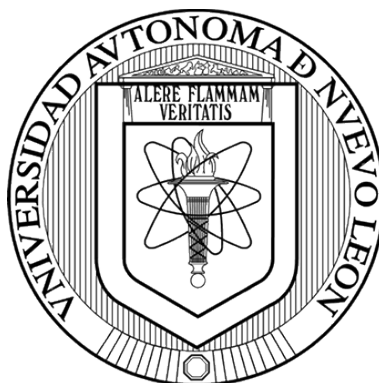


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Ambrosia artemisiifolia* (Linneo, C., 1753) EN LAS LÍNEAS CELULARES A549 Y HEPG2.

POR

JENNIFER CITLALLY LEOS RIVERA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA.

2022

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Ambrosia artemisiifolia* (Linneo, C., 1753) EN LAS LÍNEAS
CELULARES A549 Y HEPG2.**

Comité de Tesis



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Presidente



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



Dra. Diana Elía Caballero Hernández

Vocal



Dr. Moisés Armides Franco Molina

Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Ambrosia artemisiifolia* (Linneo, C., 1753) EN LAS LÍNEAS
CELULARES A549 Y HEPG2.**

Dirección de Tesis



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Director

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.



Este trabajo de investigación llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

I. AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL

Agradezco al laboratorio de Inmunología y Virología, a la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindarme la oportunidad, equipos, material y ayuda en el desarrollo de este trabajo de investigación. De igual forma le agradezco a la Dra. Diana Caballero y al Dr. Pablo Zapata por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mis padres y hermanas

A mi padre Juan José Leos Lomelí, a madre María Esther Rivera Guerrero, a mis hermanas Karen, Cinthya y a mi sobrina Nahomi por ser siempre mi apoyo incondicional, porque en momentos de grandes decisiones han estado a mi lado y han confiado siempre en mí.

A la Dra. Diana Ginette Zarate Triviño

No tengo palabras para agradecerle todo lo que usted hace por mí, gracias por creer en mí, por darme ese voto de confianza, por abrirme las puertas de su laboratorio y mostrarme que en la vida las oportunidades solo se dan una vez en la vida y siempre hay que aprovecharlas, gracias por todo.

Al Dr. Moisés Armides Franco Molina

Gracias doctor por creer en mí, darme siempre ánimos para seguir y ayudarme a darme cuenta de que, si puedo hacer las cosas, por enseñarme que leyendo y practicando todo se puede, por su tiempo, sus atenciones, conocimientos, consejos, bromas y por todo su apoyo, gracias por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Laboratorio 18

Gracias a mi compañero Bruno por ayudarme y ser un buen compañero de maestría, por soportarme y estar ahí para mí. Agradezco a Silvia y a Bety por apoyarme tanto en mis experimentos como en mi vida personal. Gracias al Dr. Menchaca por ayudarme con el análisis de mis muestras por AFM y por último quiero agradecer a mis compañeros del L-18 Raúl, Nayeli, Allende, Armando, especialmente a Gerardo y Emilio por apoyarme en mis experimentos.

I. DEDICATORIAS

A mis padres y a mis hermanas, gracias por todo....

II. ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	20
2	ANTECEDENTES	22
2.1	Medicina tradicional.....	22
2.2	Material vegetal: <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	23
2.2.1	Generalidades	23
2.2.2	Descripción taxonómica y hábitat.	24
2.2.3	Aspectos fitoquímicos	24
2.2.4	Evaluaciones de las actividades biológicas de <i>A. artemisiifolia</i>	26
2.3	Modernización de la medicina tradicional.....	28
2.4	Nanotecnología.....	29
2.4.1	Nanopartículas metálicas	30
2.4.2	Síntesis verde de nanopartículas	30
2.4.3	Síntesis verde de nanopartículas usando plantas	31
2.4.4	Síntesis de nanopartículas de oro a partir de extractos vegetales.....	33
2.5	Nanopartículas de oro y sus aplicaciones como agentes antioxidantes y antiinflamatorios	33
2.5.1	Inflamación.	33
2.5.2	Proceso de inflamación	34
2.5.3	Mediadores inflamatorios	34
2.5.4	Propiedades antiinflamatorias de las AuNps.....	35
3	JUSTIFICACIÓN	38
4	HIPÓTESIS	39
5	OBJETIVOS	40
5.1	Objetivo general	40

5.2	Objetivos específicos.....	40
6	MATERIAL Y MÉTODOS	41
6.1	Obtención de extractos.....	41
6.1.1	Ensayos fitoquímicos para la determinación de metabolitos secundarios .	41
6.2	Síntesis de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	43
6.3	Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de un extracto etanólico de <i>A. artemisiifolia</i> (AuNPs-Aa).	43
6.3.1	Plasmón de resonancia superficial (PRS) por espectroscopía UV-Vis.	43
6.3.2	Análisis de tamaño por Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z.	44
6.3.3	Análisis de tamaño y morfología por Microscopía de fuerza atómica (AFM).	44
6.3.4	Difracción de rayos X (XRD)	44
6.3.5	Espectroscopía infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR).....	45
6.3.6	Ensayo de hemólisis	45
6.4	Mantenimiento de cultivo celular.	46
6.5	Ensayo de viabilidad en células A549 y HepG2.	46
6.6	Ensayo de actividad antioxidante en las líneas celulares A549 y HepG2.....	47
6.6.1	Ensayo antioxidante de MTT	47
6.6.2	Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	47
6.6.3	Óxido nítrico	48
6.6.4	Evaluación de la activación de Nfr2 en las líneas celulares A549 y HepG2. 48	
6.7	Ensayo de actividad antiinflamatoria en células A549 y HepG2.....	49
6.7.1	Evaluación de la activación de NF-κB en las líneas celulares A549 y HepG2.....	49

6.7.2	Determinación de la presencia de citocinas antiinflamatorias.....	50
6.8	Análisis estadístico	50
7	RESULTADOS.....	52
7.1	Identificación de metabolitos secundarios por un análisis fisicoquímico del extracto etanólico de <i>A. artemisiifolia</i>	52
7.2	Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de un extracto etanólico de <i>Ambrosia artemisiifolia</i> (AuNPs-Aa).	53
7.2.1	Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis.	53
7.2.2	Análisis por Dispersión de luz dinámica (DLS) de tamaño, PDI, Potencial Z	53
7.2.3	Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	54
7.2.4	Difracción de rayos X (XRD)	55
7.2.5	Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier.....	55
7.2.6	Actividad hemolítica.....	57
7.3	Efecto de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de <i>Ambrosia artemisiifolia</i> en las líneas celulares A549 y HepG2.....	58
7.4	Ensayo de actividad antioxidante en las líneas celulares A549 y HepG2.....	59
7.4.1	Ensayo antioxidante de MTT	59
7.4.2	Efecto de AuNps-Aa en la producción de especies reactivas de oxígeno..	60
7.4.3	Efecto de AuNps-Aa en la producción de óxido nítrico.....	63
7.4.4	Evaluación de la activación de Nfr2 en las líneas celulares A549 y HepG2.	64
7.5	Ensayo de actividad antiinflamatoria en las líneas celulares A549 y HepG2. ...	67
7.5.1	Evaluación de la activación de NF- κ B en las líneas celulares A549 y HepG2.	67
7.5.2	Determinación del perfil de citocinas antiinflamatorias.....	68

8. DISCUSIÓN	72
9. CONCLUSIONES	78
10. PERSPECTIVAS	79
11. BIBLIOGRAFÍA	80

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamizaje Fitoquímico de tres especies de plantas con usos medicinales <i>Salvia</i> , <i>Altamisa</i> y <i>Venturosa</i>	25
Tabla 2. Resultados del análisis fitoquímico preliminar .;Error! Marcador no definido.	
Tabla 3. Análisis por Dispersión de luz dinámica (DLS) de tamaño, PDI, Potencial Z en varios intervalos de tiempo.	;Error! Marcador no definido.

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especímenes de <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	24
Figura 2. Principales compuestos aislados de <i>A. artemisiifolia</i>	25
Figura 3. La combinación de estos compuestos naturales con la nanotecnología puede promover la modernización.....	29
Figura 4. Nanopartículas verdes de plata y oro: enfoques de síntesis biológica y potencial para aplicaciones biomédicas	31
Figura 5. Esquema de síntesis verde de nanopartículas usando extracto de plantas	32
Figura 6. Inflamación y microambiente inflamatorio.	34
Figura 7. Mecanismo antiinflamatorio adoptado por AuNps	37
Figura 8. Análisis del espectro UV-vis de AuNps-Aa.	53
Figura 9. En la microscopía de fuerza atómica (AFM).	54
Figura 10. Patrones de difracción de rayos X (XRD) de AuNps-Aa.....	55
Figura 11. Espectros IR del EOH-Aa y AuNPs-Aa.....	56
Figura 12. Actividad hemolítica del EOH-Aa y las AuNps-Aa.....	57
Figura 13. Porcentaje de viabilidad en la línea celular A549 por el ensayo de MTT	58
Figura 14. Porcentaje de viabilidad en la línea celular HepG2 por el ensayo de MTT ..	59
Figura 15. Actividad antioxidante del extracto de <i>A. artemisiifolia</i> y las AuNps-Aa mediante ensayo MTT.	60
Figura 16. Producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular A549 sin estímulo y con estímulo de LPS.....	61
Figura 17. Producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular HepG2 sin estímulo y con estímulo de LPS.....	62
Figura 18. Producción de óxido nítrico en la línea celular A549 sin estímulo y con estímulo de LPS.	63
Figura 19. Producción de óxido nítrico en la línea celular HepG2 sin estímulo y con estímulo de LPS.	64
Figura 20. Expresión por inmunocitoquímica del factor Nfr2 en la línea celular A549.	65
Figura 21. Evaluación del área porcentual para determinar la expresión del factor Nfr2 en la línea celular A549.	65

Figura 22. Expresión por inmunocitoquímica del factor Nfr2 en la línea celular HepG2	66
Figura 23. Evaluación del área porcentual para determinar la expresión del factor Nfr2 en la línea celular HepG2.....	66
Figura 24. Expresión por inmunocitoquímica del factor NFκB subunidad p65 en la línea celular A549.....	67
Figura 25. Expresión por inmunocitoquímica del factor NFκB subunidad p65 en la línea celular HepG2	68
Figura 26. Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 por citometría de flujo en la línea celular A549	69
Figura 27. Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 por citometría de flujo en la línea celular HepG2.....	70

V. LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AuNps	Nanopartículas de oro
AuNPs-Aa	Nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto de <i>Ambrosia artemisiifolia</i> .
AuNps-Cs	Nanopartículas de oro sintetizadas a partir de citrato de sodio
A549	Células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano
CC	Concentración citotóxica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EOH-Aa	Extracto etanoólico de <i>Ambrosia artemisiifolia</i>
FBS	Suero fetal bovino
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
HepG2	Células epiteliales humanas de carcinoma hepatocelular
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón gamma
LPS	Lipopolisacárido
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol)
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer fosfatos
PDI	Índice de polidispersidad
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SPR	Plasmón de resonancia
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV-Vis	Espectroscopía UV-Vis
XRD	Difracción de rayos X
PZ	Potencial Z

1. RESUMEN

La medicina tradicional es el conocimiento, habilidad o práctica en el uso de compuestos de origen vegetal, animal o mineral, a los cuales se le atribuyen propiedades medicinales. Artemisa (*Ambrosia artemisiifolia*) es una planta medicinal utilizada como una alternativa en el tratamiento empírico de enfermedades como cáncer, malaria, diabetes, entre otras, debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria. Una forma en la que se ha buscado potenciar el empleo de la medicina tradicional es a través de modificaciones empleando nanotecnología. Las nanopartículas de oro (AuNps) se han estudiado como agentes antiinflamatorios y se han sintetizado usando extractos de plantas medicinales como agentes reductores de sales metálicas, mejorando su acción biológica. En este trabajo se obtuvo un extracto etanólico de Artemisa y se identificó la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos-esteroides, saponinas, fenoles, taninos, sequiterpenos, glucósidos, flavonoides y alcaloides. Posteriormente, se sintetizaron las nanopartículas de oro a partir del extracto (AuNps-Aa), con la finalidad de potenciar la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Las AuNps-Aa se caracterizaron por espectroscopía UV-visible donde se observó una banda de absorción a 546 nm comprobando la presencia de partículas metálicas de oro, el tamaño promedio se analizó por dispersión de luz dinámica (DLS) y fue de 88.2 nm con un PDI de 0.2 y un potencial z de -16 mV al día uno, estos tamaños se confirmaron por microscopía de fuerza atómica (AFM) y se observó una morfología casi esférica. El patrón de difracción de rayos X (XRD) mostró picos de reflexión a los 38,10 °, 44,13 ° grados de 2 θ . En el análisis de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) se observó un corrimiento correspondiente al modo de vibración relacionado con el grupo carboxilo presente en el extracto de *A. artemisiifolia* (EOH-Aa), indicando interacciones químicas con el ácido cloro áurico H₂AuCl₄. Se determinó la actividad antioxidante de EOH- Aa y AuNps-Aa empleando bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la actividad hemolítica. Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y hepatocarcinoma humana HepG2 fueron tratadas con diferentes concentraciones de AuNps-Aa y se obtuvo una curva dosis respuesta, posteriormente, se analizó la producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno

en las líneas celulares tratadas con AuNps-Aa, estimuladas con LPS y empleando como control comercial dexametasona. Se determinó la expresión de los factores de transcripción p65 y Nfr2 y finalmente se determinó el perfil de citoquinas Th1/Th2. Los resultados mostraron que AuNps-Aa aumentaron la actividad antiinflamatoria incluso después de inducir inflamación con LPS, disminuyendo la producción de NO, ROS, citoquinas inflamatorias y expresión de p65.

2. ABSTRACT

Traditional medicine is understood as all knowledge, skill, or practice in the use of compounds of plant, animal, or mineral origin, to which medicinal properties are attributed. Artemisa (*Ambrosia artemisiifolia*) is one of the medicinal plants used as an alternative in the empirical treatment of various diseases such as cancer, malaria, diabetes, among others, due to its antioxidant and anti-inflammatory activity. One way in which the use of traditional medicine has been enhanced, sought, is through modifications using nanotechnology. Gold nanoparticles (AuNps) have been studied as anti-inflammatory agents and have been synthesized using medicinal plant extracts as precursor metal salts reducing agents, improving their biological action. In this work, an ethanolic extract of Artemisa was obtained, in which the presence of secondary metabolites such as triterpenes-steroids, saponins, phenols, tannins, sesquiterpenes, glycosides, flavonoids and alkaloids was identified. Subsequently, gold nanoparticles were synthesized from the extract (AuNps-Aa), with the aim of enhancing their antioxidant and anti-inflammatory activity. The AuNps-Aa were characterized by UV-visible spectroscopy where an absorption band at 546 nm was discovered, confirming the presence of metallic gold particles, the average size was analyzed by Dynamic Light Scattering (DLS) and was 88.2 nm with a PDI of 0.2 and a z-potential of -16 mV at day one, these sizes were confirmed by atomic force microscopy (AFM) and a nearly spherical morphology was found. The X-ray diffraction (XRD) pattern showed reflection peaks at 38.10°, 44.13° degrees of 2 θ . In the infrared spectroscopy (FT-IR) analysis, a shift corresponding to the vibration mode related to the carboxyl group present in the extract of *Ambrosia artemisiifolia* (EOH-Aa) was demonstrated, indicating chemical interactions with chloroauric acid HauCl_4 . The antioxidant activity of EOH-Aa and AuNps-Aa using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and hemolytic activity are recommended. Cell lines of lung adenocarcinoma A549 and human hepatocarcinoma HepG2 were treated with different concentrations of AuNps-Aa and a dose-response curve was obtained, subsequently, the production of nitric oxide and reactive oxygen species in cell lines treated with AuNps was analyzed. -Aa, stimulated with LPS and using commercial

dexamethasone as control. The expression of the p65 and Nfr2 transcription factors was determined and finally the Th1/Th2 cytokine profile was determined. The results showed that AuNps-Aa increased anti-inflammatory activity even after inducing an inflammatory process with LPS, decreasing the production of NO, ROS, inflammatory cytokines and p65 expression.

1 INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es utilizada desde tiempos remotos, desde las culturas más antiguas del mundo como alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades, ya que esta comprende aspectos médicos del conocimiento tradicional que se desarrollaron durante generaciones dentro de varias sociedades antes de la medicina moderna (Zangeneh M, 2019).

Actualmente, se sabe que de un 70 a 80% de la población mundial hace uso de la medicina alternativa, principalmente de origen vegetal (Arceusz A, 2010). Se estima que entre un 10 a 15 % de plantas son empleadas en la medicina tradicional. El 25% de los medicamentos prescritos en el mundo provienen de plantas y debido a la eficacia de estos, la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos a partir de productos naturales sigue siendo relevante (Ming-Wei W, et. al. 2007).

En México se cuenta con una gran diversidad vegetal de más, de 30,000 especies de plantas vasculares, de las cuales de 3,500 a 4,000 plantas son utilizadas con fines medicinales (Schlaepfer y Mendoza 2010)

Las plantas poseen dos metabolismos, el metabolismo primario es el que está presente en todos los seres vivos, en cambio, el secundario, es el encargado de producir y acumular diversos compuestos de naturaleza química. Estos compuestos son denominados metabolitos secundarios y estos se distinguen por presentar propiedades farmacológicas similares a los medicamentos, ya que algunos han mostrado ser selectivos y específicos en su actividad biológica, por ello se han empleado en la actualidad para el desarrollo de fármacos en las últimas décadas, como una alternativa terapéutica, esto debido a que se les han atribuido propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas y antifúngicos (Greenlee, 2012).

El uso de plantas medicinales como medicamentos contra diversas enfermedades inflamatorias, ha proporcionado conocimientos de la medicina moderna con el uso de productos farmacéuticos más eficaces (Orang-Ojong B, 2013). La modificación química

y la conjugación de los compuestos naturales han demostrado ser exitosas para acelerar la investigación y la aplicación clínica de los compuestos de origen vegetal.

Una de las formas en las que se ha buscado la modernización de la medicina tradicional es a partir de la nanotecnología, con el desarrollo de sistemas de administración de medicamentos de tamaño nanométrico a partir del empleo de extractos naturales para la obtención de nanocomplejos mejorando así la administración de fármacos (Quiao, *et. al.* 2020)

La incorporación de productos naturales en nanoformulaciones es un gran avance en el esfuerzo por aumentar la eficacia terapéutica mediante la reducción de la toxicidad, el aumento de la biodisponibilidad, estabilidad y la mejora de la farmacocinética. En este sentido, muchos estudios han demostrado las excelentes propiedades biológicas de las nanopartículas metálicas que contienen compuestos naturales (Paciotti, 2006).

Estos avances han contribuido a plantear la idea de sintetizar nanopartículas, a partir de extractos vegetales, siendo estas una nueva forma de darle mayor funcionalidad a las propiedades medicinales de las plantas.

Recientemente, se han estudiado nanopartículas de oro y plata sintetizadas por plantas, teniendo gran relevancia las nanopartículas de oro, las cuales han sido formuladas por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes, antivirales, antifúngicos, antiparasitarias y antibacterianas (Abdel-Raouf N, 2017).

Debido al bajo costo y la alta disponibilidad de las plantas medicinales, la síntesis verde de nanopartículas de oro se ha utilizado ampliamente en las ciencias biomédicas en la terapia de muchas enfermedades (Gao X-h, 2020).

El objetivo de este trabajo es potenciar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las sales de oro y el extracto de *A. artemisiifolia*, por esto se propone la síntesis de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* y evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria en las líneas celulares HepG2 y A549.

2 ANTECEDENTES

2.1 Medicina tradicional

Las plantas medicinales, son utilizadas desde la antigüedad y estas se emplean en base a sus propiedades curativas, ya que contienen componentes bioactivos con efectos beneficiosos para la salud humana. Actualmente se sabe que alrededor de un 70 a 80% de la población mundial hacen uso de medicaciones alternativas, principalmente de origen vegetal (Arceusz A, *et.al.* 2010).

Aproximadamente el 10 a 15% de las plantas son empleadas en la medicina tradicional. Además, cerca del 25% de los medicamentos prescritos en todo el mundo provienen de plantas y debido a la eficacia de estos, en los últimos años se ha propuesto la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos a partir de productos naturales (Ming-Wei W, *et.al.* 2007).

En México, el uso de plantas con propiedades curativas es muy antiguo y hasta nuestros días se ha convertido en una práctica común. México es poseedor de una diversidad vegetal de más de 30,000 especies de plantas, de las cuales se calcula que al menos el 50% es utilizado para satisfacer alguna necesidad humana, siendo las plantas medicinales las que ocupan el principal porcentaje. En México se usan aproximadamente de 3,500 a 4,000 plantas con fines medicinales (Schlaepfer y Mendoza 2010).

