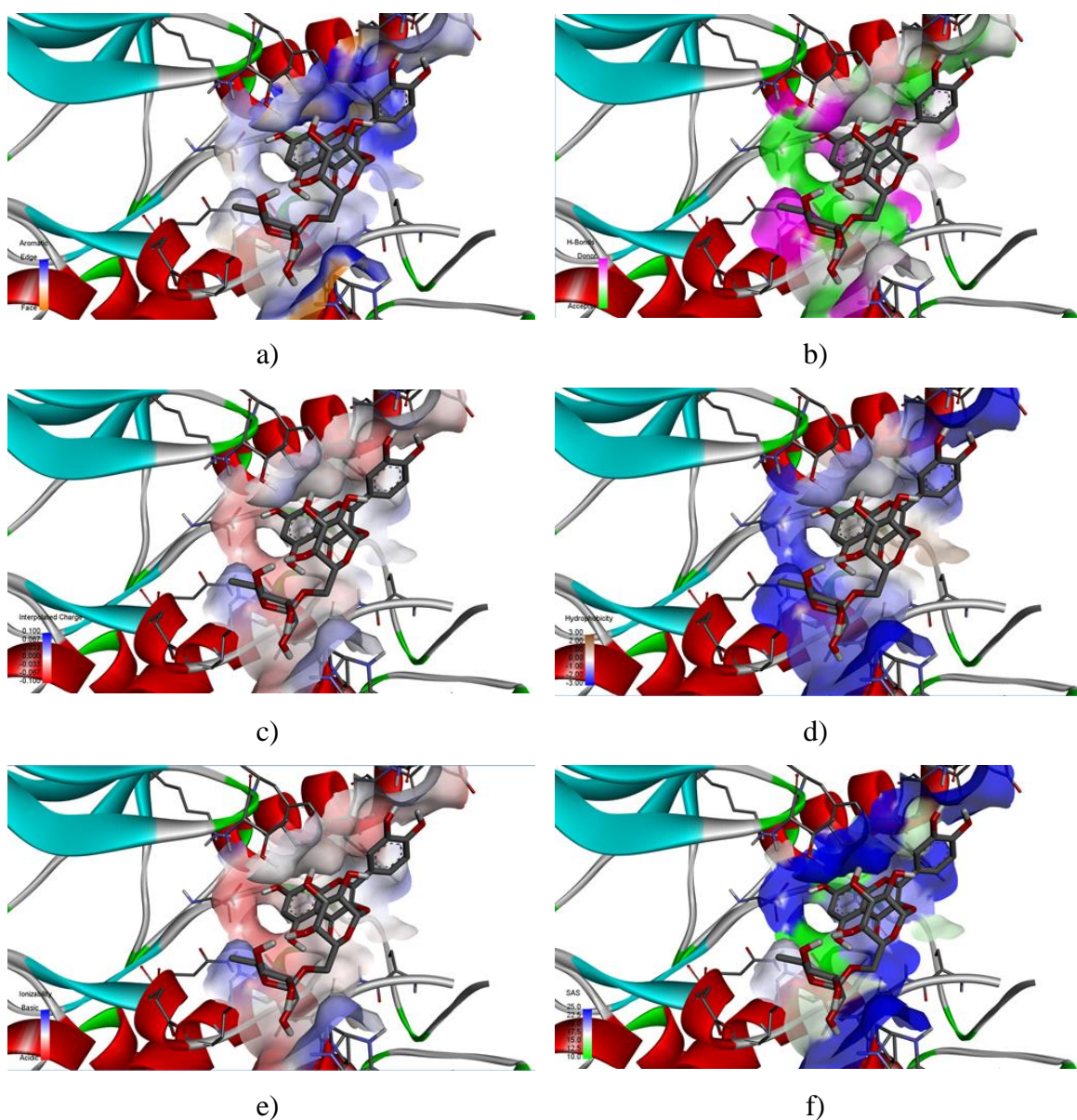
**Figura A27.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 33. Sitio activo AKT1-luteína



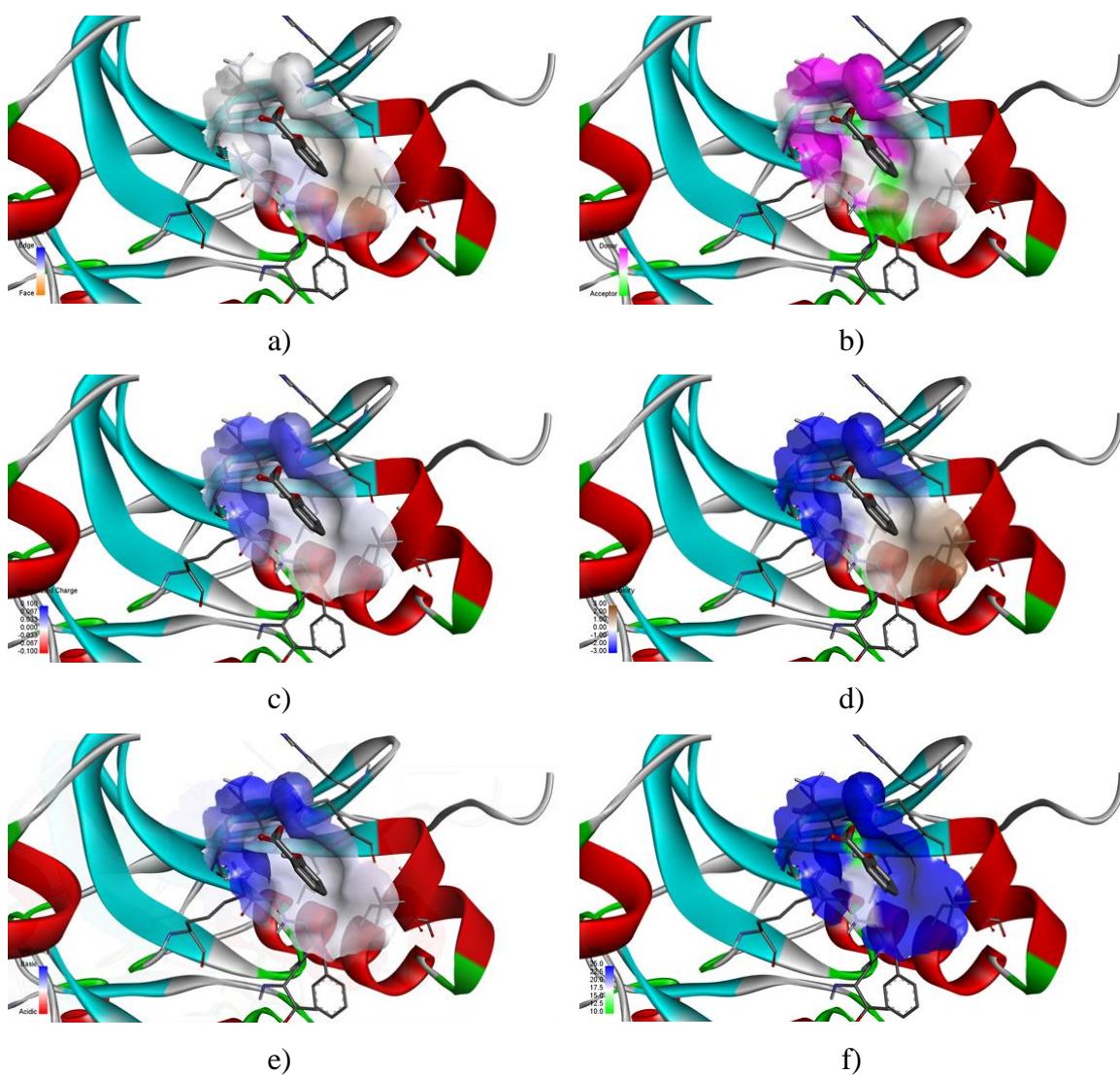
**Figura A28.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 34. Sitio activo AKT1-rutina



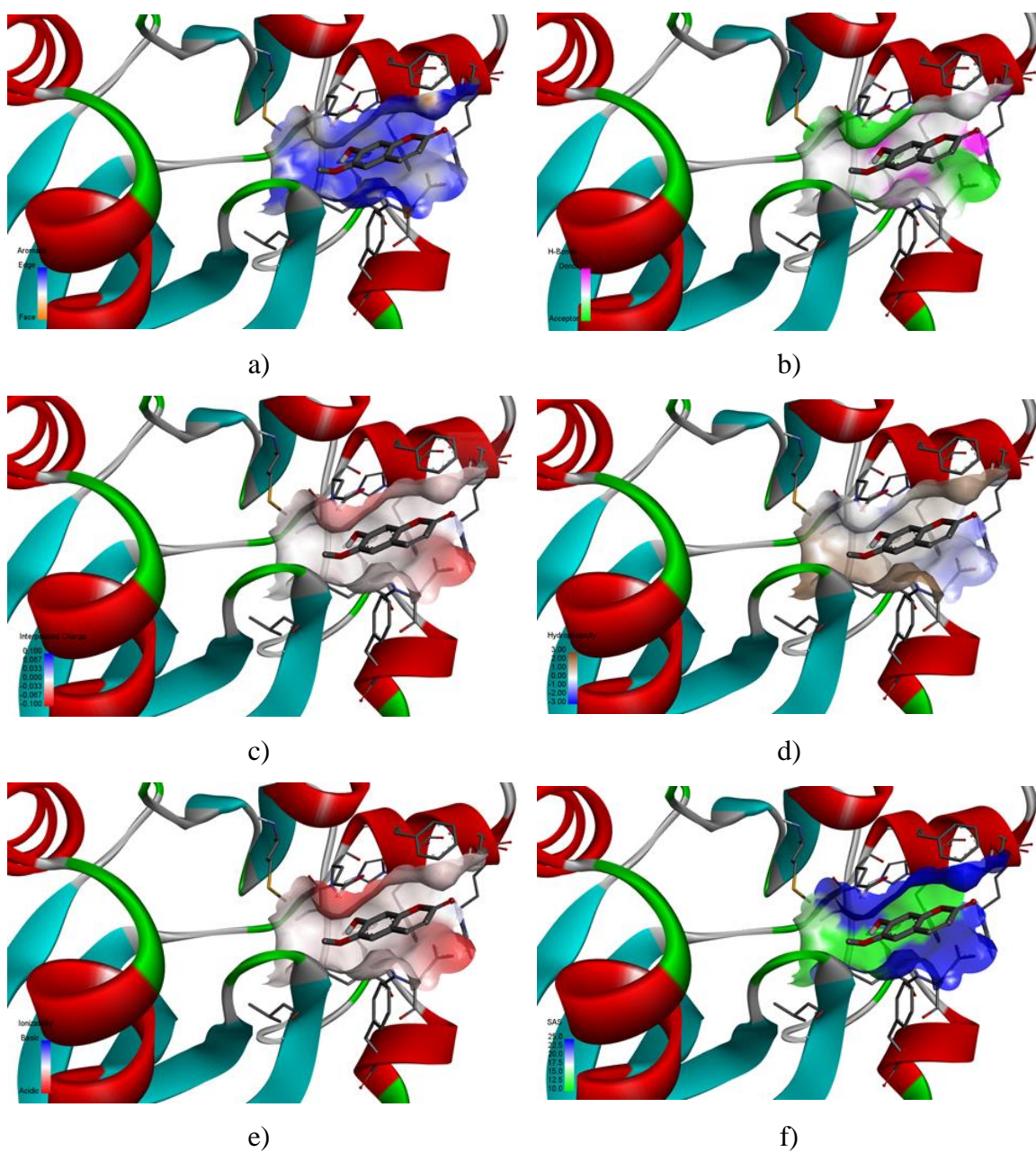
**Figura A29.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 35. Sitio activo AKT1-ácido salicílico



