



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Síntesis, caracterización y actividad biológica de
nanopartículas metálicas sintetizadas con melaninas
solubles de frutos silvestres de Sinaloa**

TESIS

Que presenta

L.N. GISELA DUARTE DE LA PEÑA

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores

DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS

DR. JULIO MONTES ÁVILA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, ambos en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación fue dirigida por el Dr. Francisco Delgado Vargas y el Dr. Julio Montes Ávila y asesorada por el Dr. José Ángel López Valenzuela. Esta investigación contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Asimismo, se agradece la beca otorgada por CONACyT a Gisela Duarte De la Peña.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 6 del mes Febrero del año 2017, el (la) que suscribe Gisela Duarte de la Peña alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0816241-7, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Francisco Delgado Vargas y Julio Montes Avila y cede los derechos del trabajo titulado “SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SINTETIZADAS CON MELANINAS SOLUBLES DE FRUTOS SILVESTRES DE SINALOA”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



M.C. Gisela Duarte de la Peña

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme a unos ángeles como padres, gracias por todo el apoyo, amor, dedicación y paciencia en toda una vida, ojalá que mis logros, que son suyos, pueda regresarles un poquito de todo lo que me han dado. A mis hermanos y hermanos postizos por todo su apoyo. Sin duda son lo más bonito que tengo.

A la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Sinaloa por darme la oportunidad de cumplir un sueño. Agradezco también a todos los profesores que formaron parte de este camino.

En especial, agradezco al Dr. Francisco Delgado Vargas por darme la oportunidad de trabajar con él y con su invaluable equipo de trabajo. Gracias por brindarme su apoyo, paciencia, y dirección y por demostrarnos que en esta vida el conocimiento no se cela sino que se comparte y expresa. Pero admito que agradezco aun más el haberme permitido conocer al excelente ser humano que es, extrañaré las pláticas de cine, comida y sus anécdotas incompletas de vida. Se le estima.

Un agradecimiento especial al Dr. Julio Montes Ávila por el apoyo, consejos y excelente asesoría brindada durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Gaby. Maestra gracias... gracias por todo. Por siempre sacarnos de dudas, por su gran conocimiento, por siempre estar ahí, por su deliciosa comida, por los buenos ratos y por decirle al doctor todo lo que nosotras no nos animábamos.

Al doctor José Ángel López Valenzuela por su apoyo en la revisión y recomendaciones aportadas a este escrito.

Al personal e investigadores de la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, encabezada por la Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho. A la MC. Yesmi Patricia Ahumada Santos por su valioso apoyo, asesoría y paciencia durante la realización de la actividad antibacteriana. Gracias Yesmi por siempre querernos hacer sentir mejor después de un ensayo fallido.

Gracias también a la MC. Sandra Olivas Quintero, porque siempre tuviste buena cara y una buena respuesta cuando te iba a buscar porque tenía una duda de cómo hacer cualquier cosa. Gracias por ser nuestro Espectro UV-vis, termómetro, balanza digital, Excel, calculadora... etc.

A mis compañeros del Laboratorio de Química de Productos Naturales: Manuel, Almita, José Ángel, Carlos, Alejandra, Sara y Oscar, en especial a Pedrito. Y a mis AMIGAS del laboratorio Alma, Sandra, María, Belinda, Perla y Anayanci, porque sin ustedes el café no es el mismo y... aprovechando... ¿Hay que hacer algo no?

A los que comenzaron como compañeros y terminaron siendo más que eso Milton, David, Cristian, Alma María y Erika María, por que sigamos compartiendo muchas metas más y.. ¡ánimo!.

Por último pero no menos importante, gracias a ese hombre que me enseñó que nunca es tarde para emprender un nuevo rumbo, vivir una nueva historia o construir un nuevo sueño, gracias Javier.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	X
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LA LITERATURA	7
A BIODIVERSIDAD FLORÍSTICA	7
1 Importancia de la biodiversidad florística	7
2 Biodiversidad florística de México	9
3 Biodiversidad florística del estado de Sinaloa	11
B FRUTOS SILVESTRES DE SINALOA	12
1 Ayale (<i>Crescentia alata</i> Kunth)	12
a Características generales	12
b Composición química	14
c Actividades biológicas	14
2 Uvalama (<i>Vitex mollis</i>)	15
a Características generales	15
b Actividades biológicas	15
c Composición química	17
3 Papache (<i>Randia echinocarpa</i> Sessé et Mociño)	18
a Características generales	18

b	Actividades biológicas	18
c	Composición química	20
C	MELANINAS	21
1	Características y propiedades	21
2	Melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa	22
a	Características generales	22
b	Actividades biológicas	23
1)	Actividad antioxidante	23
D	PRINCIPALES PROBLEMAS DE SALUD PÚBLICA EN EL MUNDO	24
1	Aspectos generales sobre las bacterias	25
2	Enfermedades bacterianas	30
3	Enfermedades parasitarias	32
a	Hymenolepiosis	33
4	Resistencia a los fármacos	36
5	Tratamientos alternativos	37
E	NANOTECNOLOGÍA	39
1	Síntesis de nanopartículas	39
2	Síntesis química de nanopartículas	40
3	Síntesis biológica de nanopartículas	42
a	Síntesis biológica de nanopartículas utilizando microorganismos como agente reductor	42
b	Síntesis biológica de nanopartículas utilizando tejido vegetal como agente reductor	42

F	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	
	SINTETIZADAS CON EXTRACTOS DE PLANTAS	47
1	Nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extractos de plantas y su función contra enfermedades infecciosas	50
a	Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro	50
b	Nanopartículas de plata y oro y su actividad antiparasitaria	51
IV	JUSTIFICACIÓN	52
V	OBJETIVOS	53
A	OBJETIVO GENERAL	53
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	54
A	MATERIALES	54
1	Material vegetal	54
2	Microorganismos	54
3	Animales de laboratorio	56
4	Reactivos	58
C	MÉTODOS	59
1	Obtención de melaninas parcialmente purificadas a temperatura de ebullición (MePP-TE)	59
a	Preparación de harina de uvalama, ayale y papache	59
b	Melaninas impuras a temperatura de ebullición (Mel-TE)	59
c	Diálisis con tubos de ultrafiltración	60

d	Diálisis con membrana de celulosa	60
2	Métodos de evaluación de la actividad biológica	61
a	Actividad antioxidante	61
1)	Método ABTS	61
2)	Método FRAP	62
3)	Método DPPH	63
b	Actividad antibacteriana	63
1)	Método antibacteriano por el método Kirby-Bauer	63
2)	Actividad antibacteriana por el método microdilución en caldo	64
c	Actividad antiparasitaria	65
1)	Condiciones de cultivo <i>Hymenolepis nana</i>	65
2)	Evaluación de la actividad antiparasitaria	66
3)	Determinación de la viabilidad mediante la exclusión del colorante azul de Evans	66
3	Síntesis de nanopartículas	67
a	Nanopartículas de plata	67
1)	Método químico	67
2)	Método biológico	67
b	Nanopartículas de oro	68
1)	Método químico	68
2)	Método biológico	69
4	Preparación de la disolución de nanopartículas biológicas de plata y oro para su caracterización	70

5	Caracterización de melaninas solubles purificadas por diálisis y nanopartículas metálicas	70
	a	
	Espectrofotometría ultravioleta visible	70
	b	
	Espectroscopía Infrarrojo	71
	c	
	Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	71
	d	
	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	71
6	Evaluación de toxicidad	72
	e	
	Ensayo de toxicidad <i>in vitro</i> con <i>Artemia salina</i> (CL ₅₀) de melaninas extraídas de los tres frutos y nanopartículas de oro y plata	72
7	Análisis estadístico	73
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
A	RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN PARA MELANINAS PARCIALMENTE PURIFICADAS	75
D	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	77
E	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	80
1	Análisis UV-visible de melaninas solubles parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración	80
2	Análisis espectrofotométrico por infrarrojo	84
F	SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	87
1	Estandarización de condiciones para la síntesis de nanopartículas de plata	87
	a	
	Efecto de la concentración de melaninas solubles parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición	87

b	Efecto de la concentración del nitrato de plata (AgNO_3)	91
c	Efecto de las diferentes temperaturas de reacción	91
d	Efecto de los tiempos de incubación	92
2	Síntesis de nanopartículas de plata en las condiciones de reacción seleccionadas	93
G	SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	95
1	Estandarización de condiciones para la síntesis de nanopartículas de oro	95
a	Efecto de la concentración de melaninas solubles parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición	95
b	Efecto de la concentración del ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4)	97
c	Efecto de las diferentes temperaturas de reacción	99
d	Efecto de los diferentes tiempos de incubación	100
2	Síntesis de nanopartículas de oro con melaninas solubles de diferentes frutos	101
H	RENDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE PLATA Y ORO SINTETIZADAS POR EL MÉTODO BIOLÓGICO	102
I	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO	105
1	Análisis espectrofotométrico por infrarrojo	105
a	Nanopartículas de plata	105
b	Nanopartículas de oro	110
2	Análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	112
a	Nanopartículas de plata	112

b	Nanopartículas de oro	116
3	Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	118
a	Nanopartículas de plata	118
b	Nanopartículas de oro	122
J	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	125
1	Actividad antioxidante	125
2	Actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas (Ag-Au)	128
a	Método Kirby-Bauer – difusión en disco	128
b	Método de microdilución en caldo	132
3	Actividad antiparasitaria de nanopartículas metálicas contra el cestodo <i>Hymenolepis nana</i>	135
4	Toxicidad de nanopartículas metálicas contra <i>Artemia salina</i>	141
VIII	CONCLUSIONES	145
IX	BIBLIOGRAFÍA	147
	ABREVIATURAS	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág
1	Imágenes de <i>Crescentia alata</i> .	13
2	Imágenes de <i>Vitex mollis</i> .	16
3	Imágenes de <i>Randia echinocarpa</i> Sessé Mociño.	19
4	Ciclo de vida del cestodo <i>Hymenolepis nana</i> .	35
5	Estructura bioquímica de algunos compuestos de extractos de plantas.	45
6	Mecanismo propuesto para la síntesis de nanopartículas de metales mediada por extractos de plantas.	46
7	Frutos de Ayale, uvalama y papache.	55
8	Espectros ultravioleta-visible de las melaninas purificadas.	81
9	Espectro ultravioleta-visible de las melaninas solubles dializadas.	82
10	Espectro infrarrojo de melaninas solubles de frutos silvestres.	85
11	Cambio de color durante la síntesis de nanopartículas de plata.	88
12	Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de plata.	89
13	Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de plata sintetizadas por el método biológico y químico.	94
14	Síntesis de nanopartículas de oro usando melaninas dializadas.	96
15	Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de oro.	98

16	Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de oro sintetizadas por el método biológico y químico.	103
17	Espectro IR de nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas	106
18	Espectro IR de melaninas solubles y nanopartículas de plata sintetizadas usando estas melaninas como agente reductor.	108
19	Posibles grupos funcionales en la estructura de las melaninas.	109
20	Espectro IR de nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas.	111
21	Histograma de DLS para nanopartículas de plata.	113
22	Histograma de DLS para nanopartículas de oro.	117
23	Imágenes de TEM de nanopartículas de plata.	119
24	Imágenes de TEM de nanopartículas de oro.	123
25	Efecto antiparasitario de las nanopartículas liofilizadas de plata y oro.	138
26	Efecto antiparasitario de las nanopartículas de plata y oro en solución.	139

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Patógenos resistentes con mayor impacto en salud pública	31
2	Precusores comunes, agentes reductores y estabilizadores poliméricos usados en los métodos químicos de síntesis de nanopartículas	41
3	Síntesis biocatalítica de nanopartículas empleando extractos de plantas	44
4	Nanopartículas de plata y oro con actividad antibacteriana	48
5	Cepas de referencia y aislados clínicos empleados en la evaluación de la actividad antibacteriana	57
6	Rendimientos de extracción de melaninas solubles obtenidas a temperatura de ebullición a partir de frutos nativos de Sinaloa y parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración	76
7	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/ g b.s.}$) de melaninas solubles obtenidas a temperatura de ebullición de frutos nativos de Sinaloa y parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración	78
8	Rendimientos en la preparación de nanopartículas de plata y oro empleando melaninas solubles de frutos nativos de Sinaloa y purificadas por diálisis	104
9	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/ g b.s.}$) de nanopartículas de plata y oro sintetizadas a partir de melanina parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición	126

10	Actividad antibacteriana, por el método de Kirby-Bauer, de nanopartículas sintetizadas empleando como agente reductor biológico melaninas solubles (<i>i.e.</i> , de ayale (a), uvalama (u), y papache (p)) y citrato tribásico de sodio como reductor químico	130
11	Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y bactericidas (MBC) ($\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas obtenidas a temperatura de ebullición y parcialmente purificadas por diálisis	133
12	Actividad contra <i>Hymenolepis nana</i> de nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs), liofilizadas o en solución, preparadas con melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa (ayale, uvalama y papache)	136
13	Toxicidad de las nanopartículas de plata y oro obtenidas por el método biológico (<i>i.e.</i> , empleando melaninas solubles de ayale, uvalama y papache) y químico. Las nanopartículas en solución, recién preparadas, se evaluaron en una relación 1:1 (v/v) al mezclarlas con el agua artificial de mar (mma)	142

I RESUMEN

México es un país megadiverso donde es común el uso de plantas en medicina tradicional; sin embargo, existe poca evidencia científica que le de soporte a estos usos medicinales. Estudios con frutos de ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) y papache (*Randia echinocarpa* Sessé Mociño) mostraron que algunos de sus componentes podrían tener efectos positivos relacionados con el tratamiento/prevenición de enfermedades infecciosas y crónico degenerativas. En particular, estos frutos contienen melaninas solubles (MS) con alta actividad antioxidante. Actualmente, se están proponiendo el uso de nanopartículas (NPs) para el tratamiento de diferentes padecimientos, incluyendo los infecciosos, con el potencial para controlar los microorganismos resistentes a los tratamientos convencionales. El método químico se ha usado tradicionalmente para obtener NPs, en el cuál las condiciones de reacción implican contaminación y altos costos. Al respecto, la síntesis verde usando extractos de plantas se ha convertido en una alternativa viable y las MS de los frutos ayale, uvalama y papache son buenos candidatos para usarse en la síntesis biológica de NPs de plata (AgNPs) y oro (AuNPs). En la presente investigación se sintetizaron AgNPs y AuNPs empleando por vez primera MS de los frutos modelo. Las NPs se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis e infrarrojo, por dispersión de luz dinámica (DLS) y por microscopía electrónica de transmisión (TEM). También se evaluó su actividad antioxidante (AA) (*i.e.*, DPPH y FRAP) y contra patógenos humanos, bacterias (difusión en disco y microdilución en caldo) e *Hymenolepis nana*; así como la

toxicidad contra *Artemia salina*. Las mejores condiciones de síntesis para las AgNPs fueron 60 °C, 2 mM AgNO₃, 1 mg/mL MS, 12 h de reacción en ausencia de luz y a 120 rpm; para las AuNPs fueron a 25 °C, 1 mM HAuCl₄, 5 mg/mL MS, 30 min de reacción a 200 rpm. Las MS de los tres frutos permitieron la síntesis de NPs. Los espectros UV-Visible de las AgNPs presentaron la banda de plasmón superficial (λ_{\max}) a 421, 426, y 419 nm para uvalama, ayale, y papache, respectivamente; las AuNPs sólo se formaron con las MS de uvalama (λ_{\max} 530 nm). La espectroscopía IR mostró interacciones entre las MS y las NPs. Las imágenes de TEM mostraron AgNPs esféricas de 15-30 nm de diámetro y AuNPs esféricas y cilíndricas de entre 9 y 20 nm. Las AgNPs sintetizadas con MS de uvalama presentaron la mayor AA en equivalentes de Trolox en los ensayos DPPH (148 μ mol ET/g b.s) y FRAP (725 μ mol ET/g b.s). Las AgNPs mostraron tener una fuerte actividad antibacteriana a concentraciones de 7.5 y 15 μ g/mL, mientras que a 20 mg/mL produjeron la parálisis y muerte de *H. nana* en un intervalo de 15-90 min. Las AuNPs liofilizadas resultaron inocuas contra *Artemia salina* (CL₅₀ >1mg/mL), mientras que las más tóxicas fueron las AgNPs de ayale (CL₅₀ = 61.6 μ g/mL). Las AgNPs y AuNPs sintetizadas por el método químico tuvieron un diámetro promedio de 10 y 5 nm, respectivamente. No presentaron actividad antibacteriana contra ninguna de las cepas patógenas evaluadas pero si produjeron parálisis y muerte de *H. Nana* en un intervalo de 5-7 min. Ambas NPs resultaron inocuas para *Artemia salina*. Los resultados del presente estudio muestran que las MS empleadas en la síntesis de las NPs contribuyen a su estabilidad y funcionalidad; asimismo, la actividad biológica sugiere su potencial uso contra patógenos humanos.

ABSTRACT

Mexico is a megadiverse country where plants are commonly used in traditional medicine; nevertheless, scientific evidence supporting such uses is still scarce. Previous studies with fruit of ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) and papache (*Randia echinocarpa* Sessé Mociño) showed that some of their components could have positive effects related to the treatment/prevention of infectious and chronic degenerative diseases. In particular, these fruit contain soluble melanins (MS) with high antioxidant activity. Currently, nanoparticles (NPs) are being proposed for the treatment of different illnesses, including infectious ones, with the potential to control microorganisms that are resistant to conventional treatments. The chemical method has been traditionally used to obtain NPs, but the reaction conditions entail pollution and high costs. In this regard, the green synthesis using plant extracts has become a viable alternative and the MS of ayale, uvalama and ppaache fruits are good candidates to be used in the synthesis of silver (AgNPs) and gold (AuNPs) nanoparticles by the biological method. In this research, AgNPs and AuNPs were synthesized for the first time using MS of the model fruits. The NPs were characterized by UV-Vis spectroscopy, infrared, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). They were also evaluated in their antioxidant activity (*i.e.*, DPPH and FRAP) and activity against human pathogens, bacteria (disc diffusion and microdilution in broth) and *Hymenolepis nana*; as well as their toxicity in the *Artemia salina* model. The best synthesis conditions for the AgNPs were 60 °C, 2 mM AgNO₃, 1 mg/mL MS, 12 h reaction in the absence of light, and

shaking at 120 rpm; for the AuNPs were 25 ° C, 1 mM HAuCl₄, 5 mg/mL MS, 30 min of reaction, and shaking at 200 rpm. The MS of the three fruits allowed the synthesis of NPs. The AgNPs UV-visible Spectra showed the surface plasmon resonance (λ_{\max}) at 421, 426, and 419 nm for uvalama, ayale, and papache, respectively; the AuNPs were only formed with the MS of uvalama (λ_{\max} 530 nm). The IR spectroscopy showed interactions between the MS and the NPs. TEM images showed spherical AgNPs of 15-30 nm in diameter and AuNPs spherical and cylindrical with sizes in the range of 9-20 nm. The AgNPs synthesized with MS of uvalama showed the highest AA in Trolox Equivalents in both DPPH (148 μ g TE/g d.w.) and FRAP (725 μ g TE/g d.w.) assays. The AgNPs showed a strong antibacterial activity at concentrations of 7.5 and 15 μ g/mL; moreover, at 20 mg/mL, they induced the paralysis and death of *H. nana* in the range of 15 – 90 min. The lyophilized AuNPs have proved harmless against *Artemia salina* ($LC_{50} > 1$ mg / mL), whereas the ayale AgNPs were the most toxic ($LC_{50} = 61.6$ μ g / mL). The AgNPs and AuNPs synthesized by the chemical method had an average diameter of 10 and 5 nm, respectively; they were not active against the evaluated pathogenic bacteria but induced the paralysis and death of *H. nana*, ranging in time of exposure between 5 and 7 min. Both NPs were innocuous in the *Artemia salina* assay. The MS used in the synthesis of NPs contribute to the NPs stability and functionality; also, the biological activity suggests their potential against human pathogens.

II INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas provocadas por bacterias y parásitos son una de las principales causas de morbilidad y de consulta ambulatoria en el ámbito mundial; estas enfermedades generalmente se asocian a condiciones de pobreza (OMS 2014). En la actualidad, el control de las infecciones se ha complicado por la ausencia de agentes terapéuticos efectivos y eficientes; y en especial por la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, lo cual les permite a un microorganismo resistir al efecto de un medicamento al que originalmente eran vulnerables. La resistencia de los microorganismos incrementa la prevalencia de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación; siendo esto uno de los principales incentivos para realizar investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para atacar estos problemas (WHO 2014a).

En el tratamiento de enfermedades infecciosas, el uso de nanopartículas (NPs), en particular de plata (AgNPs) y de oro (AuNPs), es una alternativa que está en auge. Tradicionalmente estas NPs se preparaban por métodos físicos y químicos, y preferentemente este último; sin embargo, el método químico es altamente contaminante y costoso. Al respecto, los métodos de síntesis verde han resultado atractivos y en particular el uso extractos de plantas como agente reductor. Los extractos de plantas presentan sustancias de alta capacidad reductora (*e.g.*, enzimas, flavonoides, terpenos) necesarias para la formación y crecimiento de las NPs; adicionalmente y resultando sumamente importante, algunos de sus componentes estabilizan a las NPs (Shankar y col 2016).

El Laboratorio de Química de Productos Naturales (LQPN) y la Unidad de Investigaciones en Salud Pública Dra. Kaethe Willms (UISP), de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, trabajan hacia el uso sustentable de la biodiversidad florística de Sinaloa y México, recordando que somos un país megadiverso y que nuestro estado cuenta con más del 10% de la biodiversidad del país; en particular se trabaja en demostrar la composición química y actividades biológicas de extractos de plantas nativas de Sinaloa. Recientemente, el LQPN-UISP demostró la presencia de melaninas solubles (MS) en los frutos silvestres de Sinaloa, ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) y papache (*Randia echinocarpa* Sessé et Mociño) (Cuevas-Juárez y col 2014).

Las melaninas son una familia de pigmentos de colores negros, que se han identificado en diferentes partes de plantas (e.g., corteza de semillas y bayas oscuras) (Della-Cioppa y col 1990). Estos pigmentos en su forma natural han mostrado tener un amplio espectro de funciones biológicas, incluyendo actividad antitumoral, hepatoprotectora, antiviral, fotoprotectora y antioxidante (Sava y col 2003; Hung y col 2004; El-Obeid y col 2006). Las melaninas solubles extraídas de frutos silvestre de Sinaloa estuvieron asociadas a altos valores de fenólicos y de actividad antioxidante (Cuevas-Juárez y col 2014). Estas características permiten sugerir que las melaninas solubles son una alternativa en la producción y estabilización verde de NPs metálicas con actividad contra bacterias y parásitos patógenos humanos.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A BIODIVERSIDAD FLORÍSTICA

La biodiversidad o diversidad biológica es la variedad de la vida e incluye varios niveles de la organización biológica. Entre otros aspectos, considera la diversidad de especies de animales, hongos, microorganismos y plantas que viven en un espacio determinado (CONABIO 2009a; Primack 2010).

La diversidad y la composición florística son atributos de zonas geográficas delimitadas que permiten su comprensión y comparación (Cano y Stevenson 2009). La biodiversidad tiene dos componentes principales: la riqueza de especies y la equitatividad. El primero se refiere al número de especies en una comunidad y el segundo a las proporciones relativas de cada una, teniendo en cuenta que puede haber especies dominantes y especies raras en dicha comunidad (Smith 2001). Por su parte, la composición florística se entiende como la enumeración de las especies de plantas presentes en un lugar, usualmente teniendo en cuenta su densidad, su distribución y su biomasa.

1 Importancia de la biodiversidad florística

La diversidad biológica es sumamente importante para la vida en el planeta, pues los ecosistemas proporcionan servicios ambientales esenciales tales como la captura y el almacenamiento de agua en acuíferos, lagos y ríos; la producción de alimentos a partir de los ecosistemas agrícolas y pecuarios; la posibilidad de extraer del medio silvestre productos útiles como medicinas y madera; la captura del bióxido de

carbono; la estabilidad climática, el mantenimiento de suelos fértiles y el control de deslaves y arrastres masivos de suelo por el efecto de lluvias torrenciales (CONABIO 2008).

El hombre transforma aceleradamente los ecosistemas en su beneficio pero genera elevados costos ambientales a corto, mediano y largo plazo. Por ejemplo, la deforestación lleva a la pérdida de la cubierta vegetal; afecta negativamente el clima, volviéndolo más seco y extremo; reduce la producción de oxígeno; disminuye la captura de bióxido de carbono; afecta a las comunidades vegetales al disminuir la fertilidad de los suelos y la abundancia de polinizadores; y de esta manera provocando una catástrofe para la vida (Primack 2010; Jiménez-Sierra y col 2014). Por esto, se necesitan acciones inmediatas para crear conciencia en cada individuo y en la sociedad sobre la importancia de la biodiversidad florística y de todos los organismos vivos que coexisten en los ecosistemas y que en conjunto le dan el equilibrio dinámico que resulta indispensable para que la vida del hombre en la tierra tenga futuro. Es importante reflexionar, que recuperar una especie extinta, cuando se conoce de su existencia, a la fecha es imposible; al respecto, por efecto de la intervención del hombre en los ecosistemas, especies de organismos pueden desaparecer sin que nos enteremos de su coexistencia con la raza humana en el planeta. En particular, las plantas son la fuente primaria de un gran número de satisfactores para el hombre: alimentos, madera, medicina, materia prima para generar combustibles, ropa y calzado a través de fibras, y muchos otros productos. En este sentido, usar los recursos biológicos no debe ser un sinónimo de destrucción, abatimiento de las poblaciones, ni de riesgo de extinción. La

biodiversidad como un recurso debe ser renovable, por lo que su uso debe ser en condiciones de sostenibilidad, lo que contribuirá a tener una mayor oportunidad de supervivencia para la generaciones actual y futuras (CONABIO 2000b; Chin y col 2006).

De manera general, una elevada biodiversidad se ha asociado con una alta productividad, retención de nutrientes, y estabilidad ecológica (Tilman 2000). Además, se ha generado evidencia que muestra que la degradación ambiental incrementa el riesgo de padecer enfermedades infecciosas, por ejemplo, la prevalencia de malaria es mayor en áreas deforestadas (Lanly 2003; FAO 2006). De esta manera para conservar la salud es importante que cuidemos la biodiversidad (Pongsiri y col 2009).

Bajo las premisas anteriores, es pertinente reiterar que la conservación sustentable de la biodiversidad es indispensable para nuestra sobrevivencia y la responsabilidad es aún mayor para los países megadiversos como México.

2 Biodiversidad florística de México

México cuenta con el 1.4% de la superficie terrestre del planeta; sin embargo, alberga entre 10 y 12% de todas las especies conocidas en el mundo, ocupando el cuarto lugar mundial en biodiversidad, segundo lugar en especies de reptiles (804), tercero en mamíferos (535), cuarto en anfibios (361) y quinto en plantas vasculares (25000) (Semarnat 2012). Toda esta excepcional riqueza biológica es posible debido a su ubicación latitudinal, a su complicado relieve, con la presencia de sierras y

montañas que se elevan hasta 4500 msnm y a una compleja historia geológica (CONABIO 2000b).

Como ya se mencionó, en lo que respecta a plantas vasculares, México ocupa el quinto lugar mundial con un poco más de 25 mil especies descritas hasta el momento, lo que equivale al 9% de las 272 mil descritas en el mundo (Semarnat 2012). Entre el 30 y 40% de estas plantas son endémicas de México, esto es, que solo se encuentran en el territorio mexicano. De tal manera que la desaparición de una de estas especies endémicas implicaría su desaparición en el planeta (CONABIO 2000b). No obstante, el aprovechamiento de muchas de esas plantas se realiza en forma no sostenible, lo cual las pone en riesgo de extinción.

En México, 981 familias de plantas están incluidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001 2002); de éstas, una parte importante está en alguna categoría de riesgo a consecuencia de su explotación indiscriminada y a su comercio ilegal. Sin embargo, existen algunos ejemplos que ilustran un aprovechamiento exitoso de plantas. Entre ellos destacan la pita de la selva, varias especies de agaves mezcaleros, los copales, el chicle, la palma de guano, la palma de sombrero y otras especies que son fuente de recursos forestales no maderables. Diversas instituciones de investigación, organismos de gobierno, así como organizaciones no gubernamentales y jardines botánicos contribuyen al desarrollo, disseminación y aplicación de protocolos y prácticas que apoyan y promueven el manejo sostenible y la conservación en áreas productivas. Sin embargo, los casos de éxito en el uso sostenible de la biodiversidad aún son escasos en México y en el mundo. Para alcanzar esta meta es indispensable que los mexicanos tengamos un mejor y más

amplio conocimiento de la biodiversidad, lo cual será la base para diseñar e implementar las estrategias de aprovechamiento sostenible de los recursos silvestres (CONABIO-CONANP-SEMARNAT 2008).

3 Biodiversidad florística del estado de Sinaloa

Sinaloa tiene una superficie de 58092 Km² y se ubica en el noroeste de México, entre los paralelos 22°30'40" y 27°02'42" de latitud norte y entre los meridianos 105°23'20" y 109°28'48" de longitud oeste del meridiano de Greenwich. En el estado es posible observar zonas de llanura costera que se ubican entre 1 – 100 msnm, la zona de pie de monte se localiza de los 100 – 300 msnm y la zona montañosa llega hasta 2780 msnm es su cota más alta. Esta combinación de condiciones geográficas y climáticas ha permitido el desarrollo de un gran número de especies. En Sinaloa están presentes 7 de los 10 tipos de vegetación reportados para México, siendo los más importantes el bosque espinoso, bosque tropical caducifolio, bosque de coníferas, bosque de encinos y vegetación acuática y subacuática (Rzedows 1978). También cuenta con una diversidad superior a las 2792 especies de plantas vasculares, distribuidas en 978 géneros y 202 familias (Vega-Aviña 2001; Vega-Aviña y Villaseñor-Ríos 2001).

La conservación sustentable de la biodiversidad de Sinaloa y México requiere de un profundo conocimiento. Al respecto, en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms", ambos en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, se investiga la composición química y actividades biológicas de plantas

nativas de Sinaloa. Particularmente se han estudiado los frutos silvestres de ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) y papache (*Randia echinocarpa* Sessé Mociño) de los cuales se ha demostrado que tienen potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas y crónico degenerativas (Pío-León y col 2013; Cuevas-Juárez y col 2014; López-Angulo y col 2014; Pío-León y col 2014).

B FRUTOS SILVESTRES DE SINALOA

1 Ayale (*Crescentia alata* Kunth)

a Características generales

El árbol del ayale (*Crescentia alata* Kunth) es nativo de México (**Figura 1**). Se distribuye por la región costera desde Baja California, Sonora y Sinaloa a Oaxaca y Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Veracruz, hasta Costa Rica. Este árbol crece en los bosques secos desde los 0 a los 1000 msnm y alcanza hasta los 14 m de altura, tiene la corteza café claro y hendiduras longitudinales. Las hojas están reunidas en número de 3 que salen de un mismo punto. Los frutos son casi esféricos, nacen pegados al tallo, miden cerca de 15 cm de diámetro, tienen una cáscara dura y leñosa, y una pulpa negruzca y dulzona que contiene alrededor de 300-900 semillas. Las semillas cocidas contienen 2.64 % de azúcar, 36.9 % de aceite vegetal lo que es parecido al cacahuete y olivo. Los frutos maduros son verdes-amarillentos y se mantienen en el árbol por 5-7 meses antes de volverse amarillos y caer,

A**B****C****D**

Figura 1. Imágenes de *Crescentia alata* Kunth: **(A)** árbol completo; y frutos **(B)** verdes, **(C)** en senescencia con madurez comercial, y **(D)** pulpa de frutos en el estado de consumo.

principalmente por la menor accesibilidad de agua (CONABIO 2000a; Biblioteca Digital 2009; Biología. 2010; Valverde 2012; Pío-León y col 2013).

b Composición química

Los estudios químicos de *C. alata* son escasos. En flores se identificaron al cianidín rutinósido y cianidín glucósido. La pulpa del fruto contiene ácidos grasos, resina ácida, ácido tánico y pectina (Biblioteca Digital 2009). Arenas (2004) encontró alcaloides, flavonoides, esteroides y fenoles, así como posibles derivados de la apigenina y quercetina (flavonoides); estos últimos se han relacionado con actividad anti-inflamatoria; mientras que una furanaftoquinona se ha relacionado actividad anticancerígena. La pulpa oscura del ayale se asocia a la presencia de melaninas y no contiene pigmentos comunes (*i.e.*, antocianinas, carotenoides, clorofilas, betalainas) (Cuevas-Juárez y col 2014).

c Actividades biológicas

El fruto de ayale se usa tradicionalmente como medicina en México y América tropical. Su fruto es comestible y la Sociedad Farmacéutica de México describe su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas en vías respiratorias, así como en tos, bronquitis, tuberculosis, diarrea, disentería, enfermedades del riñón, úlcera contusiones y padecimientos hepáticos. También se le han atribuido propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias (CONABIO 2000a; Biblioteca Digital 2009; Chízmar-Fernandez 2009; Antonio-Núñez y Abad-Guzmán 2010; Pío-León y col 2013).

2 Uvalama (*Vitex mollis*)

a Características generales

Otro fruto de interés para el presente trabajo es el de la uvalama (*Vitex mollis*). La uvalama o balamo es un fruto endémico de México, encontrándose de manera natural en el estado de Sinaloa (**Figura 2**). *V. mollis* es un árbol o arbusto de hasta 20 m de altura perteneciente a la familia Verbenaceae; se distribuye exclusivamente en la vertiente del Pacífico, desde Sonora y Chihuahua hasta Oaxaca; forma parte de las especies dominantes de la selvas medianas caducifolias que cuentan con buen drenaje, desde cerca del nivel del mar hasta los 1800 msnm (Flores-Islas 1999; Pennington y Sarukhán 2005; UNAM 2009b).

Los frutos de este árbol son pequeñas drupas de 1.5 a 2 cm de diámetro, carnosos, globosos con la base cóncava, verde brillante en estado inmaduro que se torna morado oscuro al madurar; contienen un hueso duro con hasta 4 semillas de 3 a 4 mm de largo de formas angulosas. Los frutos maduran de marzo a junio y también sirven de alimento para pájaros, zorros, ardillas y tejones (Flores-Islas 1999; Pennington y Sarukhán 2005).

b Actividades biológicas

Las plantas del género *Vitex* son reconocidas por sus amplios usos etnofarmacológicos (Padmalatha y col 2009; Pío-León 2012). El árbol de uvalama tiene múltiples usos medicinales. Decocciones de fruto, hoja y corteza son

A



B



C



D



Figura 2. Imágenes de *Vitex mollis*: **(A)** árbol completo; **(B)** hojas; y frutos **(C)** en madurez fisiológica, y **(D)** en senescencia con madurez comercial

empleados en el tratamiento de padecimientos como fiebre, diarrea y problemas gastrointestinales, síndrome premenstrual, para protección de la mujer después de dar a luz, dolores de pulmón y riñón, contra picadura de alacrán y serpientes, cólicos, migrañas y tuberculosis, entre otros (Flores-Islas 1999; UNAM 2009b). Estudios previos mencionan que el fruto posee actividad contra algunas bacterias enteropatógenas justificando sus usos tradicionales en problemas gastrointestinales (Delgado-Vargas y col 2010). Los frutos de *V. mollis* se consumen frescos, en conservas o hervidos en agua acompañados con leche y azúcar (Flores-Islas 1999; Montiel-Herrera y col 2004; López-Sotelo y Mejía-Montejo 2010).

c Composición química

De entre los pocos estudios del fruto destaca la caracterización fisicoquímica y nutricional, donde se señala como buena fuente en fibra dietaria (8 y 7% b.s. soluble e insoluble respectivamente), de minerales (*i.e.*, potasio, calcio, hierro, cromo y zinc) y vitamina C (5.8 mg/100 g b.f.), así como su aporte de proteínas, lípidos y azúcares (Montiel-Herrera y col 2004). Además de los estudios mencionados, la evidencia existente para que estos frutos sean considerados como alimentos funcionales es escasa. En contraste, frutos de otras especies de *Vitex* como *Vitex agnus-castus*, *Vitex rotundifolia* y *Vitex cannabifolia* han sido ampliamente estudiados (Hajdu y col 2007; Yamasaki y col 2007; Cuevas-Juárez y col 2014; Kikuchi y col 2014). Similar a lo registrado para ayale, nuestro grupo de investigación asoció el color oscuro de la pulpa de uvalama con la presencia de melaninas (Cuevas-Juárez y col 2014).