Recientemente se ha estudiado cuales son los principios activos químicos relacionados con los efectos benéficos que se les atribuyen a estas plantas. Los productos naturales obtenidos a partir de un proceso de extracción son definidos como moléculas de metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios son considerados como poseedores de cualidades farmacológicas similares a los medicamentos, ya que algunos han mostrado ser selectivos y específicos en su actividad biológica, y algunos de ellos han probado ser muy útiles para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (Greenlee, 2012).

Existe un gran número de extractos vegetales y compuestos aislados que poseen una gran variedad de propiedades biológicas, la mayoría de estos compuestos activos pertenecen a los terpenoides, compuestos de tipo fenólico y alcaloides (Orang-Ojong B, *et. al.* 2013).

El utilizar productos naturales ha presentado un gran impacto en el área médica, muchos de estos extractos de plantas y compuestos activos son hidrófobos y sus acciones farmacológicas pueden reducirse debido a su dificultad para disolverse en la membrana citoplasmática de las células. Por lo que el uso de nuevas tecnologías en la administración de extractos de plantas y compuestos bioactivos es una estrategia útil para preservar su composición química y mejorar los efectos farmacológicos y la biodisponibilidad (Zhang H., *et. al.* 2016).

2.2 Material vegetal: *Ambrosia artemisiifolia*.

2.2.1 Generalidades

En México una de las plantas utilizadas como alternativa tradicional en la medicina, es *A. artemisiifolia*, en diversas partes del mundo se le conoce con diferentes nombres como "artemisa", "artemisia", "altamisa", "ajenjo del país", "amargosa", "Santa María", entre muchos otros, pertenece a la familia *Asteraceae* y una de las especies más conocidas del género *Ambrosia*. En México se utilizan las partes aéreas de esta planta para preparar infusiones y estas ser utilizadas como un tratamiento alternativo en enfermedades como el cáncer, malaria, uso diurético, cólera y diabetes (Cano L, 1997).

2.2.2 Descripción taxonómica y hábitat.

Taxonomía

(UNAM, 2009)

Reino: *Plantae*

Subreino: *Traqueobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Ambrosia*

Especie: *Ambrosia artemisiifolia* L.

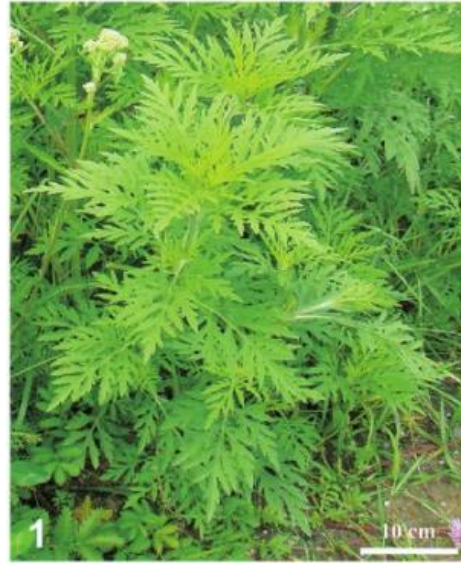


Figura 1. Especímenes de Ambrosia artemisiifolia (Piotrowska, K.; et. al. 2013)

Esta especie es autóctona de Norteamérica, pero naturalizada ampliamente en el extranjero. Crece en el centro, sur y partes de sureste del continente europeo (Maksimovic, 2008). En México, *A. artemisiifolia* puede ser localizada en el Estado de México, Guanajuato, Oaxaca; dentro del estado de Veracruz se reporta en Maltrata, localidad perteneciente a Orizaba (UNAM, 2009); (Cano L, 1997).

2.2.3 Aspectos fitoquímicos

En la determinación del tamizaje fitoquímico realizada por Arrieta, E. y colaboradores (2018), se identificaron cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en hojas de *A. artemisiifolia* la presencia de compuestos fenólicos, cardenólidos, alcaloides sesquiterpenos, triterpenos y esteroides, resinas, saponinas, taninos, cumarinas, flavonoides y azúcares reductores, tanto en *A. artemisiifolia* como en otras especies del género (Gao J, 2010).

Extracto etanólico	Metabolito secundario				
	Compuestos fenólicos	Cumarinas	Flavonoides	Terpenos	Taninos
Salvia (<i>Croton conduplicatus</i> Kunth)	+	+	+	+	-
Altamisa (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	+	-	+	+	-
Venturosa (<i>Lantana camara</i> L.)	+	-	+	+	+

Extracto etanólico	Metabolito secundario				
	Cardenólidos	Esteroles	Quinonas	Saponinas	Leucoantocianidinas
Salvia (<i>Croton conduplicatus</i> Kunth)	+	-	-	+	-
Altamisa (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	+	-	-	+	-
Venturosa (<i>Lantana camara</i> L.)	-	-	-	+	-

Extracto etanólico	Metabolito secundario (Alcaloides)				
	Prueba de Hager	Prueba de Mayer	Prueba de Wagner	Dragendorff	Prueba de Ehrlich
Salvia (<i>Croton conduplicatus</i> Kunth)	+	+	+	+	+
Altamisa (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	-	+	+	+	-
Venturosa (<i>Lantana camara</i> L.)	-	-	-	-	-

Prueba positiva (+), prueba negativa (-).

Tabla 1. Tamizaje Fitoquímico de tres especies de plantas con usos medicinales Salvia, Altamisa y Venturosa (Arrieta, E.*et.al.* 2018).

En el análisis de compuestos presentes en *A. artemisiifolia* se ha reportado la presencia de sesquiterpenlactonas: paulitina, isopaulitina, artemisiifolina, ambrosina, isabelina, psilostachina C y B, cumanina y peruvina; triterpenoides del tipo α y β amirina; y derivados del ácido cafeico (Matic S, 2008); (Parkhomenko A, 2006).

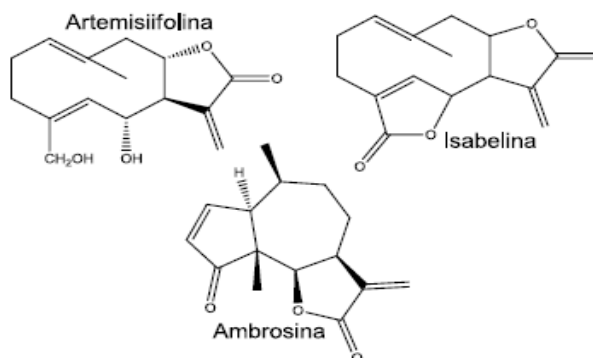


Figura 2. Principales compuestos aislados de *A. artemisiifolia* (Kiss T, *et. al.* 2017).

Las investigaciones preclínicas de *A. artemisiifolia* se realizaron principalmente con sus compuestos aislados. De acuerdo con Kiss T, y colaboradores (2017), se han aislado 29 lactonas sesquiterpénicas de *A. artemisiifolia* y se informó que muchas de ellas tienen actividades farmacológicas notables tales como antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoarias, antiinflamatorias, cardiovasculares y efectos hepatoprotectores. Entre los compuestos aislados se ha identificado que la ambrosina, isoalantolactona, damasina y la coronopilina, tienen la capacidad de inhibir el factor de transcripción NF- κ B y activar otros factores de transcripción como SAT3 y Nfr2 (Kiss T, *et. al.* 2017).

2.2.4 Evaluaciones de las actividades biológicas de *A. artemisiifolia*.

2.2.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

En la actividad antimicrobiana de *A. artemisiifolia* se ha reportado que el extracto de diclorometano de la raíz presentó un alto porcentaje de inhibición contra *M. tuberculosis* a concentraciones de 100 μ g/mL y 1000 μ g/mL, en comparación con el extracto obtenido de partes aéreas (flores, hojas y tallo), el que mostró la mejor actividad inhibitoria en un modelo in vitro a una concentración de 1000 μ g/mL (Cantrell C, 1998).

2.2.4.2 Evaluación de la actividad biológica de componentes de *A. artemisiifolia*.

En el extracto etanólico de *A. artemisiifolia*, se reportaron como componentes principales a flavonoides y cumarinas. Igualmente se reportó que el extracto presentaba actividad hepatoprotectora, la cual se observó a una dosis de 200 mg/kg, en ratas. Además, se han evaluado sus propiedades hipolipémicas, donde a 100 mg/kg disminuyó el colesterol en un 70%, y los triglicéridos en un 53% (Parkhomenko A, 2006).

2.2.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante

Maksimovic en el 2008, reportó la actividad antioxidante del extracto de acetona de *A. artemisiifolia* e identificó compuestos polifenólicos y flavonoides como los principales

constituyentes del extracto. El ensayo cuantitativo reveló la presencia de un total de $4.35 \pm 0.1\%$ de polifenoles y $0.66 \pm 0.05\%$ de flavonoides totales en el extracto. La actividad antioxidante se evaluó con el ensayo de FRAP y DPPH donde mostró 50% de reducción de este radical con una IC50 de 27.6 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos indicaron que este extracto de *A. artemisiifolia* es capaz de capturar radicales libres, responsables de los procesos oxidativos.

2.2.4.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Pérez, R., (1996) evaluó las propiedades antiartríticas y antiinflamatorias del extracto etanólico de *A. artemisiifolia*, observando que los efectos eran dependientes de la dosis (25, 50 y 100 mg/Kg) en un proceso inflamatorio agudo en ratas (edema inducido por carragenina y granuloma inducido) a partir de la dosis de 25 mg/kg. El extracto presentó actividad en el modelo de aceite de crotón de granuloma y actividad significativa en el modelo de granuloma de gránulos de algodón de la artritis subaguda. En ambos casos, el efecto del extracto fue similar al de la fenilbutazona y la betametasona. El extracto redujo efectivamente la hinchazón de la pata inyectada con carragenina en el proceso inflamatorio agudo y redujo significativamente la formación de exudado inflamatorio en el granuloma de aceite de crotón en ratas. También se reportó que el extracto de *A. artemisiifolia*, pueden inhibir la artritis inducida por formaldehído en etapa temprana. Estos resultados respaldan la eficacia de las populares preparaciones de *A. artemisiifolia*, en el tratamiento tópico de enfermedades inflamatorias relacionadas con la dermatitis vascular (Pérez, R., 1996).

2.2.4.5 Evaluación de la actividad antiproliferativa

Con respecto a la actividad antitumoral de *A. artemisiifolia* no existen reportes hasta el momento. Sin embargo, en un estudio realizado a *Ambrosia arborescens* por De Leo y colaboradores en el año 2010, de los extractos hexánico y clorofórmico, aislaron seis nuevos terpenos y 12 sesquiterpenos, a los cuales evaluaron la actividad inhibitoria sobre diversas líneas de cáncer. De los sesquiterpenos aislados; damsina, psilostaquina,

coronopolina y psilostachyin C ya se había descrito previamente actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer. Los compuestos dihidrocoronopilin y coronopilin, mostraron actividad contra células U937 (leucemia monocítica), Jurkat (leucemia T) y Molt 4 (leucemia linfoblástica) en un rango de concentración de 0.1 a 50 μM . Los compuestos antes mencionados mostraron débil inhibición contra células U937 con una IC_{50} de 20 μM para el compuesto (De Leo M, 2010), por lo cual, *A. artemisiifolia* podría presentar alguno de estos compuestos con actividad antiproliferativa.

2.3 Modernización de la medicina tradicional

El objetivo de los últimos años para el desarrollo de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales se ha basado en la obtención de moléculas o compuestos naturales a partir de diversos métodos de extracción, identificando así cuáles son sus principios activos. Estos compuestos naturales poseen propiedades más específicas y únicas en comparación con las drogas sintéticas, como la bioactividad contra múltiples tejidos, objetivos moleculares y actividades sinérgicas. Sin embargo, la mayoría de los compuestos naturales tienen una aplicación clínica limitada en estado bruto debido a su fuerte hidrofobicidad, baja estabilidad *in vivo*, baja biodisponibilidad, vida media corta y toxicidad sistémica dentro del rango de dosis terapéutica (Qiao, L., *et.al.* 2020)

La modificación química y la conjugación de los compuestos naturales han demostrado ser exitosas para acelerar la investigación y la aplicación clínica de los compuestos de origen vegetal.

Una de las formas en las que se ha buscado la modernización de la medicina tradicional es a partir de la nanotecnología, con el desarrollo de sistemas de administración de medicamentos de tamaño nanométrico a partir del uso de extractos naturales para la obtención de nanocomplejos mejorando así las propiedades biológicas funcionales de las plantas eficientizando sus actividades.

La incorporación de productos naturales en nanoformulaciones es un gran avance en el esfuerzo por aumentar la eficacia terapéutica mediante la reducción de la toxicidad, el aumento de la biodisponibilidad, el aumento de la estabilidad y la mejora de la farmacocinética. Las nanoformulaciones demuestran una mayor solubilidad, una mejor

biodisponibilidad, una orientación más específica, una liberación más lenta y la posibilidad de utilizar las rutas tradicionales de administración de medicamentos, como la administración oral e intravenosa. Además, la aplicación de la nanotecnología proporciona una poderosa estrategia para el desarrollo posterior de la medicina tradicional y una base técnica para la modernización (Qiao, L., *et.al.* 2020).

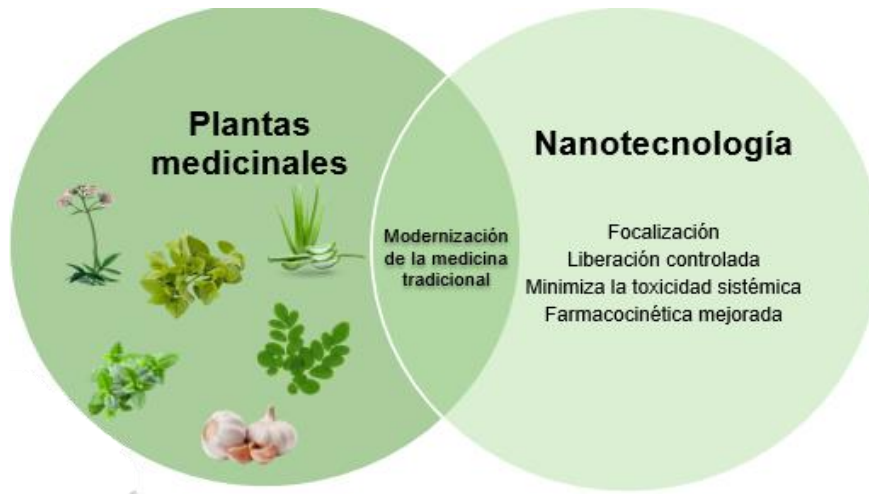


Figura 3. La combinación de estos compuestos naturales con la nanotecnología puede promover la modernización (Qiao, L., *et.al.* 2020).

Esta nueva estrategia de entrega de tamaño nanométrico ha permitido mejorar la biodisponibilidad y así potenciar las aplicaciones para el tratamiento de enfermedades, con un enfoque particular en generar nuevas alternativas terapéuticas.

2.4 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia encargada de la manipulación de materiales en una escala atómica o molecular, se basa en la fabricación de productos a nanoescala. En la medicina actual existen dos grandes áreas en la cual la nanotecnología juega un papel importante, uno de ellos es el área de diagnóstico y bioensayos, mientras que la otra área es terapéutica (Mintern, 2018).

Se sabe que las nanopartículas (Nps) exhiben propiedades físicas, químicas, mecánicas, térmicas y biológicas superiores en comparación con los materiales a granel. Algunas de estas, importantes para los campos biológicos y de investigación, son sus propiedades

antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antiproliferativa (Agarwal, *et. al.*, 2019)

2.4.1 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas han surgido como un agente antiinflamatorio potencial en las últimas décadas. Dado que los Nps tienen una gran relación de área de superficie a volumen, son mejores para bloquear los potenciadores de la inflamación como las citocinas y las enzimas que ayudan a la inflamación en comparación con sus contrapartes a granel. Las nanopartículas de metal como plata, oro, selenio, cobre, níquel, óxido de zinc, peróxido de zinc, óxido de magnesio, óxido de cerio, óxido de hierro y dióxido de titanio han tomado gran relevancia en los últimos años, esto debido a las propiedades antiinflamatorias intrínsecas que presentan (Agarwal, *et. al.*, 2019).

Recientemente se han estudiado nanopartículas de oro y plata sintetizadas por plantas, teniendo gran relevancia las nanopartículas de oro las cuales han sido formuladas por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, cicatrizantes, antioxidantes, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias y antibacterianas (Abdel-Raouf N, 2017). Estos avances han contribuido a plantear la idea de sintetizar nanopartículas, a partir de extractos vegetales, nueva forma de darle mayor funcionalidad a las propiedades medicinales de las plantas. Las nanopartículas de oro sintetizadas por plantas se han utilizado ampliamente en las ciencias biomédicas en la terapia de muchas enfermedades. Debido al bajo costo y la alta disponibilidad de las plantas medicinales, la síntesis verde de nanopartículas de oro por parte de las plantas medicinales ha aumentado significativamente su relevancia (Gao X-h, 2020).

2.4.2 Síntesis verde de nanopartículas

Existen diferentes tipos de síntesis para la elaboración de nanopartículas y entre ellas destaca la síntesis verde o biológica la cual puede ser utilizadas para producir un tamaño y morfología bien definida. Hay una gran cantidad de agentes biológicos empleados para la síntesis de nanopartículas, como bacterias, hongos, levaduras, virus, algas o plantas

como medio de reacción verde que suministra los agentes reductores y protectores para la formación de nanopartículas (Rónavári, A. *et. al.*, 2021).

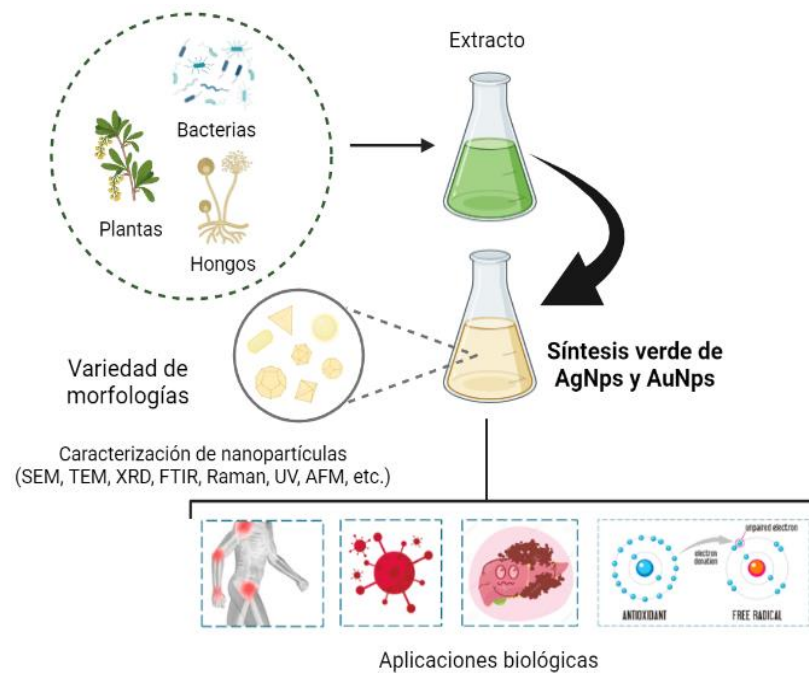


Figura 4. Nanopartículas verdes de plata y oro: enfoques de síntesis biológica y potencial para aplicaciones biomédicas (Rónavári, A. *et. al.*, 2021).

2.4.3 Síntesis verde de nanopartículas usando plantas

El uso de extractos de plantas para la síntesis de nanopartículas metálicas ha generado un avance importante en el área de la nanotecnología debido a que no requiere de un proceso complejo. Para este proceso se mezcla con una solución metálica a temperatura ambiente o variando la temperatura en una plancha de calentamiento. La reacción se completa en minutos (Mittal, 2013). La solución metálica es el precursor de las nanopartículas y el extracto de la planta actúa como reductor y estabilizador.

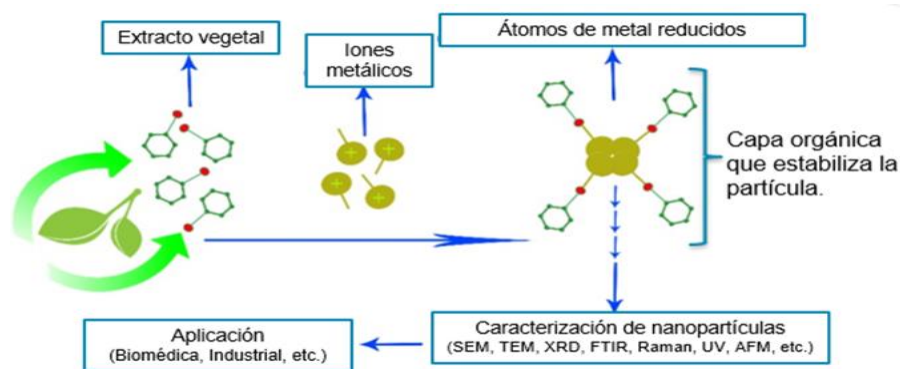


Figura 5. Esquema de síntesis verde de nanopartículas usando extracto de plantas (Rónavári, A., *et al.* 2021).

