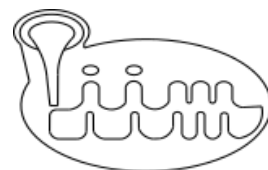




**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN METALURGÍA Y
MATERIALES**

**Síntesis de nanopartículas de oro mediante extracto de nopal
(*Opuntia ficus-indica*) y su funcionalización para su evaluación en la
línea celular linfoide**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

PRESENTA

Ingeniero en Biotecnología Abigail Torres Romero

Asesor

Doctora en Ciencias e Ingeniería de Materiales María Eugenia Contreras García

Co-Asesor.

Doctor en Ciencias Biomédicas Marcos Cajero Juárez.

Morelia, Michoacán; enero del 2015.

RESUMEN

En este trabajo se reporta la biosíntesis, funcionalización y ensayos *in-vitro*, de nanopartículas de oro funcionalizadas. Se trata de una biosíntesis de dos componentes y, posteriormente, la funcionalización de las nanopartículas obtenidas con un fármaco de uso aprobado para el tratamiento de linfomas. El análisis de los resultados de los ensayos realizados en dos líneas celulares linfoides, sugieren que las nanopartículas funcionalizadas fungen el papel de nanotransportadores del fármaco.

Los precursores utilizados en la biosíntesis fueron: extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) y ácido tetracloroaúrico. El extracto de nopal es el encargado de dotar, en el proceso de biosíntesis, los compuestos necesarios para la reducción y estabilización de las nanopartículas. Así como de agentes inhibidores de la aglomeración y agentes de superficie que determinaron la morfología de las nanopartículas obtenidas.

El antineoplásico seleccionado para la funcionalización de las nanopartículas fue la 6-mercaptopurina, que ha sido empleado eficazmente en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda. Sin embargo, este fármaco no presenta actividad diferenciada, lo que da lugar a la bioacumulación. Ha sido reportado en el pasado que es posible anclar moléculas base purina a nanopartículas de oro. La conjugación de las nanopartículas de oro a la 6-mercaptopurina, permite que puedan emplearse como nanotransportadores, con lo que se presume es posible disminuir la bioacumulación.

La caracterización de los productos de síntesis y funcionalización, se llevó a cabo mediante las técnicas de espectroscopía de ultravioleta-visible e infrarrojo, microscopía electrónica de transmisión, barrido, y difracción de rayos-X. Los conteos celulares de los resultados de los ensayos biológicos en las líneas celulares linfoides, indicaron que las nanopartículas funcionalizadas son capaces de superar la barrera celular, actuando eficazmente como vehículos del fármaco al interior de la célula e inhibiendo su proliferación. Mientras que las nanopartículas no-funcionalizadas, no presentan actividad citotóxica.

Palabras Clave: Nanopartículas, biosíntesis, funcionalización, bionesayos.

Abstract

In this paper the biosynthesis, functionalization and *in-vitro* assays of functionalized gold nanoparticles are reported. After the one-pot synthesis, the obtained gold nanoparticles were functionalized with a drug approved for the treatment of lymphomas. The results of the tests conducted on two lymphoid-cell lines, suggest that the functionalized nanoparticles act as drug-nanocarriers.

Extract of *Opuntia ficus-indica* and tetrachloroauric acid were used as precursors in the process of biosynthesis. The results obtained suggest that compounds present in *Opuntia ficus-indica* are held responsible for the reduction and stabilization of the nanoparticles, as well as agglomeration inhibition agents and surfactants which determined the final morphology of the nanoparticles observed.

6-mercaptopurine is widely used in the treatment of acute lymphocytic leukemia. However, this drug does not present differentiated activity, leading to bioaccumulation. It has been reported in the past that it is possible to anchor purine based molecules on gold nanoparticles. The conjugation of 6-mercaptopurine on gold nanoparticles, allows them to be used as nanocarriers, with which is possible to decrease bioaccumulation.

The characterization of the products of biosynthesis and functionalization were carried out by: infrared and UV-visible spectroscopy, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and X-ray diffraction. The cell counts from the biological tests on lymphoid-cell indicated that the functionalized nanoparticles were able to overcome the cell-barrier, effectively acting as drug carriers within the cell, inhibiting their proliferation. And, non-functionalized nanoparticles, do not exhibit cytotoxic activity.

Keywords: Nanoparticles, biosynthesis, functionalization, bioassays.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
Abstract.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos particulares.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 HIPÓTESIS	4
2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.....	6
2.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	6
2.2 ORO METÁLICO.....	6
2.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	8
2.3.1 Procesos de internalización celular.....	10
2.3.2 Biocompatibilidad de las nanopartículas de oro.....	10
2.3.3 Aplicación de las nanopartículas de oro en terapias contra el cáncer.....	11
2.3.4 Funcionalización de nanopartículas de oro con 6-Mercaptopurina.....	12
2.3.5 Evaluación de citotoxicidad <i>in vitro</i> de nanopartículas funcionalizadas.....	15
2.4 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOMATERIALES.....	16
2.4.1 Métodos biológicos en la síntesis de nanopartículas.....	18
2.4.2 Importancia de los compuestos químicos en las plantas.....	20
2.4.3 Síntesis de nanopartículas mediada por plantas.....	21
2.4.4 Síntesis de nanopartículas de oro por medio de plantas.....	22
2.4.5 EL NOPAL (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	28
a) Composición química general de las pencas de nopal.....	28

2.4.6	Uso del nopal como agente reductor.	29
2.4.7	Ácido ascórbico.	31
2.4.8	Ácido ascórbico como pro-oxidante.	32
2.4.9	Condiciones de pH.	32
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
3.1	BIOSÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	34
3.1.1	Obtención del extracto de nopal.	34
a.	Caracterización del extracto de nopal por espectroscopía de energía dispersada..	36
b.	Cuantificación del ácido ascórbico.	37
3.1.2	Síntesis de las nanopartículas de oro.	37
3.1.3	Caracterización de las nanopartículas de oro.	38
3.2	FUNCIONALIZACIÓN.....	39
3.2.1	Funcionalización de las nanopartículas de oro.	39
a.	Conjugación de la 6-Mercaptopurina a las nanopartículas de oro.	39
b.	Limpieza de las nanopartículas conjugadas.	40
3.2.2	Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas.	40
3.3	BIOENSAYOS.	41
a.	Bioensayos.	41
b.	Cultivo celular.....	41
c.	Determinación de la curva de crecimiento de las células Jurkat y RPMI.....	42
3.3.1	Ensayos de viabilidad celular.	43
4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	45
4.1	BIOSÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	45
4.1.1	Obtención del extracto por pulverización.....	45
4.1.2	Caracterización del extracto por microscopía electrónica de barrido.....	45
4.1.3	Cuantificación del ácido ascórbico en el extracto pulverizado de nopal.....	47
4.1.4	Síntesis de las nanopartículas de oro.	47
4.1.5	Caracterización de las nanopartículas de oro.	48
a.	Espectroscopia Ultravioleta-visible.	48
b.	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	49

c.	Microscopía electrónica de transmisión.	50
d.	Caracterización por difracción de Rayos-X.	58
4.2	FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.	59
4.2.1	Conjugación de la 6-Mercaptopurina a nanopartículas de oro.	59
4.2.2	Limpieza de las nanopartículas conjugadas.	60
4.2.3	Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas.	60
a.	Espectroscopía Ultravioleta-visible.	60
b.	Microscopía electrónica de barrido.	61
c.	Microscopía electrónica de transmisión.	64
d.	Espectroscopia de Infrarrojo.	67
4.3	EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO NANOTRASPORTADORES DE ANTINEOPLÁSICOS.	72
4.3.1	Determinación de la curva de crecimiento de las células Jurkat y RPMI	72
4.3.2	Estudios de viabilidad celular.	74
5.	CONCLUSIONES.	78
	Anexo I.	79
6.	BIBLIOGRAFÍA.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Materiales clasificados como tóxicos.....	18
Tabla 2.2. Metabolitos secundarios involucrados en la síntesis de nanopartículas.....	21
Tabla 2.3. Nanopartículas de oro sintetizadas utilizando ingredientes botánicos	28
Tabla 2.4. Composición química del nopal	29
Tabla 3.1. Métodos de separación de los principios activos del Nopal.....	34
Tabla 3.2. Tratamiento de separación para obtención del extracto de nopal.....	36
Tabla 3.3. Procedimientos de caracterización de las nanopartículas.....	38
Tabla 3.4. Variables operativas utilizadas en el análisis de DRX.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Contracción relativista del orbital 6s.....	7
Figura 2.2. Vías de internalización celular.....	10
Figura 2.3. Estructura de la 6-mercaptopurina.....	12
Figura 2.4. Espectro UV-vis de la 6Mp y NPsAu.....	13
Figura 2.5. Espectro de IR-TF de la 6Mp y NPsAu.....	14
Figura 2.6. Espectro de IR-TF del complejo 6Mp-NPsAu.....	15
Figura 2.7. Citotoxicidad de 6Mp, NPsAu-6Mp en células HEp-2.....	16
Figura 2.8. Diagrama general de biosíntesis.....	19
Figura 2.9. Espectro de UV-vis de NPsAu.....	22
Figura 2.10. Patrón de DRX e IR-TF de NPsAu.....	23
Figura 2.11. Imagen de MET de NPsAu.....	24
Figura 2.12. Espectros de UV-vis de la síntesis de nanopartícula.....	25
Figura 2.13. Micrografías de MET de NPsAu.....	25
Figura 2.14. Micrografías de MEB de redes en micro-hilo de oro.....	26
Figura 2.15. Espectro de IR del extracto de la reacción de síntesis.....	27
Figura 2.16. Espectro de absorción de UV-vis de nanopartículas de plata.....	30
Figura 2.17. Espectro de IR-TF de las nanopartículas de plata.....	30
Figura 2.18. Representación de la molécula de ácido ascórbico.....	31
Figura 2.19. Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico.....	31
Figura 2.20. Reacción oxidativa del ácido ascórbico.....	32
Figura 3.1. Diagrama general del desarrollo experimental.....	33
Figura 4.1. Micrografía por MEB y -EED del extracto de nopal.....	46
Figura 4.2. Proceso de síntesis de las nanopartículas de oro.....	47

Figura 4.3. Espectro de UV-vis de la suspensión de NPsAu.....	48
Figura 4.4. Imágenes de MEB de la suspensión coloidal y -EED.....	49
Figura 4.5. Imágenes de MET a una magnificación de 50,000X.....	51
Figura 4.6. Micrografías de MET y estadística descriptiva.....	53
Figura 4.7. Micrografía de MET e imagen de falso color	54
Figura 4.8. Imágenes de MET e imágenes de superficie en falso color.	55
Figura 4.9. Micrografías de alta resolución y TRF de nanopartículas	56
Figura 4.10. Imágenes de alta resolución de patrones de Moiré.	57
Figura 4.11. Imágenes de alta resolución de NPs con reconstrucción superficial.....	58
Figura 4.12. Patrón de difracción de la suspensión de las partículas.	59
Figura 4.13. Imagen del proceso de conjugación con 6Mp.....	60
Figura 4.14. Espectro de UV-vis de la suspensión de 6Mp-NPsAu.....	61
Figura 4.15. Micrografías de MEB de la suspensión de 6Mp-NPsAu.	62
Figura 4.16. Micrografías de MEB de las NPsAu conjugadas a la 6Mp y -EDD	63
Figura 4.17. Imágenes de MET a una magnificación de 12,000X y -EDD	64
Figura 4.18. Micrografías de TEM y estadística descriptiva.....	66
Figura 4.19. Imágenes de MET e imágenes de superficie en falso color.	67
Figura 4.20. Espectros de infrarrojo de 6Mp y 6Mp-NPsAu.	68
Figura 4.21. Periodo de división celular de RPMI y Jurkat.	73
Figura 4.22. Tratamiento en células RPMI y Jurkat con 6Mp	75
Figura 4.23. Viabilidad de células Jurkat y RPMI.....	77

1. INTRODUCCIÓN

En el Sistema Internacional de Unidades el prefijo *nano*, del griego *vávoç*, y que significa ‘enano’, se usa para designar la mil-millonésima parte de una magnitud (10^{-9}) y fue adoptado de manera oficial en 1960 [1]. La escala nanoscópica, o nanodimensional, se refiere usualmente a estructuras con una escala de longitud aplicable en la nanotecnología, aceptada como entre 1 a 100 nm. La escala nanoscópica indica usualmente el punto donde las propiedades de un material cambian. Por arriba de este punto, las propiedades están determinadas por los efectos de ‘volumen’ o ‘a granel’; por ejemplo, los átomos presentes y su proporción relativa, el tipo de enlace, etc*. Por debajo de la escala nanoscópica, mientras que el tipo de átomos y su orientación relativa sigue siendo importante, los *efectos de área superficial* se hacen más aparentes. Estos efectos, se deben en sí a la geometría del material (que tan grueso es, que tan ancho es, etc.) y que, a estas dimensiones tan pequeñas, pueden tener un efecto significativo en los estados cuantizados, y así, en las propiedades del material. Una clasificación de las estructuras nanoscópicas, es por el número de dimensiones de longitud fuera del orden nanodimensional. Así, una nanopartícula es un objeto 0d-nanodimensional. Y como se ha dicho, sus propiedades, o más bien, de un conjunto o *ensemble* de ellas, van a depender de tres características principales:

- 1.- El material del que están compuestas,
- 2.- La distribución de tamaños y,
- 3.- La morfología de las nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas de metales nobles, ha cobrado gran importancia hoy en día debido a sus múltiples aplicaciones, abarcando campos casi de cualquier índole. Como por ejemplo los médicos, tecnológicos o medio ambientales [2].

En la actualidad, han surgido diversos métodos para la síntesis de estos materiales con un control sobre su forma y tamaño, lo suficientemente aceptables para ser empleadas en diversas aplicaciones. Sin embargo, la mayoría de los métodos de síntesis son costosos y/o

* Lo que usualmente es conocido como “el triángulo de la ciencia de materiales”, composición-enlace-estructura = propiedades.

agresivos con el medio ambiente, por lo que se han investigado nuevas rutas de síntesis, por ejemplo, las biológicas [3].

Los métodos de síntesis biológicos (biosíntesis) involucran microorganismos y plantas *in vivo* o bien su biomasa. Siendo la biomasa vegetal (o en su caso un extracto de ella) la que ha presentado mayor eficiencia en la producción de nanopartículas metálicas. Esto debido, a la capacidad que tienen de reducir iones metálicos en solución acuosa; ofreciendo además, una serie de ventajas en comparación con los métodos convencionales de síntesis, destacando la obtención de productos inertes y la disminución tanto en el empleo de productos químicos, como en la generación de residuos tóxicos [4].

Siguiendo esta línea de investigación, en el presente trabajo se describe un método simple y libre de productos tóxicos para la síntesis de nanopartículas de oro. Utilizando el extracto de nopal como agente reductor y estabilizante, y al ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) como precursor. Así mismo, se llevó a cabo la conjugación del fármaco 6-mercaptopurina a las nanopartículas obtenidas y se evaluó su actividad como nanotransportadores al interior de células linfoides.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Llevar a cabo la biosíntesis de nanopartículas de oro por el método de reducción química, su funcionalización, y probar *in vitro* su efecto biostático en células linfoides humanas.

1.1.2 Objetivos particulares

1. Obtener un extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) mediante secado por pulverizado, capaz de mantener sus principios activos estables.
2. Obtener una suspensión de nanopartículas de oro mediante la reacción de biosíntesis entre el extracto de nopal y el ácido tetracloroáurico.
3. Realizar la funcionalización de las nanopartículas de oro con un fármaco de actividad anticancerígena probada.
4. Probar la efectividad del complejo nanopartícula de oro funcionalizadas a 6-mercaptopurina mediante pruebas celulares *in vitro*, para determinar su actividad como nanotransportador de fármaco.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, las nanopartículas de oro han despertado un gran interés en el campo de la biomedicina, particularmente en la técnica de imagen diagnóstica y tratamiento de enfermedades. Sin embargo, el uso de productos químicos peligrosos en los métodos convencionales de síntesis, limita la aplicación de las nanopartículas en este campo, debido a las impurezas que suelen depositarse en la superficie de las mismas. Además, de acuerdo al proceso químico, se pueden generar subproductos de síntesis que son nocivos al entorno ecológico. Debido a esta situación, se ha optado por probar diversos mecanismos biológicos de síntesis, que reduzcan y/o eliminen las impurezas causantes de la toxicidad en los materiales resultantes, a través de la aplicación de reactivos biocompatibles y amigables con el ambiente.

