

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Síntesis de nanopartículas metálicas con extracto de té verde: caracterización física y biológica

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

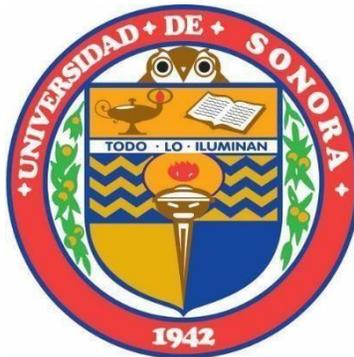
Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Mario Alberto García Soqui

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por su gran apoyo y disposición para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo.

Le doy gracias principalmente al doctor Miguel Ávalos Borja, ya que sin él esto no habría sido posible. Le agradezco por su calidez y recibimiento. Le agradezco también por tomarse el tiempo para apoyarme y presentarme con cada una de las personas que conocí en San Luis Potosí, y gracias por haber aceptado que yo pudiera ir a realizar parte de mi trabajo en el IPICyT.

Agradezco al doctor Héctor Gabriel Silva Pereyra por su paciencia, por su tiempo y gran apoyo en el uso del microscopio electrónico.

De igual manera quiero agradecer a la M. en C. Ana Iris Peña Maldonado por su gran ayuda y apoyo con el microscopio de barrido.

Agradezco también al doctor Ignacio Becerril por su apoyo, sus consejos y tips al momento de preparar muestras y por su ayuda en general, que me sirvió mucho.

Quiero agradecer a la doctora Dora Julia Borbón por haber sido quien me orientara con mi director de tesis.

Agradezco también al doctor Álvaro Posada Amarillas, mi director de tesis, por la confianza que me tuvo al momento de entregarme este proyecto. Gracias por todo el tiempo que me dedicó y por toda la ayuda. Gracias por hacer posible mi visita al IPICyT, ya que en él aprendí muchas cosas, igualmente agradezco a CONACyT por aportar fondos al proyecto 180424 para solventar algunos de los gastos de ésta visita.

Agradezco a Juan Ramírez por haberme dado tanta confianza y haberme apoyado tanto, desde el diseño experimental de mi trabajo hasta la realización del mismo.

Agradezco a la doctora Aracely Angulo por su apoyo y por haberme dirigido en el área biológica de mi trabajo. Agradezco su paciencia y disposición.

Agradezco a la maestra María Lucila Rascón por haber sido tan paciente conmigo, además de siempre estar en la mejor disposición para apoyarme cuando lo necesité.

Agradezco a todo el laboratorio de Inmunología y biología celular, a todos los que lo componen, por haberme ayudado siempre y hacerlo de tan buena manera.

Agradezco al doctor Rodrigo Meléndez Amavizca y al doctor Eduardo Larios por haberme ayudado y dedicado su tiempo para la caracterización de las muestras.

Quiero dar las gracias a la doctora María Esperita Trijullo (Q.E.P.D.) por haberme permitido hacer uso de su laboratorio para la síntesis de las nanopartículas de este trabajo. Le agradezco por el tiempo que me dedicó, por la paciencia al momento de explicarme las cosas y por haber estado al pendiente de mí.

Quiero agradecer al doctor Ronaldo Herrera Urbina por haberme ayudado tanto con la síntesis de las nanopartículas. Gracias por todos los consejos y las ideas que planteaba para mi trabajo, siempre ha sido un honor y un privilegio trabajar con él.

Agradezco de una manera muy especial a mi familia que siempre estuvieron al pendiente de mí, que siempre me apoyaron tanto, ya sea en la distancia o estando cerca. Es por ustedes que nunca me eché para atrás, incluso cuando ese pensamiento llegaba a mi cabeza. Papá y mamá, en toda mi vida nunca voy a tener palabras que puedan expresar el agradecimiento que les tengo por hacer tantas cosas por mí, por darme lo que me dan y por nunca dudar de mí, los amo y a cada paso que doy los llevo siempre en mi cabeza y en mi corazón. Agradezco también a mis hermanos, Luis y Ari (Vieja), el haber sido una de mis más grandes motivaciones para terminar mis estudios. Espero de algún modo u otro poder ser algo parecido a un ejemplo a seguir y podrán contar con mi apoyo incondicional siempre, ¡los quiero mucho!

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi novia, que pienso yo que le tocó la peor parte ya que ella fue quien me lidiaba en mis momentos de estrés. Gracias mi amor por apoyarme tanto y por alentarme a hacer las cosas. Gracias por todo el tiempo que has estado conmigo y por ayudarme tanto y de tantas maneras, ¡te amo!

Agradezco a Dios por haberme puesto en este camino y con esta gente que me tocó conocer. Si yo pudiera escoger de nuevo, escogería el mismo camino, con intención de toparme con las mismas personas.

CONTENIDO

Resumen	10
Introducción	11
Importancia	13
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos Particulares	14
Antecedentes	15
Métodos para síntesis de nanopartículas	15
Reducción química con alcoholes	16
Reducción química con polietilenglicol (PEG)	16
Reducción electroquímica	16
El método coloidal	17
Reducción fotoquímica y radioquímica	18
Síntesis a partir de bacterias	18
Síntesis a partir de plantas	19
Métodos para el análisis físico y químico de nanopartículas	19
Microscopía electrónica de Transmisión (MET)	19
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	20
Microscopía Confocal	20
Microscopía de Fluorescencia	21
Plasmón de Resonancia Superficial (SPR)	22
Espectrofotometría UV-visible	22
Química verde	23

Principios de la química sostenible	24
Materiales y métodos	26
Síntesis de nanopartículas de oro, plata y bimetalicas	26
Preparación del agente reductor (té verde)	26
Síntesis de nanopartículas de Oro $1 \times 10^{-3} \text{M}$	26
Síntesis de nanopartículas de Plata $1 \times 10^{-3} \text{M}$	26
Síntesis de nanopartículas de Oro-Plata $1 \times 10^{-3} \text{M}$	26
Síntesis de nanopartículas de Oro $1 \times 10^{-4} \text{M}$	27
Síntesis de nanopartículas de Plata $1 \times 10^{-4} \text{M}$	27
Síntesis de nanopartículas de Oro-Plata $1 \times 10^{-4} \text{M}$	27
Síntesis de nanopartículas de Oro $1 \times 10^{-5} \text{M}$	28
Síntesis de nanopartículas de Plata $1 \times 10^{-5} \text{M}$	28
Síntesis de nanopartículas de Oro-Plata $1 \times 10^{-5} \text{M}$	28
Caracterización físico-química	29
Espectrofotometría UV-visible	29
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	29
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	29
Microscopio de Fluorescencia	29
Preparación de muestras	29
Evaluación biológica parcial de nanopartículas de au, ag y au-ag (bimetalicas) en la línea celular HeLa	30
Internalización de nanopartículas en células HeLa	30
Ensayo de citotoxicidad en células HeLa	33
Resultados	34

Caracterización físico-química, análisis por microscopía	34
Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)	34
Análisis EDX	36
Microscopía de Fluorescencia	38
Espectrofotometría UV-Vis	42
Evaluación biológica parcial de nanopartículas de au, ag y au-ag (bimetálicas)	46
Internalización de Nanopartículas en Células HeLa	46
Citotoxicidad	49
Discusión de resultados	51
Conclusiones	56
Bibliografía	57
Glosario	60
Anexos	63
Anexo 1. Descongelación de la línea celular HeLa	63
Anexo 2. Preparación de medio D5F	64
Anexo 3. Tripsinización para desprendimiento de células en cultivo	65
Anexo 4. Conteo celular por el método manual en cámara de Neubauer	66
Anexo 5. Internalización de nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células ARPE	67
Anexo 6. Internalización de nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células ARPE	68
Anexo 7. Internalización de nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células ARPE	69

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Dilución de las soluciones de las nanopartículas utilizadas para la internalización en células HeLa.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Representación de la escala nanométrica.	12
2.	Representación del método de reducción electroquímica para producción de nanopartículas.	17
3.	Representación esquemática del efecto túnel.	21
4.	Micrografías de TEM para evaluar el efecto de la concentración de los metales, oro y plata, en la formación de nanopartículas mono y bimetalicas	35
5.	Micrografías del análisis EDX para las nanopartículas de oro, plata y bimetalicas	37
6.	Micrografías en campo oscuro de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-3} M.	39
7.	Micrografías en campo oscuro de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-4} M.	40
8.	Micrografías en campo oscuro de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-5} M.	41
9.	Absorbancias en espectrofotómetro de las nanopartículas de oro.	43
10.	Absorbancias en espectrofotómetro de las nanopartículas de plata.	44
11.	Absorbancias en espectrofotómetro de las nanopartículas de bimetalicas.	45
12.	Internalización de las nanopartículas Au-Ag 1×10^{-5} en células HeLa	47
13.	Internalización de las nanopartículas Au-Ag 1×10^{-5} en células HeLa	48
14.	Gráfica de porcentaje de viabilidad celular después de haber realizado el ensayo MTT.	50

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas mediante métodos puramente químicos ha sido descrita en muchos trabajos. En esta tesis se realizó la síntesis de nanopartículas de plata, oro, y plata-oro mediante la sustitución de agentes químicos reductores por el uso de compuestos naturales presentes en el té verde (*Camelia sinensis*) capaces de reducir a los metales Au y Ag utilizados para la síntesis de nanopartículas mono y bimetálicas. Los reactivos utilizados fueron: el extracto de té verde (*Camellia sinensis*) como agente reductor, y sales metálicas para producir las nanopartículas de interés. El efecto reductor del té verde todavía no ha sido completamente investigado. Adicionalmente, se realizaron pruebas de internalización en células HeLa y se probó la citotoxicidad de los tres tipos de nanopartículas en este mismo tipo de células. La caracterización de las nanopartículas y su efecto biológico se hizo mediante microscopía electrónica, espectrofotometría UV-visible, microscopía confocal y microscopía de campo oscuro.

Las micrografías de las nanopartículas sintetizadas mostraron un tamaño promedio menor a 20 nm de diámetro y que en su mayoría todas son esféricas. Para la internalización en células HeLa, la señal que fue detectada por el microscopio confocal fue la de las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$. El ensayo del MTT para citotoxicidad reveló que el efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas es más pronunciado que el de las nanopartículas de oro y plata.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas son una nueva clase de materiales, ya sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros o bien, una combinación de estos, en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nm, como se muestra en la figura 1. Mientras que un material en orden micrométrico presenta propiedades similares a las de un sólido volumétrico (*bulk*), en los nanomateriales, debido a su reducido tamaño, se modifican las propiedades que finalmente lo hacen diferente del mismo material con dimensiones de sólido volumétrico, ya que, a esta escala, las estructuras atómicas y electrónicas manifiestan su importancia. (Wing, C. E. G. 2006).

A medida que la dimensión de las partículas se reduce, sobre todo en el intervalo de 1nm a 10nm los efectos del tamaño y de superficie son más notables. Entre los efectos de tamaño más importantes, se han determinado el confinamiento de los electrones, y esto en nanopartículas metálicas y semiconductoras tiene interesantes implicaciones, como es la manifestación de efectos cuánticos en el material, y que pueden percibirse a través de sus propiedades magnéticas y/o de conducción electrónica.

Por otro lado, debido a que los átomos en la superficie de la nanopartícula están menos enlazados que el resto de sus átomos, y su esfera de coordinación está incompleta, incrementa su energía libre superficial, afectando propiedades como la temperatura de fusión y la reactividad química. El conocimiento de este tipo de propiedades y características ha hecho posible aplicar nanopartículas en diversas tecnologías, en áreas como electrónica, medicina y catálisis.

En la actualidad las nanopartículas forman parte de productos, equipos y sistemas de uso común para la población, aunque en múltiples ocasiones esto no sea tan evidente.

Algunos de sus usos se muestran a continuación:

- **Medicina:** Gasas para quemaduras serias o heridas crónicas que contienen nanopartículas de plata. La plata es un bactericida, que en forma de nanopartículas incrementa el área superficial mejorando la eficacia antibacteriana. También se utiliza en forma de cremas a base de liposomas de 90 nm que contienen fármacos analgésicos o antiinflamatorios y que son utilizadas para dolores musculares y de articulaciones. Algunos adhesivos dentales contienen contiene nanopartículas de silicio para formar

uniones más fuertes con el esmalte y las coronas en trabajos de restauración dental, endodoncias o incrustaciones de porcelana.

- **Deportes:** Pelotas de tenis que están recubiertas con nanopartículas para alargar su duración.
- **Higiene:** Desinfectantes de grado militar, utilizado en aviones para combatir el problema del síndrome respiratorio agudo severo, que es a base de nanoemulsiones.
- **Uso doméstico:** Recubrimientos superhidrofóbicos repelentes de suciedad. Se emplean como recubrimiento de concreto, ladrillo y yeso.

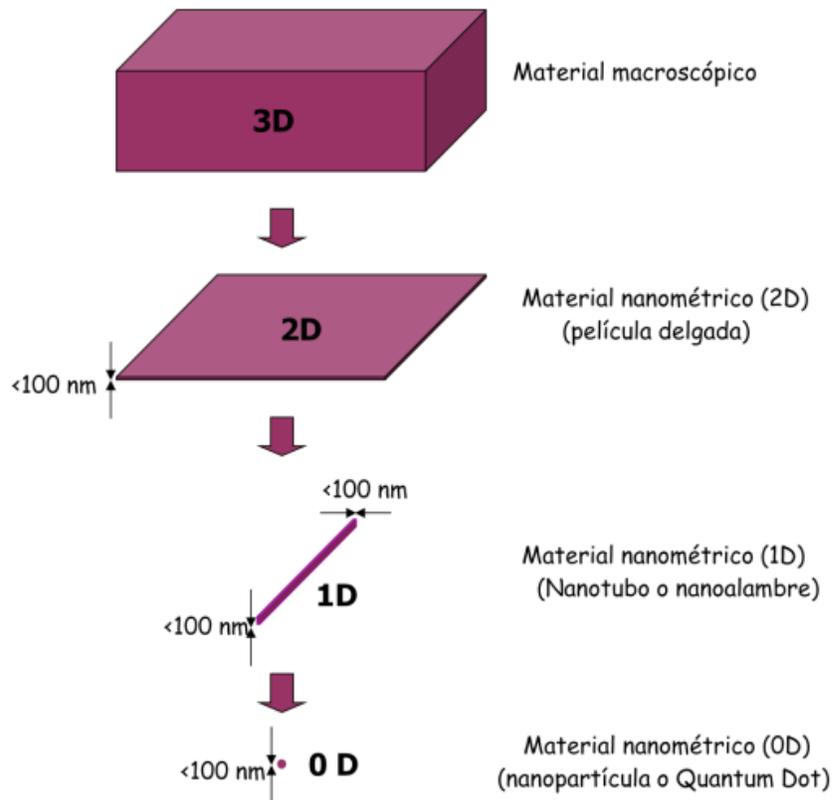


Figura 1. Representación de la escala nanométrica.

Fuente. Flores Murrieta. 2011

IMPORTANCIA

La nanotecnología brinda una gran oportunidad para lograr la optimización de materiales existentes, la formación de nuevos compuestos, la prevención y el tratamiento de enfermedades e incluso de sustancias contaminantes del medio ambiente debido a la modificación de sus propiedades con base en su tamaño. Las ciencias de la vida enfrentan retos cuya solución requiere innovación de estrategias que repercutan en mejoras sustanciales, por ejemplo, para la detección y el tratamiento de enfermedades, así como la disminución de costos e incremento de la efectividad en tratamientos no invasivos. La nanotecnología, a través de la síntesis y caracterización de nanopartículas, es una de las muchas herramientas que pueden ser utilizadas para ello. El actual enfoque de utilizar compuestos de origen natural en la síntesis química (química verde) representa grandes ventajas para la salud y el medio ambiente, minimizando los riesgos de toxicidad y contaminación ambiental, es por esto que, en la nanobiotecnología, actualmente existe interés de buscar alternativas que permitan una adecuada síntesis de nanopartículas con diferentes aplicaciones. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo utilizar té verde (*Camelia sinensis*) como fuente de agentes reductores para sustituir a los agentes reductores utilizados convencionalmente (aquí puedes citar los más utilizados). Por otra parte, el té verde es un producto comercial muy económico, fácil de obtener y no tóxico.