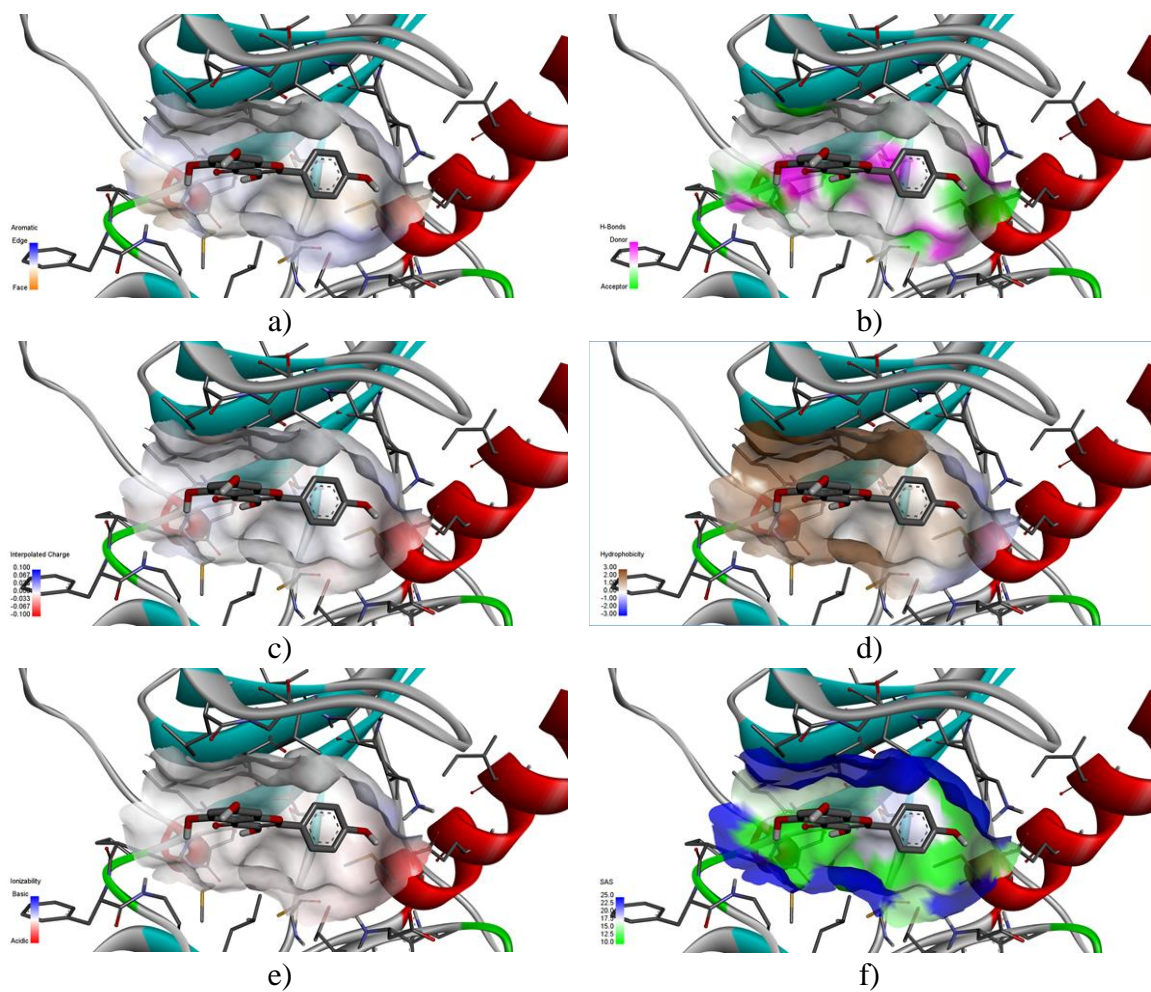
**Figura A30.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 36. Sitio activo AKT1-escopoletina



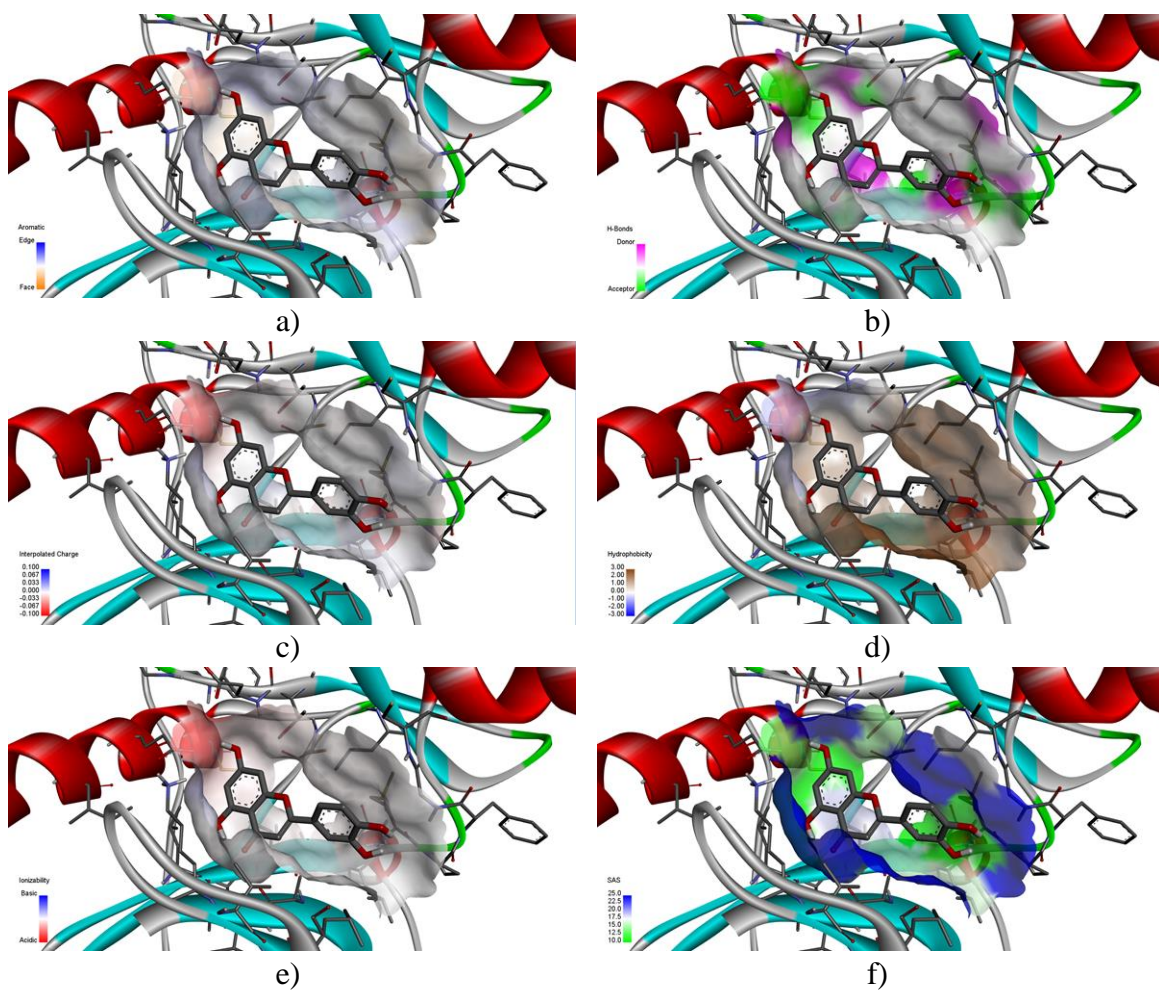
**Figura A31.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 37. Sitio activo EGFR-kaempferol



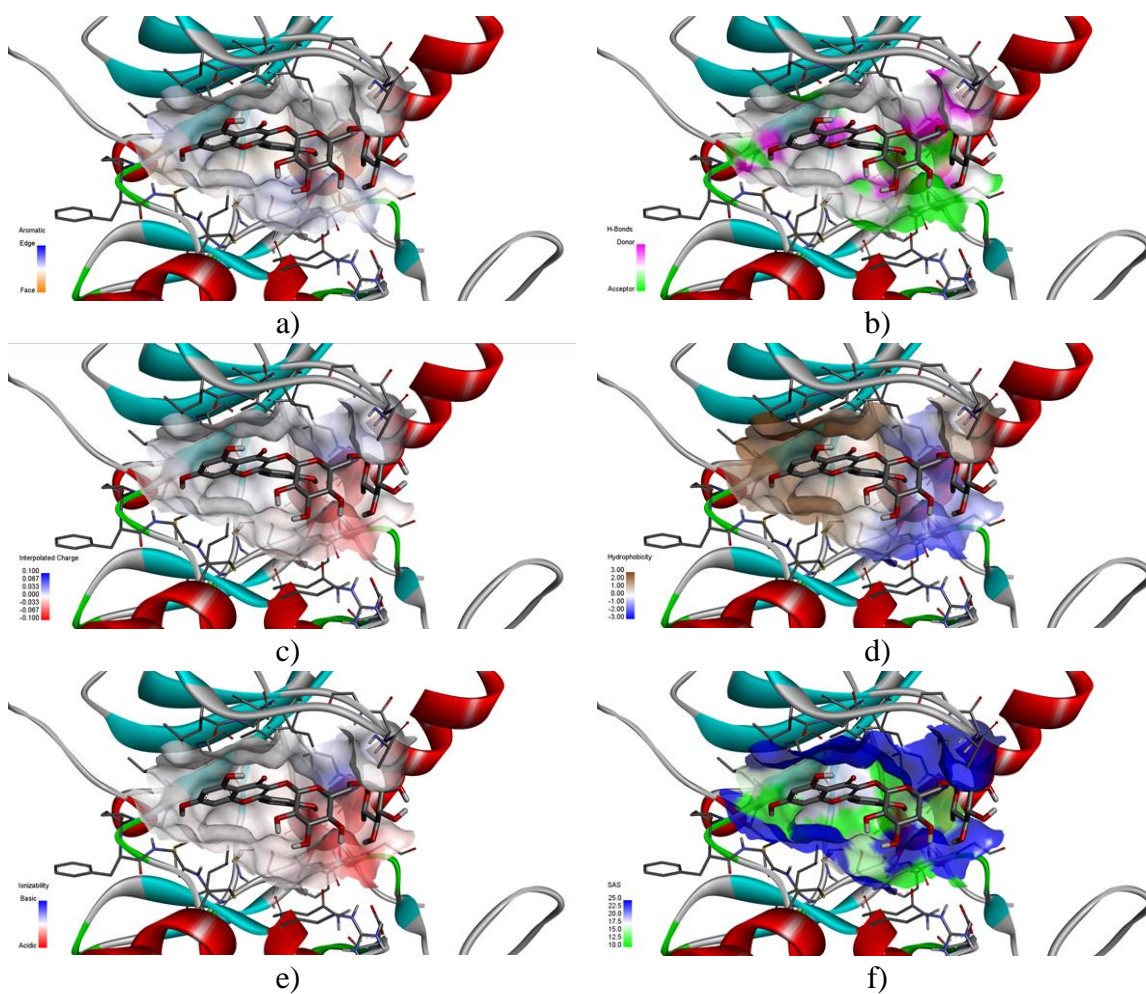
**Figura A32.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 38. Sitio activo EGFR-luteína