Mucho se ha abundado acerca de los métodos de síntesis con plantas y microorganismos vivos, principalmente de nanopartículas de oro y plata. De hecho, el primer reporte que puede considerarse como ‘síntesis biológica’, es acerca de nanopartículas de oro en plántulas de alfalfa, y data del año 2002. A partir de aquí, se han logrado con éxito

biosíntesis de nanoestructuras con una multitud de plantas y microorganismos. Donde se ha observado que la riqueza en compuestos químicos, en particular de material vegetal, es capaz de lograr una variedad de formas y distribuciones de tamaño de nanopartículas. Siendo la mayoría de las veces, biosíntesis de dos componentes. Sin duda alguna, esto es evidencia clara del éxito en la vinculación entre la ciencia de materiales y la biotecnología. Sin embargo, muchos de los trabajos se enfocan preferencialmente a un lado de la balanza – ciencia de materiales o biotecnología–. En este sentido, existen pocos trabajos donde se aborden tanto los aspectos de ciencia de materiales (llámense síntesis, caracterización y funcionalización), como los de biotecnología (ruta de síntesis y ensayos y análisis de pruebas *in vivo*).

De esta manera, en este trabajo se propone realizar biosíntesis con extracto de nopal para la obtención de nanopartículas de oro. Al término del proyecto se espera lograr un impacto en tres ejes de acción:

1.- Científico: (a) Establecer el uso del extracto de nopal mediante secado por aspersión, como un agente reductor alternativo para la biosíntesis de nanopartículas de oro. (b) Contribuir al conocimiento, al proponer a los compuestos orgánicos responsables de la biosíntesis, a partir de la caracterización estructural y química.

2.- Social: La efectividad de las nanopartículas como vectores de los antineoplásicos, permite mitigar los efectos de bioacumulación, lo que repercute directamente en la calidad de vida de los pacientes sometidos a estos tratamientos.

3.- Ecológico: el método de biosíntesis aquí propuesto, evita la utilización de materiales considerados como tóxicos por la Norma Oficial Mexicana NOM-114-STPS-1994.

1.3 HIPÓTESIS

Los extractos vegetales son utilizados en la síntesis de nanomateriales por su contenido de metabolitos secundarios, que juegan un papel importante en la reducción de iones metálicos. Así mismo, se conoce que las nanopartículas de metales nobles pueden ser modificadas, mediante su funcionalización, con múltiples fármacos con la finalidad de obtener nanosistemas apropiados para distintas aplicaciones terapéuticas.

Por lo que, al llevar a cabo la reacción de biosíntesis con extracto de *Opuntia ficus-indica* y el precursor ácido tetracloroáurico. El ácido ascórbico y/o metabolitos secundarios del extracto vegetal, actuarán como agentes reductores precipitando nanopartículas de oro. Que al ser funcionalizadas con el fármaco 6-mercaptopurina, permitirán probar que son capaces de tener una acción biostática, mediante las pruebas *in vitro* de acuerdo con el modelo celular propuesto en células linfoides humanas.

2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.

2.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

Las nanopartículas metálicas se pueden definir como nanoestructuras cero-dimensionales, las cuales presentan propiedades físicas y químicas específicas que difieren en forma considerable de su análogo metálico (*bulk*). Estas propiedades están determinadas principalmente por la gran relación volumen/área superficial y la morfología del material, así mismo, dependen enormemente de su tamaño y forma [5].

Evidentemente, no es posible observar a las nanopartículas con las técnicas convencionales de microscopía óptica, empero, un parámetro óptico importante de las nanopartículas metálicas son los plasmones de superficie (PS), definidos como oscilaciones colectivas de los electrones libres en la banda de conducción, que ocupan los estados de energía inmediatamente por encima del nivel de energía de Fermi [6]. La longitud de onda o color a la que se obtiene dicha resonancia se le conoce como banda de absorción o resonancia plasmónica, y depende tanto del tamaño como de la forma de las nanopartículas, y es lo que da lugar a las diferentes coloraciones de las dispersiones que las contienen [7]. De esta manera, una fuerte evidencia de la obtención de nanopartículas en suspensión, es el cambio o viraje de coloración durante la reacción de síntesis.

2.2 ORO METÁLICO.

El oro fue el primer metal descubierto y utilizado por el hombre en la antigüedad, esto es resultado de cuatro atributos únicos que posee: un brillo metálico amarillo característico, excelente resistencia a la corrosión, considerable maleabilidad y, alta densidad (19.32 g/cm³). La razón detrás de este interesante conjunto de propiedades reside en su especial configuración electrónica. Su alta resistencia a la corrosión es consecuencia de que su primer potencial de ionización es de 9.2eV, que es alto comparado con la plata y el cobre (7.6 y 7.7eV, respectivamente) [8]. Esto da como resultado una extensa barrera a la oxidación, de manera que el oro elemental se encuentra de manera ordinaria libre de óxido en la naturaleza.

Al ser un elemento del sexto periodo, se cumple que su comportamiento difiere de los metales de su grupo de períodos anteriores (Cu y Ag). Para explicar estos fenómenos diferenciales es necesario recurrir a los efectos relativistas. En los elementos pesados, los electrones internos sienten la gran carga nuclear y, para mantener el equilibrio con el intenso

campo electrostático creado, deben alcanzar velocidades próximas a las de la luz. Los efectos relativistas se hacen significativos para elementos con número atómico mayor de 50 (a partir del Sn). La velocidad de los electrones aumenta con Z^2 , por lo que para el oro ($Z=79$) poseen una velocidad que es 58% de la velocidad de la luz, lo que hace que su masa aparente se incremente en un 20%. El aumento de masa de los electrones internos hace que el orbital 1s se contraiga y, para cumplir la condición de ortonormalidad, el resto de orbitales tipo s también se contraen. En la Figura 2.1 se muestra la contracción relativista del orbital 6s en función del número atómico. El oro ocupa el valor mínimo en esta gráfica, siendo su orbital 6s el que muestra una mayor contracción. Este efecto es una de las causas de las peculiares propiedades del oro. En menor medida también se ven afectados los orbitales p que también se contraen. Los orbitales d y f por el contrario se expanden. Esta estabilización energética de los orbitales s y p, y desestabilización de los orbitales d y f se acompaña por un desdoblamiento energético de los orbitales con momento angular L mayor que cero debido a un acoplamiento *spin-orbital* [9].

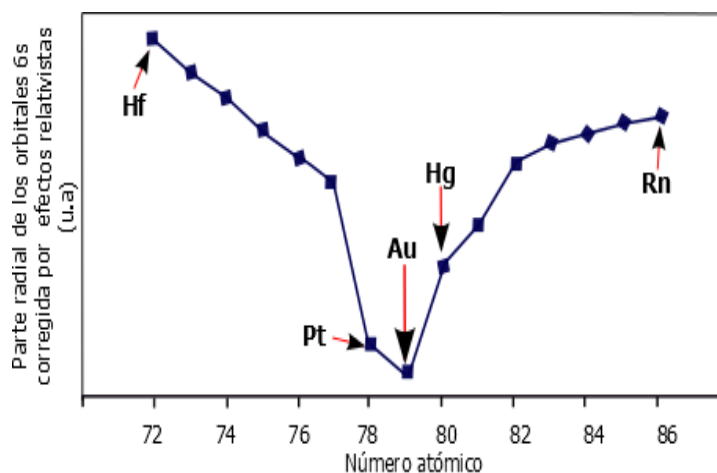


Figura 2.1. Contracción relativista del orbital 6s en función del número atómico (Z) [9].

En su presentación metálica a granel, el oro exhibe una estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc), misma que comparte con otros metales dúctiles como el aluminio, plata, níquel, platino y cobre. Los tres planos de alta simetría del oro experimentan reconstrucción de superficie cuando se encuentran libres de contaminación. Esto es inusual, ya que en otros metales fcc, mientras que las superficies (110) y (100) pueden reconstruirse, la (111) no puede hacerlo. Esta anomalía del oro se ha atribuido también a efectos relativistas [10]. La

estructura fcc del oro tiene una multiplicidad de planos densamente empaquetados en los que puede ocurrir deslizamiento, haciéndolo intrínsecamente más dúctil que otras estructuras cristalinas, como la bcc, del hierro y tungsteno, o la hcp, del magnesio y zinc. Sin embargo, la estructura fcc no es la estructura más estable del oro a escalas menores a 10 nm, por el contrario, partículas menores a este tamaño, prefieren estructuras icosaedrales, decaedrales o fcc con defectos cristalinos [11].

El intenso color amarillo del oro a granel, es debido al límite de banda bien definido alrededor de 2.4eV [12] (que corresponde aprox. a 500nm o luz color verde). El límite de banda, es la energía a la cual las transiciones inter-bandas de estados ocupados a estados desocupados son permitidas. En el oro, el límite de banda es causado por la combinación de las transiciones híbridas 5d y 6sp en la vecindad de los puntos X y L de las zonas de Brillouin [13]. La energía de estas transiciones es baja, si se les compara con las de la plata (4 eV [14]), debido a la contracción de los orbitales s y p por efectos relativistas, y la desestabilización correspondiente de las capas d y f. Los cálculos de las transiciones interbandas del oro, despreciando efectos relativistas, colocan el límite de banda a aproximadamente 4 eV [15]. El inicio de las transiciones a 500nm provoca que en el oro, la parte real de la permitividad eléctrica fluctúe alrededor de -1 en la región de 2.5-5.0 eV (250 a 500nm). Esto se refleja directamente en la “cola” de la resonancia del plasmón, que es visible en las nanopartículas de oro en la zona de longitudes de onda cortas de la resonancia, particularmente en el vacío, donde estas características no están enmascaradas por solventes o efectos de superficie [16]. Este fenómeno provoca también que, la reflectividad en el oro a granel, tenga un incremento agudo del 35% a 500nm al 95% a 600nm. De manera que su superficie refleja entonces el rojo, naranja, amarillo y algo de verde, pero absorbe las partes del verde/azul al violeta del espectro.

2.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO.

Las propiedades científicas y tecnológicas de las nanopartículas de oro (NPsAu) y nanorecubrimientos de oro, han sido abundantemente estudiadas en la década pasada. Comparado con el cobre, la plata, el hierro o el aluminio; el oro posee un conjunto de propiedades que lo hacen único en su presentación nanodimensional.

La primera razón, y quizá la más importante, es que el oro es uno de los pocos elementos metálicos que puede prepararse en una forma metálica estable, con características de nanoescala, bajo la presión ambiental de oxígeno. Otros metales, con la posible excepción del platino, se oxidan a menos que cuenten con una protección especial. Debido a que las superficies oxidadas pueden crecer hasta varios micrómetros de espesor antes de auto-pasivarse, su presencia destruirá cualquier característica o forma de nanoescala. Esto es cierto incluso para algunos metales considerados como relativamente nobles. Las nanopartículas desnudas de plata por ejemplo, solo sobreviven en el aire por algunas horas. La segunda razón es debida a las propiedades químicas. El oro es suficientemente noble para no oxidarse en condiciones atmosféricas, pero sin embargo, puede ligarse selectivamente a moléculas orgánicas con terminales de azufre. Esto permite la explotación de la superficie del oro en la nanoescala, como una plataforma en la cual se pueden ensamblar todo tipo de estructuras moleculares. En particular, el concepto de monocapas auto-ensambladas sobre oro ha recibido bastante atención [17].

Las propiedades ópticas del oro son también una razón de su especial importancia como nanomaterial, en particular, la resonancia del plasmón superficial (RPS) que las NPsAu exhiben con la luz. Esto provoca que la sección transversal de la extinción óptica de la nanopartícula, exceda considerablemente su sección transversal geométrica. En este sentido el oro no es único, ya que el mismo efecto se observa en otros metales como la plata y el cobre, los metales alcalinos (Li, Na, K, Cs), y el aluminio [16]. Pero, debe tomarse en cuenta qué, la producción y retención de nanopartículas de los elementos antes mencionados es desafiante dada su reactividad, y en este sentido, el oro se ve favorecido. A pesar de que el platino presenta una *nobilidad* equivalente a la del oro, no exhibe una fuerte respuesta óptica, lo que limita sus aplicaciones.

La implementación de las NPsAu en aplicaciones médicas *in vivo*, depende de la caracterización de sus efectos en los sistemas biológicos. En general, los estudios que han utilizado nanopartículas de oro han revelado que cualquier citotoxicidad que puedan tener es debido a especies, usualmente surfactantes o ligandos de recubrimiento, absorbidos en su superficie. Existe una amplia (pero no completa) aceptación de que las nanopartículas de oro son inertes. Por ejemplo, en el caso de nanorodillos de oro, el surfactante de forma C₁₆TAB es un conocido agente de lisis celular [18]. Y por lo tanto, el pretratamiento de los

nanorodillos para remover el exceso de C₁₆TAB es requerido [19]. En contraste, nanorodillos recubiertos de C₁₆TAB mostraron una baja toxicidad [20-23], pero, al usar esquemas de recubrimiento por polímeros capa a capa, la toxicidad puede reducirse aún más, y las propiedades de superficie diseñarse para producir una internalización celular selectiva. Se ha reportado también que las nano-corazas de oro, muestran baja toxicidad en una gama de líneas celulares [24].

2.3.1 Procesos de internalización celular.

La *endocitosis*, es un proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas a su interior. En este proceso, conocido como *invaginación*, las partículas son englobadas por la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. Cuando se da lugar a la captura de partículas se llama a este proceso *fagocitosis*, y cuando solamente son capturadas porciones de líquido, se le denomina *pinocitosis*. La pinocitosis atrapa sustancias de forma indiscriminada, mientras que existe un mecanismo de *endocitosis mediada por receptores* donde solo aquellas moléculas que se unen a dicho receptor son internalizadas a la célula, ver Figura 2.2. [25].

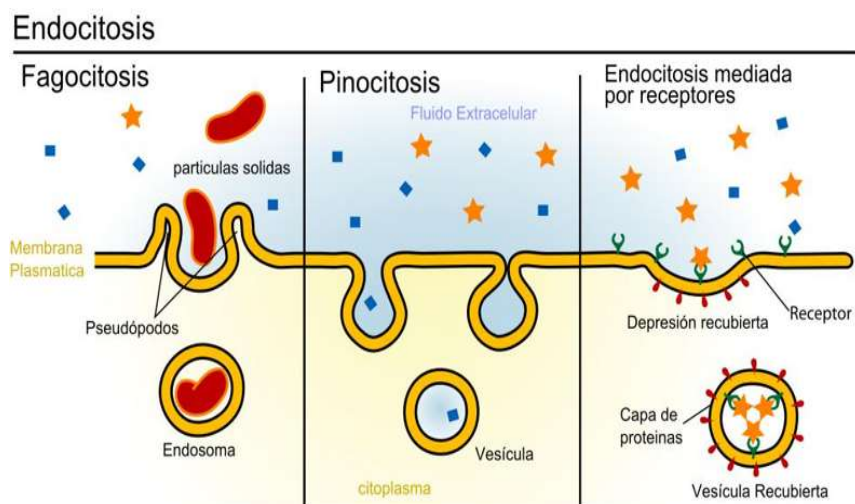


Figura 2.2. Vías de internalización celular [25].

2.3.2 Biocompatibilidad de las nanopartículas de oro.

Se ha encontrado que las nanopartículas de oro son no-citotóxicas y no-inmunogénicas [19], esto ha sido confirmado a través de diversos estudios, por ejemplo, Shukla y col. [26], al evaluar la citotoxicidad e inmunogenicidad *in vitro*, de NPsAu en células macrofágicas

RAW264.7, encontraron que no dan lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL1-b, siendo además internalizadas por los cuerpos lisosomales dispuestos en forma perinuclear.

En otro estudio, Sadauskas y col. [27], a través de ensayos *in vivo* evaluaron la biodistribución de NPsAu en ratones. Para ello, se les inyectaron NPsAu con tamaños de 2 y 4 nm vía intravenosa, y de 3 nm vía peritoneal. Los tiempos de rastreo fueron 1, 4 y 24 h. Los resultados revelaron que las NPsAu son captadas en cierta medida por la membrana celular vía endocitosis. Además, independientemente de su tamaño, son internalizadas principalmente por las células *Kupffer* en el hígado y, en menor medida, por los macrófagos existentes en otros órganos como el bazo, y no parecen atravesar la barrera placentaria ni la barrera que protege el cerebro.