HIPÓTESIS

El té verde (*Camellia sinensis*), será utilizado como una buena fuente de agentes reductores necesarios para la síntesis de nanopartículas metálicas de Au, Ag y bimetálicas (Au-Ag) que tendrán efectos biológicos.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nanopartículas de oro, plata y una aleación oro-plata, por el método de reducción de la sal del metal, utilizando *Camellia sinensis* (té verde) como agente reductor, así como realizar su caracterización y evaluación biológica.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar nanopartículas de oro, plata y bimetálicas de oro-plata utilizando *Camellia sinensis* como agente reductor.
2. Caracterizar las nanopartículas mediante técnicas de microscopía electrónica y espectrofotométricas.
3. Realizar la evaluación biológica a través de pruebas de internalización y citotoxicidad celular.

ANTECEDENTES

Las nanopartículas han existido en el planeta por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo y las nanopartículas dentro de las bacterias. En algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban, aprovechando sus propiedades ópticas y medicinales.

Las nanopartículas metálicas en particular, poseen propiedades interesantes con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Los primeros en usarlas fueron los egipcios, que empleaban nanopartículas de oro como coloide medicinal para conservar la juventud y mantener buena salud, y la civilización china, además de usarlas con fines curativos, también las utilizaban como colorantes inorgánicos en porcelanas. Aún teniendo antecedentes de la utilización de nanopartículas metálicas, no fue sino hasta 1857 que Faraday realizó el primer estudio sistemático de nanopartículas, presentando un estudio de la síntesis y de las propiedades coloidales del oro. Desde esa fecha hasta la actualidad, se han logrado grandes avances en el conocimiento de las nanopartículas metálicas; se han desarrollado diversos métodos de síntesis química y física, con la finalidad de poder diseñar sus dimensiones, forma, composición, y modificación a la superficie, y con esto controlar su comportamiento frente a diversos estímulos. En este sentido, existen varias rutas para la síntesis química de nanopartículas metálicas, algunas de las cuales nos permiten controlar eficientemente la forma, el tamaño, y la distribución de átomos cuando se trata de nanopartículas de más de un elemento químico (Zanella, R. 2012).

Métodos para Síntesis de Nanopartículas

Los métodos para la síntesis de nanopartículas se pueden clasificar en métodos físicos y métodos químicos, en el primer caso involucra la subdivisión mediante técnicas como división mecánica, espurreo o evaporación metálica. La limitante de estos métodos es que son poco efectivos para controlar el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas.

Mientras que los métodos químicos como reducción química, reducción fotolítica y reducción radiolítica representan una mejor opción en la síntesis de las nanoestructuras metálicas, debido a que se puede tener mayor control para la formación de nanomateriales con características específicas o deseadas.

Para la síntesis química de nanopartículas existen diferentes agentes reductores como: alcoholes, PEG, entre otros, y agentes reductores biológicos como hongos, bacterias y plantas.

Reducción Química con Alcoholes

En una síntesis típica se prepara una solución 0.004 M de AgNO_3 en etanol y separadamente se prepara una solución 0.0062 M de N-[3-n(trimetoxisilil)propil]dietilentriamina (ATS) en etanol con atmósfera de N_2 . Se mezclan ambas soluciones en cantidades iguales y se calienta a reflujo en atmósfera de N_2 a 40°C durante 4 horas con agitación permanente, obteniéndose de esta manera una solución color amarilla, resultado de la formación de nanopartículas esféricas. (Fratini y col. 2005) El etanol actúa como reductor y solvente. El ATS evita que se aglomere la plata reducida modificando la superficie utilizando sus grupos amino (Fratini 2005).

Reducción Química con Polietilenglicol (PEG)

Se prepara una solución que contenga aproximadamente 0.5 g de AgNO_3 y se disuelve en 1 ml de agua desionizada con agitación vigorosa por algunos minutos en oscuridad. A esta disolución se le agregan 2.5 ml de polietilenglicol (PEG, $M_w=400$) manteniendo la mezcla con agitación y protegida de la luz. Se deja reaccionar 15 minutos. Se debe observar la formación de un precipitado gris. Por último, se diluye con etanol a 20 ml de volumen final. El PEG actúa como agente reductor de los iones de plata obtenidos a partir del AgNO_3 (Slistan-Grijalva 2005)

Reducción Electroquímica

Este método fue desarrollado por M.T. Reetz. Los aspectos generales de este método son:

- El empleo de un ánodo de sacrificio como fuente del metal
- El metal se oxida en presencia de una sal cuaternaria la cual es el electrolito y el agente estabilizante
- Los iones son reducidos en el cátodo generando las nanopartículas metálicas.

Las ventajas que presenta este método son de mucha importancia, ya que es una síntesis que puede ser reproducida a gran escala y con muy altos grados de rendimiento, mayores al 95%, y además nos da la posibilidad de poder modificar el tamaño de la nanopartícula de acuerdo al potencial que se le aplique al sistema. Figura 2.

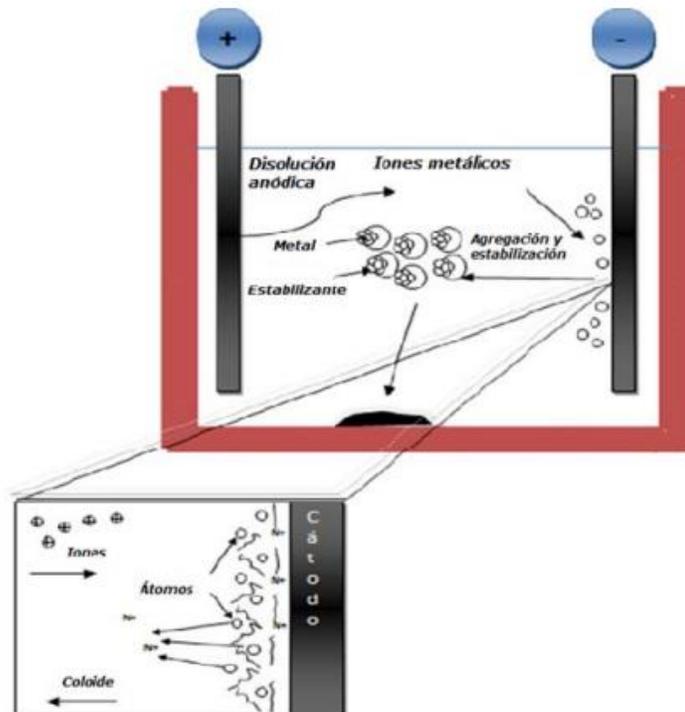


Figura 2. Representación del método de reducción electroquímica para producción de nanopartículas. Reetz M. T. (1995)

Método Coloidal

Los coloides son partículas individuales, que son más grandes que las dimensiones atómicas, pero lo suficientemente pequeños como para exhibir movimiento browniano. Si las partículas son lo suficientemente grandes, entonces debido a la gravedad van a tender a sedimentarse; si son lo suficientemente pequeños para ser coloides, entonces su movimiento irregular en suspensión puede ser atribuido a bombardeos colectivos de una multitud de moléculas térmicamente agitadas en una suspensión líquida.

Este rango de tamaño de partículas en una solución coloidal suele oscilar en el rango de nanómetros, por ello el método coloidal es un método eficiente de producción de nanopartículas.

Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). Este último puede jugar el papel de reductor, de estabilizante o ambos. El tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante, así como la

naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por períodos de tiempo muy largos. (de-Jong, 2009).

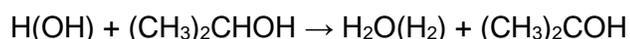
Reducción Fotoquímica y Radioquímica

La síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas.

La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radiación-química (radiólisis) difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica está caracterizada por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías mayores a 100 eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica tienen ventajas sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza.

La reducción fotoquímica en solución se emplea frecuentemente para sinterizar partículas de metales nobles. Estas partículas se obtienen a partir de las correspondientes sales en agua, alcohol o solventes orgánicos.

En el caso de reacción con alcoholes, un átomo de hidrógeno y un radical hidroxilo producen un radical alcohol:



Un electrón solvatado interacciona con, por ejemplo, un átomo de plata, reduciendo el metal (Sergeev, 2006):



Síntesis a Partir de Bacterias

Algunos microorganismos, como bacterias, levaduras, hongos, y algas tienen la capacidad de fijar y acumular el metal por medio de adsorción y son ampliamente utilizados en la reducción de la contaminación del medio ambiente. Se han confirmado un número de especies capaces de llevar a cabo estas reducciones de los metales. Vega-Baudrit reporta haber obtenido nanopartículas de plata de 10nm a 50nm, obtenidas a partir de una cepa de bacilos gram negativos aislados de residuos mineros llamada OC4. Vega-Baudrit (2011) reporta también que se obtuvieron nanopartículas de plata a partir de *Moxarella guanajuatensis* con un tamaño de las

nanopartículas de 10, 20 y 40 nm. El tamaño de las nanopartículas depende de la capacidad de la bacteria de almacenar las concentraciones de plata en su organismo; si la formación de las nanopartículas de Ag es en el periplásmico, el tamaño de la partícula será de aproximadamente 10 nm, si se sintetiza en el interior, se obtendrá una dimensión mayor (20nm-40nm) dependiendo de su capacidad de almacenamiento

Síntesis a Partir de Plantas

En comparación con los microorganismos, el empleo de extractos de plantas como agentes reductores puede ser una vía más rápida para la preparación de nanopartículas. Ronquillo de Jesús (2013) reporta la obtención de nanopartículas a partir de *Crataegus gracilior Phipps* con un tamaño promedio de 30nm y presentando formas esferoidales.

Aunque se requieren estudios más profundos para establecer el mecanismo de formación y estabilización de las nanopartículas a partir de extractos de plantas, podemos asumir que los grupos –OH y –COOH presentes en biomoléculas como los polifenoles juegan un rol importante en la reducción de los iones de metal, así como el control en el tamaño y la estabilidad de las nanoestructuras formadas (Ronquillo de Jesús 2013).

Debido a la gran cantidad de compuestos polifenólicos en las plantas es que se atribuye el poder reductor de los iones metálicos en métodos biosintéticos, como se describió por Huang et al (2007).

Métodos para el Análisis Físico y Químico de Nanopartículas

Para conocer las características físicas y químicas de las sustancias se pueden hacer análisis con diferentes técnicas, entre los cuales están:

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Un microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés, o MET) es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, debido a que la potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El principio fundamental de operación se basa en el efecto cuántico de tunelaje electrónico. El efecto túnel consiste en el paso de los electrones a través de una barrera de potencial, fenómeno que es descrito mediante las leyes de la física cuántica, es decir, resolviendo la ecuación Schrödinger, como se muestra en la figura 3.

Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen

aumentada del espécimen. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM, por Scanning Electron Microscope), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen y su funcionamiento es descrito también mediante el efecto túnel.

Microscopio Confocal

El microscopio confocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando una perforación espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal. La perforación (pinhole) es una apertura localizada delante del fotomultiplicador que evita el paso de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco, la luz que proviene de regiones localizadas por encima o por debajo del plano focal no converge en el pinhole y no es detectada por el fotomultiplicador.

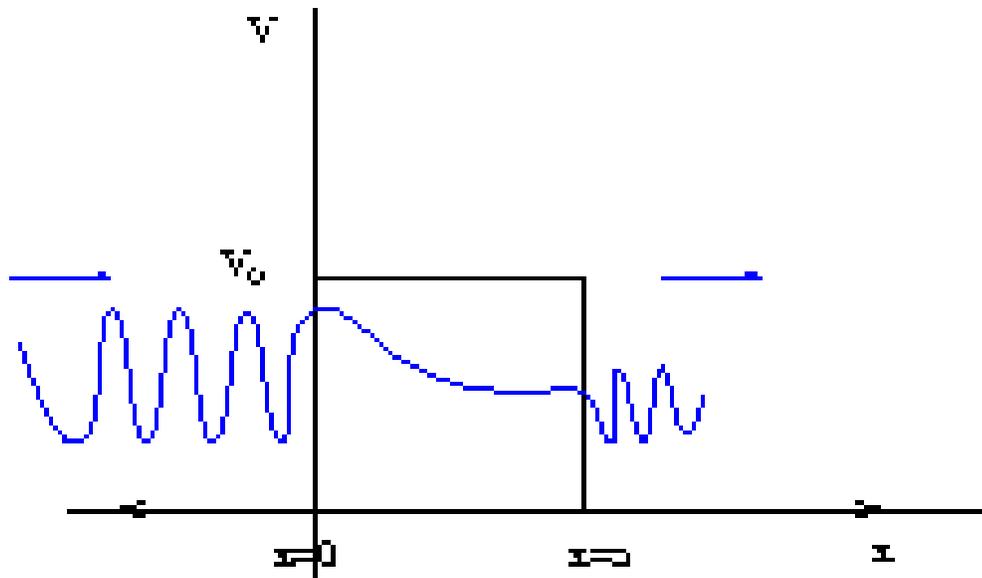


Figura 3. Representación esquemática del efecto túnel.

Fuente. <http://www.nucleares.unam.mx/~vieyra/node38.html>

Microscopio de Fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se usa para detectar sustancias con autofluorescencia (vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos.

Un microscopio de fluorescencia usa una lámpara de mercurio o neón. La luz llegar al microscopio e incide contra un espejo dicroico, que es un espejo que refleja un rango de longitud de ondas y permite que otro rango pase a través. El espejo dicroico refleja la luz ultravioleta directamente al espécimen que se quiere observar. Esta luz ultravioleta excita la fluorescencia dentro de las moléculas en el espécimen. Las lentes colectan la luz de longitud de onda fluorescente producida. Esta luz pasa por el espejo dicroico y la barrera de filtrado (esto elimina las longitudes de onda que no sean las fluorescentes, haciendo que se forme la imagen).

Plasmón de Resonancia Superficial (SPR)

La excitación de los plasmones superficiales de nanoestructuras metálicas mediante luz es conocida como resonancia de plasmones superficiales. Al aplicar luz en una capa fina metálica, generamos una oscilación en la densidad de carga siempre y cuando la energía de la luz emitida coincida con la frecuencia de plasma. Este hecho se puede estudiar a través de la teoría electromagnética de Maxwell.

Si aplicamos un campo electromagnético a la superficie de una estructura metálica, el campo eléctrico generará una fuerza sobre los electrones de conducción (electrones libres que formarán el plasma). Al desplazar la nube electrónica aparece una fuerza recuperadora, debida a la red cristalina, para intentar regresar a la situación de equilibrio perdida. Este sistema acabará comportándose como un oscilador armónico, donde cada quanta de oscilación será un plasmón. De esta manera, cuando la frecuencia de la luz incidente coincide con la frecuencia de plasma, en su espectro de reflexión o emisión se verá una disminución de la energía reflejada/transmitida (absorción resonante).

Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas.

La absorbancia se mide utilizando un espectrofotómetro, que es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución conteniendo una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia. En la espectrofotometría se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica de cada sustancia química.

La espectrofotometría ultravioleta-visible utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 180 a 380 nm, y en el de la luz visible de 380 a 780 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro. A partir de La ley de Beer podemos averiguar la concentración de una sustancia midiendo su absorbancia, pues esta establece que: “La absorbancia de una solución es

directamente proporcional a la concentración y a la longitud del paso de la luz”, Y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c,$$

donde:

A: absorbancia. No tiene unidades.

ϵ : el coeficiente de extinción molar, también llamado coeficiente de absorción. Es constante para un compuesto dado siempre que se fijen condiciones de longitud de onda, de pH, de temperatura, de solventes, etc. Sus unidades son $1/(\text{mol/cm})$.

b: es la longitud de paso de la luz, en cm.

c: es la concentración del absorbente. Se mide en mol/L.

La aplicación práctica de la Ley de Beer es que, conociendo la absorbancia de una sustancia podemos estimar su concentración

La Química Verde

La química sostenible (también llamada química verde) consiste en una filosofía química dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos que implica la reducción o eliminación de productos químicos (para los materiales, las personas y el medio ambiente). Actualmente sus bases se resumen en 12 principios. Por lo tanto, la química sostenible se centra en las reacciones y procesos que se llevan a cabo en la Industria química e industrias afines. Es necesario distinguirla de la química ambiental, que estudia el comportamiento de los compuestos químicos (naturales o sintéticos) en el medio ambiente. También hay que destacar que la química sostenible tiene un carácter preventivo (evitando, en la medida de lo posible, la generación de productos peligrosos), mientras que la remediación medio ambiental se dirige hacia la eliminación de productos dañinos que ya se han vertido a la naturaleza. La química verde o sostenible se trata de aplicar en distintos ámbitos de la química tales como la química orgánica, la química inorgánica, la bioquímica, la química analítica, la química física, la química farmacéutica, la ingeniería química, o la ciencia de polímeros.