3 Papache (*Randia echinocarpa* Sessé et Mociño)

a Características generales

Randia echinocarpa, es una especie de arbusto perteneciente a la familia de las rubiáceas, originaria de México conocida en diferentes zonas como papache o crucillo chino (**Figura 3**). Se presenta en climas cálido, semicálido y templado. Crece desde el nivel del mar hasta los 100 msnm. *R. echinocarpa* es una planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolios, subcaducifolios y perennifolios, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino (CONABIO 2009b; UNAM 2009a). Es un árbol pequeño que alcanza un tamaño de 3 a 5 m de altura y tiene espinas en las ramas. Tiene las hojas más o menos largas y un poco redondeadas en la punta, de color verde oscuro en el anverso y verde blanquecino en el reverso. Las flores del papache son blancas o amarillas y despiden un aroma agradable. Los frutos son redondos, verdes, y tienen protuberancias parecidas a verrugas (CONABIO 2009b). La pulpa del fruto maduro es comestible, y se caracteriza por su sabor ácido cítrico y astringente (UNAM 2009a).

b Actividades biológicas

En Sinaloa todavía se le encuentra de manera silvestre, y nuestro grupo de investigación ha mostrado sus propiedades antimutagénicas y antioxidantes, por lo que se sugiere que su consumo resultaría benéfico para la salud (Santos-Cervantes y col 2007; Cano-Campos y col 2011; Cuevas-Juárez y col 2014). Esta planta carece

A**B****C****D**

Figura 3. Imágenes de *Randia echinocarpa* Sessé Mociño: **(A)** árbol completo; frutos **(B)** maduros, **(C)** senecentes, estado en que comúnmente se comercializan; y **(D)** en senescencia con madurez comercial.

de estudios farmacológicos que convaliden sus aplicaciones terapéuticas tradicionales, sin embargo se utilizan en la población contra los padecimientos urinarios, para aliviar la diarrea de origen infeccioso, anemia, diabetes, bronquitis, reumas, dolor de cintura, golpes internos, paludismo y hemorroides (CONABIO 2009b).

c Composición química

Estudios de diferentes especies de *Randia* (*Randia dumetorum*) sugieren la presencia de compuestos bioactivos en la pulpa del fruto maduro como alcaloides, compuestos fenólicos, esteroides, terpenoides, saponinas, flavonoides, carbohidratos, taninos, glucósidos, randionosida A, triterpenos y randianina (una saponina triterpenoide hemolítica). Debido a estos compuestos, se le ha atribuido actividad inmunomoduladora, antibacterial, antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, antifúngica, antidiabética y analgésica (Kumar y col 2006; Gandhimathi y Bai 2013; Ahmed y col 2014; Kandimalla y col 2016). En nuestro laboratorio se demostró que la actividad antimutagénica del papache se debe al efecto combinado del β -sitosterol y de los ácidos linoléico y palmítico (Santos-Cervantes y col 2007; Cano-Campos y col 2011). El fruto del papache tiene pulpa oscura asociada a la presencia de melanina (Cuevas-Juárez y col 2014).

C MELANINAS

1 Características y propiedades

Las melaninas son una familia de pigmentos de colores claros a negros, distribuidas en animales, microorganismos y plantas (*e.g.*, corteza de semillas y bayas oscuras) (Della-Cioppa y col 1990). Las melaninas se caracterizan por ser estructuras condensadas de polifenoles o aminoácidos fenólicos, pudiendo contener o estar libres de nitrógeno. Estos pigmentos se sintetizan por la oxidación enzimática de orto-difenoles vía polifenol oxidasas. La vía clásica propuesta involucra la oxidación fermentativa de tirosina vía 3,4-dihidroxifenilalanina catalizada por tirosinasas, no obstante las rutas de síntesis no están bien establecidas (Bilinska 1996; Van Gelder y col 1997; Kereste y Venger 2003). Las melaninas poseen estructura molecular compleja y no bien definida; originalmente se propusieron como sustancias homopoliméricas, sin embargo, estudios posteriores sugieren que se tratan de complejos heteropoliméricos, al grado de sugerir que no existe en la naturaleza ningún tipo de melanina estructuralmente idéntica (Kereste y Venger 2003; Solano 2014). Las melaninas son insolubles en la mayoría de los disolventes, para su extracción se requieren de disoluciones de pH alto y los rendimientos son bajos; en consecuencia su caracterización fisicoquímica y estructural es difícil y aún insuficiente, lo que también ha limitado su uso en diferentes áreas de la ciencia y la industria (Bell y Wheeler 1986; Bilinska 1996; Seniuk 2010; Cuevas-Juárez y col 2014).

Existen diversos alimentos que son fuente de melaninas en la dieta humana, entre los más estudiados se encuentran el té negro (*Camelia sinensis*) (Sava 2001), la trufa negra (*Tuber menanosporum*) (Harki y col 1996), la uva (*Vitis vinífera*) y el huitlacoche (*Ustilago maydis*) (Kereste y Venger 2003). Sin embargo, debido a la insolubilidad de las melaninas en compuestos orgánicos, su extracción se ha llevado a cabo por medio de precipitación con HCl y blanqueamiento con oxidantes. Por ello, se requiere de la búsqueda de nuevas técnicas de extracción para estos compuestos.

2 Melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa

a Características generales

A pesar de que las melaninas son insolubles en la mayoría de los disolventes, se cree que deben ser sintetizadas como precursores solubles que luego son depositados en los tejidos en sus formas insolubles; sin embargo, las formas solubles deben desempeñar funciones importantes, como se ha sugerido en el hombre. Las melaninas solubles ya han sido documentadas en animales, hongos y bacterias y recientemente nuestro grupo de trabajo obtuvo melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa. El método de extracción empleado es sencillo, ecológico y los rendimientos en melaninas solubles son mucho mayores (3.63–13.65%) a los registrados para melaninas. El contenido de fenólicos totales cuantificados de las melaninas extraídas estuvo en el rango de 22.31 y 222.23 mg EAG/g (equivalentes

de ácido gálico), mientras que para la actividad antioxidante los rangos fueron 262.73–2779.3 $\mu\text{mol ET}$ (ABTS) y 171.43-1203.7 $\mu\text{mol ET}$ (FRAP).

b Actividades biológicas

Las melaninas extraídas de fuentes vegetales son un grupo de heteropolímeros de alto peso molecular formados principalmente por unidades de tipo indólico. Estos pigmentos en su forma natural han mostrado tener un amplio espectro de funciones biológicas, incluyendo actividad antitumoral, hepatoprotectora, antiviral, fotoprotectora y antioxidante. Por esta razón, las melaninas están siendo ampliamente utilizadas en el campo de la medicina, farmacología y la industria de cosméticos (Montefiori 1991; Sava y col 2003; Hung y col 2004; El-Obeid y col 2006)

1) Actividad antioxidante

Como se mencionó, un mecanismo de las melaninas es el de la protección que ejerce frente a agentes oxidantes; las melaninas tienen una fuerte afinidad por los metales, son quelantes con mucha afinidad por los radicales libres; además de sus propiedades de transferencia de electrones, que estabilizan radicales libres en sistemas biológicos, atrapan electrones no apareados evitando su potencial efecto dañino (Urán y Cano 2008). Estudios de resonancia paramagnética de electrones mostraron que las melaninas aumentan su señal cuando están en presencia de iones superóxido; indicando la inactivación del anión superóxido (Korytowski y col 1985; Korytowski y col 1986). Adicionalmente, las melaninas, por su estructura, interaccionan con metales de transición. La utilidad de esta unión se ha interpretado de

varias formas, como disminución de la concentración de metales libres en el caso de metales tóxicos o la creación de depósitos adyacentes en la célula en el caso de metales esenciales (Swartz y col 1992).

Las propiedades de las melaninas sugieren que las melaninas solubles pueden interactuar fácilmente con los radicales libres y otras especies reactivas debido a la presencia de electrones desapareados en sus moléculas. Considerando la alta actividad antioxidante de estas melaninas solubles, las industrias alimentaria y farmacéutica podrían utilizarlas como agentes estabilizadores, ingredientes nutracéuticos, y en formulaciones que contribuyan a evitar o disminuir el estrés oxidativo, con el consecuente beneficio en la prevención y tratamiento de numerosos padecimientos. De esta manera, se considera que las melaninas solubles de los frutos de *C. alata*, *V. mollis*, y *R. echinocarpa* le imparten propiedades antioxidantes, estabilizadoras, y protectoras (Cuevas-Juárez y col 2014).

D PRINCIPALES PROBLEMAS DE SALUD PÚBLICA EN EL MUNDO

En el 2015 se presentaron aproximadamente 57 millones de muertes en el mundo. En los países de altos ingresos las personas mueren principalmente de enfermedades crónico-degenerativas; mientras que en los países en desarrollo las enfermedades infecciosas representan un tercio de las muertes anuales y son una de las causas principales de enfermedad y muerte en los niños menores de 5 años y adultos mayores (Ferreira-Guerrero 2011; OMS 2014; OPS 2014). La OMS reporta que estos padecimientos son más frecuentes en zonas tropicales y lugares con problemas de acceso al agua potable y al saneamiento (INEGI 2013). En relación

con los países de mayor nivel de desarrollo, en el 2012 las Enfermedades No Trasmisibles (ENTs) representaron el 31% de la mortalidad; en este subgrupo, las principales causas de muerte fueron enfermedades cardiovasculares (46.2%), cánceres (21.7%), enfermedades respiratorias, incluyendo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (10.7%), y la diabetes (4%) (WHO 2014b; Chamie 2016).

Las enfermedades infecciosas son enfermedades transmisibles causadas por microorganismos (WHO 2014c), siendo uno de los principales padecimientos de seguimiento epidemiológico en México. Entre 2005 y 2011, los casos nuevos de infecciones por microorganismos, infecciones respiratorias agudas e infecciones en vías urinarias representaron el mayor número de ingresos hospitalarios, generando el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud, y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Además, las diarreas por microorganismos ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad infantil en el país (SS 2012; INEGI 2013).

1 Aspectos generales sobre las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procarióticos, es decir carecen de membrana nuclear y de organelos, y básicamente están constituidas por el citosol que está contenido por una membrana celular y una pared celular de complejidad variable. Las membranas de los procariotas se diferencian de las membranas de las células eucarióticas (*i.e.*, células con núcleo definido y organelos) por la ausencia de esteroides, salvo en los micoplasmas, los cuales los incorporan a sus membranas al

crecer en medios ricos en esteroides. La principal función de la membrana celular es regular el movimiento de material hacia el interior y el exterior de la célula mediante los mecanismos de permeabilidad selectiva, generalmente permeable a moléculas lipófilas e impermeable a moléculas hidrófilas. Por medio del transporte activo de solutos también realiza esta función reguladora. Los sistemas enzimáticos presentes facilitan la difusión pasiva de solutos específicos y a la vez catalizan el transporte activo (Black 1996; Llop y col 2001; Alberts y col 2010).

De manera general, las bacterias se desarrollan en medios hipotónicos y debido a la fragilidad de la membrana citoplasmática correrían el riesgo de la lisis celular si no fuera por la presencia de una pared celular rígida, siendo, por lo tanto, la protección osmótica, una de sus funciones. Diferentes capas de la pared celular son sitios de determinantes antigénicos de la superficie bacteriana. La pared celular está constituida por: peptidoglicano (mucopéptido o mureína), que es un heteropolímero rígido e insoluble en agua, constituido por un soporte formado por N-acetilglucosamina y ácido N-acetil-murámico alternantes, con cadenas laterales tetrapeptídicas idénticas, fijadas al ácido N-acetil-murámico y un conjunto de puentes peptídicos transversos idénticos. El soporte es el mismo en todas las especies bacterianas, pero las cadenas tetrapeptídicas laterales y los puentes peptídicos transversos varían entre las especies bacterianas (Llop y col 2001; Alberts y col 2010).

Las paredes de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son diferentes química y estructuralmente. Además del peptidoglicano, otras macromoléculas intervienen en la arquitectura de las bacterias Gram positivas; por ejemplo, éstas

contienen considerables cantidades de ácidos teicoicos que son polímeros solubles en agua, constituidos por residuos de ribitol o glicerol unidos por enlaces fosfodiéster. La mayor parte del ácido teicoico se encuentra entre la membrana citoplasmática y la envoltura del peptidoglicano (Black 1996; Llop y col 2001).

Las bacterias Gram-negativas presentan paredes celulares más finas pero más complejas que las de las Gram-positivas; al exterior del peptidoglicano existen lipoproteínas, una membrana exterior constituida por proteínas específicas empotradas en una matriz de fosfolípidos, y lipopolisacáridos. La membrana exterior es una doble capa de fosfolípidos en la cual una parte de estos, pertenecientes a la capa más externa, han sido sustituidos por moléculas de lipopolisacáridos. La membrana exterior tiene una composición fosfolipídica semejante a la de la membrana citoplasmática (Llop y col 2001; Alberts y col 2010).

La membrana exterior de las bacterias Gram-negativas contiene una gran cantidad de proteínas, siendo las más significativas: porinas, proteínas OmpA, proteínas que participan en la difusión de compuestos a través de la membrana exterior y enzimas (fosfolipasa A, proteasas). Además de las funciones antes señaladas para las proteínas de la membrana exterior, se señala que participan también en la replicación del ADN y en la división celular. Debido al hecho de servir como barreras a la difusión de moléculas grandes, se le atribuye en parte la gran resistencia de las bacterias Gram-negativas a muchos antibióticos. Algunas bacterias sintetizan grandes cantidades de polímeros extracelulares que son organizados para formar una capa bien definida, cápsula, que rodea a la pared celular. Las bacterias capsuladas son a menudo más virulentas para el hombre, le proporciona

propiedades antifagocitarias, y además son más resistentes al protegerlas de la desecación. Cuando los polímeros forman una maraña de fibras que se extiende fuera de la célula, se denomina glicocálix y tiene un papel importante en la adherencia de la bacteria a otras superficies celulares, incluyendo las células de sus hospederos (Koch 1990; Alberts y col 2010).

La mayor parte de los genomas bacterianos consisten en un cromosoma circular que contiene una molécula de ADN única de varios millones de pares de bases (pb) de longitud (e.g., *E. coli* con 4.6 millones de pb aproximadamente). Sin embargo, algunas bacterias (e.g., *Vibrio cholerae*) contienen cromosomas múltiples y pocas incluso tienen cromosomas lineales. Además del cromosoma, muchas bacterias poseen plásmidos que son pequeñas moléculas circulares de ADN. Algunos plásmidos están presentes en un alto número de copias por célula, mientras que otros sólo están presentes en una o dos. En general, los plásmidos poseen genes que no son esenciales para las funciones bacterianas, pero pueden desempeñar un papel importante en el ciclo de vida y en el crecimiento dentro de los hospederos. Algunos plásmidos estimulan el apareamiento entre bacterias, otros contienen genes que matan a otras bacterias y algunos de ellos participan en la diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Pierce 2009).

Las bacterias intercambian material genético mediante tres mecanismos distintos, el primero es por conjugación y tiene lugar cuando el material genético pasa en forma directa de una bacteria a otra; el segundo que es la transformación tiene lugar cuando una bacteria capta el ADN del medio en que se desarrolla; y por último la transducción que tiene lugar cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) transportan

el ADN de una bacteria a la otra. Bacterias patógenas han desarrollado resistencia a los antibióticos, reduciendo la eficacia del tratamiento antibiótico en infecciones de importancia médica. Una de las causas de dicha resistencia se asocia a la acción de genes localizados en los plásmidos R, los cuales pueden transferirse por conjugación (Walsh 2000; Pierce 2009).

Un aspecto importante relacionado con las bacterias es su muerte celular mediada por agentes externos como la interacción física entre una molécula de fármaco y su objetivo específico en las bacterias, dicha interacción implica alteraciones en los niveles bioquímico, molecular y ultraestructural (Rice y Bayles 2008).

Las terapias antimicrobianas actuales se dividen en dos categorías generales: fármacos bactericidas, que matan bacterias con una eficiencia > 99.9%, y fármacos bacteriostáticos, que simplemente inhiben el crecimiento. El mecanismo de la muerte celular en las bacterias al estar en contacto con algunos antibióticos se clasifica principalmente en tres clases: inhibición de la replicación y reparación del ADN, inhibición de la síntesis de proteínas e inhibición de la síntesis de la pared celular. En donde se ha encontrado que las bacterias Gram-positivas, así como Gram-negativas, producen radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a través de la cadena de la respiración celular en respuesta a los antibióticos bactericidas, ocasionando con esto la muerte celular bacteriana ya que los radicales hidroxilo son extremadamente tóxicos y dañan fácilmente las proteínas, los lípidos de la membrana y el ADN (Kohanski y col 2007; Kohanski y col 2010).

2 Enfermedades bacterianas

Las enfermedades bacterianas son un estado patológico de un organismo humano al sufrir invasión de un microorganismo, donde la bacteria ha superado a todos los mecanismos de defensa del portador, provocando daño a tejidos u órganos con manifestaciones clínicas (WHO 2014a). Con el surgimiento de los antibióticos las enfermedades infecciosas prácticamente se habían erradicado, no obstante en las últimas décadas del siglo XX el problema resurgió debido, en gran parte, al problema emergente de la resistencia a los antibióticos. En los últimos años se ha registrado que un alto porcentaje de infecciones hospitalarias se debe a bacterias resistentes, entre ellas el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus* resistentes a la vancomicina o multirresistentes y algunas cepas Gram-negativas multiresistentes (**Cuadro 1**) (WHO 2014a).

En México, un estudio gubernamental realizado en 2012 registró 4,592 decesos causados por infecciones intestinales (Sinave DGE 2013). En México, las ERA (también denominadas por la Secretaría de Salud como infecciones respiratorias agudas, IRA) presentan históricamente el mayor número de casos entre las enfermedades transmisibles, lo que las convierte en la primera causa de atención médica, seguidas por las enfermedades diarreicas y las infecciones de vías urinarias (Sinave DGE 2013). De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones, como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera y rotavirus representan un severo problema de salud pública para nuestro país (Hernández y col 2011), siendo los bebés, los niños, las personas de la tercera edad,

Cuadro 1. Patógenos resistentes con mayor impacto en salud pública

Bacterias	Hongos	Parásitos	Virus
<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida</i>	<i>Leishmania</i>	Citomegalovirus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>albicans</i>	spp.	Virus del herpes simple
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		<i>Plasmodium</i> spp.	VIH
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi		<i>Trypanosoma</i> spp.	
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
<i>Campylobacter</i> spp.			
<i>Salmonella</i> spp.			

WHO (2014a)

y las personas que tienen el sistema inmunológico comprometido, quienes presentan el mayor riesgo de fallecer por estas enfermedades (OMS 2010).

3 Enfermedades parasitarias

La palabra helminto se deriva del griego helmins (“gusano parásito”). Los helmintos que parasitan al ser humano pertenecen a dos tipos: nematelmintos, que comprenden a los nematodos (gusanos redondos) y platelmintos, que incluyen a los cestodos (gusanos planos) y trematodos. Los helmintos que parasitan al hombre viven dentro del cuerpo, volviéndose una causa común de diarrea alrededor del mundo (Longo 2012).

Las enfermedades transmitidas por vectores son trastornos causados por agentes patógenos, entre ellos los parásitos, en el ser humano. Se estima que hasta un 60% de la población mundial está infectada con parásitos intestinales, registrándose cada año más de 1000 millones de casos y más de 1 millón de defunciones como consecuencia de este tipo de enfermedades (WHO 2016). Las estimaciones de prevalencias para infecciones intestinales por parásitos varía dependiendo de la región de estudio, las condiciones socioeconómicas y los hábitos de higiene personal (Anaelom y col 2010). En algunos lugares se han registrado prevalencias altas de infecciones por parásitos intestinales en niños de edad escolar, por ejemplo, en la India (68%), Nigeria (30%), Valencia (76.29%), y Filipinas (34.1 %) (Chandrasekhar y Nagesha 2003; Ragunathan y col 2010; Belizario y col 2011; Soriano y col 2011). El continente americano no es la excepción sobre infecciones intestinales por parásitos, Gamboa y col (2011) en un estudio realizado en la Plata,

Argentina reportaron la presencia de parásitos intestinales en el 85.7% de las muestras analizadas, atribuyéndoselo a que el 62% de la población vive en áreas suburbanas, donde las inundaciones favorecen la contaminación del suelo y en consecuencia, la transmisión de enfermedades por agentes patógenos como *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides* e *Hymenolepis nana*.

a Hymenolepiosis

Las infecciones derivadas del cestodo *Hymenolepis nana* son más frecuentes en zonas de clima cálido o templado, y seco; en especial en zonas rurales y marginadas, con condiciones sanitarias deficientes. En México, las estadísticas sobre parasitosis son insuficientes. Sin embargo, grupos de investigación, en estudios en población abierta, han mostrado una alta incidencia de hymenolepiosis en niños menores de 12 años de Sinaloa (25%), condición que compromete su desarrollo físico y mental y que ocasiona grandes pérdidas al país (Quihui y col 2006).

La hymenolepiosis es una infección del intestino delgado que puede ser causada por *Hymenolepis nana* o *Hymenolepis diminuta*; sin embargo, la mayoría de estas infecciones se asocian a *H. nana*. La sintomatología de la hymenolepiosis depende de la carga parasitaria y respuesta inmune del hospedero; la infección puede cursar asintomática o presentar manifestaciones clínicas (e.g., diarrea intermitente, dolor abdominal, anorexia) que afectan la calidad de vida de quienes la padecen (Feachem y col 1983).

Hymenolepis nana es un parásito plano, perteneciente a la clase Cestoda que parasita al hombre (principalmente a niños vulnerables), puede medir hasta 40 mm de largo en su fase adulta, y su estructura presenta tres regiones: la parte superior denominada escólex, le sigue el cuello y por último el resto del cuerpo llamado estróbilo. Este parásito es monoxeno, es decir, su ciclo de vida depende básicamente de sólo un hospedero. El hábitat de *H. nana* abarca desde el duodeno hasta el segmento ileal del intestino delgado y puede llevar a cabo un ciclo de vida directo o indirecto. En el ciclo de vida directo, el humano adquiere la infección al ingerir huevos del cestodo en alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal. Ocasionalmente, el humano adquiere la infección de manera indirecta (ciclo indirecto) a través de la ingesta de artrópodos (e.g., pulgas, escarabajos) que estuvieron en contacto con materia fecal contaminada con huevos del parásito (CDC 2013) **(Figura 4)**.

Los medicamentos más utilizados para tratar la hymenolepiosis son praziquantel y nitazoxanida. Sin embargo, estos antiparasitarios son parcialmente eficientes e inducen efectos secundarios tales como cefalea, somnolencia, mareo, náusea, vómito, dolor abdominal, heces blandas, prurito, urticaria, artralgia, mialgia, febrícula, y en algunos casos ligeras elevaciones de las enzimas hepáticas (Kappagoda y col 2011; Uribarren Berrueta 2014).

Es por lo anterior que se ha vuelto necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que presenten actividad contra el céstodo *H. nana*. Ante este escenario, diferentes grupos de investigación están enfocados a desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y antiparasitarios a partir de fuentes basadas en plantas o en nuevas

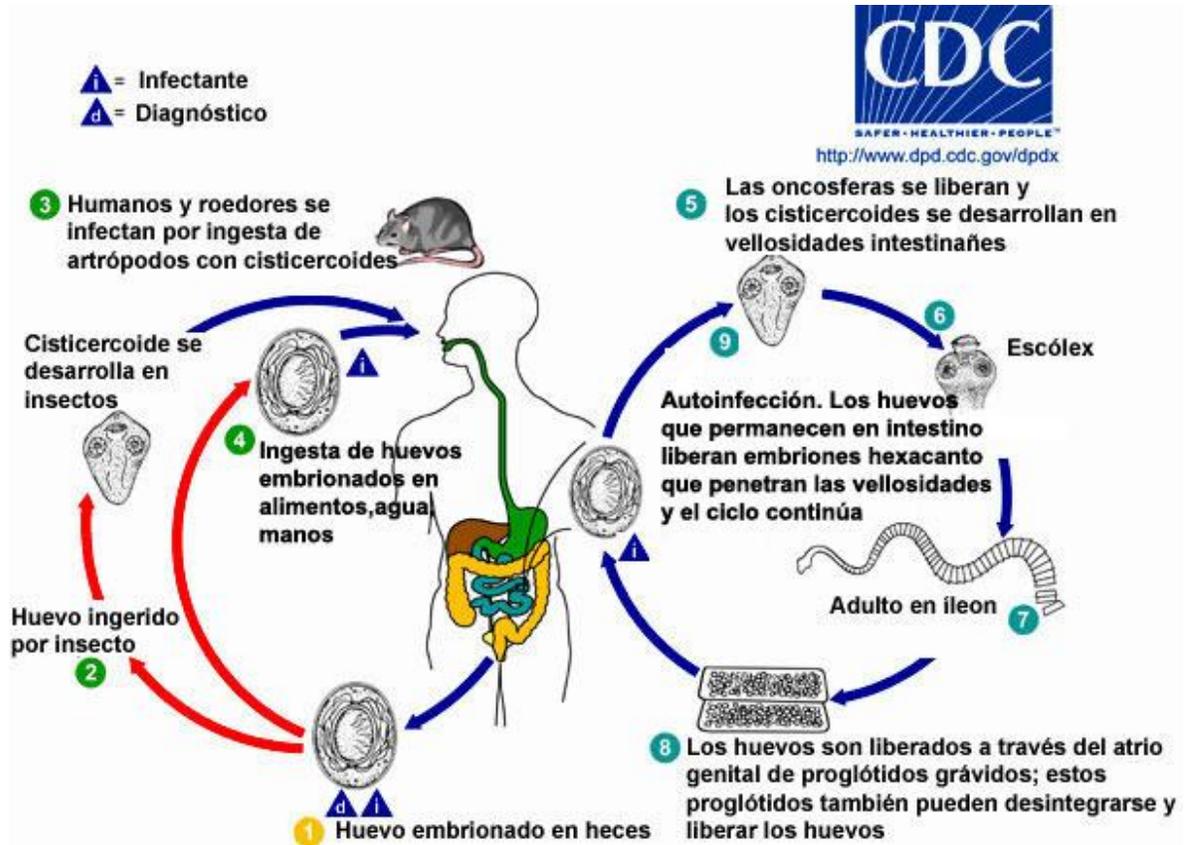


Figura 4. Ciclo de vida del cestodo *Hymenolepis nana*

tecnologías; por ejemplo, utilizando nanopartículas (Calzada y col 1998; Uribarren Berrueta 2014).

4 Resistencia a los fármacos

Las bacterias, hongos, virus y parásitos resistentes son aquellos que no pueden ser controlados por antimicrobianos a los cuales originalmente eran sensibles. Este fenómeno es complejo y provocado por numerosos factores interrelacionados, como es el uso indebido de fármacos antimicrobianos, por lo que el tratamiento farmacológico de las infecciones se ha complicado. Esto consecuentemente incrementa la morbilidad, el riesgo de defunción y los costos de tratamiento, volviéndose uno de los mayores problemas de salud pública en el ámbito mundial (WHO 2001; OMS 2014).

La resistencia de los agentes patógenos a los medicamentos de primera línea va desde cero hasta casi 100% y en algunos casos, la resistencia de los fármacos de segunda y tercera línea afecta significativamente el resultado del tratamiento. En los países más desarrollados aún se puede confiar en la eficacia de los antimicrobianos más nuevos para tratar las infecciones; sin embargo, en varios lugares del mundo el acceso a los nuevos tratamientos es limitado o aún imposible (WHO 2001), ya que de manera general, la medicina de patente es cara y en el tratamiento de enfermedades infecciosas los medicamentos ya no son 100% efectivos (Harris y col 2001; WHO 2014a).

Por su parte, en México, la pobreza tiene como consecuencia que una persona no tenga garantizado sus derechos para el desarrollo social, seguridad sanitaria y que sus ingresos sean insuficientes para adquirir los bienes y servicios que requiere para satisfacer sus necesidades (INEGI 2013). Ante esta realidad, existe una demanda generalizada por tratamientos eficientes, efectivos y de bajo costo.

Por ello, la Organización de las Naciones Unidas tiene implementada una estrategia de validación de las actividades de alternativas terapéuticas naturales usadas tradicionalmente contra enfermedades infecciosas por microorganismos, considerando que en los países de menores ingresos al menos el 80% de la población utiliza como fuente primaria de medicamentos a la medicina herbolaria (Hamilton 2006; OMS 2011, 2014) y alternativas terapéuticas apoyadas en el uso de nuevas tecnologías (Ramos Gomez y Castillo 2011).

5 Tratamientos alternativos

La medicina complementaria y alternativa describe una amplia gama de cuidado de la salud de uso o de origen fuera de la medicina convencional. La lista de terapias incluidas bajo este término es extensa, más se puede dividir en dos categorías principales: los productos naturales (e.g., hierbas medicinales, suplementos dietéticos), y las prácticas de la mente y el cuerpo (e.g., acupuntura, la quiropráctica, el masaje, la meditación , yoga) (NCCIH 2015).

El concepto de medicamentos herbarios o naturales abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen

como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, con actividad terapéutica (WHO 2013). La medicina tradicional se usa desde hace miles de años y es esencial para la salud humana; el uso masivo de plantas medicinales es usada aproximadamente por el 80% de la población en países en desarrollo, y se sustenta en la tradición y en la imposibilidad de acceso a la medicina formal (Hamilton 2004; Hamilton 2006; OMS 2014).

En el panorama médico el tratamiento contra enfermedades infecciosas abarca un gran número de medicamentos, sin embargo en la actualidad el acelerado desarrollo del campo de la nanotecnología y su aplicación en la medicina, han generado nuevas alternativas para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades de mayor impacto en la población mundial. Actualmente, la nanotecnología se apoya en novedosos métodos de preparación, modificación y caracterización de los materiales obtenidos, soportado en un mejor conocimiento a nivel atómico y molecular de estos materiales. Esto ha permitido imitar o alterar procesos biológicos, lo que aplicado en medicina, contribuiría a dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional. Los avances en nanotecnología han permitido la creación de herramientas y procesos para observar, manipular y controlar las estructuras biológicas en una escala nunca antes alcanzada, entidades de tamaños entre 100 y 10000 veces menores que una célula de mamífero (Londoño 2015).

E NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales en escala atómica y molecular, donde las propiedades de estos materiales difieren notablemente de aquellas a mayor escala, la miniaturización de los materiales modifica sus propiedades fisicoquímicas y atributos funcionales (Bhushan 2007). La nanotecnología tiene implicaciones interdisciplinarias debido a las propiedades completamente nuevas o mejoradas de las nanopartículas. Las aplicaciones en esta área crecen rápidamente en varios frentes como biomédica, farmacéutica, catálisis, administración de fármacos, desarrollo de antimicrobianos, entre otras (Edison y Sethuraman 2012). En la nanotecnología se sintetizan nanopartículas de tamaños, formas y composiciones químicas variables, con un tamaño que va desde 1 a 100 nm. El tamaño y morfología de la superficie de las nanopartículas es clave para definir sus propiedades físicas, químicas, ópticas y electrónicas (Rathi Sre y col 2015).

La nanotecnología es un área emergente importante de la investigación, y una de las áreas de interés se enfoca en el desarrollo de métodos biológicos para la síntesis de nanopartículas metálicas con mejores propiedades y ampliando sus actividades biológicas (Edison y Sethuraman 2012).

1 Síntesis de nanopartículas

Generalmente hay dos enfoques que están implicados en las síntesis de nanopartículas, el de "arriba hacia abajo" o el de "abajo hacia arriba". El método de

“arriba hacia abajo” consiste en convertir el metal en partículas finas mediante reducción de tamaño empleando diversas técnicas (e.g., técnicas litográficas y de laser). Sin embargo, este enfoque introduce imperfecciones en la superficie de la NPs, lo que resulta una gran desventaja si se considera que las propiedades físicas y químicas de las NPs dependen grandemente de la estructura de su superficie (Meyers y col 2006). Por otro lado, el enfoque “abajo hacia arriba” genera NPs mediante la reducción de sales de metales empleando agentes químicos o biológicos (e.g., extractos de plantas, microorganismos). Este método implica el auto-ensamble de átomos en centros de nucleación que crecen hasta formar una partícula de tamaño nanométrico (Iravani 2011).

2 Síntesis química de nanopartículas

En la síntesis química se emplea un compuesto químico para reducir a la sal metálica y formar los centros de nucleación, al final del proceso se requieren de moléculas estabilizantes que limiten la aglomeración de átomos y permitan generar partículas de tamaño nanométrico. El método químico de síntesis de NPs emplea reactivos tóxicos y costosos (**Cuadro 2**), genera subproductos peligrosos, y requiere de alto consumo de energía, además las temperaturas de síntesis son altas (Thakkar y col 2010; Mondal y col 2014).

Los inconvenientes inherentes a la síntesis química de NPs han limitado su uso en el campo biomédico e introduce la necesidad de contar con métodos de síntesis alternativos más seguros. En este contexto se introdujeron métodos biológicos para

Cuadro 2. Precursores comunes, agentes reductores y estabilizadores poliméricos usados en los métodos químicos de síntesis de nanopartículas

Precursores comunes	Agentes reductores comunes	Estabilizadores poliméricos
Ánodo de metal	Hidrógeno	Polivinilpirrolidona, PVP
Cloruro de paladio	Citrato de sodio	Polivinilalcohol, PVA
Hidrógeno hexacloroplatinato(IV)	Clorhidrato de hidroxilamina	Polietilamina
Tetracloroplatinato(II) de potasio	Ácido cítrico	Polifosfato de sodio
Nitrato de plata	Monóxido de carbono	Poliacrilato de sodio
Perclorato de plata	Fósforo en éter	Halogenuros de tetraalquilamonio
Ácido cloroáurico	Metanol	
	Peróxido de hidrógeno	
	Carbonato de sodio	
Cloruro de rodio	Hidróxido de sodio	
	Formaldehído	
	Tetrahidroborato de sodio	
	Ion amonio	

Mondal y col (2014)

la producción de NPs empleando como agentes reductores a microorganismos (e.g., bacterias, hongos, algas, levaduras) o extractos vegetales.

3 Síntesis biológica de nanopartículas

a Síntesis biológica de nanopartículas utilizando microorganismos como agente reductor

La síntesis de NPs empleando microorganismos que reduzcan las sales metálicas correspondientes tiene varias desventajas, entre las cuales se puede mencionar: la necesidad de mantener condiciones asépticas para obtener un crecimiento profuso, altas posibilidades de infección y contaminación, mucho tiempo para el crecimiento microbiano (2-3 días), y para la síntesis y purificación de las NPs (1-2 días). Por lo tanto, el empleo de microorganismos para formar NPs implica costos relativamente altos. De esta manera, en la búsqueda de mejores alternativas para la síntesis de NPs se evaluó como posibilidad el uso de extractos de plantas como agente reductor (Rajan y col 2015; Shankar y col 2016; McGillicuddy y col 2017).

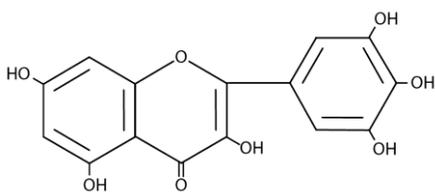
b Síntesis biológica de nanopartículas utilizando tejido vegetal como agente reductor

La biosíntesis de NPs empleando extractos vegetales ha adquirido gran relevancia debido a su simplicidad, rápida formación de las NPs, enfoque ecológico, menor producción de desechos tóxicos, y bajo costo (Siddiqui y col 2015; Ahmed y

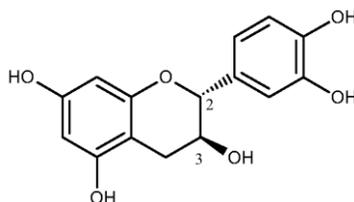
col 2016a). El uso de extractos de plantas para la síntesis de NPs metálicas inició a partir del año 2000, a la fecha se han empleado más de 200 especies de plantas como fuente de extractos para sintetizar NPs (**Cuadro 3**) (Rajan y col 2015; Shankar y col 2016; McGillicuddy y col 2017). Este método natural para la síntesis de NPs supera los procesos fisicoquímicos de producción, ya que al no utilizar o añadir sustancias tóxicas se vuelven más sencillos y respetuosos con el medio ambiente. Los extractos de plantas contienen enzimas y compuestos con propiedades reductoras (e.g., ácidos carboxílicos, hidroxilos, ácido cítrico, gálico, ascórbico, catequinas, compuestos fenólicos, proteínas) (**Figura 5**) que pueden ser utilizados para producir NPs a temperatura ambiente y a un pH neutro-alcalino en poco tiempo. Estos agentes reductores de origen natural debido a su alta solubilidad en agua, alta biodegradabilidad y no toxicidad en comparación con otros agentes químicos reductores tales como la hidracina y borohidruro de sodio, entre otros, son agentes multifuncionales ideales para el desarrollo de NPs metálicas. Adicionalmente, los extractos naturales contribuyen en la estabilización de las NPs, en la última etapa de su formación (**Figura 6**) (Dwivedi y Ma 2014; Mondal y col 2014). Diversas partes de la planta (e.g., semillas, hojas, flores, biomasa completa) han sido usadas en la producción biocatalítica de NPs metálicas. Las características de las NPs formadas (i.e., tamaño, forma y estructura superficial) dependen del tipo de extracto vegetal, del metal, del tiempo de reacción y de las condiciones de pH y temperatura; lo que impactará sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las mismas (Dwivedi y Ma 2014).