2.3.3 Aplicación de las nanopartículas de oro en terapias contra el cáncer.

Los tratamientos tradicionales de quimioterapia contra el cáncer consisten en la inoculación de un antineoplásico, o una combinación de ellos, en un régimen de tratamiento estandarizado. Los agentes de quimioterapia más comunes actúan destruyendo las células que se dividen rápidamente, que es una de las características principales de las células de cáncer. Sin embargo, esto conlleva a una seria limitación de este tipo de tratamientos, debido a la reducida especificidad de los agentes quimioterapéuticos. Ya que los antineoplásicos pueden también dañar células que se dividen rápidamente bajo circunstancias normales como las células óseas, del tracto digestivo, y folículo piloso. Esto, resulta en efectos secundarios indeseables que son comunes a este tipo de terapias; algunos ejemplos son: la mielosupresión (y por lo tanto inmunosupresión), mucositis y alopecia. Aquí es donde entran en escena las nanopartículas de oro, ya que pueden conjugarse a moléculas específicas que ayuden a dirigir las a dianas (células) específicas para controlar su acción. Es decir, en un tipo de endocitosis selectiva, llamado también vectorización pasiva. Un ejemplo de ello, es el uso de péptidos como Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, que reconocen integrinas de la superficie celular de células tumorales [28]. También es posible conseguir una vectorización pasiva hacia células tumorales, al funcionalizar nanopartículas con polietilenglicol, con lo que se logra aumentar el tiempo de vida media en el torrente sanguíneo, mejorando tanto la permeabilidad como la retención del fármaco en el tumor [29]. En este trabajo, se estudiará la conjugación

de las NPsAu a un fármaco antineoplásico, 6-mercaptapurina, donde se espera observar, mediante conteos celulares, evidencia de vectorización pasiva en células Jurkat y RPMI.

2.3.4 Funcionalización de nanopartículas de oro con 6-Mercaptopurina.

La 6-Mercaptopurina (6Mp) es un derivado tiolado en la posición 6, de la molécula de purina (Figura 2.1(a)). Su similitud estructural con la base nitrogenada adenina, ha hecho de esta molécula, una de las más utilizadas como antimetabolito en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda humana [30].

La funcionalización de las NPsAu, consiste en la modificación superficial de las nanopartículas por la quimisorción de la 6Mp. La presencia en la molécula del grupo tiol (-SH) en la posición 6, permite la formación de monocapas autoensambladas sobre las superficies metálicas, debido a que la anisotropía y las fuerzas intermoleculares son superiores a las observadas en alcanotioles. Lo que debe favorecer diferentes ordenamientos moleculares. Ante la posibilidad de dichos ordenamientos debe considerarse que la 6MP, al igual que su análogo la adenina, posee la geometría apropiada para producir apilamiento molecular (π - π *stacking* o interacciones de apilamiento entre los anillos de purina); por lo que tienden a alinearse, formando cadenas similares a los polímeros [30-31]. Esto sugiere que las moléculas de 6Mp se unen a la superficie del oro en una estructura densamente empaquetada; llegando a estimarse un área superficial ocupada de $\approx 29 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ [32]. Viudez y col. [32], concluyen que estas moléculas interactúan con la superficie del oro no sólo a través del átomo de azufre (S) en la posición 6, sino también a través del nitrógeno (N) en la posición 7, que corresponde al anillo imidazol (Figura 2.3 (a, b)).

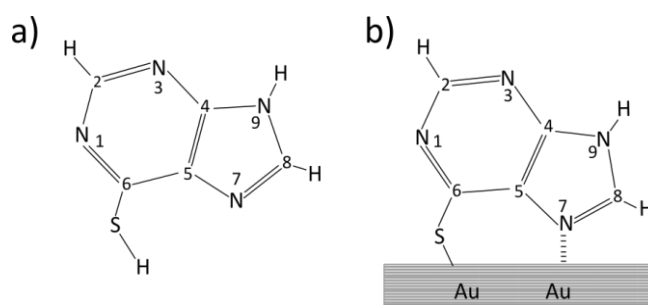


Figura 2.3. a) Estructura de la 6Mp, b) Modo de anclaje de la 6Mp en oro (111) [32].

Selvaraj y col. [33], llevaron a cabo la síntesis, funcionalización y detección analítica de 6MP en nanopartículas de oro. El protocolo empleado consistió en dos etapas, en primer lugar se

sintetizaron nanopartículas de oro mediante reducción de HAuCl_4 con citrato trisódico. La segunda etapa consistió en la funcionalización de las NPsAu ; empleando una relación 1:5 mM de suspensión de NPsAu y 6Mp y bajo agitación constante durante 5 h, tras las cuales la suspensión cambio a un color azul. La caracterización por medio de espectroscopia de UV-vis mostró la presencia de la banda de resonancia del plasmón de las nanopartículas libres, así como la de la 6Mp pura (518 y 320 nm respectivamente).

La Figura 2.4, muestra el espectro de absorción de UV-vis dependiente del tiempo, las curvas 1(a)-1(d) se obtuvieron a intervalos de tiempo de 30 min y la curva 1(e) se registró después de 5h. Se observa la banda de resonancia del plasmón las NPsAu libres, indicada por la flecha hacia abajo. Puede observarse como esta disminuye en intensidad conforme transcurría el tiempo. Es posible observar también (flecha hacia arriba), después de transcurridas 5h, la aparición de una nueva banda a 650 nm. Esta nueva resonancia se asocia a la agregación de las nanopartículas, como resultado del remplazo de los iones citrato por las moléculas de 6Mp y la formación del complejo NPAu-6Mp .

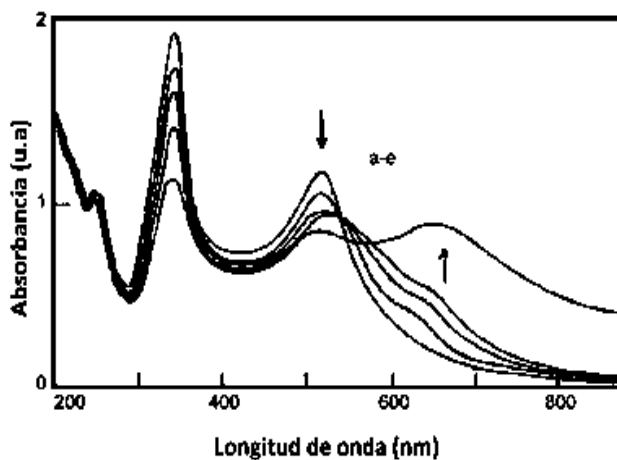


Figura 2.4. Espectro UV-vis dependiente del tiempo de la mezcla de la 6Mp y NPsAu [33].

Adicionalmente, para confirmar la conjugación de la 6Mp a la superficie de las NPsAu , llevaron a cabo un estudio de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF). En el espectro del fármaco libre, Figura 2.5 (a), se pueden apreciar varios grupos funcionales. La banda a 3424 cm^{-1} corresponde al modo de vibración de estiramiento del grupo amina ($-\text{NH}$), la banda sobrepuesta a 1611 cm^{-1} está relacionada al estiramiento del enlace múltiple $\text{C}=\text{C}$ del grupo aromático, y la banda a 1407 cm^{-1} se debe a las vibraciones

del enlace C=N de la amina alifática. Tomando en cuenta que la 6Mp en estado sólido se presenta en forma tautomérica con un grupo C=S, esta resonancia puede observarse a 1275 cm^{-1} . En cuanto al complejo NPAu-6Mp, Figura 2.5 (b), no hubo cambios relativos a las frecuencias de estiramiento de los grupos amina (-NH) o amina alifática (C-N). Lo que sugiere que estos grupos no están involucrados en la unión de la molécula con el oro. En cambio, la banda que corresponde a la vibración de estiramiento del grupo C=S (1275 cm^{-1}) había desaparecido, confirmando la conjugación entre 6Mp y las NPsAu a través del átomo de azufre, dado que es bien sabida la afinidad del oro por los grupos tiol [33].

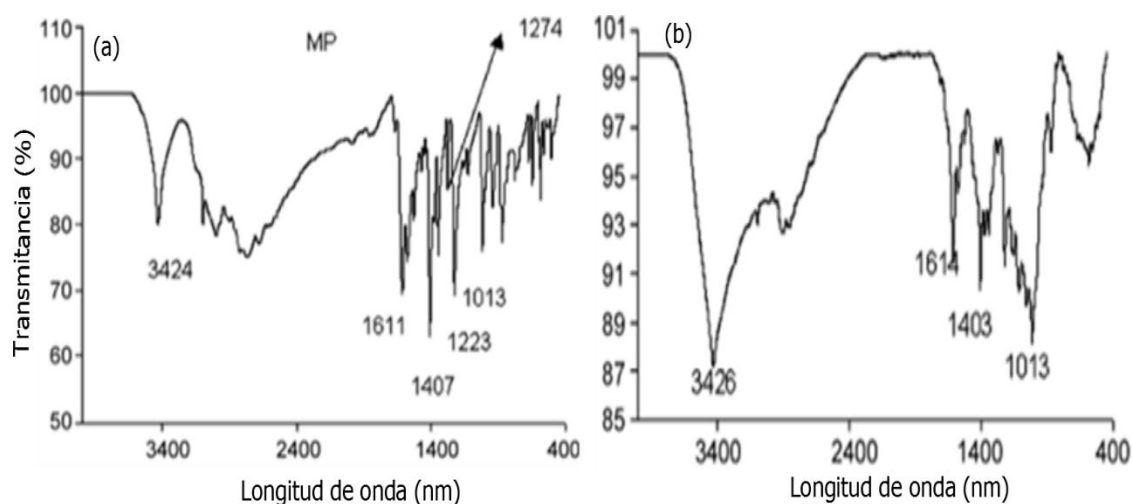


Figura 2.5. (a) Espectro de IR-TF de la 6Mp pura y (b) 6Mp conjugada a las NPsAu [33].

También, en un estudio de funcionalización de NPsAu con 6Mp. Ganeshkumar y col. [34], sintetizaron nanopartículas a partir de HAuCl_4 con agar nutritivo como agente reductor; posteriormente realizaron su funcionalización empleando una relación milimolar 1:10 (NPsAu:6Mp) y agitación por 12 h. Al caracterizar la suspensión a través de IR-FT, Figura 2.6, encontraron que las bandas presentes en 1583 cm^{-1} , correspondiente al anillo heterocíclico con presencia de nitrógeno. La banda a 873 cm^{-1} , asociada a la vibración de deformación del grupo -CH de 6Mp pura, se habían desplazado a 1543 cm^{-1} y 883 cm^{-1} respectivamente. Ante estos resultados sugieren que tales desplazamientos se deben a la interacción del fármaco con las nanopartículas.

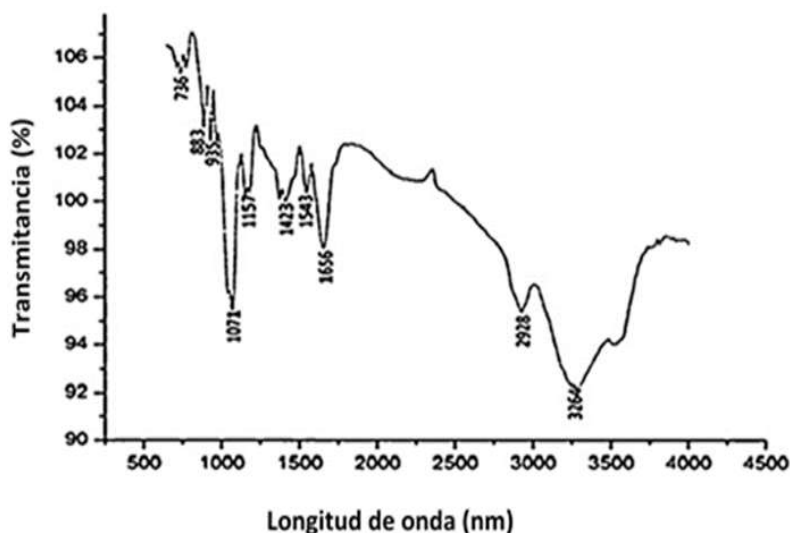


Figura 2.6. Espectro de IR-TF del complejo 6Mp-NPsAu [34]

2.3.5 Evaluación de citotoxicidad *in vitro* de nanopartículas funcionalizadas.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas provocada por un agente exógeno, que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. La inoculación de un agente citotóxico a las células puede derivar en una de las siguientes: Las células pueden manifestar *necrosis*, en la que pierden la integridad de la membrana celular y mueren rápidamente por la pérdida del material intracelular (*lisis celular*). Las células pueden detener la actividad de crecimiento y división (*decremento de la viabilidad celular*). Las células pueden expresar el mecanismo genético de muerte celular programada (*apoptosis*). A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos; utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas [35].

Se considera que un compuesto es citotóxico, independientemente de su mecanismo de acción, si interfiere en el proceso de división y multiplicación celular. Esto se manifiesta en una reducción de la velocidad de crecimiento celular, reflejándose en el número de células presentes en el cultivo. El grado de inhibición del crecimiento, relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa, es un índice de su toxicidad [36].

Ganeshkumar y col. [34], evaluaron la citotoxicidad *in vitro* de las formulaciones 6Mp-NPsAu, NPsAu-6Mp-Fa (ácido fólico) y el fármaco libre (6Mp) en células HEp-2 (línea

celular de cáncer de laringe). En este ensayo, las células fueron expuestas por triplicado a varias concentraciones de las formulaciones, e incubadas a 37 °C por 24 h, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Cabe mencionar que la concentración de 6Mp en toda formulación se ajustó para que fuera la misma que la del fármaco libre.

Derivado de estas pruebas, al evaluar la inhibición del crecimiento celular después de las 24h de incubación, encontraron que las concentración inhibitoria máxima (CI₅₀) del fármaco libre y las formulaciones, fueron 2.5 mg/mL, 0.625 mg/mL y 0.625 mg/mL (inhibición del 54.06%), respectivamente. Con base en estos resultados, reportan que la cantidad de Mp requerida para alcanzar la CI₅₀, fue mucho menor al asociarla a NPsAu que en forma libre. En la Figura 2.7, se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad del fármaco libre, y las formulaciones 6Mp- NPsAu y NPsAu-6Mp-Fa, contra células HEp-2; contrastándose los porcentajes de inhibición celular con el recuento de células viables después de 24 h de incubación. El valor de cada barra representa el promedio de los tres ensayos.

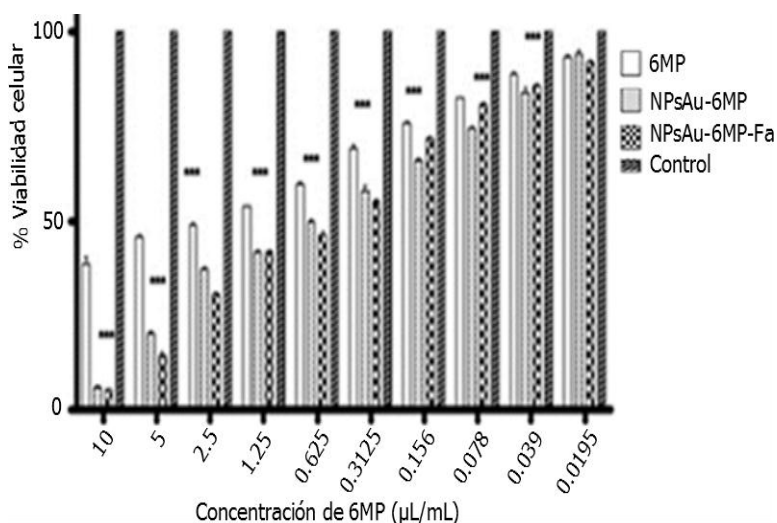


Figura 2.7. Citotoxicidad de 6Mp, 6Mp-NPsAu, NPsAu-6Mp-Fa en células HEp-2 [34].

2.4 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOMATERIALES.

De manera tradicional se han utilizado dos enfoques generales para la síntesis de nanomateriales metálicos. Estos dos, son llamados *top-down* y *bottom-up*. El primero, parte de materiales a granel y busca la reducción de ellos hasta llegar a la nanoescala. Mientras que en el enfoque *bottom-up*, a partir de componentes de tamaño atómico o molecular

(precursores), el control de la reacción de síntesis permite al *auto-ensamblado* dar como resultado la formación de nanoestructuras. No puede decirse en sí que un método sea mejor que el otro. La utilización de uno u otro enfoque dependerá de las características deseadas de la nanoestructura, así como de factores extrínsecos como: rapidez/facilidad de procesamiento, reproducibilidad, factores económicos, etc [35].