Aunque el empleo por primera vez del término "Química Verde" ha sido asignado a Paul Anastas en 1991, parece que el término ya había sido empleado con anterioridad, como por el investigador Trevor Kletz lo uso en 1978 en un artículo en el que se instaba al uso responsable de procesos químicos y búsqueda de procesos sostenibles.

Los Doce Principios de la Química Sostenible

Paul Anastas, de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, y John C. Warner desarrollaron doce principios de la química verde. Los principios cubren conceptos como:

1. **Prevención.** Es mejor prevenir la formación de residuos que tratar de limpiar tras su formación.
2. **Eficiencia atómica.** Los métodos sintéticos deben ser diseñados para conseguir la máxima incorporación en el producto final de todas las materias usadas en el proceso.
3. **Síntesis segura.** En cuanto posible, se deben diseñar metodologías sintéticas para el uso y la generación de sustancias con escasa toxicidad humana y ambiental.
4. **Productos seguros.** Se deben diseñar productos químicos que, preservando la eficacia de su función, presenten una toxicidad escasa.
5. **Disolventes seguros.** Las sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) deben resultar innecesarias en lo posible y, cuanto menos deben ser inocuas.
6. **Eficiencia energética.** Las necesidades energéticas deben ser consideradas en relación a sus impactos ambientales y económicos. Los métodos sintéticos deben ser llevados a temperatura y presión ambiente.
7. **Fuentes renovables.** Las materias de partida deben ser renovables y no extinguidas, en la medida que esto resulte practicable técnica y económicamente.
8. **Evitar derivados.** La formación innecesaria de derivados (bloqueo de grupos, protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos) debe ser evitada en cuanto sea posible.
9. **Catalizadores.** Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los estequiométricos.
10. **Biodegradabilidad.** Los productos químicos han de ser diseñados de manera que, al final de su función, no persistan en el ambiente, sino que se fragmenten en productos de degradación inerte.
11. **Polución.** Se deben desarrollar las metodologías analíticas que permitan el monitoreo a tiempo real durante el proceso y el control previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. **Prevención de accidentes.** Las sustancias y las formas de su uso en un proceso químico, deben ser elegidas de manera que resulte mínima la posibilidad de accidentes.

La química verde consiste en el esfuerzo colectivo para reducir al mínimo, o de ser posible eliminar por completo la contaminación producida en procesos químicos evitando al máximo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la elaboración de productos químicos “limpios”, que no atenten contra la salud o el ambiente. Los medios que utiliza la química verde se centran en la

disminución o eliminación del uso de productos químicos tóxicos y el reciclaje de los desechos producidos por el avance tecnológico, de tal forma que se consiga un impacto mínimo en los seres humanos y el ambiente. Todo lo anterior sin sacrificar el avance científico y tecnológico.

Hay que diferenciar entre química ambiental y química verde. La primera tiene como objetivo el saneamiento y remediación de los efectos en el ambiente de los procesos contaminantes, mientras que la química verde intenta prevenir la contaminación desde su origen.

Salinas-EstevanéA, P. (2012)

Teniendo esto en cuenta, surge la idea de poner en práctica la química verde en este trabajo, tratando de reducir al máximo la producción de residuos tóxicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de Nanopartículas de Oro, Plata y Bimetálicas

En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas mono y bimetálicas a partir de HAuCl_4 y AgNO_3 mediante el método químico de la reducción de las sales utilizando como agente reductor un producto natural de fácil acceso y muy económico.

Preparación del Agente Reductor (Té Verde)

Se preparó un extracto de té verde utilizando un sobre de té verde comercial de la marca McCormick™. Se pusieron a calentar 200ml de agua destilada hasta llegar a la ebullición y después se vertió el contenido de la bolsa de té verde. Se esperó a que bajara la temperatura a 25 ± 5 °C. Se filtró usando un embudo de separación de cristal y un papel filtro de la marca Whattman #44.

Síntesis de Nanopartículas de Oro 1mM.

Se preparó una solución madre de oro que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M. De ésta solución, se tomaron 50 ml y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Una vez llegada a la ebullición se añadió 1ml del extracto de té en la solución para que este último empezara con la reducción del HAuCl_4 y así tener nanopartículas de oro.

Síntesis de Nanopartículas de plata 1mM.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizó el mismo método que para las de oro, lo único que cambió fue el reactivo a utilizarse. Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 50 ml de ésta y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añade 1ml del extracto de té en la solución para que este último empiece con la reducción del AgNO_3 y así tener nuestras nanopartículas de plata.

Síntesis de Nanopartículas de Oro-Plata 1mM.

Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 50 ml y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añadió de 1ml del extracto de té en la solución para que este último empiece con la reducción del AgNO_3 y así tener

nanopartículas de plata. Por otro lado, y en un vaso de precipitado diferente, se preparó una solución que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 50 ml de ésta y se pusieron en agitación. Ya que la señal del espectrofotómetro UV-Vis nos indicaba la formación de las nanopartículas de plata, se vertió la solución de oro en la solución de plata.

Síntesis de Nanopartículas de Oro 1×10^{-4} M.

Se preparó una solución que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 5 ml de ésta y 44ml de agua destilada y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición se añadió 1ml del extracto de té en la solución para que este último empiece con la reducción del HAuCl_4 y así tener nuestras nanopartículas de oro.

Síntesis de Nanopartículas de Plata 1×10^{-4} M.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizó el mismo método que para las de oro, lo único que cambió fué el reactivo a utilizarse. Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 5 ml de ésta y 44ml de agua destilada y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añadió 1ml del extracto de té en la solución para que este último empiece con la reducción del AgNO_3 y así tener nanopartículas de plata.

Síntesis de Nanopartículas de Oro-Plata 1×10^{-4} M.

Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 50 ml y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añadió de 1ml del extracto de té en la solución para que este último empezara con la reducción del AgNO_3 y así tener nanopartículas de plata. Por otro lado, y en un vaso de precipitado diferente, de una solución que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M, se tomaron 5 ml de ésta y 44ml de agua destilada y se pusieron en agitación. Ya que la señal del espectrofotómetro UV-Vis nos indicaba la formación de las nanopartículas de plata, se vertió la solución de oro en la solución de plata.

Síntesis de Nanopartículas de Oro 1×10^{-5} M.

Se preparó una solución que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 0.5 ml de ésta y 48.5ml de agua destilada y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición se añadió 1ml del extracto de té en la solución para que este último empezara con la reducción del HAuCl_4 y así tener nanopartículas de oro.

Síntesis de Nanopartículas de Plata 1×10^{-5} M.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se utilizó el mismo método que para las de oro, lo único que cambió fué el reactivo a utilizarse. Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 0.5 ml de ésta y 48.5ml de agua destilada y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añadió 1ml del extracto de té en la solución para que este último empezara con la reducción del AgNO_3 y así tener nanopartículas de plata.

Síntesis de Nanopartículas de Oro-Plata 1×10^{-5} M.

Se preparó una solución que contenía 0.017g de AgNO_3 para que su molaridad fuera de 0.001M. Ya teniendo esta solución, se tomaron 50 ml de ésta y se pusieron en agitación y calentamiento hasta llegar a la ebullición. Después de haber llegado a la ebullición, se añadió de 1ml del extracto de té en la solución para que este último empezara con la reducción del AgNO_3 y así tener nuestras nanopartículas de plata. Por otro lado, y en un vaso de precipitado diferente, de una solución que contenía 0.034g de HAuCl_4 para que su molaridad fuera de 0.001M, se tomaron 0.5 ml de ésta y 48.5ml de agua destilada y se pusieron en agitación. Ya que la señal del espectrofotómetro UV-Vis nos indicaba la formación de las nanopartículas de plata, se vertió la solución de oro en la solución de plata.

Caracterización Físico-Química

Con el objetivo de conocer las características físicas y químicas de los nanomateriales obtenidos en este proyecto, se llevaron a cabo varios análisis, entre los cuales están:

- a. Espectrofotometría UV-visible. Shimadzu UV-2450, Universidad de Sonora departamento de Ingeniería Química.
- b. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2, IPICYT San Luis Potosí.
- c. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). FEI-Quanta 200, IPICYT San Luis Potosí.
- d. Microscopio de Fluorescencia. ZEISS ApoTome.2, IPICYT San Luis Potosí.

Para ello fue necesaria la preparación de las muestras de manera específica para cada una de las técnicas de caracterización utilizadas.

Preparación de Muestras

Las muestras preparadas fueron de oro, plata y oro-plata, utilizando como agente reductor al té verde. Para el análisis por MET y con el objetivo de conocer las características físicas y morfológicas de las nanopartículas, se montaron las muestras en laminillas de cobre. Se pusieron 4 gotas de las muestras, previamente sonicada por 5 minutos, y se esperó que se secase cada gota antes de poner la siguiente. Una vez secada la última gota se introdujo la laminilla en isopropanol y se retiró de inmediato. Se llevó a cabo este procedimiento 4 veces y la quinta vez se dejó 10 segundos dentro del isopropanol, para quitar la materia orgánica procedente de los residuos del té verde y así evitar interferencias al momento de introducir las muestras al microscopio.

Para la caracterización en el microscopio electrónico de barrido (MEB) se pusieron 4 gotas de cada una de las dispersiones de nanopartículas en los pines para muestra, previamente lavados y secados. Se esperó a que se secase cada una de las gotas antes de añadir la otra gota.

Con el objetivo de saber si las nanopartículas presentan el fenómeno de resonancia del plasmón superficial, se observaron las muestras en campo oscuro y para esto se puso una gota de cada una de las muestras en su respectivo portaobjetos, previamente lavado y rotulado, y después se depositó un cubreobjetos sobre la muestra.

Evaluación Biológica Parcial de Nanopartículas de Au, Ag y Au-Ag (Bimetálicas) en la Línea Celular Hela

Internalización de Nanopartículas en Células Hela

Con el objetivo de evaluar la capacidad de internalización de las nanopartículas sintetizadas, se procedió a obtener un cultivo axénico de células HeLa, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5% (D5F), las cuales fueron cosechadas por tripsinización, por adición de 500 μ L de tripsina (sigma, T4049).

Se estimó la concentración celular mediante el método manual en cámara de Neubauer, con azul de tripano para evaluar su viabilidad. Utilizando una placa de 24 pozos, se pusieron 100,000 células en cada uno de los pocillos y se añadieron las nanopartículas en un volumen final de 500 μ l, las cuales se dejaron en las células por 24 horas antes de su lectura en microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti).

Materiales

Placa estéril de 24 pozos

Cubreobjetos redondos

Puntas Azules estériles para micropipeta

Puntas amarillas estériles para micropipeta

Pinzas en Alcohol

Encendedor

Metodología para internalización de nanopartículas en células HeLa

1. Se prepara una suspensión celular y se realiza el conteo celular.
2. En una placa de 24 pozos estéril se depositan cubreobjetos redondos en el fondo de cada pozo, cuidando el lado para facilitar la adherencia, utilizando las pinzas en alcohol y flameándolas antes de tomar el cubreobjetos.
3. Ya que se deposita el cubreobjetos en el fondo de cada uno de los pozos de la placa, un volumen de suspensión celular que contenga de 80,000 a 100,000 células, añadiéndolas gota a gota.
4. Se añade el volumen restante de medio suplementado tratando de que el volumen final sean 500 microlitros.
5. Se ponen en incubación a 37°C y 5% de CO₂ por 24hrs.

6. Pasadas las 24hrs, se revisa el color del medio y en caso de ser necesario, se cambia. Se añaden las nanopartículas siguiendo la tabla 1 siempre y cuando estén viables las células.
7. Se ponen en incubación nuevamente a 37°C y 5%CO₂ por 24hrs.
8. Se procede a observar las muestras en el microscopio confocal.

1x10 ⁻³ M	Au	Ag	Au-Ag
PBS	9.987ml	9.975ml	9.983ml
Nanopartículas	13µl	25µl	17µl
Total	10ml	10ml	10ml
Tomar	50µl	50µl	50µl
1x10 ⁻⁴ M			
PBS	9.870ml	9.750ml	9.830ml
Nanopartículas	130µl	250µl	170µl
Total	10ml	10ml	10ml
Tomar	50µl	50µl	50µl
1x10 ⁻⁵ M			
PBS	8.7ml	7.5ml	8.3ml
Nanopartículas	1.3ml	2.5ml	1.7ml
Total	10ml	10ml	10ml
Tomar	50µl	50µl	50µl

Ensayo de Citotoxicidad en Células Hela

Con la intención de conocer el efecto citotóxico de las nanopartículas mono y bimetálicas sobre la línea celular HeLa, se procedió al ensayo de reducción del MTT (CGD1 - Sigma-Aldrich). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa la cual reduce al MTT en cristales de formazán, los cuales son solubilizados mediante una solución alcohol-ácido. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. El cual se puede evaluar espectrofotométricamente.

Materiales

Placa de 96 pozos

Puntas amarillas estériles

Kit de MTT

Espectrofotómetro o lector de placas

Metodología para citotoxicidad

1. Se toma un volumen necesario de la suspensión celular en el que estén contenidas 10,000 células, dejando un exceso de la suspensión celular.
2. Se incuba a 37°C y 5%CO₂ por 24hrs.
3. Pasando las 24hrs se añaden 1, 2, 4, 8 y 10µl de las dispersiones de nanopartículas con concentración 1x10⁻³ M.
4. Se ponen en incubación a 37°C y 5%CO₂ por 24hrs.
5. Después de la incubación, se aplica el MTT (10% del volumen de cada pozo) y se incuba a 37°C y 5%CO₂ por 3-4hrs.
6. Se añade el alcohol-ácido equivalente al volumen original de cada pozo y se solubilizan los cristales formados.
7. Se lee la absorbancia a 570 nm y a 650 nm.
8. Se resta la lectura de 650 nm a la lectura de 570 nm y se hace una gráfica con los datos obtenidos.

RESULTADOS

Caracterización Físico-Química: Análisis por Microscopía

Las nanopartículas monometálicas de oro, plata y bimetálicas au-ag fueron sintetizadas fácilmente y de manera muy rápida, con un tiempo de síntesis de entre 10 y 15 minutos a diferencia de otros métodos descritos en la literatura donde el proceso se realiza en más de una hora (Guzmán. 2009, Zhou. 2012), mediante un método de reducción por química verde utilizando al té verde a temperatura de ebullición. Para su posterior caracterización se utilizaron diferentes tipos de microscopía y espectrofotometría UV-Vis.

Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Con el objetivo de conocer la morfología de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo, se procedió a tomar micrografías en Microscopio Electrónico de Transmisión. Las muestras fueron montadas en laminillas de cobre, como se describió anteriormente, y se procedió después a su análisis. Utilizando el software ImageJ se analizaron las micrografías, encontrándose que las nanopartículas muestran un tamaño promedio por debajo de los 20 nm de diámetro y pudimos observar, también, a excepción de las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $1 \times 10^{-5} \text{M}$, son esféricas, tal como se muestra en la figura 4.