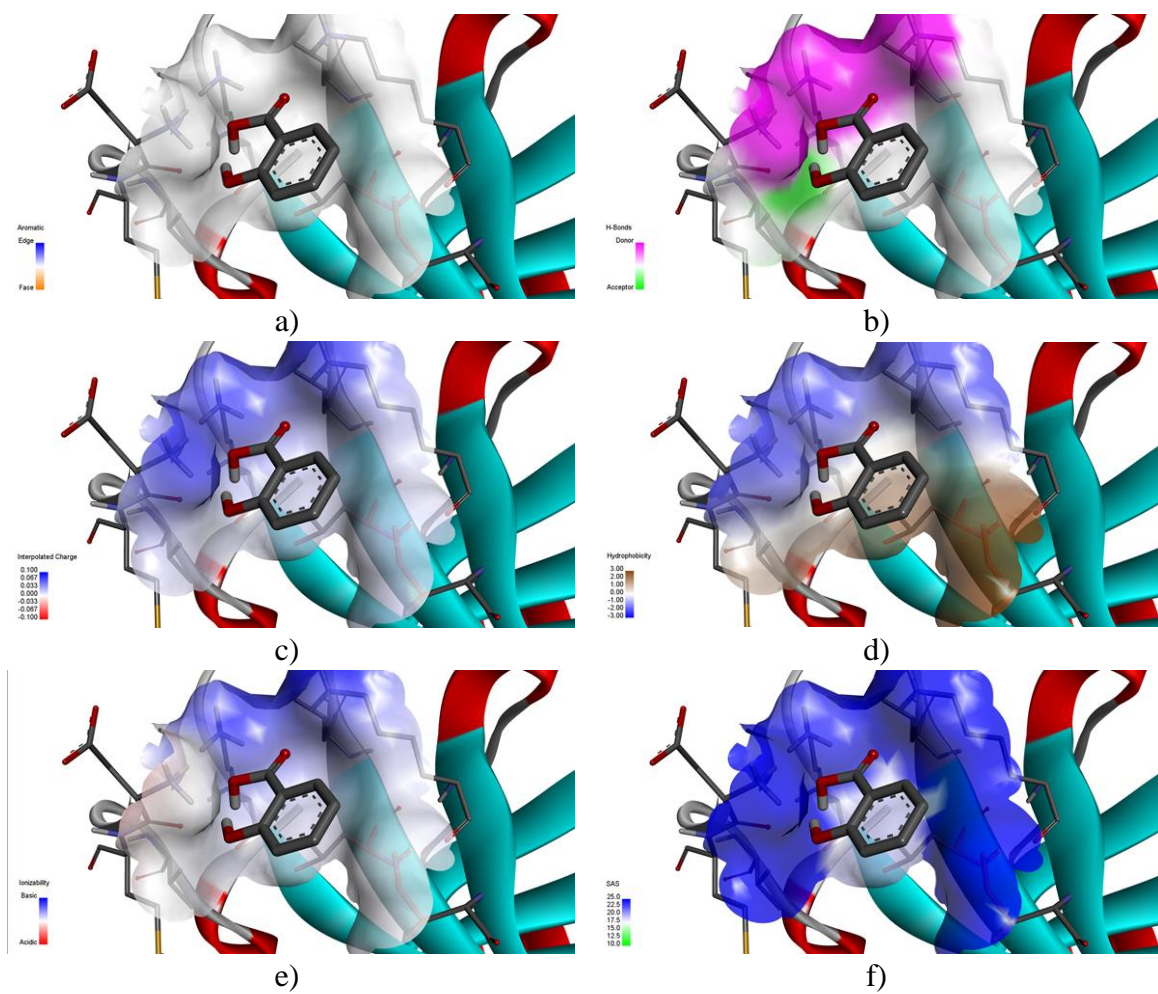
**Figura A33.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 39. Sitio activo EGFR-rutina



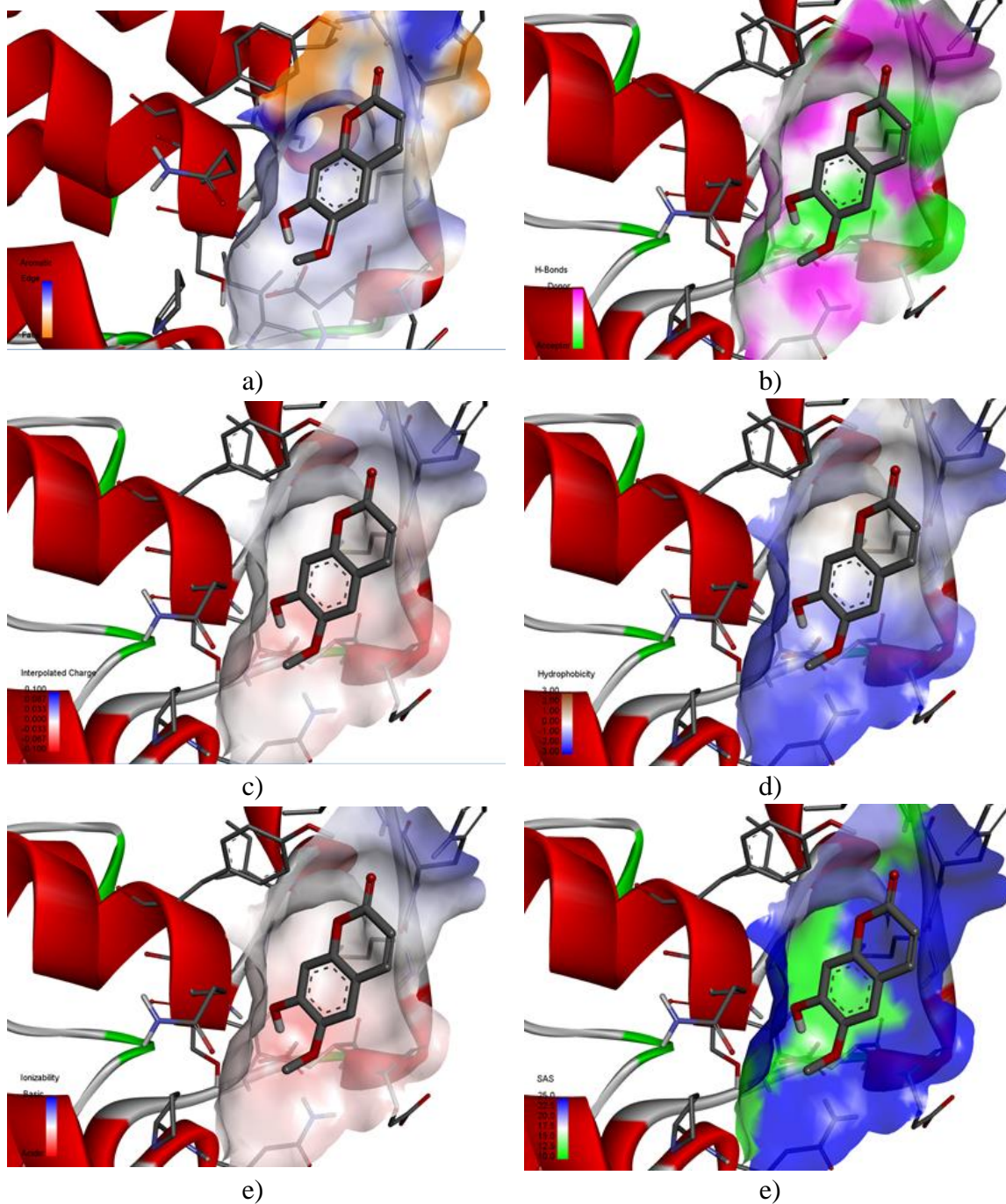
**Figura A34.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

## Apéndice 40. Sitio activo EGFR-ácido salicílico



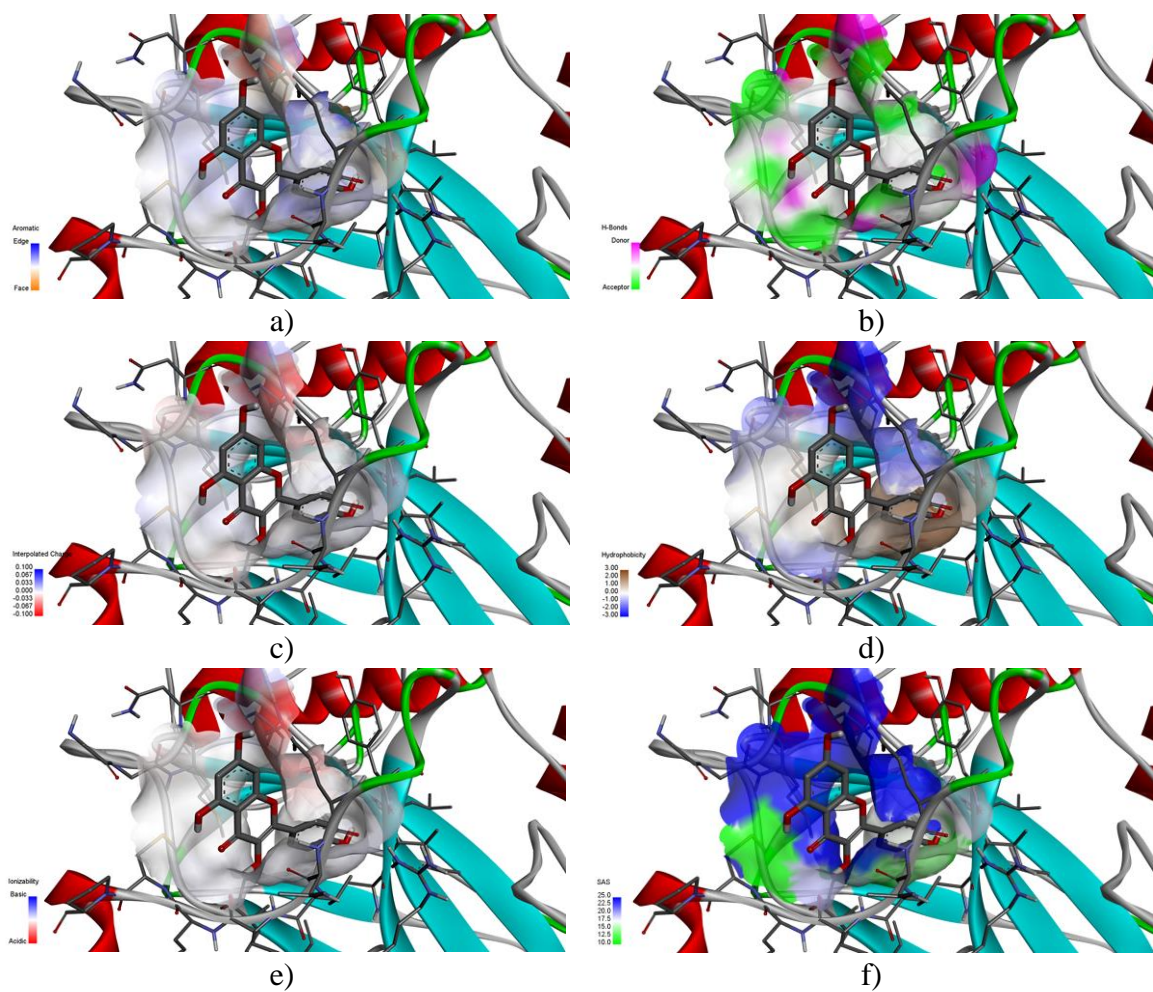
**Figura A35.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

## Apéndice 41. Sitio activo EGFR-escopoletina



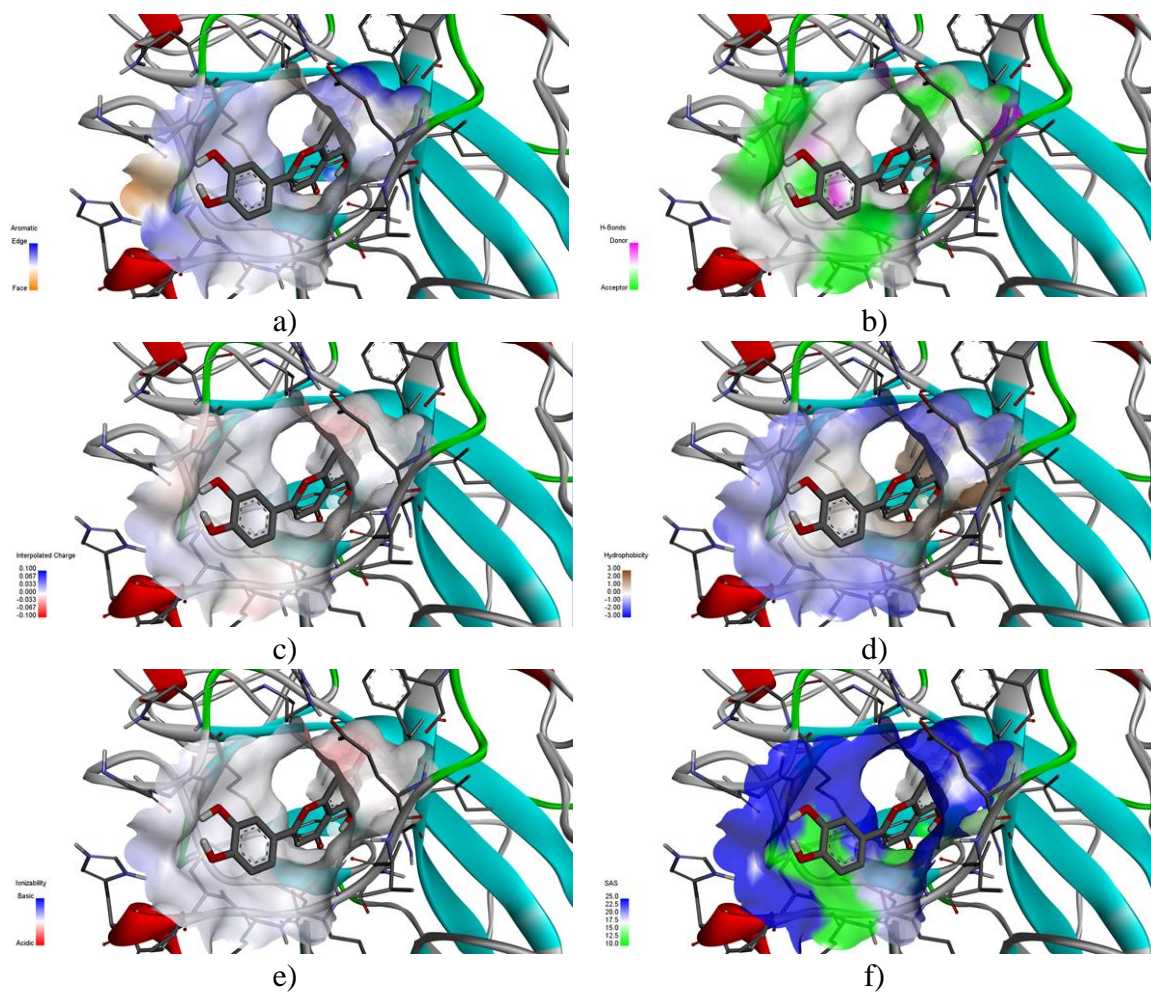
**Figura A36.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