La ruta top-down puede considerarse un *método físico* enteramente. Este parte de estructuras macroscópicas, que pueden ser controladas externamente para lograr el adecuado procesamiento de los nanomateriales. Por ejemplo, la litografía y fotolitografía. Por estos métodos es posible obtener objetos nanodimensionados que son altamente reproducibles. Sin embargo, es inherente a la técnica la necesidad de un sustrato o soporte para la “impresión” de las nanoestructuras, visto de otra manera, no es posible obtener nanopartículas aisladas como tales. Otras rutas de procesamiento consisten en la subdivisión de los metales sólidos (*bulk*) por medios mecánicos, y aunque efectivamente permiten la obtención de nanopartículas. El mayor inconveniente que presentan es la imperfección de la estructura en la superficie, debido a que la reducción de tamaño se logra a través de una severa deformación plástica, además de que la distribución de tamaño de partícula es muy amplia. Evidentemente, estas técnicas resultan ser no reproducibles [36].

Los métodos químicos para la obtención de nanomateriales siguen por definición el enfoque bottom-up. Consisten básicamente en la construcción del nanomaterial átomo por átomo, molécula por molécula. Estos procedimientos son más efectivos que los físicos en el sentido de que pueden obtenerse nanopartículas de tamaños menores, y con distribuciones de tamaños más uniformes. En la literatura se han reportado algunos métodos químicos para la preparación de nanopartículas de metales de transición como [37]:

- Reducción química de una sal metálica.
- Descomposición térmica, fotoquímica o sonoquímica de complejos metálicos de valencia baja.
- Reducción y desplazamiento del ligando en compuestos organometálicos.
- Deposición del metal en fase de vapor.

La reducción química de sales de metales de transición en presencia de moléculas estabilizadoras es quizás el método químico más popular para la preparación de nanopartículas metálicas. Las principales ventajas del método de reducción de sal son:

1. Es muy simple y reproducible.
2. Permite preparar nanopartículas a gran escala y con una distribución de tamaño estrecha.
3. La estructura, tamaño y forma de las nanopartículas pueden ser controladas variando simplemente las condiciones de preparación, como son: el tipo de reductor, el contenido de los iones metálicos, la temperatura, la velocidad de agitación, etc.

A pesar de las ventajas que presenta este método, el uso de productos químicos tóxicos limita enormemente sus aplicaciones en la biomedicina, y además genera subproductos contaminantes para el ambiente [38]. En la tabla 2.1, se muestran algunos compuestos ampliamente utilizados en la síntesis de NPs, así como su clasificación de acuerdo con la Asociación Nacional de Protección contra el fuego (NFP: National Fire Protection) y el Sistema de Identificación de Materiales Peligrosos (HMIG: Hazardous Materials Identification System), que los identifica como tóxicos. El sistema consiste en asignar colores y números, y dar una "clasificación" a un producto, manejando una escala del 0 al 4, dependiendo del grado de su peligrosidad [39].

Tabla 2.1. Algunos materiales clasificados como tóxicos, que se utilizan en la síntesis de NPs [39].

Compuesto	Clasificación	
	NFPA	HMIG
Borohidruro de Sodio		H:3, F:4, R:2, P:J
Trifenil fosfina	210-	
9-Borabicyclo[3.3.1]nonano	232W	

En este sentido, surge la necesidad de utilizar tecnologías que reduzcan la aplicación de este tipo de reactivos nocivos en la síntesis de nanopartículas metálicas. Siendo los métodos biológicos, que involucran el empleo de microorganismos o extractos de plantas, una alternativa viable [40-41].

2.4.1 Métodos biológicos en la síntesis de nanopartículas.

Los métodos de biosíntesis adoptan el enfoque bottom-up, donde un sistema biológico, o partes de él, aportan algunos de los principios activos necesarios para la síntesis de las nanopartículas. El caso deseado es cuando el componente biológico es capaz de aportar todas

las sustancias necesarias para la síntesis y estabilización de las nanopartículas, es decir, se puede lograr una síntesis de dos componentes y un solo paso. Aplicar la ruta biológica obedece principalmente a la tolerancia que ofrecen estos sistemas al metal, así como por la simplicidad, relativa reproducibilidad, y también, a menudo se obtienen materiales con mayor estabilidad [41]. En la Figura 2.8 se explica de manera general la aplicación de la biosíntesis de nanomateriales [42].

Los sistemas biológicos empleados en esta ruta van desde microorganismos: bacterias, hongos o actinomicetos; hasta plantas. Cuando se realiza síntesis mediada por plantas, se tiene la ventaja de puede lograrse un protocolo de síntesis un solo paso. Además, las plantas son de fácil disposición, seguras de manejar y poseen una amplia variedad de metabolitos secundarios, que pueden ayudar en la reducción de iones. En cambio, los microorganismos pueden sufrir mutaciones durante el proceso, y perder su capacidad de sintetizar nanopartículas. Adicionalmente, su preservación y mantenimiento resulta ser muy laboriosa y costosa [43].

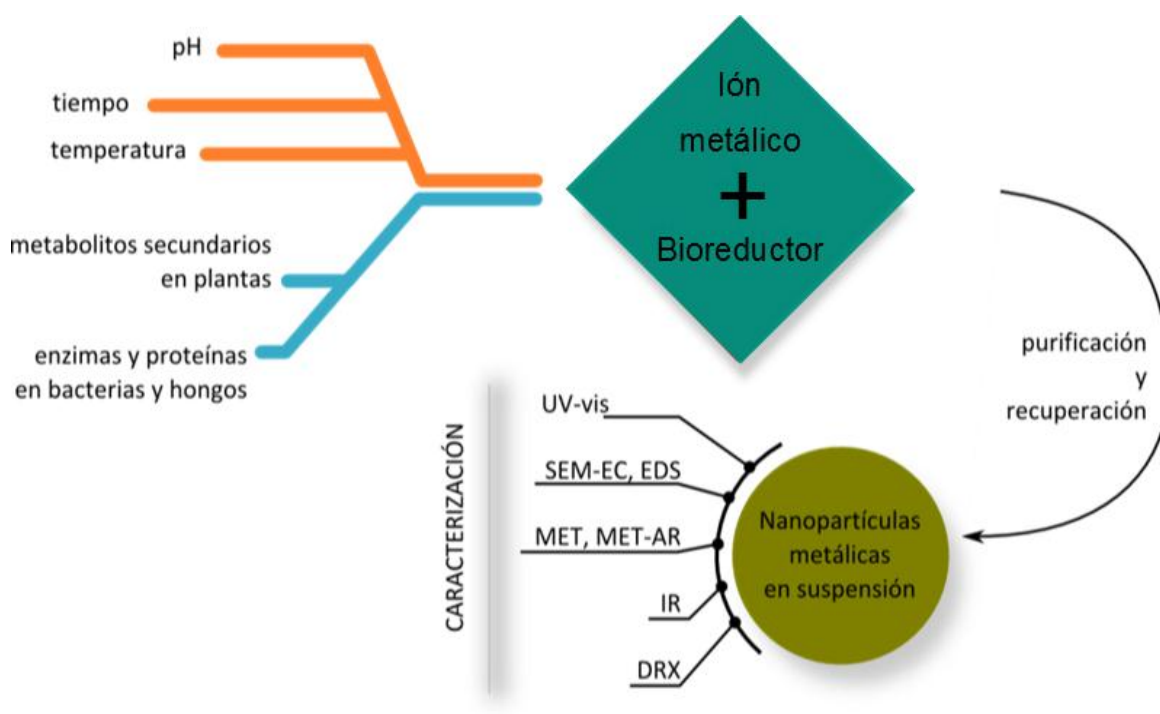


Figura 2.8. Diagrama general de biosíntesis [42].

2.4.2 Importancia de los compuestos químicos en las plantas.

Las plantas producen una amplia y diversa variedad de compuestos orgánicos, estos son conocidos como *metabolitos primarios* y *metabolitos secundarios*. Los metabolitos primarios se encuentran en todas las plantas y realizan funciones metabólicas que son esenciales (p.ej. la fotosíntesis, respiración, y síntesis de proteínas, entre otras). En cuanto a los metabolitos secundarios, se encuentran distribuidos diferencialmente entre los grupos taxonómicos del reino vegetal; y no parecen participar directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, la gran diversidad en sus propiedades conocidas, les otorga una importancia mayor en el sector de la investigación [43].

La importancia de los metabolitos secundarios, radica en su gran complejidad química y las interacciones que presentan, derivándose de ellas:

- 1) *Estabilización estructural*, determinada por la polimerización y condensación de fenoles y quinonas, o por interacciones electrostáticas de poliaminas con los componentes celulares;
- 2) *Fotoprotección*, relacionada con la absorción de la luz visible y la radiación UV, debido a la presencia de dobles enlaces conjugados;
- 3) *Antioxidantes y anti-radicales* gobernados por la disponibilidad de grupos hidroxilo (-OH), amino (-NH₂) y sulfhidrilo (-SH), así como núcleos aromáticos y cadenas alifáticas insaturadas.

Actualmente, se han publicado reportes sobre la síntesis de nanomateriales por plantas, pero poco se ha contribuido en la elucidación del mecanismo de síntesis. Por lo que una descripción más detallada sobre la interacción de los metabolitos involucrados en la obtención de nanopartículas, potenciaría su aplicación en diferentes órdenes de producción. En la Tabla 2.2, se indican algunas plantas y sus metabolitos secundarios, que han sido utilizadas en la nanosíntesis como ha citado por Jha y col. [44].

Tabla 2.2. Plantas y sus metabolitos secundarios involucrados en la síntesis de nanopartículas [44].

Nombre de la planta	Metabolito propuesto
Hierba del golpe (<i>Acalypha indica</i>)	Alcaloides, acalipus, acalifina y acetato gamma-sitosterol.
Agave amarillo (<i>Agave americana</i>)	Azucres fermentables, agavosa, saponinas y esteroides.
Sábila (<i>Aloe vera</i>)	Aloína (glucósido antraquinona), emodina, ácido crisofánico, barbolin-pentosidos, isobarbolin y barbolin beta
Avena (<i>Avena sativa</i>)	Ácidos: p-Hidroxibenzoico, vinílico, cafeico, vinílico, p-cumárico y ferúlico.
Bakli (<i>Anogeissus latifolia</i>)	Taninos, goma.
Nim (<i>Azadirachta indica</i>)	Margosina y azadiractina.
Floripondio (<i>Datura alba</i>)	Alcaloides: hiosciamina, hioscina, atropina y escopolamina. Semilla: mezcla de aceites, alantoína. Hoja: Ácido ascórbico.
Grosella espinosa (<i>Emblica officinalis</i>)	Taninos y ácido ascórbico
Eucalipto blanco (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Aceite volátil: cineol, alcohol, aldehídos, cetonas, fenoles, terpenos, eugenol, sesquiterpeno, taninos, resina. Goma: ácido Kino-tánico, catequina, pirocatequina.
Geranio (<i>Geranium</i>)	Hojas: ácidos orgánicos, emodina
Cardosanto (<i>Argemone mexicana</i>)	Alcaloides: barberina, protofina y aceite ergemona.
Rosa de China (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	Quercetina, cianidina y kaempferol.

2.4.3 Síntesis de nanopartículas mediada por plantas.

La idea de utilizar plantas en la síntesis de nanopartículas metálicas surge con la fitorremediación, esta técnica emplea a las plantas para remover, reducir o estabilizar contaminantes. A partir de ella, llegaron a identificarse una amplia diversidad de especies con gran capacidad para acumular metales pesados, las cuales reciben el nombre de *hiperacumuladoras* [45-46]. Al emplear las técnicas de fitorremediación, se han logrado sintetizar nanopartículas en el interior de plantas vivas. Sin embargo, el empleo de los extractos a base de plantas resulta ser aún más eficiente y sencillo. Esto se debe

principalmente, a que concentran la mayoría de los metabolitos secundarios. A los cuales no solo se les atribuye la síntesis de las nanopartículas, sino también la estabilización de las mismas. Al actuar simultáneamente como agentes reductores y surfactantes [40].

2.4.4 Síntesis de nanopartículas de oro por medio de plantas.

El número de reportes de la obtención de nanopartículas de oro sintetizadas por plantas es significativamente menor en comparación con los trabajos reportados para la síntesis de nanopartículas de plata. No obstante, el primer reporte exitoso sobre la síntesis de nanopartículas metálicas en plantas vivas apareció en 2002; y fueron precisamente de oro en el interior de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*), donde se obtuvieron tamaños entre los 2 a 20 nm [40].

Suman y col. [47], evaluaron el potencial del Noni (*Morinda citrifolia*), como agente reductor en la síntesis de NPsAu. Para ello, emplearon el extracto acuoso de la raíz. La síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de 12 h, al adicionar 3 mL del extracto a 34 mL de solución 1mM de H_{AuCl}₄. Dando como resultado una suspensión de color rojo rubí, como indicativo de la presencia de nanopartículas (Figura 2.9 (a)). El espectro del análisis de UV-vis (Figura 2.9 (b)), mostró un pico máximo aproximadamente a 540 nm, atribuido a la banda de resonancia del plasmón superficial de las NPsAu.

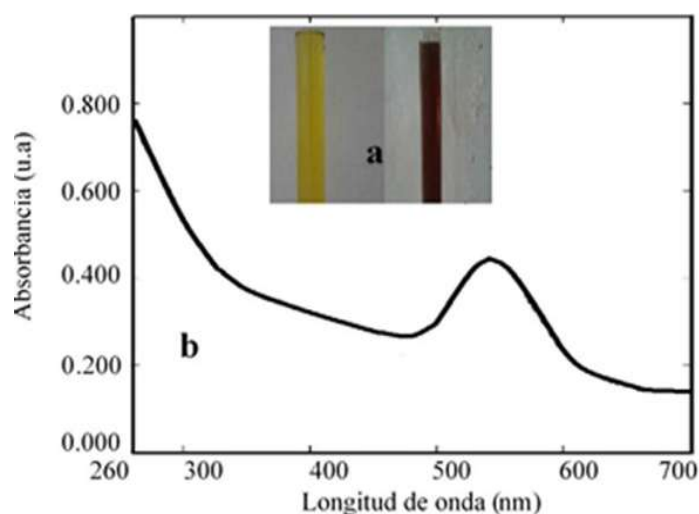


Figura 2.9. (a) Imagen del extracto acuoso de raíz de noni, el cambio de color indica que se ha llevado a cabo la síntesis; (b) Espectro de UV-vis del extracto, el pico a 540 nm indica la presencia de NPsAu [47].

Los estudios de difracción de rayos-X (DRX), Figura 2.10(a), confirmaron la naturaleza cristalina de las nanopartículas de oro. Se observan los picos de difracción a 38.2, 44.5, 64.7 y 77.7 2θ -grados, correspondiendo respectivamente, a las reflexiones de los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura fcc. Puede verse también, que la reflexión debida a los átomos del plano (111) es más intensa que las otras, lo que sugiere que es la orientación predominante.

Así mismo, para establecer el mecanismo probable de síntesis y estabilización de las nanopartículas, llevaron a cabo un estudio IR-TF. Se puede observar en el espectro, Figura 2.10 (b), la presencia de los siguientes grupos funcionales: amida secundaria (3420 cm^{-1}), alquilo y aldehído ($2920\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$) y amida primaria (1641 cm^{-1}). La presencia del enlace amida sugiere que hay algunas proteínas en el extracto, indicando que podrían ser las responsables de la formación y estabilización de las nanopartículas. También se pueden observar otras bandas presentes a 1443 cm^{-1} , asignada a las vibraciones del grupo metileno de las proteínas, y las que se encuentran a 1318 cm^{-1} y 1089 cm^{-1} , debidas a la vibración de estiramiento C-N de aminas aromáticas y alifáticas, respectivamente.