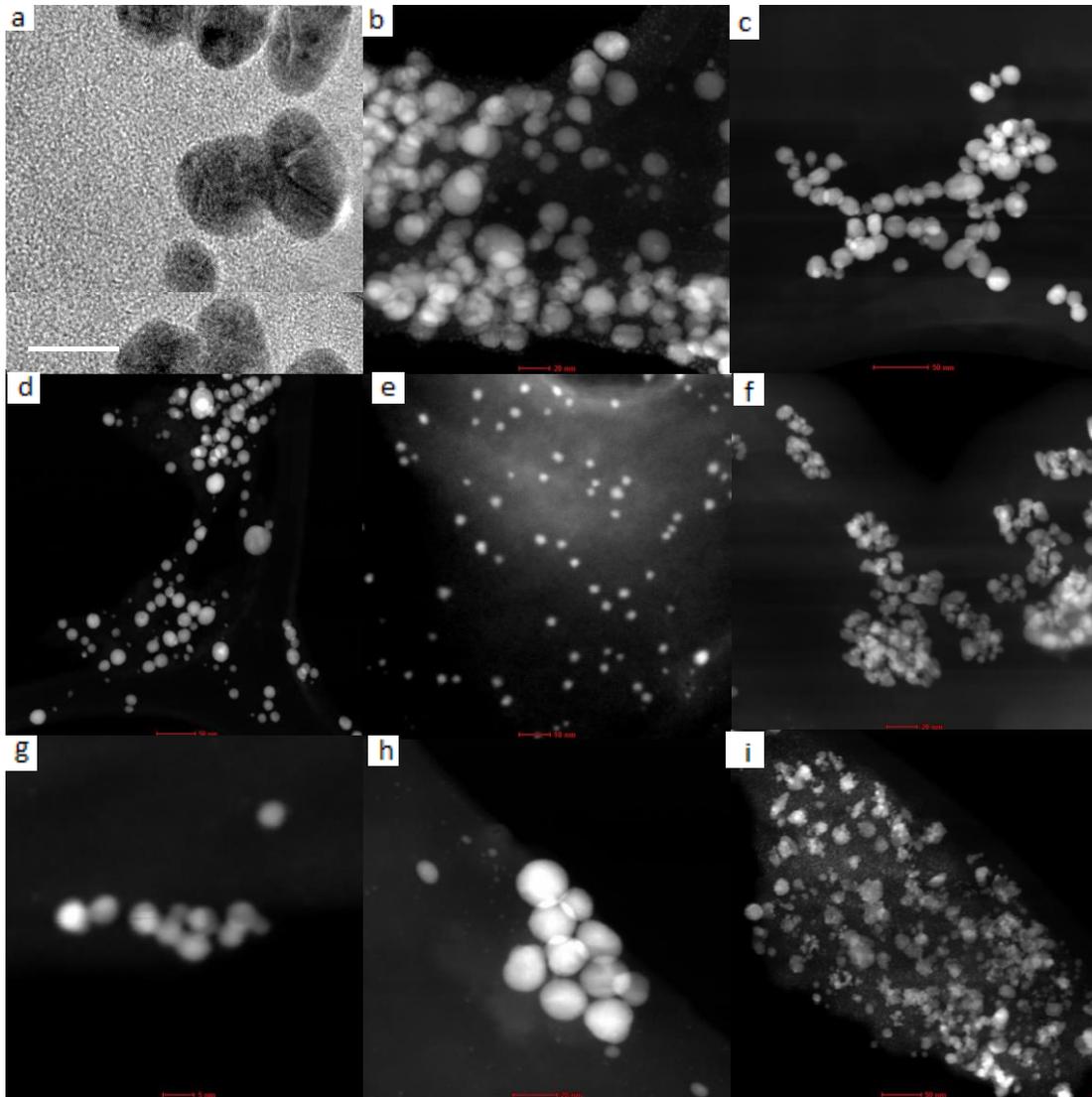


Figura 4. Micrografías de TEM para evaluar el efecto de la concentración de los metales, oro y plata, en la formación de nanopartículas mono y bimetálicas. En el panel **a** al **c** se muestran las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, **a**) oro, **b**) plata y **c**) oro-plata. Los paneles de **d** al **f** muestran las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, **d**) oro, **e**) plata, **f**) oro-plata. Las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ puede observarse en los paneles de **g** al **i**, **g**) oro, **h**) plata, **i**) oro-plata. HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2, IPICYT San Luis Potosí.

Análisis EDX.

Con la intención de conocer la pureza de las nanopartículas y saber si el té verde genera residuos en la síntesis de las nanopartículas, se llevó a cabo el análisis EDX a cada una de las muestras, como se muestra en la figura 5. Podemos apreciar que el elemento que aparece en cada uno de los análisis, es el correspondiente a las nanopartículas sintetizadas, permitiéndonos inferir que las nanopartículas son puras, y carecen de contaminación.

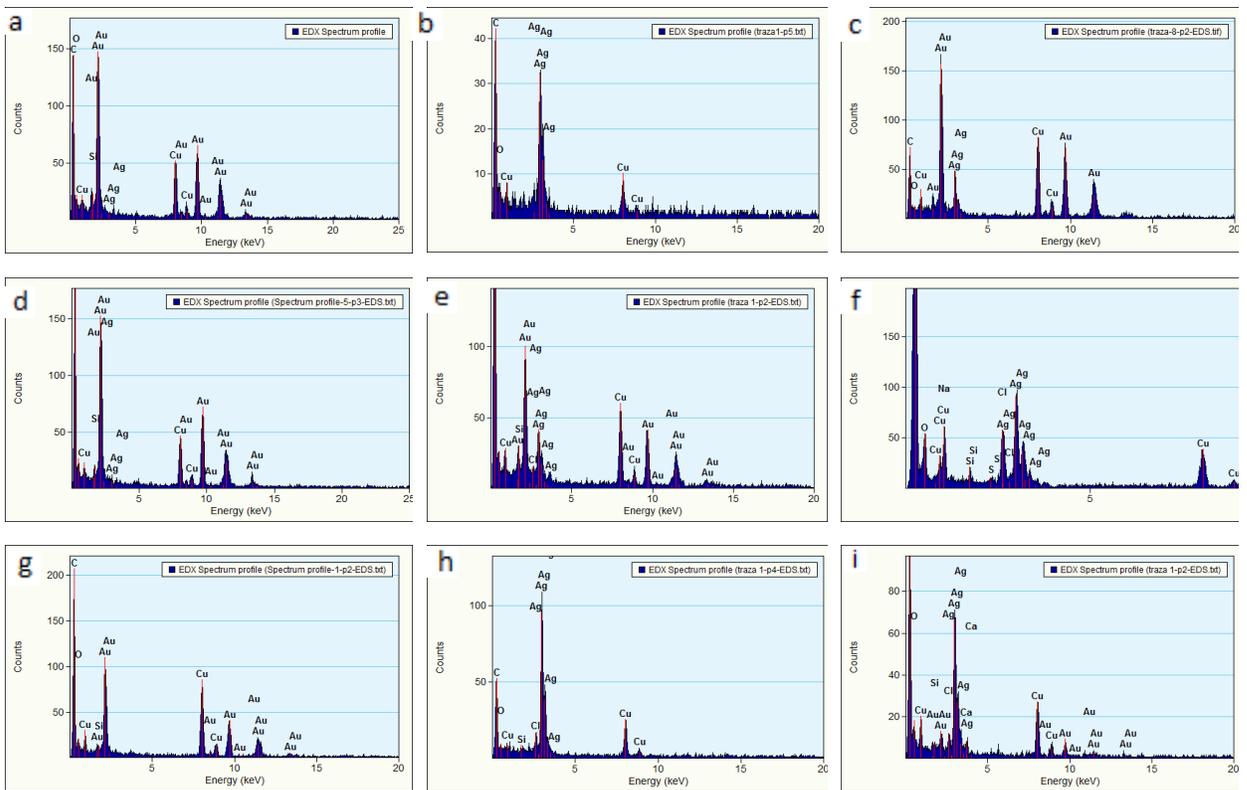


Figura 5. Micrografías del análisis EDX para las nanopartículas de oro, plata y bimetalicas. En el panel a al c se muestran las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, a) oro, b) plata y c) oro-plata. Los paneles de d al f muestran las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, d) oro, e) oro-plata, f) plata. Las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ puede observarse en los paneles de g al i, g) oro, h) plata, i) oro-plata. Los picos indican la presencia de los metales correspondientes a cada una de las muestras. Picos asociados con otros elementos químicos estarían relacionados con componentes del té verde, como por ejemplo el silicio **Figura 5f**. HRTEM FEI TECNAI F30 STWIN G2, IPICyT San Luis Potosí.

Microscopía de Fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Se usa para detectar sustancias con autofluorescencia (vitamina A) o sustancias marcadas con fluorocromos.

Con el objetivo de determinar si las nanopartículas producen señales al excitarse con ondas electromagnéticas, se llevó a cabo el análisis de las muestras en Microscopio de Fluorescencia (ZEISS ApoTome.2), usando un láser de luz ultravioleta (400 nm) y una cámara AxioCam mrc. Para la preparación de estas muestras, se depositó una gota de la muestra entre porta y cubreobjetos. Las nanopartículas, por sí mismas, nos dieron señales capaces de ser captadas por el microscopio (figuras 6, 7 y 8). En éstas, podemos observar señales en color azul, las cuales representan cúmulos de nanopartículas.

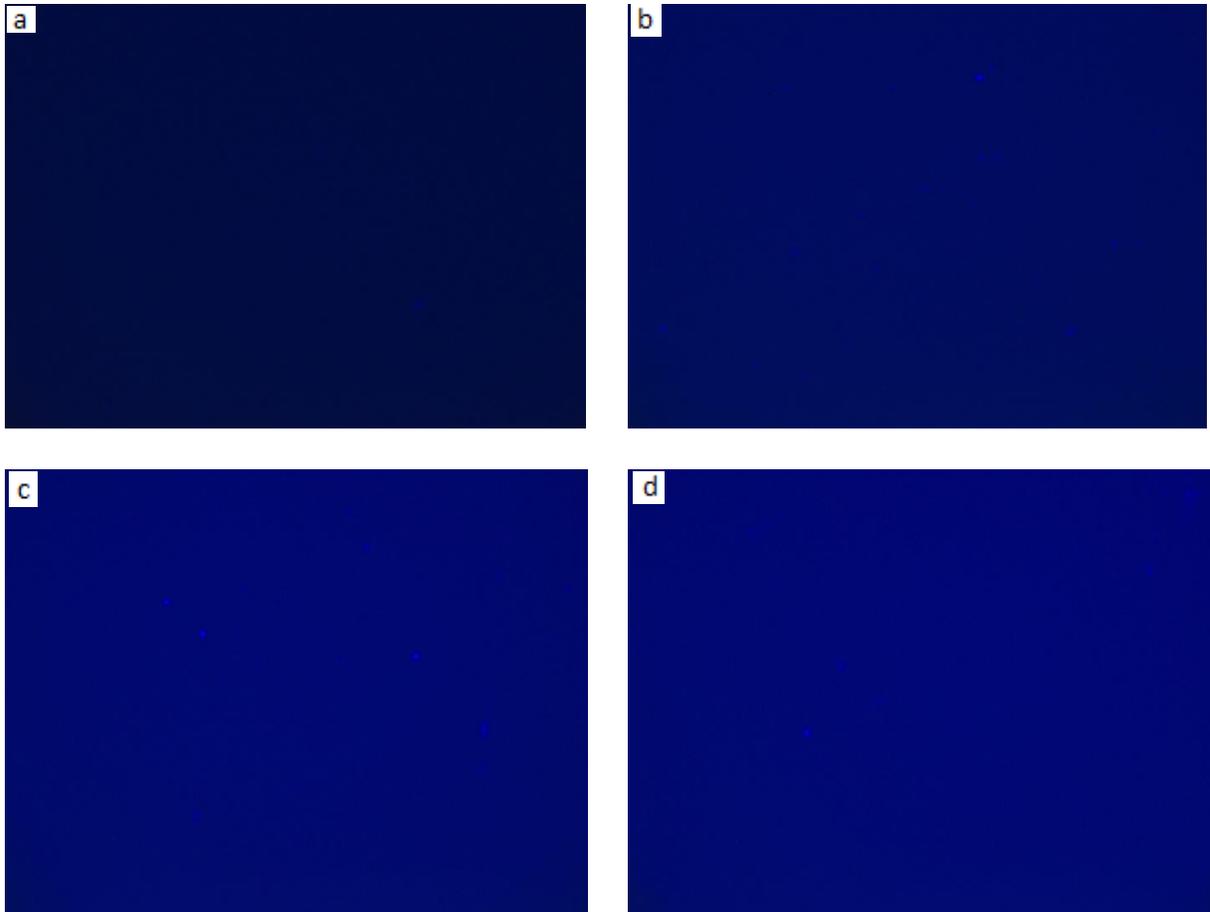


Figura 6. Micrografías de Fluorescencia de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-3} M. a) blanco, agua en un portaobjetos, b) nanopartículas de oro en concentración 1×10^{-3} M, c) nanopartículas de plata en concentración 1×10^{-3} M y d) nanopartículas bimetalicas de oro-plata en concentración 1×10^{-3} M. ZEISS ApoTome.2, IPICyT San Luis Potosí.

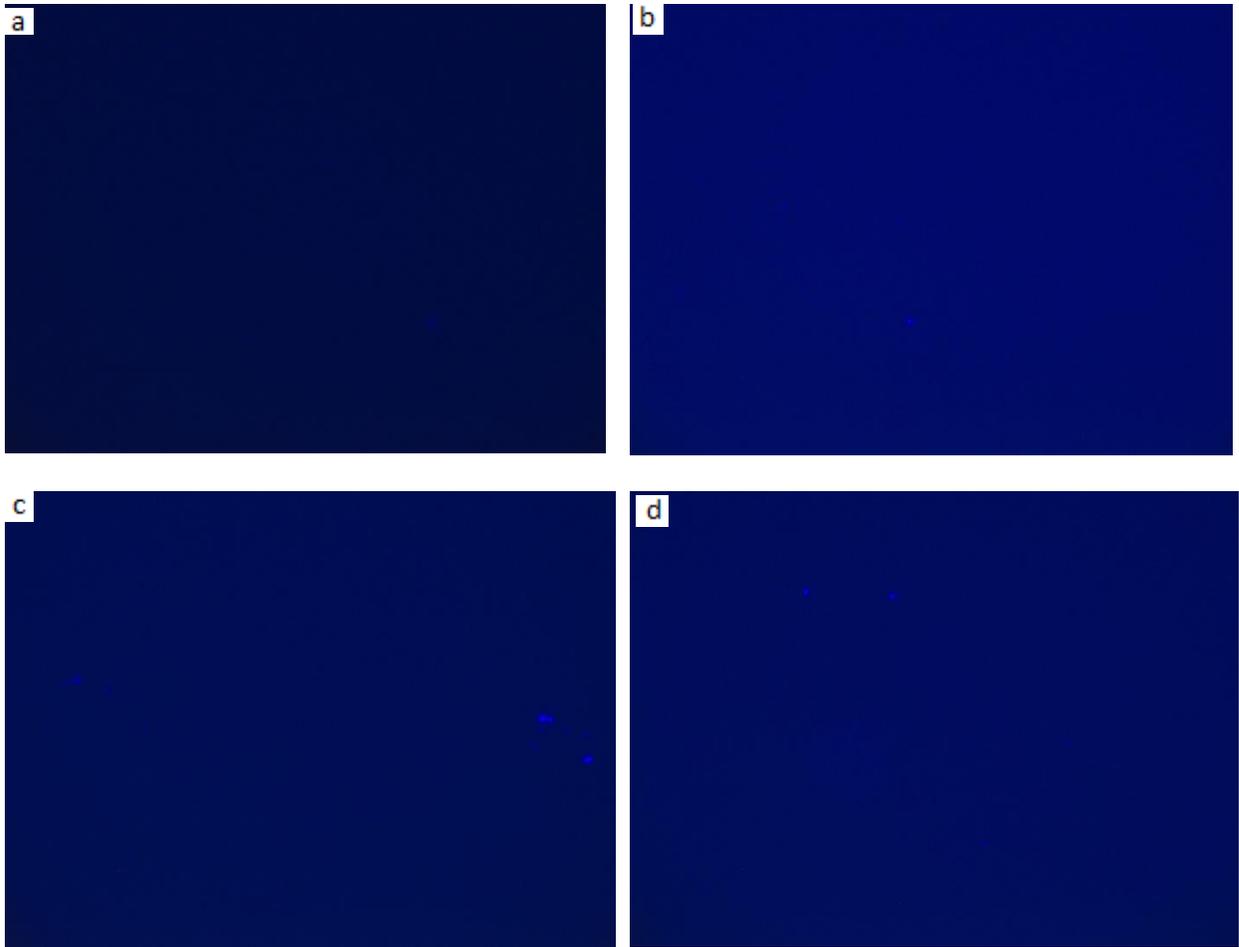


Figura 7. Micrografías de Fluorescencia de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-4} M. a) blanco, agua en un portaobjetos, b) nanopartículas de oro en concentración 1×10^{-4} M, c) nanopartículas de plata en concentración 1×10^{-4} M y d) nanopartículas bimetalicas de oro-plata en concentración 1×10^{-4} M. ZEISS ApoTome.2, IPICyT San Luis Potosí.