Cuadro 3. Síntesis biocatalítica de nanopartículas empleando extractos de plantas

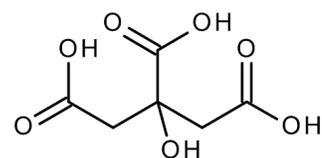
Fuente (partes de plantas)	Nanopartículas (NPs)	Tamaño de las NPs (nm)	Forma geométrica de las NPs	Referencia
<i>Tenacetum Vulgare</i> (fruto tanaceto)	Ag, Au	16,11	Esférica/triangular	Dubey y col (2010)
<i>Terminalia catappa</i> (hoja de almendro)	Au	10-35	Esférica	Ankamwar (2010)
<i>Ocimum sanctum</i> (extracto de la hoja)	Ag, Au	10,20,30	Esférica hexagonal y triangular	Philip y col (2011)
Extracto del fruto pera	Au	200-500	Triangular, hexagonal	Ghodake y col (2010)
Extractos de hojas de té	Ag,Au	20	Esférica/prisma	Begum y col (2009)
<i>Desmodium triflorum</i>	Ag	5-20	Esférica	Ahmad y col (2011)
<i>Euphorbia birta</i> (hoja)	Ag	40-50	Esférica	Elumalai (2010)
<i>Diospyros kaki</i> (caqui) (extracto de la hoja)	Bimetalica Au/ag	50-500	Cubica	Song (2008)
<i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor)	Au	5-100	Cristalina, irregular, esférica	Ragunandan y col (2010)
<i>Chenopodium album</i> (extracto de la hoja)	Ag, Au	10-30	Esférica	Dwivedi y Gopal (2010)
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Óxido de Fe	2-10	Cristalina	Herrera-Becerra y col (2008)
<i>Sedum alfredii hance</i>	ZnO	53.7	Hexagonal y esférica	Qu y col (2011)
<i>Cinammon zeylanicum</i> (canela)	Pd	10-20	Cristalina	Sathishkumar y col (2009)



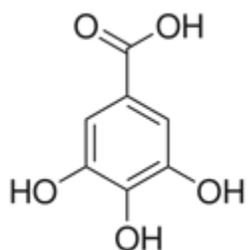
Flavonoides



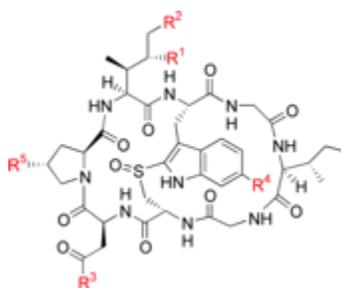
Catequinas



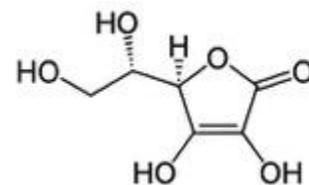
Ácido cítrico



Ácido gálico



Proteína (e.g., actina)



Ácido Ascórbico

Figura 5. Estructura bioquímica de algunos compuestos de extractos de plantas que pueden catalizar la síntesis de nanopartículas metálicas

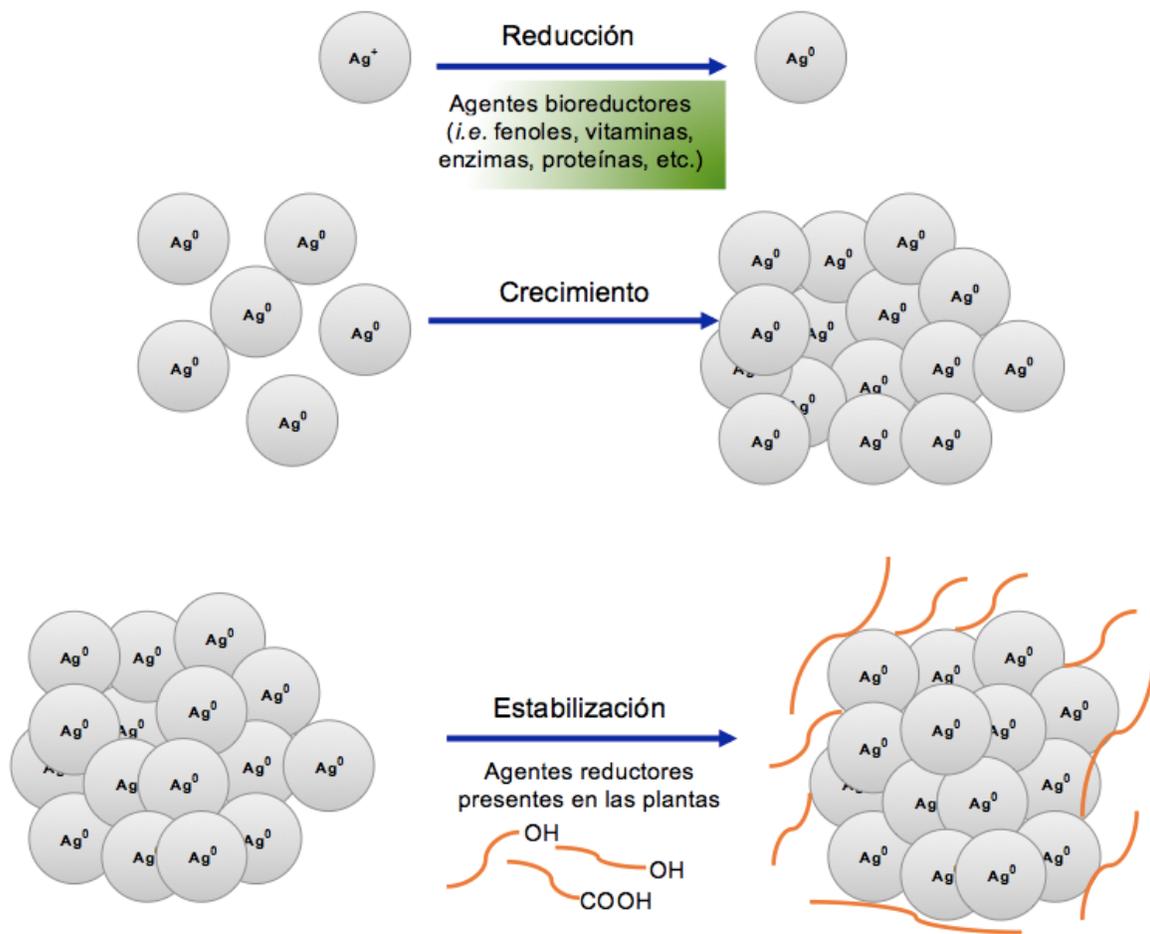


Figura 6. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la síntesis de nanopartículas metálicas mediada por extractos de plantas (Mondal y col 2014)

Es importante mencionar que en la producción e industrialización de plantas se generan una gran cantidad de subproductos (e.g., cáscara, semilla) con alto contenido de compuestos bioactivos. Estos podrían ser usados para generar NPs cuyo valor en el mercado sería superior al del propio producto agrícola (Silva y col 2014).

F ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SINTETIZADAS CON EXTRACTOS DE PLANTAS

Las nanopartículas ofrecen oportunidades sin precedentes para intervenir en los procesos celulares y moleculares, y por lo tanto de tener aplicaciones clínicas (Muthuvel y col 2014). Entre ellas se pueden mencionar nuevos métodos de liberación de principios activos en sitios específicos del cuerpo, la mejora del índice terapéutico de los medicamentos, ya que aumentan su biodisponibilidad y disminuyen su toxicidad, y como alternativa contra enfermedades infecciosas ocasionadas por patógenos resistentes a los tratamientos convencionales (Swami A 2012).

Los metales para generar NPs que han adquirido gran importancia en épocas recientes debido a su biocompatibilidad son la plata, el oro, el platino, el titanio, el paladio, el hierro, el aluminio, y el cobre. Entre estos metales biocompatibles, plata y oro son los más importantes debido a su larga historia en el uso medicinal como tratamiento contra el cáncer, artritis, e infecciones; y a su potencial para controlar a microorganismos patógenos o de vectores implicados en su transmisión (**Cuadro 4**) (Rai y col 2014). Estas nanopartículas ya se han utilizado para diversas aplicaciones

Cuadro 4. Nanopartículas de plata y oro con actividad antibacteriana

Planta/extracto	NPs	Características de la NPs	Método y cepas utilizadas	Comentarios	Referencias
Grewia flavescens (extracto de la hoja)	Ag	λ_{max} 380-460 nm, esférica 60 nm, estructura cristalina	Método difusión en disco, <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Se sugiere que las AgNPs inducen la formación de poros en las membranas de las bacterias, lo que disipa el gradiente de protones y afecta su metabolismo y finalmente induce su muerte	Sana Siva y col (2015)
Extracto de betabel	Ag	λ_{max} 350-500 nm, esféricas y simétricas 10-15 nm	Difusión en disco/ <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853), <i>Streptococcus aureus</i> (ATCC 12384) y <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	A mayor concentración de extracto se observó una reducción en el tamaño de las NPs. Se sugieren dos mecanismos para el efecto antibacteriano: (1) atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular del microorganismo y la carga positiva de Ag y (2) la formación de poros en la membrana celular	Bindhu (2015)
Erythrina indica lam (extracto de la raíz)	Ag	λ_{max} 437nm cristalinas y esféricas de 20-118 nm.	Difusión en disco/ <i>Staphylococcus aureus</i> (MTCC 7443), <i>Micrococcus luteus</i> (MTCC 1538), <i>Escherichia coli</i> (MTCC 443), <i>Bacillus subtilis</i> (MTCC 441), <i>Salmonella typhi</i> (MTCC 734) y <i>Salmonella paratyphi</i> (MTCC 735)	Se sugiere que las AgNPs interfieren con las rutas de señalización en la bacteria mediante la modulación de procesos de fosforilación importantes para el crecimiento y división celular	Rathi Sre y col (2015)
Cassia tora (extracto de la hoja)	Ag	λ_{max} 400-450 nm/ esféricas, 90 nm	Difusión en disco/ <i>Staphylococcus aureus</i> (NCIM 2079), <i>Bacillus subtilis</i> (NCIM 2063), <i>Escherichia coli</i> (NCIM 93 2931), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCIM 5029)	A mayor concentración y menor tamaño de AgNPs, mayor es el efecto antibacteriano. Se registró mayor efecto sobre las bacterias Gram negativas, sugieren que debido a las diferencias en la estructura de la membrana, en las Gram negativas la capa de peptidoglicanos es más delgada	Saravanakumar y col (2015)
Rosa indica (pétalos de rosa)	Ag	λ_{max} 441 nm/ NPs esféricas 23.52-60.83 nm y cristalinas	Método de difusión en disco/ <i>Streptococcus mutans</i> -MTCC-896, <i>Enterococcus faecalis</i> -MTCC-439, <i>E. coli</i> -MTCC-40 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> MTCC-740	Hubo buena actividad antibacteriana	Manikandan y col (2015)
Prosopis farcta (extracto)	Ag	λ_{max} 400-500 nm esféricas 8 – 11 nm, cristalinas	Método de difusión en disco/ <i>Staphylococcus aureus</i> (PTCC 1431), <i>Bacillus subtilis</i> (PTCC 1420), <i>Escherichia coli</i> (PTCC 1399), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PTCC 1074)	La biosíntesis de AgNPs mostró inhibición del crecimiento celular tanto para bacterias gram ⁺ como para gram ⁻ . La biosíntesis de AgNPs es un método antimicrobiano innovador usando productos naturales con aplicaciones biomédicas	Miri y col (2015)
Acorous calamus (extracto de rizoma)	Ag	λ_{max} 421 nm esféricas 31.83 nm.	Método de difusión en disco/ <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	El extracto por si solo mostró moderada actividad antibacteriana. Sin embargo las AgNPs a partir del extracto tuvieron mejor actividad. Se comprobó que las AgNPs tienen un fuerte efecto bactericida, ya que atacan la membrana celular de la bacteria, modificando su estructura, y con ello inhibiendo el crecimiento de la misma	Nakkala y col (2014)
Solanum nigrum (extracto de la hoja)	Au	λ_{max} 537 nm esféricas 50 nm	Método de difusión en disco/ <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia.coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Debido al tamaño y gran superficie de las AuNPs produce efectos electrónicos, potenciando la fuerza de unión entre las AuNPs y la bacteria AuNPs, penetrando fácilmente la membrana	Muthuvel y col (2014)
Chenopodium murale (extracto)	Ag	λ_{max} 440 nm, esféricas 30-50 nm	Método de difusión en agar/ <i>Staphylococcus aureus</i> /	El extracto por si solo no mostró actividad bactericida. El posible mecanismo de acción de las	Abdel-Aziz y col (2014)

de hoja)				AgNPs con el extracto es que disminuyen la permeabilidad de la membrana, libera polisacáridos y proteínas a través de la membrana, genera radicales libres como respuesta al daño en la membrana y disipación de la fuerza protón motriz	
Zingiber officinale (extracto de raíz)	Ag, Au	λ_{\max} 436–531 nm, esféricas 10-20 nm	Método de difusión en disco y MIC por microdilución/ <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Listeria</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp/ tetraciclina	pH alcalino favorece la formación de NPs	Velmurugan y col (2014b)
Piper longum (fruto)	Ag	λ_{\max} 430 nm esféricas 46 nm	Método de difusión en agar/ <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / estreptomycin	AgNPs con el extracto mostraron fuerte actividad antibacteriana, atribuyéndose a que disminuyen la replicación de DNA e inactivación proteica	Reddy y col (2014)
Lansium domesticum (extracto de la cáscara del fruto)	Ag, Au	λ_{\max} 430-538 nm Triangulares hexagonales 20–40 nm	Método por microdilución (MTT)/ <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	Las AuNPs no mostraron actividad antibacteriana en las concentraciones usuales, solo con concentraciones altas (40 $\mu\text{g/mL}$) se vio disminución en la actividad celular. Las NPs bimetalicas mostraron mayor tamaño que las mono metálicas y buena biocompatibilidad.	Shankar y col (2014)
Coriandrum sativum (extracto de semilla)	Ag	λ_{\max} 400–480 nm, cristalina y esféricas 13.09 nm	Método de difusión en disco/ <i>Bacillus subtilis</i> NCIM 2635/ penicilina.	La reacción entre las NPs (ácidas) y las células (bases) resulta en la formación de sales, lo que ocasiona daño o muerte celular. La interacción de las AgNPs con el azufre y fósforo del ADN puede traer problemas durante la replicación	Nazeruddin y col (2014)
Crataegus douglasii (extracto del fruto)	Ag	λ_{\max} 447 nm esféricas 40–60 nm	Método de difusión en disco / <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Se sugiere que la actividad antibacteriana se debe a las AgNPs interfieren con el metabolismo aeróbico de la bacteria	Ghaffari-Moghaddam y Hadi-Dabanlou (2014)

biomédicas como biosensores, bioimagen, terapia fototérmica, y administración dirigida de fármacos (Keat y col 2015).

1 Nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extractos de plantas y su función contra enfermedades infecciosas

El uso de nanopartículas metálicas sintetizadas a partir de extractos vegetales como nuevos agentes antimicrobianos podría representar una alternativa viable para retrasar o inhibir el crecimiento de muchas especies patógenas. El interés del uso de las AgNPs y AuNPs contra enfermedades infecciosas es debido a la eficiencia parcial de los medicamentos actualmente utilizados, lo cual está relacionado con la aparición de cepas resistentes (Keat y col 2015; Benelli 2016).

a Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro

Entre las NPs de metales nobles, la plata es uno de los materiales más comúnmente utilizados. La evidencia sugiere que la Ag es segura para las células animales y se ha empleado como un agente bactericida seguro y eficaz. Diversos grupos de investigación han propuesto que la Ag interactúa electrostáticamente con la membrana, induce la formación de poros, provoca un desbalance químico y el ingreso de las AgNPs a la célula; posteriormente las AgNPs interactúan con las biomoléculas y afectan en forma negativa prácticamente todos los procesos celulares. Por tal motivo, se considera que es muy difícil que las bacterias adquieran resistencia a NPs (Abdel-Aziz y col 2014).

Otro metal que es ampliamente utilizado es el oro, a pesar de que los mecanismos detrás de la actividad de las AuNPs en las bacterias aún no están completamente dilucidados, se considera que actúan de manera similar a las AgNPs (Bindhu y col 2014).

b Nanopartículas de plata y oro y su actividad antiparasitaria

La actividad antiparasitaria de las NPs se ha evaluado prácticamente sólo usando AgNPs y contra protozoarios. De manera general, el efecto antiparasitario no es tan claro como el antibacteriano; sin embargo, las AgNPs mostraron efectos similares a la fármaco cloroquina contra *Plasmodium falciparum* (Panneerselvam, 2011), evidenciando la actividad tanto en promastigotes como en amastigotes, registrándose un mayor efecto en AgNPs (Allahverdiyev y col 2011). Las AgNPs sintetizadas empleando el extracto acuoso de *Acacia auriculiformis* se probaron contra el parásito *Setaria cervi*, observándose que las AgNPs tuvieron una LC_{50} 5.61 $\mu\text{g/mL}$ mientras que fue 81.5 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto acuoso; al teñir los parásitos con azul de tripano, la membrana de éstos aparece distorsionada, por lo que la muerte puede ser apoptótica o necrótica (Saini y col 2016). La actividad antiparasitaria de NPs es promisorio y se requieren de más estudios con protozoarios, así como contra otros parásitos, que permitan el desarrollo de tratamientos efectivos contra parasitosis incluidas entre las enfermedades ignoradas. Es importante mencionar que las NPs han mostrado excelentes efectos contra ectoparásitos, así como contra insectos vectores de enfermedades parasitarias (Rai y col 2014), información en la que no se abunda por el enfoque de la presente investigación.

IV JUSTIFICACIÓN

La incidencia de enfermedades infecciosas en México y el mundo es muy alta. El tratamiento de estos padecimientos es costoso y poco eficiente, principalmente por el fenómeno de resistencia y la consecuente re-emergencia de patógenos que se creían controlados. De esta manera, se requiere el desarrollo de nuevos tratamientos eficientes, eficaces y de bajo costo. Al respecto, el uso de nanopartículas metálicas producidas con extractos de plantas emerge como una estrategia de alta factibilidad contra estos padecimientos. México tiene una gran diversidad vegetal y algunos extractos de plantas nativas han mostrado una alta actividad antioxidante. En particular, del fruto de ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) y papache (*Randia equinocarpa* Sessé et Mociño) se han aislado melaninas solubles de alta actividad antioxidante con potencial para generar nanopartículas que pudieran usarse como potentes agentes antioxidantes, antimicrobianos, y antiparasitarios. En este trabajo, por vez primera se propone el uso de melaninas solubles de plantas para sintetizar nanopartículas metálicas por medio de síntesis verde, que sean más estables y que presenten actividad contra bacterias patógenas humanas y contra el cestodo *Hymenolepis nana*, sustentando su potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Caracterizar propiedades fisicoquímicas y actividad biológica (*i.e.*, antioxidante, antibacteriana y antiparasitaria) de nanopartículas metálicas preparadas con melaninas solubles de frutos nativos como agente reductor.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar las propiedades fisicoquímicas de nanopartículas metálicas formadas mediante el uso de melaninas solubles y un compuesto químico como agente reductor.
2. Establecer las actividades biológicas (*i.e.*, antioxidante, antibacteriana y antiparasitaria) de nanopartículas obtenidas empleando melaninas solubles y un compuesto químico como agente reductor.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Material vegetal

Frutos de ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis* Kunth), y papache (*Randia echinocarpa* Sessé et Mociño) fueron recolectados por Francisco Delgado Vargas y Gabriela López Angulo en diferentes zonas del estado de Sinaloa; la identidad fue corroborada por el Dr. Rito Vega-Aviña. Los frutos se recolectaron en estado de maduro; en el cual, ayale y papache presentan un color café opaco, y uvalama un color violeta uniforme (**Figura 7**). Los frutos se trasladaron al Laboratorio de Química de Productos Naturales, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde fueron lavados para eliminar impurezas y suciedad, y se les eliminó el exceso de humedad a temperatura ambiente (25°C)/ sombra. En el caso de ayale y papache se eliminó la cáscara para recuperar la pulpa y de papache se eliminó la semilla usando un procesador centrífugo de jugos; mientras que para uvalama se manejó el fruto entero. Los tres materiales se almacenaron en un ultracongelador (REVCO Industries, Inc., Ashville, North Carollina, EE. UU.) a -70 °C hasta su procesamiento.

2 Microorganismos

En la determinación de la actividad antibacteriana se utilizaron 8 bacterias patógenas importantes para el hombre, tres fueron cepas control (DIFCO Laboratories, Michigan, EE. UU.) y las demás cepas correspondieron a aislados de

A



B



C



Figura 7. Frutos de **(A)** ayale, **(B)** uvalama y **(C)** papache

muestras clínicas, proporcionados por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría ubicado en México D.F. (**Cuadro 5**).

Para la determinación de la actividad antiparasitaria se usaron parásitos de *Hymenolepis nana*, obtenidos de ratones previamente infectados en el laboratorio de acuerdo a lo reportado por Padilla-Salas (2003).

El ensayo de toxicidad *in vitro* se realizó con larvas de *Artemia salina* cultivadas a partir de huevos (Brine shrimp eggs, BIO-MARINE INC, EE. UU.).

3 Animales de laboratorio

En los ensayos de actividad antiparasitaria se utilizaron ratones Balb/C (Harlan Laboratories Models, S.A. México) previamente infectados con *H. nana* (Stettler y col 2004; Nanayakkara y col 2008), de donde se aislaron parásitos adultos con proglótidos grávidos. De los proglótidos grávidos se obtuvieron los huevos para infectar ratones Balb/C de 4-6 semanas de edad y así obtener un número suficiente de parásitos para realizar los estudios.

La hymenolepiosis en ratones se verificó por análisis coproparasitoscópicos mediante el método de Faust (Ash y Orihel 2010). La identificación de huevos de *H. nana* en la muestra de heces se relacionó con la presencia de parásitos adultos en el tracto digestivo de los ratones. Estos permanecieron en el bioterio y en el día 17^o postinfección, los animales infectados se sacrificaron utilizando éter etílico e inmediatamente se colocaron en un recipiente con etanol al 70% por 1 min y se diseccionaron para recuperar el intestino delgado que se colocó en medio de Hank's

Cuadro 5. Cepas de referencia y aislados clínicos empleados en la evaluación de la actividad antibacteriana ¹

Bacterias gram positivas	Bacterias gram negativas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Streptococcus grupo A-4</i>	<i>Escherichia coli</i> A011
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATTCC 27853
	<i>Shigella dysenteriae</i>

Control Gentamicina

¹ Las cepas control ATCC (American Type Culture Colection) y aislados clínicos fueron proporcionados por el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría ubicado en México, D.F.

(pH 7.6) (Bernard y col 1984). Posteriormente, del intestino se aislaron los parásitos adultos los cuales fueron mantenidos en el medio de Hank's a 37 °C. Esta metodología fue previamente estandarizada por Padilla-Salas (2003).

4 Reactivos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron grado reactivo. Las siguientes sustancias fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.): ácido 2,2-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), cloruro hexahidratado de hierro (III) ($\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), complejo férrico-2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ) (FRAP), 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxilato dihidratado, citrato tribásico de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (CTS), ácido cloroaúrico (HAuCl_4), borohidruro de sodio (NaBH_4), nitrato de plata (AgNO_3), dimetilsulfóxido (DMSO), amortiguador fosfato salino (PBS), medio de Hank's (pH 7.6), gentamicina, y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Asimismo, se emplearon los medios de cultivo agar de tripticaseína y soya (TSA), caldo y agar Muller Hinton y agar McConkey (Becton Dickinson de México). Solventes como etanol, metanol y acetona fueron destilados previos a su uso. Se utilizó agua desionizada (18.0 Ω) para todos los experimentos.

C MÉTODOS

1 Obtención de melaninas parcialmente purificadas a temperatura de ebullición (MePP-TE)

a Preparación de harina de uvalama, ayale y papache

El material vegetal se secó en una liofilizadora modelo 5L (The Virtis Company, New York, EE. UU.). La semilla de ayale y papache fue eliminada. La pulpa de los frutos se molió en una licuadora (Oster[®], México), aplicando pulsos para evitar el calentamiento de la muestra, para obtener una harina que se hizo pasar por una malla N° 40. La harina se almacenó en bolsas de plástico (Ziploc[®], EE. UU.), manteniéndolas a -20 °C protegidas de la luz hasta su utilización.

b Melaninas impuras a temperatura de ebullición (Mel-TE)

La harina (5 g) se maceró por 30 min con agua desionizada (100 mL), en un matraz ámbar, con agitación constante (900 rpm), y a temperatura de ebullición; el tiempo contó a partir del inicio de la ebullición. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada (20000 x g/ 15 min/ 20-25 °C), se recuperó el sobrenadante, se congeló a -80 °C, y se liofilizó por 4 días. El residuo obtenido corresponde a las melaninas impuras a temperatura de ebullición (Mel-TE) y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La cantidad de Mel-TE se cuantificó para determinar su rendimiento.

c Diálisis con tubos de ultrafiltración

En la purificación de melaninas, la Mel-TE (500 mg) se resuspendió en 10 mL de agua desionizada y se colocó en un tubo de diálisis con membrana de polietersulfona (MWCO 10 KDa) (VIVASPIN 20 mL Sartorius, México, D.F.). La muestra se centrifugó (3220 g/ 30 min/ 20-23 °C) para recuperar la fracción dializada. El tubo se volvió a centrifugar con agua desionizada para eliminar impurezas. La muestra dializada se liofilizó para obtener las melaninas parcialmente purificadas por ultrafiltración del extracto acuoso a temperatura de ebullición (MePPU-TE). Las MePPU-TE se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La MePPU-TE se cuantificó para determinar los rendimientos.

d Diálisis con membrana de celulosa

La Mel-TE (500 mg) se resuspendió en 10 mL de agua desionizada en una bolsa de celulosa (12 kDa) previamente hidratada, se suspendió en un vaso de precipitado de 500 mL con 300 mL de agua desionizada, y se mantuvo en agitación constante, se realizaron cambios de agua dos veces al día durante cuatro días. La muestra dializada se recuperó y se liofilizó para obtener la melanina parcialmente purificada por diálisis (MePPD-TE) que se almacenó a -20 °C hasta su utilización. La MePPD-TE se cuantificó para determinar los rendimientos.

2 Métodos de evaluación de la actividad biológica

a Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de las melaninas parcialmente purificadas extraídas de los tres frutos estudiados se determinó por los métodos ABTS y FRAP. El método ABTS mide la inactivación de radicales libres por transferencia de hidrógenos o electrones, mientras que el FRAP es por transferencia de electrones. La evaluación de la capacidad de captación de radicales libres de las nanopartículas se determinó a través de los métodos FRAP y DPPH, este último método está influenciado por la inactivación de radicales libres por medio de la transferencia de iones hidrógeno y electrones (Kumar y col 2016a; Ravichandran y col 2016).

1) Método ABTS

El reactivo ABTS es oxidado al radical $ABTS^{•+}$ que presenta un color azul-verde intenso. Las sustancias oxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno al radical provocando su decoloración, medida por la pérdida de absorbancia dependiente del tiempo de reacción (Re 1999). El $ABTS^{•+}$ (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) se produjo mezclando 5 mL de una disolución de ABTS (7 mM en agua) y 1 mL de persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) durante 12-16 h. El radical $ABTS^{•+}$ se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (10 mM, pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.020 a 734 nm (λ_{max}). Para el ensayo antioxidante, 1950 μ L de disolución $ABTS^{•+}$ se mezclaron con 50 μ L de melanina

dializada (0.5 mg/mL), o de agua desionizada como el control, la mezcla se incubó en la oscuridad durante 10 min a 37 °C, y se midieron las absorbancias a 734 nm (Liu y col 2009b). Para la cuantificación de la actividad antioxidante se preparó una curva patrón de Trolox (200, 100, 50, 25 y 0 µg/mL) y los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto en base seca (µmol ET/ g b.s.).

2) Método FRAP

El ensayo de FRAP se ha utilizado para medir actividad antioxidante de productos fitoterapéuticos y nutracéuticos (Benzie y Szeto 1999). La reacción mide la reducción de 2,4,6-tripiridiltriazina férrica (TPTZ) que se manifiesta como el cambio de color amarillo opaco a azul rey y detecta compuestos con potenciales redox <0.7 V.

El reactivo FRAP se preparó mezclando 2.5 mL de TPTZ 10 mM (2,4,6-*tris*-(2-piridil)-s-triazina), 2.5 mL de FeCl₃•6H₂O 20 mM, y 25 mL de buffer de acetato de sodio (0.3 mM, pH 3.6). La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C. En la evaluación de la actividad antioxidante, se mezclaron 1800 µL de reactivo FRAP recién preparado, 180 µL de agua desionizada, y 10 µL de muestra (1 mg/mL); como blanco se utilizó agua desionizada. La mezcla se incubó (30 min/ 25 °C) y se midió la absorbancia a 595 nm. La cuantificación se realizó usando una curva de calibración Trolox (500, 400, 300, 200, 100, 50 y 25 µg/mL) y los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto en base seca (µmol TE / g b.s.) (Benzie-Iris y Strain 1996).

3) Método DPPH

El método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mide la capacidad de una sustancia de donar electrones o átomos de hidrógeno, que es asociado a la pérdida del color púrpura de la disolución del radical DPPH (Brand-Williams y col 1995).

La evaluación se realizó en microplaca de 96 pozos con fondo plano. Para el ensayo las nanopartículas se suspendieron en agua desionizada (5000 mg/mL) y a partir de ahí se realizaron diluciones para la muestra evaluada (5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500 y 250 mg /mL); se utilizó metanol y agua desionizada como blanco y se les añadió 180 μ L de DPPH (150 mM) a cada pozo. La mezcla se homogeneizó y se dejó en reposo por 30 min a 37 °C en oscuridad y posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a 530 nm (λ_{max}).

La lectura fue ajustada con 200 μ L de metanol, con el objetivo de corregir la absorbancia presentada por el color de la muestra, se tomó la lectura con 20 μ L de muestra y 180 μ L de metanol. Para la cuantificación de la actividad antioxidante se preparó una curva patrón de Trolox (100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ g/mL) y los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de nanopartícula en base seca (μ mol ET/ g b.s.).

b Actividad antibacteriana

1) Método antibacteriano por el método Kirby-Bauer

El efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata (1×10^{-3} M) y oro (1×10^{-4} M) se analizó por el método Kirby-Bauer (difusión en disco). Para esto, las cepas bacterianas fueron sembradas en medio TSA e incubadas hasta su fase logarítmica ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/ 18\text{-}20\text{ h}$), se preparó una suspensión del inóculo en disolución salina (0.85% p/v) ajustando su turbidez a 0.5 del estándar de McFarland (1×10^8 UFC/ mL; %A = 0.08 ± 0.1 a una longitud de onda de 625 nm), para la inoculación del agar se utilizó un hisopo estéril el cual se humedeció con la solución, se eliminó el exceso y se estrió en la caja con medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie del agar. Una vez que el inóculo secó (3-5 min) se colocaron los discos de 5 mm de papel filtro Whatman N° 1 (sigma-aldrich, EE. UU.) a los cuales se les añadió 5 μL de la disolución a evaluar. Después de 15 min de haber colocado los discos, se invirtió la caja Petri y se incubó ($35\text{ }^{\circ}\text{C}/ 16\text{-}18\text{ h}$); posteriormente la medición de los halos de inhibición se determinó visualmente, con ayuda de un vernier, ignorando colonias tenues o muy pequeñas que solo se veían con minuciosidad.

2) Actividad antibacteriana por el método microdilución en caldo

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo descrito por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI 2015). La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó como la concentración de extracto que es capaz de inhibir al 100% el crecimiento bacteriano. Para esto, las cepas bacterianas fueron sembradas en medio TSA e incubadas hasta su fase logarítmica ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/ 18\text{-}20\text{ h}$), se preparó una suspensión del inóculo en disolución salina (0.85% p/v) ajustando su turbidez a 0.5 del estándar de McFarland (1×10^8

UFC/ mL; %T = 62.7 ± 0.5 a una longitud de onda de 530 nm), se tomaron 0.1 mL de dicha suspensión y se agregó a 9.9 mL de caldo Muller Hinton para así obtener el inóculo a emplear (1×10^6 UFC/mL). Se utilizaron placas estériles tipo ELISA de 96 pozos, fondo plano con tapa, a las que se les añadió 50 μ L de inóculo (ocho cepas bacterianas), en las columnas 2 a 9. En las filas A a F se añadieron 50 μ L de los extractos o nanopartículas a evaluar (1 mg/mL en agua desionizada como disolvente + 50 μ L del medio sin inóculo); en la columna 1 se añadieron 50 μ L del solvente utilizado + 50 μ L del inóculo de cepas a probar; estos se emplearon como controles negativo y positivo, respectivamente. La placa se cerró con parafilm y se incubó (37 °C/ 18-20 h); posteriormente se determinó la MIC y MBC utilizando el indicador MTT: Se añadió 20 μ L de la disolución de MTT a cada pozo de la placa (5 mg /mL de PBS), dejando incubar por 30 min (37 °C) para posteriormente centrifugar (4400 g x 15 min), y eliminar el sobrenadante; las sales de tetrazolio formadas se disolvieron con DMSO (100 μ L/pozo), agitando por 2 min, y se midió la absorbancia a 530 nm (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE. UU.).

c Actividad antiparasitaria

1) Condiciones de cultivo *Hymenolepis nana*

Los adultos de *H. nana* se recuperaron de ratones infectados experimentalmente y se lavaron tres veces con una disolución de NaCl al 0.85% (p/v). En una placa de 24 pozos, los parásitos se colocaron (Corning Incorporated 14831. EE. UU.) en una mezcla de medio de Hank's con 0.2% (v/v) de antibiótico-antimicótico Gibco

(Penicilina G, Sulfato de estreptomicina y anfotericina B) y 0.5% (p/v) de peptona (Mangoni y col 2005).

2) Evaluación de la actividad antiparasitaria

La actividad antiparasitaria se evaluó en placa de 24 pozos (Corning Incorporated 14831. EE. UU.). En cada pozo se añadieron 0.5 mL de medio de Hank's, 5 adultos de *H. nana* viables, y los compuestos a evaluar a una concentración de 25 mg/ mL. Como control positivo, se evaluó Praziquantel (20 mg/ mL) por ser el fármaco de elección para el tratamiento contra este parásito. Para realizar la comparación de la actividad antiparasitaria, las nanopartículas se evaluaron en disolución, dejando al parásito en contacto directo con las mismas (20 mg/mL). La movilidad y daño se determinó haciendo observaciones detalladas con un estéreo microscopio modelo Sz40 (Olympus, Japón), a los 10, 30 y 60 min; luego a las 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 24 h.

3) Determinación de la viabilidad mediante la exclusión del colorante azul de Evans

A los parásitos que estaban inmóviles se les determinó la viabilidad mediante la exposición por 3 min con el colorante vital azul de Evans (4% p/v), los parásitos se lavaron tres veces con disolución salina estéril para eliminar el exceso de colorante completamente, y se observaron en el estéreo microscopio. La membrana plasmática de las células muertas es permeable al azul de Evans, lo que permite diferenciar células muertas de células vivas.

3 Síntesis de nanopartículas

a Nanopartículas de plata

1) Método químico

El método de reducción química para la síntesis de nanopartículas de plata se hizo a una relación 1/100 mL (v/v del agente metálico precursor y disolución de NaBH_4 , respectivamente). La disolución 1×10^{-2} M de nitrato de plata (AgNO_3) se mezcló con 100 mL de una disolución fría (0°C) de NaBH_4 (1×10^{-3} M) y se colocó en una placa con agitación para que la temperatura de la disolución se mantuviera homogénea. Posteriormente, 25 mL de la disolución de CTS (0.30 mM) se añadió gota a gota y se mantuvo por 60 min. La formación de nanopartículas de plata (AgNPs) se manifestó por un cambio de color de incoloro a amarillo brillante. Las AgNPs se pasaron por una membrana de fluoruro de polivinilideno (Gelman Acrodisc[®] Syringe Filters, PVDF) de $0.45 \mu\text{m}$ con ayuda de una jeringa de 10 mL. Una vez filtradas las nanopartículas, se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 7°C hasta su uso.

2) Método biológico

Diferentes condiciones de síntesis de nanopartículas de plata fueron evaluadas de acuerdo a la metodología descrita por Haytham (2015) con algunas modificaciones. Para la síntesis, el extracto del fruto se usó como agente reductor a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 6, 8, y 10 mg/mL) y la concentración del AgNO_3 (2×10^{-3} M) y temperatura (60°C) se mantuvieron constantes. En otra serie de

experimentos se probaron diferentes concentraciones de AgNO_3 (1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} , 4×10^{-3} , 5×10^{-3} , 6×10^{-3} , y 7×10^{-3} M), manteniendo fija la concentración del extracto (1 mg/ mL) y la temperatura de reacción (60 °C). Esta última prueba también se realizó con una temperatura constante de 30 °C y 80 °C. Todas las síntesis de nanopartículas se realizaron con agitación constante (150 rpm) en un baño maría, en ausencia de luz, y se mantuvo el pH a 6.7. La síntesis de nanopartículas fue evaluada a diferentes tiempos (20, 40, 60, 120 y 240 min; y 10, 15, y 24 h). El agente reductor (melaninas solubles parcialmente purificadas por el método de diálisis) se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción para evitar que el extracto formara aglomerados en la disolución o en las nanopartículas.

b Nanopartículas de oro

1) Método químico

El material utilizado para la síntesis de nanopartículas se lavó con agua regia (3:1:2 v/v/v de ácido clorhídrico, ácido nítrico y agua, respectivamente) para eliminar sales e impurezas que pudieran interferir en la reacción. La disolución 1×10^{-4} M de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se preparó en 50 mL de agua desionizada; así como 5 mL de citrato tribásico de sodio (CTS) 0.039 M en agua desionizada. La disolución de HAuCl_4 (50 mL) se colocó en una placa de calentamiento con agitación constante hasta alcanzar una temperatura estable de 90 °C, posteriormente se añadió gota a gota 0.5 mL de la disolución de CTS, y se mantuvo por 30 min. La formación de nanopartículas de oro (AuNPs) se manifestó por un cambio de color de amarillo a rojo brillante. Las AuNPs se pasaron por una membrana de fluoruro de

polivinilideno (Gelman Acrodisc® Syringe Filters, PVDF) de 0.45 µm con ayuda de una jeringa de 10 mL. Una vez filtradas las nanopartículas, se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 7 °C hasta su uso.

2) Método biológico

En la síntesis de nanopartículas de oro se evaluaron diferentes condiciones de reacción, de acuerdo a la metodología descrita por (Kuppusamy y col 2015) con algunas modificaciones. En la primera serie de experimentos, el extracto del fruto se usó como agente reductor a diferentes concentraciones (0.5, 1, 5, 10, 15 y 20 mg/mL), y la concentración de H_{AuCl}₄ (1×10^{-3} M) y temperatura (30 °C) se mantuvieron constantes. En otra serie de experimentos se probaron diferentes concentraciones de H_{AuCl}₄ (1×10^{-3} , 2×10^{-3} , 3×10^{-3} y 4×10^{-3}), manteniendo fija la concentración del extracto (5 mg/ mL) y la temperatura de reacción (30 °C). De los experimentos anteriores se seleccionó la concentración de extracto (5 mg/ mL) y de H_{AuCl}₄ (1×10^{-3} M) para variar la temperatura de reacción (30, 50, y 80 °C). Todas las síntesis de nanopartículas se realizaron con agitación constante (200 rpm) en un baño maría, en ausencia de luz, y se mantuvo el pH a 6.7. La formación de nanopartículas se midió a diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 h). El agente reductor (melaninas solubles parcialmente purificadas por el método de diálisis) se adicionó gota a gota a la mezcla de reacción para evitar que el extracto formara aglomerados en la disolución o en las nanopartículas.