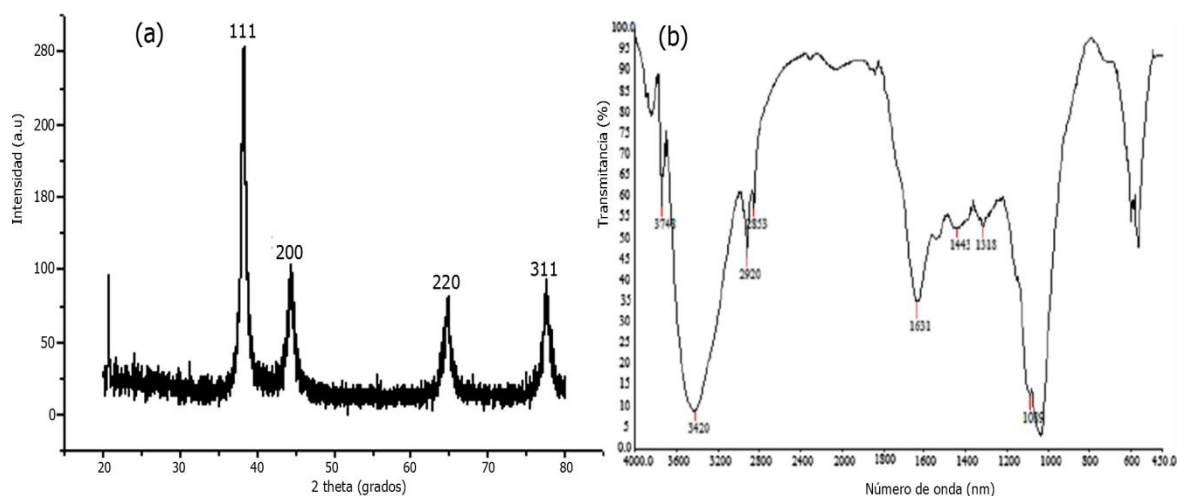


Figura 2.10. (a) Patrón de DRX de nanopartículas de oro, (b) espectro de IR-TF de NPsAu [47].

Finalmente, con los estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET), se determinaron la morfología y el tamaño de las nanopartículas. En la Figura 2.11, se muestra que las nanopartículas obtenidas presentaron formas esférica, triangular y hexagonal; y con tamaños en el rango de 12.17 a 38.26 nm.

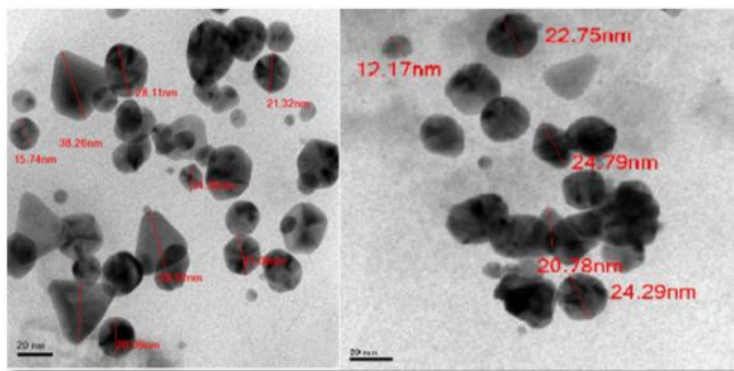


Figura 2.11. Imagen de MET (campo claro) de NPs Au [47].

Por su parte Noruzi y col. [48], reportan la síntesis de NPs Au utilizando el extracto acuoso de pétalos de rosa (*Rosa hybrida*), evaluando el efecto de la concentración de sal de oro y concentración/cantidad de extracto en la reacción de síntesis. Nuevamente, la producción de las NPs Au se registró a través del cambio de color en la mezcla. Atribuyendo el cambio de coloración a la expresión de la resonancia del plasmón superficial.

La Figura 2.12 (a)-(c) muestra los espectros de UV-vis en función del tiempo, concentración, cantidad de extracto y concentración de iones de oro. Estos indican que no hubo diferencia significativa en la intensidad de las bandas de la RPS en función del tiempo (0, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos), Figura 2.12 (a). Lo que sugiere que la reacción se completó durante los primeros minutos. Por lo que su cinética, es una de las más rápidas que se ha reportado en la síntesis verde de nanopartículas de oro a temperatura ambiente.

En cuanto al efecto de la concentración de sal de oro y concentración/cantidad de extracto, observaron lo siguiente: la intensidad de la banda de RPS aumentó cuando la concentración del extracto incrementó; es decir, para una concentración del 10% de extracto no se observó cambio de color de la mezcla, y por ende, la síntesis no tuvo lugar (Figura 2.12 (b)). Al incrementar la cantidad de extracto, la intensidad de la banda RPS disminuyó, debido al decremento en el tamaño de nanopartícula (Figura 2.12 (c)). Esto demostró, que 5 mL del extracto, son suficientes para finalizar la reacción. Por último, al incrementar la concentración de sal de oro; la intensidad de la banda de RPS aumentó en intensidad (Figura 2.12 (d)). Debido a que la velocidad de la reacción aumentó, y la concentración de NPs Au fue mayor. Se observó también de manera consistente en los espectros de UV-vis, un pico a 750 nm (Figuras 2.12 (a-b)), atribuido a la resonancia longitudinal del plasmón de superficie, que sugiere la formación de nanopartículas de oro anisotrópicas.

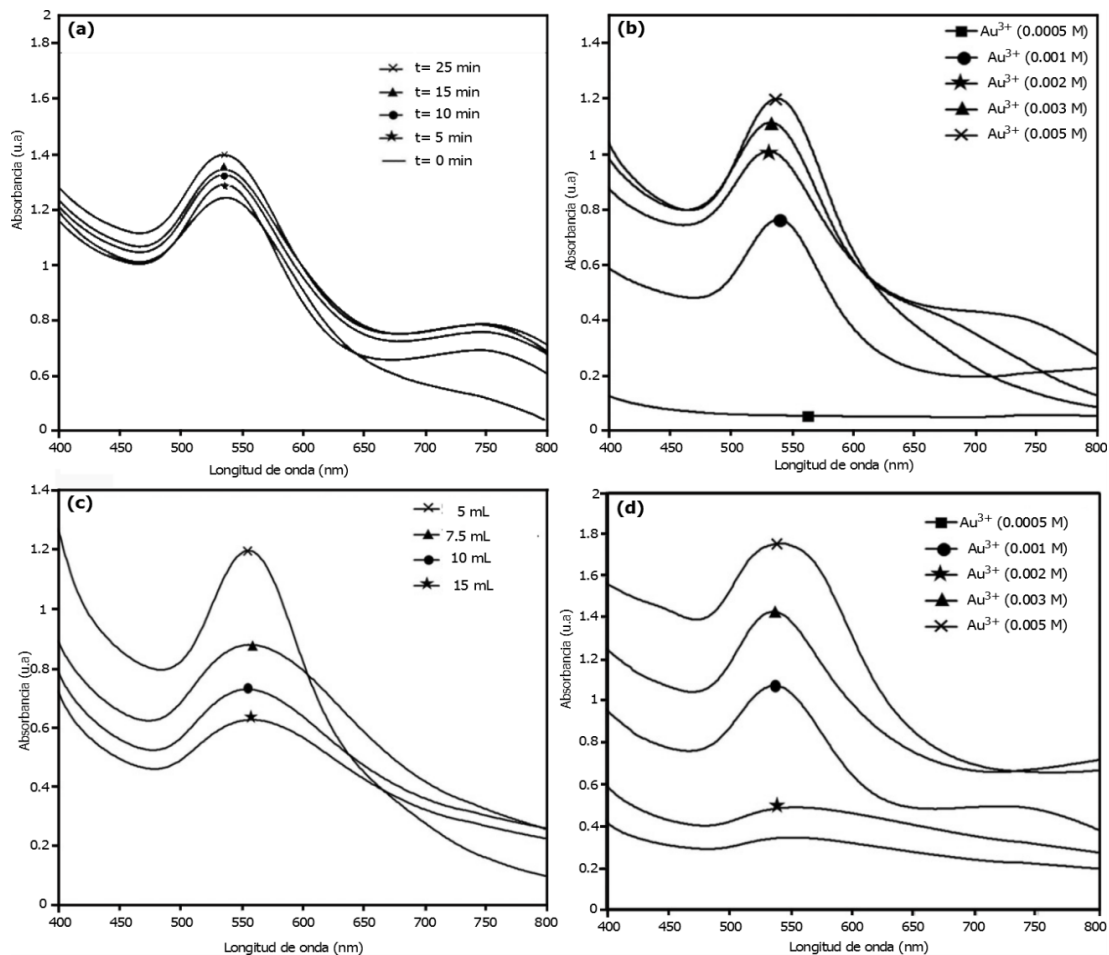


Figura 2.12. Espectros de UV-vis:(a) registrados en función del tiempo de reacción de la sal de oro con extracto al 100%. (b) Efecto de la concentración del extracto. (c) Efecto de la cantidad de extracto. (d) Efecto de la concentración de iones de oro en la síntesis de nanopartículas [48].

La presencia de NPsAu anisotrópicas fue corroborada mediante microscopía electrónica de transmisión. Las micrografías muestran la presencia de nanopartículas de oro con formas triangular y hexagonal, adicionalmente se observan nanopartículas esféricas (Figura 2.13).

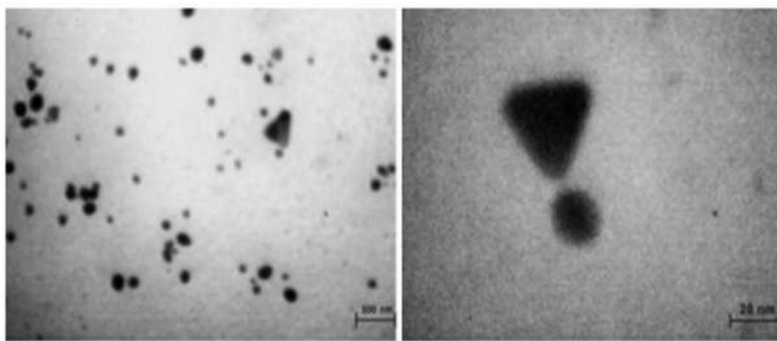


Figura 2.13. Micrografías de MET (campo claro) de NPsAu [48].

Bakar y col. [49], sintetizaron nanopartículas de oro de forma esférica, cúbica e hilo. Empleando como agente reductor extracto en polvo de cáscara de plátano (ECP) y HAuCl_4 como sal precursora. El extracto se obtuvo al hervir y triturar la cascara de plátano, que posteriormente se precipitó con acetona, para ser secado después. La obtención de NpsAu con diversas formas, fue atribuida a los cambios controlados en las condiciones de síntesis, donde se fueron variando el pH, la temperatura y la concentración tanto de la sal precursora, como del extracto. Reportan que tan solo 3 minutos después de iniciada la reacción de síntesis, se presentaron una gama de colores, lo que indicó la presencia de una variedad de nanopartículas con distintas morfologías.

La caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB) de las suspensiones incubadas con un $\text{pH}=3$ (10 mg de ECP y 0.25, 0.5 ó 1.0 mM de HAuCl_4). Permitió observar nanopartículas de oro y nanoplacas, (flechas blancas y negras respectivamente, en las Figuras 2.14(a) y (b)). Notaron también, que al secarse la muestra, estas nanopartículas se acumularon en la periferia de la gota seca; formando micro-redes (flechas blancas) que pueden ser observadas incluso a bajas magnificaciones, Figuras 2.14(c) y (e). Sin embargo, para acercamientos mayores (1000 X o 2000 X), las imágenes revelaron que las redes se componen de microcubos de oro dispuestos en una matriz específica, Figuras 2.14 (d) y (f). En particular, la Figura 2.14 (f) muestra la presencia de triángulos y hexágonos en los microhilos (flechas negras).

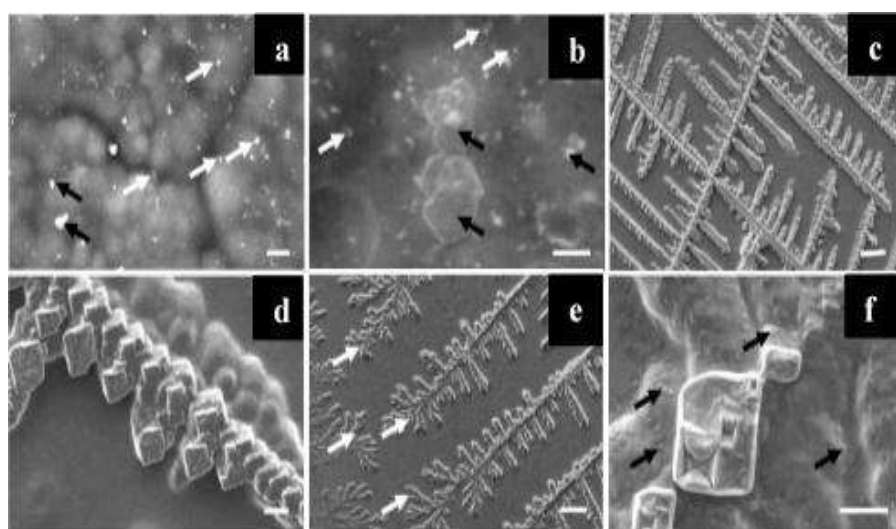


Figura 2.14. Micrografías de MEB. (a) y (b) redes en micro-hilo en la periferia, (c) y (d) con 0.25 mM de HAuCl_4 , (e) y (f) con 1.0 mM HAuCl_4 . [49].

Finalmente, se realizaron estudios de espectroscopía de infrarrojo, para identificar los grupos funcionales presentes en el extracto y así predecir su papel en la síntesis. En la Figura 2.15, se presenta el espectro correspondiente a la suspensión coloidal, comparándolo con el espectro de ECP. El cambio en los picos de los grupos funcionales metilo, metileno y metoxi (de 2930 a 2888 cm^{-1}), amina (de 2353 a 2357 cm^{-1}) y amida (de 1640 a 1670 cm^{-1}), sugiere que estos grupos están involucrados en la síntesis. Así mismo, el cambio en la banda de 1445 a 1443 cm^{-1} , apunta a la participación de los grupos alifáticos y aromáticos también. Es sabido que la cáscara de plátano se compone principalmente de pectina, celulosa y hemicelulosa, los cuales presentan estos grupos funcionales en su estructura; por lo que se cree que estos polímeros están implicados en la reducción de la sal de oro y la estabilización de microestructuras.

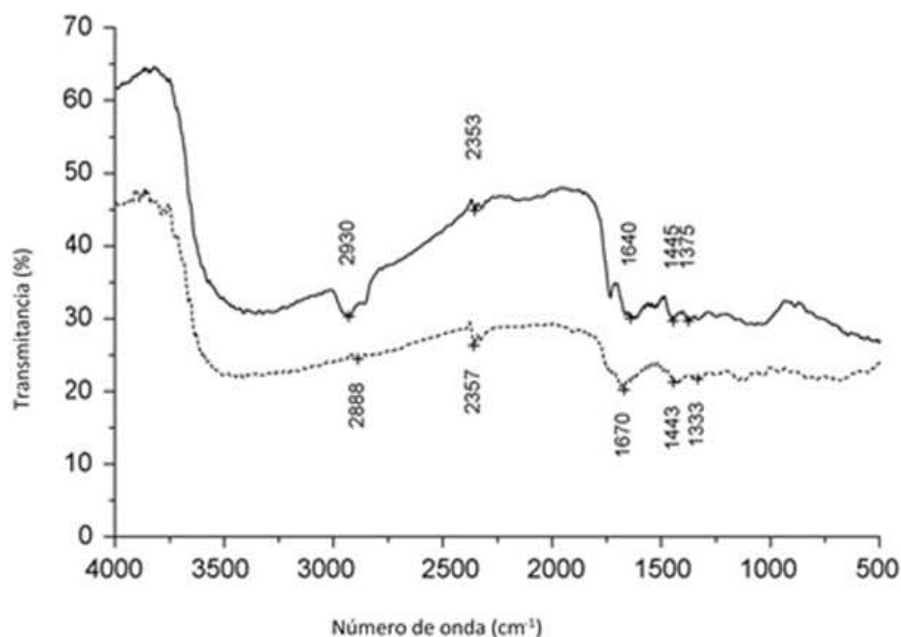


Figura 2.15. Espectro de IR del extracto de cáscara de plátano (línea a trazas) antes y después (línea a puntos) de la reacción de síntesis [49].

Siendo estos solo algunos de los trabajos reportados sobre la síntesis de nanopartículas de oro empleado extractos vegetales. En la Tabla 2.3, se muestra un listado breve de plantas utilizadas en la síntesis de NPsAu, citadas por Rai y col. [50].