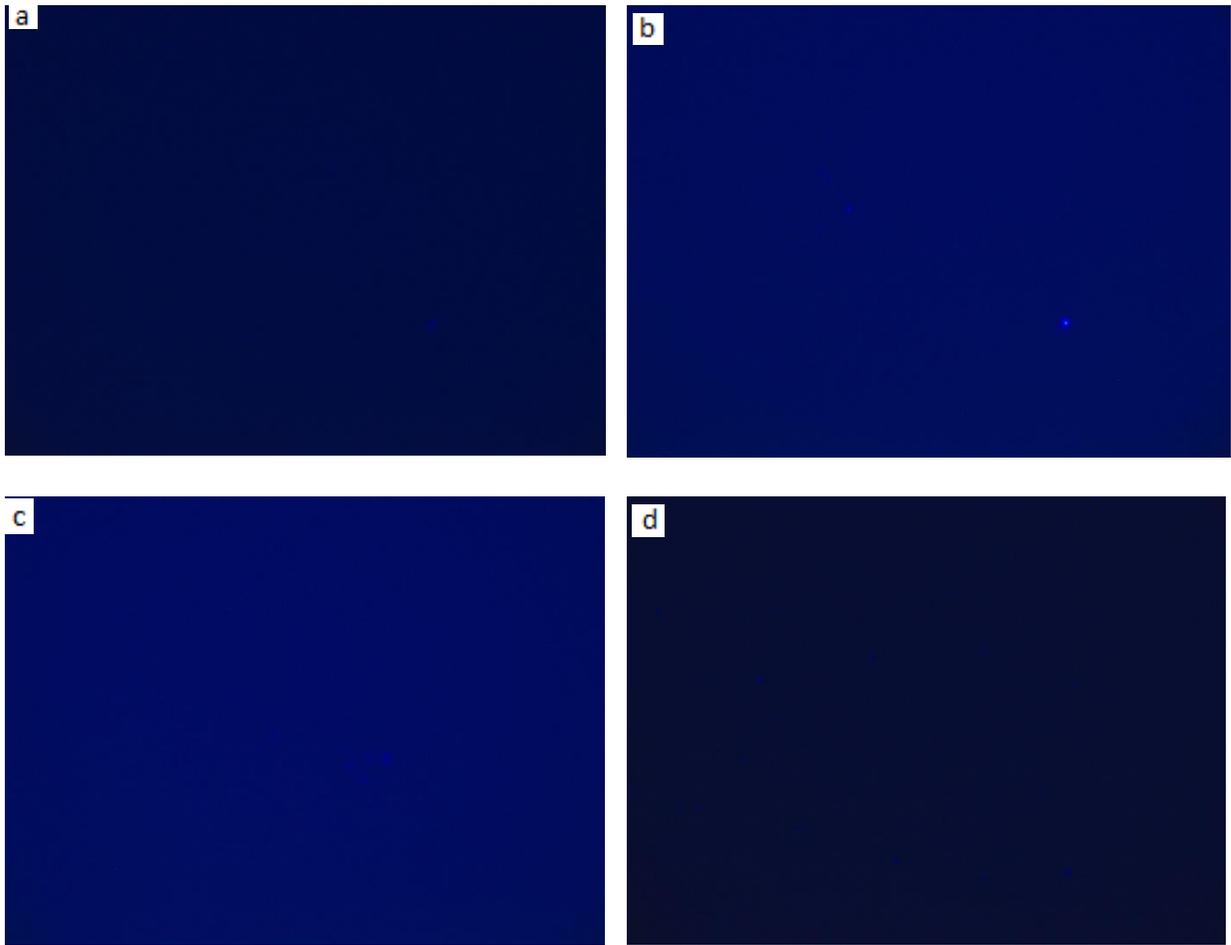


Figura 8. Micrografías de Fluorescencia de las nanopartículas de oro, plata y oro-plata en concentración 1×10^{-5} M. a) blanco, agua en un portaobjetos, b) nanopartículas de oro en concentración 1×10^{-5} M, c) nanopartículas de plata en concentración 1×10^{-5} M y d) nanopartículas bimetalicas de oro-plata en concentración 1×10^{-5} M. ZEISS ApoTome.2, IPICyT San Luis Potosí.

Espectrofotometría UV-Vis.

Durante la síntesis de las nanopartículas, fue necesario el monitoreo de la muestra para conocer la formación de las mismas. Para este monitoreo, se llevó a cabo la lectura de absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro Shimadzu UV2450 para medir la absorbancia de las nanopartículas desde los 900nm hasta los 200nm., en donde una banda de absorción máxima alrededor de los 520 nm denota la formación de nanopartículas de oro, y una banda de absorción máxima alrededor de 420 nm denota la formación de nanopartículas de plata. En las gráficas de absorbancia que se obtuvieron durante los monitoreos, se observan las bandas a 520 nm (figura 9) correspondientes a las nanopartículas de oro y las bandas a 420nm (figura 10) para las nanopartículas de plata.

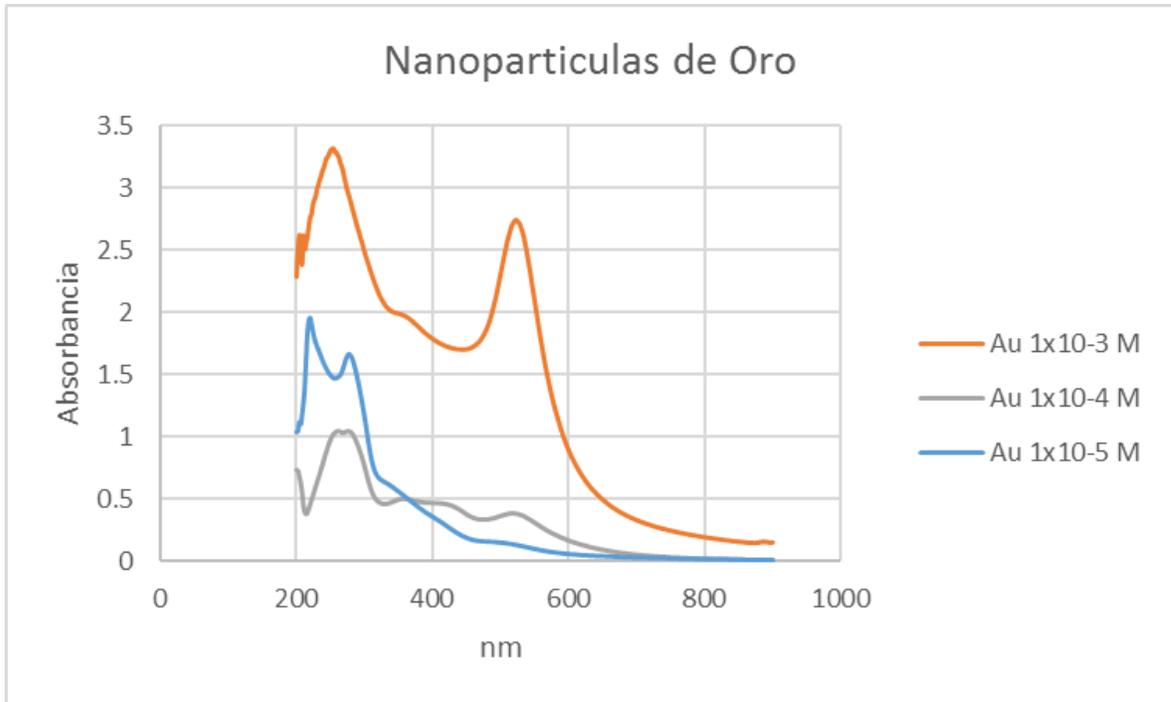


Figura 9. Análisis espectrofotométrico, UV-Vis, de las nanopartículas de oro. Shimadzu UV-2450, Universidad de Sonora, departamento de Ingeniería Química.

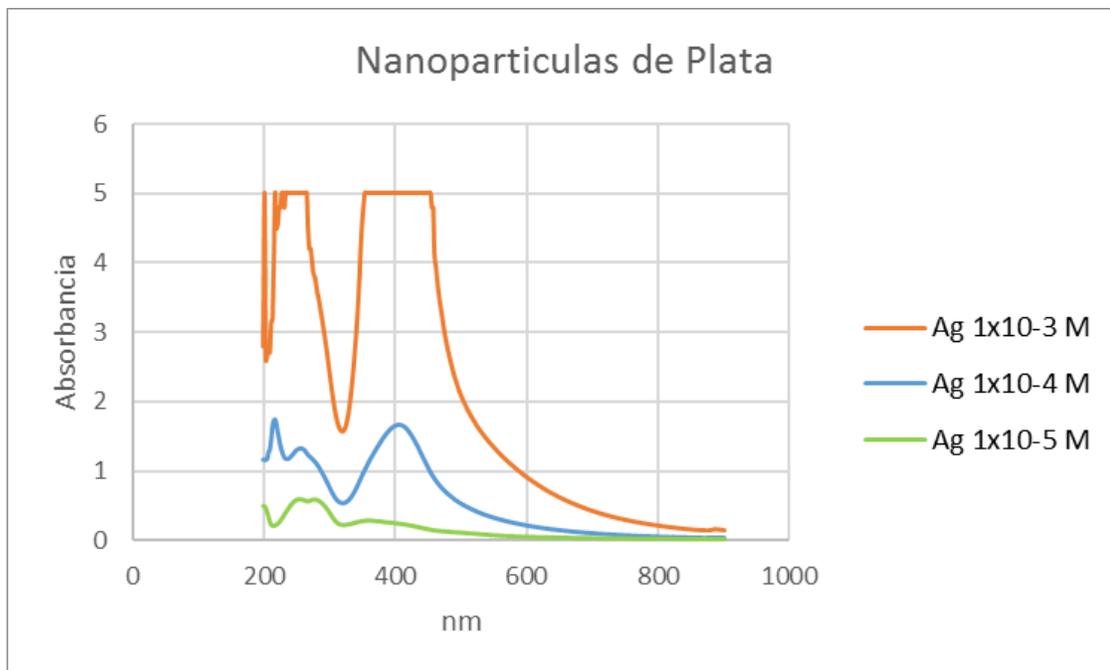


Figura 10. Análisis espectrofotométrico, UV-Vis, de las nanopartículas de plata. Shimadzu UV-2450, Universidad de Sonora, departamento de Ingeniería Química.

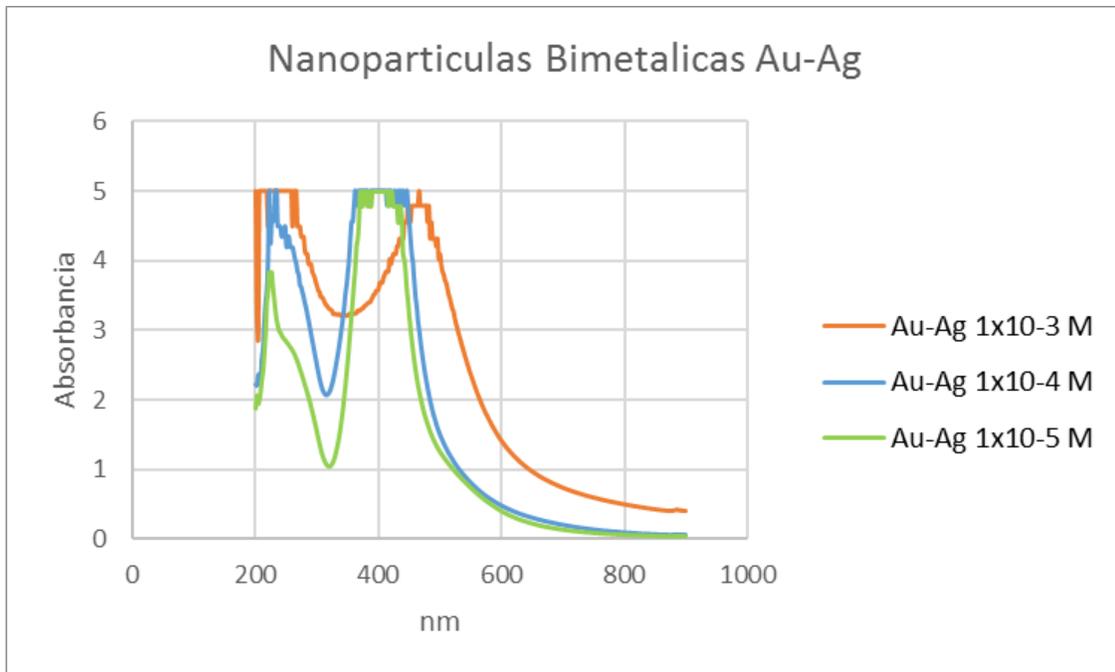


Figura 11. Análisis espectrofotométrico, UV-Vis, de las nanopartículas bimetalicas Au-Ag. Shimadzu UV-2450, Universidad de Sonora, departamento de Ingeniería Química.

Evaluación Biológica Parcial de Nanopartículas de Au, Ag y Au-Ag

Internalización de Nanopartículas en Células Hela

La internalización de las nanopartículas se evaluó en la línea celular HeLa. Para ello se utilizó un equipo de Microscopia Confocal Nikon Eclipse Ti del departamento de Física de la Universidad de Sonora, con un aumento de 20X. En la figura 12 y figura 13 se muestran las señales que se pudieron detectar en el interior de las células tratadas con las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$. Este resultado indica que las nanopartículas bimetálicas a esta concentración fueron capaces de internalizarse en esta línea celular. Sin embargo, no se observó señales de internalización para las nanopartículas monometálicas a las diferentes concentraciones evaluadas. Esto no necesariamente indica que no sean capaces de entrar a las células, sino que posiblemente el desarrollo técnico no fue eficiente o no es el método apropiado para la detección de este tipo de nanopartículas. En otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación se observó la internalización de estas mismas nanopartículas (Au, Ag y Au-Ag) en células ARPE (Anexo 5, 6 y 7).

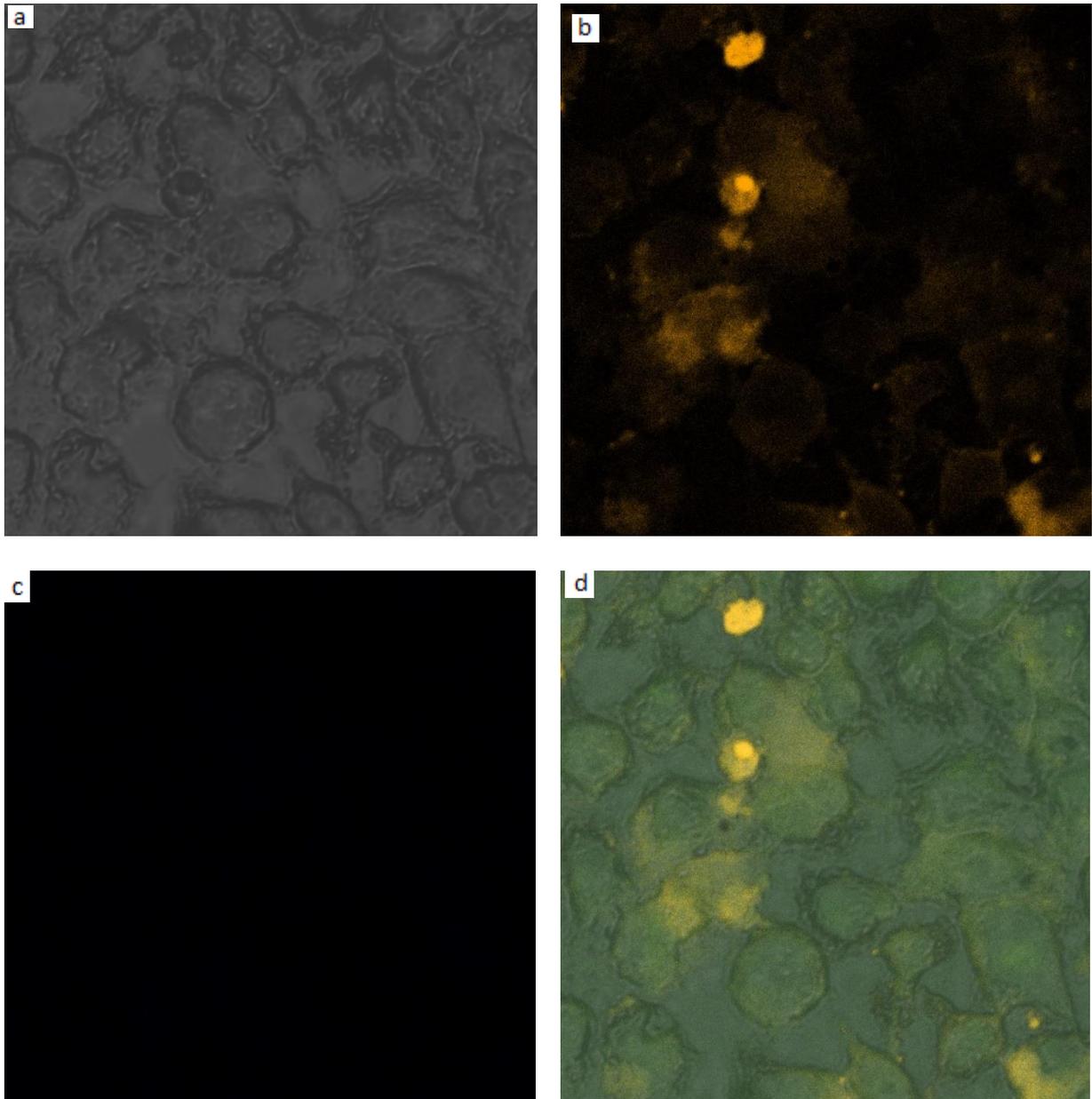


Figura 12. Internalización de las nanopartículas Au-Ag 1×10^{-5} en células HeLa. a) Au-Ag 1×10^{-5} 640 nm, b) Au-Ag 1×10^{-5} a 561 nm, c) Au-Ag 1×10^{-5} 640 nm y d) Au-Ag 1×10^{-5} 488 nm. Nikon Eclipse Ti, Universidad de Sonora, departamento de Física. Aumento 20X.