## Apéndice 42. Sitio activo TP53-kaempferol



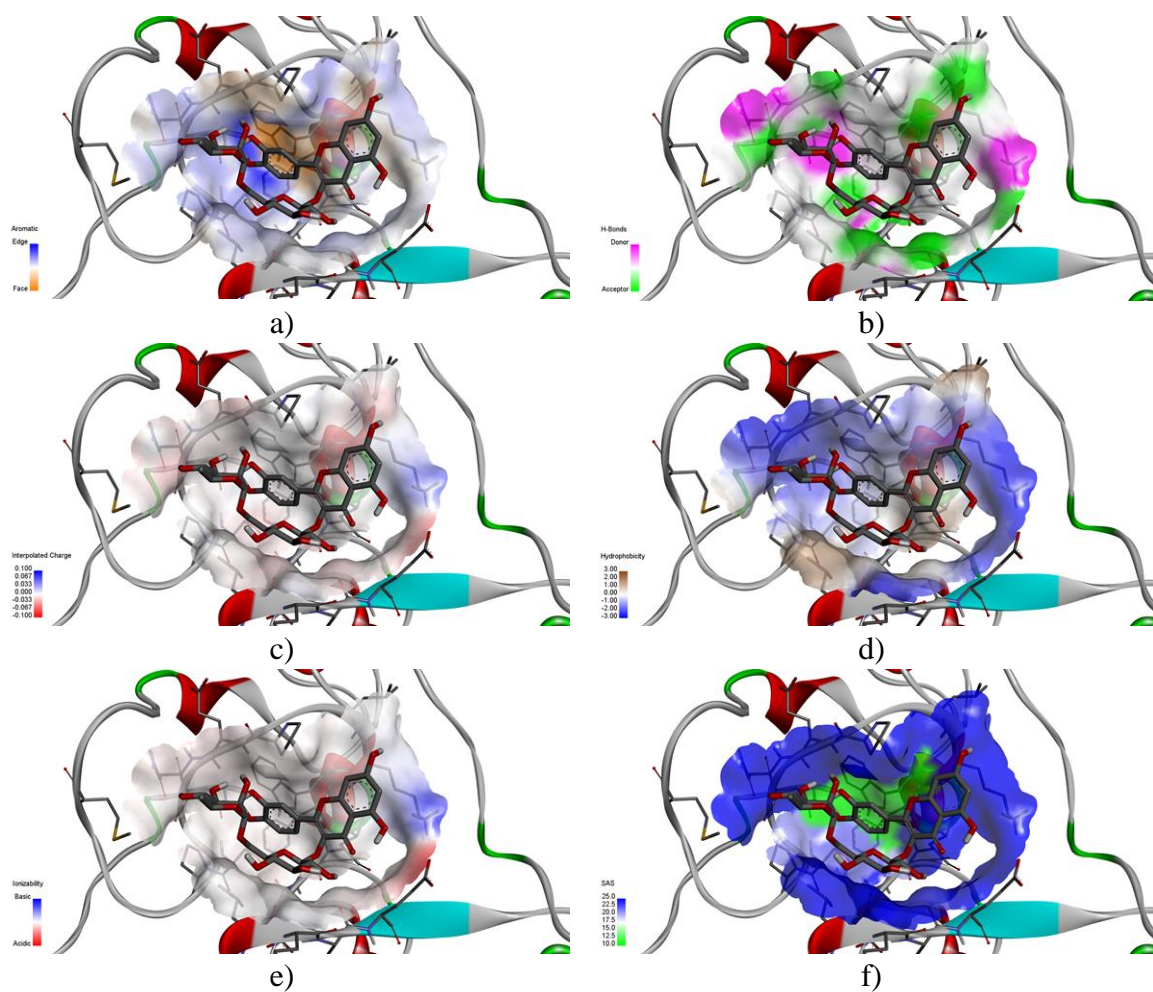
**Figura A37.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

### Apéndice 43. Sitio activo TP53-luteína



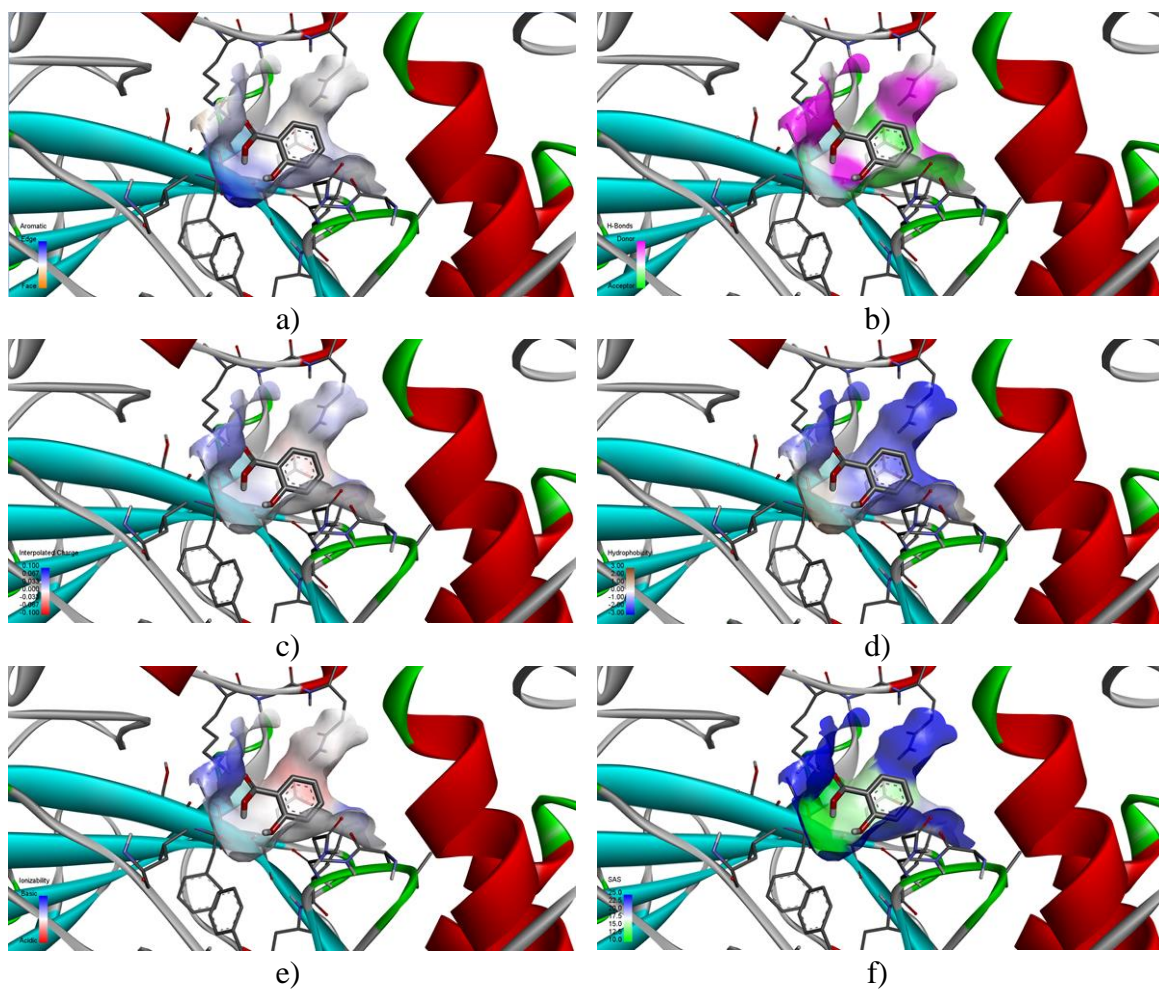
**Figura A38.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

## Apéndice 44. Sitio activo TP53-rutina



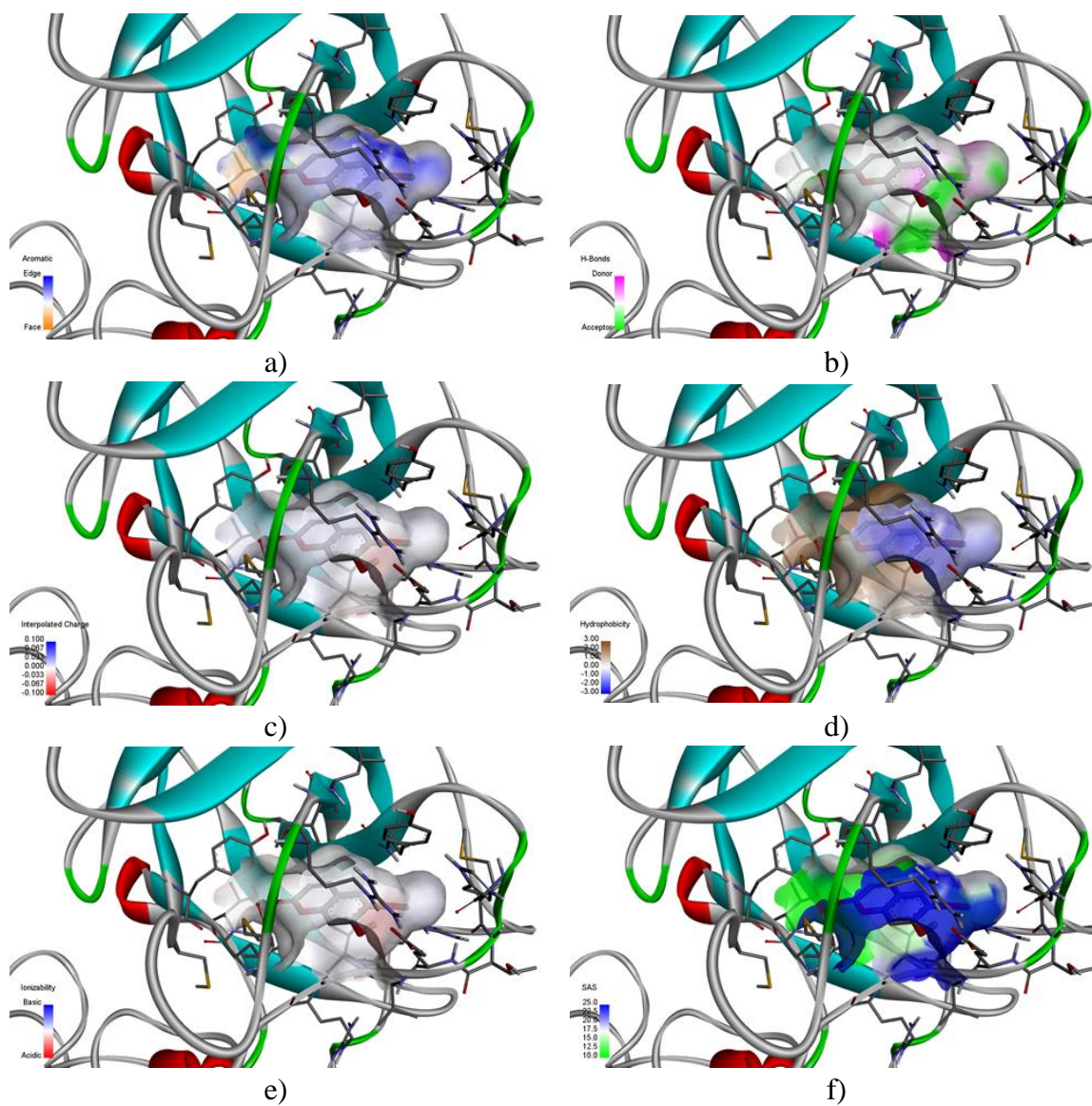
**Figura A39.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

#### Apéndice 45. Sitio activo TP53-ácido salicílico



**Figura A40.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS





## Apéndice 46. Sitio activo TP53-escopoletina



**Figura A41.** Sitio activo resaltando: a) aromaticidad, b) puentes de H, c) cargas interpolares, d) hidrofobicidad, e) ionizabilidad, f) SAS

Review

## Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration

Karen Guillén-Carvajal <sup>1</sup>, Benjamín Valdez-Salas <sup>1,2</sup>, Ernesto Beltrán-Partida <sup>1,2,\*</sup>, Jorge Salomón-Carlos <sup>1</sup> and Nelson Cheng <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Corrosión y Materiales, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal s/n, Mexicali 21280, Baja California, Mexico; kguillen@uabc.edu.mx (K.G.-C.); benva@uabc.edu.mx (B.V.-S.); jsalvador@uabc.edu.mx (J.S.-C.)