En general, (Makarov V, *et al*; 2014) mencionan que el biomecanismo de síntesis de nanopartículas metálicas con extractos de plantas incluye tres fases principales:

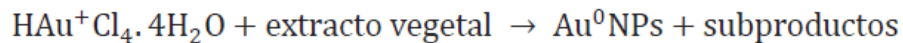
- 1) Fase de activación durante el cual se producen la reducción de iones metálicos y la nucleación de los átomos de metal reducido.
- 2) Fase de crecimiento durante la cual las pequeñas nanopartículas adyacentes se unen de forma espontánea formando partículas de mayor tamaño (maduración de Ostwald), que se acompaña por un aumento en la estabilidad termodinámica de las nanopartículas.
- 3) Fase de terminación del proceso que determina la forma final de las nanopartículas. A medida que la duración de la fase de crecimiento aumenta, las nanopartículas se agregan para formar nanotubos, nanoprismas, nanohexaedros, y una variedad de otras nanopartículas de forma irregular.

En la fase de terminación, las nanopartículas adquieren la conformación más energéticamente favorable, que está fuertemente influenciada por la capacidad del extracto de la planta utilizado para estabilizar las nanopartículas metálicas (Makarov V, 2014).

Para lograr las nanopartículas deseadas, es obligatoria la optimización de cada protocolo utilizando diferentes solventes, la naturaleza del extracto de la planta, su concentración, la concentración de la solución metálica, el tiempo de reacción, el pH y la temperatura afectan la tasa de producción de las nanopartículas, su cantidad, morfología y otras características (Rónavári, A., *et al.* 2021).

2.4.4 Síntesis de nanopartículas de oro a partir de extractos vegetales

En el caso de las plantas, el extracto vegetal contiene diferentes biomoléculas tales como polifenoles, flavonoides, terpenoides, aldehídos, proteínas, alcaloides, ácidos y compuestos alcohólicos. Estos metabolitos están fuertemente involucrados en el proceso de bioreducción. La reacción dada se efectúa con la reducción de los iones Au, esto debido a la presencia de metabolitos y enzimas redox (Kuppusamy P, 2016). La reacción producida, se muestra a continuación:



2.5 Nanopartículas de oro y sus aplicaciones como agentes antioxidantes y antiinflamatorios

2.5.1 Inflamación.

La inflamación se describe como un mecanismo de defensa, el cual desencadena una respuesta inespecífica del sistema inmunológico a diversos agentes causales, el cuerpo desarrolla hinchazón, enrojecimiento, dolor, etc. en respuesta a una infección o lesión. Este proceso está mediado por dos componentes principales de los mecanismos de defensa del huésped: la respuesta inmune innata y adaptativa. Las respuestas inflamatorias deben regularse para mantener la homeostasis tisular o sistémica. La inflamación no controlada relacionada con el inicio y la progresión de numerosas enfermedades agudas y crónicas, como la lesión hepática / pulmonar aguda, la bronquitis aguda, el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la artritis reumatoide (AR), la aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas.

La inflamación es un proceso que generalmente se inicia en cuestión de minutos en un huésped con un sistema inmune innato funcional en contacto con estímulos extraños. Las vías inflamatorias y los tejidos diana varían dependiendo de la naturaleza del estímulo. Por ello es importante mantener un balance entre la inflamación y la respuesta antiinflamatoria (Caballero.G, *et. al.* 2016).

2.5.2 Proceso de inflamación

La inflamación es una autorespuesta biológica a estímulos endógenos y/o exógenos, que se caracteriza por la liberación de una amplia gama de mediadores moleculares y células inflamatorias. El proceso de inflamación se puede clasificar en respuestas inflamatorias agudas y crónicas, esto va a depender de duración del proceso. La inflamación aguda, se distingue principalmente por los signos clínicos como: enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor, con frecuencia dura de horas a días (Placha & Jampilek, 2021).

La inflamación aguda generalmente se acompaña de una acumulación rápida y dramática de líquido, quimiocinas, citocinas y células inflamatorias (particularmente neutrófilos) en los tejidos / órganos involucrados. La respuesta inflamatoria aguda suele ser autolimitada, que puede resolverse rápidamente para restaurar la homeostasis tisular. Sin embargo, un proceso de inflamación agudo descontrolado provoca la incapacidad de realizar la resolución del proceso y esto conducirá a una lesión tisular persistente y una respuesta inflamatoria que puede durar de meses a años, denominada inflamación crónica (Dou, 2020).

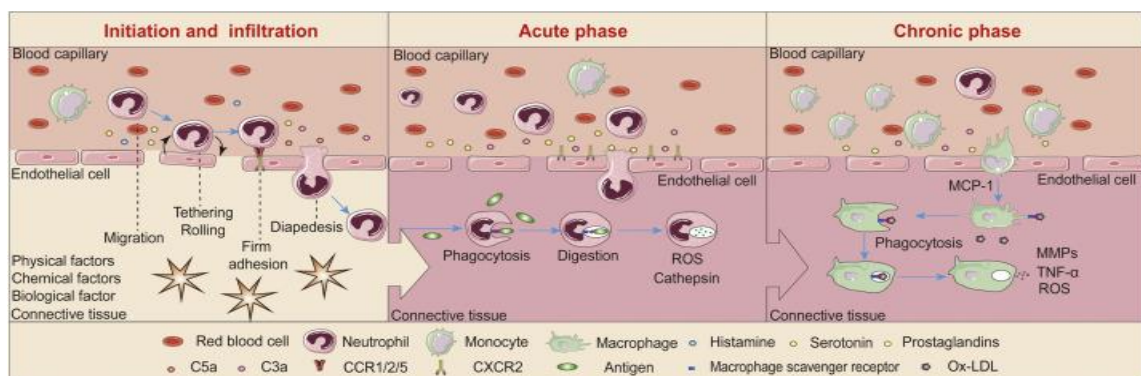


Figura 6. Inflamación y microambientes inflamatorios (Dou, *et. al.* 2020).

2.5.3 Mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios son los responsables en el avance del proceso de inflamación a través de la modificación de la permeabilidad endotelial vascular (vasodilatación), la extravasación de neutrófilos y el exceso de plasma que contiene factores del complemento y anticuerpos contra el sitio de la inflamación. El desarrollo y

el curso de las reacciones inflamatorias están regulados por las citocinas, las cuales son uno de los mediadores más importantes del proceso de inflamación y están estrechamente relacionadas con las vías de señalización NF- κ B y COX-2, las cuales son algunos de los mecanismos primordiales involucrados en la expresión de citocinas inflamatorias lo que influye en la regulación ascendente de la inflamación (Dou, 2020).

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor transcripcional relacionado con la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Estudios han demostrado que una forma de activar la vía de señalización es por medio de la estimulación con LPS, el cual induce que la subunidad p65 de NF- κ B, se disocia de I κ B y se transloca al núcleo, uniéndose al promotor de genes diana y activando la transcripción induciendo la activación de NF- κ B, provocando la producción de factores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6), las cuales están relacionadas en el proceso de inflamación aguda. Pero cuando se tiene una inflamación crónica se identifican también la interleucina-12 (IL-12), interferón gamma (IFN- γ) y la interleucina-17 (IL-17) (Gao X-h, 2020), (He, y otros, 2017).

Otro de los factores de transcripción involucrados en el proceso de modulación de la inflamación es el factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2), este es considerado un modulador crítico de las respuestas inflamatorias y la homeostasis redox celular. Nrf2 juega un papel importante en la respuesta antiinflamatoria de compuestos con actividad antioxidante, al igual se ha reportado que la activación de Nrf2, afecta los niveles de especies reactivas de oxígeno e inflamatorias, incluido el óxido nítrico (NO), la prostaglandina E2 (PGE 2) y las citocinas (IL-6, IL-8). Nrf2 es ampliamente considerado como un protector de múltiples órganos debido a sus funciones antioxidantes y citoprotectoras (Saha, S., *et.al.* 2020).

2.5.4 Propiedades antiinflamatorias de las AuNps

Las nanopartículas de oro han surgido como una alternativa terapéutica en los procesos inflamatorios, esto debido al potencial antiinflamatorio que presentan. Poseen una gran relación de área de superficie a volumen, son mejores para bloquear los potenciadores de

la inflamación como las citocinas y las enzimas que ayudan en el proceso de inflamación en comparación con sus contrapartes a granel (Agarwal, Nakara, & Kumar, 2019).

2.5.4.1 Reducción de la producción de ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son metabolitos de oxígeno que se encuentran en su forma parcialmente reducida (OH^- , O_2^- , H_2O_2), por lo tanto, tienen una fuerte propiedad oxidante. Estos metabolitos de oxígeno son producidos por NADPH oxidasas presentes en los fagocitos y como subproductos de la cadena de transporte de electrones (ETC). Estos compuestos oxidan lípidos y proteínas en las células causando daño en la membrana y el ADN de la célula. El anión superóxido (O_2^-) libre tiene la capacidad de combinarse con NO a velocidades de difusión limitadas y esto conduce a la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), estas inducen estrés que promueve la producción de ROS. Por esto es importante la búsqueda de compuestos que tengan la capacidad de controlar la producción de ROS, las AuNps se han propuesto como posible agente antiinflamatorio, esto debido a que se ha observado que tiene la capacidad de disminuir la producción de ROS de una manera dependiente de la dosis, actuando, así como un posible agente antiinflamatorio (Agarwal, *et.al* , 2019).

2.5.4.2 Disminución de la producción de citoquinas inducida por LPS

El LPS es uno de los estímulos utilizados para estimular la producción de citocinas proinflamatorias, simulando un proceso de inflamación. Las AuNps se han reportado como compuestos capaces de inhibir de forma selectiva la producción de algunas citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-17 y TNF- α , desencadenadas por LPS. También reducen los niveles elevados de producción de IL-12 cambiando la respuesta inmune celular de T_H1 (proinflamatoria) a T_H2 (antiinflamatoria) (Agarwal, Nakara, & Kumar, 2019).

2.5.4.3 Modulación de las vías de señalización relacionadas con los procesos de inflamación

El LPS es uno de los estímulos más utilizados, ya que se une a los receptores tipo Toll (TLR) presentes en la superficie de las células y activa ciertas cinasas que a su vez activan la vía MAPK (mitogen-Activated Protein Kinase). La vía PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa) está involucrada en la expresión génica, la proliferación celular, la síntesis de proteínas y la estimulación de citocinas. La vía PI3K regula a la baja la producción de TNF- α inducida por LPS y la activación de NF- κ B inducida por LPS en monocitos humanos. Está directamente relacionada con la baja producción de ROS. La vía MAPK activa mensajeros secundarios intracelulares como Ca²⁺ y AMP cíclico (cAMP) y también coordina las interacciones receptor-proteína de la superficie celular. Estos resultan en la activación de factores de transcripción, lo que lleva a una alteración en la expresión génica. Las AuNps modulan varias vías de señalización como la vía MAPK y la vía PI3K, regulando así negativamente la producción de citocinas proinflamatorias en células de Kuppfer y células estrelladas hepáticas que afectan su estrés oxidativo y perfil de citocinas (Agarwal, Nakara, & Kumar, 2019).

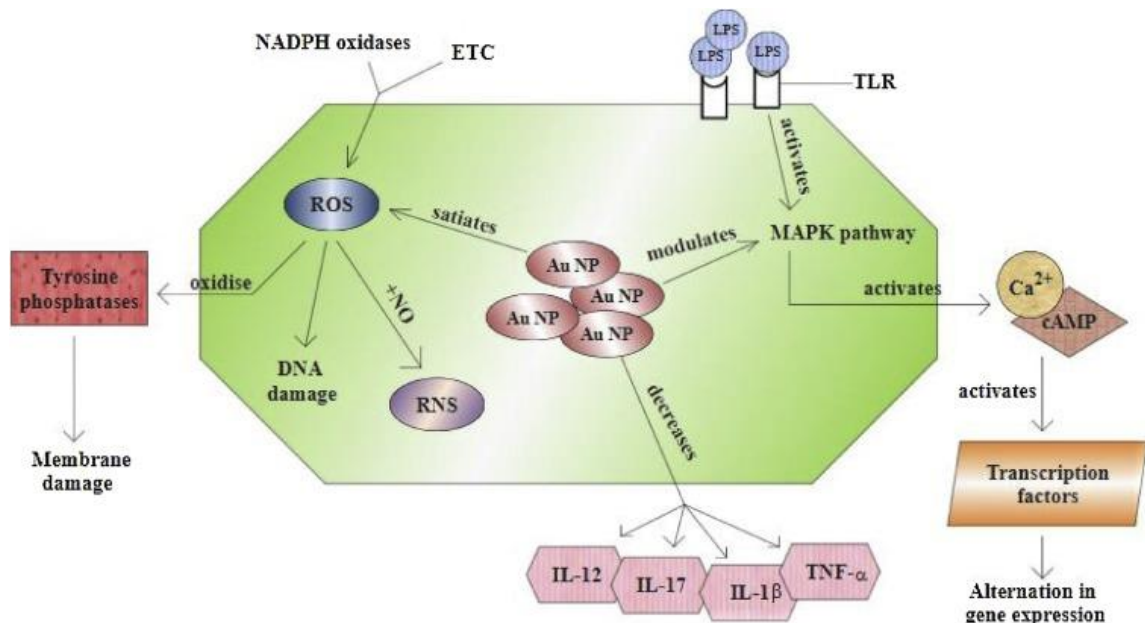


Figura 7. Mecanismo antiinflamatorio adoptado por AuNps (Agarwal, Nakara, & Kumar, 2019).

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades que involucran inflamación crónica son un problema a nivel mundial y una de las causas más comunes que afectan la calidad de vida. Tres de cada cinco personas en todo el mundo mueren de enfermedades asociadas con enfermedades inflamatorias crónicas como enfermedades respiratorias, por lo que la búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria para el tratamiento de procesos de inflamación crónica es prioritaria. Aunque existen diversos medicamentos para el tratamiento de la inflamación, algunos pueden tener reacciones adversas, lo que puede limitar su uso. El presente trabajo de investigación pretende determinar si las nanopartículas de oro reducidas a partir del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* tiene la capacidad de potenciar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Generando así una alternativa terapéutica para enfermedades relacionadas con procesos de inflamación.

4 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro reducidas a partir del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia*, presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en las líneas celulares A549 y HepG2.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de nanopartículas de oro sintetizadas a partir del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* en las líneas celulares A549 y HepG2.

5.2 Objetivos específicos

- I. Obtener y caracterizar un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* e identificar la presencia de metabolitos secundarios por un análisis fisicoquímico.
- II. Estandarizar la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *A. artemisiifolia*.
- III. Determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* en las líneas celulares A549 y HepG2.
- IV. Evaluar la actividad antioxidante de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* en las líneas celulares A549 y HepG2.
- V. Evaluar la actividad antiinflamatoria de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* en las líneas celulares A549 y HepG2.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de extractos.

Las hojas y raíz de *Ambrosia artemisiifolia* se lavaron con agua Milli-Q, después se colocaron en áreas sombreadas para secarlas a temperatura ambiente (25-30 °C) durante una semana. Posteriormente se pulverizó el material vegetal obtenido y pesaron dos gramos de la muestra seca y se colocaron en 20 mL de etanol (96%) (Arrieta, y otros, 2018). Después del proceso de extracción, el extracto se filtró utilizando papel Whatman No. 1. Se procedió a eliminar el solvente del extracto filtrado utilizando el concentrador Thermo Scientific Savant SpeedVac.

6.1.1 Ensayos fitoquímicos para la determinación de metabolitos secundarios

Después de obtener el extracto se realizó un tamizaje fitoquímico para identificar la presencia de metabolitos secundarios. Los ensayos y pruebas que se realizaron son métodos cualitativos y específicos para la determinación de diferentes tipos de metabolitos secundarios. Se fundamentan principalmente en el cambio de coloración o formación de precipitados. De acuerdo con el protocolo propuesto por (Arrieta, E., *et.al.* 2018).

Compuestos fenólicos: se tomó 1 mL del extracto total en etanol en un tubo de ensayo, se agregaron 10 µL de FeCl₃ al 1 % en agua y luego se agito. La aparición de coloraciones violetas, verdes, azules o tonos oscuros se considera prueba positiva.

Sesquiterpenos (ensayo de Baljet): Se tomaron 2 mL de extracto total en etanol y se le adicionaron de 20 µL de reactivo de Baljet, considerándose positivo el ensayo la aparición de coloración o precipitado color rojo.

Flavonoides (prueba de Shinoda): Se tomaron 2 mL de extracto total, se adiciono en un tubo de ensayo, y se agregó magnesio en polvo y por las paredes del tubo de ensayo se añadieron 30 µL de HCl concentrado. La aparición de colores naranja, rosado, rojo o violeta es prueba positiva para la existencia de flavonoides en la muestra.

Terpenos (ensayo de Lieberman-Buchard): Se tomaron 2 mL de extracto total en etanol en un tubo de ensayo, se le adicionaron 20 μ L de anhídrido acético y por las paredes del tubo se colocaron 20 μ L de ácido sulfúrico (H_2SO_2) concentrado. La prueba es positiva si se da la aparición de coloración azul o verde oscuro.

Saponinas: En un tubo de ensayo se agregaron 4 mL de extracto y se agitaron vigorosamente durante 3 minutos. La formación de espuma abundante la cual persiste por más de dos minutos es prueba positiva.

Taninos: En un tubo de ensayo se adicionó 1 mL de extracto total y 30 μ L gotas de reactivo de gelatina- sal. La prueba es positiva si se forma turbidez o un precipitado.

Alcaloides: Se tomaron 10 mL de extracto total en etanol, se colocó en una plancha caliente hasta la evaporación del solvente. Luego, se adicionaron 100 μ L de HCl al 1% y se calentó hasta obtener burbujeo. Posteriormente, se filtró y se agregaron 2 mL de este ácido filtrado a 5 tubos de ensayo, Posteriormente, se adicionaron 20 μ L de reactivos usados para la determinación preliminar de alcaloides (Hager, Mayer, Wagner, Dragendorff y Erhlich).

Ensayo de hemólisis para glucósidos

Los experimentos de hemólisis se realizaron de acuerdo con la metodología reportada por Yildirim, A. y colaboradores. Las muestras de sangre humana utilizadas fueron recién obtenidas de voluntarios en el Laboratorio de Inmunología y Virología (San Nicolás de los Garza, Nuevo León). Primero, se centrifugaron 3 mL de sangre a 1600 rpm durante 5 min y se eliminaron el plasma sanguíneo y la capa superficial. El sedimento de glóbulos rojos restante se lavó cinco veces con 6 ml de PBS solución y los glóbulos rojos se diluyeron en 25 mL de solución de PBS. Luego, 0.8 mL del EOH-Aa en PBS a diferentes concentraciones, después se añadieron 0.2 mL de suspensión de glóbulos rojos. Se prepararon muestras de control agregando 0.8 mL de agua y PBS, respectivamente a 0,2 ml de solución de glóbulos rojos. Luego, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras fueron agitadas ligeramente una vez cada 30

minutos para resuspender los glóbulos rojos y el EOH-Aa. Después de 2 horas, las muestras se centrifugaron a 1600 rpm y se transfirieron 100 μ L de sobrenadantes a una placa de 96 pocillos. La absorción de hemoglobina en los sobrenadantes se midió con un lector de microplacas a 570 nm. Porcentajes de hemólisis de los glóbulos rojos se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs del control negativo})}{(\text{Abs de control positivo} - \text{Abs de control negativo})}$$

Los valores de hemólisis porcentuales se calcularon a partir de tres experimentos separados.

6.2 Síntesis de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia*

Para este trabajo se sintetizaron nanopartículas de oro reducidas a partir del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia*. Se colocaron 10 mL de una solución de H₂AuCl₄ a una concentración de 1 mM, y se calentaron por 2 minutos, a 90 °C en constante agitación continua a 600 rpm, después se añadieron 400 μ mL del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia*. Las mezclas de sales de oro se calentaron a 80 °C durante 15 minutos con agitación continua, se dejará reposar en refrigeración y se almacenaron como mínimo una semana antes de su utilización. De acuerdo con el protocolo propuesto por (Khan, 2020).

6.3 Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de un extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* (AuNPs-Aa).

6.3.1 Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis.

Para la obtención de la PRS se utilizará un Nanodrop 200c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), se tomaron 10 μ L de la muestra y se colocaron en el pedestal del equipo, en principio el equipo realizará un escaneo del espectro visible (200 nm a 750 nm), al tener las partículas metálicas en tamaños nanométricos un plasmón característico en el

caso del oro va de 510 nm a 550 nm, es posible identificar la existencia de partículas de oro en estado nanométrico.