Tabla 2.3. Nanopartículas de oro sintetizadas utilizando ingredientes botánicos [50]

Planta	Morfología	Tamaño [nm]
<i>Azadirachta indica</i> (lila india)	Esférica	20
<i>Cinnammum camphora</i> (alcanforero)	Triangular y Esférica	55 a 80
<i>Aloe vera</i> (sábila)	Esférica	30
<i>Avena sativa</i> (avena)	Irregular y alambre.	15 a 25
<i>Tamarindus indica</i> (tamarindo)	Triangular.	5 a 35
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Irregular.	4 a 10

2.4.5 EL NOPAL (*Opuntia ficus-indica*).

El nopal es una de las más de 300 especies del género *Opuntia*, pertenece a la familia de las cactáceas y es endémica del continente americano, pudiéndose encontrar en forma silvestre desde el norte de Estados Unidos hasta la Patagonia. Se trata de una planta muy rústica y ramificada, con ramas ampliamente extendidas e inclinadas. Las ‘pencas’ (cladodios) son característicos del género, y tienen apariencia de hoja carnosa, son planos, y generalmente ovales. Estas pencas poseen la capacidad de convertirse en tallos, y a su vez, emitir nuevos segmentos y flores. Es en las pencas donde se realiza la fotosíntesis y se almacenan considerables cantidades de agua, lo que permite al nopal soportar largos periodos de sequía [51]. Esto último debido a que la planta cuenta con un sistema radicular muy extenso, densamente ramificado y rico en raíces finas absorbentes.

a) Composición química general de las pencas de nopal.

Se han realizado diversas investigaciones para determinar la composición química del nopal. En la tabla 2.4 se muestran los componentes más relevantes, de acuerdo a los autores consultados [52-55]. Como puede verse en la tabla, el ácido ascórbico se presenta de manera importante en cuanto al contenido de vitaminas. Siendo este, el compuesto de interés para los procesos de síntesis a los que se refiere este trabajo.

Tabla 2.4. Composición química del nopal (100 gr, fresco) [53-56].

Composición química del nopal (100g, fresco)		
Humedad [53]		
Agua como componente mayoritario	90-95%	-
Compuestos nitrogenados [53]		
Principalmente proteínas	5.2-13.63%	-
Vitaminas [53]		
Tiamina	-	0.03mg
Riboflavina	-	0.06mg
Niacina	-	0.03mg
Ácido Ascórbico	-	8.00mg
Lípidos [54-55]		
Porciones variables de triglicéridos, ceras, resinas, látex	1.22%	-
Carbohidratos [55]		
Arabinosa, galactosa, xilosa, ácido galacturónico	8.89%	-
Minerales [56]		
Calcio		93.00mg
Hierro		1.6mg
potasio		1.66mg

2.4.6 Uso del nopal como agente reductor.

Ha sido reportada en el pasado, la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de la penca de nopal, mejor conocido como mucilago. Gade y col. [56], sintetizaron nanopartículas de plata (NPsAg) con nopal, el cambio de coloración de verde tenue a café, indicó la síntesis de las NPsAg, confirmándose a través de la técnica de UV-vis. En la Figura 2.16, se muestra la banda de RPS a 440 nm exhibida por las nanopartículas de este metal, contrastada con el control (sal de plata sin extracto).

Mediante un análisis de IR-TF, buscaron identificar los grupos funcionales presentes en el extracto que pudiesen ser responsables de la síntesis. En la Figura 2.17, se muestra el espectro, de las NPsAg, en cual se pueden apreciar fuertes bandas en 1041, 1390, 1452, 1596 y 1630 cm^{-1} , que corresponde a diferentes grupos funcionales. La banda a 1041 cm^{-1} se asignó a las vibraciones del enlace -COC- ó -CO. La banda a 1390 cm^{-1} corresponde a la presencia

de nitrato residual. La banda a 1452 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento simétrico de $-\text{COO}-$, lo que sugiere residuos de aminoácidos. La banda a 1596 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones $-\text{C}-\text{C}-$ de grupos aromáticos. La banda a 1630 cm^{-1} corresponde a la presencia de amida I y amida II, que surge debido a la vibración de estiramiento del carbonilo y el enlace $-\text{NH}$.

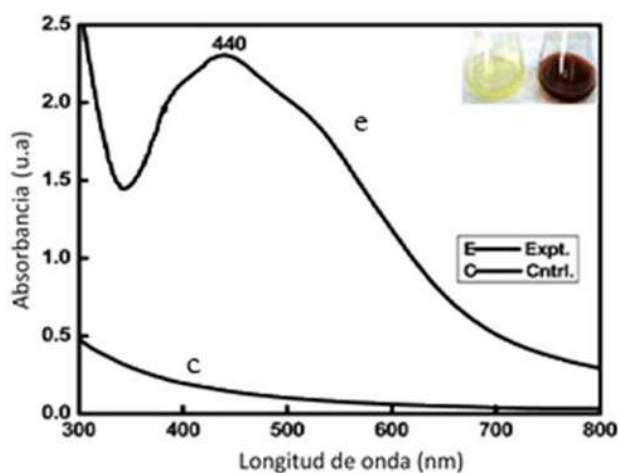


Figura 2.16. Espectro de absorción de UV-vis de nanopartículas de plata [51].

Derivado de este estudio, proponen que las bandas de absorción a 1041 cm^{-1} (enlaces éter) y 1390 cm^{-1} (grupos aromáticos), sugieren la presencia de compuestos heterocíclicos, alcaloides y glucósidos, que actúan como agentes estabilizantes de las nanopartículas.

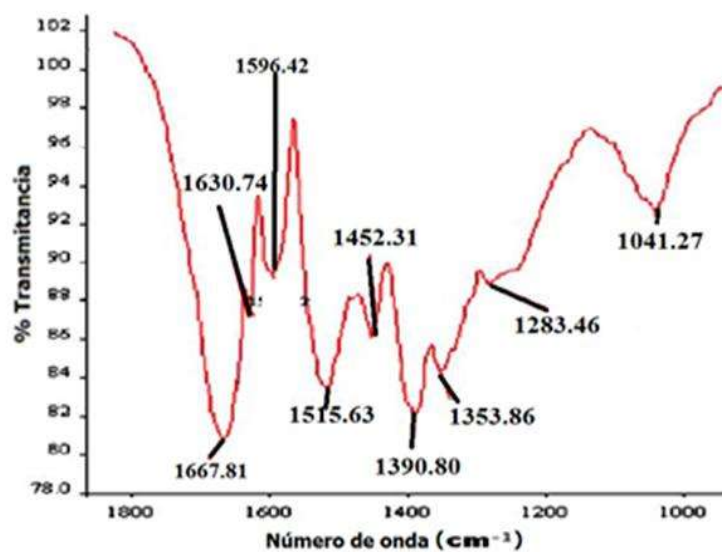


Figura 2.17. Espectro de IR-TF de las nanopartículas de plata [51].

2.4.7 Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico, o vitamina C, tiene características reductoras por sus dos grupos donadores de protones, un esquema de la estructura de esta molécula se muestra en la Figura 2.18. Es también hidrosoluble, termolábil y se oxida en el aire con facilidad. Interviene en muchas reacciones metabólicas importantes, por ejemplo como cofactor en las reacciones de hidroxilación en la síntesis del colágeno. La vitamina C tiene dos coeficientes de disociación ácida –pKa– indicados en la Figura 2.18, de manera que el grado de ionización de la molécula determinará si actuara como pro-oxidante o antioxidante. A un pH > 4, el ácido ascórbico se convierte en pro-oxidante en la presencia de iones de hierro. Si el ácido ascórbico se encuentra en un pH equivalente o inferior a su pKa, la carga negativa responsable del acoplamiento con metales de transición puede ser estabilizada por protonación. Esto impide el flujo de electrones en el sistema [57].

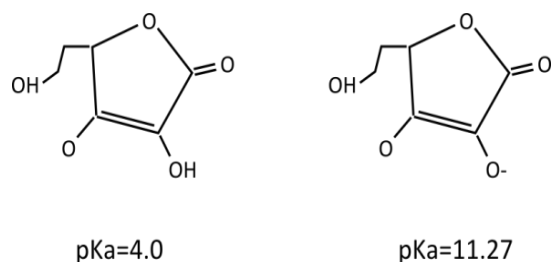


Figura 2.18. Representación de la molécula de ácido ascórbico y los coeficientes de disociación ácida de sus grupos [57]

La mayoría de las reacciones metabólicas del ácido ascórbico se deben a su fuerte potencial reductor. Su actividad antioxidante, deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada: L-dehidroascórbico (Figura 2.19); esto también, habilita a la molécula para combatir radicales oxidantes (O_2^- y OH^-) y los radicales acuosos.

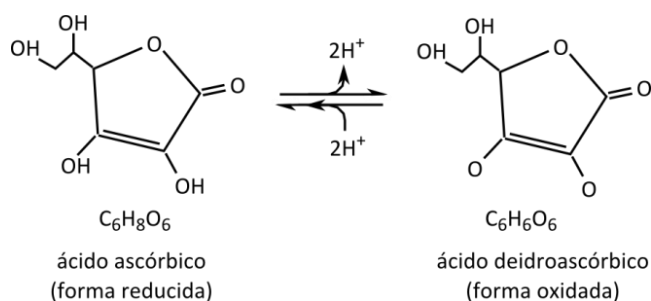


Figura 2.19. Formas moleculares en equilibrio del ácido ascórbico [57].

2.4.8 Ácido ascórbico como pro-oxidante.

El proceso de oxidación del ácido ascórbico depende de la presencia de metales de transición, como el cobre o el hierro, que lo conducen a su degradación. Entre otros factores fisicoquímicos que influyen se tienen: de manera muy importante al pH, y también además, la temperatura, concentración de sales/azúcares, presencia de oxígeno, enzimas, catalizadores metálicos, aminoácidos, oxidantes y los reductores inorgánicos. Con los desplazamientos de equilibrio entre ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico, es importante mencionar, que el primero es susceptible a formar complejos con metales de transición y el segundo a degradación enzimática [57]. Por lo general, el estado oxidado del ácido ascórbico es difícil de determinar a un $\text{pH} < 2$, o bajo altas concentraciones de ácidos orgánicos, ya que en estas condiciones su reactividad es baja. Por esta razón, se recomienda manejar un pH de 4.5, donde los mecanismos que involucran oxígeno y complejos con metales pesados son factibles. El sistema de flujo de electrones que degrada el ácido ascórbico del mono anión (HA^-) a $\text{pH}=4.5$, hacia ácido deshidroascórbico radical (A^\cdot), es una especulación sobre el mecanismo de los catalizadores metálicos [58].

2.4.9 Condiciones de pH.

La variación del potencial de Hidrógeno (pH) en la reacción oxidativa no catalizada, sigue una curva en forma sigmoideal a lo largo del eje de incremento de los valores de pH, esto corresponde al valor del pKa del ácido ascórbico y tiende a caer arriba de un $\text{pH}= 6$; bajo condiciones anaerobias las tasas de reacción tienen un máximo de 4 y declinan a $\text{pH}= 2$. Las reacciones por debajo del $\text{pH}=2$ tienen poca significancia, porque el ácido ascórbico no se encuentra en su promotor aniónico necesario para iniciar el flujo de electrones [59].

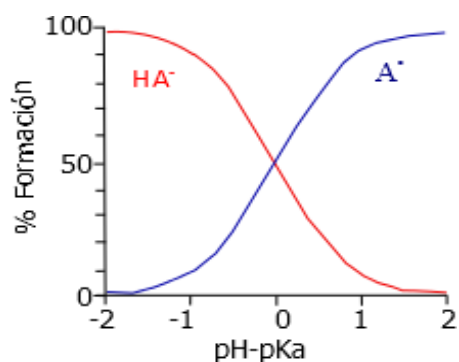


Figura 2.20. Reacción oxidativa del ácido ascórbico [59].

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental realizado consistió de 6 actividades agrupadas en 3 etapas básicas: biosíntesis, funcionalización, y bioensayos en células vivas. En la Figura 3.1 se indican de manera general las etapas, actividades y las partes que componen cada actividad.

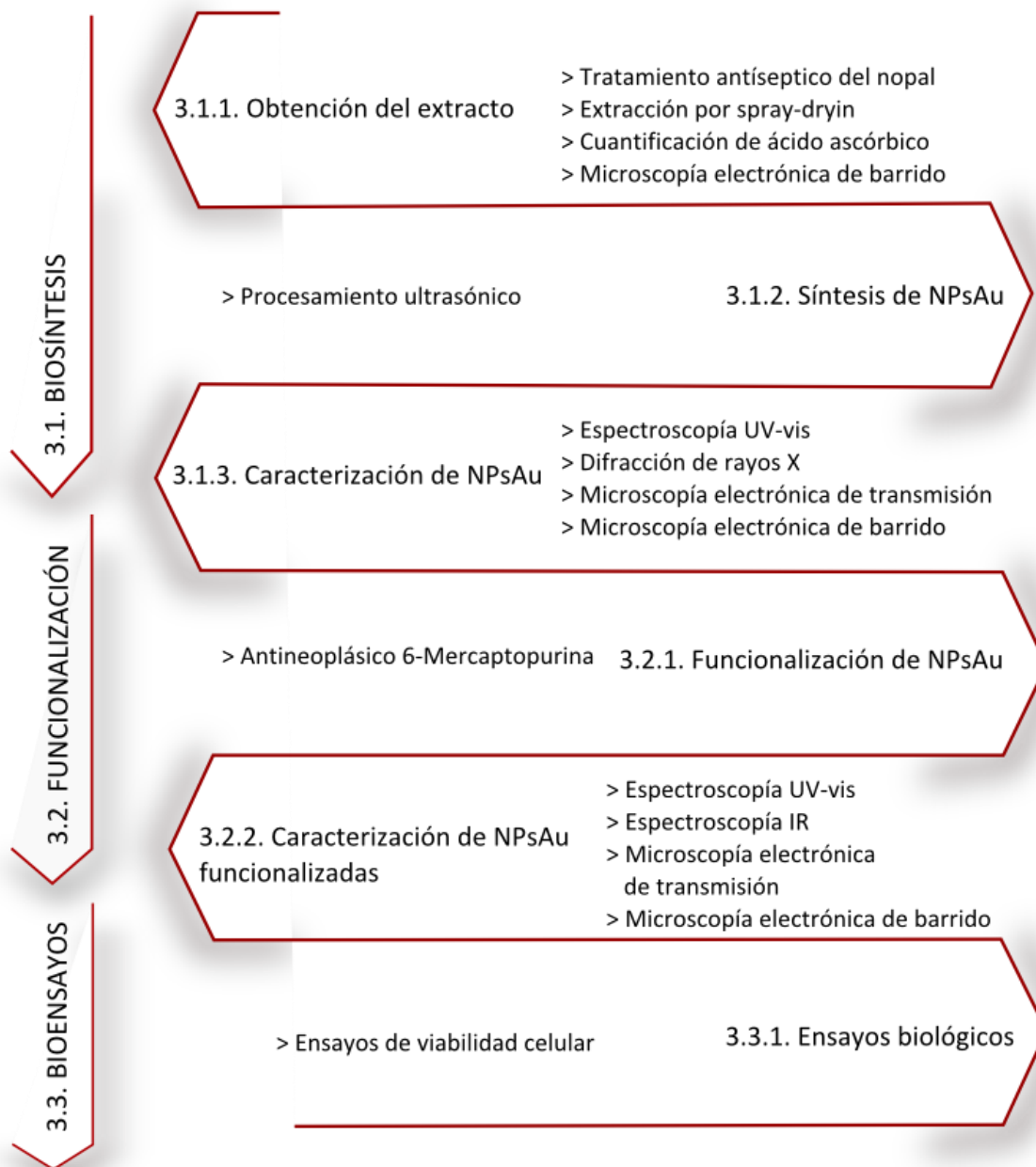


Figura 3.1. Diagrama general del desarrollo experimental.