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle Normal s/n, Mexicali 21280, Baja California, Mexico

<sup>3</sup> Magna International Pte Ltd., 10 H Enterprise Road, Singapore 629834, Singapore; nelsoncheng@magnachem.com.sg

\* Correspondence: beltrane@uabc.edu.mx; Tel.: +52-6865664150

**Abstract:** Hydrogels are versatile biomaterials characterized by three-dimensional, cross-linked, highly hydrated polymeric networks. These polymers exhibit a great variety of biochemical and biophysical properties, which allow for the diffusion of diverse molecules, such as drugs, active ingredients, growth factors, and nanoparticles. Meanwhile, these polymers can control chemical and molecular interactions at the cellular level. The polymeric network can be molded into different structures, imitating the structural characteristics of surrounding tissues and bone defects. Interestingly, the application of hydrogels in bone tissue engineering (BTE) has been gathering significant attention due to the beneficial bone improvement results that have been achieved. Moreover, essential clinical and osteoblastic fate-controlling advances have been achieved with the use of synthetic polymers in the production of hydrogels. However, current trends look towards fabricating hydrogels from biological precursors, such as biopolymers, due to the high biocompatibility, degradability, and mechanical control that can be regulated. Therefore, this review analyzes the concept of hydrogels and the characteristics of chitosan, collagen, and gelatin as excellent candidates for fabricating BTE scaffolds. The changes and opportunities brought on by these biopolymers in bone regeneration are discussed, considering the integration, synergy, and biocompatibility features.

**Keywords:** bone regeneration; osteoblast-hydrogel interaction; hydrogel cross-linking; drug delivery; hydrogel biomaterials



**Citation:** Guillén-Carvajal, K.; Valdez-Salas, B.; Beltrán-Partida, E.; Salomón-Carlos, J.; Chang, N. Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration. *Polymers* **2023**, *15*, 2762. <https://doi.org/10.3390/polym15132762>

Academic Editor: Luminita Marin

Received: 10 May 2023

Revised: 14 June 2023

Accepted: 19 June 2023

Published: 21 June 2023








**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Bones consist of highly vascularized tissue, capable of auto-regenerating as part of a reparation process in response to injury, as well as during skeletal development and continuous remodeling throughout adulthood [1,2]. Contrasting with other tissues, most bone injuries (such as fractures) heal without forming scar tissue and are indistinguishable from the adjacent non-injured bones [2,3]. Currently, millions of patients suffer from bone defects due to trauma, bone disease, congenital malformations, and cancer [4]. The repair of significant bone defects is a great orthopedic challenge worldwide due to the difficulty of conducting and restoring new bone. [5]. Moreover, medical factors such as age, gender, lifestyle, and preexisting conditions influence the risk of fracture and complications arising during the recuperation process [6–8]. A recent study on the global burden of morbidity suggested that approximately 178 million people (53% male and 47% female) worldwide suffered from bone fractures in 2019, exemplifying an increase of roughly 34% since 1990 [9]. In fact, approximately 2.2 million bone grafting surgeries have been performed globally at

## Article

# Atherosclerotic-Derived Endothelial Cell Response Conducted by Titanium Oxide Nanotubes

Ernesto Beltrán-Partida <sup>1</sup>, Benjamín Valdez-Salas <sup>1,\*</sup>, Martha García-López Portillo <sup>1</sup>,  
Claudia Gutiérrez-Pérez <sup>1</sup>, Sandra Castillo-Urbe <sup>1</sup>, Jorge Salvador-Carlos <sup>1</sup>, José Alcocer-Cañez <sup>2</sup>  
and Nelson Cheng <sup>3</sup>

- <sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle de la Normal s/n, Mexicali C.P. 21040, Baja California, Mexico  
<sup>2</sup> Coordinación Clínica de Cirugía, Hospital General de Zona No. 30, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Lerdo de Tejada s/n, Mexicali C.P. 21100, Baja California, Mexico  
<sup>3</sup> Magna International Pte Ltd., 10 H Enterprise Road, Singapore 629834, Singapore  
\* Correspondence: berval@uabc.edu.mx; Tel.: +52-6865664150

**Abstract:** Atherosclerosis lesions are described as the formation of an occlusive wall-vessel plaque that can exacerbate infarctions, strokes, and even death. Furthermore, atherosclerosis damages the endothelium integrity, avoiding proper regeneration after stent implantation. Therefore, we investigate the beneficial effects of TiO<sub>2</sub> nanotubes (NTs) in promoting the initial response of detrimental human atherosclerotic-derived endothelial cells (ATH<sub>EC</sub>). We synthesized and characterized NTs on Ti6Al4V by anodization. We isolated ATH<sub>EC</sub> and tested the adhesion long-lasting proliferative activity, and the modulation of focal adhesions conducted on the materials. Moreover, ultrastructural cell-surface contact at the nanoscale and membrane roughness were evaluated to explain the results. Our findings depicted improved filopodia and focal adhesions stimulated by the NTs. Similarly, the NTs harbored long-lasting proliferative metabolism after 5 days, explained by overcoming cell-contact interactions at the nanoscale. Furthermore, the senescent activity detected in the ATH<sub>EC</sub> could be mitigated by the modified membrane roughness and cellular stretch orchestrated by the NTs. Importantly, the NTs stimulate the initial endothelial anchorage and metabolic recovery required to regenerate the endothelial monolayer. Despite the dysfunctional status of the ATH<sub>EC</sub>, our study brings new evidence for the potential application of nano-configured biomaterials for innovation in stent technologies.

**Keywords:** cell topography; cell-nanointeractions; tissue engineering; endothelial mechanosensing; nanobiotechnology



**Citation:** Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; García-López Portillo, M.; Gutiérrez-Pérez, C.; Castillo-Urbe, S.; Salvador-Carlos, J.; Alcocer-Cañez, J.; Cheng, N. Atherosclerotic-Derived Endothelial Cell Response Conducted by Titanium Oxide Nanotubes. *Materials* **2023**, *16*, 794. <https://doi.org/10.3390/ma16020794>

Academic Editor: Amin Shavandi


Received: 16 December 2022  
Revised: 4 January 2023  
Accepted: 11 January 2023  
Published: 13 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the predominant pathophysiological processes causing mortality and morbidity, mainly in top-income countries [1–3]. Interestingly, among CVD, atherosclerosis points is the leading vascular condition characterized by critical chronic inflammation, lipids accumulation, fibrous elements, calcification, and plaque formation in the intima of blood vessels [4,5]. Moreover, atherosclerosis lesions alter and damage the endothelium activity close to the plaque boundaries. Far more critical is when a rupture of the atherosclerotic plaques takes place, exacerbating myocardial infarctions, strokes, and in the worst scenario, death. The catheter-based angioplasty followed by stenting implantation is the gold standard intervention for the revascularization and treatment of atherosclerotic lesions [6,7]. However, the angioplasty and the stent colocation process led to significant damage and alterations of the surrounding endothelial cells [8–10]. In addition, current studies have evidenced a cellular turnover accompanied by senescent transformed endothelial cells after implant colocation [7,11,12]. Consequently, the detrimental endothelial integrity conducts dysfunctional adhesion, proliferation, and monolayer cellular formation [13], prerequisites required to integrate the surface of the

 RESEARCH PAPER	RAPID OPTIMIZATION OF DISINFECTANTS BY PHOTOGRAPHIC IMAGE-BASED ANALYSIS AND DESIGN OF EXPERIMENTS	Statistics   1209.05
	Benjamin Valdez-Salas, Jorge Salvador-Carlos, Ernesto Beltrán-Partida, Mario Curiel-Álvarez, Nelson Cheng, Ernesto Valdez-Salas	Analysis and Design of Experiments

## RAPID OPTIMIZATION OF DISINFECTANTS BY PHOTOGRAPHIC IMAGE-BASED ANALYSIS AND DESIGN OF EXPERIMENTS

Benjamin Valdez-Salas<sup>1</sup>, Jorge Salvador-Carlos<sup>1</sup>, Ernesto Beltrán-Partida<sup>1</sup>, Mario Curiel-Álvarez<sup>1</sup>, Nelson Cheng<sup>2</sup> y Ernesto Valdez-Salas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Departamento de Corrosión y Materiales Avanzados. Calle de la Normal, s/n Blvd. Benito Juárez – 21280 Mexicali, Baja California (México).

<sup>2</sup> Magna International Pte Ltd. 10H Enterprise Rd – 629834 Singapur (Singapore).

<sup>3</sup> Centro Médico Ixchel. Av. Nicolás Bravo 270 - 21000. Mexicali, Baja California (México).

To cite this article: VALDEZ-SALAS, Benjamin; SALVADOR-CARLOS, Jorge; BELTRAN-PARTIDA, Ernesto Alonso et al. RAPID OPTIMIZATION OF DISINFECTANTS BY PHOTOGRAPHIC IMAGE-BASED ANALYSIS AND DESIGN OF EXPERIMENTS. DYNA March - April 2024, vol. 99, n.2, pp. 154-158. DOI: <https://doi.org/10.6036/10666>

**ABSTRACT:**

*The current pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) introduced the need for the development and optimization of new alcohol-water based disinfectant formulations. Moreover, the limited supply chain of traditional active ingredients such as ethanol (EtOH) has excessively increased the base formula cost, thus, novel platforms are needed to design new strategies for disinfectant development. In this work, we devise a novel quantification method of disinfectant turbidity and foam thickness based on photographic image analysis of disinfectant to optimize formula preparation, which improves critical physicochemical parameters related to colloidal stability. Next, the numerical data obtained from the pixel photograph's values were ordered by applying a 2<sup>4</sup> factorial design, considering each disinfectant ingredient, followed by an analysis of variance (ANOVA) and counter with contour and surface plots, respectively. Furthermore, our novel method was validated using a linear regression test, consequently outlining the method's error value. Our results suggest that the photographic image analysis supported by the statistical model correlated satisfactorily with the real physicochemical behavior of disinfectant, showing that the EtOH-H<sub>2</sub>O system plays a crucial role in turbidity and foam height control. In addition, we predicted by Minitab Optimizer Tool the physicochemical and aesthetic conditions of the disinfectant, having an error of 5%. Our current approach opens up a novel path to incorporate novel active ingredients for a rapid formulation and potentially scalable method to fabricate disinfectants.*







*Keywords: image analysis, factorial design, disinfectant, foaming, active ingredients, optimization*

### 1.- INTRODUCTION

The coronavirus infection disease-2019 (COVID-19) has brought a high demand for disinfection products to clean and eradicate any virus particles of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Thus, whenever a country dictates a sanitary contingency, an extreme shortage of disinfectant products is reached. As a result, the disinfectant and cleaning industry faces an exponential increase in sales and production, resulting in an extreme shortage of disinfectant availability, thus harming the supply chain [1]-[2].