6.3.2 Análisis de tamaño por Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z.

Para este ensayo se realizaron tres diluciones seriadas de una muestra concentrada de AuNps-Aa, se colocaron en celdas para espectroscopia y se colocaron en el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), se realizaron tres lecturas de cada muestra y se obtuvo la medición promedio, esto se repitió al día 1, 7, 14 y 21, mediante la dispersión del haz de luz que provoca un láser en el equipo es posible calcular el tamaño de las partículas en solución a partir del movimiento browniano de las partículas. Por otro lado, el mismo equipo tiene la capacidad de medir la carga superficial neta de las partículas a partir del potencial Z, esto a partir de utilizar una celda especial por la cual se hace pasar una ligera corriente eléctrica, de esta manera el equipo arroja los datos de potencial Z en mV, para este ensayo se utilizó la muestra en la que se haya obtenido la mejor estabilidad de partículas y menor PDI. Estos datos se analizarán en el software Zetasizer 7.01.

6.3.3 Análisis de tamaño y morfología por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

Para corroborar el tamaño de partícula y visualizar la forma se colocará una muestra de las AuNps-Aa sobre un porta muestra y se analizó por microscopía de fuerza atómica, el archivo arrojado será analizado.

6.3.4 Difracción de rayos X (XRD)

Se obtuvieron patrones de difracción de rayos X en polvo (XRD) utilizando un difractómetro (D8 Advance; Karlsruhe, Bruker, Alemania) operando a 40 kV y 40 mA, con radiación $\text{CuK}\alpha$, una tasa de escaneo de $6^\circ/\text{min}$, y un tamaño de paso de 0.02° sobre el rango 2θ de 20° – 80° .

6.3.5 Espectroscopía infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)

Se analizaron las muestras del EOH-Aa y AuNps-aa liofilizados en un espectrómetro FTIR Spectrum™ One (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE. gránulos de KBr. Se utilizó el análisis FTIR para identificar los posibles grupos funcionales del extracto y responsables en la reducción de las AuNps-Aa.

6.3.6 Ensayo de hemólisis

Los experimentos de hemólisis se realizaron de acuerdo con la metodología reportada por Yildirim, A. y colaboradores. Las muestras de sangre humana utilizadas fueron recién obtenidas de voluntarios en el Laboratorio de Inmunología y Virología (San Nicolas de los Garza, Nuevo León). Primero, se centrifugaron 3 mL de sangre a 1600 rpm durante 5 minutos y se desechó el plasma sanguíneo y la capa superficial. El sedimento de glóbulos rojos restante se lavó cinco veces con 6 mL de PBS y los glóbulos rojos se diluyeron en 25 mL de solución de PBS. Luego, se añadieron las AuNps-Aa y el EOH-Aa en PBS a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 µg/mL), después se añadieron a 0,2 ml de suspensión de glóbulos rojos. Se prepararon muestras de control agregando 0.8 mL de agua y PBS, respectivamente a 0,2 ml de solución de glóbulos rojos. Luego, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las muestras fueron agitadas ligeramente una vez cada 30 minutos para resuspender los glóbulos rojos y las muestras. Después de 2 horas, las muestras se centrifugaron a 1600 rpm y se transfirieron 100 µL de sobrenadantes a una placa de 96 pocillos. La absorción de hemoglobina en los sobrenadantes se midió con un lector de microplacas a 570 nm. Porcentajes de hemólisis de los glóbulos rojos se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs del control negativo})}{(\text{Abs de control positivo} - \text{Abs de control negativo})}$$

Los valores de hemólisis porcentuales se calcularon a partir de tres experimentos separados.

6.4 Mantenimiento de cultivo celular.

Se emplearon las líneas celulares A549 (Células epiteliales de carcinoma de pulmón humano) y HepG2 (Células epiteliales humanas de carcinoma hepatocelular) del Banco de Células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, como modelos inflamatorios de estudio. Para el mantenimiento y proliferación se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) y con penicilina/estreptomicina al 1% y se mantuvo en condiciones a 37 °C en una atmosfera de 85% de humedad relativa al 5% CO₂.

6.5 Ensayo de viabilidad en células A549 y HepG2.

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer (A549 y HepG2) del Banco de Células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para este ensayo, se colocaron 5.000 células viables/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano, se llevaron a un volumen final de 100 µL de medio DMEM suplementado (10 % SFB), se mantuvieron durante 24 h en condiciones de incubación estándar, después de un tiempo se trataron las células a las siguientes concentraciones 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL de AuNps-Aa, EOH-Aa y AuNPs-Cs. Las células se expusieron a dichos tratamientos durante 24 horas y al bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Filter Max F5; Molecular Devices, San Francisco, CA, EE. UU.) El reactivo se usó para estimar la viabilidad celular relativa a partir de la absorbancia, se colocaron 10 µL del reactivo en cada pocillo que contenía células y se dejó incubar durante 3 horas, pasado el tiempo se retirara el medio y se colocaran 100 µL de DMSO, para poder analizar el cambio de coloración en cada pozo de la placa, en principio si las células están metabólicamente activas convertirán el reactivo de MTT en cristales, que al entrar en contacto con el DMSO se disolverán y se medira la absorbancia a 570 nm, la cual será analizada en un lector de microplacas ELISA, la fórmula para calcular la viabilidad relativa se expresa a continuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia del tratameinto}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

6.6 Ensayo de actividad antioxidante en las líneas celulares A549 y HepG2.

6.6.1 Ensayo antioxidante de MTT

Anani, H. y colaboradores (2020) describieron un ensayo eficiente para evaluar la actividad antioxidante de extractos de plantas naturales y compuestos puros. Se evaluó la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* utilizando el ensayo MTT. Se prepararon diferentes concentraciones de EOH-Aa, AuNps-Aa y ácido ascórbico como control en medio DMSO (0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL). El colorante MTT (1 mg/mL) se disolvió con PBS y se añadieron 100 µL de la solución a cada pocillo. Luego, se añadieron 100 µL de DMSO y se incubó a 37 °C durante 4 horas. La absorbancia fue, medida a 570 nm en un lector de microplacas ELISA (Liu y Nair, 2010).

6.6.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para identificar la producción de especies reactivas de oxígeno en células A549 y HepG2, se cultivaron 1×10^6 células en placas de 12 pozos (Corning Cat. 3599) con medio DMEM suplementado (SFB 10%). Las células se estimularon con LPS (1 µg/ml) por 2 horas y posteriormente se dio tratamiento por 24 horas con las AuNps-Aa, EOH-Aa (100 µg/ml), AuNps-Cs (100 µg/ml) y dexametasona (50 µg/ml) como control de actividad antiinflamatoria.

La línea celular A549 con la CC_0 (50 µg / ml) y CC_{10} (100 µg / ml) de las AuNps-Aa. En cambio, las HepG2 se trataron con la CC_0 (50 µg / ml) y CC_{10} (150 µg / ml) de las AuNps-Aa. Después del tratamiento las células se fijaron con una solución de metanol: acetona, 1:1 por 5 minutos, se realizaron dos lavados con PBS (1x), tomando en cuenta un control positivo de H_2O_2 (0.1 %) y LPS (1 µg/ml) después se incubaron. Se evaluará la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) Assay Kit 520nm (ThermoFisher No. 88-5930-74). Siguiendo las instrucciones del proveedor como se describe a continuación:

La solución concentrada de tinción (Invitrogen REF 15295) se preparará a 500 X agregando 40 μL de DMSO al recipiente de solución de tinción del kit. La solución de tinción de trabajo para el marcaje de las células se utilizará a 1X, agregando 2 μl de la solución de tinción 500 X a 1ml de la solución diluyente (Invitrogen Ref 15296).

Se agregaron 10 μL del concentrado de tinción 1x y se incubaron por 60 minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS se fijaron para ser observadas en el BA310ELITE-EPILED Microscopio con Fluorescencia LED Filtro FITC. Finalmente, se analizó la intensidad de fluorescencia de las imágenes capturadas con el software ImageJ.

6.6.3 Óxido nítrico

Para la determinación de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivos celulares se evaluaron los niveles de sus productos de degradación estables, nitrato y nitrito, utilizando un kit de ensayo colorimétrico de nitrato/nitrito (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nitrato se convierte enzimáticamente en nitrito mediante la enzima nitrato reductasa y luego se cuantifica el nitrito usando el reactivo de Griess. El límite de detección de este ensayo es de 2,5 μM . Para determinar la producción de óxido nítrico en las líneas celulares A549 y HepG2, se cultivaron 1×10^4 células en placas de 96 pozos (Corning Cat. 3599) con medio DMEM suplementado (SFB 10%). Las células se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 2 horas y posteriormente se trataron por 24 horas con las AuNps-Aa, EOH-Aa (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), AuNps-Cs (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y dexametasona (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La línea celular A549 se trató con la CC_0 (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) y CC_{10} (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de las AuNps-Aa. En cambio, la línea celular HepG2 se trató con la CC_0 (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) y CC_{10} (150 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de las AuNps-Aa. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de microplacas ELISA.

6.6.4 Evaluación de la activación de Nfr2 en las líneas celulares A549 y HepG2.

El factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2), un factor de transcripción, se considera un modulador crítico de las respuestas inflamatorias y la homeostasis redox celular. La activación del factor de transcripción Nfr2 se analizó por inmunocitoquímica, para este ensayo se colocaron cubreobjetos redondos estériles (22 mm) en placas de 12 pozos y se sembraron 2.5×10^4 células / pocillo de las líneas celulares A549 y HepG2. Se

evaluó la expresión de Nfr2 sin estímulo y con el estímulo de LPS (1 µg / ml) durante 2 horas, después las células tratadas con LPS se trataron por 24 horas con las AuNps-Aa y dexametasona (50 µg / ml) como control comercial. La línea celular A549 se trató con la CC0 (50 µg / ml) y CC10 (100 µg / ml) de las AuNps-Aa.

En cambio, las HepG2 se trataron con la CC0 (50 µg / ml) y CC10 (150 µg / ml) de las AuNps-Aa. Después del tratamiento las células se fijaron con la solución de metanol: acetona, 1:1 por 5 minutos, se dan dos lavados con PBS (1x), después se permeabilizaron las células por 8 minutos con la solución permeabilizante (0.04 g citrato de sodio:40 µL tritón X-100:40 mL H₂O), se dan dos lavados con PBS (1x), Se bloquearon los sitios inespecíficos con la solución de bloqueo (Tris.HCl 0.1 M, pH 7.5: 5 mL de BSA:50 mL PBS 1x), se lavan dos veces con PBS (1x), posteriormente se bloquearon las peroxidasa con H₂O₂ al 1 %, se lavó dos veces con PBS (1x). Se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (Nfr2 1:1000) y se incubaron por 12 horas. Después se lavó dos veces con PBS (1x), y se coloca el anticuerpo secundario IgG anti-ratón/conejo biotinilado universal incluido en este Kit VECTASTAIN® Elite ABC-HRP, peroxidasa, RTU (universal) PK-7200, el cual es un cóctel de IgG anti-ratón e IgG anti-conejo biotinilados, siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit VECTASTAIN® Elite ABC-HRP, las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 de Carl Zeiss. Finalmente, se analizó la expresión del factor de transcripción y se realizó un contraste de tinción de las imágenes capturadas, para ser analizadas por el software ImageJ.

6.7 Ensayo de actividad antiinflamatoria en células A549 y HepG2.

6.7.1 Evaluación de la activación de NF-κB en las líneas celulares A549 y HepG2.

El factor nuclear kappa B (NF-κB) es un factor transcripcional relacionado con la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. La activación del factor de transcripción NF-κB se analizó por inmunocitoquímica, para este ensayo se colocaron cubreobjetos redondos (22 mm estéril) en placas de 12 pozos y se sembraron 2.5×10^4 células / pocillo de las líneas celulares A549 y HepG2. Se evaluó la expresión de Nfr2 sin estímulo y con el estímulo de LPS (1 µg / ml) durante 2 horas, después las células tratadas con LPS se trataron por 24 horas con las AuNps-Aa y dexametasona (50 µg / ml) como

control comercial. La línea celular A549 se trató con la CC0 (50 µg / ml) y CC10 (100 µg / ml) de las AuNps-Aa. En cambio, las HepG2 se trataron con la CC0 (50 µg / ml) y CC10 (150 µg / ml) de las AuNps-Aa. Después del tratamiento las células se fijaron con la solución fijadora (Metanol: Acetona, 1:1) por 5 minutos, se lavó dos veces con PBS (1x), después se permeabilizaron las células por 8 minutos con la solución permeabilizante (0.04 g citrato de sodio:40 µL tritón X-100:40 mL H₂O), se lavó dos veces con PBS (1x), Se bloquean los sitios inespecíficos con la solución de bloqueo (Tris.HCl 0.1 M, pH 7.5: 5 mL de BSA:50 mL PBS 1x), se lavó dos veces con PBS (1x), después se realizó el bloqueo de peroxidasas con H₂O₂ al 1 %, se lavó dos veces con PBS (1x). Se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (NF-κB 1:1000) por 12 horas. Después se lavó dos veces con PBS (1x), y se coloca el anticuerpo secundario IgG anti-ratón/conejo biotinilado universal incluido en este Kit VECTASTAIN® Elite ABC-HRP, peroxidasa, RTU (universal) PK-7200, el cual es un cóctel de IgG anti-ratón e IgG anti-conejo biotinilados, siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit VECTASTAIN® Elite ABC-HRP, las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 de Carl Zeiss. Finalmente, se analizó la expresión de factor de transcripción y se realizó un contraste de tinción de las imágenes capturadas, para ser analizadas por el software ImageJ.

6.7.2 Determinación de la presencia de citocinas antiinflamatorias.

Este ensayo se realizó para ambas líneas celulares, los sobrenadantes de los distintos tratamientos fueron congelados a -70°C hasta su empleo. Las concentraciones de citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-1β, IL-10) fueron determinadas por citometría de flujo utilizando el kit de citocinas inflamatorias CBA de la marca BD (Franklin Lakes, New Jersey, United States), en un citómetro de flujo (BD Acuri).

6.8 Análisis estadístico

Los datos experimentales se presentan como media ± error estándar de la media. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía

seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de metabolitos secundarios por análisis fisicoquímico del extracto etanólico de *A. artemisiifolia*.

Se obtuvo un extracto etanólico de *A. artemisiifolia* y se identificaron los metabolitos secundarios por análisis fitoquímico.

Tabla 2. Resultados del análisis fitoquímico preliminar

<i>Metabolito secundario</i>	<i>Prueba química</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observaciones</i>
Triterpenos	<i>Ensayo de Liberman-Blichard</i>	++	<i>Coloración verde intenso</i>
Saponinas	<i>Ensayo espuma</i>	+	<i>Se observa espuma en la superficie y persiste 2 minutos</i>
Fenoles	<i>Ensayo con Cloruro férrico</i>	++	<i>Coloración verde intenso</i>
Taninos	<i>Gelatina-Sal</i>	++	<i>Se observa precipitado</i>
Sesquiterpenos	<i>Ensayo de Balijet</i>	+	<i>No se observa cambio de coloración</i>
Glucósidos	<i>Prueba de hemólisis</i>	++	<i>Se observa hemólisis en los eritrocitos a diferentes concentraciones del extracto</i>
Flavonoides	<i>Ensayo de Shinoda</i>	++	<i>Se observa una coloración naranja</i>
Alcaloides	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	++	<i>Se observa turbidez y precipitado</i>

(*) Los resultados se reportan: Poco (+), regular (++) , Abundante (+++), Negativo (-).

En la determinación preliminar de metabolitos secundarios realizada a partir del material vegetal de *A. artemisiifolia*. En la Tabla 2 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico, en el cual se identificaron: compuestos fenólicos, sesquiterpenos, flavonoides, terpenos, saponinas, taninos, glucósidos y alcaloides.

7.2 Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de un extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* (AuNPs-Aa).

Una vez obtenido, el extracto de *A. artemisiifolia* se utilizó como agente reductor para la síntesis de nanopartículas de oro, utilizando ácido cloro áurico (HAuCl_4) como agente precursor (Marzlin *et al.*, 2018). A continuación, las nanopartículas se caracterizaron utilizando espectroscopía UV-vis, AFM, XRD y FT-IR.

7.2.1 Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis.

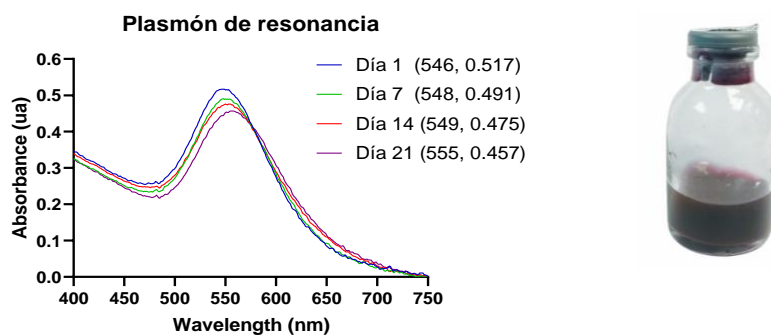


Figura 8. Análisis del espectro UV-vis de AuNps-Aa en varios intervalos de tiempo.

En el espectro de absorción UV-vis, se observó una banda de absorción a 546 nm, que corresponde a los fenómenos PRS característicos de AuNPs, esto debido a que las partículas metálicas en tamaños nanométricos presentan un plasmón característico en el caso del oro que abarca de 510 a 550nm. Se tomaron medidas a diferente tiempo, para evaluar la estabilidad de la síntesis al día 1, 7, 14 y 21.

7.2.2 Análisis por Dispersión de luz dinámica (DLS) de tamaño, PDI, Potencial Z

En el análisis de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z se observaron Nps que variaban de 80 a 100 nm con un tamaño promedio de 88.29 y un PDI de 0.2 (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis por Dispersión de luz dinámica (DLS) de tamaño, PDI, Potencial Z en varios intervalos de tiempo.

Tiempo	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Día 1	80.46	0.277	- 16
Día 7	80.76	0.269	- 29.1
Día 14	93.83	0.274	- 30.4
Día 21	98.11	0.272	- 33.7

Los valores del potencial zeta (PZ) revelaron información sobre la carga superficial y la estabilidad de las AuNps sintetizadas. Como se puede ver en la Tabla 3, el valor PZ variaban de -16 al día 1 y disminuía conforme el tiempo hasta llegar a - 33.7 a los 21 días, lo que indica que las moléculas presentes en la superficie de las AuNps están compuestas principalmente por grupos cargados negativamente y también son responsables de la estabilidad moderada de las nanopartículas. La muestra no precipitó durante un período de dos meses, lo que indica que los AuNps se mantienen estables durante un período de tiempo razonable.

7.2.3 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

En la microscopia de fuerza atómica (AFM), se confirmaron tamaños de las nanopartículas que iban desde 70 a 100 nm y se observó que tenían una morfología casi esférica y algunas de ellas estaban agregadas (Figura 9).

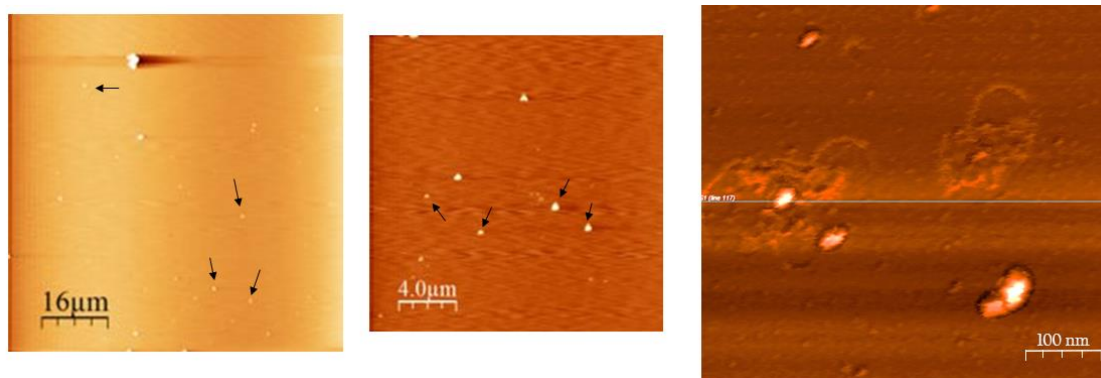


Figura 9. En la microscopia de fuerza atómica (AFM), se confirmaron nanopartículas con un tamaño de 70 a 100 nm.

7.2.4 Difracción de rayos X (XRD)

El patrón XRD de los AuNps-Aa sintetizados mostró picos de reflexión que aparecieron a $38,10^\circ$, $44,13^\circ$, que corresponden a los índices de Miller (111) y (200) respectivamente. Se identificaron los picos correspondientes a KCl y NaCl, que eran subproductos de la reacción (Figura 10).