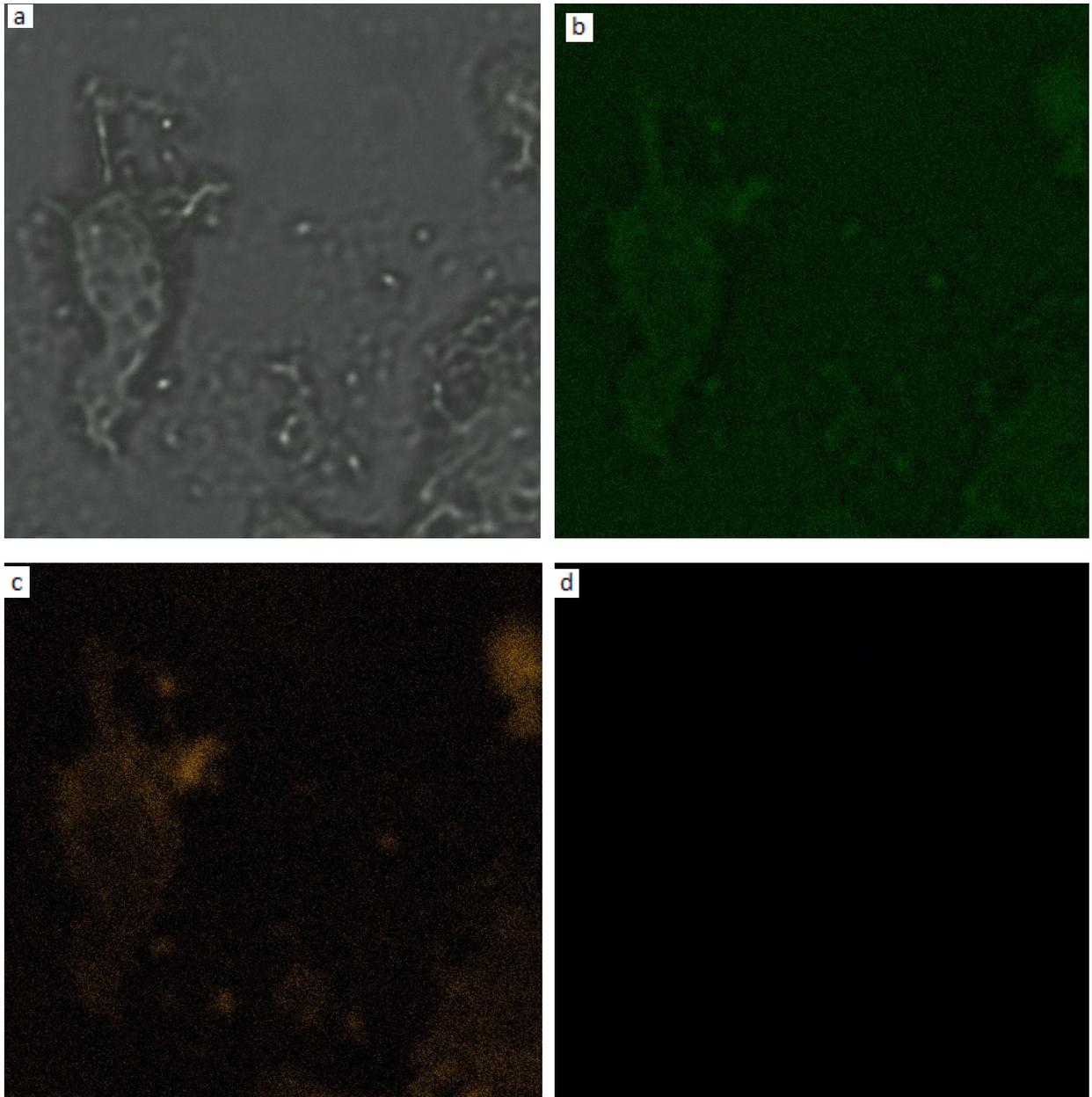


Figura 13. Internalización de las nanopartículas Au-Ag 1×10^{-5} en células HeLa. a) Au-Ag 1×10^{-5} 640 nm, b) Au-Ag 1×10^{-5} 488 nm, c) Au-Ag 1×10^{-5} 561 nm y d) Au-Ag 1×10^{-5} 405 nm. Nikon Eclipse Ti, Universidad de Sonora, departamento de Física. Aumento 20X.

Ensayo de Citotoxicidad en Células Hela

El ensayo de MTT, se realizó como se describe en materiales y métodos, para conocer la citotoxicidad de las nanopartículas a la concentración $10^{-3}M$ en la línea celular HeLa en un volumen final de $300\mu l$. Los resultados del ensayo MTT se observan en la figura 14, donde se puede observar que las nanopartículas bimetálicas tiene una actividad más citotóxica que las nanopartículas de oro y plata por si solas. La viabilidad de las células HeLa fue del 38% a las 24 horas con el tratamiento con nanopartículas bimetálicas en contraste con un 46% y 72% de viabilidad en el tratamiento con nanopartículas de plata y de oro respectivamente.

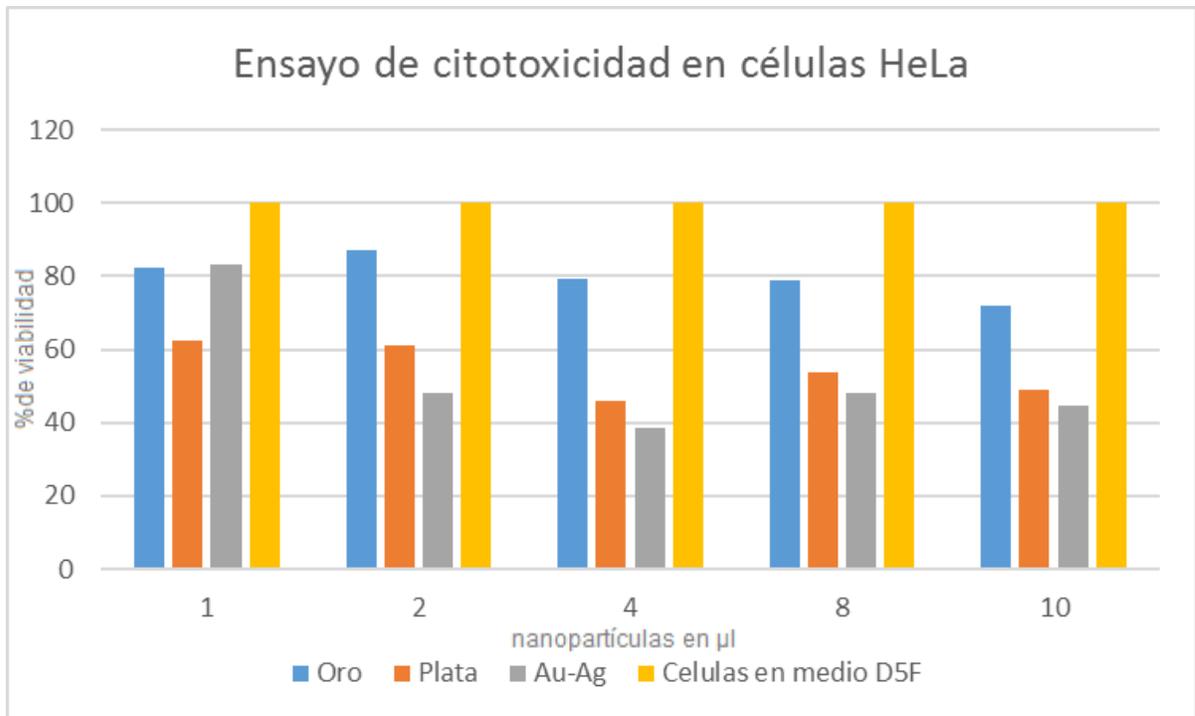


Figura 14. Gráfica de porcentaje de viabilidad celular después de haber realizado el ensayo MTT. En cada pocillo con 10,000 células se añadieron 1,2,4,8 y 10µl de las nanopartículas de Oro, Plata y Oro-Plata de concentraciones 1×10^{-3} M. El eje de las X denota la cantidad de nanopartículas añadidas a cada pocillo en µl, y el eje de las Y muestra el porcentaje de viabilidad.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se sintetizaron nanopartículas de oro, tal como se muestra en la figura 4a. Estas nanopartículas de oro se encuentran en un tamaño máximo de 10nm y son esféricas en su mayoría. De acuerdo a la figura 9, se muestra la gráfica de absorbancia de la muestra de oro en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, que presentó una absorción del plasmón de superficie alrededor de los 520nm que nos indica que las nanopartículas efectivamente son de oro (Verma y col.). Son nanopartículas de oro coloidal de acuerdo al análisis EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy), representados en la figura 5a, en donde podemos apreciar que la composición de estas nanopartículas es solamente oro.

Se sintetizaron también nanopartículas de plata, tal como se observa en la figura 4b. En esta figura se aprecian nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, y se puede ver que están en un tamaño máximo de 20nm. La gráfica del espectro de esta muestra está representada por la figura 10, en la cual se muestra podemos apreciar una absorbancia máxima del plasmón de superficie alrededor de los 420nm lo que nos indica la presencia de nanopartículas de plata (Guzmán y col.). El análisis EDX de esta muestra puede observarse en la figura 5b, en donde podemos ver que el elemento del que están compuestas estas nanopartículas es plata solamente, lo que nos permite inferir que son puras.

La micrografía de las nanopartículas bimetálicas oro-plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$ puede apreciarse en la figura 4c, en donde podemos observar que la mayoría de las nanopartículas son de forma esférica y se encuentran en un tamaño máximo de alrededor de 20nm. La gráfica de absorción en UV-Vis para esta muestra se aprecia en la figura 11. El análisis EDX de esa muestra, para conocer la composición de estas nanopartículas, puede apreciarse en la figura 5c, en donde se muestra que, tanto la plata como el oro se encuentran presentes, dándonos a entender que se trata de nanoaleaciones oro-plata.

Se sintetizaron también nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, representados en la figura 4d, en donde se muestra una micrografía de las mismas. En esta micrografía podemos observar que se trata de nanoesferas y que éstas, en su mayoría, se encuentran por debajo de 20nm de diámetro. También podemos ver la gráfica de absorbancia en UV-Vis en la figura 9, en donde se aprecia que, al igual que en las nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, la absorción máxima del plasmón de superficie se encuentra alrededor de los 520nm, pero en menor intensidad, y de igual manera nos indica que las nanopartículas son de oro. La disminución en la señal del oro (figura 9 se debe a que esta muestra se sintetizó con $1/10$ de la cantidad de la solución

de oro cuando se sintetizaron las nanopartículas en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, por lo tanto, habrá menos material sintetizado.

Se realizó el análisis EDX para la muestra de nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, que se puede apreciar en la figura 5e y en la cual podemos observar que el elemento que aparece es el oro, por lo cual podemos decir que las nanopartículas son solamente de oro. Para las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, la figura 4e muestra una micrografía de éstas. En esta micrografía podemos observar que, a diferencia de las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$ (figura 4b), éstas se encuentran en un tamaño inferior a 10nm y son en su mayoría esféricas, además de que existe una dispersión de tamaño más homogénea. La gráfica de absorbancia en UV-Vis para esta muestra se aprecia en la figura 10, en la cual podemos observar que la absorbancia máxima del plasmón de superficie se encuentra alrededor de los 420nm lo que nos indica la presencia de nanopartículas de plata. Se observa en esta gráfica que la señal es inferior a la que se muestra en la gráfica para las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, y esto es debido a que al momento de sintetizar estas nanopartículas, se utilizó $\frac{1}{10}$ de la cantidad de solución de plata que se utilizó al momento de la síntesis de las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y, por lo tanto, se espera que haya menos material sintetizado. El análisis EDX de esta muestra (figura 5e) exhibe únicamente a la plata presente, por lo que se puede decir que las nanopartículas son solamente de plata.

Las nanopartículas bimetálicas oro-plata en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ pueden observarse en la micrografía de la figura 4f, en el cual se observan aglomerados de nanopartículas en tamaños desde 10nm hasta alrededor de 50nm y no tiene una forma específica, caso contrario a las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, en la cual se observa la forma esférica en su mayoría, no hay aglomerados y las cuales no sobrepasan los 20nm de diámetro. La gráfica de absorbancia en UV-Vis para estas nanopartículas se encuentra representada en la figura 11, y el análisis EDX se puede apreciar en la figura 5f en donde, al igual que en la concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, se observa que se encuentran presentes el oro y la plata en la composición de estas nanopartículas. El espectro de UV-Vis es muy parecido al espectro que presentan las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, y esto es debido a que la cantidad de plata añadida al momento de la síntesis se mantuvo constante, es decir, se añadió la misma cantidad de plata que cuando se sintetizaron las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$, lo único que cambió fue la cantidad de la solución de oro añadida, ya que esta solución de oro añadida fue un décimo de la solución de plata añadida.

Las nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ pueden observarse en la figura 4g, en donde se observan nanoesferas con un tamaño inferior a 5nm. Estas nanopartículas muestran

una dispersión más homogénea que las nanopartículas de oro en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$, lo cual podría deberse a que hay menos cantidad de material para reducir que en las otras concentraciones (100 veces menos y 10 veces menos respectivamente) y por lo tanto la reacción sea más controlada. La figura 9 muestra la gráfica de absorbancia de UV-Vis para ésta muestra y en ella se puede apreciar que, a diferencia de las dos concentraciones anteriores de oro, la señal de la absorción máxima del plasmón de superficie de esta muestra se encuentra también alrededor de los 520nm, y podemos decir que son nanopartículas de oro. Al realizar el análisis EDX, representado en la figura 5g, se observa que la composición de estas nanopartículas es oro solamente.

Las nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ pueden observarse en la figura 4h y se aprecian nanoesferas con un diámetro no mayor a 20nm y una dispersión de tamaño muy homogénea. La gráfica de absorbancia se muestra en la figura 10 y se observa que la señal de absorción máxima del plasmón de superficie se encuentra, igual que en las muestras anteriores de plata, alrededor de los 420nm, pero con una intensidad muy baja en la señal. La disminución en la intensidad se debe a la menor cantidad de material que hay en esta muestra (100 veces menos que en la concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y 10 veces menos que en la concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$) y por lo tanto el nanomaterial sintetizado es menor. El análisis EDX de esta muestra, representado en la figura 5h, en el cual se observa que el único elemento presente es la plata.