4 Preparación de la disolución de nanopartículas biológicas de plata y oro para su caracterización

Las nanopartículas metálicas (AuNPs y AgNPs) obtenidas por el método biológico se pasaron a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0.45 μm (Gelman Acrodisc[®] Syringe Filters, PVDF), con ayuda de una jeringa de 10 mL, para eliminar impurezas. El filtrado se liofilizó para obtener las nanopartículas que se almacenaron en refrigeración (7 °C) para su posterior uso. La cantidad de nanopartículas obtenidas se cuantificó para determinar los rendimientos.

5 Caracterización de melaninas solubles purificadas por diálisis y nanopartículas metálicas

a Espectrofotometría ultravioleta visible

Las melaninas parcialmente purificadas por diálisis se re-suspendieron en agua desionizada hasta alcanzar una mezcla homogénea (0.5 mg/mL) y se analizaron por espectroscopía UV-Vis, realizando un barrido entre los 200–800 nm, en un equipo NanoDrop 2000 Uv-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

El análisis UV-Vis de las nanopartículas metálicas implicó un barrido entre los 200–800 nm para identificar la banda del plasmón superficial (400-500 nm), característica de las nanopartículas de plata; para las nanopartículas de oro, la banda aparece entre los 500-550 nm.

b Espectroscopía Infrarrojo

El análisis de espectroscopía infrarroja (IR) se realizó en un espectrofotómetro Cary 600 FT/ATR (Agilent Technologies, Alemania). A la melanina parcialmente purificada dializada y liofilizada (1 mg) se le realizó un barrido de 400-1500 cm^{-1} .

c Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño de las nanopartículas se midió por la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por las siglas en inglés "Dynamic Light Scattering") en un equipo Zetasizer instrument (Malvern Co., U.K. Zetasizer software v7.10). Las mediciones por triplicado se realizaron a 25 °C, usando agua como solvente. El ángulo de dispersión utilizado para la medición fue de 90°, 585 nm. Estos análisis se realizaron bajo la supervisión del Dr. Edgar A. Reynoso Soto en el Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana, Baja California, México.

d Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La forma y tamaño de las nanopartículas se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un equipo de TEM Hitachi 7700, que opera con un voltaje de 40-120 KV y permite el análisis de imágenes de alto contraste (200x - 200 000x) y alta resolución (4.000x - 600.000x). Las muestras para poder ser analizadas deben tener un espesor menor de 100 nm. Las muestras se analizaron bajo la supervisión de la Dra. Velia Carolina Osuna Galindo y el Dr. Alejandro Vega Ríos en el Laboratorio de Polímeros en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados

en Chihuahua, Chihuahua, México.

6 Evaluación de toxicidad

e Ensayo de toxicidad *in vitro* con *Artemia salina* (CL₅₀) de melaninas extraídas de los tres frutos y nanopartículas de oro y plata

El ensayo de toxicidad de *Artemia salina* se basó en el procedimiento reportado en la literatura (Meyer y col 1982; Solis y col 1993; Silva y col 2006), con algunas modificaciones. Para obtener los nauplios del crustáceo, huevos de *A. salina* (200 mg/ 500 mL) se colocaron en un vaso de precipitado de 1 L con medio de mar artificial (MMA), preparado con sal comercial y agua destilada (38 g/ L), con suministro continuo de aire mediante una bomba de oxígeno, e iluminación continua con luz blanca artificial (127 V de potencia, Osram™, México). Las larvas se mantuvieron a 25-30 °C/ 24 h, posteriormente los nauplios fototrópicos fueron colectados en MMA nuevo y se mantuvieron a 25-30 °C/ 24 h para asegurar que las larvas utilizadas en el ensayo tuvieran 48 h de vida.

La melanina se disolvió en MMA (4, 2, 0.2, y 0.02 mg/mL). En tubos de ensayo se colocaron 10 nauplios de *A. salina*, 200 µL de la muestra, y finalmente el volumen se llevó a 2 mL, para tener una concentración final de la muestra de 2000, 1000, 100, y 10 µg/mL, respectivamente. Para realizar una comparación de toxicidad con las nanopartículas de plata y oro, la evaluación se realizó en disolución a una relación 1:1 v/v, en donde se evaluaron las nanopartículas químicas (Ag-Au), biológicas y los precursores metálicos (AgNO₃ y HAuCl₄) por separado. Las AgNPs y AuNPs

sintetizadas por el método biológico se liofilizaron y evaluaron por triplicado (1000, 100, y 10 mg/ mL). El control negativo correspondió al MMA sin melaninas ni nanopartículas. Las larvas de los diferentes tratamientos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente (25 – 30 °C) bajo luz continua. Después de este tiempo, se contó el número de larvas vivas en cada tubo. Los porcentajes de muerte de cada dosis y de los controles fueron determinados por la corrección en la fórmula de Abbott (Abbott 1987):

$$\%M = (r / s') 100$$

Donde: % **M** es el porcentaje de mortalidad, **r** las larvas muertas en el extracto, y **s'** las larvas vivas en el blanco.

La dosis letal media (DL₅₀) se determinó graficando la concentración del extracto evaluado contra el porcentaje de letalidad del conteo de 24 h. La información se analizó utilizando el análisis Probit (Finney 1971).

La escala de toxicidad en *Artemia salina* fue registrada como: elevada (0.1-100 µg/mL), moderada (100 – 300 µg/mL), baja (300-640 µg/mL), mínima (>640 µg/mL) (Sanabria-Galindo y col 1997) y no tóxica si es >2000 µg/ mL (Meyer y col 1982).

7 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus versión 5.1 (Statistical Graphics CorporationTM, EE. UU.) para analizar los datos por estadística descriptiva y análisis de varianza de un factor (*e.i.*, tipo de nanopartículas) con cuatro niveles (*i.e.*,

Ag MePP-ayale, Ag MePP-uvalama, Ag MePP-papache y Au MePP-uvalama). El contraste de medias se realizó mediante la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 0.05. Los datos de toxicidad en *A. salina* se procesaron por análisis Probit. Las evaluaciones se realizaron por triplicado de manera independiente.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN PARA MELANINAS PARCIALMENTE PURIFICADAS

La ultrafiltración del extracto acuoso de los tres frutos generó mayor rendimiento de melaninas solubles parcialmente purificadas (36.85-46.33%) que la diálisis (4.23-7.25%); por ultrafiltración, el rendimiento mayor fue con el fruto de papache y por el método de diálisis el mayor rendimiento fue para uvalama (**Cuadro 6**).

Los rendimientos más altos de extracción por ultrafiltración se relacionan con mayor retención de muestra en la membrana, pudiendo deberse a que los sólidos precipitados al centrifugar taponan la membrana; otra posibilidad es que el poro de la membrana es más pequeño (10 KDa) que en la diálisis (12 KDa), aunado a que el área de contacto de la muestra con la membrana es menor en la ultrafiltración.

Los rendimientos de extracción de las melaninas dializadas de ayale y uvalama, se encuentran por debajo de los reportados por Cuevas-Juárez y col (2014), pero para papache fueron iguales. Lo anterior puede ser atribuido a que la recolección de frutos fue en lugares, tiempos y condiciones diferentes, lo que modifica directamente su composición (Greenfield y Southgate 2003). Al comparar los rendimientos de melaninas de otros materiales, los obtenidos en esta investigación fueron mayores que los reportados para té negro (1.35%) (Sava 2001), frutas y semillas de *Nyctanthes arbor-tristis* (0.05%) (Ganjewala y Kannan 2009), del hongo *Cladosporium cladosporioides* (4.6%), y bayas de *Cinnamomum burmannii* y *Osmanthus fragrans* (0.34%) (Huang y col 2011) obtenidas por extracción alcalina e hidrólisis ácida.

Cuadro 6. Rendimientos de extracción de melaninas solubles obtenidas a temperatura de ebullición a partir de frutos nativos de Sinaloa y parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración

Melaninas solubles de	Rendimiento (%)	
	Diálisis	Ultrafiltración
Ayale	4.23 ± 0.33 ^{B,c}	36.85 ± 1.40 ^{A,c}
Uvalama	7.25 ± 0.10 ^{B,a}	41.74 ± 2.75 ^{A,b}
Papache	5.19 ± 0.15 ^{B,b}	46.33 ± 1.78 ^{A,a}

Se presenta la media de tres ensayos independientes, por triplicado, con su desviación estándar.

^{A,B}Letras mayúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas. P = 0.000 (LSD diálisis y ultrafiltración = 3.30).

^{abc}Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. P = 0.0002 (LSD frutos diálisis = 0.79). P = 0.003 (LSD frutos ultrafiltración = 4.09).

Los resultados de esta investigación sugieren que las melaninas pueden encontrarse en plantas en formas solubles en agua, probablemente a la formación de complejos con proteínas o polisacáridos; en nuestro caso, al tratarse de frutos que contienen altas cantidades de hidratos de carbono, esto podría contribuir a los altos rendimientos de extracción de las melaninas solubles parcialmente purificadas MePP en comparación con los rendimientos de extracción de melaninas de otras fuentes (Goncalves y col 2012; Kejzar y col 2013; Cuevas-Juárez y col 2014).

Además del mayor rendimiento obtenido en el presente trabajo, también se tiene la ventaja de que las MePP se obtuvieron por extracción acuosa; este método es más fácil, barato, y amigable con el medio ambiente que la obtención de melaninas por el método tradicional (Cuevas-Juárez y col 2014).

D ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las melaninas solubles purificadas por diálisis presentaron mayor actividad antioxidante (AA) que las obtenidas por ultrafiltración, los valores fueron de 1.3 a 4.4 veces mayores por ABTS y de 2.7 a 4 por FRAP (**Cuadro 7**). La mayor actividad se registró para la melanina soluble de uvalama purificada por diálisis (ABTS 1692.1 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$; FRAP 1593.9 $\mu\text{mol ET/g b.s.}$).

Los resultados confirman la alta actividad antioxidante esperada de las melaninas debido a que entre sus principales características se encuentran la protección contra la radiación UV y su capacidad de atrapar radicales libres y neutralizar agentes oxidantes ocasionados por el estrés del medio ambiente . La mayor AA de uvalama

Cuadro 7. Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/ g b.s.}$) de melaninas solubles obtenidas a temperatura de ebullición de frutos nativos de Sinaloa y parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración¹

Melaninas solubles de	Diálisis		Ultrafiltración	
	ABTS ⁴	FRAP ⁵	ABTS ⁶	FRAP ⁷
Ayale ¹	314.0 \pm 17.22 ^{A,c}	342.0 \pm 18.23 ^{X,b}	149.48 \pm 17.34 ^{B,b}	84.87 \pm 5.57 ^{Y,b}
Uvalama ²	1692.1 \pm 8.31 ^{A,a}	1593.9 \pm 52.28 ^{X,a}	1,331.0 \pm 236.6 ^{A,a}	590.26 \pm 25.46 ^{Y,a}
Papache ³	725.0 \pm 14.40 ^{A,b}	359.9 \pm 9.45 ^{X,b}	163.74 \pm 2.18 ^{B,b}	98.57 \pm 1.46 ^{Y,b}

¹ ultrafiltración: 3220 g/30 min

Los datos son la media de tres ensayos independientes con su desviación estándar y son calculados como $\mu\text{moles equivalentes de Trolox/gramo en base seca}$ ($\mu\text{mol ET/ g b.s.}$).

^{AB,XY} Letras mayúsculas diferentes en la misma fila en el mismo método de actividad antioxidante indican diferencias significativas. P = 0.0003 (¹LSD ABTS = 39.2) P = 0.0009 (²LSD ABTS = 113.56), P = 0.000 (³LSD ABTS = 23.34) P = 0.0001 (¹LSD FRAP = 29.43) P = 0.000 (²LSD FRAP = 93.22), P = 0.000 (³LSD FRAP = 15.33)

Letras minúsculas diferentes en un mismo método (columna), indican diferencia significativa, (P = 0.000 ⁴LSD = 83.62), (P = 0.000 ⁵LSD = 64.80), (P = 0.000 ⁶LSD = 27.60) (P = 0.0003 ⁷LSD = 29.5).

podría estar asociada a que la parte comestible de este fruto está más expuesta a la radiación y cambios solares, lo que implica un mayor estrés abiótico que el que puede generarse en las pulpas de ayale y papache, ambas protegidas por una cáscara opaca y dura (Hung y col 2004; Huang y col 2011; Goncalves y col 2012; Cuevas-Juárez y col 2014).

En el ensayo ABTS, los valores de la AA de MePPD-TE fueron 314.0, 1692.1, y 725.9 $\mu\text{mol ET/g}$ para ayale, uvalama, y papache, respectivamente. Estos resultados coincidieron con los reportados por Cuevas-Juárez y col (2014) para los frutos ayale (413.78 $\mu\text{mol ET/g}$) y papache (719.51 $\mu\text{mol ET/g}$), sin embargo la AA para uvalama fue de 1,087.17 $\mu\text{mol ET/g}$ siendo menor al reportado por Cuevas-Juárez y col (2014) para este mismo fruto. Lo anterior se puede atribuir a que los frutos fueron recolectados en tiempos, lugares y condiciones diferentes.

En el ensayo ABTS, los valores de AA de melaninas solubles de las MePPD-TE de uvalama fueron superiores a los registrados para melanoidinas (otro pigmento soluble en agua) de granos de café tostado (480- 730 $\mu\text{mol ET /g}$) (Liu y Kitts 2011), pero similares a los obtenidos para las MePPD-TE de papache. En contraste con el método FRAP, en el método de ABTS se obtuvieron los valores más bajos de AA para las MePPD-TE de uvalama y papache, lo que podría asociarse con diferencias en la composición de la muestra y en los mecanismos en que se basan los ensayos. El método FRAP se basa en transferencia de electrones, detecta la reducción de compuestos férricos con potenciales menores a 0.7 V y no es sensible a los antioxidantes que actúan por reacción de transferencia de protones. Por otro lado el

método ABTS registra la AA mediada por transferencia de protones y electrones en compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica (Opitz y col 2014).

E CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

1 Análisis UV-visible de melaninas solubles parcialmente purificadas por diálisis y ultrafiltración

Los espectros UV-vis de las melaninas solubles obtenidas por diálisis fueron diferentes a los de las purificadas por ultrafiltración. Las muestras dializadas del fruto de uvalama presentaron el máximo de absorción (λ_{max}) entre 250 y 280 nm y absorbancias de 0.208 a 1.0; mientras que para las obtenidas por ultrafiltración, la absorbancia es mínima en la región UV (< 0.1 U.A.), observándose un pequeño hombro que puede deberse a la presencia de MS, sin embargo su intensidad y baja definición vuelve difícil su análisis e interpretación (**Figura 8**). Un comportamiento similar se registró para las melaninas solubles purificadas por diálisis de los otros frutos pero con menores valores de absorbancia (**Figura 9**). De acuerdo a los resultados de rendimiento de extracción, actividad antioxidante, y espectroscopía UV-vis, todos los análisis posteriores se realizaron con melaninas solubles purificadas por diálisis (**Figura 8**).

Los resultados muestran que no se obtuvieron melaninas solubles por ultrafiltración, pero si por diálisis. Aparentemente la ultrafiltración no elimina gran parte de las moléculas asociadas a las melaninas, lo que corresponde al mayor porcentaje de extracción (36.85 -46.33%), su menor AA y a la ausencia de la banda de absorción característica en el UV-vis.

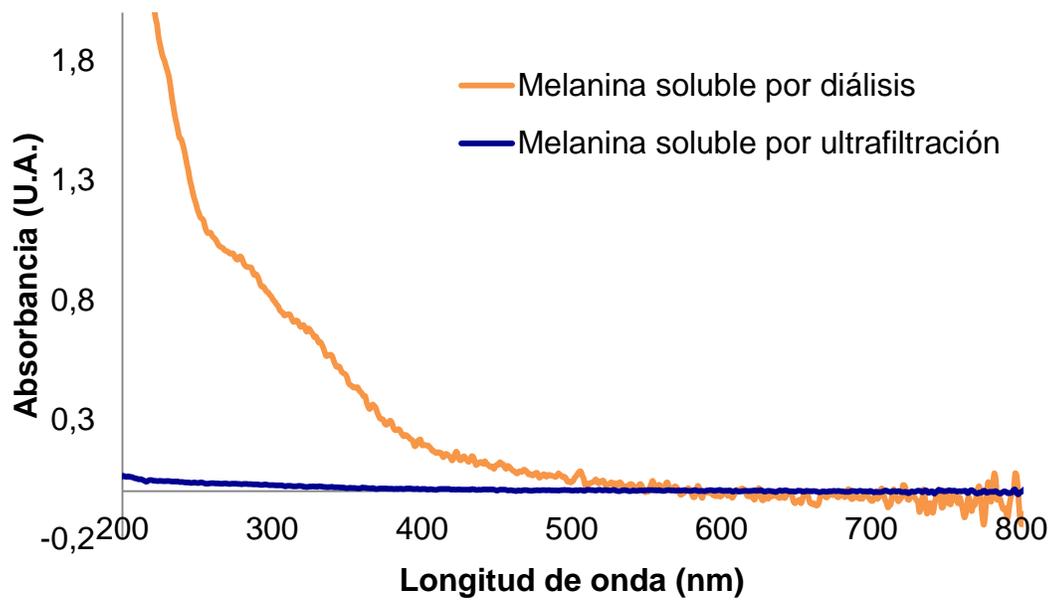


Figura 8. Espectros ultravioleta-visible de las melaninas solubles de uvalama purificadas por diálisis y ultrafiltración (250 $\mu\text{g/mL}$).

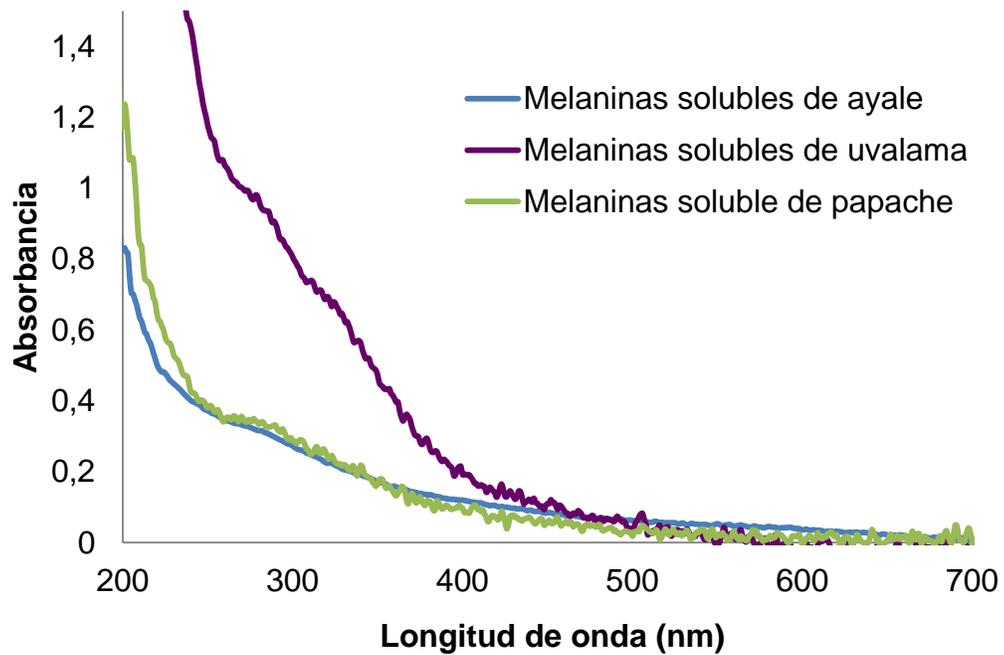


Figura 9. Espectro ultravioleta-visible de las melaninas solubles de ayale, uvalama y papache purificadas por diálisis (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los valores obtenidos de λ_{\max} en el presente trabajo para las melaninas solubles (MePPD-TE) concuerdan con los de otras para melaninas (λ_{\max} 200-300 nm), como los registrados para las melaninas de la bacteria *Actinolloteichus* sp. MA-32 (Manivasagan y col 2013), del hongo *Auricularia auricula* (Zhang y col 2015; Sun y col 2016), de la semilla y fruto *Nyctanthes arbor-tristis* (Ganjewala y Kannan 2009), y de las hojas de té negro (Hung y col 2004).

Las melaninas se caracterizan por una fuerte absorción en la región UV que disminuye progresivamente hacia la región del visible (400-800 nm). Este resultado es típico del perfil de absorción de compuestos aromáticos, como lo son las melaninas; en consecuencia su absorbancia a longitudes de onda entre 400–800 nm da un gradiente negativo, debido a la presencia de múltiples complejos unidos a las estructuras de las melaninas con baja o nula absorción en la región visible (Seniuk 2010; Aghajanyan y col 2011). La intensidad de absorbancia que se presentó entre longitudes de onda de 400 a 800 nm fue de 0.015, 0.166 y 0.100 nm para ayale, uvalama y papache, respectivamente. Estas disminuciones de absorbancia se usan a menudo para identificar melaninas. Como se ha sugerido, la solubilidad de las melaninas (MePP) podría asociarse a la formación de complejos melanina-hidratos de carbono. Apoyando esta teoría, el espectro de absorción UV-visible de las melaninas evaluadas de los tres frutos, sugieren que las proteínas no son parte de esos complejos, debido a que carecían de un pico de absorción bien definido para los aminoácidos aromáticos (270-280 nm), que debería ser evidente cuando se presentan los espectros de melaninas parcialmente purificadas de ayale, uvalama y papache, sin embargo esta información no es suficiente para descartar en su

totalidad la interacción melaninas-proteínas. Por ello los análisis químicos espectrofotométricos mostrados indican que los frutos contienen melaninas, que sus propiedades son muy similares a las extraídas de otras fuentes y que se encuentran formando complejos con hidratos de carbono (Sava 2001; Goncalves y col 2012; Manivasagan y col 2013; Sun y col 2016).

2 Análisis espectrofotométrico por infrarrojo

El espectro infrarrojo (IR) mostró bandas características de melaninas y se llevó a cabo para identificar los grupos funcionales de las biomoléculas presentes en las MePPD-TE que pudieran ser responsables de la reducción de los iones plata y oro para la síntesis de nanopartículas evaluadas en este trabajo.

Las principales señales del IR de las melaninas de ayale (**Figura 10A**) y los grupos funcionales asociados fueron: 3348 cm^{-1} (O-H), 2931 cm^{-1} (C-H de grupos alifáticos), 1736 cm^{-1} (C=O de grupos carbonilos), 1606 cm^{-1} (C=C de anillos aromáticos), 1420 cm^{-1} (C-O-H de ácidos carboxílicos), 1229 cm^{-1} (C-O de ácido carboxílico), y dos señales a 1096 y 1015 cm^{-1} (C-O de polisacáridos). El espectro IR de la melanina soluble de uvalama (**Figura 10B**) mostró una banda ancha a 3347 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace O-H; a 2918 cm^{-1} debido al enlace C-H de grupos alifáticos; a 1690 cm^{-1} asociada al doble enlace C=O; a 1604 cm^{-1} por el doble enlace C=C de anillos aromáticos; en 1436 cm^{-1} asociado a la flexión C-OH de ácido carboxílico; a 1267 cm^{-1} debido al enlace de ácido carboxílico; y señales a 1073 , 1019 , y 623 cm^{-1} atribuidas al enlace C-O de polisacáridos. Por otra parte, el IR de la melanina soluble de papache (**Figura 10C**) presentó bandas en las regiones de 3289 cm^{-1} (O-H), a 2927 cm^{-1} (C-H de grupos alifáticos), a 1644 - 1531 cm^{-1} (C=C

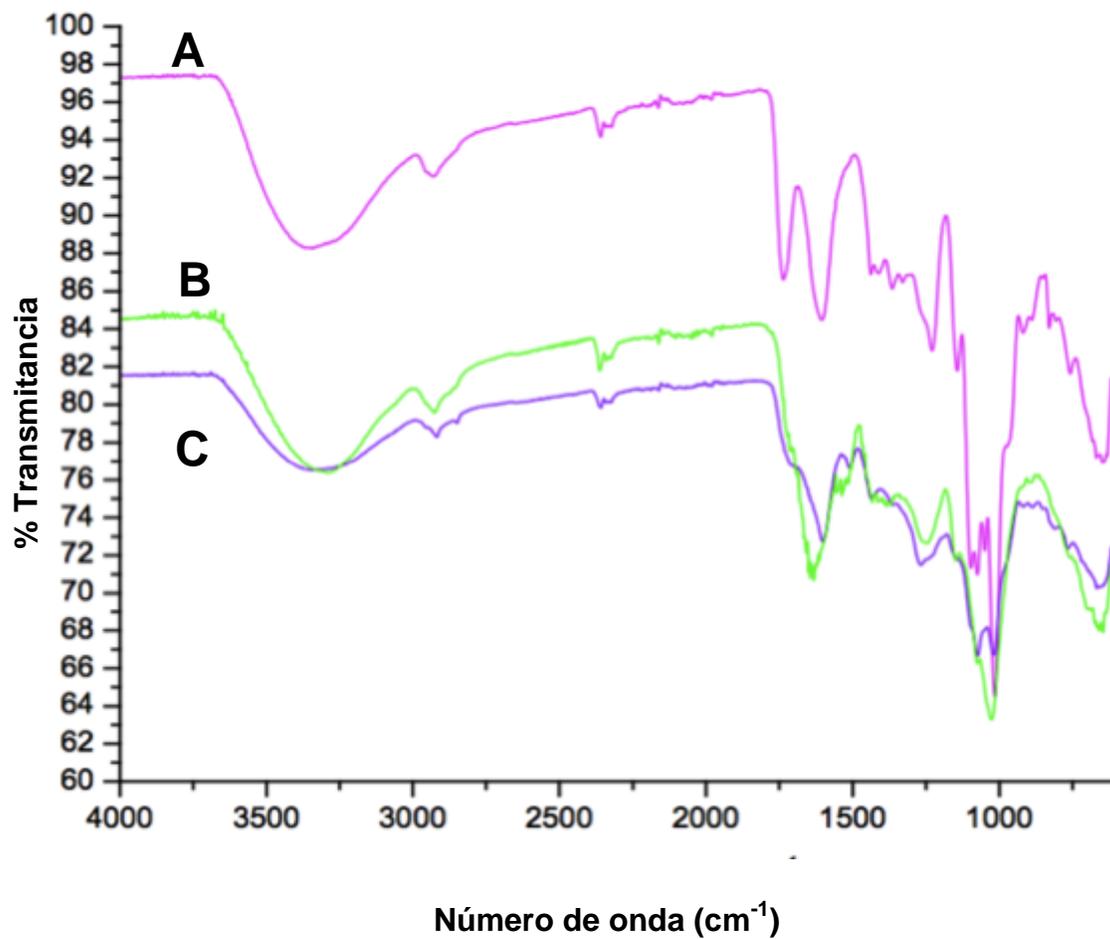


Figura 10. Espectro infrarrojo de melaninas solubles obtenidas a temperatura de ebullición y parcialmente purificadas por diálisis de **(A)** ayale, **(B)** uvalama y **(C)** papache.

de anillos aromáticos), a 1434 cm^{-1} (C-OH de ácido carboxílico), a 1249 cm^{-1} (C-O de ácido carboxílico) y a 1026 cm^{-1} (C-O de polisacáridos).

Los espectros IR de los tres frutos presentaron diferencias entre sí. Relacionado con el contenido de humedad, las melaninas de papache presentaron una banda con mayor amplitud a 3300 cm^{-1} con respecto a los otros dos frutos. Uvalama y ayale presentaron una banda de absorción entre $1700\text{-}1736\text{ cm}^{-1}$ asociada a grupos carbonilo, la cual no se presentó en papache, sin embargo no se puede afirmar su ausencia ya que puede estar encubierta por el pico 1644 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo que pudiera corresponder al -COOH. Las bandas que corresponden al enlace de los polisacáridos se presentaron en los tres frutos, con algunas diferencias (**Figura 10**).

Los resultados obtenidos indican que la estructura de la melanina presenta anillos aromáticos y grupos carboxílicos, así como grupos que pudieran asociarse a la presencia de hidratos de carbono y contribuir con la solubilidad de las melaninas (Sava y col 2003; Sun y col 2016).

Los frutos estudiados presentaron bandas muy similares a las de los espectros de las melaninas solubles de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Aghajanyan y col 2011), de la cáscara de nuez *Castanea mollissima* (Yao y col 2012), de la bacteria *Actinoalloteichus* sp. MA-32 (Manivasagan y col 2013), y de los hongos *Aspergillus medulas* (Goncalves y col 2012) y *Auricularia auricula* (Zhang y col 2015). Sin embargo algo que aun no esta elucidado en el presente trabajo, es la atribución que se le da a la señal de $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ya que puede estar asociadas a vibraciones de

extensión de grupos -OH debido a la alta higroscopicidad de estos pigmentos o a la presencia de enlaces de grupos $-NH_2$ con las melaninas.

F SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

1 Estandarización de condiciones para la síntesis de nanopartículas de plata

a Efecto de la concentración de melaninas solubles parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición

La formación de nanopartículas se manifestó por un cambio de color en la disolución, de café oscuro a tonalidades amarillas (**Figura 11**), debido al fenómeno de resonancia del plasmón superficial, propiedad de las nanopartículas metálicas asociada a la excitación de los electrones libres de su superficie cuando son irradiadas con un haz de luz. Esta observación pone en evidencia que las melaninas solubles (MePP) reducen los iones de plata e inducen la formación de nanopartículas (Baghizadeh y col 2015; Pattanayak y col 2015; Ahmed y col 2016b; Dong y col 2016; Khalilzadeh y Borzoo 2016; Nayak y col 2016; Pethakamsetty y col 2016; Ravichandran y col 2016). A 1 mg/mL de MePP se observó claramente la banda de plasmón superficial a 411 nm (0.615 U.A.), característica de las nanopartículas de plata (400-450 nm) (Pattanayak y col 2015); entre 2 y 6 mg/mL, la banda de absorción fue más intensa (1.058 – 1.65 U.A.); mientras que a 8 y 10 mg/mL, la absorción disminuyó. Basados en esta información, la concentración de melaninas solubles seleccionada para la síntesis de nanopartículas fue 1 mg/mL (**Figura 12A**).



Figura 11. Síntesis de nanopartículas de plata usando diferentes concentraciones de melaninas dializadas de uvalama (0.5-10 mg/mL). Se muestra un cambio de color de café a amarillo brillante debido a la reducción del AgNO_3 a AgNPs después de 15 h de incubación.

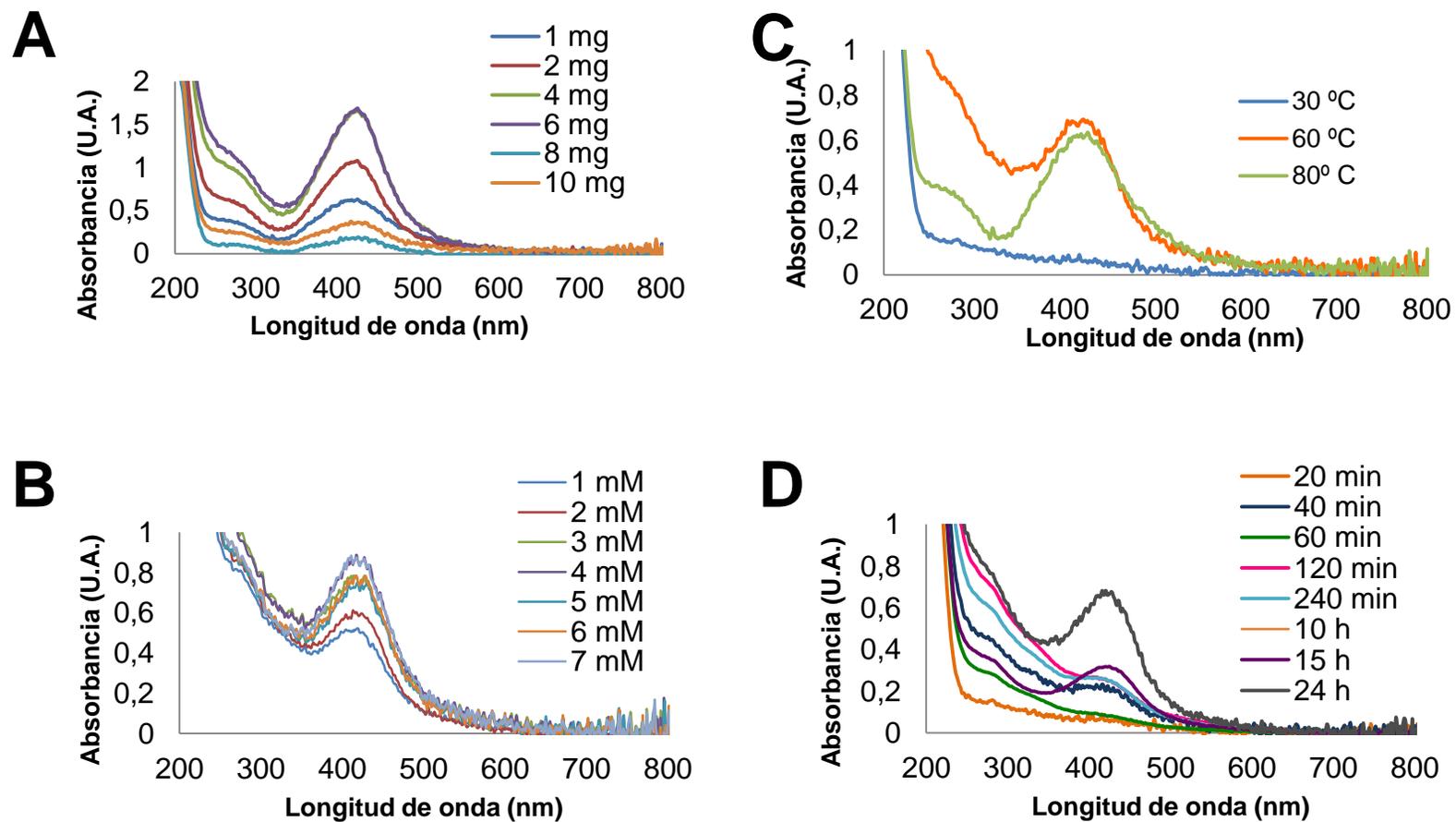


Figura 12. Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de plata, donde se presenta la banda característica del plasmón superficial a **(A)** diferentes concentraciones del extracto de melaninas, **(B)** diferentes concentraciones del AgNO₃, **(C)** diferentes temperaturas de reacción, y **(D)** diferente tiempo de incubación.

Los resultados de esta investigación coinciden con los de Sana Siva y col (2015), quienes observaron que al incrementar la concentración de extracto de hoja de *Grewia flaviscenes* (10 a 30%) la banda de plasmón superficial se desplazó ligeramente hacia longitudes de onda mayores y fue de menor intensidad.

Los resultados publicados a la fecha sobre el efecto de la concentración de los extractos de plantas en la formación de nanopartículas son contradictorios. Diversos estudios sugieren que cuando se incrementa la concentración del material biológico que media la síntesis de nanopartículas, hay mayores contenidos de las biomoléculas implicadas en el proceso reductor de metal, resultando en un color más intenso en la disolución y una banda de plasmón superficial de mayor intensidad y mejor definida; dicho efecto se observó cuando se usó extracto de corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (Daniel y col 2011) y hojas de *Cinnamomum camphora* (Huang y col 2007). Por otro lado, otras investigaciones muestran que al incrementar la concentración del extracto disminuye la absorción máxima de la banda en el espectro UV-vis, esto lo han explicado señalando que altas concentraciones de extracto favorecen la agregación de nanopartículas en la disolución; se argumenta que a altas concentraciones de extracto, el AgNO_3 se vuelve limitante y el exceso de extracto puede unirse a las NPs formadas en el medio o bien precipitarse (Sana Siva y col 2015).

La bioreducción de iones plata por extractos de plantas es amigable con el medio ambiente. Sin embargo, el fenómeno químico de la síntesis es complejo ya que involucra a una gran variedad de compuestos presentes en los extractos (e.g., proteínas, aminoácidos, polisacáridos y compuestos fenólicos) que participan en la

reducción y captación de radicales libres durante la síntesis de nanopartículas (Kummara Swamy y col 2014; Rajan y col 2015).

b Efecto de la concentración del nitrato de plata (AgNO_3)

El análisis del efecto de la concentración de AgNO_3 (1-7 mM) en la formación de nanopartículas de plata (AgNPs) mostró que a partir de 3 mM la banda de plasmón superficial es más definida e intensa (420 nm, 0.744 U.A.) y se decidió usar esta concentración (**Figura 12B**).

Diversos estudios sugieren que las bandas del UV-vis de las AgNPs se modifican a medida que aumenta la concentración de AgNO_3 . De manera general se ha establecido que la concentración de AgNO_3 es un factor importante en la determinación de la distribución de tamaños de las AgNPs. Al usar concentraciones bajas de AgNO_3 , la banda vis entre 400-450 nm es estrecha, lo que corrobora la síntesis de AgNPs de tamaño menor y más uniforme (Sana Siva y col 2015; Kummara y col 2016; Ren y col 2016).

c Efecto de las diferentes temperaturas de reacción

La formación de AgNPs fue similar a 60 y 80 °C, con λ_{max} a 411 y absorbancias de 0.615 y 0.678 U.A., respectivamente. La temperatura seleccionada para la síntesis de AgNPs fue 60 °C (**Figura 12C**).

La temperatura afectó el proceso de reducción de la plata, observándose que su aumento produjo bandas de absorción más estrechas y agudas en contraste con la

temperatura más baja (30 °C), indicando la formación de nanopartículas de menor tamaño. Es un hecho bien conocido que cuando la temperatura se incrementa, los reactivos se consumen rápidamente dando lugar a la formación de nanopartículas de tamaño pequeño (Dubey y col 2010; Haytham 2015). Nuestros resultados coinciden con los reportados por Baghizadeh y col (2015), en donde la tasa de formación de nanopartículas de plata también aumentó al incrementar la temperatura.

d Efecto de los tiempos de incubación

Al analizar los tiempos de incubación (20 min-24 h), la síntesis de AgNPs mostró la banda característica de plasmón superficial a partir de los 60 min; sin embargo, hasta las 15 horas se registró una banda intensa y bien definida a λ_{max} 416 nm (0.413 U.A.), dicha banda aumentó a las 24 horas (0.659 U.A.). Con base en lo anterior, el tiempo de incubación seleccionado fue de 15 h (**Figura 12D**).