3.1 BIOSÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.

3.1.1 Obtención del extracto de nopal.

Se colectaron pencas de nopal en la localidad de Tarímbaro, municipio del estado de Michoacán. Para facilitar el manejo, se retiraron las espinas y posteriormente se realizó un lavado y desinfección por 10 min en una solución 1N de HCl diluido en agua destilada. Si bien, ha sido reportada la síntesis de NPs a partir de biomasa [47-49], ésta presenta una disminución en sus propiedades, debido a la oxidación de la clorofila o bien por la oxidación enzimática de sus biomoléculas; lo que obliga a una nueva colecta de material biológico. En este proyecto, como ya se ha mencionado, se busca proponer una metodología de separación física para obtener un extracto que presente una alta eficiencia en la síntesis; y una capacidad de actividad química estable bajo el almacenamiento adecuado. Es decir, se busca que el extracto presente propiedades químicas inalteradas respecto a las de colecta.

Bajo estas condiciones, los métodos de separación a utilizar están en función de los compuestos encontrados en el nopal fresco. La Tabla 3.1 muestra en la primera columna los grupos de compuestos, de acuerdo a diversos autores consultados [50, 52, 60-61]. La segunda columna, indica el método de separación físico, sugerido en los manuales de procesamiento de material vegetal, para la obtención de extractos. Se muestra también, el contenido esperado después de aplicar el método de separación [62-63], en la columna tres, y la actividad química de los compuestos en presencia del H_{AuCl}₄ (Cuarta columna).

Tabla 3.1. Métodos de separación de los principios activos del Nopal.

Compuestos presentes en el nopal	Método físico de separación [44]	Contenido después de la separación (% peso de partida) [53-56]	Actividad química en presencia de H _{AuCl} ₄
<u>vitaminas</u>			
Ácido ascórbico	Método por aspersión	30-40	Reducción, Luty-Blocho y col. [64]
Riboflavina	Método por aspersión	Trazas	No presenta
Tiamina			No presenta
Niacina			No presenta
<u>minerales</u>			
Ca ⁺			
Na ⁺	No viable por métodos físicos.	--	No presenta
K ⁺			
Mg ²⁺			

...continuación de la tabla 3.1.

<u>macrocomponentes</u>			
Proteínas	Método por aspersión.	20	No presentan
Lípidos	Método por aspersión.	5	No presentan
<u>pectina</u>			
Soluble en agua	Método de aspersión.	10	No presenta
Insoluble en agua y de solubilidad parcial	Tamizado de la pulpa.	15	No presenta
<u>carbohidratos</u>			
L-arabinosa L-ramnosa D-galactosa D-xilosa, Ácido galacturónico	Molienda en molino de cuchillas y tamizado con malla No. 50.	7	No presenta
<u>taninos</u>			
Betalaínas β-carotenos Clorofila	Remoción de cutícula (decoloración)	10	No presenta

Luty-Błocho y col. [64], establecieron que el ácido ascórbico es el responsable de la reducción del HAuCl_4 . Por lo que se quiere remover el mínimo de este compuesto; a la vez que el contenido de taninos y carbohidratos busca reducirse, ya que éstos interfieren con la actividad del ácido ascórbico en el proceso de síntesis. Los taninos y carbohidratos se removerán mediante la eliminación de la cutícula de la penca (pelado), la molienda, y el tamizado. La obtención del extracto por el método de aspersión se ve afectada por la presencia de pectinas, ya que tienden a aglutinarse y pegarse en las paredes del colector del equipo de extracción. Las pectinas insolubles y parcialmente solubles se separan durante el tamizado de la pulpa molida. La pectina soluble en agua se remueve durante el proceso de aspersión. Los lípidos contenidos en el extracto se oxidan espontáneamente en presencia del aire; al oxidarse alteran el pH de la solución, inhibiendo la actividad de óxido-reducción del ácido ascórbico. Sin embargo, es posible removerlos mediante aspersión, y durante este mismo proceso se da la remoción de las proteínas, las cuales si bien no interfieren en el proceso de síntesis, tampoco juegan un papel promotor de la reacción.

De esta manera, el tratamiento propuesto consistió en la secuencia de operaciones pelado, molido, tamizado y pulverizado por aspersión del material vegetal; según se describe en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Tratamiento de separación para obtención del extracto de nopal.

Condiciones		Componentes removidos
01 Pelado	Se remueve completamente la cutícula con un cuchillo	Taninos y parte de los carbohidratos
02 Molido	Se muele en una licuadora, hasta obtener una pasta	Carbohidratos
03 Tamizado	Tamiz de fibra sintética malla 50, hasta la saturación de la malla.	Carbohidratos, pectina insoluble y parcialmente insoluble
04 Aspersión	<i>Spray drying</i> YAMATO ADL31, $T_{\text{entrada}}=130$, $T_{\text{salida}} 80^{\circ}\text{C}$	Lípidos, proteínas, pectina soluble y algunas vitaminas.

Después de la secuencia de procesos mencionados en la Tabla 3.2, el producto esperado fue un polvo fino, con un porcentaje de humedad bajo; cuya composición aproximada estuvo regida por los procesos de separación realizados en él. En base a lo reportado en la Tabla 3.1, la composición del extracto consistió de aproximadamente 10% de taninos, cerca de 15% de proteínas, bajo contenido en lípidos y pectinas, alrededor de 30% del contenido original de ácido ascórbico y trazas de tiamina, niacina y riboflavina, debido al bajo contenido de ellas en el material de partida [60, 64]. Así mismo, la remoción de los minerales presentes no es viable, sin embargo bien pueden participar como modificadores del proceso de síntesis.

Hay que recalcar que el propósito de realizar estos tratamientos no tuvieron por objetivo aislar el ácido ascórbico del nopal, para su empleo como agente reductor en la síntesis de nanopartículas, sino el de disminuir el contenido de aquellos elementos que pudieran interferir en el proceso de síntesis. De tal manera que, que fuese posible obtener un extracto con un alto porcentaje de ácido ascórbico, preservando el resto de los componentes que bien podrían participar en la estabilización de las nanopartículas obtenidas.

a. Caracterización del extracto de nopal por espectroscopía de energía dispersada.

El propósito de llevar a cabo este tipo de caracterización, obedeció a la necesidad de poder determinar las especies adsorbidas en la superficie de las nanopartículas provenientes del nopal. Para ello se observó el extracto (polvo) en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-7600F FEG-SEM) y se realizó el análisis químico por -EED (BRUKER XFlash 6130).

b. Cuantificación del ácido ascórbico.

Como ya se mencionó en la tabla 3.1, el ácido ascórbico es el encargado de reducir el HAuCl_4 [64]. El proceso de síntesis de las NPs, consta de la reacción entre el extracto y la sal. Para establecer esta relación de reactivos, se debe determinar el contenido de ácido ascórbico en el extracto. El contenido de ácido ascórbico se cuantificó por el método Tillmans. Keller 1988. AOAC 967.21 (2000) [65], se trata de un método de valoración óxido-reducción, en el que se usa el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI) como indicador*.

3.1.2 Síntesis de las nanopartículas de oro.

La síntesis de las nanopartículas de oro está dada por la reacción en fase acuosa de dos componentes, a saber: solución acuosa 1 mM de HAuCl_4 (solución A) y, suspensión del extracto de nopal (solución B). Se describen a continuación los métodos utilizados para preparar estas soluciones.

Solución A: Se prepararon 50 mL de disolución acuosa de HAuCl_4 1 mM, calentando en una parrilla con agitación magnética (Thermo) a reflujo y con agitación vigorosa, hasta observar que el líquido entra en ebullición.

Solución B: El valor de la cuantificación del ácido ascórbico en el nopal, indicó que para la concentración de la solución 1 mM de HAuCl_4 [64] es necesario 1 g de extracto de nopal. Por lo que se suspendió 1 g de extracto de nopal pulverizado en 50 mL de agua desionizada. Se sometió a tratamiento ultrasónico hasta disolver, para después centrifugarse a 1500 rpm durante 15 min, recuperándose el sobrenadante.

Una vez obtenidas las soluciones A y B, en condiciones asépticas (campana de flujo laminar LABCONCO) y bajo agitación constante; la solución A se llevó a la temperatura de 60 °C por 20 minutos, con la finalidad de evitar la desnaturalización de los principios activos presentes en el solución B, después se adicionó gota a gota la solución B, preservando las condiciones de temperatura y agitación por 30 minutos más. La síntesis de nanopartículas de oro a partir de las soluciones A y B, se hizo evidente porque es posible observar un cambio de color que va del verde claro al rojo-rubí. Como ha sido reportado en el pasado, el cambio a la coloración rojo-rubí indica la formación de nanopartículas de oro [47-50].

* Para detalles del método de titulación consultar el Anexo I.

3.1.3 Caracterización de las nanopartículas de oro.

La caracterización estructural y química de las nanopartículas, se realizó a partir de muestras tomadas de la suspensión obtenida en la síntesis. Las muestras se prepararon en forma de diluciones de concentración variada (de acuerdo a la técnica de análisis), y polvos obtenidos del secado de muestras de la suspensión. Las técnicas de caracterización que se utilizaron fueron: espectroscopía de absorción de ultravioleta visible (UV-vis), microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (MEB-EC) y espectroscopía de energía dispersiva (-EED), microscopía electrónica de transmisión convencional (MET) y de alta resolución (MET-AR), espectroscopía de infrarrojo (IR) y difracción de Rayos-X (DRX). Ya que estas mismas técnicas de análisis se utilizaron también en la caracterización de los productos de la etapa de funcionalización, se describen en forma de una tabla de procedimientos (tabla 3.3), para poder ser referidos en su momento.

Tabla 3.3. Procedimientos de caracterización utilizados en la biosíntesis y funcionalización de las nanopartículas.

P01. UV-vis	Se llevó a cabo con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, con un rango de 400 a 1350 nm, usando portamuestras (celdas) de plástico. La muestra se diluyó en una relación 1:5 en agua destilada. Se tomaron los espectros del agua destilada utilizada para la dilución y de la muestra, los picos característicos de la suspensión son el resultado de la substracción del espectro del agua destilada al espectro de la muestra.
P02. MEB-EC, EED	Los polvos se fijaron con pintura de carbono a un portamuestras cilíndrico de Cu-Zn, para observarse en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-7600F FEG-SEM) en el modo de electrones retrodispersados. Se realizó también el análisis químico -EED (BRUKER XFlash 6130) a zonas seleccionadas en la muestra.
P03. MET, MET-AR	Las muestras se prepararon depositando 10–15 μ L de la suspensión de nanopartículas en rejillas de cobre con recubrimiento de carbono amorfo. Utilizando los modos de campo claro, campo oscuro, alta resolución y análisis químico -EED- en microscopía electrónica de transmisión (Phillips, TECNAI F20, 200 KV). La morfología, composición y tamaño de las nanopartículas se determinaron a partir de las micrografías obtenidas.

...continuación de la tabla 3.3.

P04. IR	La determinación de la presencia de los grupos funcionales en la suspensión se efectuó por espectroscopía de infrarrojo (IR, BRUKER TENSOR27), en los modos de transmitancia y reflectancia total atenuada (IR-RTA). Para el análisis de transmitancia se fabricó una pastilla de polvos de la muestra, embebidos en una matriz de KBr. Para el estudio de IR-RTA, los polvos de la muestra se depositaron directamente en el portamuestras del espectrómetro.
P05. DRX	Polvos obtenidos de la suspensión se depositaron en un portamuestras de vidrio esmerilado, para realizar análisis de difracción de rayos-X con radiación $\text{CuK}\alpha$. Las variables operativas del difractómetro SIEMENS D5000 se indican en la Tabla 3.4. Las reflexiones de Bragg presentes en los patrones de difracción obtenidos, se indexaron con la ayuda de la base de datos instalada en el equipo.

Tabla 3.4. Variables operativas utilizadas en el análisis de DRX.

Difractómetro SIEMENS D5000	
Geometría	Bragg-Brentano
Radiación	$\text{CuK}\alpha$ (1.542 Å)
Voltaje del filamento	40 kV
Intensidad de corriente	40 mA
Tamaño de paso del goniómetro	0.02°
Tiempo de muestreo	3 seg/paso
Rango de muestreo (ángulo 2θ)	25 a 80°

3.2 FUNCIONALIZACIÓN.

3.2.1 Funcionalización de las nanopartículas de oro.

La funcionalización de las nanopartículas de oro consistió de dos etapas: la conjugación del antineoplásico 6-Mercaptopurina a la superficie de las nanopartículas de oro, y la limpieza de las nanopartículas conjugadas. A continuación, se describen cada una de ellas:

a. Conjugación de la 6-Mercaptopurina a las nanopartículas de oro.

La conjugación se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Se preparó una solución 1.2 mM de 6-Mercaptopurina (6Mp) en 5 mL de dimetilformamida (DMF).

2. En baño termoestable a 4 °C [32] y agitación vigorosa, se mezcló la solución de 6MP con 10 ml de suspensión de nanopartículas de oro. La mezcla permaneció durante 1 hora bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación.

El proceso de conjugación se manifestó por un cambio de coloración en la suspensión, de rojo-rubí a morado intenso [47-50].

b. Limpieza de las nanopartículas conjugadas.

La limpieza del complejo NPsAu-6Mp consistió en la remoción del exceso de 6Mp no conjugada a las nanopartículas, de la siguiente manera:

1. La suspensión se colocó en tubos cónicos de plástico, que se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min (SOL-BAT J500).
2. Se retiró el sobrenadante (transparente), y el precipitado se dispersó en 10 mL de dimetilformamida, que se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 20 min. Este paso se repitió 2 veces más.
3. El precipitado resultante se dispersó en 5 mL de una solución acuosa 10 mM de NaOH.

El precipitado resuspendido en la solución acuosa de NaOH se almacenó en un recipiente transparente a 4 °C protegido de la luz, hasta su utilización en los ensayos de citotoxicidad [32-34].

3.2.2 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas.

La caracterización del complejo NPsAu-6Mp, se llevó a cabo de manera similar a la empleada en las muestras de la suspensión de nanopartículas libres de fármaco. Las técnicas de caracterización que se utilizaron fueron: UV-vis, MEB-EC y EED, MET y MET-AR, IR y DRX.

Para la caracterización del complejo NPsAu-6MP por espectroscopía de UV-vis, la preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento P01 (Tabla 3.3).

Por medio del microscopio electrónico de barrido en el modo de electrones retrodispersados, se realizó una inspección visual del complejo NPsAu-6Mp y también se realizó el análisis químico por -EED. Tanto la preparación, como el montaje de la muestra para el análisis, se realizaron según el procedimiento P02 de la tabla 3.3.

Para descartar posibles modificaciones en la morfología y tamaño de las nanopartículas, como resultado del proceso de conjugación, se hizo el análisis por microscopía electrónica de transmisión, utilizando los modos de campo claro, campo oscuro y análisis químico –EED. La muestra se preparó siguiendo el procedimiento P03 indicado en la tabla 3.3.

Mediante espectroscopía de infrarrojo, en el modo de transmitancia, se determinaron los grupos funcionales de la 6-Mercaptopurina presentes en la solución. Preparando y montado la muestra según el procedimiento P04 (tabla 3.3). Los picos observados en los espectros obtenidos se correlacionaron con datos de reportados en la literatura [32, 34].

3.3 BIOENSAYOS.

a. Bioensayos.

Los ensayos citotóxicos se realizaron en el laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CMEB-UMSNH). Los resultados de los ensayos de viabilidad, se determinaron por el contraste de la muestra evaluada contra el blanco (cultivo celular sin aplicación de tratamientos). Esta fue evaluada mediante su conteo en cámara de Neubauer. Se utilizó la línea celular neoplásica suministrada por el CMEB: RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™) y Jurkat, clon E6-1 (ATCC® TIB-152™).

b. Cultivo celular.

El cultivo y mantenimiento de las células se llevó a cabo de acuerdo al “Protocolo y condiciones de las líneas celulares inmortales y determinación de viabilidad” [65], el cual consiste en:

1. Descongelamiento celular: el tubo criogénico que contenía las células se retiró del tanque de nitrógeno y se atemperó a 37°C por 5 min (incubadora Thermolyne 37900).
2. Acondicionamiento celular: en condiciones asépticas (campana de flujo laminar LABCONCO) se transfirieron las células a un tubo cónico de plástico y se les adicionó 2 mL de medio de cultivo (RPMI-1640, pH 4.2±0.2) y se homogeneizó. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm (SOL-BAT J500), se decantó el sobrenadante.

3. Adaptación del paquete celular: el precipitado (células) se resuspendió en 6 mL de medio RPMI completo en caja de Petri plástica.