La figura 4i nos muestra las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y en la micrografía se observa que, al igual que en la muestra de nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$, no existe una forma definida de las nanopartículas, además tienden a formar agregados de gran tamaño (alrededor de 50nm). El análisis espectrofotométrico con UV-Vis puede observarse en la figura 11 y puede apreciarse una gráfica muy parecida a la de nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$. La razón de este parecido es que al momento de sintetizar las diferentes concentraciones de nanopartículas bimetálicas se mantuvo constante la solución de plata añadida, lo único que cambió fue la cantidad de solución de oro añadida, en este caso, la cantidad de oro añadida era $1/100$ de la cantidad de plata añadida y es por esto que podemos asumir que la señal que aparezca sea muy parecida a la de la plata y no a la del oro. En el análisis EDX (figura 5i) observamos que la señal de la plata es muy superior a la señal del oro, pero aparecen las dos señales, por lo que podemos decir que se trata de nanoaleaciones de estos elementos. La señal de la plata es muy superior a la del oro debido a que hay 100 veces más plata que oro en la síntesis de estas nanopartículas.

ZHAO, J. (2015) reporta la síntesis de nanopartículas de oro utilizando citrato de sodio y borohidruro de sodio. Utilizando al citrato como agente reductor y variando las concentraciones

de reactantes pudo sintetizar nanopartículas esféricas de 10, 25 y 50 nm de diámetro. Cuando utilizó el borohidruro de sodio como agente reductor sintetizó nanopartículas de diversas morfologías y con tamaños desde 10nm hasta 100nm.

Guzmán, M. G (2009) reporta tamaños de nanopartículas desde 8 nm hasta 50 nm en donde se utiliza como agente reductor al citrato de sodio. Zhou, G. (2012) reporta la síntesis de nanopartículas de plata utilizando también al citrato de sodio como agente reductor. Reporta formas esféricas en las nanopartículas y de tamaños alrededor de 30 nm

Internalización.

Uno de los intereses de las nanopartículas son sus potenciales aplicaciones en el área biológica. De ahí el interés de realizar pruebas de internalización y citotoxicidad. Para ello, una de las pruebas realizadas fue la observación de las nanopartículas en fluorescencia. En las figuras 9, 10 y 11, se observan pequeños cúmulos de nanopartículas con esta técnica. Las imágenes muestran diferentes cantidades de puntos presentes, pero esto se debe a la dispersión de la muestra sobre el portaobjetos y al campo donde se tomó la micrografía.

Cuando se sintetizan nanopartículas con fines biológicos, se requiere evaluar las interacciones con sistemas vivos, como los cultivos celulares. Entre las pruebas que se recomiendan está la internalización, ya que de resultar positiva se pueden buscar nuevos usos o aplicaciones para las nanopartículas sintetizadas. Por ello, se realizó esta prueba exponiendo a las células Hela por 24 horas a diferentes cantidades de nanopartículas. En el microscopio confocal es posible evaluar fenómenos a diferentes niveles de profundidad celular. Las figuras 12 y 13 muestran la acumulación de las nanopartículas bimetálicas en concentración 1×10^{-5} alrededor del núcleo. En la figura 12b se observaron señales fluorescentes en el interior celular cuando se utilizó una longitud de onda de 561 nm en el microscopio confocal. En la figura 12d se observan las señales fluorescentes de las nanopartículas utilizando una longitud de onda de 488 nm. La figura 13c nos muestra las señales de las nanopartículas bimetálicas en concentración $1 \times 10^{-5}M$ cuando se utilizó una longitud de onda de 561 nm, en donde se observa que los cúmulos de nanopartículas se sitúan alrededor del núcleo. Estos resultados nos indican que con la metodología utilizada y bajo las condiciones de cultivo y concentración de nanopartículas utilizadas fue posible detectar la internalización de estas nanopartículas. Se requieren estudios adicionales por TEM para evaluar al resto de las nanopartículas y obtener más información biológica al respecto.

Citotoxicidad.

Las nanopartículas actuaron con una tendencia dosis dependiente en las células HeLa como se puede observar en la Figura 14. Se evaluaron los pozos con 1, 2, 4, 8 y 10µl de las muestras en concentración $1 \times 10^{-3} \text{M}$. En ésta gráfica, la cantidad de formazan formado por las células es directamente proporcional al número de células vivas. En la gráfica se observó que, conforme iba aumentando la cantidad de nanopartículas añadidas y por ende la concentración, la cantidad de formazan iba disminuyendo indicando pérdida de la viabilidad. La viabilidad de las células HeLa fue del 38% a las 24 horas con el tratamiento con nanopartículas bimetálicas en contraste con un 46% y 72% de viabilidad en el tratamiento con nanopartículas de plata y de oro respectivamente.

Teniendo en cuenta que, para que las nanopartículas sean consideradas biocompatibles tiene que tener un efecto toxico o dañino menor al 20%, podemos determinar que las nanopartículas sintetizadas en este trabajo serian consideradas incompatibles biológicamente, ya que presentan 28, 54 y 62% de toxicidad.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis muestran que el té verde es un buen agente reductor que permite la síntesis de nanopartículas de oro, plata y aleaciones de oro-plata, además de disminuir los tiempos de síntesis de estas nanopartículas. Las nanopartículas formadas en este trabajo a partir de la técnica de reducción de la sal del metal utilizando té verde como agente reductor, se encuentran en una dispersión de tamaños muy amplia, pero ninguna sobrepasa los 20nm. La morfología para estas nanopartículas es esférica en su mayoría. Estas dispersiones de nanopartículas son muy estables.

En cuanto a la evaluación biológica en las células HeLa, las nanopartículas bimetálicas en concentración 1×10^{-5} M sintetizadas a con té verde fueron capaces de ser detectadas por el microscopio confocal, como indicativo de su internalización.

Para la citotoxicidad, se observa un comportamiento diferenciado entre las nanopartículas de oro y las de plata, con respecto a la nanoaleación. Puede verse que las nanopartículas de oro y plata presentan un efecto citotóxico menor, en tanto que la citotoxicidad de las nanoaleaciones fue más alta a menor concentración.

BIBLIOGRAFÍA

Akhtar, M. S., Panwar, J. & Yun, Y.-S. 2013. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1, 591-602.

Courtney, C. M., Goodman, S. M., McDaniel, J. A., Madinger, N. E., Chatterjee, A., & Nagpal, P. (2016). Photoexcited quantum dots for killing multidrug-resistant bacteria. *Nature materials*.

Flores Murrieta, Viridiana Maricela, Síntesis y caracterización de nanopartículas de Au, Pd, Au@Pd y Pd@Au soportados sobre una matriz de nanoesferas de SiO₂, para su aplicación en conversión catalítica. Pág. 8

Frattini, A., Pellegrini, N., Nicastro, D., & De Sanctis, O. (2005). Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Materials Chemistry and Physics*, 94(1), 148-152.

Guzmán, M. G., Dille, J., & Godet, S. (2009). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng*, 2(3), 104-111.

Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... & Hong, J. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104.

Iravani, S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, 2638-2650.

IZAGUIRRE LOPEZ, M. G. (2012). Obtención de Nanopartículas de Ag, Mediante dos Diferentes Métodos Químicos (Doctoral dissertation).

Kamal, S. S. K., Sahoo, P. K., Vimala, J., Premkumar, M., Ram, S. & Durai, L. 2010. A novel green chemical route for synthesis of silver nanoparticles using *Camellia sinensis*. *Acta Chim. Slov*, 57, 808-812.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H. & Hwang, C.-Y. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 95-101.

Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M. & Radu, S. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International journal of nanomedicine*, 7, 4263.

Mirgorod, Y. & Borodina, V. 2013. Preparation and bactericidal properties of silver nanoparticles in aqueous tea leaf extract. *Inorganic Materials*, 49, 980-983.

Mittal, A. K., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31, 346-356.

Philip, D. 2009. Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73, 650-653.

Philip, D. 2010. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 42, 1417-1424.

Roldán, M. V., Frattini, A. L., Sanctis, O. A., & Pellegrini, N. S. (2005, June). Nanopartículas metálicas con formas diversas. In *ANALES AFA* (Vol. 17, No. 1).

Ronquillo de Jesús, E., Aguilar Méndez, M. A., Guzmán Mendoza, J., & San Martín Martínez, E. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata empleando extractos de plantas.

Salinas-EstevanéA, P., & CervantesB, E. M. S. (2012). La química verde en la síntesis de nanoestructuras. *Ingenierías*, 15(54), 7.

Sharma, V. K., Yngard, R. A. & Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145, 83-96.

Singh, K., Panghal, M., Kadyan, S., Chaudhary, U., & Yadav, J. P. (2014). Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles from *Tinospora cordifolia* against multi drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2014.

Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Avalos-Borja, M., Castillon-Barraza, F. F., & Posada-Amarillas, A. (2005). Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol–silver nitrate–polyvinylpyrrolidone solution. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 25(4), 438-448.

Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Avalos-Borja, M., Castillon-Barraza, F. F., & Posada-Amarillas, A. (2005). Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol–silver nitrate–polyvinylpyrrolidone solution. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 25(4), 438-448.

Vega-Baudrit, J. R. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS A PARTIR DE MICROORGANISMOS.

Verma, H. N., Singh, P., & Chavan, R. M. (2014). Gold nanoparticle: synthesis and characterization. *Veterinary world*, 7(2), 72-77.

Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58, 267-297.

Wing, C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29.

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1).

ZHAO, J., & FRIEDRICH, B. (2015) SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES VIA CHEMICAL REDUCTION METHODS.

Zhou, G., & Wang, W. (2012). Synthesis of silver nanoparticles and their antiproliferation against human lung cancer cells in vitro. *Oriental journal of chemistry*, 28(2), 651.

GLOSARIO

Bionanotecnología: La bionanotecnología es un área multidisciplinaria relativamente nueva. Integra elementos de las ciencias biológicas (particularmente de ingeniería genética), con las nanociencias y la nanotecnología. Además, incluye áreas tan diferentes como la informática, la medicina, química, ingeniería, entre otras. Básicamente, la bionanotecnología consiste en:

- La modificación de los sistemas biológicos (desde biomoléculas hasta organismos enteros), utilizando nanomateriales.
- La síntesis o modificación de las nanoestructuras, utilizando sistemas biológicos

Células HeLa: son un tipo particular de células de cultivo celular, usadas en investigación científica. Es el linaje celular humano más antiguo y utilizado con mayor frecuencia. El linaje al cual pertenecen estas células deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks (de allí el acrónimo He{nrietta} La{cks}) quien falleció el 4 de octubre de ese mismo año debido al cáncer. El linaje HeLa ha mostrado ser particularmente duradero y prolífico, esto se ha demostrado puesto que contamina otros cultivos celulares usados también en investigación en los mismos laboratorios

Electronvoltio (símbolo eV): es una unidad de energía que representa la variación de energía potencial que experimenta un electrón al moverse desde un punto de potencial V_a hasta un punto de potencial V_b cuando la diferencia $V_{ba} = V_b - V_a = 1V$, es decir, cuando la diferencia de potencial del campo eléctrico es de 1 voltio. Equivale a $1,602176565 \times 10^{-19} J$, obteniéndose este valor de multiplicar la carga del electrón ($1,602176565 \times 10^{-19} C$) por la unidad de potencial eléctrico (V). Es una de las unidades aceptadas para su uso en el Sistema Internacional de Unidades, pero que no pertenece estrictamente a él.

Esfera de coordinación: El número de coordinación de un complejo es el número de ligandos unidos directamente al átomo metálico central.

La esfera de coordinación interna contiene a los ligandos unidos al metal central. Estos ligandos se encierran entre corchetes. Los ligandos de la esfera de coordinación interna dan cuenta de la valencia secundaria del complejo, es decir, del número de enlaces que forma el metal con el ligando y por tanto también da información de la geometría del complejo. Así, para un número de coordinación 6, que se supone valencia secundaria de seis, la geometría del complejo será la octaédrica.

La esfera de coordinación externa, la forman el resto de ligandos que no van entre corchetes. Así, en el complejo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Los tres iones cloruro forman la esfera de coordinación externa, y dan cuenta de la valencia primaria o estado de oxidación del catión $\text{Co}(\text{III})$.

En el complejo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$. La esfera de coordinación interna está formada por cinco moléculas de amoníaco y por un ión cloruro. La esfera de coordinación externa la forman dos iones cloruro. Ocurre entonces que un mismo ligando, en este caso un ión cloruro satisface al mismo tiempo una valencia secundaria y una valencia primaria del catión $\text{Co}(\text{III})$.

Movimiento browniano: Es el movimiento aleatorio que se observa en algunas partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido (por ejemplo, polen en una gota de agua). Recibe su nombre en honor al escocés Robert Brown, biólogo y botánico que descubrió este fenómeno en 1827 y observó que pequeñas partículas de polen se desplazaban en movimientos aleatorios sin razón aparente. En 1785, el mismo fenómeno había sido descrito por Jan Ingenhousz sobre partículas de carbón en alcohol.

El movimiento estocástico de estas partículas se debe a que su superficie es bombardeada incesantemente por las moléculas (átomos) del fluido sometidas a una agitación térmica.

Este bombardeo a escala atómica no es siempre completamente uniforme y sufre variaciones estadísticas importantes. Así, la presión ejercida sobre los lados puede variar ligeramente con el tiempo, y así se genera el movimiento observado.

Tanto la difusión como la ósmosis se basan en el movimiento browniano.

Nanobiotecnología: La nanobiotecnología es una rama de la nanotecnología con aplicaciones o usos biológicos y bioquímicos. A menudo la nanobiotecnología estudia elementos existentes en la naturaleza para fabricar nuevos dispositivos.

El término bionanotecnología es usado a menudo como sinónimo de nanobiotecnología. Si hacemos la distinción entre ambas, la nanobiotecnología se refiere a usar la nanotecnología para alcanzar las metas de la biotecnología, mientras que la bionanotecnología puede referirse a cualquier superposición entre la biología y la nanotecnología, incluyendo el uso de biomoléculas como parte o inspiración de dispositivos nanotecnológicos.

Nanociencia: La nanociencia es el estudio de los sistemas cuyo tamaño es de unos pocos (10-100) nanómetros. Un nanómetro (nm) es 10^{-9} metros, alrededor de 10 átomos de hidrógeno. La nanociencia trata de comprender qué pasa a estas escalas, y la nanotecnología busca

manipularlo y controlarlo. Lo que lleva a que la nanotecnología sea un gran avance en diversos campos de la ciencia.

La nanociencia es un área emergente de la ciencia que se ocupa del estudio de los materiales de muy pequeñas dimensiones.

Nanómetro (nm): es la unidad de longitud que equivale a una mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

Comúnmente se utiliza para medir la longitud de onda de la radiación ultravioleta, radiación infrarroja y la luz. Recientemente la unidad ha cobrado notoriedad en el estudio de la nanotecnología, área que estudia materiales que poseen dimensiones de unos pocos nanómetros.

Nanotecnología: La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala. Cuando se manipula la materia a la escala tan minúscula de átomos y moléculas, demuestra fenómenos y propiedades totalmente nuevas. Por lo tanto, los científicos utilizan la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos y poco costosos con propiedades únicas.

Nanopartícula: Una nanopartícula (nanopolvo, nanoracimo, o nanocristal) es una partícula microscópica con por lo menos una de sus dimensiones menor que 100 nm. Actualmente las nanopartículas son un área de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos de biomédicos, ópticos, y electrónicos. Las partículas están calificadas por su diámetro.

Química Verde: La química verde es sinónimo de salud y de sostenibilidad ambiental. Básicamente, la química verde u orgánica está orientada a buscar nuevas formas de sintetizar sustancias químicas para lograr una química más amigable con la salud y el entorno, eliminando la producción de residuos tóxicos desde su inicio.

ANEXOS

Anexo 1. Descongelación de la Línea Celular HeLa

Materiales

3 pipetas de 5 ml

1 tubo Falcon de 50ml

Puntas azules estériles para micropipeta

1 botella de cultivo de 25ml

PBS 1X

Medio de Cultivo D5F suplementado

Metodología de descongelación.

Se preparó todo el material para descongelación de células en una campana de flujo laminar. Se pone a atemperar el medio de cultivo y el Buffer de Fosfato Salino(PBS) 1X en un baño María a 37°C para evitar dañar las células al agregarles el líquido helado.