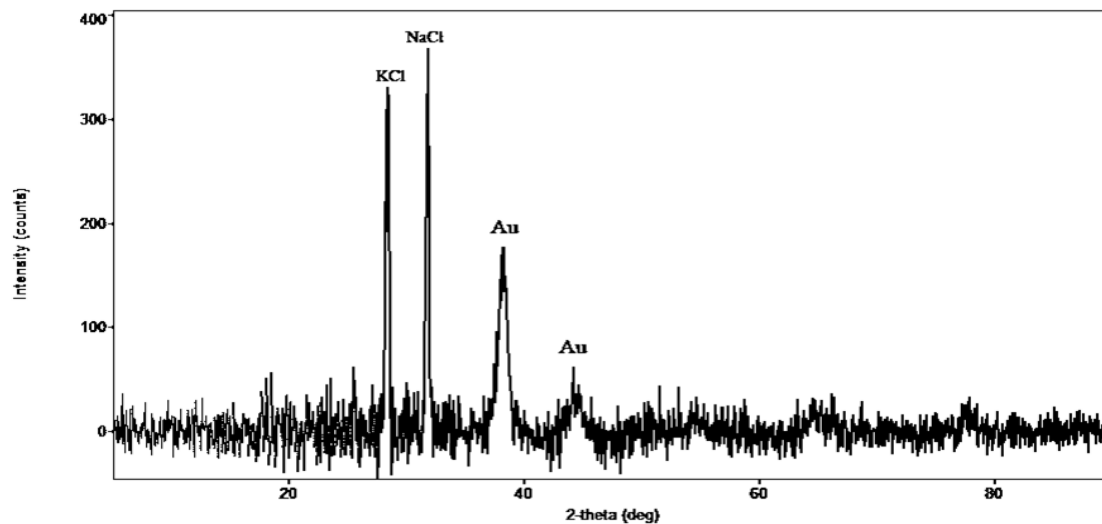


Figura 10. Patrones de difracción de rayos X (XRD) de AuNps-Aa. Se observaron picos de reflexión a $38,16^\circ$, $44,11^\circ$ lo que indica la presencia de oro cristalino puro.

7.2.5 Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier

En el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se identificaron los grupos funcionales que, se sugiere, participaron en la reducción de la síntesis de las AuNPs.

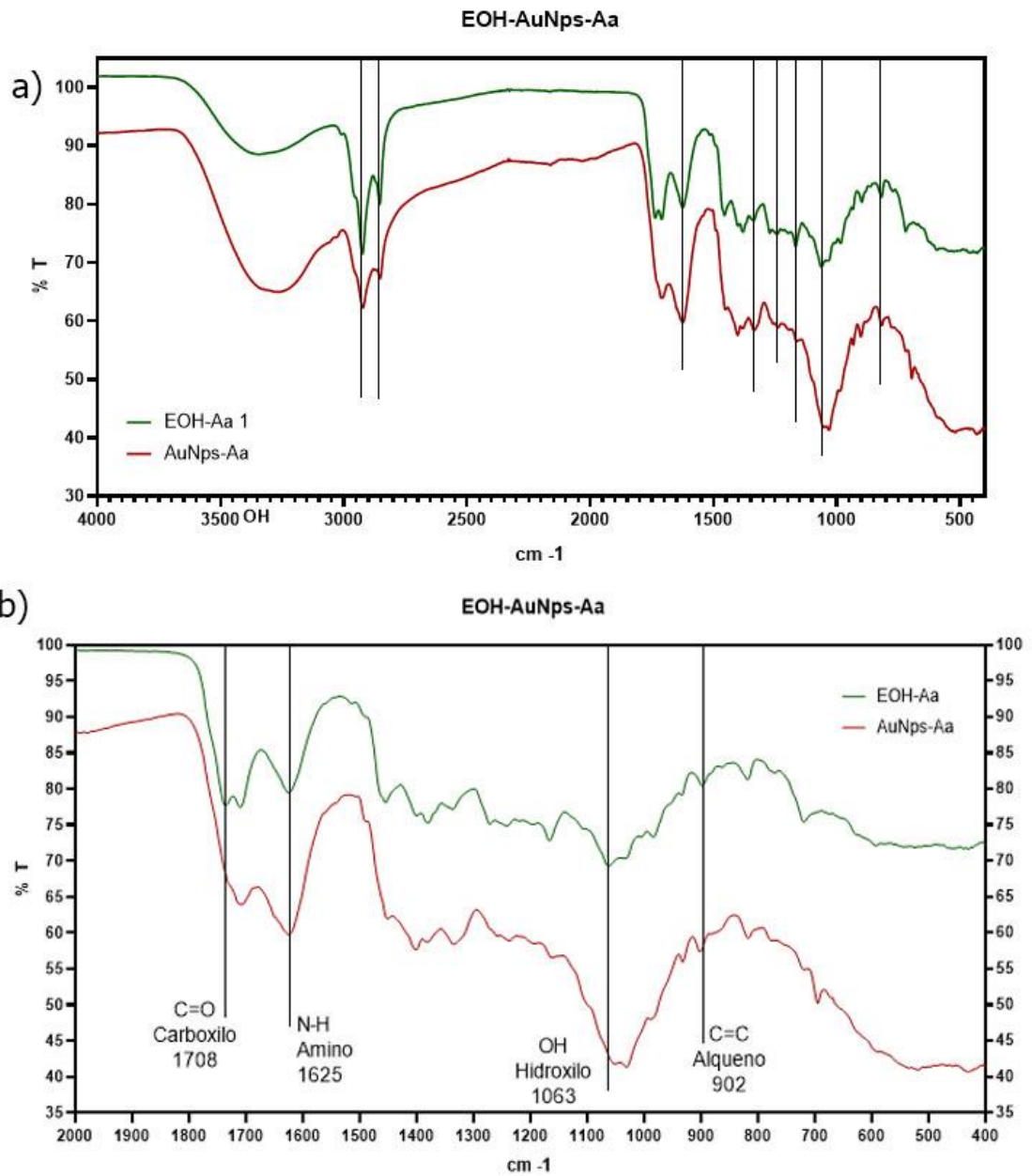


Figura 11. Espectros IR del EOH-Aa y AuNPs-Aa a) picos característicos de los grupos funcionales del EOH-Aa. b) espectros IR entre 2000 y 400 cm-1 donde se observan los picos de las interacciones entre el oro y el grupo químico carboxilo, hidroxilo y alqueno presente en el EOH-Aa.

En la Figura 11b se identifican bandas de absorción a 1700 a los 1800 cm-1 que están relacionadas con el grupo carboxilo. Se observó una banda entre 1000 y 1100 cm-1 para el grupo hidroxilo, y las bandas que van desde 900 a 800 cm-1 están relacionados con el grupo químico de alqueno. Después de analizar los FT-IR se observó un corrimiento

correspondiente al modo de vibración relacionado con el grupo carboxilo presente en el extracto de *Ambrosía artemisiifolia* (EOH-Aa), indicando interacciones químicas con ácido cloro áurico HAuCl_4 .

7.2.6 Actividad hemolítica

Se evaluó si el EOH-Aa y las AuNps-Aa tienen actividad hemolítica a concentraciones menores a 500 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 12 se observa que el EOH-Aa y las AuNps-Aa inducen actividad hemolítica de 1 al 2 % en las concentraciones de 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$, pero en dosis menores a 300 $\mu\text{g/mL}$ no se induce hemólisis.

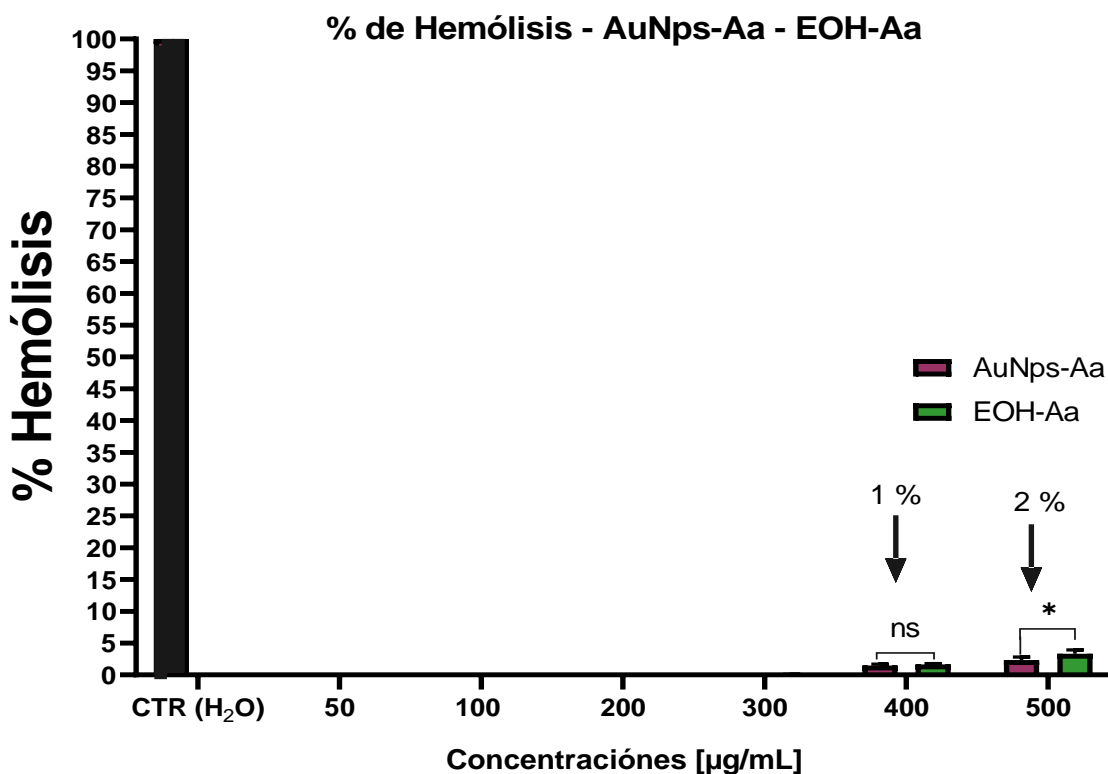


Figura 12. Determinación de la actividad hemolítica del EOH-Aa y las AuNps-Aa en diferentes concentraciones. La comparación de medias se evaluó mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Shapiro-Wilk.

7.3 Efecto de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un extracto etanólico de *Ambrosia artemisiifolia* en las líneas celulares A549 y HepG2.

Se evaluó el efecto de las AuNps-Aa en las líneas celulares A549 y HepG2, mediante un ensayo MTT. Las AuNps-Aa se evaluaron en un intervalo de concentraciones de 50 a 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$, al igual AuNps-Cs y el EOH-Aa.

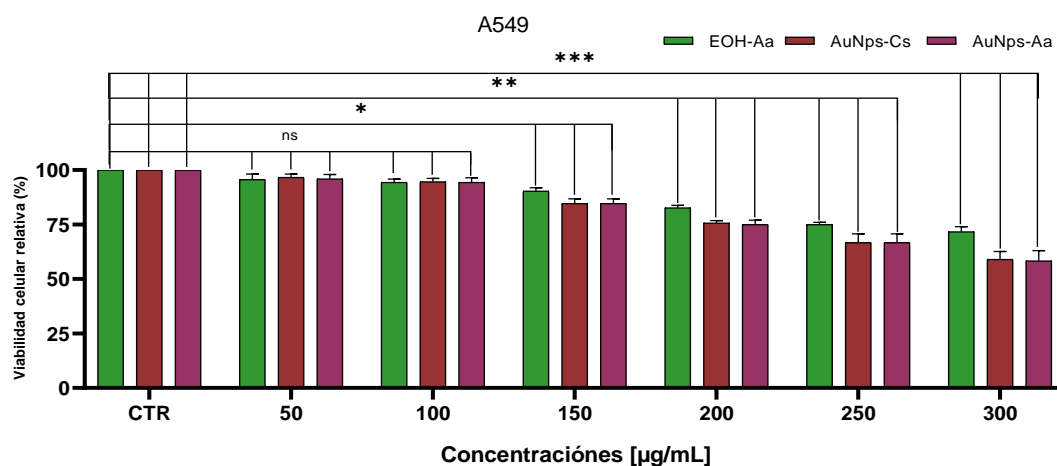


Figura 13. Viabilidad de células A549 por el ensayo de MTT. EOH-Aa (verde), AuNps (rosa) y AuNps-Aa (morado). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las AuNps-Aa disminuyen el porcentaje de viabilidad relativa en la línea celular A549 de manera significativa en concentraciones mayores a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (* $p < 0.05$). Pero en concentraciones menores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no se observa una diferencia significativa estadística con respecto al control.

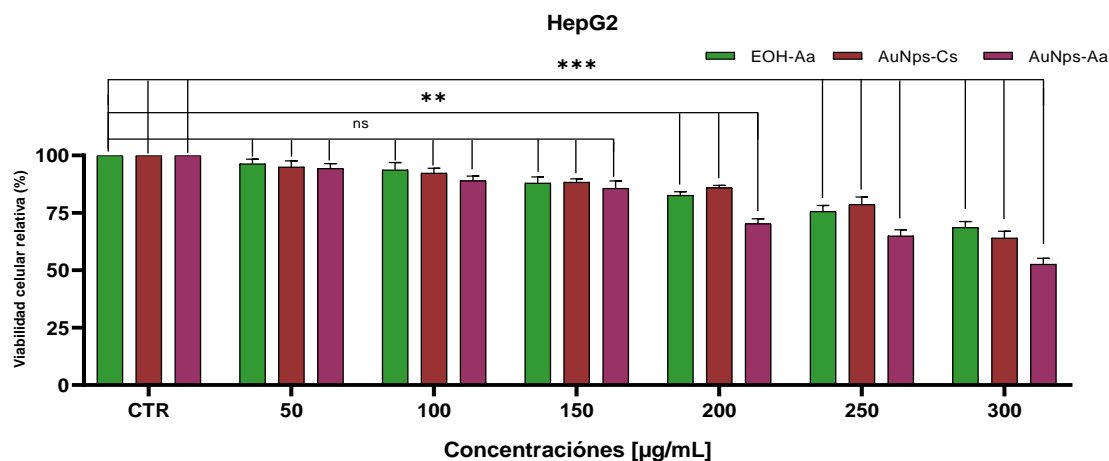


Figura 14. Viabilidad de células HepG2 por el ensayo de MTT. EOH-Aa (verde), AuNps (rosa) y AuNps-Aa (morado). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,001 y ***p < 0,0001 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

En la línea celular HepG2 las AuNps-Aa disminuyeron el porcentaje de viabilidad relativa de manera significativa en concentraciones mayores a 200 µg/mL (**p < 0.001). Pero en dosis menores a 150 µg/mL no se observa diferencia significativa estadística con respecto al control.

7.4 Ensayo de actividad antioxidante en las líneas celulares A549 y HepG2.

7.4.1 Ensayo antioxidante de MTT

Como se presenta en la Figura 15, el extracto etanólico de *A. artemisiifolia* redujo de manera dependiente de la dosis el compuesto MTT al igual que las AuNps-Aa, reduciendo el compuesto de MTT a la sal de formazán, lo que sugiere que ambos compuestos tienen un potencial antioxidante, esto en comparación con el control positivo de ácido ascórbico.

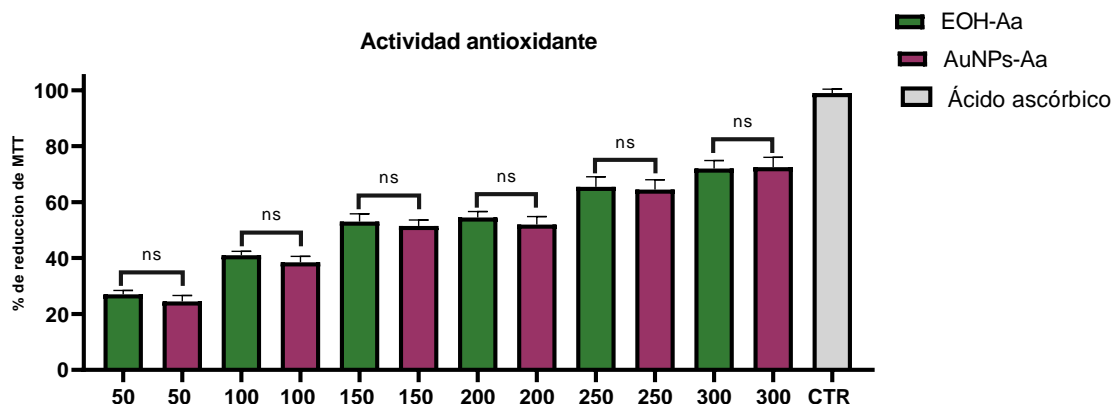


Figura 15. Determinación de la actividad antioxidante del extracto de *Ambrosia artemisiifolia* y las AuNps-Aa mediante ensayo MTT. La comparación de medias se evaluó mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Shapiro-Wilk.

No se encontró diferencia significativa estadística entre el porcentaje de reducción del extracto con el presentado por las AuNps-Aa, y que el porcentaje de reducción es dependiente de dosis en ambos tratamientos.

7.4.2 Efecto de AuNps-Aa en la producción de especies reactivas de oxígeno

Para determinar si las AuNps-Aa podrían inhibir la producción de ROS en las líneas celulares A549 y HepG2 estimuladas con LPS, determinamos en las células la intensidad de fluorescencia proporcional a los niveles de especies reactivas de oxígeno dentro del citosol celular. Se estimuló el proceso de inflamación en las células, tratándolas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 horas. Después de este período se trataron con AuNPs-Aa, AuNps-Cs, EOH-Aa y dexametasona como control, se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas. El aumento de la producción de ROS fue significativamente menor en las células tratadas con las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración.

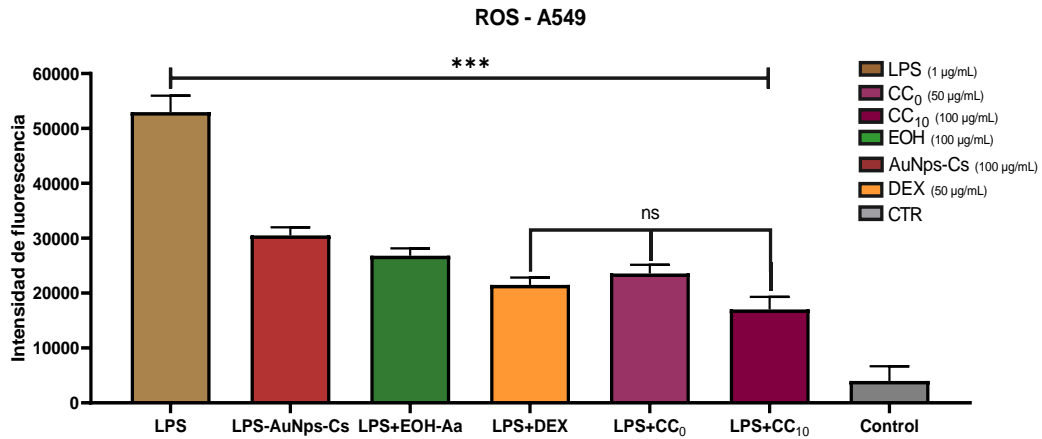
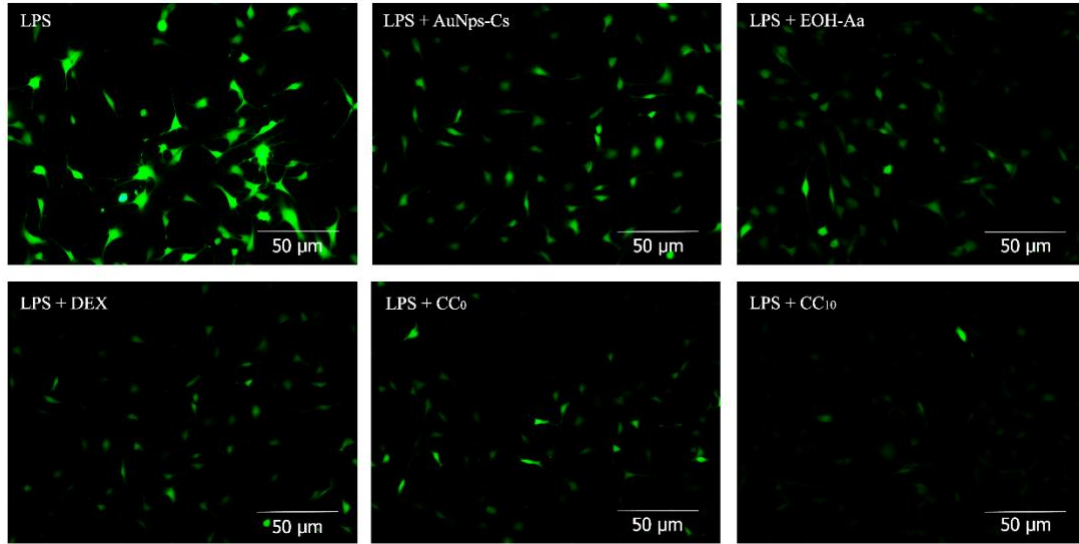


Figura 16. Producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular A549 sin estímulo y con estímulo de LPS (1 µg/mL). Los tratamientos consistieron en AuNps-Aa (50 y 100 µg/mL), EOH-Aa (100 µg/mL), AuNps-Cs (100 µg/mL) y dexametasona (50 µg/mL). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Shapiro-Wilk.