La intensidad del color amarillo fue directamente proporcional al tiempo de incubación de la reacción, indicando que las MePP están reduciendo a los iones plata, fenómeno que concuerda con lo registrado previamente (Bhainsa y D'souza 2006). Es importante mencionar que tiempos de incubación largos favorecen la formación de nanopartículas de mayor tamaño o a su aglomeración, además de requerir una mayor inversión de energía y tiempo por lo que es conveniente evitarlos (Yuan y col 2017).

Diversas fuentes dan a conocer que el tiempo requerido para la reducción completa de los iones metálicos durante la biosíntesis de nanopartículas metálicas

usando bacterias y hongos oscila entre 24 y 124 h (Korbekandi y col 2009). Tiempos mucho mayores que los requeridos en nuestra investigación, lo que corrobora que las melaninas solubles extraídas de los frutos silvestres de Sinaloa tienen un excelente potencial reductor que permite la rápida formación de nanopartículas.

2 Síntesis de nanopartículas de plata en las condiciones de reacción seleccionadas

Al lograr llevar a cabo la síntesis de AgNPs con melaninas solubles, nuestra investigación demuestra una aplicación importante de componentes de estos frutos y una alternativa para su uso en condiciones de sustentabilidad. Las NPs formadas con esta estrategia podrán ser aplicadas en diferentes áreas y es evidente que las melaninas solubles usadas para su síntesis contribuirán a su funcionalidad.

Las condiciones de reacción para la formación de AgNPs por el método biológico fueron de 1 mg/mL de melaninas como reductor biológico, 3 mM AgNO₃, 60 °C, y 15 horas de incubación. Los espectros UV-vis de las AgNPs obtenidos con las melaninas solubles de diferentes frutos mostraron claras diferencias. Las AgNPs obtenidas con la melaninas de uvalama indujeron una banda de plasmón superficial más definida e intensa (435 nm, 0.863 U.A.) que la obtenida con las melaninas de ayale (416 nm, 0.391 U.A.) y papache (412 nm, 0.622 U.A.). En contraste, las AgNPs sintetizadas por el método químico usando NaBH₄ como reductor presentaron una banda de plasmón superficial (397 nm, 0.079 U.A.) de menor intensidad que las obtenidas por el método biológico (**Figura 13**).

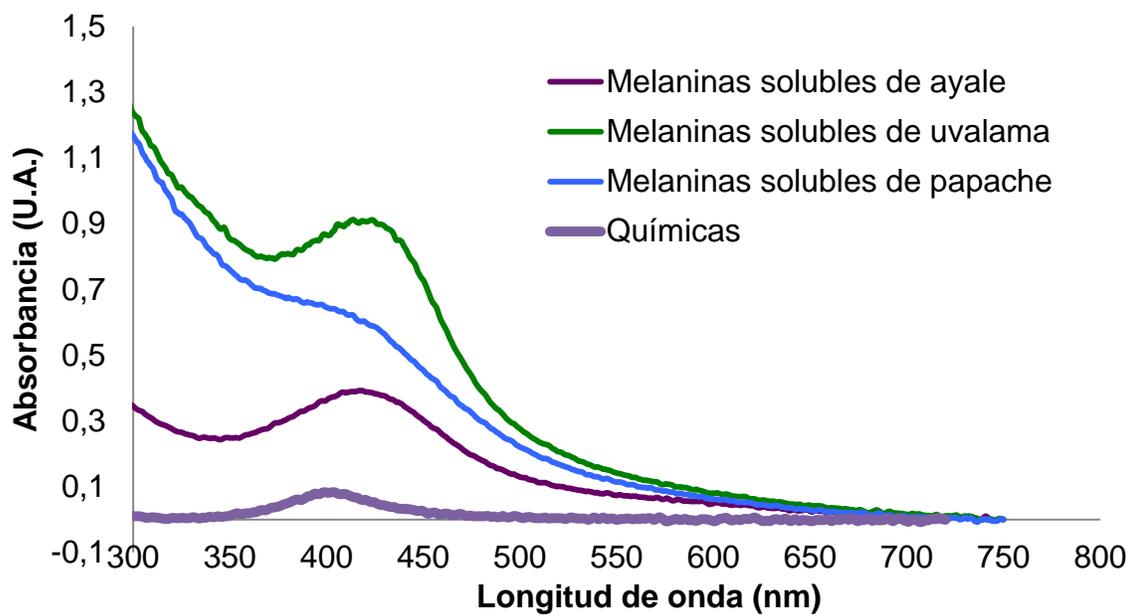


Figura 13. Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de plata sintetizadas empleando 1 mg/mL de melaninas de ayale, uvalama y papache, 1×10^{-3} M AgNO_3 , 60 °C y 15 h de reacción; para las nanopartículas sintetizadas por el método químico se empleó 1×10^{-2} M de borohidruro de sodio (NaBH_4) como reductor químico.

G SÍNTESIS BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

1 Estandarización de condiciones para la síntesis de nanopartículas de oro

a Efecto de la concentración de melaninas solubles parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición

Es bien conocido que la dispersión coloidal de AuNPs conduce a un cambio en el color de las nanosuspensiones del amarillo al rojo rubí o azulado debido a la absorción o dispersión de la luz que los atraviesa (Harker 2011). Por lo tanto, la primera evidencia para la síntesis de AuNPs es un cambio de color visible de las disoluciones en reacción (Dzimitrowicz y col 2016a). Por ello, se realizaron observaciones visuales para examinar la capacidad de las melaninas dializadas para reducir los iones Au^{+3} a Au^0 después de la adición de hasta 20 mg del extracto.

El efecto de la concentración de melaninas solubles (0.5-20 mg/mL) se evaluó hasta las 2 h, cuando la disolución cambió de color de café oscuro a tonalidades rojas-violetas (**Figura 14**), considerándolo un indicador primario de la formación de AuNPs, y que se asocia al desarrollo de la banda de absorción UV-vis de resonancia plasmónica de las AuNPs, cuyo máximo característico está en el rango de 520-580 nm (Bhambure y col 2009; Islam y col 2015; Pal y Kryschi 2015; Dzimitrowicz y col 2016b; Mata y col 2016). Las observaciones visuales se corroboraron por



Figura 14. Síntesis de nanopartículas de oro usando melaninas dializadas de uvalama. Se muestra un cambio de color de café a violeta brillante debido a la reducción del HAuCl_4 a AuNPs después de 30 min de incubación.

espectrofotometría UV-vis. La banda de plasmón superficial se detectó a partir de 1 mg/mL de melaninas (λ_{max} 532 nm, 0.127 U.A.). La intensidad de absorción se incrementó con 5 mg/mL de melaninas solubles (λ_{max} 525 nm, 0.382 U.A.) para luego disminuir con concentraciones mayores. Patra y col (2015) y Yu y col (2016) reportaron un comportamiento similar y sugieren que a concentraciones altas se presenta la agregación de las nanopartículas en la disolución.

La concentración de melaninas solubles seleccionada fue de 5 mg/mL. A esta concentración la banda de plasmón superficial fue más ancha que en otros experimentos, lo que indica que las AuNPs son polidispersas, esta interpretación se comprobó mediante evaluaciones por microscopía una vez que se tuvieron establecidas todas las condiciones de síntesis (Ayaz Ahmed y col 2014) (**Figura 15A**).

b Efecto de la concentración del ácido tetracloroaurico (HAuCl₄)

En el rango de concentraciones evaluadas para el H₂AuCl₄ (1-4 mM), el mejor resultado se obtuvo a 1 mM, a esta concentración la banda de plasmón superficial de las AuNPs es definida e intensa (529 nm, 0.214 U.A.), por lo que fue la concentración seleccionada (**Figura 15B**).

Estudios recientes reportan que la concentración de 1 mM de H₂AuCl₄ también fue usada para la síntesis de AuNPs usando extractos de hojas de *Gloriosa superba* (538 nm), de la planta de *Salicornia* (532 nm), de flores de *Plumeria alba* (532-552 nm), del árbol *Salix alba* (536 nm), y del aceite esencial de *Curcuma pseudomontan*

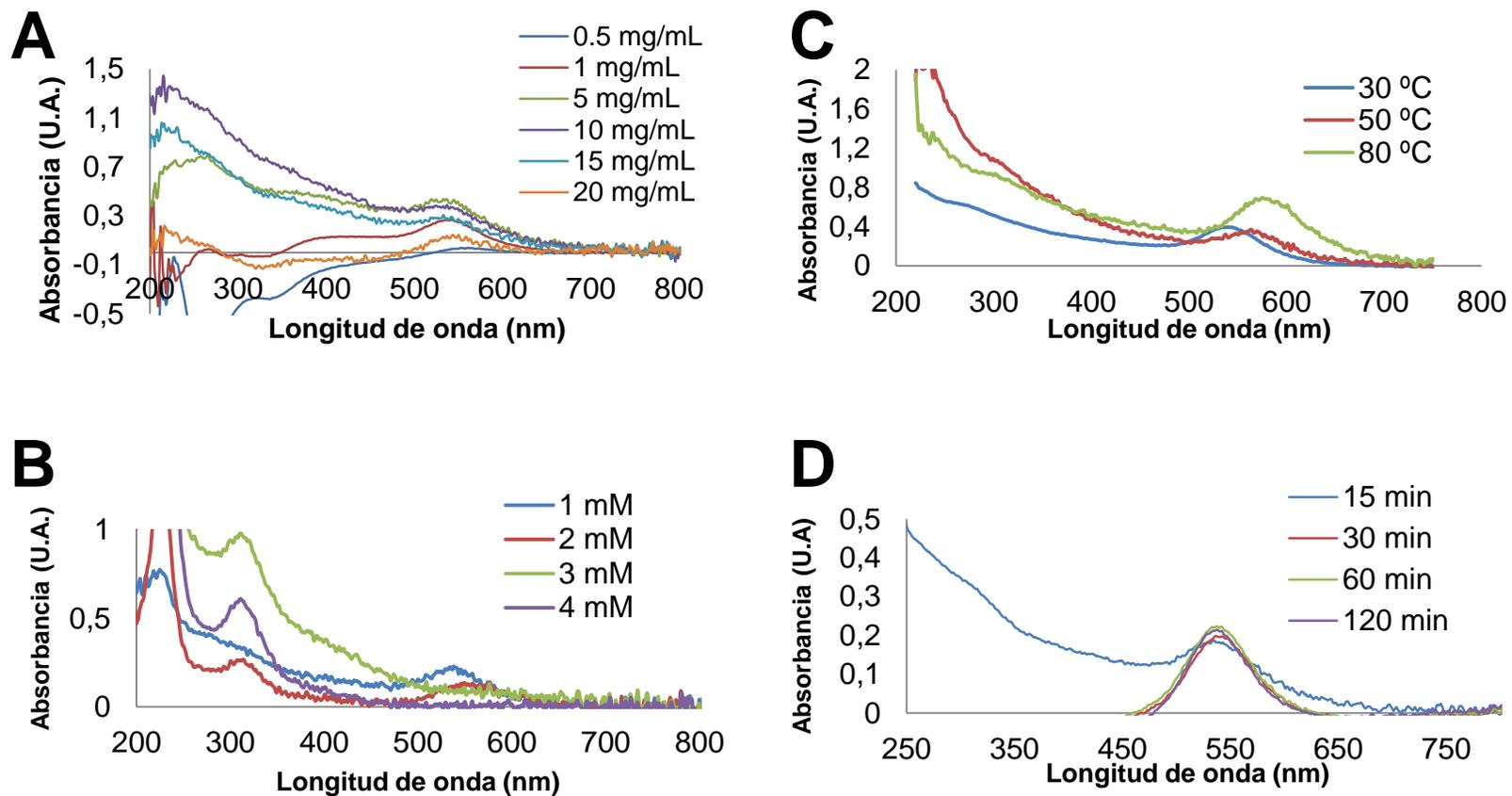


Figura 15. Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de oro, donde se presenta la banda característica del plasmón superficial a **(A)** diferentes concentraciones del extracto de melaninas, **(B)** diferentes concentraciones del HAuCl_4 , **(C)** diferentes temperaturas de reacción, y **(D)** diferente tiempo de incubación.

(523 nm) (Ayaz Ahmed y col 2014; Muniyappan y Nagarajan 2014; Islam y col 2015; Gopinath y col 2016; Mata y col 2016).

A concentraciones mayores de HAuCl_4 (2-4 mM), el extracto se precipitó dentro de los primeros minutos después de realizar la mezcla. Es posible que la concentración de melaninas solubles como agente reductor fue insuficiente para reducir el exceso de iones Au^{+3} , lo cual pudo favorecer una inestabilidad de las partículas de oro y provocar que co-precipitaran junto con las biomoléculas de las melaninas solubles. Con un 1 mM de HAuCl_4 , se tuvieron las suficientes biomoléculas con acción reductora y estabilizadora para que las partículas se mantuvieran pequeñas, evitando la agregación y manteniéndose dispersas y de tamaño uniforme. En estudios previos se realizó la síntesis de AuNPs empleando concentraciones altas de HAuCl_4 ; sin embargo, las partículas formadas fueron más grandes que las obtenidas a menores concentraciones debido a que la oportunidad para que ocurra la nucleación y agregación en las NPs es mayor (Cai y col 2011; Yuan y col 2017).

c Efecto de las diferentes temperaturas de reacción

A las temperaturas evaluadas (30, 50 y 80 °C), la banda de mayor intensidad se obtuvo a los 80 °C (λ_{max} 569 nm, 0.679 U.A.). Sin embargo, también se registró que al incrementar la temperatura hay un cambio batocrómico, característica que sugiere la formación de aglomerados de AuNPs. Por lo tanto, la temperatura seleccionada para formar las AuNPs fue de 30 °C (**Figura 15C**).

Islam y col (2015) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de AuNPs sintetizadas con extractos de hojas de *Salix alba*, calentándolas durante 30 min a 30 y 80 °C en un baño maría. Los resultados mostraron una banda de absorción definida y angosta a 30 °C (λ_{\max} 545 nm, 2.6 U.A) que disminuyó a 80 °C (λ_{\max} 593 nm, 0.9 U.A.). Esto indicó que se presentó agregación de nanopartículas de oro después de calentar la disolución y en su estudio dicha agregación se pudo confirmar a partir de las imágenes de SEM.

La temperatura de formación de las nanopartículas influye de manera importante en su estabilidad, actividad biológica, y características químicas, por lo que resulta importante la selección adecuada de este parámetro (Vorkapic y Matsoukas 1998).

d Efecto de los diferentes tiempos de incubación

La banda de absorción máxima característica de las AuNPs apareció a partir de los 15 min de incubación (λ_{\max} 545 nm, 0.2 U.A.), pero a los 30 min fue más intensa y definida (λ_{\max} 528 nm, 0.202 U.A.), y prácticamente no incrementó a mayores tiempos. El tiempo de reacción seleccionado para la síntesis de AuNPs fue de 30 min **(Figura 15D)**.

El tiempo de síntesis reportado para este trabajo (30 min) coincide con el registrado para la formación de nanopartículas usando extractos de *Azolla microphylla* (Kunjiappan y col 2014), de flor *Plumeria alba* (Mata y col 2016) y de hoja de *Butea monosperma* (Patra y col 2015); sin embargo, es pertinente destacar que el tiempo de síntesis de nanopartículas usando melaninas solubles como agente

reductor fue menor que los reportados para la síntesis empleando extractos de raíz de *Mammea suriga* (12 h) (Poojary y col 2016), *Vetiveria zizanioides* y *Cannabis sativa* (1-4 h) (Swain y col 2016), y de *Alpinia galanga* (4 h) (Mahakham y col 2016).

Krishnaswamy y col (2014) usaron extracto de la cáscara, semilla, y tallo de uva en la síntesis de nanopartículas, registrando un aumento gradual en la intensidad de la banda de absorción hasta alcanzar la máxima intensidad (λ_{\max} 536 – 538 nm) al pasar 1 h de incubación, esta característica permaneció estable y sin oscilaciones hasta por 36 h de monitoreo.

2 Síntesis de nanopartículas de oro con melaninas solubles de diferentes frutos

La estabilidad de las nanopartículas es de suma importancia en la nanotecnología para garantizar que sus propiedades químico-biológicas se mantengan y los resultados de su aplicación sean reproducibles (e.g., biodisponibilidad, toxicidad) (Gupta y Gupta 2005; Zhu y col 2012). La estabilidad y movilidad de las nanopartículas en el entorno biológico dependen de procesos tales como aglomeración, agregación, dispersión, sedimentación y disolución; los cuales están asociados a las propiedades fisicoquímicas de las partículas que a su vez están influenciadas por parámetros ambientales como el pH, la temperatura, concentraciones de reductores, concentración de precursores metálicos, tiempo de incubación y la presencia de ligantes o de materia orgánica (Stankus y col 2010; Levard y col 2012).

Las condiciones seleccionadas para la síntesis de AuNPs por el método biológico fueron 5 mg/mL de melaninas solubles, 1 mM de HAuCl_4 , 30 °C, y 30 min de incubación. Sin embargo, estas condiciones solo fueron exitosas para la preparación de AuNPs usando melaninas solubles de uvalama, estas AuNPs presentaron una banda mejor definida e intensa (λ_{max} 510 nm, 0.394 U.A.) que la obtenida para las AuNPs obtenidas empleando CTS como reductor químico (λ_{max} 517 nm, 0.041 U.A.) **(Figura 16)**.

Estos resultados indican que la reacción fue muy rápida y de acuerdo al espectro UV-vis que las partículas mostraron buena dispersión en la disolución, lo que corresponde a la longitud de onda registrada y al incremento de la banda máxima de absorción.

Los resultados muestran que melaninas solubles de frutos nativos de Sinaloa son mejores agentes reductores en la síntesis de AgNPs y AuNPs que el método químico, además de que el método es más amigable con el ambiente.

H RENDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE PLATA Y ORO SINTETIZADAS POR EL MÉTODO BIOLÓGICO

Los rendimientos en la síntesis de NPs, por el método biológico, fueron mayores para las AgNPs (0.96–1.33 mg/ mL) que para las AuNPs obtenidas con melanina de uvalama (0.40 mg/ mL). El rendimiento mayor fue para las AgNPs con las melaninas de ayale (1.33 mg/ mL) **(Cuadro 8)**.

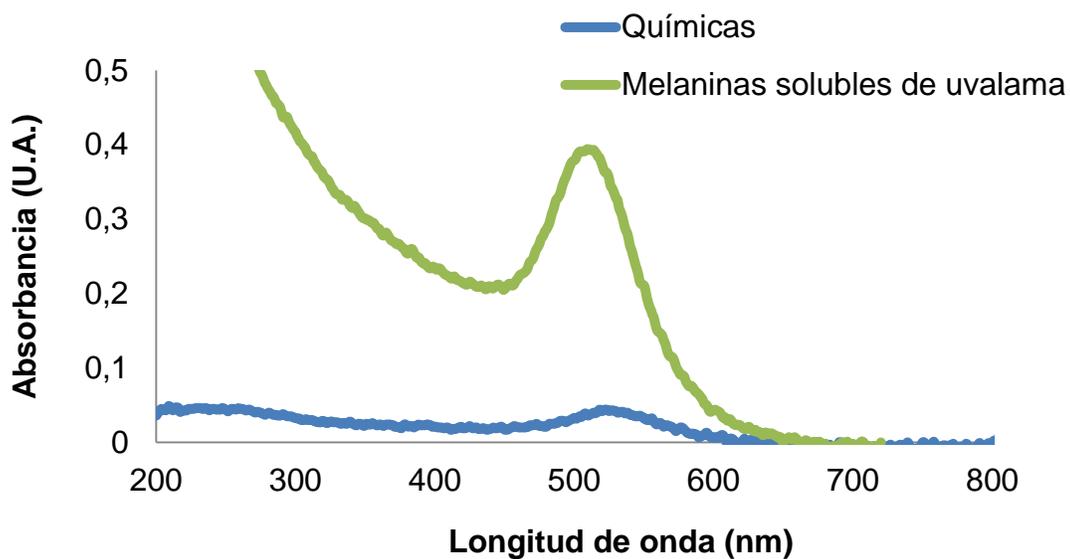


Figura 16. Espectro de absorción UV-vis de nanopartículas de oro sintetizadas empleando 5 mg/mL de melaninas de uvalama, 1×10^{-3} M HAuCl_4 , 30°C y 15 min de reacción; para las nanopartículas sintetizadas por el método químico se empleó 1×10^{-4} M de citrato tribásico de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) como reductor químico.

Cuadro 8. Rendimientos en la preparación de nanopartículas de plata y oro empleando melaninas solubles de frutos nativos de Sinaloa y purificadas por diálisis

Nanopartículas	Rendimiento (mg/100 mL)
Plata	
Ayale	133 ± 1.52^a
Uvalama	96.13 ± 2.71^c
Papache	113.51 ± 12.74^b
Oro	
Uvalama	40.33 ± 5.03^d

Los rendimientos de extracción son obtenidos a partir de 100 mL de disolución.

Se presenta la media de tres ensayos independientes, por triplicado, con su desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas

(P = 0.000, LSD= 13.2).

Los rendimientos de extracción para las AgNPs fueron mejores que los obtenidos al usar extracto de hojas de *Azadirachta indica* (0.23 mg/mL) (Kummara y col 2016).

Jayaseelan y col (2013) obtuvieron un rendimiento de 3 mg /mL para las síntesis de AuNPs usando el extracto acuoso de *Abelmoschus esculentus*, valor que resultó mayor a los registrados en el presente trabajo.

Las nanopartículas sintetizadas usando extractos de plantas como reductor tienen potencial para usarse en diversas aplicaciones biomédicas (e.g., antimicrobianas, antimicóticas y anticancerosas) (Ávalos y col 2013; Kummara y col 2016).

I CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y ORO

1 Análisis espectrofotométrico por infrarrojo

a Nanopartículas de plata

El espectro de IR se analizó para averiguar si se presentaron cambios en las bandas de los grupos funcionales de las melaninas responsables de la reducción y la estabilización de NPs después de la síntesis. El IR de las AgNPs obtenidas con ayule (Figura 17A) mostró una banda a 3375 cm^{-1} debido a la presencia de grupos O-H en la muestra, a 2937 cm^{-1} debido al enlace C-H de grupos alifáticos, a 1702 cm^{-1} asociada al doble enlace C=O, a 1643 cm^{-1} por el doble enlace C=C de anillos aromáticos, a 1343 cm^{-1} , asociada a la flexión C-OH de ácido carboxílico y

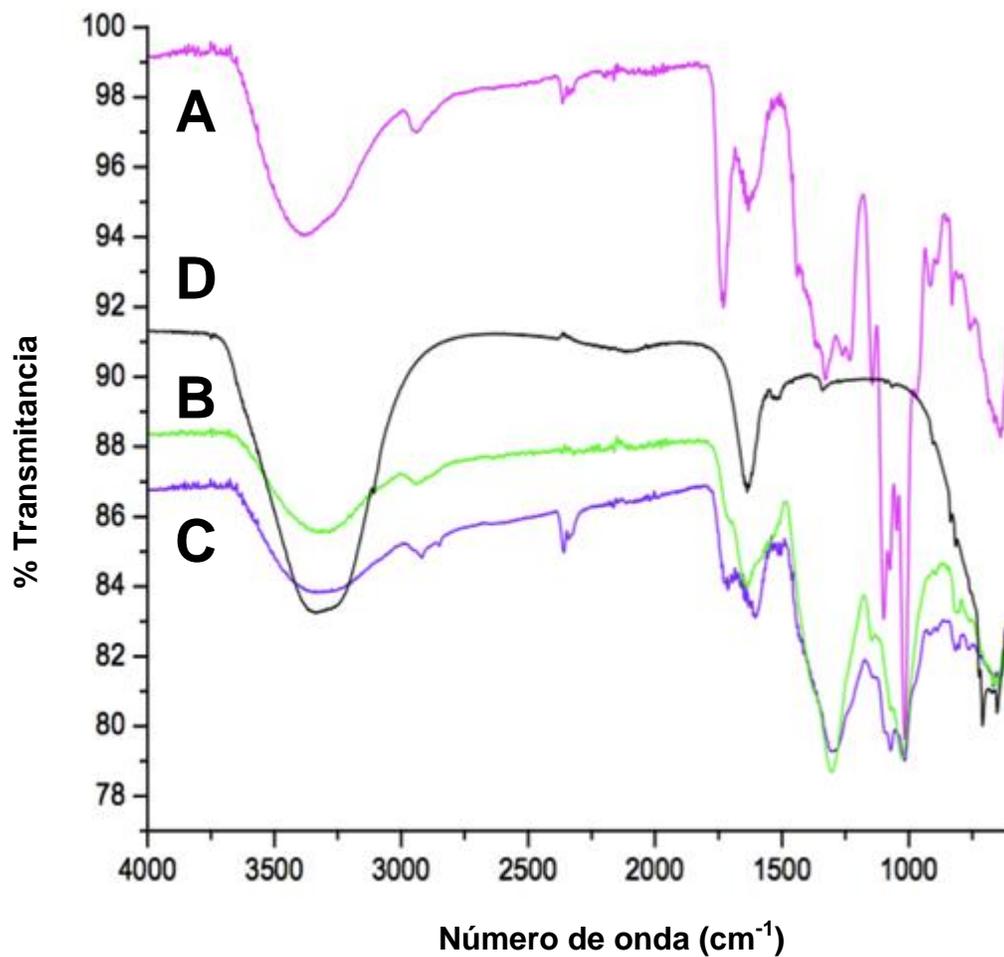


Figura 17. Espectro infrarrojo de nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas solubles obtenidas de **(A)** ayale, **(B)** uvalama y **(C)** papache y con **(D)** borohidruro de sodio (NaBH₄) como reductor químico.

señales a $1113 - 1002 \text{ cm}^{-1}$ atribuidas al enlace C–O de polisacáridos. Los espectros de IR de las AgNPs de uvalama (**Figura 17B**) y papache (**Figura 17C**) fueron similares al del IR de ayale.

En contraste, el IR de las AgNPs obtenidas por el método químico usando NaBH_4 y CTS como agente reductor mostró una banda a 3302 cm^{-1} atribuible a la presencia de grupos -OH de ácidos carboxílicos en la muestra que pueden corresponder al CTS y a 1700 cm^{-1} asociada al grupo carbonilo que pudiera corresponder al grupo -COOH {Kummara, 2016 #303}.

Las bandas diferenciales entre las NPs obtenidas por el método biológico se atribuyen a restos de melaninas solubles adheridas a las AgNPs. Contrastando los espectros de IR de la NPs obtenidas por síntesis biológica con las correspondientes melaninas solubles usadas como agente reductor, algunas bandas compartidas presentan una menor intensidad en las NPs (**Figura 18**). La presencia de estas señales y sus ligeros cambios en las posiciones de las bandas de IR de las AgNPs sintetizadas por reducción con melaninas solubles sugiere que fitoquímicos derivados de las melaninas (*e.g.*, fenoles, ácidos carboxílicos, y polisacáridos) son los responsables de la formación y estabilización de las AgNPs (**Figura 19**). Las melaninas solubles extraídas de los tres frutos son un grupo de heteropolímeros con grupos funcionales que pueden actuar en la reducción del Ag^+ a Ag^0 (Haytham 2015; Dhand y col 2016; Mahakham y col 2016; Nayak y col 2016).

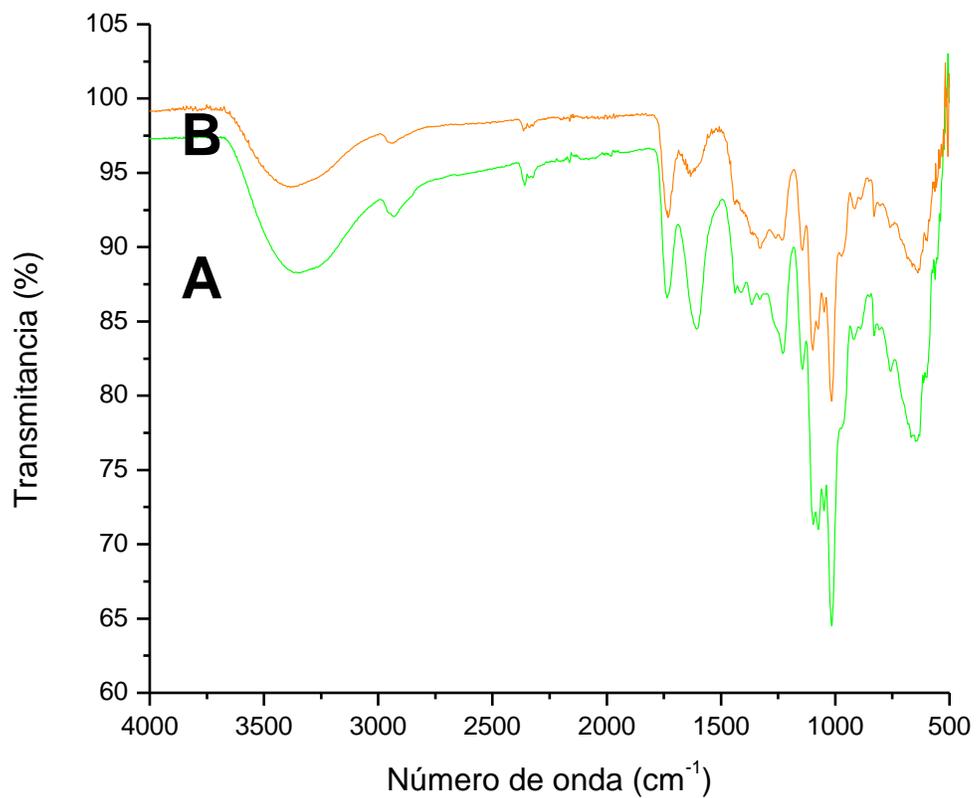


Figura 18. Espectro infrarrojo de **(A)** melaninas solubles de ayale y **(B)** nanopartículas de plata sintetizadas usando estas melaninas como agente reductor.

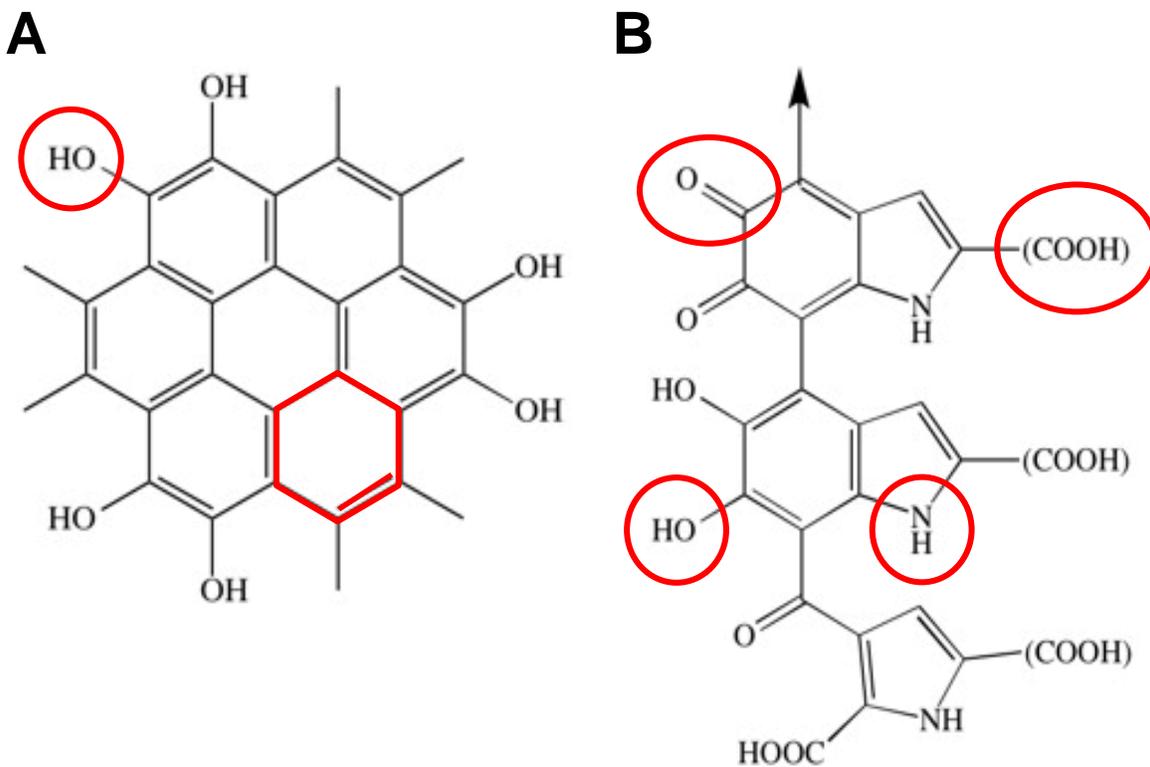


Figura 19. Posibles grupos funcionales en la estructura propuesta de las melaninas que median la síntesis de nanopartículas de plata y oro: **(A)** estructura de melanina libre de nitrógeno (Harborne 1984) y **(B)** estructura de melanina con nitrógeno (Marcano y Hasegawa 2002).

b Nanopartículas de oro

El análisis espectroscópico por infrarrojo se realizó para identificar los posibles grupos funcionales en las melaninas responsables de la reducción de los iones Au^{+3} para la síntesis y la estabilización de AuNPs (**Figura 20**). El IR de las AuNPs obtenidas con uvalama (**Figura 20A**) mostró una banda a 3327 cm^{-1} debido a la presencia de grupos O-H en la muestra, a 2969 cm^{-1} debido al enlace C-H de grupos alifáticos, a 1754 cm^{-1} asociada al doble enlace C=O, a 1667 cm^{-1} por el doble enlace C=C de anillos aromáticos, a 1375 cm^{-1} , asociada a la flexión C-OH de ácido carboxílico y señales a $1125 - 1031\text{ cm}^{-1}$ atribuidas al enlace C-O de polisacáridos.

El espectro de infrarrojo de las AuNPs sintetizadas por el método químico en el presente estudio coincidió con el reportado por Zhang y col (2011), en donde se indica que los grupos hidroxilo y el grupo carboxilato del citrato de sodio forman enlaces de hidrógeno fuertes con el NaBH_4 y los iones plata (**Figura 20B**).

Basándose en el cambio de banda en el grupo hidroxilo y carboxilato de las melaninas a las NPs puede inferirse que estos grupos están implicados en la síntesis y estabilización de AuNPs. En particular, las melaninas podrían estar formando un recubrimiento en la superficie de las AuNPs, evitando así la aglomeración de las partículas y proporcionando estabilidad en el medio (Islam y col 2015; Rajan y col 2015; Balashanmugam y col 2016).

Yuan y col (2017), Yu y col (2016) y Mahakham y col (2016) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio empleando extractos acuosos de

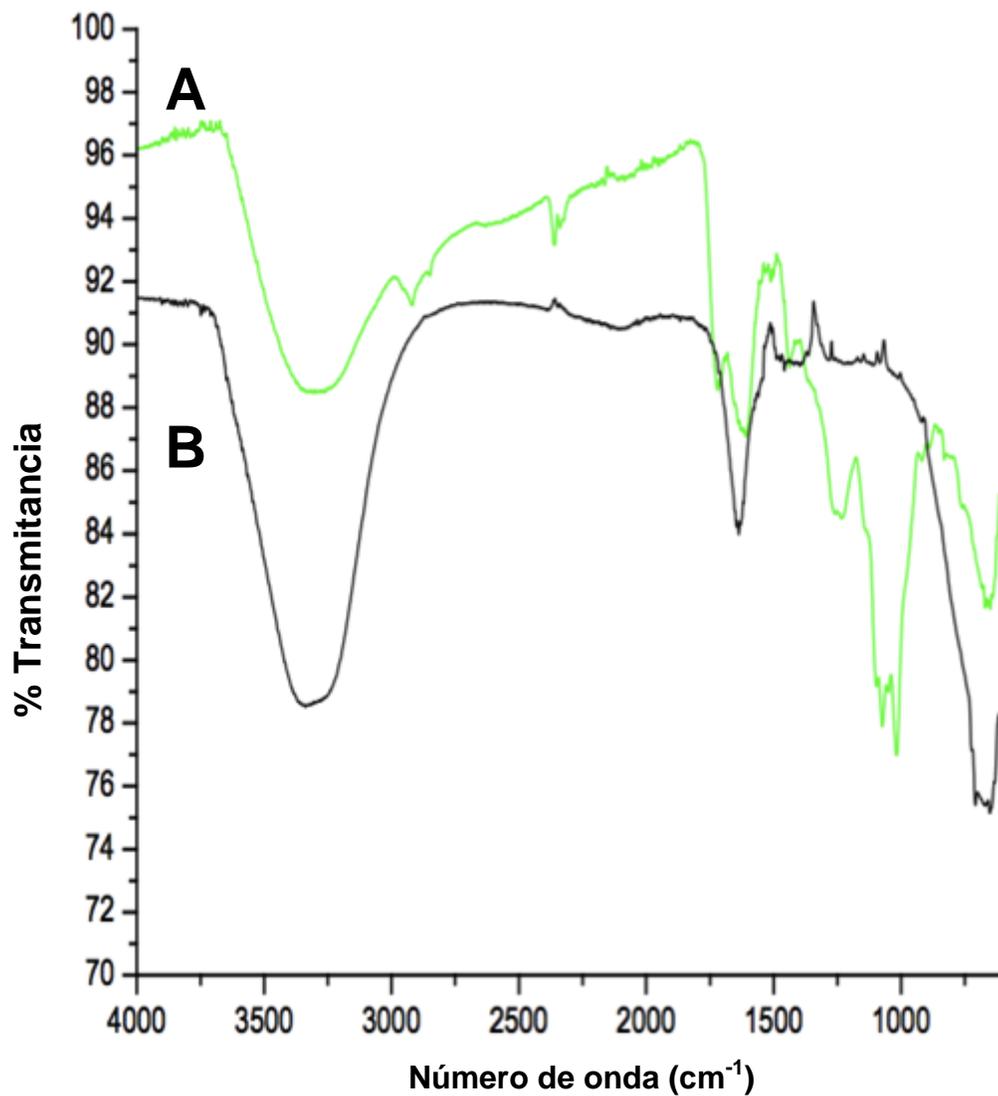


Figura 20. Espectro de infrarrojo de nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas solubles obtenidas de **(A)** uvalama y **(B)** citrato tribásico de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) como reductor químico.