Publicaciones DYNA SL - c) Mazarredo nº69 - 2º -- 48009-BILBAO (SPAIN) Tel +34 944 237 566 – <a href="http://www.revistadyna.com">www.revistadyna.com</a> - email: <a href="mailto:dyna@revistadyna.com">dyna@revistadyna.com</a> ISSN: 0012-7361 eISSN: 1989-1490 / DYNA Vol.99 n.2 DOI: <a href="https://doi.org/10.6036/10666">https://doi.org/10.6036/10666</a>	Pag. 10 / 10
---	--------------

## Improvement of the antibacterial and skin-protective performance of alcohol-based sanitizers using hydroglycolic phytocompounds

Tanya Rivera-Martinez<sup>a</sup> , Benjamín Valdez-Salas<sup>b,c</sup> , Jorge Salvador-Carlos<sup>b</sup> , Margarita Stoytcheva<sup>b,d</sup> , Roumen Zlatev<sup>b,d</sup>  and Ernesto Beltrán-Partida<sup>b,c</sup> 

<sup>a</sup>Laboratorio de Investigación Cosvela, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México; <sup>b</sup>Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México; <sup>c</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México; <sup>d</sup>Laboratorio de Electroquímica y Biosensores, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México

### ABSTRACT

The Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak increased the usage of hand rub disinfectants, resulting in skin damage. The World Health Organization (WHO) proposed hand rubs formulations incorporating glycerine due to its moisturizing effect; nonetheless, glycerine can reduce the antimicrobial activity of alcohol-based hand rubs. Here we demonstrated that incorporating hydroglycolic extract as a substitute for glycerol in hand rub formulations reduces epidermis damage while improving antimicrobial effectiveness. We applied the hydroglycolic extracts from *Cucumis sativus* L., *Fragaria* sp. and *Calendula officinalis* instead of glycerol to modify the formula proposed by the WHO. The antimicrobial activity and the healing skin action were evaluated using the agar diffusion test and a human skin tolerability trial. Furthermore, we assessed the cytotoxicity and wound repair capability of the formulated hydroglycolic extracts against human gingival fibroblasts (HGFs) and the phenotype of murine macrophages. The hand rubs containing *Fragaria* sp. and *C. officinalis* hydroglycolic extracts showed improved antimicrobial activity even after six months of fabrication. Moreover, the formulated hand rubs had similar cellular viability behaviour to glycerol. Interestingly, the tolerability and acceptability response were promoted by the *C. sativus* extract, showing skin protection and increased integrity by up to 14.12%. Our results represent an alternative, ecofriendly and cost-effective option for formulating new potential hand rubs that improve skin protection without compromising the disinfection functionality.

### ARTICLE HISTORY

Received 19 April 2023  
Accepted 28 August 2023

### KEYWORDS



Sanitizer cytotoxicity;  
green disinfectants;  
human fibroblasts;  
COVID-19; skin integrity

### Introduction

Since the health crisis caused by Coronavirus disease 2019 (COVID-19), the population's lifestyles have considerably changed, as new efforts for personal protection are now practiced among households and institutions. Furthermore, the risk of SARS-CoV-2 spread is highly latent due to human-to-human interactions, close contact with contaminated inanimate surfaces, and microbial persistence, uncovering the hand as the transmission platform. Thus, the development of cleaning protocols at the entrance and exit of homes, schools, and buildings has increased worldwide. However, the disinfection practices that intend to

reduce microbial transmission involve excessive cleaning, and usage of disinfection products can severely damage the connective tissue and/or epithelium tissue, such as the skin surface [1,2]. Moreover, since the beginning of the pandemic, the prolonged exposure to irritant chemical products used for disinfectant formulations is now a frequent problem for healthcare workers [34]. Therefore, paying particular attention to the hands' skin, which is the most sensitive tissue, this damage occurs as redness, cracking, irritation, and in the worst case, severe allergies [5,6].

Worldwide, different alternatives such as cleaning, water temperature, and the formulation of hand-rubs

**CONTACT** Ernesto Beltrán-Partida  [beltrane@uabc.edu.mx](mailto:beltrane@uabc.edu.mx)  Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México

Tanya Rivera-Martinez and Benjamín Valdez-Salas contributed equally and are considered as co-first authors.

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.



## One-step synthesis of freestanding and translucent ZrO<sub>2</sub> nanotube membranes by direct electrochemical anodization

Jorge Salomón-Carlos, Benjamín Valdez-Salas<sup>\*</sup>, Jhonathan Castillo-Saenz, Ernesto Beltrán-Partida<sup>\*</sup>

Care Facility de Química y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal s/n, Mexicali 21280, Baja CA, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Zirconium oxide  
Nanotubes  
Membranes  
Anodic oxidation

### ABSTRACT

One-step synthesis of freestanding zirconium oxide nanotube (ZrO<sub>2</sub>-NT) membranes was obtained by direct electrochemical anodization of zirconium (Zr) substrates in aqueous electrolytes (mixture of 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.75 M NH<sub>4</sub>F). The maximum membrane area was 9 cm<sup>2</sup> and showed translucency from 400 to 700 nm. The ZrO<sub>2</sub>-NTs have an external diameter of ~80 nm, an internal diameter of ~55 nm, and a length of ~22.5 μm. Moreover, the ZrO<sub>2</sub>-NTs showed a cubic crystal structure after anodization. The results are highly promising for applications requiring independent ZrO<sub>2</sub> nanotube membranes.

### 1. Introduction

Metal oxide nanotubes have garnered significant attention in recent times. These self-organizing, porous nanostructures have proven vital in various applications, particularly in catalytic reactions where maximum specific surface area is essential. Furthermore, they serve as patterns, support, and etching templates for nanomaterials. Although nanotubes possess exceptional physicochemical properties, they constitute only a minuscule portion of the substrate, thus restricting the range of applications. To overcome this challenge, a feasible solution is to detach the nanotubes from the substrate surface to obtain an independent and manageable membrane.

Metal oxide nanotubes have been extensively researched, with Al and Ti nanotubes being the most commonly studied [1]. However, nanotubes have been successfully synthesized from other metal oxides, including Hf, Ta, Nb, and Zr [2]. Research has indicated that zirconia (ZrO<sub>2</sub>) possesses qualities that make it a viable replacement for titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) in specific applications [3]. Specifically, zirconia offers benefits such as biocompatibility, osseointegration, corrosion resistance, low bacterial adhesion, and reduced susceptibility to periimplantitis. However, there are still hurdles to producing zirconia nanotube (ZrO<sub>2</sub>-NT) membranes, including synthesis, size control, crystallinity, and mechanical resistance. Tsuchiya H et al. synthesized ZrO<sub>2</sub>-NT with cubic crystalline phase using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in an electrolyte solution but failed to obtain a freestanding membrane [4].

Various authors have reported creating ZrO<sub>2</sub>-NT independent membranes by electrochemically anodizing in electrolyte media that contained fluorine [5–8]. Although membranes have been documented as being obtained through multiple synthesis steps, the maximum reported area is only 2 cm<sup>2</sup>. Furthermore, the ZrO<sub>2</sub>-NT obtained are typically amorphous, requiring additional thermal annealing processes at temperatures equal to or higher than 400 °C to achieve a crystalline state. Unfortunately, this process often results in damage and, in some cases, destroys the membrane.

In this work, we report the one-step synthesis of the ZrO<sub>2</sub>-NT membrane through direct electrochemical anodization. The resulting ZrO<sub>2</sub>-NT membrane is translucent, crystalline, and has an extensive area of 9 cm<sup>2</sup>. Our research has demonstrated the feasibility of manipulating the membrane area, with the only limiting factor being the voltage source.

### 2. Experimental

#### 2.1. Synthesis of ZrO<sub>2</sub>-NT membranes

To prepare the independent ZrO<sub>2</sub>-NT membranes, we used a high-purity Zr sheet (99.1 %, Baoji Hanz Metal Material Co., Ltd. China) with a thickness of 0.05 mm and a factory surface mirror finish. The sheet was cut into 5 × 3 cm rectangles. Subsequently, the resulting samples were subjected to a cleaning process that involved washing with distilled water and ethanol for 15 min each, followed by a drying period

<sup>\*</sup> Corresponding authors.

E-mail addresses: [berval@uabc.edu.mx](mailto:berval@uabc.edu.mx) (B. Valdez-Salas), [beltrane@uabc.edu.mx](mailto:beltrane@uabc.edu.mx) (E. Beltrán-Partida).

<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2024.136635>







Received 21 March 2024; Received in revised form 10 May 2024; Accepted 13 May 2024

Available online 14 May 2024

0167-577X/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Research Article

## Pitting Corrosion of Austenitic Stainless Steels in Electroactivated Water

Benjamín Valdez-Salas <sup>1,2</sup>, Jorge Salvador-Carlos <sup>1,2</sup>, Ernesto Beltrán-Partida <sup>1</sup>,  
Mario Alberto Curiel-Álvarez <sup>1</sup>, Ernesto Valdez-Salas <sup>1</sup>, and Nelson Cheng <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Core Facility de Química y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal s/n, Mexicali, Baja California 21280, Mexico

<sup>2</sup>Magna International Pte Ltd, 1011 Enterprise Road, Singapore 692834, Singapore

Correspondence should be addressed to Jorge Salvador Carlos; [jsalvador@uabc.edu.mx](mailto:jsalvador@uabc.edu.mx)

Received 29 May 2024; Accepted 31 July 2024

Academic Editor: Michael J. Schütze

Copyright © 2024 Benjamín Valdez Salas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The pitting corrosion behavior of austenitic stainless steels (SSs) UNS S30400 and UNS S31600 exposed to electroactivated water (EAWA) (oxidation-reduction potential [ORP]  $1100 \pm 15$  mV and pH  $4.5 \pm 0.2$ ) was evaluated by gravimetric tests, linear and cyclic potentiodynamic polarization (CPP), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Gravimetric and electrochemical results for corrosion rates indicate a good corrosion resistance of the tested SS. However, localized pitting corrosion appears after 1 week of exposure to EAWA, as was corroborated by the results of both corrosion rate and surface analysis. Special care must be taken for the sanitization of SS surfaces used in medical installations to avoid their corrosion when EAWA is applied as a disinfectant.

**Keywords:** anolyte; austenitic stainless steel; electroactivated water; pitting corrosion

### 1. Introduction

Electroactivated water (EAWA), also known as electrochemically activated water or superoxidized water, is a product of a series of subprocesses such as electrolytic deposition, electrophoresis, electroflotation, and electrocoagulation [1]. These subprocesses involve redox reaction ion transport at the anode and cathode with evolving gas and flocculation reactions. The reactions occur in an electrochemical cell with two different environments divided by a semipermeable membrane, in which the cathode contains the alkaline media (catholyte) and the anode the acidic media (anolyte) [2]. For both the catholyte and the anolyte, physicochemical parameters such as pH, oxidation-reduction potential (ORP), and electrical conductivity are dependent on factors such as the amount of water, electrode materials, the concentration of NaCl or HCl, temperature, and applied voltage [3, 4].

Anolyte and catholyte are different in chemical composition and physicochemical parameters, as shown in Figure 1 [5].

The particular physicochemical characteristics and the diversity of chemical components in both anolyte and catholyte also provide particular important properties, making them useful for a diversity of applications [6, 7]. Studies have demonstrated that catholyte has antioxidant, immunostimulant, and cleansing properties, and also promotes tissue regeneration, cellular growth, and division [8]. On the other hand, anolyte has antibacterial, antiviral, antifungal, anti-allergic, and anti-inflammatory properties [9–11]. Interestingly, the active compounds in anolyte stand out for not being toxic to somatic cells and superior organisms. Due to its broad spectrum and easy preparation, the anolyte has been included by the World Health Organization (WHO) for use as a disinfectant, antiseptic, and wound-healing agent during the COVID-19 pandemic in 2021 [12].