En células A549 estimuladas con LPS se encontró que la intensidad de fluorescencia fue mayor en el tratamiento con LPS comparado con el resto de los tratamientos. Cuando se comparó la intensidad de fluorescencia del tratamiento comercial de dexametasona con los tratamientos de las AuNps-Aa no se observó una diferencia significativa estadística, lo que indica que las AuNps-Aa inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno de forma similar a la dexametasona.

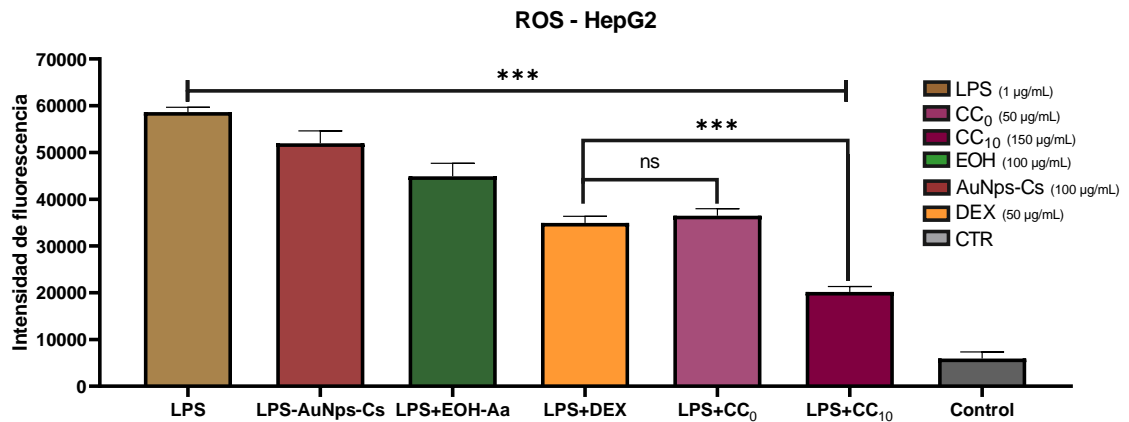
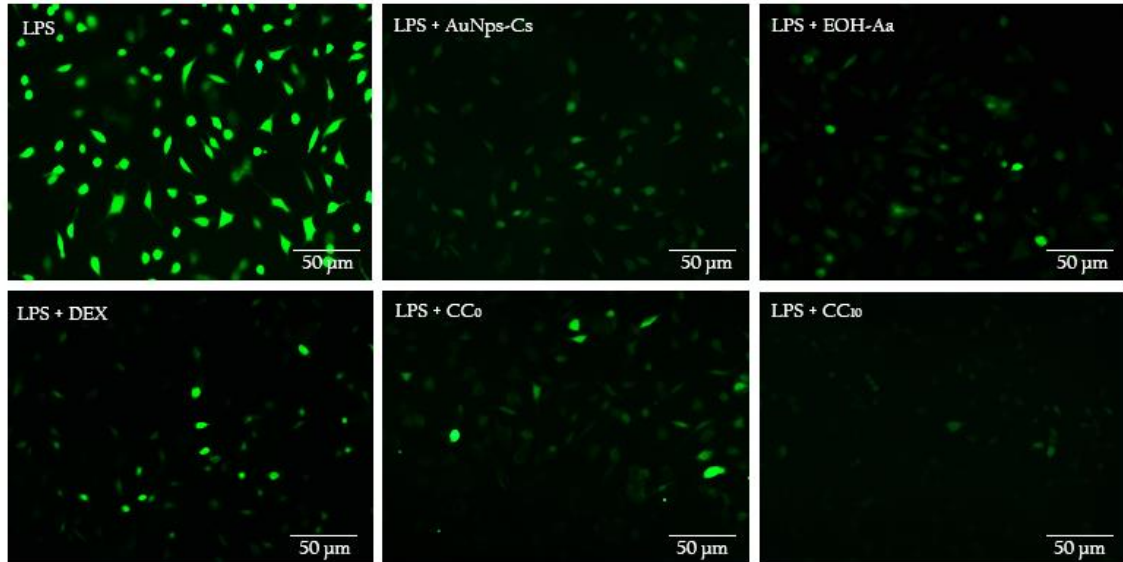


Figura 17. Producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular HepG2 sin estímulo y con estímulo de LPS (1 µg/mL). Las células se trataron con AuNps-Aa (50 y 150 µg/mL), EOH-Aa (100 µg/mL), AuNps-Cs (100 µg/mL) y Dexametasona (50 µg/mL). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Shapiro-Wilk.

En las células HepG2 estimuladas con LPS se encontró que la intensidad de fluorescencia fue mayor en el tratamiento con LPS comparado con el resto de los tratamientos, pero cuando se compara la intensidad de fluorescencia del tratamiento comercial de dexametasona con la concentración citotóxica 0 de las AuNps-Aa no se observó una diferencia estadística significativa, sin embargo, cuando se comparó con la concentración citotóxica 10 (** $p < 0,001$) de las AuNps-Aa si existe una diferencia significativa en la

intensidad de fluorescencia. El aumento de la intensidad de fluorescencia fue significativamente suprimido por las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración.

7.4.3 Efecto de AuNps-Aa en la producción de óxido nítrico

Para determinar si las AuNps-Aa podrían inhibir la producción de óxido nítrico en las líneas celulares A549 y HepG2 estimuladas con LPS, determinamos los niveles de nitrito y nitrato, que es un producto estable del metabolismo del óxido nítrico en los medios de cultivo utilizando el reactivo de Griess. Se determinó que el tratamiento con AuNps-Aa no indujo la producción de óxido nítrico en las líneas celulares A549 y HepG2. Sin embargo, cuando se estimularon con LPS, la producción de óxido nítrico fue disminuida con respecto a los tratamientos.

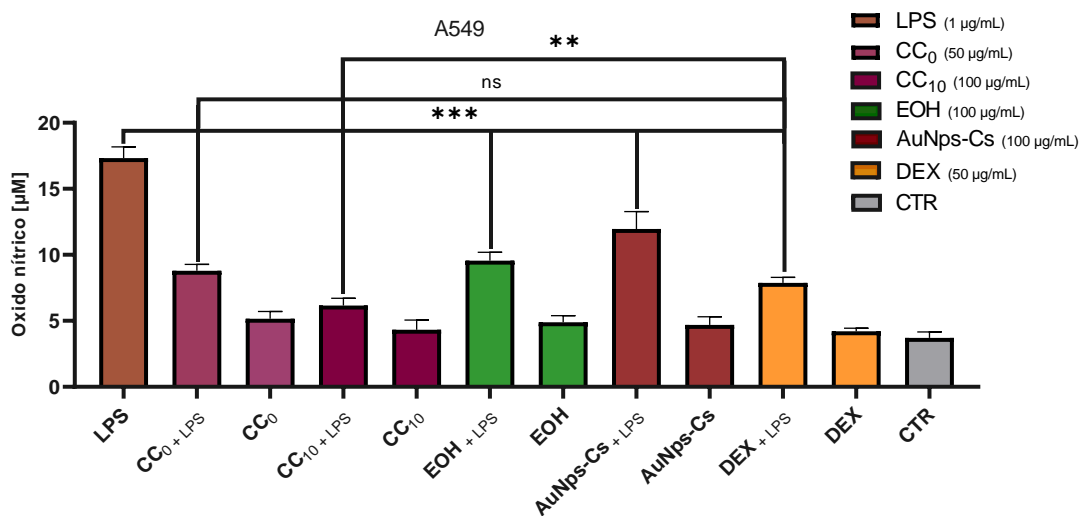


Figura 18. Producción de óxido nítrico en la línea celular A549 sin estímulo y con estímulo de LPS (1 µg/mL). Se utilizaron tratamientos de AuNps-Aa (50 y 100 µg/mL), EOH-Aa (100 µg/mL), AuNps-Cs (100 µg/mL) y dexametasona (50 µg/mL). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,001 y ***p < 0,0001 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

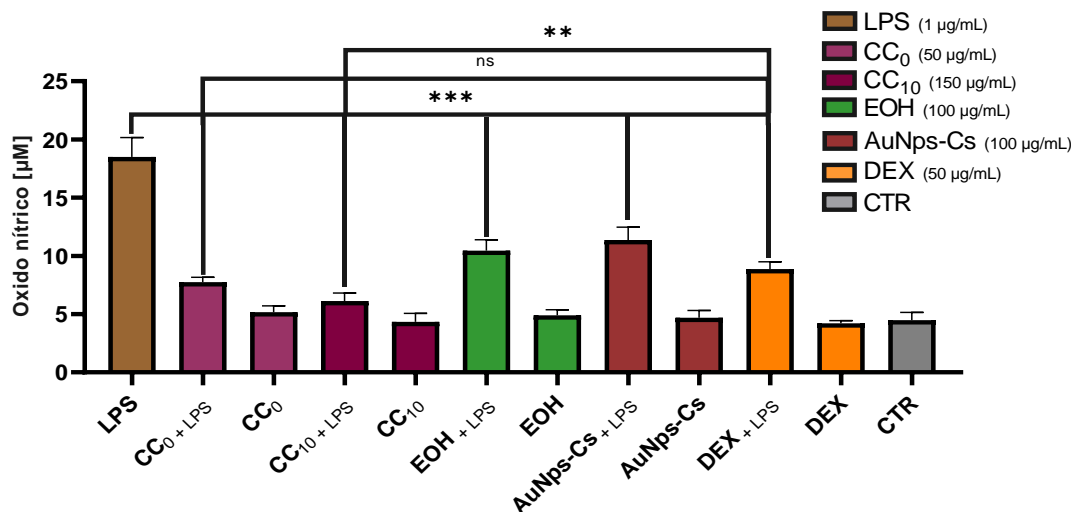


Figura 19. Producción de óxido nítrico en la línea celular HepG2 sin estímulo y con estímulo de LPS (1 μg/mL). Se utilizaron tratamientos de AuNps-Aa (50 y 100 μg/mL), EOH-Aa (100 μg/mL), AuNps-Cs (100 μg/mL) y dexametasona (50 μg/mL). La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,001 y ***p < 0,0001 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La exposición a LPS (1 μg/mL) durante 24 horas indujo una liberación excesiva de óxido nítrico en ambas líneas celulares (Figura 18, Figura 19). El aumento de la producción de óxido nítrico fue significativamente suprimido por las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración (50 μg/mL **p < 0.001, 100 μg/mL ***p < 0.0001, 150 μg/mL ***p < 0.0001) tanto en la línea celular A549 como en la HepG2. La producción de óxido nítrico en las células tratadas con dexametasona fue significativamente mayor al ser comparado con las AuNPs-Aa. El aumento de la producción de óxido nítrico fue significativamente inhibido por las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración.

7.4.4 Evaluación de la activación de Nfr2 en las líneas celulares A549 y HepG2.

La activación del factor de transcripción Nfr2 se determinó por inmunocitoquímica en las líneas celulares A549 y HepG2, determinando el área porcentual de inmunopositividad en las células y cuantificando mediante el software ImageJ, como lo describe Binch, A. y colaboradores (2020).

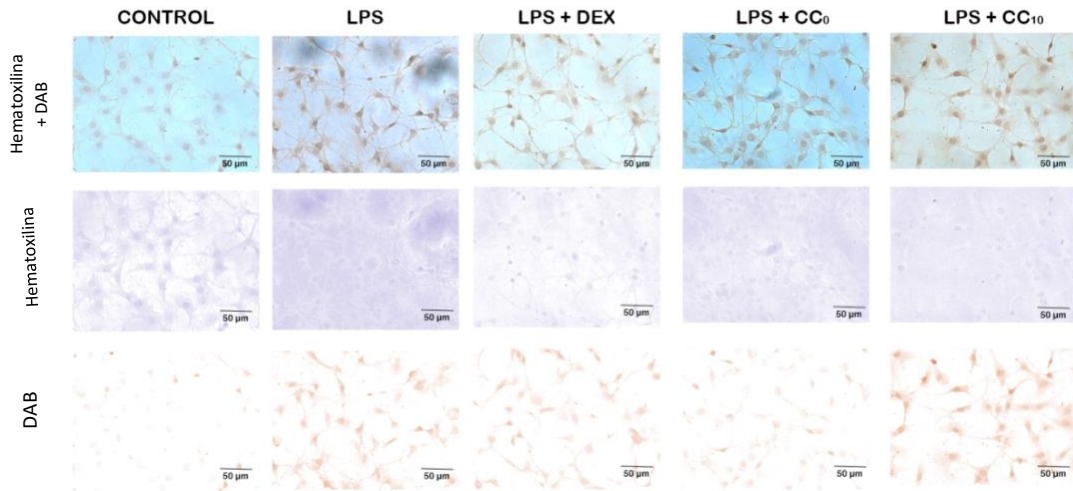


Figura 20. Expresión por inmunocitoquímica del factor Nfr2 en la línea celular A549. Las células de color marrón se consideran positivas y las moradas negativas, con contraste de hematoxilina.

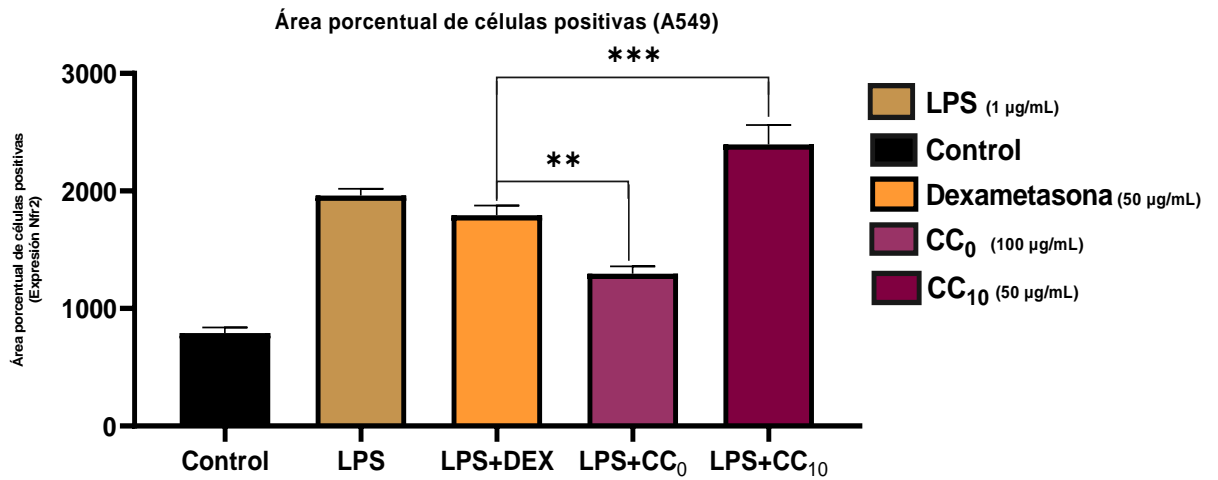


Figura 21. Evaluación del área porcentual para determinar la expresión del factor Nfr2 en la línea celular A549, estimuladas con LPS y tratadas con Dexametasona, las AuNps-Aa en diferentes concentraciones. La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Evaluando la expresión del factor de Nfr2, se determinó que existe un aumento significativo en el área porcentual de células tratadas con las AuNps-Aa en la

concentración citotóxica 10 (** $p < 0.0001$), en comparación con el resto de los tratamientos.

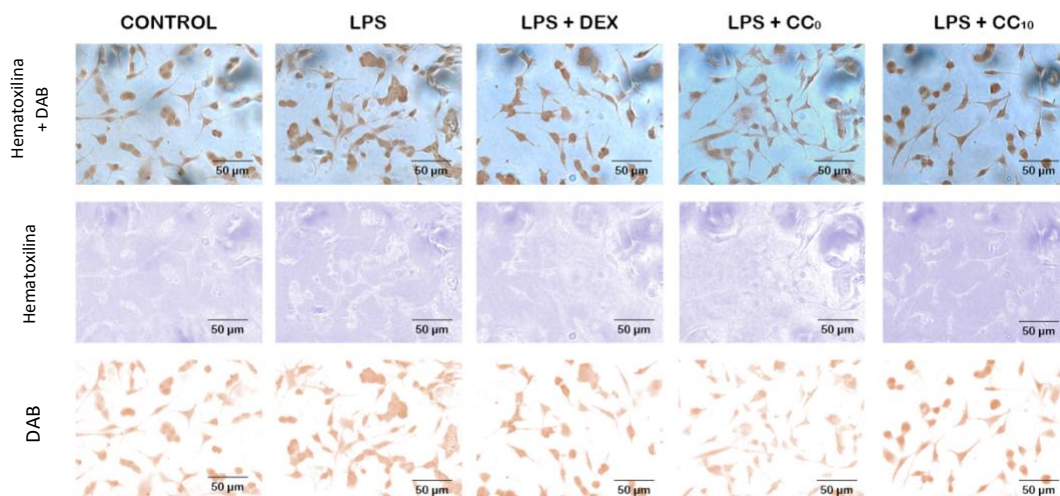


Figura 22. Expresión por inmunocitoquímica del factor Nfr2 en la línea celular HepG2. Las células de color marrón se consideran positivas y las moradas negativas, con contraste de hematoxilina.

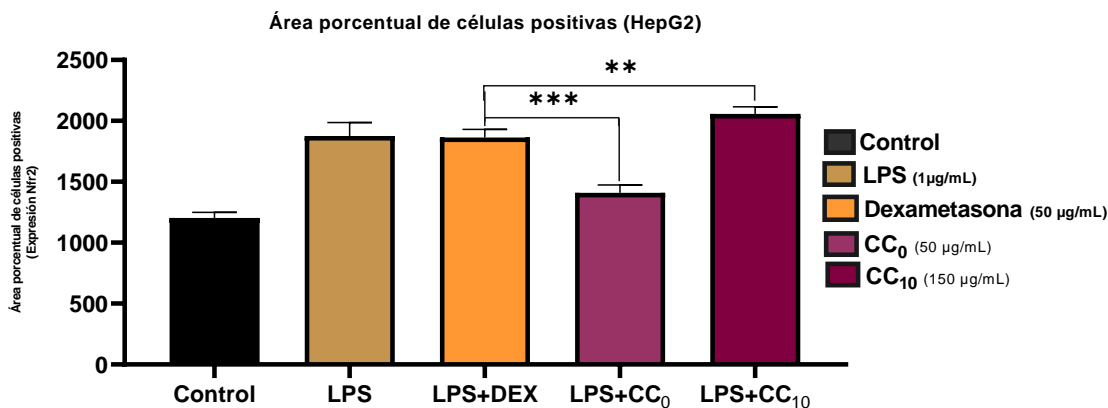


Figura 23. Evaluación del área porcentual para determinar la expresión del factor Nfr2 en la línea celular HepG2, estimuladas con LPS y tratadas con dexametasona, las AuNps-Aa en diferentes concentraciones. La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se determinó la expresión del factor Nfr2 en la línea celular HepG2 mediante el análisis del área porcentual de células estimuladas con LPS positivas para este factor. Se determinó

una mayor área porcentual de las células tratadas con la concentración citotóxica 10 (**p<0.001) de las AuNps-Aa en comparación con la dexametasona y el LPS.

7.5 Ensayo de actividad antiinflamatoria en las líneas celulares A549 y HepG2.

7.5.1 Evaluación de la activación de NF- κ B en las líneas celulares A549 y HepG2.

Se evaluó la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF κ B en las líneas celulares A549 y HepG2. Cultivos celulares se estimularon con LPS por dos horas, después se trataron con dexametasona y las AuNps-Aa en diferentes concentraciones.

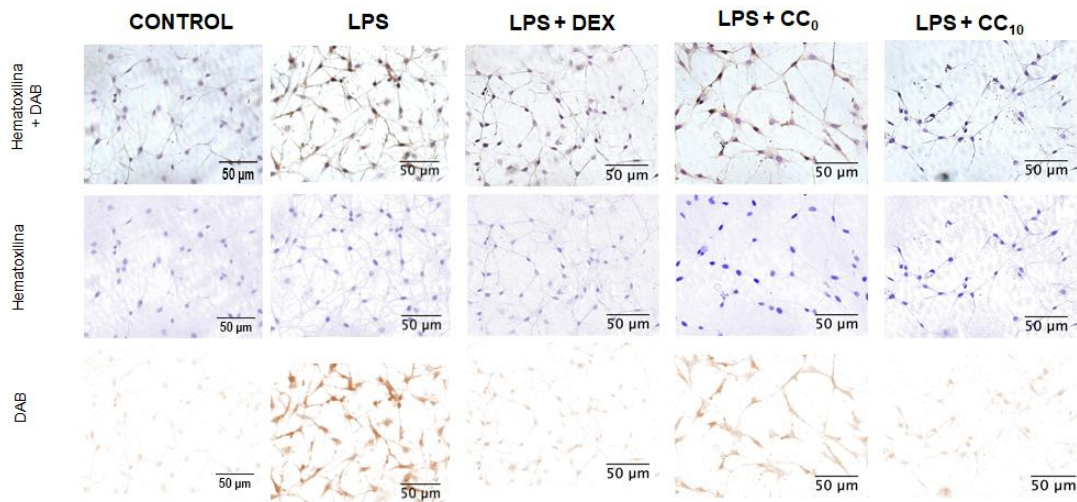


Figura 24. Determinación de la expresión del factor NF κ B subunidad p65 en la línea celular A549 por inmunocitoquímica. Las células de color marrón se consideran positivas y las moradas negativas, con contraste de hematoxilina.