1. Se toma el vial con células congeladas y se descongela sosteniéndolas en la mano.
2. Se toma la suspensión celular y se pasa a un tubo falcon de 50ml.
3. Se añade 1ml de PBS 1X al tubo falcon.
4. Se centrifuga el tubo a 1700rpm por 7 minutos y a 4°C.
5. Se decanta el sobrenadante tomándolo con una micropipeta y teniendo cuidado de no resuspender el botón de células que se formó en la parte inferior del tubo falcon.
6. Se añaden 5ml de medio suplementado y se añade al tubo. Se resuspende el botón celular tomando y regresando el líquido 16 veces aproximadamente.
7. Se rotula la botella de medio. Se pasa todo el líquido que se resuspendio en el tubo falcon y se deposita en la botella rotulada.
8. Se pone en incubación a 37°C y 5%CO₂.
9. Revisar la botella a diario en busca de cambio de color y presencia de turbidez.

Anexo 2. Preparación de Medio D5F

Para preparar 250ml de medio D5F

1. 230.625ml de Medio de Cultivo sin suplementos.
2. 12.5ml de Suero fetal bovino
3. 2.5ml de Piruvato
4. 1.875ml de Glutamina
5. 2.5ml de penicilina.

Se añaden los líquidos y se mezclan de manera suave, evitando hacer burbujas en el medio.

Anexo 3. Tripsinización para el Desprendimiento de Células en Cultivo

Materiales

- 1 Pipeta de 10ml
- 2 pipetas de 5 ml
- Puntas azules estériles para micropipeta
- 1 tubo falcon de 50ml
- Vaso de precipitado para desechos

Metodología para despegar células.

Atemperar el medio de cultivo, el Buffer de Fosfato Salino(PBS) 1X y la tripsina en un baño maría a 37°C para evitar dañar las células al agregarles el líquido helado.

1. Con mucho cuidado y sin agitar mucho, se saca todo el medio de cultivo y se desecha. En este medio van a ir las células muertas y los desechos.
2. Se lavan las células con 5ml de PBS 1X de 3 a 4 veces, utilizando el mismo PBS que se añadió. Se toma con una pipeta y se baña la pared en donde están pegadas las células.
3. Tomar el PBS de lavado y se desecha.
4. Se añaden 500microlitros de tripsina y se lava de 3 a 4 veces al igual que en el paso #2.
5. Ya que se añadió la tripsina se pone en incubación a 37°C y 5% de CO₂, revisándolos cada minuto.
6. Se observan en el microscopio y en caso de que no estén despegadas se les dan golpes ligeros para favorecer que se despeguen las células.
7. Ya que las células se despegaron, se añade 1ml de medio suplementado (D5F) y se lava nuevamente de 3 a 4 veces para neutralizar la tripsina.
8. Se toma toda la suspensión celular y se pasa al tubo falcon.
9. Se centrifuga a 1700rpm por 7min y 4°C.
10. Se descarta el sobrenadante, ya que en este irán los restos de la tripsina.
11. Se añade 1ml de medio D5F y se procede a hacer conteo celular.

Nota. La tripsina rompe enlaces peptídicos e intracelulares para que se desadhieran de la superficie y entre ellas. Por eso es necesario cuidar el tiempo que se deja la suspensión celular con la tripsina.

Anexo 4. Conteo Celular por el Método Manual en Cámara de Neubauer

Materiales

Puntas amarillas estériles para micropipeta

Tubos eppendorf

Azul de tripano

Cámara de Neubauer

Metodología para Conteo Celular.

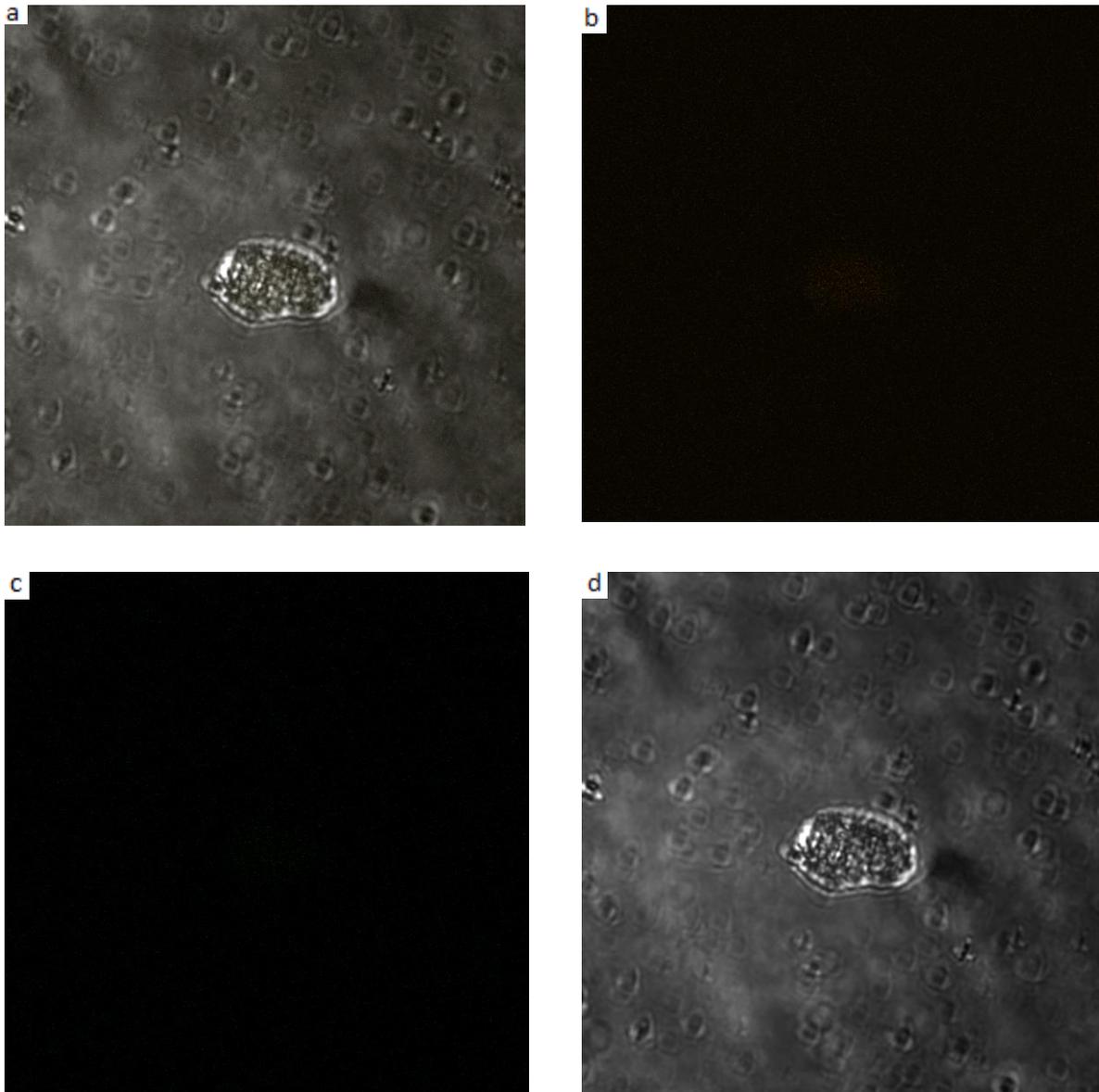
Para hacer el conteo celular es necesario conocer el factor de dilución que se obtiene utilizando la fórmula para el factor de dilución, $FD=V_f/V_i$, donde V_i y V_f son los volúmenes inicial y final de la suspensión.

La fórmula general para conteo celular es:

$$(\text{Promedio de células contadas}) (\text{Factor de dilución}) (10,000) = \# \text{ células/ml}$$

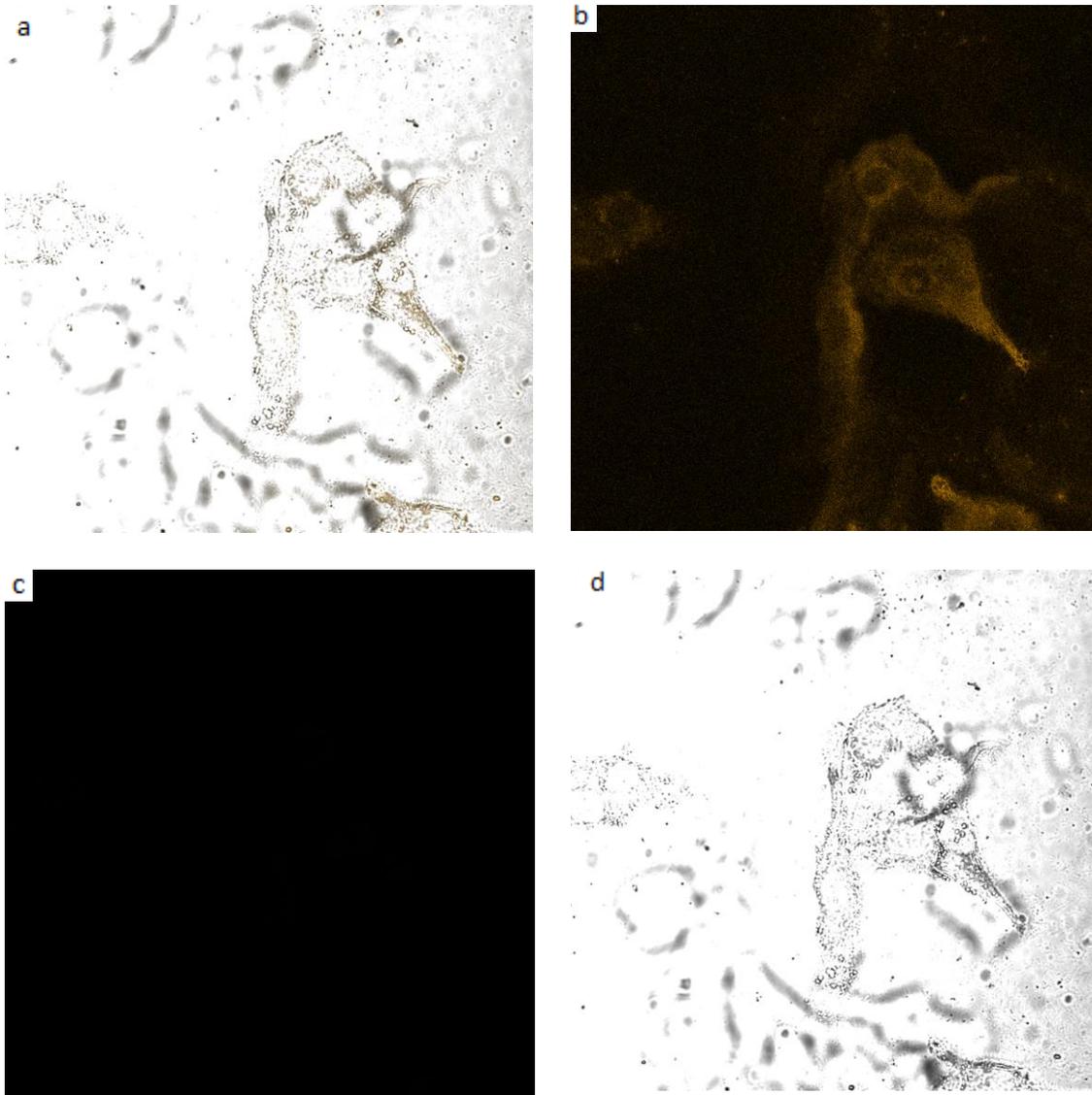
1. Se toman 25 μ l de la suspensión celular que quedó cuando se tripsinizaron las células. Se toman también 50 μ l de azul de tripano y se mezclan en un tubo eppendorf.
2. Se toman 20 microlitros y se montan en la cámara de Neubauer y se realiza el conteo en los 4 cuadrantes de las esquinas.

Anexo 5. Internalización de nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-4} M$ en células ARPE.



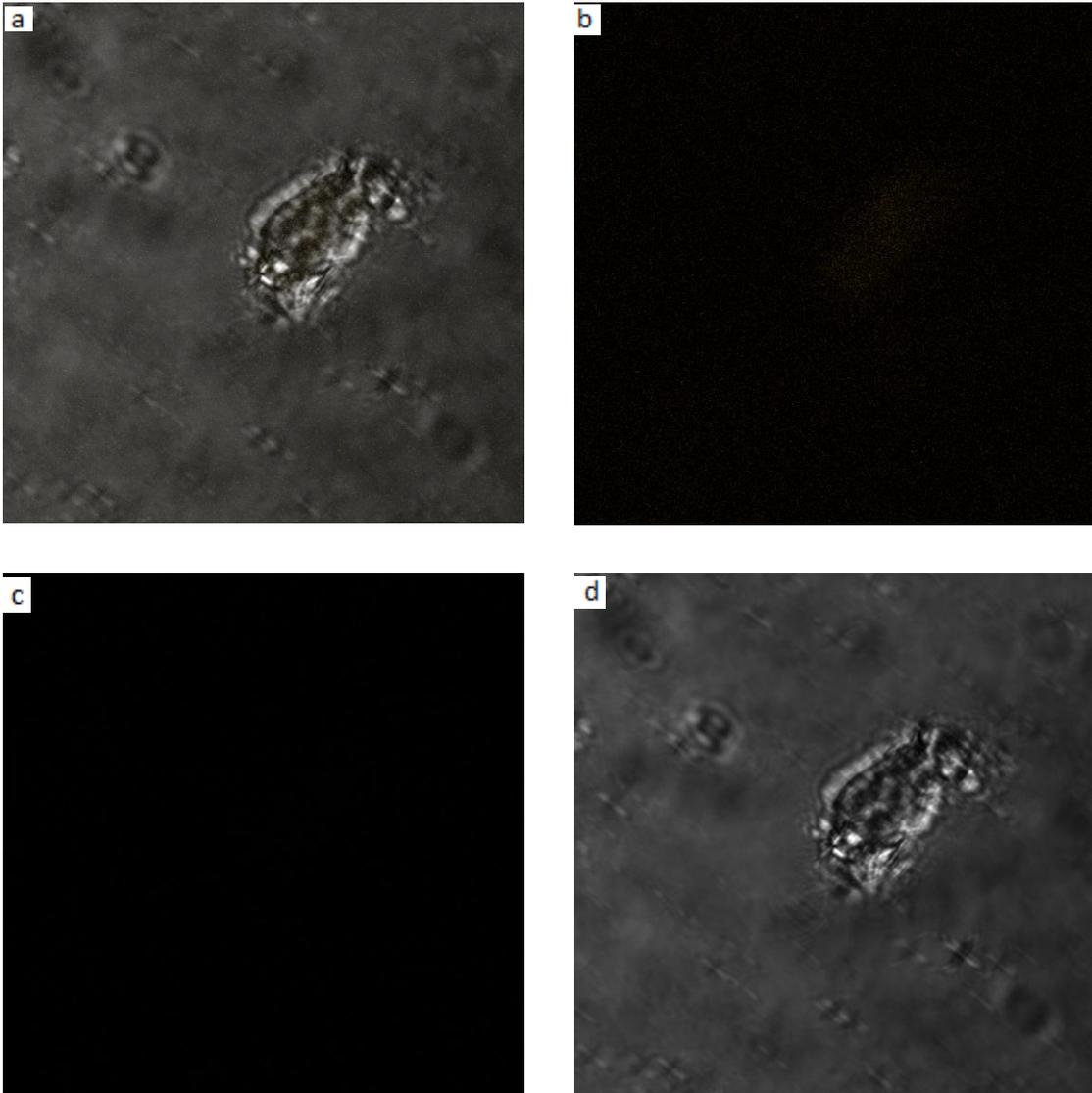
Internalización de las nanopartículas Au $1 \times 10^{-4} M$ en células HeLa. a) Au $1 \times 10^{-4} M$ en todos los canales, b) Au $1 \times 10^{-4} M$ 561 nm, c) Au $1 \times 10^{-4} M$ 488 nm y d) Au $1 \times 10^{-4} M$ 640 nm. Nikon Eclipse Ti, Universidad de Sonora, departamento de Física. Aumento 20X.

Anexo 6. Internalización de nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células ARPE.



Internalización de las nanopartículas Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células HeLa. a) Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en todos los canales, b) Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 561 nm, c) Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 488 nm y d) Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 640 nm. Nikon Eclipse Ti, Universidad de Sonora, departamento de Física. Aumento 20X.

Anexo 7. Internalización de nanopartículas de plata en concentración $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células ARPE.



Internalización de las nanopartículas Au-Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en células HeLa. a) Au-Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ en todos los canales, b) Au-Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 561 nm, c) Au-Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 488 nm y d) Au-Ag $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 640 nm. Nikon Eclipse Ti, Universidad de Sonora, departamento de Física. Aumento 20X.