Capsicum annuum, *Citrus máxima*, y *Alpinia galanga*. Estos autores sugieren que los grupos funcionales asociados a los compuestos presentes en los extractos tales como fenólicos (e.g., flavonoides y polifenoles), terpenos, vitaminas, ácidos carboxílicos, hidroxilos, y las proteínas presentes en los frutos actúan como poderosos agentes reductores que pueden ser responsables de la reducción del HAuCl_4 durante la síntesis y contribuir a la estabilidad de las nanopartículas de oro. También sugieren que proteínas, polipéptidos y heteropolímeros pueden actuar como agentes tensoactivos, unirse a la superficie de AuNPs, y estabilizarlas mediante fuerzas electrostáticas. Al respecto, la estabilidad de las nanopartículas es un aspecto importante de la nanotecnología puesto que es una propiedad que modula las propiedades biológicas de las NPs (Islam y col 2015).

2 Análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

a Nanopartículas de plata

El análisis por DLS de las AgNPs sintetizadas por el método biológico arrojó un tamaño estimado en el rango de 118 a 230.5 nm (**Figura 21**); siendo las AgNPs más pequeñas las preparadas con melaninas solubles de papache (**Figura 21C**). El estudio también mostró que las AgNPs sintetizadas con las melaninas de uvalama y papache presentaron una doble distribución con agrupaciones inferiores a los 30 nm (**Figura 21B y 21C**)

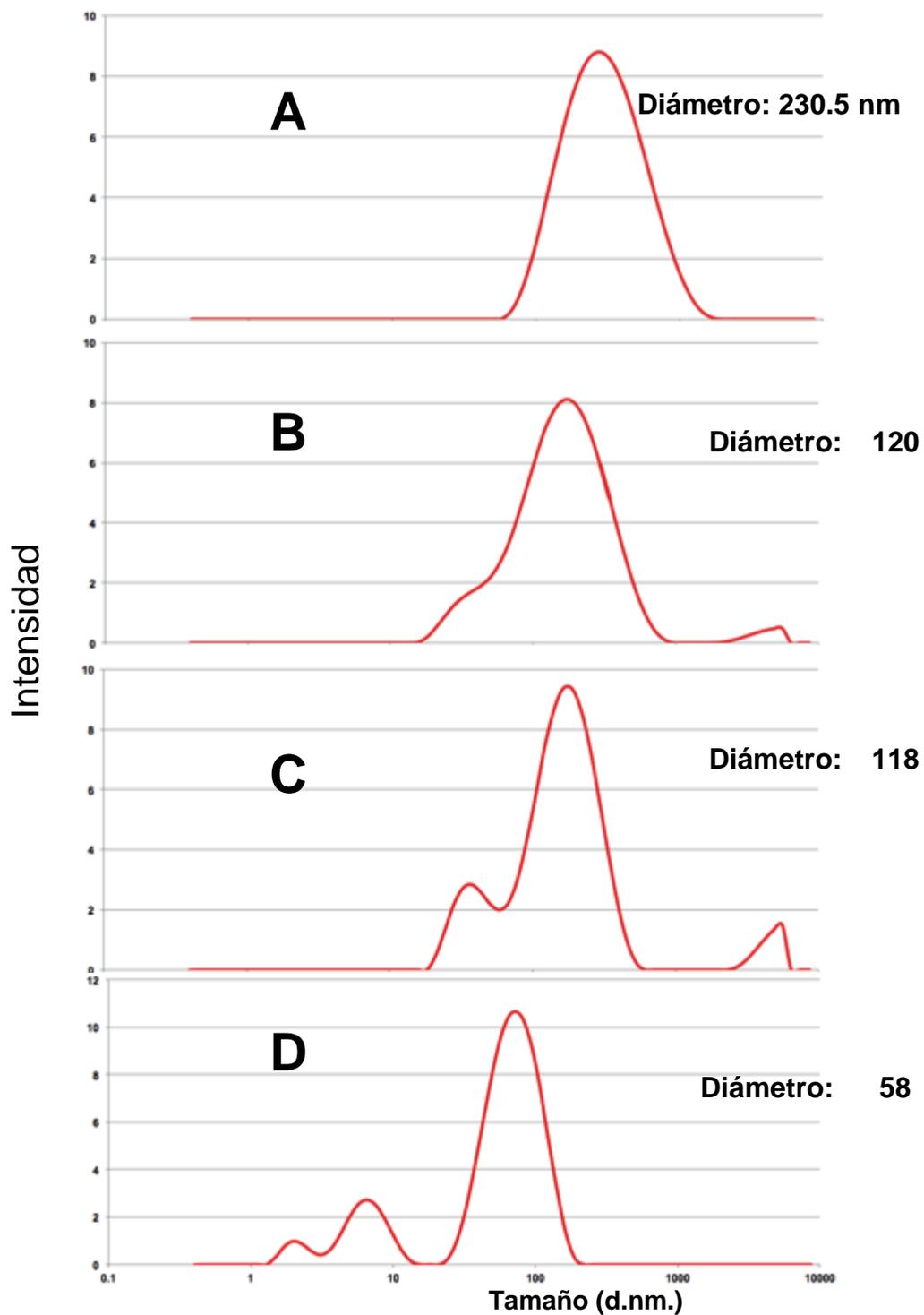


Figura 21. Histograma de dispersión de luz dinámica para nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas solubles de **(A)** ayale, **(B)** uvalama, **(C)** papache y **(D)** NaBH₄ como reductor químico.

El histograma de DLS para las AgNPs obtenidas con NaBH₄ registró un diámetro promedio de 58 nm y una segunda población de partículas con tamaños inferiores a los 10 nm (**Figura 21D**).

Los resultados de este trabajo coinciden con estudios previos donde reportaron que el diámetro hidrodinámico de las AgNPs sintetizadas a partir de otros extractos de plantas se encuentra entre 20 y 100 nm (Chowdhury y col 2016). Algunos ejemplos de investigaciones que emplean extractos de plantas para formar AgNPs muestran tamaños en el rango mencionado: tubérculo de *Curcuma longa*/ 102 nm (Sankar y col 2017); *Eucalyptus oleosa*/ 21 nm (Pourmortazavi y col 2015); y semilla de *Coffea arabica*/ 22 nm (Kumar y col 2016b). Sin embargo, el empleo de algunos extractos de plantas como agentes reductores resultó inadecuado para la formación de AgNPs, el extracto de la raíz *Pelargonium endlicherianum* Fenzl generó NPs de 445- 470 nm (Şeker Karatoprak y col 2017) y extractos de los manglares *Heritiera fomes* y *Sonneratia apetala* produjeron nanopartículas de 50 – 400 nm (Thatoi y col 2016).

Realizando una breve comparación de la síntesis de NPs utilizando diferentes metales a la plata se ha observado que se obtienen tamaños más grandes de partículas. Sankar y col (2017) probaron la síntesis de NPs utilizando metales como el cobre y hierro obteniendo tamaños promedios de 190 y 215 nm respectivamente; Thatoi y col (2016) utilizaron el zinc en la síntesis de NPs obteniendo tamaños de entre 400 – 500 nm. Lo anterior se explicó debido a que las AgNPs suelen tener mayor carga negativa que las NPs sintetizadas con otros metales; al respecto se ha

señalado que a mayor carga superficial, un menor tamaño de partícula estabiliza las NPs y previene la aglomeración.

Estudios previos han demostrado que el diámetro promedio en la suspensión acuosa en el estudio de DLS es mayor que por otros métodos analizados (e.g., TEM, SEM), por lo que el tamaño hidrodinámico es siempre más alto que el tamaño real; sin embargo, estas diferencias se explican comúnmente por la tendencia de las NP a aglomerarse en un medio acuoso, haciéndolas más grandes que en estado seco. Además, el aumento del tamaño de partícula en esta técnica también se debe a la influencia de moléculas orgánicas presentes alrededor de las nanopartículas, en este caso a la presencia de melaninas asociadas a las nanopartículas (Sánchez y col 2016; Sankaranarayanan y col 2016).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se presentó una doble distribución de tamaño en las NPs, donde la evidencia sugiere que se debe a la participación de diversas biomoléculas para la bioreducción de AgNO_3 en la disolución y a la estabilidad de las AgNPs, en este caso a la presencia de melaninas en el medio (Kumar y col 2016b; Al-Bahrani y col 2017).

La dispersidad mide la heterogeneidad de las partículas en una mezcla. El índice de polidispersidad (IPD) toma valores de 0 a 1, por debajo de 0.5 indica monodispersión y por encima polidispersión (Lancheros y col 2014; Bautista Hernández 2015). El IPD de nuestras AgNPs estuvo en el rango de 0.296 – 0.417, lo que indica que nuestra muestra se encuentra monodispersas en la disolución coloidal. Estos resultados coinciden con informes previos de AgNPs sintetizadas con

extractos de plantas; Chowdhury y col (2016) reportan IPD de 0.179 – 0.211 y Sinha y col (2014) de 0.926, este último valor indica una mayor variación en el tamaño de partículas en su disolución.

El análisis de DLS de AgNPs sintetizadas con NaBH₄ arrojó un tamaño más pequeño de partícula que las sintetizadas por Kummara y col (2016) (104 nm), lo cual puede deberse a diferencias en las condiciones de reacción.

b Nanopartículas de oro

El análisis por DLS mostró que las AuNPs sintetizadas con melaninas de uvalama presentaron un tamaño estimado de 42.1 nm y otras dos poblaciones con tamaños inferiores a los 10 nm (**Figura 22A**); mientras que las sintetizadas por el método químico tuvieron un diámetro promedio menor de 5.4 nm y una subpoblación con tamaño aproximado a 1 nm (**Figura 22B**). Estos resultados fueron similares a los obtenidos al preparar AuNPs con otros extractos de plantas: con el fruto de *Terminalia arjuna*, 5 – 60 nm, tamaño promedio de 25 nm (Gopinath y col 2014); con *Allium cepa*, 25 – 70 nm, tamaño promedio de 45.4 nm (Patra y col 2016); de *Elaeis guineensis*, 52.2 – 42.9 nm, dos subpoblaciones de menor (10 nm) y mayor (8000 nm) tamaño (Ahmad y col 2016).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, la variación en los tamaños de las AuNP se asocia a la naturaleza polidispersa de las NPs. El IPD de las AuNPs sintetizadas con melaninas de uvalama fue de 0.557 lo que sugiere una tendencia a la polidispersividad de las AuNPs, lo que a su vez puede deberse en parte a la

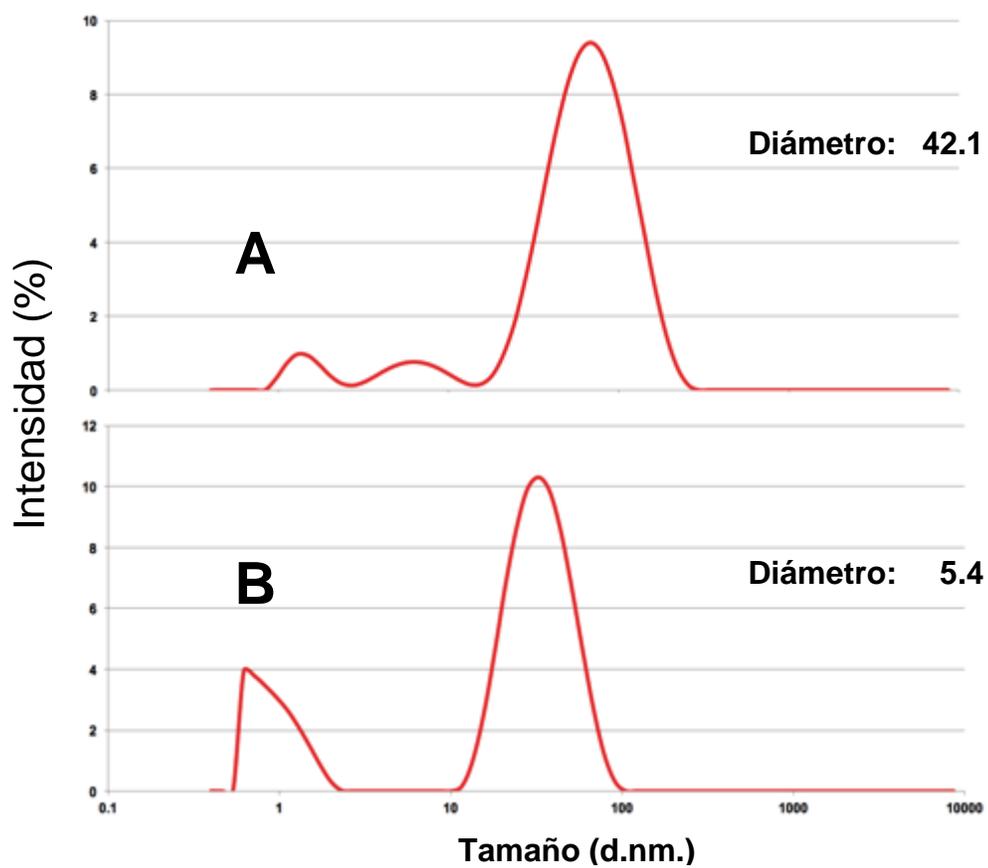


Figura 22. Histograma de dispersión de luz dinámica para nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas de **(A)** uvalama y **(B)** citrato tribásico de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) como reductor químico.

formación de aglomerados, lo que genera variabilidad en la determinación del tamaño calculado de partícula en comparación con el real (Gopinath y col 2014; Dash y col 2015; Jamdagni y col 2016). El IPD para las AuNPs sintetizadas con melaninas de uvalama en este trabajo se encuentra por arriba del reportado por Narayanan y Park (2015), quienes emplearon hojas de *Brassica rapa* y obtuvieron AuNPs con un tamaño más homogéneo (IPD = 0.213); sin embargo, el diámetro promedio de sus AuNPs fue de 230 nm, mayor al reportado para el presente trabajo (42.1 nm).

El tamaño de las AuNPs sintetizadas por el método químico con CTS resultó ligeramente mayor que el reportado por Swain y col (2016) (16 nm), lo que puede deberse a diferencias en las condiciones de síntesis.

3 Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

a Nanopartículas de plata

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron AgNPs obtenidas por el método biológico de forma esférica, y estructura cristalina, con una distribución de tamaño de 13 a 31 nm, monodispersas, y que a pesar de la filtración quedan restos de extracto en el medio donde se encuentran las nanopartículas, lo que pudiera explicar que el análisis por DLS indicara tamaños que fueron hasta 17.73 veces más grandes que los reales de acuerdo al TEM (**Figura 23**).

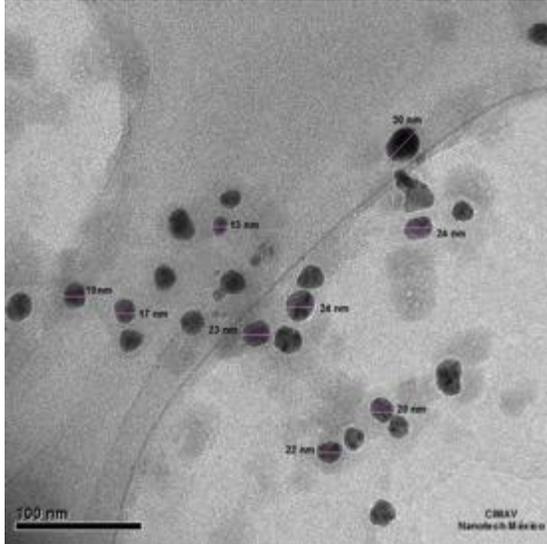
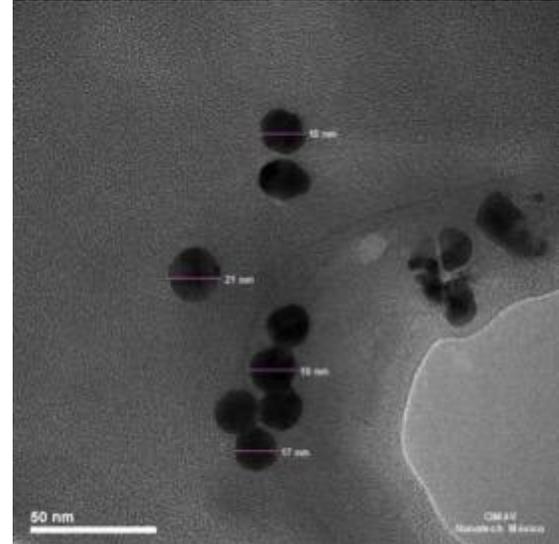
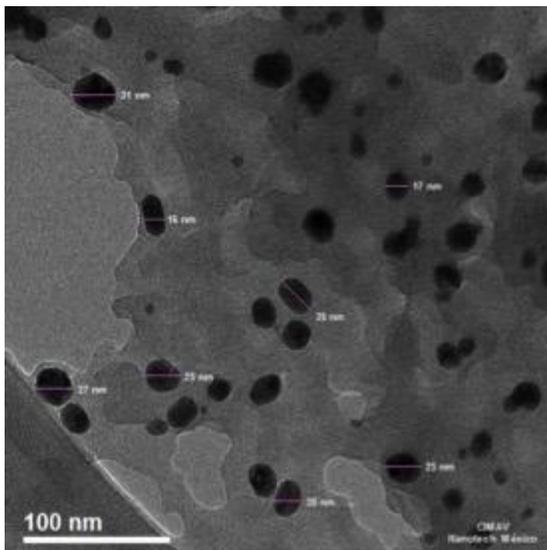
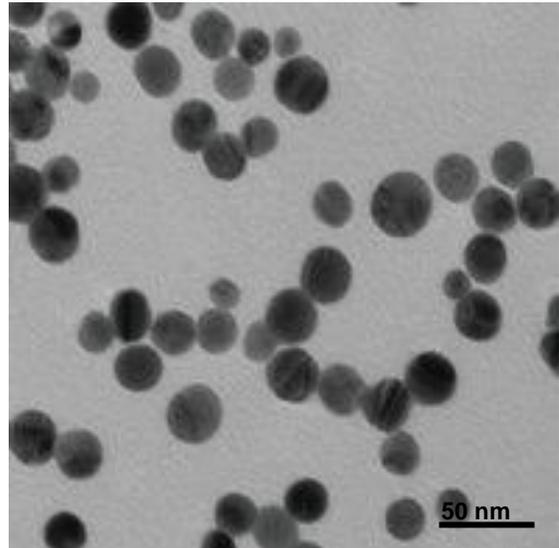
A**B****C****D**

Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas solubles de **(A)** ayale, **(B)** uvalama, **(C)** papache y **(D)** NaBH₄ como reductor químico.

Los resultados observados en las microfotografías de este trabajo coinciden con estudios previos donde reportan las características morfológicas de las NPs obtenidas a partir de extractos de plantas como agente reductor; tal es el caso de Sankaranarayanan y col (2016) en donde a partir de hojas de *Pedaliium murex* obtuvieron AgNPs de forma esférica, con estructura cristalina y con un tamaño promedio de 50 nm; Sadeghi y Gholamhoseinpoor (2015) a partir del extracto de *Ziziphora tenuior* lograron sintetizar AgNPs de forma esférica, monodispersas, con estructura cristalinas y con un tamaño que va de 8 a 40 nm; Fatimah (2016) en su análisis por TEM muestra AgNPs sintetizadas a partir de cáscara de *Parkia speciosa Hassk*, en su mayoría de forma esférica y con tamaños que van de los 20 – 50 nm, también se observa un capa fina de material orgánico de la planta al igual que en el presente y otros trabajos anteriores.

El análisis de las AgNPs por TEM mostró que la población es monodispersa, sin embargo, en la micrografía pueden observarse pequeñas aglomeraciones de nanopartículas. Las formación de agregados podría deberse a la evaporación del disolvente durante la preparación de la muestra o bien a la acumulación de pequeños cristales nanométricos durante la síntesis (Joy Prabu y Johnson 2015; Kumar y col 2016b).

La distribución de tamaño (13 a 31 nm) de las AgNPs obtenidas en el presente estudio, en comparación con otros, podría explicarse parcialmente por la complejidad de las muestras de melaninas solubles, que presentan grupos fenólicos, carboxilos e hidroxilos, cada uno de estos grupos tienen diferente capacidad de bio-reducción y,

en consecuencia, en la misma disolución se forman nanopartículas de características diferentes (Sánchez y col 2016).

La TEM se ha utilizado para analizar AgNPs obtenidas con extractos de diferentes productos naturales. Por ejemplo, Shankar y col (2016) usaron microalgas *Sargassum muticum* y 12 h de reacción para obtener NPs con una distribución de tamaño de 10 – 60 nm, con estructuras amorfas y esféricas, observándose aglomeración en su superficie. Balakumaran y col (2016) emplearon extractos del hongo *Aspergillus terreus* y 48 h de reacción, las AgNPs fueron triangulares, hexagonales, y esféricas; distribución de tamaño de 8 – 20 nm. A la fecha, diferentes extractos de productos naturales han mostrado su eficiencia como reductores en la síntesis de NPs. Sin embargo, diversos investigadores señalan que es mejor usar extractos de plantas en razón a su disponibilidad, mayor potencial de bio-reducción, menor tiempo de incubación y energía, tamaños más homogéneos de partículas, y menor probabilidad de aglomeración; además, los productos de desecho generados a partir de los procesos de síntesis mediados por plantas son usualmente compatibles con el medio ambiente, por el contrario, los productos de desecho de los métodos de síntesis microbiana son susceptibles de ser peligrosos para el medio ambiente dependiendo del tipo de microbio utilizado. En cuanto a la seguridad de los procedimientos de síntesis biológica, el enfoque mediado por plantas tiene una contaminación menor o casi nula y, por lo tanto, tiene un impacto mucho menor en el medio ambiente. Aparte de la reducción de los iones metálicos, los fitoquímicos presentes en los extractos de plantas estabilizan las nanopartículas sintetizadas. Por lo tanto, el protocolo basado en extractos de plantas cumple todos los criterios para

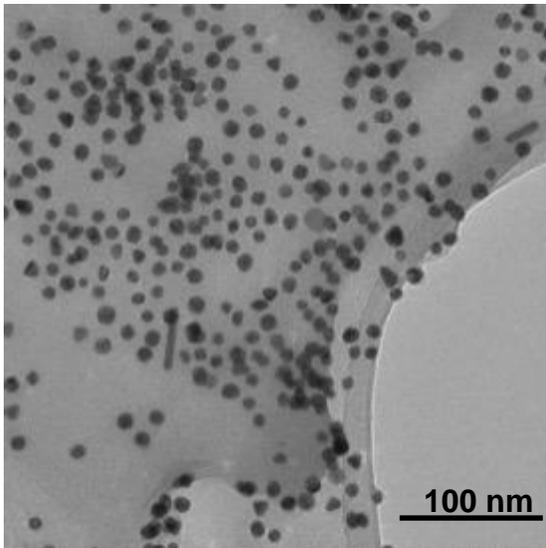
una síntesis más ecológica y es adecuado para la producción a gran escala, ya que es más fácil de implementarse, de bajo costo, respetuoso con el medio ambiente y seguro para el uso terapéutico humano (Dahl y col 2007; Narayanan y Sakthivel 2010; Iravani 2011; Kannana y col 2011; Rajan y col 2015).

b Nanopartículas de oro

La TEM de las AuNPs sintetizadas por el método biológico mostró que en su mayoría son esféricas, con poblaciones menores de forma cilíndrica y triangular, con tamaños que van de 2 a 16 nm, monodispersas, y que las preparaciones tienen restos de extracto en el medio donde se encuentran las nanopartículas, lo cual pudiera estar interfiriendo en el resultado de DLS (**Figura 24**).

La banda ancha registrada para AuNPs en el espectro UV-vis está asociada a la diversidad morfológica de partículas en un mismo medio. Las micrografías de TEM muestran una distribución de tamaño uniforme y forma de tipo anisotrópico en las partículas (*e.g.*, esférica, triangular y bastones) (Alvarez y col 2016). Esta variabilidad podría estar asociada a la presencia de diversos grupos funcionales (*e.g.*, fenólicos, ácidos carboxílicos, hidroxilos) en las melaninas de uvalama y su capacidad individual para reducir y formar los núcleos de oro (Kunjiappan y col 2014; Patra y col 2015; Mashwani y col 2016). También se observó que las AuNPs contienen una capa fina de revestimiento debido a los restos del extracto adheridas en su superficie (Sathishkumar y col 2016).

A



B

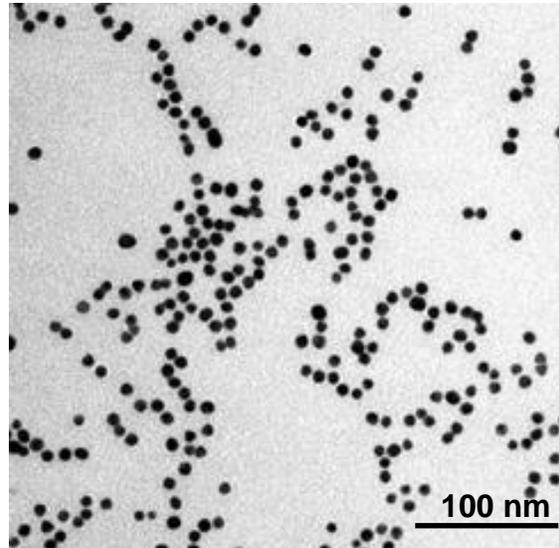


Figura 24. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas solubles de **(A)** uvalama y **(B)** citrato tribásico de sodio como reductor químico.

La baja temperatura (30 °C) de incubación y concentración de melaninas solubles de uvalama (5 mg/ mL) utilizadas favoreció el desarrollo de AuNPs de menor tamaño (2 – 16 nm). Dash y col (2015) y Dhamecha y col (2016) mostraron que altas temperaturas de incubación (>60 °C) y concentraciones de extracto conllevan a un tamaño de partícula alrededor de los 100 nm.

Las AuNPs sintetizadas mostraron buena dispersión y estabilidad en disolución. Probablemente esto se deba a que los grupos hidroxilo de las melaninas solubles adheridas a las NPs favorecen el desarrollo de las altas cargas superficiales que la estabilizan, fuertes fuerzas repulsivas impiden la aglomeración de AuNPs a medida que se acercan unas a otras (Muniyappan y Nagarajan 2014).

Estudios previos presentan resultados similares, a los de este trabajo, en la obtención de AuNPs usando diferentes extractos: AuNPs de 10 – 30 nm/ extracto de *Alpinia galanga* (Mahakham y col 2016); AuNPs de 3 – 20 nm/ extracto de *Azolla microphylla* (Kunjiappan y col 2014); y AuNPs de 15.1±10.2/ *Salvia officinalis*, 19.5±24.3/ *Melissa officinalis*, y 55.1±48.4 nm/ *Mentha piperita* (Dzimitrowicz y col 2016b). En los tres casos antes mencionados, las AuNPs presentaron mezclas de formas (*i.e.*, esférica, triangular, hexagonal, y de bastón).

La forma de las nanopartículas es un criterio importante para cualquier tipo de aplicación, ya que está directamente relacionada con sus propiedades ópticas y eléctricas. En lo que respecta al tamaño, las AuNPs son ventajosas para la liberación dirigida de fármacos, terapia fototermal, y en el caso de las AgNPs para el

tratamiento de heridas (antimicrobianos) (Kelly y col 2003; Huang y col 2007; Nath y col 2007; Noginov y col 2007; Velmurugan y col 2014a).

J ACTIVIDAD BIOLÓGICA

1 Actividad antioxidante

La producción excesiva de radicales libres (HO^\bullet , O_2^\bullet , H_2O_2) en las células durante el estrés oxidativo, el metabolismo y la respiración están asociadas a diferentes condiciones fisiológicas tales como envejecimiento, ataque al corazón, y cáncer. Los antioxidantes son moléculas que tienen el poder de transferir un electrón o protón a los radicales libres logrando estabilizarlos.

La actividad antioxidante (AA) de las NPs fue mayor al determinarse por FRAP (154.26-725.35 $\mu\text{mol ET/ g b.s.}$) que por DPPH (86.62-148.21 $\mu\text{mol ET/ g b.s.}$), las AgNPs preparadas con melaninas de uvalama presentaron los mayores valores por ambos métodos (**Cuadro 9**).

Los resultados de la AA obtenidos en el presente trabajo por el método de FRAP fueron mayores que el registrado para las AgNPs obtenidas con el extracto del fruto *Hylocereus undatus* (32.63 $\mu\text{mol ET / g de extracto}$) (Phongtongpasuk y col 2016) y para las AuNPs sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Brassica napus* (30.7-75.6 $\mu\text{mol ác. sinápico/ g}$) (Tulodziecka y Szydłowska-Czerniak 2016).

Por el método de DPPH el porcentaje de inhibición más alto fue el registrado para las Ag-Au NPs sintetizadas con melaninas de uvalama con 42.4 y 27%,

Cuadro 9. Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/ g b.s.}$) de nanopartículas de plata y oro sintetizadas a partir de melanina parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición

Nanopartículas sintetizadas con melaninas solubles		Métodos de evaluación	
		FRAP	DPPH
Plata (Ag)			
	Ayale	160.37 ± 4.8^c	10.92 ± 0.9^d
	Uvalama	725.35 ± 5.5^a	148.21 ± 3.0^{da}
	Papache	154.26 ± 13.4^c	86.62 ± 2.3^c
Oro (Au)			
	Uvalama	36 3.38 ± 13.9^b	97.71 ± 2.2^b

Se presenta la media de tres ensayos independientes, por triplicado, con su desviación estándar.

^{a,b}Letras diferentes, en un mismo método (columna) indican diferencia significativa (P = 0.000, LSD FRAP = 19.53) (P = 0.000, DPPH = 4.31).

respectivamente; estos resultados son más altos que los registrados por Khamhaengpol y Siri (2016) en dónde sintetizaron NPs a partir de un extracto proteico de las larvas de las hormigas tejedoras donde obtuvieron 5% de inhibición usando 1 mg/mL del extracto; a la misma concentración, Tahir y col (2015) obtuvieron mayores porcentajes de inhibición (70%) con las NPs sintetizadas con extracto acuoso de *Nerium oleander*. Por otro lado, Phull y col (2016) registraron 59.31% de inhibición para las AgNPs sintetizadas a partir de un extracto crudo de *Bergenia ciliata*. A pesar de que en el presente estudio se presentaron porcentajes de inhibición menores que algunos reportes en donde utilizaron extractos de plantas, las Ag-Au NPs sintetizadas con melaninas de frutos silvestres de Sinaloa mostraron mayor AA en comparación con las NPs de hierro (IC_{50} 52.88-69.10 mg) y níquel (IC_{50} 27.70±0.56 mg) (Saikia y col 2010; Phull y col 2016).

Una posible explicación de la variabilidad entre los resultados de la AA de las NPs examinadas es la influencia de los factores tecnológicos y los parámetros de los procedimientos analíticos empleados (naturaleza y preparación de la muestra, disolvente utilizado, condiciones y mecanismo de las reacciones químicas). Los valores más altos de AA presentados por el método de FRAP pueden ser debido a que el ensayo responde de mejor manera a las muestras de naturaleza hidrofílica en contraste con el método DPPH el cual usa un radical disuelto en medios orgánicos y por lo tanto tiene una mayor afinidad hacia los antioxidantes lipofílicos que hidrofílicos (Medina 2010; Saikia y col 2010; Phull y col 2016).

Otra posible razón por la que en el presente trabajo se obtuvieron AA más bajas, que en otros reportes de síntesis verde de NPs, podría deberse a que las melaninas

dializadas de los tres frutos presentan una composición menos compleja que los extractos acuosos/metanólicos empleados en otros estudios, los fitoquímicos de naturaleza polar pueden estar interfiriendo en la donación de electrones y protones para neutralizar radicales libres (Uddin y col 2012).

El aumento de la eficacia antioxidante de los Ag-Au NPs por el método de FRAP podría ser el resultado sinérgico de una interacción físico-química activa de los átomos de Ag y Au con los grupos funcionales de las moléculas bioreductoras de las melaninas que se encuentran adheridas a la superficie de las partículas (Kharat y Mendhulkar 2016; Kumar y col 2016b; Lateef y col 2016). Esta investigación proporciona evidencia del potencial de la NPs biosintetizadas para ser usadas como antioxidante natural o eliminador de radicales contra daños causados por los radicales libres.

2 Actividad antibacteriana de nanopartículas metálicas (Ag-Au)

a Método Kirby-Bauer – difusión en disco

Los productos naturales se consideran una fuente importante de nuevos agentes antibacterianos. De hecho, el 80% de los nuevos fármacos o medicamentos semisintéticos son obtenidos de fuentes naturales (Gordon M. Cragg 1997; Prieto-González y col 2004; Menchaca y del Carmen 2013).

Las AgNPs sintetizadas con melaninas solubles de los tres frutos presentaron actividad contra siete de las ocho cepas bacterianas evaluadas; mostrando halos de inhibición de crecimiento en el rango 6.8-10 mm. Interesantemente, las AgNPs

obtenidas por el método químico y todas las melaninas solubles empleadas en la síntesis de NPs, fueron inactivas contra las ocho cepas evaluadas. También es importante mencionar que *Shigella dysenteriae* fue sensible a las AgNPs (7.5-9.3 mm) pero no al AgNO₃. De manera general, el AgNO₃ usado como precursor de las NPs mostró actividad antibacteriana similar a las AgNPs obtenidas por el método biológico para seis de las ocho cepas bacterianas evaluadas (**Cuadro 10**). Las AuNPs sintetizadas por el método químico y biológico fueron inocuas contra las ocho cepas bacterianas.

Kim y col (2007) informaron que *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram-positiva, fue menos sensible a las AgNPs que *E. coli*, incluso a altas concentraciones, lo cual coincide con lo reportado en este trabajo. Phull y col (2016) y Saravanakumar y col (2015) mostraron resultados similares respecto a la actividad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas con extracto crudo de *Bergenia ciliata* (8.5-11 mm) y extracto de la hoja de *Cassia tora* (7.14-10.81 mm); sin embargo, sus extractos por si solos presentaron actividad antibacteriana (7-9 mm), lo que pudiera estar influyendo en los resultados. En nuestro caso las melaninas dializadas (1 mg/mL) de los frutos estudiados no presentaron actividad antibacteriana contra ninguna de las cepas bacterianas, evaluadas hasta 25 µg/mL en el método de microdilución en caldo. En ambos trabajos se discute que la mayor actividad bacteriana en bacterias Gram-negativas puede deberse a que en su estructura presentan la capa de peptidoglicano mucho más delgada en comparación a las Gram-positivas.

Cuadro 10. Actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer de nanopartículas sintetizadas empleando como agente reductor biológico melaninas solubles (*i.e.*, de ayale (A), uvalama (U), y papache (P)) y citrato tribásico de sodio como reductor químico

Microorganismo	Zona de inhibición (diámetro mm ¹)				
	AgNPs ²			Control	
	A ⁵	U ⁶	P ⁷	AgNO ₃ ³	GN ⁴
<i>Streptococcus</i> grupo A-4	9.5 ± 0.70	8.8 ± 0.35	10 ± 0.23	9.9 ± 0.14	28 ± 0.35
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	9.5 ± 0.70	8.8 ± 0.35	9 ± 0.30	13 ± 0.07	28.3 ± 0.35
<i>Escherichia coli</i> A011	9.0 ± 0.15	9.8 ± 0.35	9.5 ± 0.70	9.9 ± 0.21	28.5 ± 0.71
<i>Escherichia coli</i> A055	0	9.5 ± 0.70	8.5 ± 0.70	11.3 ± 1.06	29.3 ± 0.35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	32.3 ± 0.21
<i>Shigella dysenteriae</i>	9.3 ± 0.35	7.5 ± 0.70	7.5 ± 0.70	0	32.3 ± 0.35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6.8 ± 0.35	8.8 ± 0.35	08.8 ± 0.35	9.9 ± 1.27	33 ± 0.35
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9.5 ± 0.70	10 ± 1.41	9.5 ± 0.70	9.8 ± 0.35	31.3 ± 0.35

¹ Los diámetros son los valores promedio en milímetros ± desviación estándar; ² AgNPs = Nanopartículas de plata; ³ AgNO₃ = Nitrato de plata (1x10⁻³ M); ⁴ GN = Gentamicina (6x10⁻⁸ M); la concentración evaluada de las AgNPs de ⁵ ayale (A), ⁶ uvalama (U), y ⁷ papache (P) fue de 1x10⁻³ M. Las melaninas de los tres frutos (1 mg/mL), el HAuCl₄, las AuNPs-biológicas y químicas (1x10⁻⁴ M) y las AgNPs químicas (1x10⁻³ M) no mostraron actividad antibacteriana contra ninguna de las 8 cepas bacterianas evaluadas.

Los mecanismos antibacterianos de AgNPs no se han elucidado completamente, pero varios estudios han demostrado que AgNPs pueden adherirse a la superficie de la membrana celular, perturbando así la permeabilidad y las funciones respiratorias. Además, las AgNPs interactúan con la superficie de la membrana y pueden penetrar la bacteria (Morones y col 2005a; Kvittek y col 2008).

Wang y col (2007) informaron que las AgNPs reaccionan con proteínas que contienen azufre y compuestos que contienen fósforo, como enzimas vitales y bases de ADN en el interior de las células, afectando la cadena respiratoria y la división celular en las bacterias, lo que a su vez induce la formación de radicales libres que dañan a la membrana y causan la muerte celular (Khamhaengpol y Siri 2016).

También es bien conocido que factores clave como el tamaño, área superficial, estabilidad, y la forma de las partículas afectan a la actividad antibacteriana de AgNPs (Rai y col 2012).