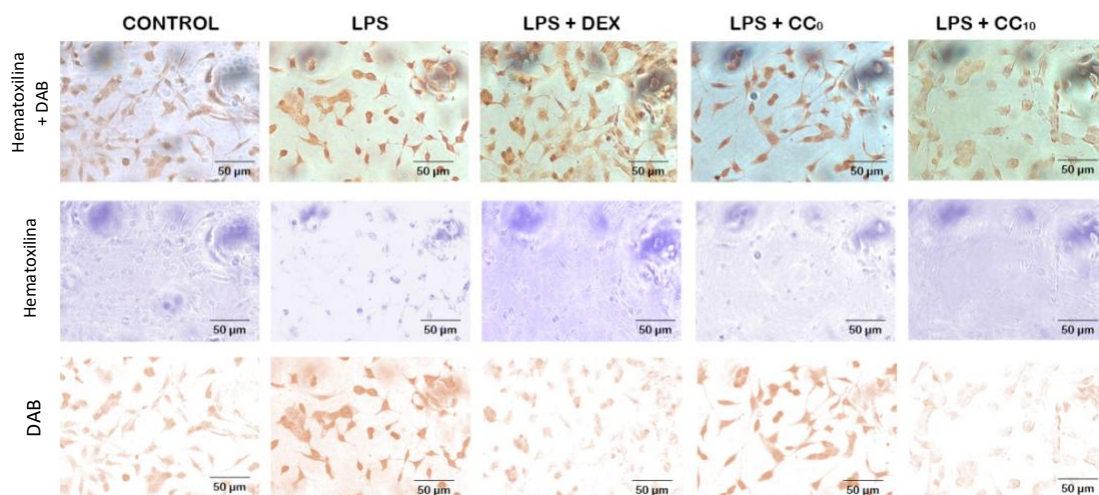


Figura 25. Determinación de la expresión del factor NFκB subunidad p65 en la línea celular HepG2 por inmunocitoquímica. Las células de color marrón se consideran positivas y las moradas negativas, con contraste de hematoxilina.

Como se muestra en la Figura 24 y 25, el tratamiento con las AuNPs-Aa bloqueó claramente la regulación positiva inducida por LPS para la activación de la subunidad p65 de NFκB en las líneas celulares A549 y HepG2, además, el tratamiento con las AuNps-Aa en la concentración más alta inhibió la expresión de p65, de forma evidente comparado con el tratamiento con dexametasona. Por lo tanto, los resultados demostraron que las AuNPs-Aa inhibieron significativamente la expresión de NF-κB en las líneas celulares A549 y HepG2 estimuladas con LPS.

7.5.2 Determinación del perfil de citocinas antiinflamatorias.

Se utilizó citometría de flujo para detectar la liberación de citocinas proinflamatorias Th1 y Th2 como IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-4 y IL-2 en el sobrenadante de células A549 y HepG2, después de ser estimuladas con LPS por dos horas y posteriormente tratadas con las AuNps-Aa, dexametasona, AuNPs-Cs, EOH-Aa.

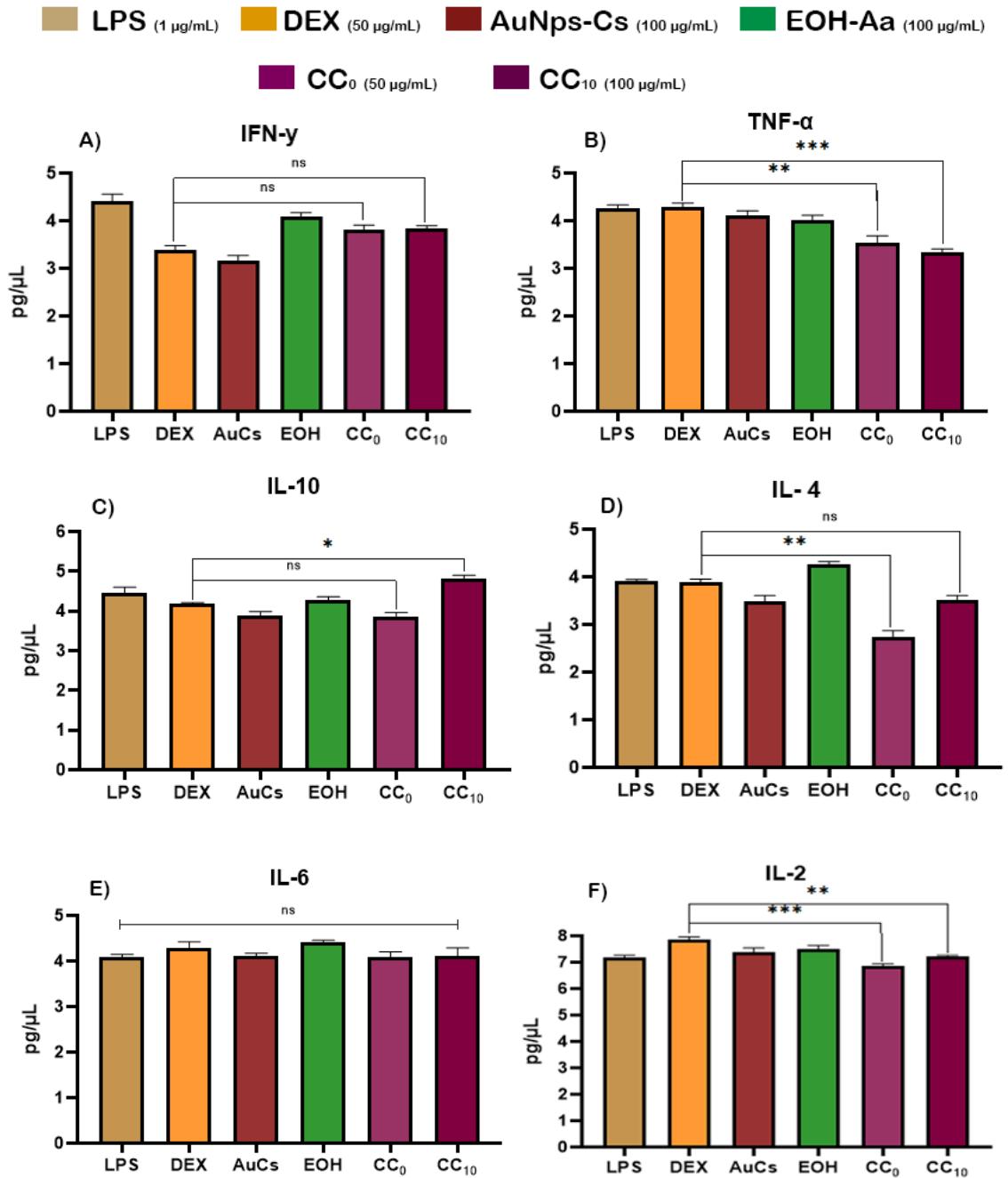


Figura 26. Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 por citometría de flujo en sobrenadantes de células A549, estimuladas con LPS y tratadas con las AuNps-Aa, dexametasona, AuNPs-Cs, EOH-Aa. La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

En los sobrenadantes de cultivos de células A549 tratadas con las AuNps-Aa (100μg/mL) (** $p < 0.0001$) se observó una disminución en la secreción de TNF-α de forma

significativa comparado con el tratamiento de dexametasona. Pero en el caso de la IL-10, se observa que en el tratamiento con la concentración citotóxica 10 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ * $p < 0.05$) hubo un aumento significativo en la secreción de IL-10 en comparación con el tratamiento de dexametasona.

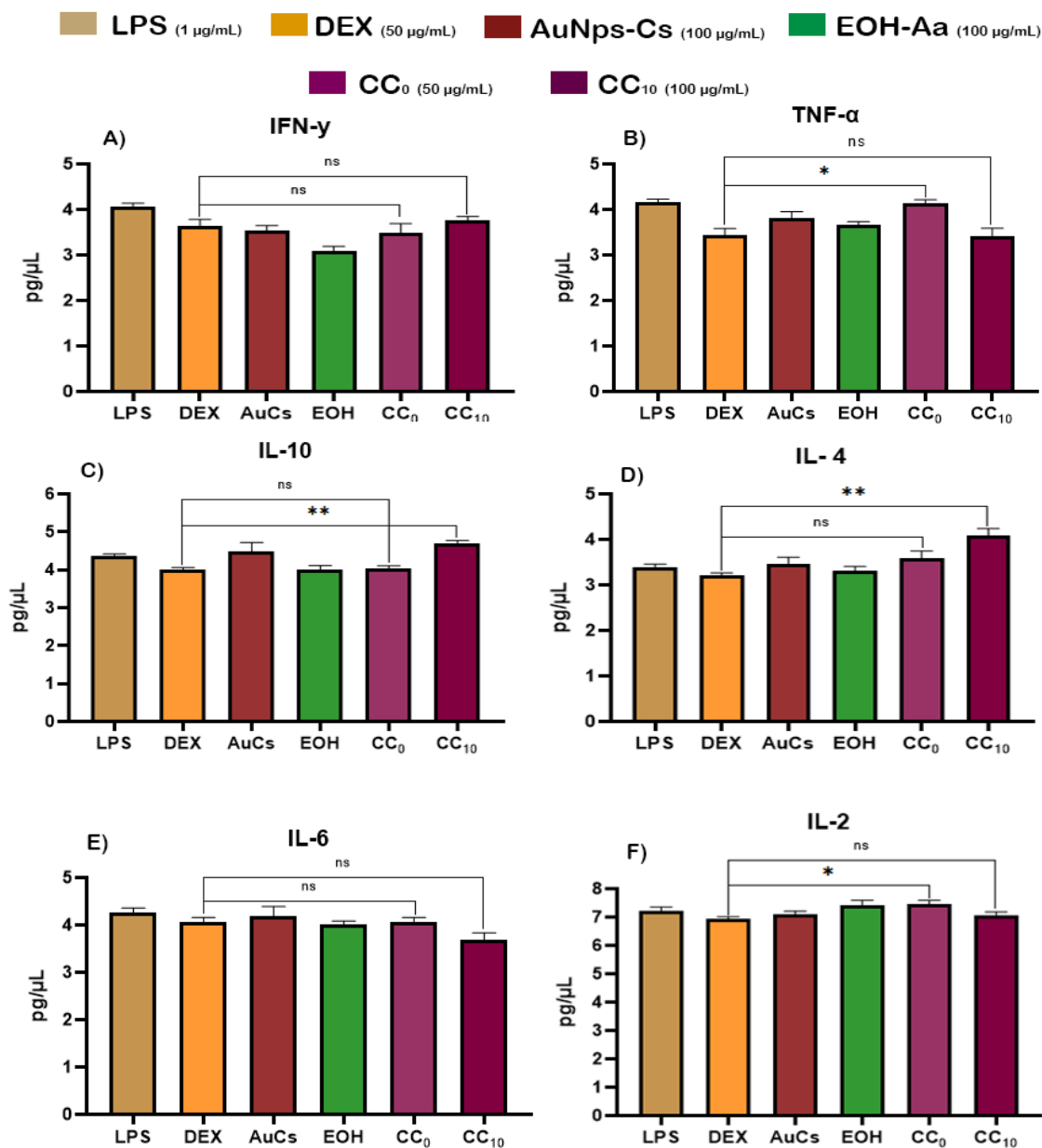


Figura 27. Determinación del perfil de citocinas Th1, Th2 por citometría de flujo en sobrenadantes de células A549, estimuladas con LPS y tratadas con las AuNps-Aa, dexametasona, AuNPs-Cs, EOH-Aa. La comparación de medias se evaluó mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba

de comparación múltiple de Dunnett. *p <0,05, **p<0,001 y ***p<0,0001 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos se normalizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

En la línea celular HepG2 tratadas con concentración citotóxica 10 de las AuNps-Aa se observó que hubo una disminución en la secreción de IL-6 en comparación con el tratamiento de dexametasona. Pero en la secreción de IL-10 y IL-4 se observa que en el tratamiento con la concentración citotóxica 10 de las AuNps-Aa (100 µg/mL *p<0.05) hubo un aumento significativo en la secreción de IL-10 y IL-4 en comparación con el tratamiento de dexametasona.

8. DISCUSIÓN

El uso de extractos de plantas para la síntesis de nanopartículas metálicas ha generado la atención de la comunidad científica en los últimos años, esto debido a que se ha observado que estas formas nanométricas mejoran las propiedades biológicas y funcionales de las plantas y son obtenidos por métodos de síntesis físicos o químicos convencionales donde una solución metálica es el precursor de las nanopartículas y el extracto de la planta actúa como reductor y estabilizador (Mittal, 2013).

En el presente estudio, se obtuvo un extracto etanólico a partir del material vegetal de *A. artemisiifolia* y se empleó como agente reductor de ácido cloro áurico con el fin de obtener AuNps. En la Tabla 2 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico que se realizó para la identificación de compuestos fenólicos, sesquiterpenos, flavonoides, terpenos, saponinas, taninos, glucósidos y alcaloides presentes en el extracto etanólico, coincidiendo con los análisis reportados por Arrieta, *et. al.* (2018) donde se realizó el tamizaje en un extracto alcohólico de *A. artemisiifolia* como en otras especies del género y se identificó la presencia de alcaloides, sesquiterpenos, triterpenos y esteroides, resinas, saponinas, taninos, cumarinas, flavonoides y azúcares reductores.

Una vez obtenido y caracterizado el extracto, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro, utilizando HAuCl_4 como agente precursor y extracto vegetal como agente reductor (Marslin *et al.*, 2018). Las AuNps-Aa, se caracterizaron utilizando espectroscopía UV-vis, AFM, XRD y análisis FT-IR. En el proceso de síntesis de las AuNps-Aa con el extracto de *A. artemisiifolia* y HAuCl_4 , se observó un cambio de color, de amarillo a morado oscuro vinculado a la formación de AuNps, como lo describe Baran, *et.al.* (2021) el cual reporta que en la síntesis de AuNPs utilizando el extracto *Artemisia absinthium*, se determinó que el cambio de color de amarillo a morado oscuro se debía a la reducción del oro a un tamaño nanométrico. Se tomaron medidas en diferentes intervalos de tiempo, para evaluar la estabilidad de la síntesis al día 1, 7, 14 y 21. En el espectro de absorción UV-vis, se observó una banda de absorción a 546 nm, como se observa en la Figura 9, estos resultados son similares a los reportados en la biosíntesis con extracto de *Artemisia absinthium*, donde se encontraron absorbancias con longitud de onda máxima de 528 nm

(Baran *et al.*, 2020). A una conclusión similar también se llegó en un estudio realizando la síntesis de AuNPs con el extracto de *Artemisia vulgaris* (Sundararajan *et al.*, 2017). Esto se atribuye debido a que las partículas metálicas en tamaños nanométricos presentan un plasmón característico en el caso del oro, que varía de 510 a 550 nm, es posible identificar la existencia de partículas de oro en el estado nanométrico (Khan *et al.*, 2020).

En el análisis de tamaño y morfología se observó que las partículas tenían forma casi esférica y algunas de ellas estaban agregadas (Figura 10), se confirmaron tamaños que iban desde 70 a 100 nm y un índice de polidispersidad PDI de 0.2 (Tabla 2). Los tamaños encontrados concuerdan con lo reportado en un estudio de síntesis llevado a cabo con el extracto de *A. absinthium*, donde se encontró que las AuNPs exhibieron una morfología esférica, por debajo de 100 nm (Barant *et al.*, 2021). En cuanto a los valores del potencial zeta (Tabla 2) se obtuvo un potencial z de -16 al día 1 y disminuía hasta llegar a -33.7 a los 21 días, lo que indica que las moléculas presentes en la superficie de las AuNps están compuestas principalmente por grupos cargados negativamente y también son responsables de la estabilidad de las nanopartículas.

En el patrón XRD los picos de reflexión aparecieron a 38,10 °, 44,13 ° de 2 θ , que corresponden a los índices de Miller (111) y (200) respectivamente. Se identificaron KCl y NaCl, que eran subproductos de la reacción (Figura 11) esto concuerda por lo mencionado por Lee *et al.*, (2019), donde menciona que se obtienen picos de reflexión característicos del oro y se pueden obtener subproductos como los encontrados al realizar la síntesis con extractos de plantas, esto debido a que ciertas plantas tienen altas concentraciones de estas sales. Después de analizar los FT-IR del extracto y las AuNps-Aa se observaron que las bandas de IR demostraron la presencia de los grupos químicos de *A. artemisiifolia* que interaccionan con el HAuCl₄. Estas interacciones, sugieren que los grupos carboxilos, pueden ser responsables de la reducción. Esto debido a lo reportado por Bran *et al.* (2021), donde mencionan que los grupos carboxílicos, aldehídos y anhídridos presentes en el extracto de *Artemisia absinthium* se consideran responsables de la reducción de las AuNps.

La actividad hemolítica del EOH-Aa y las AuNps-Aa en diferentes concentraciones se evaluaron mediante un ensayo de hemólisis. Los compuestos se incubaron con suspensión

de eritrocitos a 37 ° C durante 24 horas. Los resultados observados en la Figura 12 demostraron que el EOH-Aa y las AuNps-Aa inducen actividad hemolítica de 1 al 2 % en las concentraciones de 400 y 500 µg/mL, pero en concentraciones menores a 300 µg/mL no se induce hemolisis. No se encontraron diferencias significativas entre el EOH-Aa y las AuNps-Aa, esto demuestra que las AuNps-Aa y el extracto no causan daño a los eritrocitos en concentraciones menores de 500 µg/mL demostrando su biocompatibilidad (Xia, 2019).

Las AuNps-Aa se evaluaron en un intervalo de concentraciones de 50 a 300 µg / mL, al igual AuNps-Cs y el EOH-Aa en las líneas celulares A549 y HepG2, se evaluó mediante el ensayo MTT. En la Figura 14 se observa que las AuNps-Aa disminuyen el porcentaje de viabilidad relativa en la línea celular A549 de manera significativa en concentraciones mayores a 150 µg/mL. Pero en concentraciones menores a 100 µg/mL, no se observa diferencia significativa con respecto al control. En cambio, en la línea celular HepG2, las AuNps-Aa disminuyeron el porcentaje de viabilidad relativa de manera significativa a concentraciones mayores a 200 µg/mL, pero en concentraciones menores a 150 µg/mL, no se observa diferencia significativa con respecto al control. Esto concuerda con los reportes de Sánchez y colaboradores (2016) donde el EOH-Aa afectó la viabilidad de las células DU-145 en concentraciones mayores a 300 µg/mL del extracto crudo.

Se determinó también si el EOH-Aa y las AuNps-Aa tienen potencial antioxidante, esto a partir de la capacidad del extracto para reducir el compuesto MTT a la sal de formazán, como lo menciona (Yunbao & Muraleedharan, 2010). En la Figura 16, se observa que el EOH-Aa redujo el compuesto MTT de manera dependiente de la concentración al igual que las AuNps-Aa, lo que sugiere que ambos compuestos tienen potencial antioxidante, esto en comparación con el control de ácido ascórbico, lo que concuerda mencionado por (Maksimovic, 2008), donde se determinó que el extracto de *A. artemisiifolia* tiene una actividad antioxidante considerable a una concentración de 27 µg/mL, atribuida tanto a los flavonoides como a los glucósidos, según lo verificado por análisis de TLC dot-blot.

La evaluación de la producción de ROS intracelular y NO, después de estimular con LPS a las líneas celulares A549 y HepG2 se midió mediante el ensayo DCF-DA para ROS, para el NO determinamos los niveles de nitrito y nitrato, que es un producto estable del

metabolismo del NO, en el sobrenadante de los cultivos celulares utilizando el reactivo de Griess. DCF-DA es un tinte no fluorescente sensible a redox, que podría oxidarse a DCF verde fluorescente en respuesta a ROS intracelular. Como se muestra en las imágenes microscópicas de fluorescencia (Figura 17 Y 18), el tratamiento con LPS, indujo significativamente la producción de ROS intracelulares tanto en células A549 como HepG2.

Las células tratadas con dexametasona como control comercial y AuNps-Aa no produjeron ROS, en comparación con el LPS, EOH-Aa y las AuNps-Cs, sin encontrar diferencia significativa cuando se compara la intensidad de fluorescencia en las células A549 tratadas con dexametasona y AuNps-Aa, lo que indica que las AuNps-Aa inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno de forma similar que la dexametasona, sin embargo, en la línea celular HepG2, cuando se compara el efecto de la dexametasona con la concentración citotóxica 10 de las AuNps-Aa existe una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia, lo que indica que el aumento de la intensidad de fluorescencia fue significativamente inhibido o bloqueado por las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración.