Article

# Eco-Friendly Synthesis of Cerium Oxide Nanoparticles from *Lycium cooperi*

 Jhonathan Castillo-Saenz , Jorge Salomón-Carlos , Ernesto Beltrán-Partida \* and Benjamín Valdez-Salas \*

Core Facilities of Chemistry and Advanced Materials, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21280, Baja California, Mexico; jhonathan.saenz@uabc.edu.mx (J.C.-S.); jsalvador@uabc.edu.mx (J.S.-C.)

\* Correspondence: beltrane@uabc.edu.mx (E.B.-P.); berval@uabc.edu.mx (B.V.-S.)

**Abstract:** Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub>-NPs) offer promising advantages in semi-conductors and biomedical applications due to their optical, electrical, antioxidant, and antibacterial properties. However, the widely reported synthetic strategies for CeO<sub>2</sub>-NPs demand toxic precursors and intermediary pollutants, representing a major limitation to CeO<sub>2</sub>-NPs applications. Therefore, it is necessary to develop greener strategies that implicate ecological precursors to reduce the negative impact on the scalability of CeO<sub>2</sub>-NPs. In this regard, we applied *Lycium cooperi* (*L. cooperi*) aqueous extracts as an unexplored potential green reducing agent for the eco-friendly synthesis of CeO<sub>2</sub>-NPs. The *L. cooperi* extract showed the presence of alkaloids, flavonoids, cardiac glycosides, and carbohydrate-derived families, which were assessed for spherical monodispersed CeO<sub>2</sub>-NPs under a rapid chemical reduction. Moreover, the elemental composition revealed Ce and O, indicating highly pure CeO<sub>2</sub>-NPs characterized by an interplanar cubic crystalline structure. Furthermore, we detected the presence of stabilizing functional groups from *L. cooperi*, which, after a controlled annealing process, resulted in a band gap energy of 3.9 eV, which was optimal for the CeO<sub>2</sub>-NPs. Thus, the results indicate that *L. cooperi* is an environmentally friendly synthesis method that can open a new route for CeO<sub>2</sub>-NPs in biomedical and industrial applications.

**Keywords:** green nanoparticles; cerium oxide; sustainable chemistry; semiconductors



Academic Editor: Serge Thorimbert

Received: 29 October 2024

Revised: 14 January 2025

Accepted: 7 February 2025

Published: 11 February 2025

**Citation:** Castillo-Saenz, J.; Salomón-Carlos, J.; Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B. Eco-Friendly Synthesis of Cerium Oxide Nanoparticles from *Lycium cooperi*. *Reactions* **2025**, *6*, 14. <https://doi.org/10.3390/reactions6010014>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) is an n-type semiconductor material with a band gap of approximately 3.3 eV [1]. Interestingly, CeO<sub>2</sub>-NPs have garnered significant attention due to their improved optical, electrical, catalytic, and thermal properties, along with greater chemical stability compared with non-nanostructured CeO<sub>2</sub> precursors [2]. Moreover, CeO<sub>2</sub>-NPs are considered a highly promising material for various applications, including optoelectronic devices [3], energy conversion and storage [4], catalysis [5], tissue engineering [6], biotechnology [7], and nanomedicine and antioxidants in biological systems [8]. In this regard, CeO<sub>2</sub>-NPs have been synthesized using different chemical strategies, such as sol-gel, colloidal synthesis, hydrothermal, and precipitation methods [9,10]. These synthetic approaches allow precise control of nanoparticle size, morphology, and chemical composition. However, an important disadvantage of the chemical method is that it often involves toxic solvents and significant pollutant substances. Thus, considering these detrimental issues, green precipitation mechanisms have been widely applied using plant extracts for a facile, economic technique, which



Article

# Nasal Spray Disinfectant for Respiratory Infections Based on Functionalized Silver Nanoparticles: A Physicochemical and Docking Approach

Benjamín Valdez-Salas <sup>1,\*</sup>, Jorge Salvador-Carlos <sup>1,\*</sup>, Ernesto Valdez-Salas <sup>2</sup>, Ernesto Beltrán-Partida <sup>1</sup>,  
Jhonathan Castillo-Saenz <sup>1</sup>, Mario Curiel-Álvarez <sup>1</sup>, Daniel Gonzalez-Mendoza <sup>3</sup> and Nelson Cheng <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Core Facilities of Chemistry and Advanced Materials, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Calle de La Normal S/N and Boulevard Benito Juárez, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; benva@uabc.edu.mx (B.V.-S.); beltrane@uabc.edu.mx (E.B.-P.); jhonathan.saenz@uabc.edu.mx (J.C.-S.); mcuriel@uabc.edu.mx (M.C.-Á.)

<sup>2</sup> Centro Médico Ixchel, Av. Nicolás Bravo 270, Mexicali 21000, Baja California, Mexico; valdez68ernesto@gmail.com

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n, Ejido Nuevo Leon, Mexicali 21705, Baja California, Mexico; danielg@uabc.edu.mx

<sup>4</sup> Magna International Pte Ltd., 10 H Enterprise Road, Singapore 629834, Singapore; nelsoncheng@magnachem.com.sg

\* Correspondence: jsalvador@uabc.edu.mx

**Abstract:** Respiratory diseases have presented a remarkable challenge during modern history, contributing to important pandemics. The scientific community has focused its efforts on developing vaccines and blocking the transmission of viruses through the respiratory tract. In this study, we propose the use of stable silver nanoparticles (AgNPs) functionalized with tannic acid (TA) and sodium citrate (SC) as a nasal spray disinfectant (NSD). The non-ionic ethoxylated surfactant Tween 80 (T80) was added to enhance the wetting effect on nasal and oral tissues following spray application. We analyzed the physicochemical properties of the AgNPs and the NSD, including zeta potential, polarity, morphology, composition, particle size, and distribution. The results indicated spherical AgNPs ranging from 3 to 5 nm, stabilized by TA-SC. The addition of T80 resulted in particles with negative polarity, high stability, and improved coverage area. Furthermore, the colloidal stability was monitored over one year, showing no signs of degradation or precipitation. Interestingly, the interaction between the capped AgNP complex, the spike protein, and ACE2 was studied by molecular docking, indicating a strong and thermodynamically favorable complex interaction. These findings hold promise for the development of potential inhibitors, antagonist receptors, Ag-complex agonists (as observed here), and drug development for viral protection.

**Keywords:** nasal spray disinfectant; SARS-CoV-2; respiratory diseases; tannic acid; sodium citrate; silver nanoparticles



Academic Editor: Alexey Pestryakov

Received: 5 March 2025

Revised: 28 March 2025

Accepted: 31 March 2025

Published: 31 March 2025

**Citation:** Valdez-Salas, B.; Salvador-Carlos, J.; Valdez-Salas, E.; Beltrán-Partida, E.; Castillo-Saenz, J.; Curiel-Álvarez, M.; Gonzalez-Mendoza, D.; Cheng, N. Nasal Spray Disinfectant for Respiratory Infections Based on Functionalized Silver Nanoparticles: A Physicochemical and Docking Approach. *Nanomaterials* **2025**, *15*, 533. <https://doi.org/10.3390/nano15070533>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The nasal, oral, and ocular mucous acts as the main airway route for the SARS-CoV-2 penetration and invasion of the receptor cells [1,2]. Thus, following this initial infection process, viral particles can reach the respiratory system, producing alveolar alterations and subsequent pulmonary collapsing, as described among the literature [3–6]. Interestingly, it was described as having three phases in the pathogenesis of COVID-19 [7]. The first phase is related to the infection of the ciliary and secretory cells in the nose, resulting in



Número de certificado: UC-c336ad4a-563b-4b36-8fb2-d9987f9791ca  
Uri del certificado ude.my/UC-c336ad4a-563b-4b36-8fb2-d9987f9791ca  
Número de referencia: 0004

CERTIFICADO DE FINALIZACIÓN

# Learn Molecular Docking From The Scratch

Instructores **Thirumal Kumar**

**Jorge Salvador**

Fecha **2 de Mayo de 2022**

Duración **1 hora en total**



Número de certificado: UC-7e39ffd0-b1da-46d2-8e38-27c484c26727  
Uri del certificado ude.my/UC-7e39ffd0-b1da-46d2-8e38-27c484c26727  
Número de referencia: 0004

CERTIFICADO DE FINALIZACIÓN

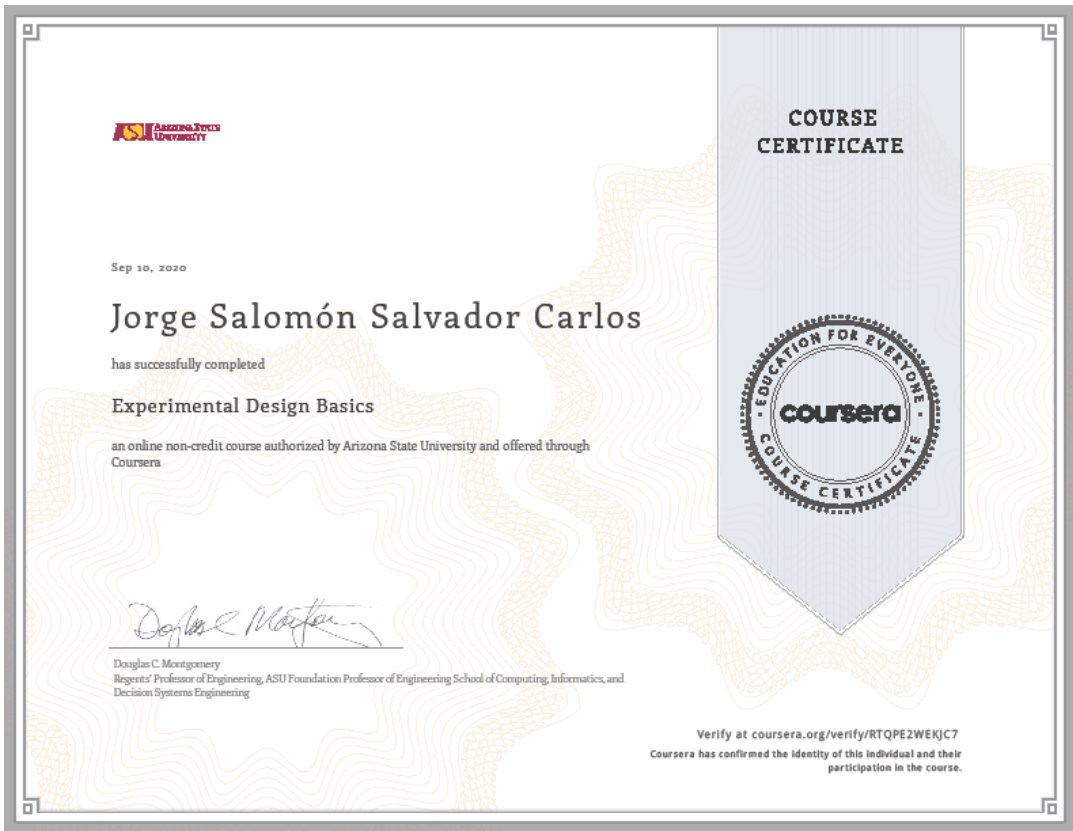
# Basics of Computer Aided Drug Discovery Part-I

Instructores **Hussain Basha Syed**

**Jorge Salvador**

Fecha **8 de Abril de 2022**

Duración **2.5 horas en total**



# Stanford | ONLINE

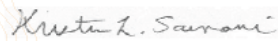
Jan 14, 2020

## Jorge Salomon Salvador Carlos

completó con éxito

### Writing in the Sciences

un curso en línea sin crédito autorizado por Stanford University y ofrecido a través de Coursera



Kristin Sainani, PhD  
Associate Professor  
Health Research and Policy

COURSE  
CERTIFICATE



Verify at:  
[coursera.org/verify/BB67B8GYU4M](https://coursera.org/verify/BB67B8GYU4M)  
Coursera confirmó la identidad de esta persona y su participación en el curso.



Sep 18, 2022

## Jorge Salomon Salvador Carlos

completó con éxito

### Ser más creativos

un curso en línea sin crédito autorizado por Universidad Nacional Autónoma de México y ofrecido a través de Coursera



Dra. Guadalupe Vadillo  
Académica  
Universidad Abierta y Educación a Distancia

COURSE  
CERTIFICATE



Verify at:  
[coursera.org/verify/SMHACDDYINSM](https://coursera.org/verify/SMHACDDYINSM)  
Coursera confirmó la identidad de esta persona y su participación en el curso.