En contraste con las AgNPs, Williams y col (2006) demostraron que las AuNPs no afectan el crecimiento bacteriano ni su actividad funcional, pero conjugados de antibióticos (vancomicina/gentamicina) y AuNPs disminuyen el número de células bacterianas en crecimiento (Burygin y col 2009).

Para utilizar el método de difusión en disco se debe tomar en cuenta la capacidad de difusión del compuesto a evaluar, característica que no es fácil de determinar debido a que no se conocen con exactitud los componentes de las melaninas solubles y cuáles de éstos se unen a la superficie de las nanopartículas; también se

debe de tener en cuenta que en muchos de los casos donde utilizan este método para evaluar colocan cierto volumen en el disco y no una concentración específica de antimicrobiano por lo que los resultados pueden correr el riesgo de no ser reproducibles.

Los ensayos de susceptibilidad bacteriana basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin importar su tamaño, son insuficientes (Prat y General 2002), por lo que también se realizaron pruebas antibacterianas por el método de microdilución en caldo.

b Método de microdilución en caldo

Las AgNPs obtenidas por el método biológico presentaron valores de MIC de 7.5 y 15 $\mu\text{g/mL}$ y de MBC de 15 y 30 $\mu\text{g/mL}$; los que resultaron mayores al registrado para el AgNO_3 (MIC= 1.85, MBC= 7.5 $\mu\text{g/mL}$). Resalta la actividad de las AgNPs preparadas con melaninas de uvalama contra las cepas *Streptococcus* grupo A4, *Shigella dysenteriae*, y *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC=3.7 $\mu\text{g/mL}$, MBC=7.5 $\mu\text{g/mL}$); así como la de todas las AgNPs, obtenidas por el método biológico, contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC=1.85 y 3.7 $\mu\text{g/mL}$, MBC=3.7 y 7.5 $\mu\text{g/mL}$) **(Cuadro 11)**.

Las AuNPs preparadas con melanina de uvalama no fueron activas contras las bacterias evaluadas hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 11. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y bactericidas (MBC) ($\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de plata sintetizadas con melaninas obtenidas a temperatura de ebullición y parcialmente purificadas por diálisis¹

Microorganismo	AgNPs preparadas con melaninas solubles de						AgNO ₃		Antibiótico (GN ¹)	
	Ayale		Uvalama		Papache		MIC	MBC	MIC	MBC
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC				
<i>Streptococcus</i> grupo A-4	7.5	15	3.7	7.5	7.5	15	1.85	3.7	0.25	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	15	30	7.5	15	15	30	3.7	7.5	0.25	0.5
<i>Escherichia coli</i> A011	7.5	15	7.5	15	7.5	15	3.7	3.7	0.25	0.5
<i>Escherichia coli</i> A055	7.5	15	7.5	15	7.5	15	3.7	3.7	0.25	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	15	30	7.5	15	15	30	3.7	7.5	0.25	0.5
<i>Shigella dysenteriae</i>	7.5	15	3.7	7.5	7.5	15	3.7	3.7	0.25	0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7.5	15	7.5	15	7.5	15	3.7	3.7	1	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.85	3.7	3.7	7.5	3.7	7.5	3.7	3.7	0.25	0.5

GN¹ = Gentamicina

Las melaninas de los tres frutos no mostraron actividad antibacteriana evaluadas hasta 1 mg/mL.

Chen y col (2016) en su estudio prueban que las AgNPs sintetizadas con un polisacárido del hongo *Cordyceps sinensis* inhibieron completamente el crecimiento de *E. coli* (1.6 mg/mL) y *S. aureus* (0.8 mg/mL), valores más altos a los registrados en la presente investigación. Los resultados mostraron que las AgNPs pueden inhibir las bacterias Gram-negativas más que las bacterias Gram-positivas en consecuencia a su capa más delgada de peptidoglicanos en su estructura.

Soman y Ray (2016) en su estudio evaluaron la actividad antibacteriana de las AgNPs sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Ziziphus oenoplia* contra las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* siendo las más sensibles a las AgNPs (MIC = 7.8 µg/mL). En el mismo estudio, las micrografías de TEM mostraron que las AgNPs estaban presentes en la membrana celular y parecían estar unidas a la capa de lipopolisacárido de la pared celular, observándose una célula completamente desintegrada junto con AgNPs unidas a la membrana a las 24 h de incubación.

El enfoque más posible para la interacción AgNPs-bacterias podría implicar la alteración en la integridad estructural o cambios fisicoquímicos en la pared celular, lo que a su vez podría asociarse al cambio en la osmoregulación de la célula y causar la extrusión del material intracelular por la formación de fosas y agujeros en la membrana celular, lo que finalmente conduce a la muerte de la bacteria (Sondi y Salopek-Sondi 2004; Li y col 2013; Agnihotri y col 2014). También se sabe que el daño de *E. coli* dependió directamente de la concentración inicial de AgNPs utilizada.

En otro informe, los investigadores han observado que sólo las AgNPs con diámetro inferior a 10 nm son capaces de penetrar las bacterias. Al respecto, se

requieren de amplios estudios para dilucidar la ruta exacta del efecto biocida de las AgNPs (Morones y col 2005b).

3 Actividad antiparasitaria de nanopartículas metálicas contra el cestodo *Hymenolepis nana*

Las NPs, liofilizadas (25 mg/mL) y luego puestas en disolución, indujeron la parálisis (10-40 min) y muerte (15-90 min) del cestodo *H. nana* (**Cuadro 12**). Entre las AgNPs, las preparadas con melaninas solubles de papache indujeron mayor efecto que se vio reflejado en un menor tiempo de parálisis (10 min) y muerte (20 min), valores menores que los registrados para Praziquantel (20 mg/mL) con 20 y 30 min, respectivamente. También es importante resaltar que para las NPs preparadas con melaninas de uvalama, tuvieron un efecto menor en los parásitos induciendo mayores tiempos de parálisis y muerte (40 y 90 min) que las de AuNPs (28 y 40 min).

Las NPs preparadas por el método químico no fue posible liofilizarlas y preparar una disolución a concentración peso volumen (p/v) determinada, por tal motivo se tomó 1 mL de la disolución de NPs químicas preparadas en fresco y se expuso a *Hymenolepis nana* con esta disolución como se indica en materiales y métodos. Los céstodos al entrar en contacto con la disolución de NPs incrementaron su movilidad como manifestación del daño que sufrían, dicha movilidad fue incluso mayor que la presentada en el control. En el experimento donde se evaluaron las NPs liofilizadas, las AgNPs preparadas con melaninas solubles de papache mostraron los menores tiempos de parálisis (3 min) y muerte (10 min).

Cuadro 12. Actividad contra *Hymenolepis nana* de nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs), liofilizadas o en disolución, preparadas con melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa (ayale, uvalama y papache)¹

Muestra	Concentración (mg / mL)	Tempo (min)	
		Parálisis	Muerte
Liofilizadas²			
AgNPs-Ayale	25	30	60
AgNPs-Uvalama	25	40	90
AgNPs-Papache	25	10	15
AuNPs- Uvalama	25	28	40
Praziquantel	20	20	30
Solución³			
	Volumen (mL)		
AgNPs-Papache ⁴	1	3	10
AgNPs Químicas	1	5	12
AuNPs-Uvalama ⁵	1	8	15
AuNPs- Químicas	1	7	15

¹ Las melaninas de los tres frutos no mostraron actividad antiparasitaria evaluadas hasta 25 mg/mL.

² Liofilizadas: muestra a la cual se le eliminó prácticamente la totalidad del agua libre.

³ Solución: muestra evaluada en estado líquido, sin modificaciones después de terminada la reacción.

AgNPs-Papache⁴ 1.1351 mg/mL

AuNPs-Uvalama⁵ 403.3µg/mL

Las AgNPs y AuNPs preparadas por el método químico, así como las AuNPs preparadas con melaninas solubles de uvalama presentaron tiempos de parálisis y muerte similares (**Cuadro 12**).

Los parásitos tratados con las NPs se tiñeron con azul de Evan's para establecer la muerte del parásito (color azul) (**Figura 25**). En las evaluaciones con NPs liofilizadas, no se observaron grandes diferencias respecto al daño causado en los parásitos tratados con AgNPs, en los tres casos se presentó daño estructural en escólex, cuello y proglótidos grávidos; sin embargo el parásito tratado con AuNPs mostró su principal daño en tegumento, proglótidos maduros, y aumento de tamaño del escólex.

En la **Figura 26** se observa que los parásitos al estar en contacto directo con las AgNPs biológicas presentaron mayor daño estructural en comparación con el inducido por las AgNPs químicas; observándose mayor daño en escólex (**a**), tegumento (**b**) y estróbilo o proglótidos grávidos (**c**). Mientras que en las AuNPs biológicas y químicas no se observó diferencia en el daño del cestodo entre los tratamientos aplicados; ambos causaron daño estructural en el parásito (**d**), en escólex (**e**) y proglótidos grávidos (**f**).

Las AgNPs preparadas usando el extracto acuoso del fruto *Momordica charantia* presentaron actividad antiparasitaria contra el helminto *Pheretima posthuma*, los tiempos de parálisis (6 min) y muerte (10 minutos) (Rashid y col 2016) fueron similares a los registrados para las AgNPs sintetizadas con melaninas dializadas de

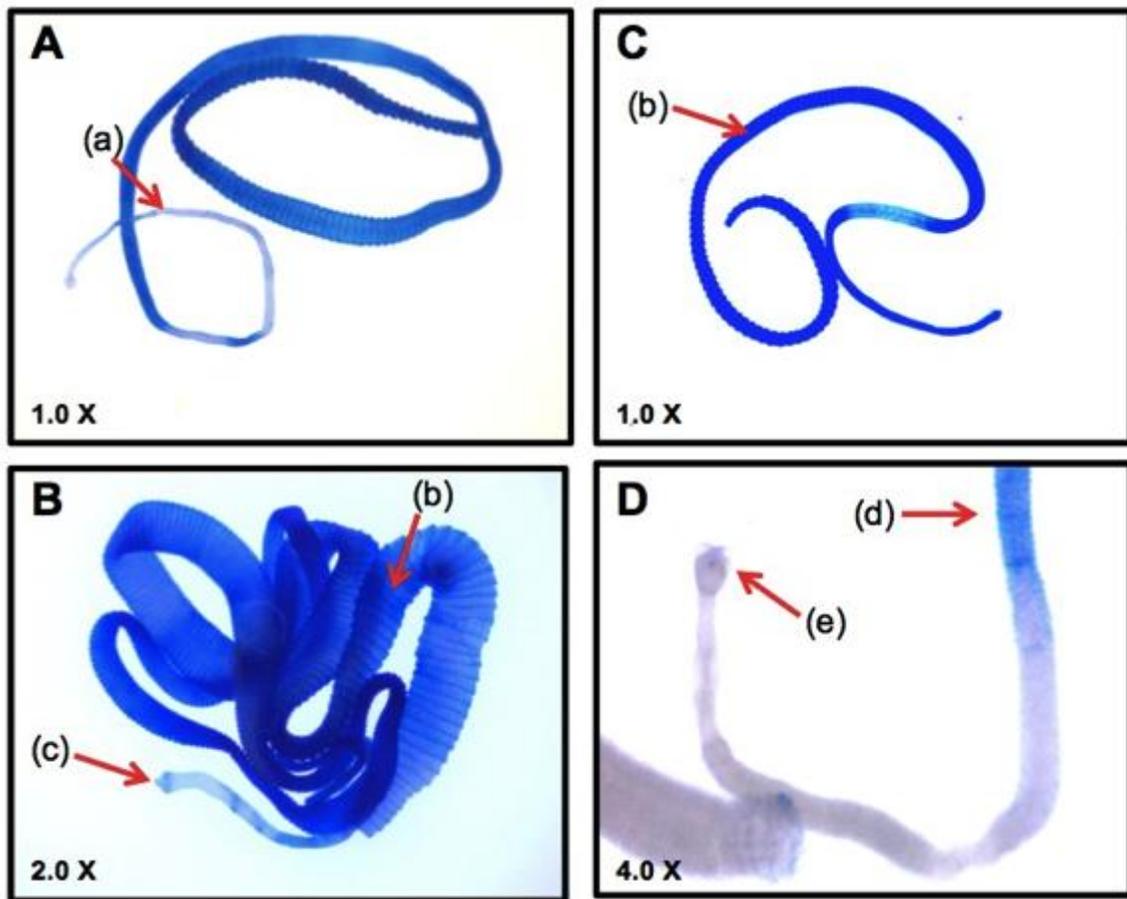


Figura 25. Efecto antiparasitario de las nanopartículas de plata sintetizadas con melanina de ayale (60 min) **(A)**, uvalama (90 min) **(B)** y papache (15 min) **(C)**, y nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas de uvalama **(D)**, evaluadas a 25 mg/mL. En las imágenes se observan alteraciones morfológicas y daño en diversas regiones del parásito; aparente daño estructural **(a)**, en tegumento **(b)** y escólex **(c)** y daño en los proglótidos inmaduros **(d)**, además de un incremento en el volumen del escólex **(e)**.

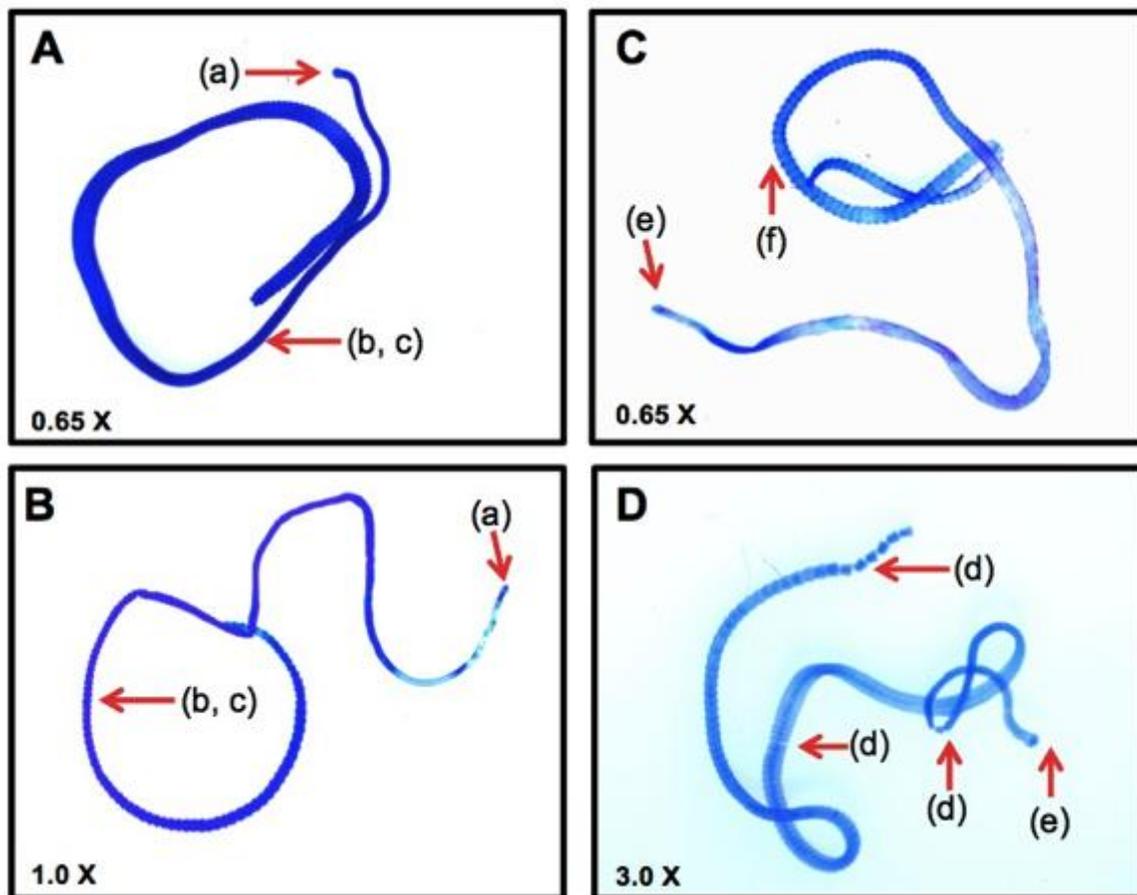


Figura 26. Efecto antiparasitario de las nanopartículas de plata evaluadas en solución sintetizadas con melanina de **(A)** papache (15 min) y **(B)** NaBH_4 como reductor químico (15 min) y nanopartículas de oro sintetizadas con melaninas de **(C)** uvalama (15 min) y **(D)** CTS (15 min) como reductor químico, por medio de la tinción positiva con azul de Evans. En las imágenes se observan alteraciones morfológicas y daño en diversas regiones del parásito; tanto en escólex **(a)**, tegumento **(b)** y estróbilo **(c)**. Mientras que las nanopartículas de oro causaron daño estructural en el parásito **(d)**, en escólex **(e)** y proglótidos grávidos **(f)**.

papache (10-15 min); sin embargo, en contraste a la concentración empleada por Rashid y col (2016) (50 mg/mL), en esta investigación se evaluó a 25 mg/mL; adicionalmente, el extracto de *Momordica charantia* por si solo indujo la parálisis y muerte (17 – 35 min) del helminto, mientras que las melaninas solubles de los tres frutos de la presente investigación fueron inofensivas contra *H. nana*.

El mecanismo de los efectos inhibitorios de los iones Ag sobre microorganismos es parcialmente conocido. Diversos estudios señalan que la carga positiva del ión de plata es la responsable de la actividad antimicrobiana, ya que puede interaccionar con la membrana celular de microorganismos que está cargada negativamente. Por otra parte, algunos de los frutos tienen en su estructura moléculas como glucósidos, saponinas, alcaloides, azúcares reductores, resinas, constituyentes fenólicos, aceites fijos y ácidos libres. Estos fitoquímicos pueden unirse con proteínas libres en el tracto gastrointestinal o glicoproteína en la cutícula del parásito y causar su muerte. Por lo que la actividad antihelmíntica combinada de extractos de frutos y AgNPs puede ser más efectiva que su efecto individual (Hamouda y col 2001; Dibrov y col 2002; Liu y col 2009a; Rashid y col 2016).

En un estudio donde sintetizaron AgNPs a partir de un extracto acuoso de *Acacia auriculiformis* probaron la actividad antiparasitaria contra el parásito *Setaria cervi* en donde el ensayo reveló que altas dosis de AgNPs producen más ROS promoviendo la apoptosis celular ocasionando distorsión y daño en la membrana del parásito y con ello su muerte (Saini y col 2016).

Por otro lado, las AuNPs sintetizadas empleando extractos del hongo *Nigrospora oryzae* son activas contra el parásito intestinal *Raillietina echinobothrida*, induciendo tiempos de parálisis y muerte en el rango de 1.5 a 2.5 h (Kar y col 2014), valores significativamente mayores que los tiempos registrados en este trabajo.

Los céstodos son parásitos de cuerpo blando y el tegumento es su única interfaz con el medio circundante, está involucrada en diversas funciones fisiológicas tales como digestión y absorción. Nuestros resultados sugieren que las AuNPs afectan la fisiología de *H. nana* e inducen su parálisis y muerte. Probablemente, los cambios estructurales inducidos en el tegumento del parásito por las AuNPs estén asociados a la inhibición de la síntesis de proteínas o a cambios de permeabilidad a lo largo de su tegumento (Anderson y Fairweather 1995; Roy y Tandon 1996; Tandon y col 1997; Kar y col 2014).

4 Toxicidad de nanopartículas metálicas contra *Artemia salina*

Las nanopartículas metálicas (Ag – Au) se evaluaron con las muestras liofilizadas y en solución. Las AgNPs sintetizadas por el método biológico presentaron toxicidad en el ensayo de *Artemia salina* (**Cuadro 13**), las más tóxicas fueron las de ayale ($CL_{50} = 61.6 \mu\text{g/mL}$), las de papache mostraron baja toxicidad ($CL_{50} = 414.19 \mu\text{g/mL}$), y con las de uvalama la toxicidad fue mínima ($CL_{50} = 826.91 \mu\text{g/mL}$). Las AuNPs sintetizadas con MS de uvalama no presentaron toxicidad contra *Artemia salina* (CL_{50}

Cuadro 13. Toxicidad de las nanopartículas de plata y oro obtenidas por el método biológico (*i.e.*, empleando melaninas solubles de ayale, uvalama y papache) y químico. Las nanopartículas en solución, recién preparadas, se evaluaron en una relación 1:1 (v/v) al mezclarlas con el agua artificial de mar (MMA).

Nanopartículas	Número de larvas		Letalidad (%)	
	Muertas	Vivas		
Plata				
Ayale	3	7	30	
Uvalama	9	1	90	
Papache	2	8	20	
Químicas	0	10	0	
AgNO ₃ ¹	10	0	100	
Oro				
Uvalama	10	0	100	
Químicas	0	10	0	
HAuCl ₄ ²	1	9	10	
Control	MMA ³	0	10	0

¹ AgNO₃ (1x10⁻² M)

² HAuCl₄ (1x10⁻⁴ M)

³ MMA: medio marino artificial (38 mg NaCl/ mL)

>1 mg/mL). Las melaninas solubles de los tres frutos resultaron inocuas en este ensayo ($CL_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$).

El ensayo con las NPs preparadas en fresco y en solución, mostró claras diferencias entre las AgNPs; las sintetizadas por el método químico fueron inocuas y las más tóxicas fueron las sintetizadas con la melanina soluble de uvalama (90 %), asimismo se encontró que el precursor AgNO_3 fue extremadamente tóxico (100 %) en el ensayo (**Cuadro 13**). En el caso de las AuNPs, las químicas y el precursor HAuCl_4 fueron inocuos; mientras que las AuNPs preparadas con la melanina de uvalama fueron extremadamente tóxicas (100 %) (**Cuadro 13**). Sin embargo es importante mencionar que el medio de cultivo para *Artemia salina* contiene una alta concentración de sal, provocando la precipitación de las nanopartículas y de las melaninas que quedaron en la solución final, sobre todo de aquellas donde se utilizaron melaninas de uvalama ya que son las menos solubles, lo que probablemente esté interfiriendo con el resultado final, ya que la muerte de las larvas de *Artemia salina* pudo deberse al arrastre de las larvas al momento de la precipitación y no por la toxicidad de la muestra (**Cuadro 13**).

En la literatura es posible encontrar datos de NPs con mayor y menor toxicidad, en el ensayo de *A. salina*, que la registrada en la presente investigación. Las AgNPs formadas con extracto crudo de *Bergenia ciliata* presentaron un CL_{50} de 33.92 mg/mL (Phull y col 2016). En otro estudio, AgNPs preparadas con el extracto del alga marina *Turbinaria conoides* mostraron un CL_{50} de 88.91 $\mu\text{g/mL}$ (Vijayan y col 2014).

Karthik y col (2013) estudiaron el efecto de la toxicidad de las AuNPs contra *Artemia salina*, sin registrarse mortalidad hasta 8 mg/ L de nanopartículas de oro, en el estudio no se mencionaron los controles negativos y positivos.

Los efectos citotóxicos de las nanopartículas hacia las larvas del camarón pueden estar relacionados con la actividad anticancerígena y las nanopartículas podrían ser fuente alternativa de fármacos contra el cáncer (Ghareeb y col 2014; Kummara y col 2016). También se destaca que las AgNPs biosintetizadas pueden utilizarse como un agente antibiótico respetuoso del medio ambiente contra los microorganismos marinos formadores de biopelículas y así evitar la sucesión ecológica (Vijayan y col 2014).

VIII CONCLUSIONES

- 1 Las melaninas solubles extraídas de los frutos ayale (*Crescentia alata* Kunth), uvalama (*Vitex mollis*) y papache (*Randia echinocarpa equinocarpa* Sessé et Mociño) sirven como agentes reductores y estabilizadores para la síntesis de nanopartículas metálicas.
- 2 Las melaninas solubles de uvalama resultaron mejores agentes reductores/estabilizadores para la síntesis de nanopartículas de plata y sólo con ellas se pudieron obtener nanopartículas de oro.
- 3 Las características fisicoquímicas (*i.e.*, forma, tamaño y dispersión) de las nanopartículas de plata y oro sintetizadas con melaninas solubles resultaron similares a las de las nanopartículas sintetizadas por el método químico; las nanopartículas de oro sintetizadas con las melaninas solubles de uvalama presentaron mayor diversidad de formas, aunque predominaron las esféricas.
- 4 La actividad antioxidante por DPPH y FRAP de las nanopartículas de plata y oro sintetizadas con melaninas solubles fue relativamente baja en comparación con la actividad de estos compuestos extraídos de frutos silvestres de Sinaloa.
- 5 Las melaninas solubles de frutos silvestres de Sinaloa no presentaron actividad antibacteriana, pero las nanopartículas de plata sintetizadas con estos compuestos inhibieron el crecimiento de las ocho cepas patógenas evaluadas. En contraste, las nanopartículas de plata y oro sintetizadas por el método químico no presentaron actividad antibacteriana.

- 6 La actividad contra el parásito *Hymenolepis nana* de las nanopartículas de plata y de oro sintetizadas por el método biológico fue similar a la registrada para las obtenidas por el método químico.
- 7 Los resultados de las pruebas de toxicidad obtenidos en el ensayo con *Artemia salina* no son concluyentes y se requieren estudios adicionales.
- 8 Los resultados obtenidos en las pruebas de actividad antibacteriana y antiparasitaria de las nanopartículas metálicas sintetizadas por el método biológico con melaninas solubles extraídas de frutos silvestres de Sinaloa indican que tienen potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3(2):302-303.
- Abdel-Aziz MS, Shaheen MS, El-Nekeety AA, Abdel-Wahhab MA. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society* 18(4):356-363.
- Aghajanyan AA, Asaturian RA, Hambardzumyan AA, Sargsyan LB, Hovsepyan AS, Vardanyan AH, Saghyan AS. 2011. Obtaining of water soluble microbial melanin and study of its some properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47(5):500-506.
- Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Royal Society of Chemistry Advances* 4(8):3974-3983.
- Ahmad N, Sharma S, Singh V, Shamsi S, Fatma A, Mehta BR. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: a novel approach towards weed utilization. *Biotechnology Research International* 2011:454090.
- Ahmad T, Irfan M, Bustam MA, Bhattacharjee S. 2016. Effect of reaction time on green synthesis of gold nanoparticles by using aqueous extract of *Elaeis Guineensis* (oil palm leaves). *Procedia Engineering* 148:467-472.
- Ahmed M, Nasir A, Kavidul-Nur M. 2014. Traditional knowledge and formulations of medicinal plants used by the traditional medical practitioners of Bangladesh to treat schizophrenia like psychosis. *Schizophrenia Research and Treatment* 2014:1-10.

- Ahmed S, Annu, Ikram S, Yudha SS. 2016a. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 161:141-153.
- Ahmed S, Saifullah, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. 2016b. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 9(1):1-7.
- Al-Bahrani R, Raman J, Lakshmanan H, Hassan AA, Sabaratnam V. 2017. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria. *Materials Letters* 186:21-25.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Grimstone A. 2010. *Molecular Biology of the Cell*. (5th. edition). New York, United State of America. 210-210 p.
- Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, Rafailovich M. 2011. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine* 10.2147/IJN.S23883:6: 2705-2714.
- Alvarez RAB, Cortez-Valadez M, Bueno LON, Britto Hurtado R, Rocha-Rocha O, Delgado-Beleño Y, Martinez-Nuñez CE, Serrano-Corrales LI, Arizpe-Chávez H, Flores-Acosta M. 2016. Vibrational properties of gold nanoparticles obtained by green synthesis. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 84:191-195.
- Anaelom NJ, Ikechukwu OJ, Sunday EW, Nnaemeka UC. 2010. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *Journal of Public Health and Epidemiology* 2(6):118-124.
- Anderson H, Fairweather I. 1995. *Fasciola hepatica*: ultrastructural changes to the tegument of juvenile flukes following incubation *in vitro* with the deacetylated

- (amine) metabolite of diamphencthide. *International Journal for Parasitology* 25(3):319-333.
- Ankamwar B. 2010. Biosynthesis of gold nanoparticles (green-gold) using leaf extract of *Terminalia Catappa*. *Journal of Chemistry* 7(4):1334-1339.
- Antonio-Núñez J, Abad-Guzmán A. 2010. Usos y beneficios de la planta del morro. México. Disponible en <http://www.acmor.org.mx/sites/default/files/931-usos-y-beneficios.pdf>.
- Arenas S. 2004. Etnobotánica y usos potenciales del cirión (*Crescentia alata*, H.B.K.) en el Estado de Morelos. *Polibotánica* 18:13-31.
- Ash LR, Orihel TC. 2010. *Parasites: a guide to laboratory procedures and identification*. 5 ed. Madrid, España: American Society of Clinical Pathologists Press. 525 p.
- Ávalos A, Haza AI, Morales P. 2013. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 7(2):1-23.
- Ayaz Ahmed KB, Subramanian S, Sivasubramanian A, Veerappan G, Veerappan A. 2014. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 130:54-58.
- Baghizadeh A, Ranjbar S, Gupta VK, Asif M, Pourseyedi S, Karimi MJ, Mohammadinejad R. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *Journal of Molecular Liquids* 207:159-163.
- Balakumaran MD, Ramachandran R, Balashanmugam P, Mukeshkumar DJ, Kalaichelvan PT. 2016. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles:

- Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. *Microbiological Research* 182(2016):8-20.
- Balashanmugam P, Durai P, Balakumaran MD, Kalaichelvan PT. 2016. Phytosynthesized gold nanoparticles from *C. roxburghii* DC. leaf and their toxic effects on normal and cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 165(2016):163-173.
- Bautista Hernández S. 2015. Efecto del tamaño de gota y HLB (balance hidrófilo-lipófilo) en la bioaccesibilidad de nanoemulsiones de paprika (*Capsicum annuum* L.). Xalapa, Veracruz: Universidad Veracruzana 69 p.
- Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D. 2009. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71(1):113-118.
- Belizario VY, Totanes FIG, de Leon WU, Lumampao YF, Ciro RNT. 2011. Soil-transmitted helminth and other intestinal parasitic infections among school children in indigenous people communities in Davao del Norte, Philippines. *Acta tropica. The Diagnostics and Control of Neglected Tropical Helminth Diseases*. 120(1):S12-S18.
- Bell A, Wheeler M. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24:411-451.
- Benelli G. 2016. Plant-synthesized nanoparticles: an eco-friendly tool against mosquito vectors? Springer International Publishing Switzerland: *Nanoparticles in the Fight Against Parasites, Parasitology Research Monographs* 8. 155-172 p.
- Benzie IF, Szeto YT. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2):633-636.

- Benzie-Iris F, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay *Analytical biochemistry* 0292(239):70-76.
- Bernard G, Lucht W, Niedermeyer M, Snapper J, Ogletree M, Brigham K. 1984. Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *Journal of Clinical Investigation* 73(6):1772.
- Bhainsa KC, D'souza S. 2006. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 47(2):160-164.
- Bhambure R, Bule M, Shaligram N, Kamat M, Singhal R. 2009. Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using *Aspergillus niger* characterization and stability. *Chemical Engineering & Technology* 32(7):1036-1041.
- Bhushan B. 2007. Introduction to Nanotechnology. Introduction to Nanotechnology. Chapter 1. 3 ed. United States of America: Springer.
- Biblioteca Digital U. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana "*Crescentia alata Kunth*". Disponible en http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ciria_n_o_cuatecomate&id=7347. Marzo.
- Bilinska B. 1996. Progress of infrared investigations of melanin structures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 52(9):1157-1162.
- Bindhu M, Rekha PV, Umamaheswari T, Umadevi M. 2014. Antibacterial activities of *Hibiscus cannabinus* stem-assisted silver and gold nanoparticles. *Materials Letters* 131:194-197.

- Bindhu MRU, M. 2015. Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 10.1016/j.saa.2014.07.045:135: 373-378.
- Biología. Id. 2010. "*Crescentia alata* Kunth - IBUNAM:MEXU:PVsn12255". México. Disponible en <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn12255>. Abril.
- Black J. 1996. *Microbiology. Principles and Applications*. (3 edition). New Jersey, United States of America: Prentice-Hall Inc. Simon and Shuster.
- Brand-Williams M, Cuvelier E, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28:25-30.
- Burygin GL, Khlebtsov BN, Shantrokha AN, Dykman LA, Bogatyrev VA, Khlebtsov NG. 2009. On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 4(8):794-801.
- Cai F, Li J, Sun J, Ji Y. 2011. Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chemical Engineering Journal* 175:70-75.
- Calzada F, Meckes M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Contreras A, Mata R. 1998. Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology* 36 (5): 305-309.
- Cano Á, Stevenson PR. 2009. Floristic composition and diversity of three forest types at Caparú, Vaupús Biological Station. *Colombia Forestal* 12(1):63-80.
- Cano-Campos MC, Díaz-Camacho SP, Uribe-Beltrán MJ, López-Angulo G, Montes-Avila J, Paredes-López O, Delgado-Vargas F. 2011. Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extract from the fruit of *Randia*

- echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene. Food Research International 2011(44):3087–3093.
- CDC. 2013. Parasites - Hymenolepiasis (also known as *Hymenolepis nana* infection). Global Health - Division of Parasitic Diseases. 10 January 2010 ed. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.
- Chamie J. 2016. En 2015 murieron 57 millones de personas. Disponible en <http://www.ipsnoticias.net/2016/01/en-2015-murieron-57-millones-de-personas/>. 7 de Diciembre.
- Chandrasekhar M, Nagesha C. 2003. Intestinal helminthic infestation in children. Indian Journal of Pathology & Microbiology 46(3):492-494.
- Chen X, Yan J-K, Wu J-Y. 2016. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared with a fungal exopolysaccharide in water. Food Hydrocolloids 53:69-74.
- Chin Y, Jones W, Rachman I, Riswan S, Kardono L, Chai H, Farnsworth N, Cordell G, Swanson S, Cassady J, Kinghorn A. 2006. Cytotoxic lignans from the stems of *Helicteres hirsuta* collected in Indonesia. Phytotherapy Research 20(1):62-65.
- Chízar-Fernandez C. 2009. Plantas comestibles de centroamérica. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. Disponible en <http://www.museocostarica.go.cr/descargas/PlantasComestiblesCA-VE.pdf>.
- Chowdhury NR, MacGregor-Ramiasa M, Zilm P, Majewski P, Vasilev K. 2016. 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. Journal of Colloid and Interface Science 482:151-158.
- CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 8 ed. Wayne, Pennsylvania, United State of America: Clinical and Laboratory Standards Institute. p. 2-87.

- CONABIO. 2000a. *Crescentia alata* Kunth. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info.../10-bigno1m.pdf>.
- CONABIO. 2000b. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. p. 103.
- CONABIO. 2008. Importancia de la diversidad biológica México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/importancia_db.html.
- CONABIO. 2009a. Biodiversidad Mexicana: ¿Qué es la biodiversidad? México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.html. 1 Diciembre 2016.
- CONABIO. 2009b. Crucillo chino (*Randia echinocarpa*). México: Catálogo taxonómico de especies de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/CAT.html>.
- CONABIO-CONANP-SEMARNAT. 2008. Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal y las Áreas Protegidas, Objetivos y metas. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Cuevas-Juárez E, Yuriar-Arredondo KY, Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Páz Díaz-Camacho S, Delgado-Vargas F. 2014. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods* 9:78-88.

- Dahl JA, Maddux BL, Hutchison JE. 2007. Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews* 107(6):2228-2269.
- Daniel S, Kumar R, Sathish V, Sivakumar M, Sunitha S, Sironmani TA. 2011. Green synthesis (*Ocimum tenuiflorum*) of silver nanoparticles and toxicity studies in Zebra Fish (*Danio rerio*) model. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2:103-117.
- Dash SS, Bag BG, Hota P. 2015. *Lantana camara* Linn leaf extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity. *Applied Nanoscience* 5(3):343-350.
- Delgado-Vargas F, Félix-Favela F, Pío-León J, López-Angulo G, López-Valenzuela J, Díaz-Camacho S, Uribe-Beltrán M. 2010. Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of *Vitex mollis* fruit. *International Journal of Green Pharmacy* 4(4):288-291.
- Della-Cioppa G, Garger SJ, Sverlow GG, Turpen TH, Grill LK. 1990. Melanin production in *Escherichia Coli* from a cloned Tyrosinase gene. *Nature* 8(8):768.
- Dhamecha D, Jalalpure S, Jadhav K. 2016. *Nepenthes khasiana* mediated synthesis of stabilized gold nanoparticles: Characterization and biocompatibility studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 154:108-117.
- Dhand V, Soumya L, Bharadwaj S, Chakra S, Bhatt D, Sreedhar B. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C* 58:36-43.
- Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC. 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(8):2668-2670.

- Dong C, Zhang X, Cai H, Cao C. 2016. Green synthesis of biocompatible silver nanoparticles mediated by *Osmanthus fragrans* extract in aqueous solution. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics* 127(22):10378-10388.
- Dubey SP, Lahtinen M, Sillanpää M. 2010. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry* 45(7):1065-1071.
- Dwivedi AD, Gopal K. 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 369(1-3):27-33.
- Dwivedi AD, Ma LQ. 2014. Biocatalytic synthesis pathways, transformation, and toxicity of nanoparticles in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44(15):1679-1739.
- Dzimitrowicz A, Berent S, Motyka A, Jamroz P, Kurcbach K, Sledz W, Pohl P. 2016a. Comparison of the characteristics of gold nanoparticles synthesized using aqueous plant extracts and natural plant essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. *Arabian Journal of Chemistry* 10.1016/j.arabjc.2016.09.007.
- Dzimitrowicz A, Jamróz P, diCenzo GC, Sergiel I, Kozlecki T, Pohl P. 2016b. Preparation and characterization of gold nanoparticles prepared with aqueous extracts of *Lamiaceae* plants and the effect of follow-up treatment with atmospheric pressure glow microdischarge. *Arabian Journal of Chemistry* 10.1016/j.arabjc.2016.04.004.
- Edison TJI, Sethuraman MG. 2012. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochemistry* 47(9):1351-1357.