En cuanto a la producción de NO, se determinó que el tratamiento con AuNps-Aa no indujo la producción de NO en las líneas celulares A549 y HepG2. Sin embargo, cuando se estimularon con LPS, la producción de NO disminuyó con respecto a los tratamientos. El aumento de la producción de NO fue significativamente suprimido por las AuNps-Aa de una manera dependiente de la concentración tanto en la línea celular A549 como en la HepG2.

Las células tratadas con dexametasona presentaron diferencia significativa en la producción de óxido nítrico al ser comparadas con las tratadas con las AuNPs-Aa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mohamed, *et.al* (2020), donde menciona que el uso de lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Ambrosia maritima* tienen potencial antiinflamatorio ya que reducen la producción de óxido nítrico en las líneas celulares A549, MCF7, de forma dependiente de concentración.

También se evaluó la expresión del factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2), considerado como un modulador crítico de las respuestas inflamatorias y la homeostasis

redox celular. La activación del factor de transcripción Nrf2 se determinó por inmunocitoquímica en las líneas celulares A549 y HepG2, y se determinó el área porcentual de inmunopositividad en las células y se cuantificó mediante el software ImageJ, como lo describe Binch, A y colaboradores (2020). Se evaluó la expresión del factor Nrf2 en las líneas celulares A549 y HepG2 estimuladas con LPS.

Se encontró un aumento significativo en el área porcentual de células positivas al ser tratadas con las AuNps-Aa en la concentración citotóxica 10, en comparación con el resto de los tratamientos. Estos resultados sugieren que a una concentración de 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$ Nrf2 está implicado en la producción de ROS y NO, para células A549 y HepG2 tratadas, lo que corresponde con lo mencionado por Saha, *et.al.* (2020) Nrf2 modula directamente el ROS y el RNS al regular los niveles de superóxido y peróxidos a través de la inducción de enzimas antioxidantes. Además, se menciona que Nrf2 inhibe la activación de NF- κ B mediada por el estrés oxidativo al disminuir los niveles intracelulares de ROS.

De la misma forma, se evaluó la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF κ B, en las células A549 y HepG2 estimuladas con LPS por dos horas, posteriormente tratadas con dexametasona y AuNps-Aa en diferentes concentraciones. Como se muestra en las Figuras 24 y 25, el tratamiento con las AuNPs-Aa bloqueó claramente la regulación positiva inducida por LPS para la activación de la subunidad p65 de NF κ B en las líneas celulares A549 y HepG2. Además, el tratamiento con las AuNps-Aa en la concentración más alta inhibió la expresión de p65, de forma evidente comparado con el tratamiento con dexametasona. Por lo tanto, los resultados demostraron que los AuNPs-Aa inhibieron significativamente la expresión de NF- κ B en las líneas celulares A549 y HepG2 estimuladas con LPS.

Estos resultados nos indican que las vías de señalización de Nrf2 y NF- κ B cooperan para mantener la homeostasis fisiológica del estado redox celular y para regular la respuesta celular al estrés y la inflamación. Esto debido a que la señalización Nrf2 juega un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo y es responsable del mantenimiento de la homeostasis y el equilibrio redox en células y tejidos. Por el contrario, NF- κ B también

es un factor de transcripción regulado por redox, que regula las respuestas inflamatorias y las lesiones celulares (Saha, 2020).

Después de evaluar la expresión de estos factores de transcripción se llevó a cabo la determinación del perfil de citocinas Th1 y Th2; para ello se midieron los niveles de IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4 y IL-2 mediante citometría de flujo en el sobrenadante de células A549 y HepG2 después de ser estimuladas con LPS por dos horas y tratadas con las AuNps-Aa, dexametasona, AuNPs-Cs, EOH-Aa. En el sobrenadante de células A549 tratadas con las AuNps-Aa se observó una menor secreción de TNF- α , estadísticamente significativa al compararse con los niveles hallados en los sobrenadantes de cultivos de células A549 tratadas con dexametasona. En la secreción de IL-10 se observa que hubo un aumento significativo en comparación con las células tratadas con dexametasona.

En la línea celular HepG2 tratadas con la concentración citotóxica 10 de las AuNps-Aa se observó una disminución en la secreción de IL-6 en comparación con el tratamiento de dexametasona. La secreción de IL-10 y IL-4 presentó un aumento significativo comparado con el tratamiento de dexametasona. Estos resultados se pueden deber a que no se presenta translocación nuclear de NF- κ B, el cual induce la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) (Saha, 2020).

Desde una perspectiva funcional, se puede sugerir que las AuNps-Aa inducen la expresión de Nrf2, que contribuye a la disminución en la producción ROS y NO, lo que conlleva a que se regule de forma negativa la vía de señalización de NF- κ B mediante múltiples mecanismos, inhibiendo así la producción de citocinas proinflamatorias, lo que demuestra que las AuNps-Aa potencian el efecto terapéutico tanto del extracto de *A. artemisiifolia* como de las sales oro en un proceso inflamatorio, presentando un efecto mejor y/o similar que la dexametasona comercial, lo que sugiere que estas nanopartículas pueden ser una alternativa para el tratamiento de inflamación crónica, sin los efectos secundarios de los tratamientos corticosteroides convencionales.

9. CONCLUSIONES

En el EOH-Aa se identificó la presencia de compuestos fenólicos, sesquiterpenos, flavonoides, terpenos, saponinas, taninos, glucósidos y alcaloides por un análisis fisicoquímico.

Se obtuvieron partículas nanométricas de oro empleando *Ambrosía artemisiifolia* como agente reductor y se demostró que el producto de síntesis fue estable por 21 días con un plasmón de resonancia a 546 nm comprobando la presencia de partículas metálicas de oro, el tamaño promedio fue de 88.2 nm con un PDI de 0.2 y un potencial z de -33.7 mV al día veintiuno, se observó una morfología casi esférica. En el XRD mostró picos de reflexión a los 38,10 °, 44,13 ° grados de 2θ. En el FT-IR que el grupo carboxilo presente en el extracto de *Ambrosía artemisiifolia* (EOH-Aa) tiene interacciones químicas con ácido cloro áurico H₂AuCl₄ esto debido a un corrimiento correspondiente al modo de vibración relacionado con este grupo químico. El EOH-Aa y AuNps-Aa no presentan actividad hemolítica y tienen potencial antioxidante.

Las AuNps-Aa no afectaron la viabilidad celular en concentraciones menores a 150 µg/mL en la línea celular A549, pero en la línea celular HepG2 no se observó un efecto negativo en la viabilidad celular en concentraciones menores a 200 µg/mL

Las AuNps-Aa inducen la expresión de Nrf2, que contribuye a la disminución en la producción ROS y NO, lo que conlleva a que se regule de forma negativa la vía de señalización de NF-κB mediante múltiples mecanismos, inhibiendo así la producción de citocinas proinflamatorias, lo que demuestra que las AuNps-Aa potencian el efecto terapéutico tanto del extracto de *A. artemisiifolia* como de las sales oro en un proceso inflamatorio, presentando un efecto mejor y/o similar que la dexametasona comercial

10.PERSPECTIVAS

Estudiar el efecto antiinflamatorio de las AuNps-Aa en un modelo *in vivo* para evaluar su biodistribución, y el efecto que tiene en el sistema complejo con todos los factores pueden afectar o favorecer su actividad biológica.

Determinar cómo las AuNps-Aa interaccionan con la célula, y como es que activan o inhiben ciertos mecanismos celulares.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf N, A.-E. N. (2017). Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity. *Arab J Chem*, 3029-3039.
- Agarwal, H., Nakara, A., & Kumar, V. (2019). Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111-116.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B., & Ikram, S. (2016). "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise". *Journal of Advanced Research*, 17-28.
- Anani, H. B. (2020). *Zataria multiflora* methanolic extract has antitumor properties on U266 multiple myeloma cell line. *Gene reports*, 1-6.
- Arceusz A, R. I. (2010). Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. *Food Chem*, 52-58.
- Arrieta, E., Arcón, A., Pérez, J., Argel, A., Alvarez, M., & Pérez, J. (2018). Phytochemistry of *Ambrosia artemisiifolia* L, *Croton conduplicatus* kunth, *Lantana camara* L, of the Colombia north region. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 44-51.
- Auffan M., R. J. (2009). Wiesner M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol.*, 634-641.
- Baran, A., Mehmet, X., Keskin, C. S., & Atalar, M. (2021). Environmentally Friendly Rapid Synthesis of Gold Nanoparticles from *Artemisia absinthium* Plant Extract and Application of Antimicrobial Activities. . *Journal of the Institute of Science and Technology*, 365-375.
- Bórdes, R. (2014). El proceso inflamatorio. *Revista de Enfermería*, 09-12.
- Caballero.G, L. &. (2016). Alimentos con efecto antiinflamatorio. *Acta Médica Peruana AMP*, 50-64.
- Cano L, V. M. (1997). Flora medicinal de Veracruz. *Universidad Veracruzana*, 1-8.
- Cantrell C, F. N. (1998). Antimycobacterial crude plant extracts from South, Central, and North America. *Phytomedicine*, 137-145.
- Carpio Zabaleta, C. M. (2016). "Química, actividad larvicida sobre *Aedes aegypti* y evaluación antioxidante del extracto total en etanol de las hojas secas de *Croton conduplicatus* Kunth.". *Metabiblioteca UNISUCRE*, 1-8.

- De Leo M, V. M. (2010). Sesquiterpenes and diterpenes from *Ambrosia arborescens*. *Phytochemistry*, 804-809.
- Dou, Y. L. (2020). Bioresponsive drug delivery systems for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Controlled Release*, 641-666.
- Gao J, Z. H. (2010). Secondary metabolite mapping identifies *Scutellaria* inhibitors of human lung cancer cells. *J Pharm Biomed Anal*, 723-728.
- Gao X-h, Z. S.-d.-t.-l.-y.-q.-d.-h.-j. (2020). Anti-Inflammatory Effects of Neochlorogenic Acid Extract from Mulberry Leaf (*Morus alba* L.) Against LPS-Stimulated Inflammatory Response through Mediating the AMPK/Nrf2 Signaling Pathway in A549 Cells. *Molecules* 2020, 1385.
- García de Lorenzo, L. . (2013). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva*, 353-360.
- Gibon, E., Lu, L., Nathan, K., & Goodman, S. (2017). Inflammation, ageing, and bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, 28-35.
- Greenlee, H. (2012). Natural products for cancer prevention. *Semin Oncol Nurs*, 29-44.
- Guyton, A. C. (2011). *Tratado de Fisiología médica Decimoprimer Edición*. España: GEA Consultoría Editorial.
- He, G., Zhang, X., Chen, Y., Chen, J., Li, J., & Xie, Y. (2017). Isoalantolactone inhibits LPS-induced inflammation via NF- κ B inactivation in peritoneal macrophages and improves survival in sepsis. *Biomed. Pharmacother*, 598–607.
- Ingale, A. C. (2013). "Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: Eco-Friendly Approach". *Nanomedicine & NANotechnology*, 2-4.
- Jain P, H. X.-S.-S. (2008). Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. . *Acc Chem Res.* , 1578-1586.
- Khan, S. S.-S. (2020). Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Clerodendrum inerme*; Characterization, Antimicrobial, and Antioxidant Activities. *Biomolecules*, 1-25.
- Kiss T, S. A. (2017). Repeated-dose toxicity of common ragweed on rats. *PLOS ONE* , 1-18.
- Kuppusamy P, Y. M. (2016). "Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications- An updated report". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 473-484.
- Lezama, P. (2006). Role of chemokines and its receptors in inflammation. *Rev. Med. Vallejana.*, 133-139.

- Luo, Y. C. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System : Activation , Inflammation , and Potential Applications. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-12.
- Makarov V, L. A. (2014). "Green NANotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants". *Acta Naturae*, 35-44.
- Maksimovic, Z. (2008). In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *Ind Crops Prod*, 356-360.
- Matic S, S. S. (2008). Comparative analysis of acetonic and watery pollen extract of *Ambrosia artemisiifolia* L. on *Drosophila melanogaster*. *Kragujevac, J. Sci.*, 99-104.
- Ming-Wei W, X. H. (2007). Biological screening of natural products and drug innovation in China. *Phil. Trans. R. Soc.*, 1093-1105.
- Mintern, J. (2018). Introduction to the Special Issue : Nanomaterials in Immunology. *Molecular Immunology Journal*, 5890.
- Mittal, A. C. (2013). "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts". *Biotechnology Advances*, 346-356.
- Mohamed, A., Hassan, M., Ahmed, M., & Gouda, S. (2020). Docking studies of sesquiterpene lactones isolated from *Ambrosia maritima* L. their potential anti-inflammatory and cytotoxic activities. *Natural Product Research*, 1-16.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* , 846-852.
- Nonaka M, Y. F. (2004). Evolution of the complement system. *Mol Immunol.*, 897-902.
- Orang-Ojong B, M. J. (2013). Impact of natural resources and research on cancer treatment and prevention: A perspective from Cameroon. *Mol Clin Oncol*, 610-620.
- Paciotti, G. K. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research*, 47-54.
- Parkhomenko A, O. E. (2006). Pharmacologically active substances from *Ambrosia artemisiifolia*. Part 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 627-632.
- Placha, D., & Jampilek, J. (2021). Chronic Inflammatory Diseases, Anti-Inflammatory Agents and Their Delivery Nanosystems. *Pharmaceutics*, 1-27.
- Pugin, R., Lee, J., & Matthay, M. (2003). Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, 525-535.

- Qiao, L., Han, M., Gao, S., Shao, X., Wang, X., Sun, L., . . . Wei, Q. (2020). Research progress on nanotechnology for delivery of active ingredients from traditional Chinese medicines. *Journal of Materials Chemistry B*, 1-19.
- Rónavári, A., Igaz, N., Adamecz, D., Szerencsés, B., Molnar, C., Kónya, Z., . . . Kiricsi, M. (2021). Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications. *Molecules*, 2-39.
- Saha S, B. B. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 22-29.
- Saha, S. B. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 1-31.
- Schlaepfer L, M. J. (2010). Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 18-27.
- Talhaoui, N., Vezza, T., Gómez-Caravaca, A., Fernández-Gutiérrez, A., Gálvez, J., & Segura-Carretero, A. (2016). Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. *J. Funct. Foods*, 270–277.
- Tolochko, N. (2003). HISTORY OF NANOTECHNOLOGY. *NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGIES*, 1-18.
- UNAM. (03 de 03 de 2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Ambrosia artemisiifolia*. Obtenido de UNAM: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ambrosia%20artemisiifolia&id=7822>
- Xia, Q. H. (2019). Size- and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6950-6970.
- Yunbao, L., & Muraleedharan, G. (2010). An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant. *Journal of Natural Products*, 1193-1195.
- Zamora, M., Somonte, D., & Morales, V. (2015). Leucotrienos y antileucotrienos en medicina basada en la evidencia. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 157-162.
- Zangeneh M, P. M. (2019). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Fritillaria flower extract and their antibacterial activity against some human pathogens. *Polyhedron*, 8-14.
- Zhang, H. T. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin*, 33-42.

ANEXOS

ANEXO 1.- Identificación de metabolitos secundarios

Extracto etanólico	<i>Metabolismo secundario</i>			
	Taninos	Cumarinas	Flavonoides	Triterpenos y esteroides
 <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	 (+) Verde intenso-procatecólicos (+) Rojo-vino Fenolicos (+) Azul- pirogalotánicos (-) No se observa cambio	 (+) Cambio de coloración o precipitado rojo (-) No se observa un cambio de coloración	 (+) Se observa una coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo intenso. (-) No se observan cambios de color	 (+) Cambio de coloración: -Rosado- Azul muy rápido -Verde intenso- Visible, aunque rápido -Verde oscuro- negro- Final de la reacción (-) No se observa cambio
	Saponinas	Alcaloides (Ensayo Dragendorff)	Resinas	Sesquiterpenos
 (+) Se observa es espuma en la superficie y persiste 2 min. (-) No se observa espuma	 (+) Se observa opalescencia, turbidez o precipitado (-) No se observan cambios	 (+) Se observa la aparición de un precipitado o turbidez (-) No se observan cambios	 (+) Se observa una coloración amarilla (-) No se observan cambios	



Glucósidos - Prueba de hemólisis

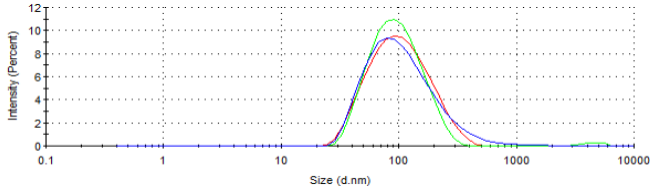
(+) Prueba positiva, (-) Prueba negativa

ANEXO 2.- Tamaño por DLS y Potencial Z

Día 1

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 80.46	Peak 1: 116.0	100.0	68.90
Pdl: 0.277	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.926	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			

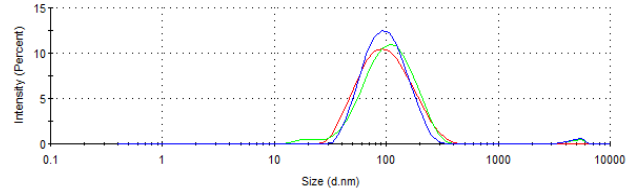
Size Distribution by Intensity



Día 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 80.76	Peak 1: 110.7	100.0	60.25
Pdl: 0.269	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			

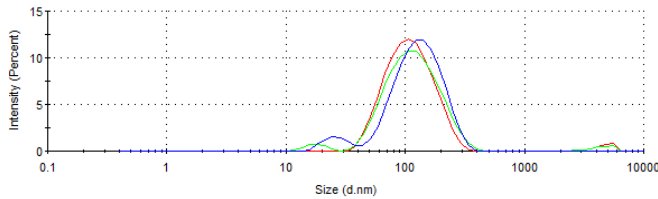
Size Distribution by Intensity



Día 14

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 93.83	Peak 1: 117.7	97.5	52.76
Pdl: 0.274	Peak 2: 4695	2.5	782.2
Intercept: 0.920	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			

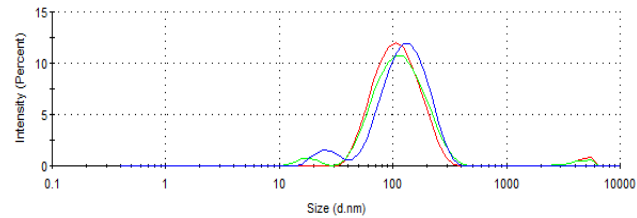
Size Distribution by Intensity



Día 21

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 98.11	Peak 1: 140.1	92.7	58.63
Pdl: 0.272	Peak 2: 27.78	7.3	7.519
Intercept: 0.929	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			

Size Distribution by Intensity

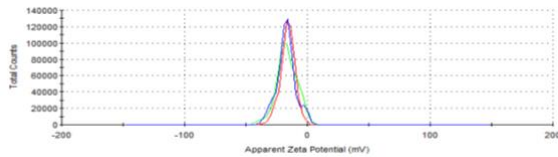


Potencial Z

Día 1

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -16.0	Peak 1: -16.0	100.0	6.04
Zeta Deviation (mV): 6.04	Peak 2: 0.0	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.38	Peak 3: 0.0	0.0	0.00
Result quality: See result quality report			

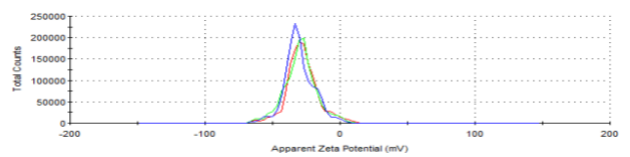
Zeta Potential Distribution



Día 7

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -29.1	Peak 1: -27.6	98.8	11.2
Zeta Deviation (mV): 19.9	Peak 2: -63.2	1.2	2.46
Conductivity (mS/cm): 1.67	Peak 3: 0.0	0.0	0.00
Result quality: See result quality report			

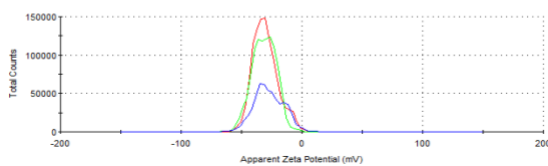
Zeta Potential Distribution



Día 14

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -30.4	Peak 1: -30.4	100.0	10.5
Zeta Deviation (mV): 10.5	Peak 2: 0.0	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.53	Peak 3: 0.0	0.0	0.00
Result quality: See result quality report			

Zeta Potential Distribution



Día 21

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33.7	Peak 1: -33.7	100.0	8.96
Zeta Deviation (mV): 8.96	Peak 2: 0.0	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.46	Peak 3: 0.0	0.0	0.00
Result quality: See result quality report			

Zeta Potential Distribution