Este certificado acredita 6 horas de dedicación.





4 cursos

Ser más creativos  
Innovar  
Entender el diseño  
Creatividad, diseño e innovación: Técnicas y herramientas · Proyecto Final



Dec 1, 2022

**Jorge Salomon Salvador Carlos**

completó con éxito el programa especializado en línea sin créditos

## Creatividad, diseño e innovación: Técnicas y herramientas

Utilice las herramientas y técnicas de creatividad, diseño e innovación para generar soluciones diferentes a las convencionales ante retos complejos y reconozca el papel crítico que juega el diseño en la sociedad. ¡Conviértase en un líder creativo en su campo!



Prasad Boradkar  
Professor  
The Design School,  
Arizona State University



Dra. Guadalupe Vadillo  
Académica  
Universidad Abierta y  
Educación a Distancia

The online specialization named in this certificate may draw on material from courses taught on-campus, but the included courses are not equivalent to on-campus courses. Participation in this online specialization does not constitute enrollment at this university. This certificate does not confer a University grade, course credit or degree, and it does not verify the identity of the learner.

Verifica este certificado en:  
<https://coursera.org/verify/specialization/337328k27W3/>



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Jul 31, 2023

**Jorge Salomon Salvador Carlos**

completó con éxito

**Técnicas Microscópicas de Caracterización**

un curso en línea sin crédito autorizado por Universitat de Barcelona y ofrecido a través de Coursera



Sònia Estradé, Departamento de Electrónica; Albert Cornet, Departamento de Electrónica; Jordi Diaz, Centros Científicos y Tecnológicos, Unidad de Técnicas Nanométricas; Arinzazu Villaverdas, Centros Científicos y Tecnológicos, Microscopía Electrónica de Transmisión Aplicada a los Materiales; Joan Mendoza, Centros Científicos y Tecnológicos, Microscopía Electrónica de Transmisión Aplicada a los Materiales; Francesca Peiró, Departamento de Electrónica

**COURSE CERTIFICATE**



Verify at:  
<https://coursera.org/verify/vBMX5QBH26XB3>  
Coursera confirmó la identidad de esta persona y su participación en el curso.



**Universidad Autónoma de Baja California**

Coordinación General de Vinculación y Cooperación Académica

Otorga el presente reconocimiento a:

**Salvador Carlos Jorge S.**

Por haber concluido satisfactoriamente el programa  
**“MOOC ENGLISH FOR THE SEMICONDUCTOR INDUSTRY”**  
de Arizona State University con una duración total de 26 horas.

**Dra. Martha Ofelia Lobo Rodriguez**  
Coordinadora General



A 8 de diciembre del 2023, Mexicali, Baja California

EL COMITÉ DE TURISMO Y CONVENCIONES DEL MUNICIPIO DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA  
HACE ENTREGA DE LA SIGUIENTE CONSTANCIA

A: Jorge Salomón Salvador Carlos

Por haber participado como tallerista en el pabellón de la Ciencia de la Tercera edición del Festival Aeroespacial "Mexicali en las alturas", dirigido al público en general para fomentar el acercamiento a la ciencia, tecnología, ingeniería, artes y matemáticas, llevado a cabo el día 25 de noviembre del 2023 en la ciudad de Mexicali, Baja California.



  
**Nancy Paola Minor Ibarra**  
DIRECTORA DEL COMITÉ DE TURISMO Y CONVENCIONES  
DEL MUNICIPIO DE MEXICALI

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN  
INGENIERÍA QUÍMICA Y ENERGÍA  
SUSTENTABLE**




Otorga la presente:

**Constancia de Participación**

a:

**ING. JORGE SALOMÓN SALVADOR CARLOS**

Por su valiosa participación activa en el curso: "MITIGACIÓN DE LA CORROSIÓN INTERIOR EN EL DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y OPERACIÓN EN DUCTOS DE TRANSPORTE DE GAS NATURAL" impartido los días 23 y 24 de septiembre del 2023 con una duración de 16 horas

  
**Dra. Irene Carrillo Salgado**  
Instructor y Tecnólogo en Corrosión  
Interna AMPP Certif. 48945 Internal  
Corrosion Senior Specialist

# Universidad Autónoma de Baja California

"2023, año de la concienciación sobre las personas con trastorno del espectro autista"

## FACULTAD DE CIENCIAS

### CONSTANCIA

#### A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe director de la Facultad de Ciencias dependiente de la Universidad Autónoma de Baja California, hace constar que:

**DRA. VERÓNICA MENDOZA DURÁN**  
**DR. ADRIÁN GÓMEZ ÁRCIGA**  
**DRA. CAROLINA BARAJAS GARCÍA**  
**DR. ERIK ESTEBAN RAMÍREZ RAMOS**  
**M.C. JORGE SALOMÓN SALVADOR CARLOS**  
**ING. JESÚS VIDAL PAYÁN CARRILLO**

Organizaron la subselección en Mexicali, Baja California, del **Concurso Nacional de Talentos** de la Sociedad Mexicana de Física. En este evento participaron 13 estudiantes de secundaria que previamente fueron seleccionados dentro de estudiantes de todo el Estado de Baja California.

Para los fines que los interesados convengan, se extiende la presente CONSTANCIA en la ciudad de Ensenada, Baja California a los veintidós días del mes de junio del año dos mil veintitrés.

**ATENTAMENTE**  
**"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"**

  
**DR. ALBERTO LEOPOLDO MORÁN Y SOLARES**  
**DIRECTOR**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

C.c.p. Archivo,  
ALMyS/secretaría



Otorga el presente

# RECONOCIMIENTO

**A: JORGE SALOMÓN  
SALVADOR CARLOS**

Por haber participado en la Segunda edición del Festival Aeroespacial "Mexicali en las alturas" el día 26 de Noviembre del 2022 en la ciudad de Mexicali, Baja California.

**NANCY PAOLA MINOR IBARRA**  
Directora general del Comité de Turismo y Convenciones de Mexicali



**Universidad Autónoma de Baja California**

Campus Ensenada

Coordinación General de Vinculación y Cooperación Académica



Otorgan la presente

## Constancia

**a: *Jorge Salomón Salvador Carlos***

Por su participación en el evento: Diálogo de Rectores UABC-QMUL con estudiantes universitarios.

Ensenada, Baja California a 6 de junio de 2022.

*"Por la realización plena del Ser"*

**Dra. Mónica Lacavex Berumen**  
Vicerrectora



**Dr. David Toledo Sarracino**  
Coordinador General



  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA  
 UNIDAD VALLE DE LAS PALMAS  
 OTORGA LA PRESENTE  
**CONSTANCIA**  
 A  
**Dra. Jorge Salomón Salvador Carlos**  
 Por su apoyo y colaboración como **ponente** con su conferencia magistral “**Corrosión de aceros inoxidables expuestos a agua superoxidada**”, en representación de la **FIM, UABC, Mexicali**, como parte integral de las actividades del **3er Simposio Nacional de Corrosión 2024**  
 Tijuana, B. C., México, a 22 de agosto de 2024  
 “POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER”  
  
 DR. DAVID ABEL MEJÍA MEDINA  
 DIRECTOR  
  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA  
 CAMPUS TIJUANA

**ARIZONA STATE UNIVERSITY**  
*Certificate of Completion*  
 Presented to  
**Jorge Salomón Salvador Carlos**  
 For successfully completing the  
**UABC INNOVATION PROGRAM**  
*Session/Program Date*  
 awarded on *January 20, 2023*  
*at Arizona State University*

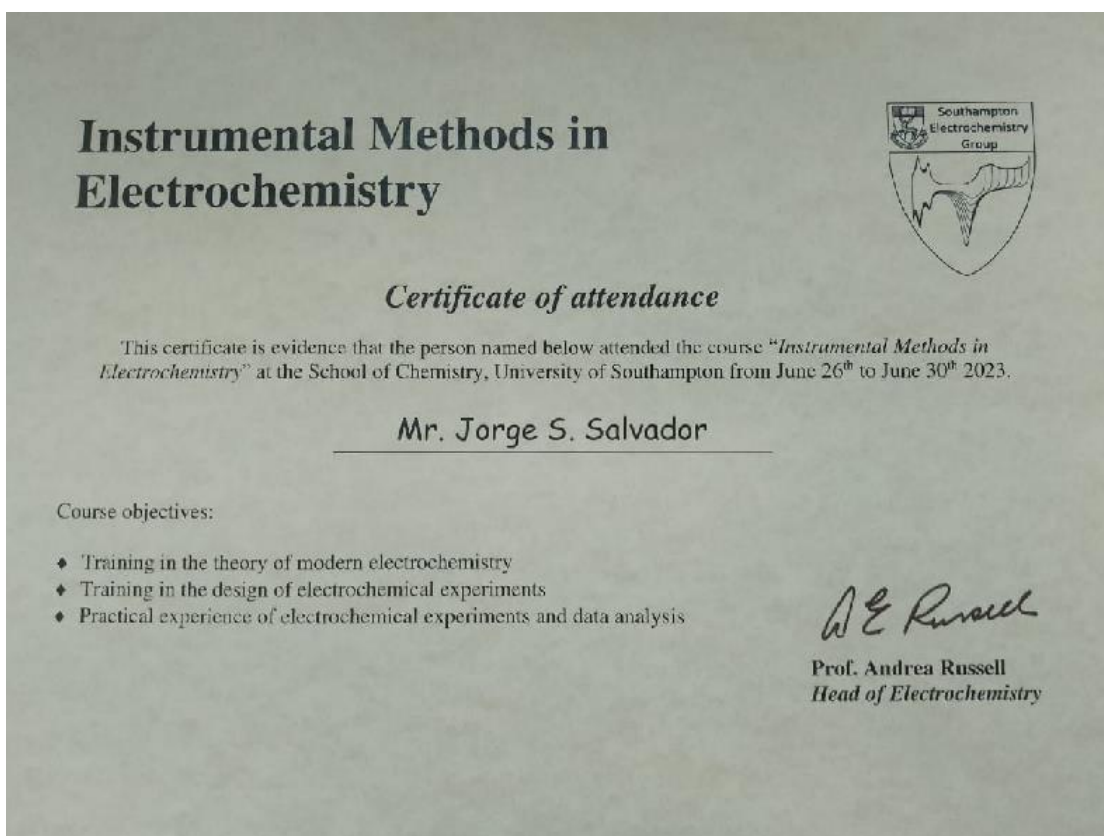



Dr. Dianna Lippincott, Ed. D.  
 Associate Director  
 Academic Programming & Innovation  
 Global Launch




Erin McCloskey  
 Program Coordinator, Sr.  
 Global Launch





# Certificate of Completion

This certificate is proudly presented to

*Jorge Salvador*

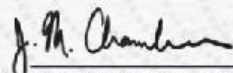
for the successful completion of



**Introduction to Molecular Modeling in Drug Discovery**

*December 13, 2022*  
Date



  
Jennifer M. Chambers, Ph.D.  
Director of Education, Schrödinger

0001991

## *Diploma*

This is to certify that

**Jorge Salvador**

has successfully completed the 8 ECTS PhD course

## **Hands-on Liquid Chromatography–Mass spectrometry course in the analysis of small molecules**

10 June – 21 June 2024, organised by Aarhus University,  
Department of Agroecology

The course covered:

- ◆ Preparatory reading of selected chapters in an LCMSMS textbook
- ◆ Approximately 3 days of practical exercise on the creation of batch and quantification methods, optimization of parameters for selected phytochemicals, preparation of samples, validation of the quantitative method (recovery)
- ◆ Approximately 3 days of practical exercise chosen on the basis of the student's on-going PhD project
- ◆ Theoretical lessons on
  - ◆ Method validation: LOD, LOQ, recovery, matrix interferences
  - ◆ ESI and APCI inlet systems
  - ◆ Use of iontrap for analysis of phytochemicals
  - ◆ HPLC method development and optimization
  - ◆ Representative sampling: plants, soil and water
  - ◆ Good Laboratory Practice
  - ◆ New developments in mass spectrometry
- ◆ Subsequent elaboration of a 30-40 pages report on the practical exercises



**Inge S. Fomsgaard**  
Professor, Course Coordinator