- El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, Hassib A. 2006. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine* 13(5):324-333.
- Elumalai EP, T. Hemachandran, J. Viviyan, S. Therasa, S. Thirumalai, T. David E. 2010. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. *Journal of Pharmaceutical Science & Research* 2(9):549-554.
- FAO. 2006. Los bosques y la aparición de nuevas enfermedades infecciosas en los seres humanos. Los bosques y la salud humana en las zonas tropicales: algunas conexiones importantes. United State of America: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fatimah I. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Parkia speciosa* Hassk pods assisted by microwave irradiation. *Journal of Advanced Research* 7(6):961-969.
- Feachem RG, Guy MW, Harrison S, Iwugo KO, Marshall T, Mbere N, Muller R, Wright AM. 1983. Excreta disposal facilities and intestinal parasitism in urban Africa: preliminary studies in Botswana, Ghana and Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77(4):515-521.
- Ferreira-Guerrero E. 2011. Enfermedades infecciosas. México: Instituto Nacional de Salud Pública. Disponible en <http://www.insp.mx/avisos/2712-msp-enfermedades-infecciosas.html>. Marzo.
- Finney DJ. 1971. *Probit Analysis*: 3d Ed. Cambridge University Press.
- Flores-Islas E. 1999. Flora silvestre de Sinaloa su fenología y relación económica. Mazatlán, Sinaloa, México: Gobierno del estado de Sinaloa.
- Gamboa MI, Navone GT, Orden AB, Torres MF, Castro LE, Oyhenart EE. 2011. Socio-environmental conditions, intestinal parasitic infections and nutritional

status in children from a suburban neighborhood of La Plata, Argentina. *Acta tropica. The Diagnostics and Control of Neglected Tropical Helminth Diseases.* 118(3):184-189.

Gandhimathi S, Bai GVS. 2013. *In Vitro* antioxidant activity of *Randia dumetorum* Lam leaf extract. *International Journal of Herbal Medicine* 1(4):107-111.

Ganjewala D, Kannan P. 2009. Preliminary characterization of melanin isolated from fruits and seeds of *Nyctanthes arbor-tristis*. *Journal of Scientific Research* 1(3):655-661.

Ghaffari-Moghaddam M, Hadi-Dabanlou R. 2014. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Crataegus douglasii* fruit extract. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(2):739-744.

Ghareeb MA, Hussein A, Hassan M, Laila A, Mona A, Amal M. 2014. Antioxidant and cytotoxic activities of *Tectona grandis* Linn. leaves. *International Journal of Phytopharmacology* 5:143-157.

Ghodake GS, Deshpande NG, Lee YP, Jin ES. 2010. Pear fruit extract-assisted room-temperature biosynthesis of gold nanoplates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(2):584-589.

Goncalves RC, Lisboa HC, Pombeiro-Sponchiado SR. 2012. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4):1467-1474.

Gopinath K, Gowri S, Karthika V, Arumugam A. 2014. Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*. *Journal of Nanostructure in Chemistry* 4(115):1-11.

Gopinath K, Kumaraguru S, Bhakyaraj K, Mohan S, Venkatesh KS, Esakkirajan M, Kaleeswarran P, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Govindarajan M, Benelli G,

- Arumugam A. 2016. Green synthesis of silver, gold and silver/gold bimetallic nanoparticles using the *Gloriosa superba* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activities. *Microbial Pathogenesis* 101(2016):1-11.
- Gordon M. Cragg DJN, and Kenneth M. Snader. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Natural Products Branch* 60:52-60.
- Greenfield H, Southgate D. 2003. Datos de composición de alimentos y bases de datos de composición de alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Gupta AK, Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26(18):3995-4021.
- Hajdu Z, Hohmann J, Forgo P, Martinek T, Dervarics M, Zupko I, Falkay G, Cossuta D, Mathe I. 2007. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research* 2(4):391-394.
- Hamilton A. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity & Conservation* 13(8):1477-1517.
- Hamilton DK, Lawrence A. 2006. Toward a sustainable herbal harvest: A work in hand. *Hormone crosstalk in plants*. National Institutes of Health. 43:32-35.
- Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih AY, Reuter JD, Baker JR. 2001. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research* 156(1):1-7.
- Harborne J. 1984. *Methods of plant analysis. Phytochemical methods*. New York, USA: Chapman and Hall: Springer. p. 1-36.

- Harker D. 2011. Concepts of nanochemistry by Ludovico Cademartiri and Geoffrey A. Ozin: Scope: monograph. Level: undergraduate and postgraduate. United State of America: John Wiley & Sons.
- Harki E, Talou T, Dargen R. 1996. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber mehnosporum* Vitt. Food Chemistry 58(1-2):69-73.
- Harris J, Cottrell S, Plummer S, Lloyd D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology 57(3):282-286.
- Haytham M. 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representation microorganism. Journal of Radiation Research and Applied Science 8:265-275.
- Hernández C, Aguilera M, Castro G. 2011. Gastrointestinal diseases, situation in Mexico. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 31:137-151.
- Herrera-Becerra R, Zorrilla C, Rius JL, Ascencio JA. 2008. Electron microscopy characterization of biosynthesized iron oxide nanoparticles. Applied Physics A 91(2):241-246.
- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N. 2007. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. Nanotechnology 18(10):105104.
- Huang S, Pan Y, Gan D, Ouyang X, Tang S, Ekunwe SIN, Wang H. 2011. Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans*. Medicinal Chemistry Research 20(4):475-481.

- Hung Y, Sava C, Hong V, Huang G. 2004. Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn. *Life Sciences* 74(16):2037-2047.
- INEGI. 2013. Estadísticas a propósito del día internacional de las personas de edad avanzada. México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Iravani S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry* 13(10):2638.
- Islam NU, Jalil K, Shahid M, Rauf A, Muhammad N, Khan A, Shah MR, Khan MA. 2015. Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. *Arabian Journal of Chemistry* 10.1016/j.arabjc.2015.06.025.
- Jamdagni P, Khatri P, Rana JS. 2016. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science* 10.1016/j.jksus.2016.10.002.
- Jayaseelan C, Ramkumar R, Rahuman AA, Perumal P. 2013. Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity. *Industrial Crops and Products* 45:423-429.
- Jiménez-Sierra C, Sosa-Ramírez Jn, Cortés-Calva P, Breceda-Solís Cm, Iñiguez-Dávalos L, Ortega-Rubio A. 2014. Mexico a megadiverse country and the importance of natural protected areas. *Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 22(60):16-22.
- Joy Prabu H, Johnson I. 2015. Plant-mediated biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Tragia involucrata*, *Cymbopogon citronella*, *Solanum verbascifolium* and *Tylophora ovata*. *Karbala International Journal of Modern Science* 1(4):237-246.

- Kandimalla R, Kalita S, Saikia B, Choudhury B, Singh YP, Kalita K, Dash S, Kotoky J. 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *Randia dumetorum* Lam. leaf and bark via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Frontiers in Pharmacology* 10.3389/fphar.2016.00205.
- Kannana N, Mukunthana K, Balajia S. 2011. A comparative study of morphology, reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86:378-383.
- Kappagoda S, Singh U, Blackburn B. 2011. Antiparasitic therapy. *Mayo Clinic Proceedings* 86(6):561-583.
- Kar P, Murmu S, Saha S, Tandon V, Acharya K. 2014. Anthelmintic efficacy of gold nanoparticles derived from a phytopathogenic fungus, *Nigrospora oryzae*. *PLoS One* 9(1):e84693.
- Karthik L, Kumar G, Keswani T, Bhattacharyya A, Reddy BP, Rao KB. 2013. Marine actinobacterial mediated gold nanoparticles synthesis and their antimalarial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9(7):951-960.
- Keat CL, Aziz A, Eid AM, Elmarzugi NA. 2015. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing* 2(47):2-11.
- Kejzar A, Gobec S, Plemenitas A, Lenassi M. 2013. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology* 117(5):368-379.
- Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. 2003. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B* 107(3):668-677.
- Kereste J, Venger LA, inventores; Google Patents, cesionario. 2003. Biologically active fraction of vegetable melanin, process for its production and its use.

- Khalilzadeh MA, Borzoo M. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using onion extract and their application for the preparation of a modified electrode for determination of ascorbic acid. *Journal of Food and Drug Analysis* 24(4):796-803.
- Khamhaengpol A, Siri S. 2016. Fluorescent light mediated a green synthesis of silver nanoparticles using the protein extract of weaver ant larvae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 163:337-344.
- Kharat SN, Mendhulkar VD. 2016. "Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Elephantopus scaber* leaf extract". *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 62:719-724.
- Kikuchi H, Yuan B, Yuhara E, Imai M, Furutani R, Fukushima S, Hazama S, Hirobe C, Ohyama K, Takagi N. 2014. Involvement of histone H3 phosphorylation via the activation of p38 MAPK pathway and intracellular redox status in cytotoxicity of HL-60 cells induced by *Vitex agnus-castus* fruit extract. *International Journal of Oncology* 45(2):843-852.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3(1):95-101.
- Koch A. 1990. Growth and form of the bacterial cell wall. *American Scientist* 78(4):327-342.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8(6):423-435.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130(5):797-810.

- Korbekandi H, Iravani S, Abbasi S. 2009. Production of nanoparticles using organisms. *Critical Reviews in Biotechnology* 29(4):279-306.
- Korytowski W, Hintz P, Sealy R, Kalyanaraman B. 1985. Mechanism of dismutation of superoxide produced during autoxidation of melanin pigments. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 131:640-659.
- Korytowski W, Kalyanaraman B, Menon I, Sarna T, Sealy R. 1986. Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 882(145):53-62.
- Krishnaswamy K, Vali H, Orsat V. 2014. Value-adding to grape waste: green synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Food Engineering* 142:210-220.
- Kumar VP, Bano D, Mohan S, Singh D, Kumar H, Syed H. 2016a. Sunlight-induced green synthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Polyalthia longifolia* and its antioxidant activity. *Materials Letters* 181(2016):371–377.
- Kumar VP, Brajesh, Smita, Kumari, Debut, Alexis, Cumbal, Luis. 2016b. Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 26(9):2363-2371.
- Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 107(2):182-188.
- Kummara S, Patil MB, Uriah T. 2016. Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles - A comparative study. *Biomedicine Pharmacotherapy* 84:10-21.
- Kummara Swamy M, Sudipta KM, Jayanta K, Balasubramanya S. 2014. The green synthesis, characterization, and evaluation of the biological activities of silver

nanoparticles synthesized from *Leptadenia reticulata* leaf extract. *Applied Nanoscience* 5(1):73-81.

Kunjiappan S, Chowdhury R, Bhattacharjee C. 2014. A green chemistry approach for the synthesis and characterization of bioactive gold nanoparticles using *Azolla microphylla* methanol extract. *Frontiers of Materials Science* 8(2):123-135.

Kuppusamy P, Ichwan SJ, Parine NR, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. 2015. Intracellular biosynthesis of Au and Ag nanoparticles using ethanolic extract of *Brassica oleracea* L. and studies on their physicochemical and biological properties. *Journal of Environmental Sciences* 29:151-157.

Kvitek L, Panáček A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Holecova M, Zboril R. 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C* 112(15):5825-5834.

Lancheros RJ, Beleño JÁ, Guerrero CA, Godoy-Silva RD. 2014. Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum* 19(2):161-168.

Lanly J-P. 2003. Los factores de la deforestación y de la degradación de los bosques. Québec, Canadá.

Lateef A, Azeez M, Asafa T, Yekeen T, Akinboro A, Oladipo I, Azeez L, Ajibade S, Ojo S, Gueguim-Kana E, Beukes L. 2016. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using a pod extract of *Cola nitida*: Antibacterial and antioxidant activities and application as a paint additive. *Journal of Taibah University for Science* 10(4):551-562.

Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown Jr GE. 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology* 46(13):6900-6914.

- Li J, Rong K, Zhao H, Li F, Lu Z, Chen R. 2013. Highly selective antibacterial activities of silver nanoparticles against *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 13(10):6806-6813.
- Liu J-Q, Chen J-C, Wang C-F, Qiu M-H. 2009a. New cucurbitane triterpenoids and steroidal glycoside from *Momordica charantia*. *Molecules* 14(12):4804-4813.
- Liu Q, Kong B, Jiang L, Cui X, Jing. 2009b. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 42(5):956-962.
- Liu Y, Kitts DD. 2011. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International* 44(8):2418-2424.
- Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo J. 2001. *Microbiología y parasitología médicas*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas:31-38.
- Londoño M. 2015. *Nanotechnology and nanomedicine: advances and promises for human health*. Medellín, Colombia: Biomédica, Insitituto Nacional de Salud.
- Longo D. 2012. *Harrison: principios de medicina interna* 18 ed. México: Sección 19: Infecciones por helmintos.
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry* 10.1016/j.arabjc.2014.11.050.
- López-Sotelo Y, Mejía-Montejo I. 2010. *Vitex mollis* Kunth propiedades y usos medicinales. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Disponible en http://www.tlahui.com/medic/medic31/nanche_perro.htm.

- Mahakham W, Theerakulpisut P, Maensiri S, Phumying S, Sarmah AK. 2016. Environmentally benign synthesis of phytochemicals-capped gold nanoparticles as nanoprimer agent for promoting maize seed germination. *Science of the Total Environment* 573:1089-1102.
- Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. 2005. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry* 280(2):984-990.
- Manikandan R, Manikandan B, Raman T, Arunagirinathan K, Prabhu NM, Jothi Basu M, Perumal M, Palanisamy S, Munusamy A. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 138:120-129.
- Manivasagan P, Venkatesan J, Senthilkumar K, Sivakumar K, Kim SK. 2013. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules* 58:263-274.
- Marcano D, Hasegawa M. 2002. *Fitoquímica Orgánica*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela:54-57.
- Mashwani ZU, Khan MA, Khan T, Nadhman A. 2016. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* 234:132-141.
- Mata R, Bhaskaran A, Sadras SR. 2016. Green-synthesized gold nanoparticles from *Plumeria alba* flower extract to augment catalytic degradation of organic dyes and inhibit bacterial growth. *Particuology* 24:78-86.

- McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N, Morris D. 2017. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment* 575:231-246.
- Medina LA. 2010. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. Mérida, Yucatán, México: Autodidacta. Revista de los profesionales de la Educación Extremadura. Disponible en http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf.
- Menchaca V, del Carmen M. 2013. Identificación parcial de principios activos de diez plantas medicinales del norte de México con actividad biológica contra bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45(5):31-34.
- Meyers MA, Mishra A, Benson DJ. 2006. Mechanical properties of nanocrystalline materials. *Progress in Materials Science* 51(4):427-556.
- Miri A, Sarani M, Rezazade Bazaz M, Darroudi M. 2015. Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 141(2015):287-291.
- Mondal S, Basu S, Begum NA, Mandal D. 2014. A brief introduction to the development of biogenic synthesis of metal nanoparticles. *Journal of Nano Research* 27:41-52.

- Montefiori DC, & Zhou, J. 1991. Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antiviral Research* 15(1):11-25.
- Montiel-Herrera M, Camacho-Hernández I, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F. 2004. Partial physicochemical and nutritional characterization of the fruit of *Vitex mollis* (Verbenaceae). *Journal of Food Composition and Analysis* 17:205- 215.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. 2005a. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10):2346-2353.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. 2005b. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16(10):2346.
- Muniyappan N, Nagarajan NS. 2014. Green synthesis of gold nanoparticles using *Curcuma pseudomontana* essential oil, its biological activity and cytotoxicity against human ductal breast carcinoma cells T47D. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2(4):2037-2044.
- Muthuvel A, Adavallan K, Balamurugan K, Krishnakumar N. 2014. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4(2):325-332.
- Nakkala JR, Mata R, Gupta AK, Sadras SR. 2014. Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract. *European Journal of Medicinal Chemistry* 85:784-794.
- Nanayakkara ND, Ager AL, Bartlett MS, Yardley V, Croft SL, Khan IA, McChesney JD, Walker LA. 2008. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl) amino]-6-

methoxy-4-methyl-5-[3, 4-dichlorophenoxy] quinoline succinate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(6):2130-2137.

Narayanan KB, Park HH. 2015. Homogeneous catalytic activity of gold nanoparticles synthesized using turnip (*Brassica rapa* L.) leaf extract in the reductive degradation of cationic azo dye. *Korean Journal of Chemical Engineering* 32(7):1273-1277.

Narayanan KB, Sakthivel N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* 156(1):1-13.

Nath S, Chakdar D, Gope G. 2007. Synthesis of CdS and ZnS quantum dots and their applications in electronics. *Nanotrends* 2(3):20-28.

Nayak D, Ashe S, Rauta PR, Kumari M, Nayak B. 2016. Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Materials Science and Engineering: C* 58:44-52.

Nazeruddin G, Prasad N, Prasad S, Shaikh Y, Waghmare S, Adhyapak P. 2014. *Coriandrum sativum* seed extract assisted in situ green synthesis of silver nanoparticle and its anti-microbial activity. *Industrial Crops and Products* 60:212-216.

NCCIH. 2015. *Complementary, Alternative, or Integrative Health: What's In a Name?* United States of America: National Center for Complementary and Integrative Health.

Noginov M, Zhu G, Bahoura M, Adegoke J, Small C, Ritzo B, Drachev V, Shalaev V. 2007. The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Applied Physics B* 86(3):455-460.

NOM-059-ECOL-2001. 2002. NORMA Oficial Mexicana. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y

- especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. En: Federación, DOdl, editor. México: Diario Oficial de la Federación.
- OMS. 2010. Medidas de control de infecciones en atención sanitaria de pacientes con enfermedades respiratorias agudas en entornos comunitarios. Guía para el instructor. Suiza: Organización Mundial de la Salud.
- OMS. 2011. Las enfermedades diarreicas agudas en las emergencias complejas: medidas esenciales. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud. p. 1-8.
- OMS. 2014. Estadísticas sanitarias mundiales 2014. Geneva, Switzerland: Organización Mundial de la Salud. p. 12.
- Opitz SEW, Smrke S, Goodman BA, Yeretian C. 2014. Methodology for the measurement of antioxidant capacity of coffee. 10.1016/b978-0-12-404738-9.00026-x:253-264.
- OPS. 2014. Los alimentos insalubres causan más de 200 enfermedades. United States of America: Organización Panamericana de la Salud. Disponible en http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10639%3Alos-alimentos-insalubres-causan-mas-de-200-enfermedades-&Itemid=1926&lang=es. 2015.
- Padilla-Salas R. 2003. Tesis de Maestría: Actividad antiparasitaria de frutos silvestres del estado de Sinaloa. [Obj]. Culiacán, Sinaloa, México: Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. p. 547.
- Padmalatha K, Jayaram K, Rajú N, Pradas M, Arora R. 2009. Ethnopharmacological and biotechnological significance of *Vitex*. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability. Global Science Books. 3(1):6-14.

- Pal NK, Kryschi C. 2015. A facile one-pot synthesis of blue and red luminescent thiol stabilized gold nanoclusters: a thorough optical and microscopy study. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(33):21423-21431.
- Patra JK, Kwon Y, Baek K-H. 2016. Green biosynthesis of gold nanoparticles by onion peel extract: Synthesis, characterization and biological activities. *Advanced Powder Technology* 27(5):2204-2213.
- Patra S, Mukherjee S, Barui AK, Ganguly A, Sreedhar B, Patra CR. 2015. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C* 53:298-309.
- Pattanayak S, Mollick MMR, Maity D, Chakraborty S, Dash SK, Chattopadhyay S, Roy S, Chattopadhyay D, Chakraborty M. 2015. *Butea monosperma* bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Characterization and biomedical applications. *Journal of Saudi Chemical Society* 10.1016/j.jscs.2015.11.004.
- Pennington T, Sarukhán J. 2005. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. Fondo de Cultura Económica.
- Pethakamsetty L, Kothapenta K, Nammi HR, Ruddaraju LK, Kollu P, Yoon SG, Pammi SVN. 2016. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros sylvatica*. *Journal of Environmental Sciences* 10.1016/j.jes.2016.04.027.
- Philip D, Unni C, Aromal SA, Vidhu VK. 2011. *Murraya Koenigii* leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 78(2):899-904.
- Phongtongpasuk S, Poadang S, Yongvanich N. 2016. Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia* 89:239-247.

- Phull A-R, Abbas Q, Ali A, Raza H, Kim SJ, Zia M, Haq I-u. 2016. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(1):31-36.
- Pierce BA. 2009. *Genética: Un enfoque conceptual*. sexta ed. México: Ed. Médica Panamericana.
- Pío-León JF. 2012. Caracterización química y actividad biológica- funcional del fruto de uvalama (*Vitex mollis* HBK) para establecer su potencial nutracéutico. Culiacán, Sinaloa, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 126 p.
- Pío-León JF, Díaz-Camacho S, López-López M, Uribe-Beltrán M, López-Ángulo G, Montes Ávila J, Delgado-Vargas FD. 2013. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(4):356-364.
- Pío-León JF, León-De la Luz J, Ortega-Rubio A. 2014. A new record of *Amoreuxia gonzalezii* (Bixaceae) for the Baja California peninsula, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85(2014):1269-1272.
- Pío-León JF, López-Angulo G, Vega-Aviña R, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. 2013. Caracterización fisicoquímica y nutricional de las semillas de *Ebenopsis caesalpinoides* (Standl.) Britton & Rose, planta nativa de Sinaloa, México. *CyTA - Journal of Food* 11(2):119-126.
- Pongsiri MJ, Roman J, Ezenwa VO, Goldberg TL, Koren HS, Newbold SC, Ostfeld RS, Pattanayak SK, Salkeld DJ. 2009. Biodiversity loss affects global disease ecology. *BioScience* 59(11):945-954.
- Poojary MM, Passamonti P, Adhikari AV. 2016. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using root bark extract of *Mammea suriga*: characterization,

process optimization, and their antibacterial activity. *BioNanoScience* 6(2):110-120.

Pourmortazavi SM, Taghdiri M, Makari V, Rahimi-Nasrabadi M. 2015. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136:1249-1254.

Prat S, General SB. 2002. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (1).

Prieto-González S, Garrido-Garrido G, González-Lavaut JA, Molina-Torres J. 2004. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas [internet]* 35(7).

Primack R. 2010. *Essentials of Conservation Biology*. 5 ed. United States of America: Sinauer Associates, Inc.

Qu J, Luo C, Hou J. 2011. Synthesis of ZnO nanoparticles from Zn-hyperaccumulator (*Sedum alfredii* Hance) plants. *Micro & Nano Letters, IET* 6(3):174-176.

Quihui L, Valencia ME, Crompton DW, Phillips S, Hagan P, Morales G, Diaz-Camacho SP. 2006. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health* 6:225.

Raghunandan D, Bedre MD, Basavaraja S, Sawle B, Manjunath SY, Venkataraman A. 2010. Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79(1):235-240.

Ragunathan L, Kalivaradhan SK, Ramadass S, Nagaraj M, Ramesh K. 2010. Helminthic infections in school children in Puducherry, South India. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 43(3):228-232.

- Rai M, Deshmukh S, Ingle A, Gade A. 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug - resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 112(5):841-852.
- Rai M, Kon K, Ingle A, Duran N, Galdiero S, Galdiero M. 2014. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(5):1951-1961.
- Rajan R, Chandran K, Harper SL, Yun S-I, Kalaichelvan PT. 2015. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products* 70:356-373.
- Ramos Gomez M, Castillo CG. 2011. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *ideas CONCYTEG* 72(6):630-649.
- Rashid MM, Ferdous J, Banik S, Islam MR, Uddin AH, Robel FN. 2016. Anthelmintic activity of silver-extract nanoparticles synthesized from the combination of silver nanoparticles and *M. charantia* fruit extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:242.
- Rathi Sre PR, Reka M, Poovazhagi R, Arul Kumar M, Murugesan K. 2015. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 135:1137-1144.
- Ravichandran V, Vasanthi S, Shalini S, Ali Shah SA, Harish R. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. *Materials Letters* 180(2016):264-267.
- Re PN, Proteggente Anna, Pannnala Ananth y Yang Min. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9):1231-1237.

- Reddy NJ, Nagoor Vali D, Rani M, Rani SS. 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* 34(2014):115-122.
- Ren Y, Yang H, Wang T, Wang C. 2016. Green synthesis and antimicrobial activity of monodisperse silver nanoparticles synthesized using *Ginkgo Biloba* leaf extract. *Physics Letters A* 380(45):3773-3777.
- Rice KC, Bayles KW. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(1):85-109.
- Roy B, Tandon V. 1996. Effect of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, a leguminous plant, on *Artyfechinostomum sufrartifex* and *Fasciolopsis buski*: a scanning electron microscopy study. *Parasitology Research* 82(3):248-252.
- Rzedows J. 1978. *Vegetación de México*. México: Limusa.
- Sadeghi B, Gholamhoseinpoor F. 2015. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 134(2015):310-315.
- Saikia JP, Paul S, Konwar BK, Samdarshi SK. 2010. Nickel oxide nanoparticles: a novel antioxidant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78(1):146-148.
- Saini P, Saha SK, Roy P, Chowdhury P, Sinha Babu SP. 2016. Evidence of reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis in *Setaria cervi* induced by green silver nanoparticles from *Acacia auriculiformis* at a very low dose. *Experimental Parasitology* 160:39-48.
- Sana Siva S, Badineni VR, Arla SK, Naidu Boya VK. 2015. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Grewia flaviscences* and study of their antimicrobial activity. *Materials Letters* 145:347-350.

- Sanabria-Galindo A, López S, Gualdrón R. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre artemia salina de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 26:15-19.
- Sánchez GR, Castilla CL, Gómez NB, García A, Marcos R, Carmona ER. 2016. Leaf extract from the endemic plant *Peumus boldus* as an effective bioproduct for the green synthesis of silver nanoparticles. *Materials Letters* 183:255-260.
- Sankar R, Rahman PKSM, Varunkumar K, Anusha C, Kalaiarasi A, Shivashangari KS, Ravikumar V. 2017. Facile synthesis of *Curcuma longa* tuber powder engineered metal nanoparticles for bioimaging applications. *Journal of Molecular Structure* 1129:8-16.
- Sankaranarayanan A, Munivel G, Karunakaran G, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Khaled JM, Kuznetsov D. 2016. Green Synthesis of silver nanoparticles using *Arachis hypogaea* (ground nut) root extract for antibacterial and clinical applications. *Journal of Cluster Science* 10.1007/s10876-016-1084-x.
- Santos-Cervantes ME, Ibarra-Zazueta ME, Loarca-Pina G, Paredes-Lopez O, Delgado-Vargas F. 2007. Antioxidant and antimutagenic activities of *Randia echinocarpa* fruit. *Plant Foods for Human Nutrition* 62(2):71-77.
- Saravanakumar A, Ganesh M, Jayaprakash J, Jang HT. 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cassia tora* leaf extract and its antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 10.1016/j.jiec.2015.03.003.
- Sathishkumar G, KJ. P, Vignesh V, Rajkuberan C, Jeyaraj M, Selvakumar M, Rakhi J, Sivaramakrishnan S. 2016. Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids* 215:229-236.
- Sathishkumar M, Sneha K, Won S, Cho C, Kim S, Yun Y. 2009. *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of

- nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73(2):332-338.
- Sava VM, Hung YC, Blagodarsky VA, Hong MY, Huang GS. 2003. The liver-protecting activity of melanin-like pigment derived from black tea. *Food Research International* 36(5):505-511.
- Sava VY, S. 2001. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry* 73: 177-184.
- Şeker Karatoprak G, Aydın G, Altınsoy B, Altinkaynak C, Koşar M, Ocsoy I. 2017. The effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme and Microbial Technology* 97:21-26.
- Semarnat. 2012. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. En: naturales, Sdmayr, editor. México. p. 361.
- Seniuk G, L, Beketova, G, Savichuk, H, Rytik, P, Kucherov, I, Prilutskay A, & Prilutsky A. 2010. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (Aphyllophoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13:7–18.
- Shankar PD, Shobana S, Karuppusamy I, Pugazhendhi A, Ramkumar VS, Arvindnarayan S, Kumar G. 2016. A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 95:28-44.
- Shankar S, Jaiswal L, Aparna R, Prasad R. 2014. Synthesis, characterization, *in vitro* biocompatibility, and antimicrobial activity of gold, silver and gold silver alloy nanoparticles prepared from *Lansium domesticum* fruit peel extract. *Materials Letters* 137:75-78.

- Siddiqui H, Al-Wahaibi M, Mohammad F. 2015. Nanotechnology and Plant Sciences. Switzerland: Springer International Publishing.
- Silva LM, Hill LE, Figueiredo E, Gomes CL. 2014. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: synthesis, characterization, and antimicrobial activity. Food Chemistry 165:362-370.
- Silva T, Jefferson R, MN. M, Batista M, Agra C. 2006. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy 17(1):35-38.
- Sinave DGE S. 2013. Información Epidemiológica de Morbilidad. Anuario Ejecutivo 2012. En: Epidemiología, DGd, editor. México: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.
- Sinha SN, Paul D, Halder N, Sengupta D, Patra SK. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity. Applied Nanoscience 5(6):703-709.
- Smith L. 2001. Ecología. Pearson Educación (No. 574.5S662e). 6 ed. Madrid, España. p. 62 – 64.
- Solano F. 2014. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. New Journal of Science 2014:1-28.
- Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medica 59(3):250-252.
- Soman S, Ray JG. 2016. Silver nanoparticles synthesized using aqueous leaf extract of *Ziziphus oenoplia* (L.) Mill: Characterization and assessment of antibacterial activity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 163:391-402.

- Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275(1):177-182.
- Song JyK, B. 2008. Biological synthesis of bimetallic Au/Ag nanoparticles using Persimmon (*Diopyros kaki*) leaf extract. *Korean Journal of Chemical Engineering* 25(4):808-811.
- Soriano J, Domènech G, Martínez M, Mañes J, Soriano F. 2011. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine* 28(3):557-562.
- SS. 2012. Perfil epidemiológico de las enfermedades infecciosas intestinales. En: Salud, Sd, editor. México: Secretaría de Salud. p. 2-93.
- Stankus DP, Lohse SE, Hutchison JE, Nason JA. 2010. Interactions between natural organic matter and gold nanoparticles stabilized with different organic capping agents. *Environmental Science & Technology* 45(8):3238-3244.
- Stettler M, Rossignol JF, Fink R, Walker M, Gottstein B, Merli M, Theurillat R, Thormann W, Dricot E, Segers R. 2004. Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. *International Journal for Parasitology* 34(5):615-624.
- Sun S, Zhang X, Chen W, Zhang L, Zhu H. 2016. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties. *Food Chemistry* 196:486-492.
- Swain S, Barik SK, Behera T, Nayak S, Sahoo S, Mishra S, Swain P. 2016. Green synthesis of gold nanoparticles using root and leaf extracts of *Vetiveria zizanioides* and *Cannabis sativa* and its antifungal activities. *BioNanoScience* 6(3):205-213.

- Swami A SJ, Gadde S, Votruba A, Kolishetti N, and Farokhzad O. 2012. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications. Chapter 2. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. Springer:9-15.
- Swartz H, Sarna T, Zecca L. 1992. Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Annals of Neurology* 32(1992):69-75.
- Tahir K, Nazir S, Li B, Khan AU, Khan ZUH, Gong PY, Khan SU, Ahmad A. 2015. *Nerium oleander* leaves extract mediated synthesis of gold nanoparticles and its antioxidant activity. *Materials Letters* 156:198-201.
- Tandon V, Pal P, Roy B, Rao H, Reddy K. 1997. *In vitro* anthelmintic activity of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, an indigenous plant in Shillong, India. *Parasitology Research* 83(5):492-498.
- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(2):257-262.
- Thatoi P, Kerry RG, Gouda S, Das G, Pramanik K, Thatoi H, Patra JK. 2016. Photo-mediated green synthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of two mangrove plant species, *Heritiera fomes* and *Sonneratia apetala* and investigation of their biomedical applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 163:311-318.
- Tilman D. 2000. Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Macmillan Magazines*:4.
- Tulodziecka A, Szydłowska-Czerniak A. 2016. Development of a novel gold nanoparticle-based method to determine antioxidant capacity of Brassica oilseeds, white flakes and meal. *Food Chemistry* 208:142-149.

- Uddin G, Rauf A, Arfan M, Ali M, Qaisar M, Saadiq M, Atif M. 2012. Preliminary phytochemical screening and antioxidant activity of *Bergenia caliata*. Middle East Journal of Scientific Research 11(8):1140-1142.
- UNAM. 2009a. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *Randia echinocarpa* Moc. & Sessé. México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional de Mexicana. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Grangel&id=7557>.
- UNAM. 2009b. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *Vitex mollis* kunth. México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Coyotomate&id=7941>.
- Urán ME, Cano LE. 2008. Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. Infectio 12:128-148.
- Uribarren Berrueta T. 2014. Hymenolepiasis o Himenolepiosis. UNAM. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/hymenolepiosis.html>. Marzo.
- Valverde P. 2012. Contribución al conocimiento del árbol de cirián (*Crescentia alata* Kunth) variabilidad, selección, morfología, citogenética y fitoquímica. [Doctorado]. Texcoco, México: Insitución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. 212 p.
- Van Gelder C, Flurkey W, Wichers H. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phytochemistry 45(7):1309-1323.

- Vega-Aviña R. 2001. Flora del municipio de Culiacán, Sinaloa (México): un estudio preliminar para evaluar futuras áreas de protección. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vega-Aviña R, Villaseñor-Ríos J. 2001. Catálogo preliminar de la flora de Sinaloa. Listados florísticos de Culiacán Sinaloa.2-20. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfL057.pdf>.
- Velmurugan P, Anbalagan K, Manosathyadevan M, Lee KJ, Cho M, Lee SM, Park JH, Oh SG, Bang KS, Oh BT. 2014a. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37(10):1935-1943.
- Velmurugan P, Lee SM, Cho M, Park JH, Seo SK, Myung H, Bang KS, Oh BT. 2014b. Antibacterial activity of silver nanoparticle-coated fabric and leather against odor and skin infection causing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(19):8179-8189.
- Vijayan SR, Santhiyagu P, Singamuthu M, Kumari Ahila N, Jayaraman R, Ethiraj K. 2014. Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, *Turbinaria conoides*, and their antimicrofouling activity. *The Scientific World Journal* 2014:938272.
- Vorkapic D, Matsoukas T. 1998. Effect of temperature and alcohols in the preparation of titania nanoparticles from alkoxides. *Journal of the American Ceramic Society* 81(11):2815-2820.
- Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Biological Chemistry and Molecular Pharmacology* 406:775-781.
- Wang G, Shi C, Zhao N, Du X. 2007. Synthesis and characterization of Ag nanoparticles assembled in ordered array pores of porous anodic alumina by chemical deposition. *Materials Letters* 61(18):3795-3797.

- WHO. 2001. Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos: resumen. Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos: resumen. United State of America: World Health Organization.
- WHO. 2013. Traditional medicine strategy: 2014-2023. Complementary therapies. Complementary therapies. Hong Kong, China: World Health Organization. p. 76.
- WHO. 2014a. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: World Health Organization. p. 256.
- WHO. 2014b. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, Suiza: World Health Organization.
- WHO. 2014c. The top 10 causes of death. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Marzo.
- WHO. 2016. Vector-borne diseases. United States of America: World Health Organization.
- Williams DN, Ehrman SH, Pulliam Holoman TR. 2006. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology* 10.1186/1477-3155-4-3.
- Yamasaki T, Kawabata T, Masuoka C, Kinjo J, Ikeda T, Nohara T, Ono M. 2007. Two new lignan glucosides from the fruit of *Vitex cannabifolia*. *Journal of Natural Medicines* 62(1):47-51.
- Yao Z, Qi J, Wang L. 2012. Isolation, fractionation and characterization of melanin-like pigments from chestnut (*Castanea mollissima*) shells. *Journal of Food Science* 77(6):C671-676.

- Yu J, Xu D, Guan HN, Wang C, Huang LK, Chi DF. 2016. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles using *Citrus maxima* aqueous extracts and its catalytic activity. *Materials Letters* 166:110-112.
- Yuan C-G, Huo C, Yu S, Gui B. 2017. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Capsicum annuum* var. *grossum* pulp extract and its catalytic activity. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 85:19-26.
- Zhang M, Xiao G, Thring RW, Chen W, Zhou H, Yang H. 2015. Production and Characterization of Melanin by Submerged Culture of Culinary and Medicinal Fungi *Auricularia auricula*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(1):253-266.
- Zhang Z, Chen H, Xing C, Guo M, Xu F, Wang X, Gruber HJ, Zhang B, Tang J. 2011. Sodium citrate: A universal reducing agent for reduction / decoration of graphene oxide with au nanoparticles. *Nano Research* 4(6):599-611.
- Zhu X, Tian S, Cai Z. 2012. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One* 7(9):e46286.

ABREVIATURAS

AA	Actividad antioxidante
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
b.s.	Base seca
Col	Colaboradores
DLS	Dispersión de luz dinámica
DL ₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.E.	Desviación estándar
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ENT	Enfermedades no transmisibles
<i>e.g.</i>	Por ejemplo
EE.UU.	Estados Unidos de América
E.T.	Equivalentes de Trolox
<i>g</i>	Fuerza G
IR	Espectroscopía Infrarroja
IC ₅₀	Concentración de inhibición media/necesaria para inhibir el 50%
<i>i.e.</i>	Mientras que
IPD	índice de polidispersidad
LQPN	Laboratorio de Química de Productos Naturales
MBC	Concentración mínima bactericida
MePP	Melaninas parcialmente purificadas

MePPD-TE	Melanina parcialmente purificada por diálisis a temperatura de ebullición
MePPU-TE	Melanina parcialmente purificada por ultrafiltración a temperatura de ebullición
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MMA	Medio marino artificial
MS	Melaninas solubles
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
MWCO	Molecular weight cut-off/tamaño de corte referente al peso molecular
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
p/v	Peso/volumen
PBS	Solución amortiguadora de sodio y fosfatos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Transmitancia
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
U.A.	Unidades de absorbancia
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV-Vis	Espectroscopía Uv-visible

V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
X	Distancia focal referente a un dispositivo fotográfico
λ_{\max}	Banda de absorción máxima en espectroscopía Uv-Vis