Las células fueron depositadas en una incubadora *Lab-line* CO₂ INCUBATOR para mantenerlas en un ritmo de crecimiento exponencial en condiciones estándar a 37 °C, 5% en volumen de CO₂ y 90% de humedad.

c. Determinación de la curva de crecimiento de las células Jurkat y RPMI.

Este procedimiento se condujo para cada línea celular previo al diseño de los ensayos de viabilidad, permite determinar si la densidad inicial del inóculo se encontraba en condiciones de crecimiento exponencial. Para ello se llevaron a cabo 2 experimentos por triplicado, que consistieron en:

- a) Se sembraron las células (Jurkat y RPMI) en placas de 24 pozos en medio de cultivo RPMI-1640 a una concentración de 2×10^4 células/1.5 mL/pozo e incubadas a 37° C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Se permitió a las células proliferar de forma exponencial durante 7 días.
- b) A intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h de incubación se recuperó el contenido de tres pozos y se determinó la densidad celular en cada uno de ellos mediante su recuento. Depositando 10 µL de medio de cultivo en una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad, y utilizando un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Axiostar Plus), el número de células/mililitro se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células por mL} = \frac{C}{X} \times 10,000 \quad (\text{ec. 1})$$

donde:

- C = Número de células contadas en los cuadrantes
10,000 = Factor de volumen (superficie x profundidad)
X = Número de cuadrantes contados (generalmente 5)

A partir de los ensayos preliminares, mediante los recuentos celulares, se establecieron los periodos de tratamiento para los ensayos de viabilidad.

3.3.1 Ensayos de viabilidad celular.

Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo en 2 fases:

Fase 1.

Determinación de la citotoxicidad del fármaco 6-Mercaptopurina en los cultivos celulares Jurkat y RPMI.

Los ensayos de citotoxicidad con 6-Mercaptopurina se llevaron a cabo mediante el tratamiento de las células con 3 dosis, 0.5, 1.0 y 2.0 μL , de una solución 3 mM del fármaco, que de acuerdo con Ganeshkumar y col. [20] ha mostrado efecto inhibitorio en células cancerígenas HEP-2, los cuales consistieron en:

- a) Protocolo para células Jurkat.
 - Las células en fase de crecimiento exponencial se depositaron en 4 placas de 24 pozos, a una densidad de 2×10^4 células/1.5 mL/pozo y se preincubaron durante 24 h a 37°C , 5% CO_2 y 90% de humedad.
 - Transcurrido el periodo de adaptación de las células al recambio de medio de cultivo, se inocularon por triplicado tres de las placas con las dosis del fármaco propuestas a intervalos de 24, 72 y 120 h. Como control negativo se utilizó la cuarta placa con el cultivo celular sin tratamiento.
 - Tras un periodo de exposición de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h al fármaco se recuperó el contenido de tres pozos y se determinó la densidad celular en cada uno de ellos, mediante su recuento en cámara de Neubauer empleando la ecuación (1).

b) Protocolo para células RPMI.

El ensayo se realizó empleando las mismas dosis del fármaco, mediante un protocolo idéntico al desarrollado en células Jurkat, variando los intervalos de tratamiento y cuantificación, como se describe a continuación:

- La dosificación se realizó cada 48, 96, 144, 192 y 240 h.
- El efecto de los tratamientos se monitoreo cada 48, 96, 144, 192, 240 y 288 h, a través de los recuentos celulares.

Fase 2.

Tratamiento de las células con el complejo NPsAu-6Mp y NPsAu.

Con la finalidad de comparar las respuestas a los tratamientos, siguiendo los protocolos descritos en la fase 1, se inocularon paralelamente 4 placas de 24 pozos por cada línea celular. Tras el periodo de adaptación de las células, fueron inoculadas con una dosis de 1.6 μ L de las formulaciones NPsAu-6Mp y NPsAu a una concentración de 1.2 mM. Esta concentración se eligió en base a lo reportado por Viudez y col. [32] y Ganeshkumar y col. [34].

Se emplearon células sin ningún tratamiento como control negativo de toxicidad (100% viables) y, como control positivo de toxicidad, células expuestas a la solución 3 mM de 6-Mercaptopurina a una dosis de 0.5 μ L. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad, normalizados respecto al control negativo.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1 BIOSÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.

4.1.1 Obtención del extracto por pulverización.

Como resultado del tratamiento realizado al nopal fresco se obtuvo un polvo fino de color verde claro, con bajo contenido de humedad y un rendimiento de 0.88% por cada 100 g de biomasa. Estos resultados presentan un porcentaje de recuperación similar a lo reportado por Sepúlveda y col. [53] que alcanzaron un rendimiento del 1.3 a 0.6%, mediante el método de macerado con tratamiento térmico, mientras que Cárdenas y col. [52] lograron porcentajes de 0.3 a 1.0 % de extracto, utilizando el método de extrusión.

4.1.2 Caracterización del extracto por microscopía electrónica de barrido.

Una muestra de los polvos obtenidos en la extracción se caracterizó mediante MEB, en el modo de electrones secundarios de bajo ángulo (LEI). La Figura 4.1 (a) presenta una micrografía a una magnificación de 500X. En ella, se observa una partícula con una morfología tipo agregado grueso, que está conformada por partículas esféricas más pequeñas de diferentes tamaños. Algunos autores [66-67], proponen que la aglomeración se debe a efectos electrostáticos y fuerzas de Van der Waals al momento de la atomización, lo que provoca que las partículas individuales se unan para formar aglomerados. Así mismo, se ha reportado que estas partículas tienden a colapsar debido a la pérdida de humedad [61]. Debido a esto, en la imagen se observa el hinchamiento de las mismas ocasionada por la adsorción de agua, así como el alisamiento de sus superficies.

Se realizó un análisis químico por –EED a la partícula en la región que indica la flecha de la Figura 4.1 (a). Se ha reportado [51-54] que el nopal presenta un contenido elevado de minerales en forma de oxalato de calcio, carbonato y nitrato de potasio; y en menor concentración, de fosfato cálcico, sulfato magnésico y cloruro sódico. De acuerdo con Hart y col. [68], al someter el material vegetal a temperaturas de 700 °C los minerales contenidos en él se volatilizan apreciablemente, y se pierden casi por completo a 900 °C. En la Figura 4.1 (b) se presentan los porcentajes atómicos de los elementos detectados. El análisis químico reveló que el extracto contiene un porcentaje alto de potasio, así como de calcio, magnesio, silicio, fósforo y cloro. La presencia de estos elementos se atribuye entonces, de acuerdo a lo

mencionado anteriormente, a los minerales contenidos en el nopal, ya que la temperatura empleada durante la obtención del extracto fue de 130 °C. También, se observa la presencia de zinc y cobre (Figura 4.1(c)), estos dos elementos no se asocian a la composición de la muestra, ya que su presencia es debida a la aleación de la que está fabricada el portamuestras.

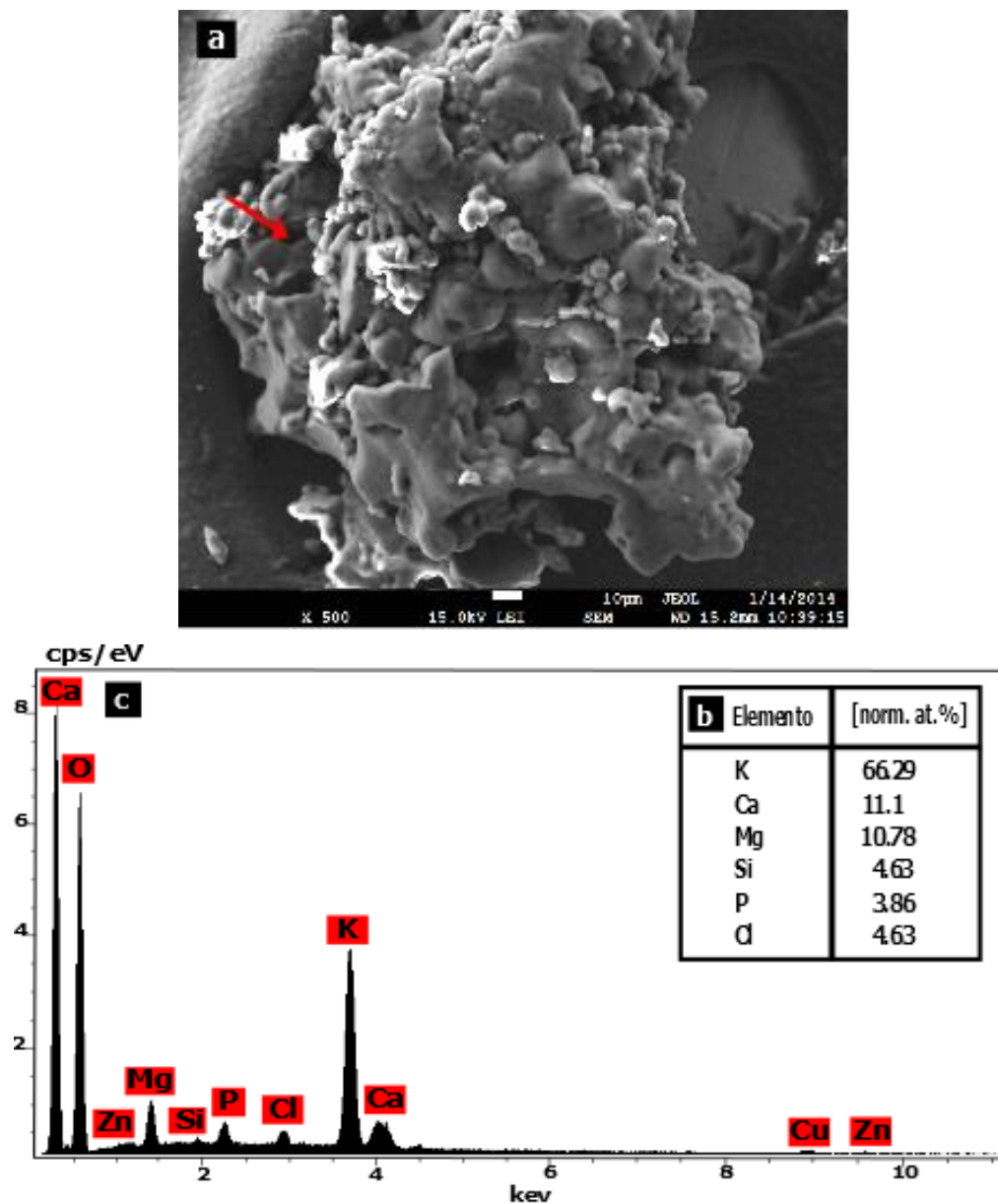


Figura 4.1. (a) Micrografía por MEB de la muestra pulverizada del extracto de nopal, (b) porcentajes atómicos y (c) análisis químico por EED.

4.1.3 Cuantificación del ácido ascórbico en el extracto pulverizado de nopal.

El contenido de ácido ascórbico en el extracto se cuantificó mediante el método de Tillmans.Keller [65], la titulación realizada indicó que hay 2.8 mg de ácido ascórbico por gramo de nopal pulverizado. Este valor se encuentra en concordancia con la tasa de recuperación esperada para el método de extracción aquí utilizado (30 al 40%, ver tabla 3.1), y también en relación a lo reportado por Cárdenas y col. [53] en mucilago de nopal (8 mg por cada 100 g de nopal fresco).

4.1.4 Síntesis de las nanopartículas de oro.

El proceso de síntesis a partir de las soluciones del extracto y el ácido tetracloroaurico, se manifiesta por el cambio de coloración de la mezcla inicial, que primero es de color verde claro (Figura 4.2 (a)), para, después de 5 min, pasar al color gris (Figura 4.2 (b)); de gris a morado intenso al cumplir 11 min de reacción (Figura 4.2 (c)) y, de morado intenso a rojo rubí 3 min después(Figura 4.2 (d)). Se conoce que el color rojo rubí es debido a la presencia de las nanopartículas de oro, como las reportadas por Suman y col. [47]. Así mismo, Noruzi y col. [48] al usar extracto acuoso de pétalos de *Rosa hybrida* y HAuCl_4 , reportan el cambio del color inicial a rojo rubí en los primeros minutos de reacción.

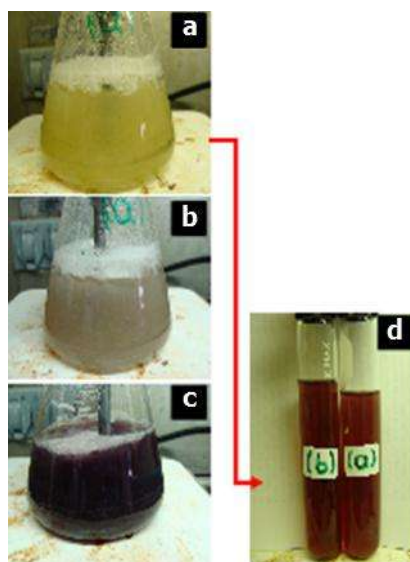


Figura 4.2. Proceso de síntesis de las nanopartículas de oro a partir de los precursores. (a) Después de 30 s de reacción. (b) 5 min, (c) 13 min y (d) 16 min. El color rojo-rubí (d) indica la presencia de nanopartículas de oro.

4.1.5 Caracterización de las nanopartículas de oro.

a. Espectroscopia Ultravioleta-visible.

En la Figura 4.3 se presenta el espectro de absorción de UV-vis de la suspensión de nanopartículas, el pico de absorción a 540 nm está asociado a las nanopartículas de oro [16]. La longitud de onda de este pico de absorción corresponde al color verde, que al ojo humano aparece con el color complementario, es decir, rojo [12]. La diferencia en color apreciada, respecto al oro metálico a granel, es debida a la resonancia del plasmón superficial. Cuando la RPS se desplaza a longitudes de ondas mayores, se sabe que es debido a la agregación de las nanopartículas [47-48], lo que al ojo humano se tornan azuladas. Pueden observarse también en la Figura 4.3, una fuerte banda de absorción a 267 nm, y un hombro o prepico a 338 nm; que pueden ser atribuidos a la presencia de productos y/o reactivos de la síntesis [59, 64]. A diferencia de la resonancia exhibida por las nanopartículas de oro, que es un fenómeno electromagnético, los picos de absorción a 267 y 338 nm son expresión de las vibraciones de los grupos cromóforos del ácido ascórbico y cloruro áurico, respectivamente; los cuales se unen mediante un enlace covalente, dando origen a transiciones electrónicas apreciables únicamente en la región del espectro UV cercano [69].

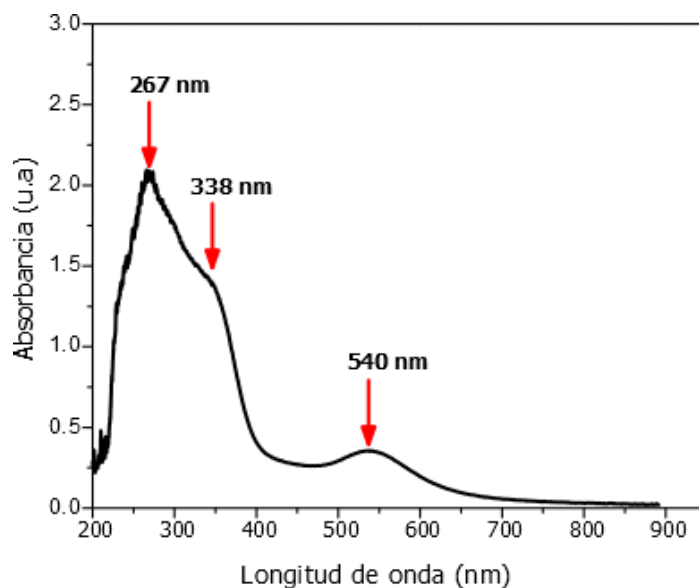


Figura 4.3. Espectro de UV-vis de la suspensión de NPsAu.

b. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

En la Figura 4.4 (a), se presenta la micrografía obtenida en el modo de electrones retrodispersados (eR), por contraste de número atómico (COMPO), a una magnificación de 10,000X. En ella se observan las NPs_{Au}, que aparecen de color claro, embebidas en un sustrato orgánico poroso. De acuerdo con Mercer y col. [70], este sustrato está formado por los restos de los tubos cribosos del floema de la penca de nopal. La Figura 4.4 (b) corresponde a una magnificación a 30,000X de la zona indicada en la micrografía 4.4. (a), en ella se observa que el diámetro de las partículas es menor a 100 nm. Empero, a esta resolución no es posible determinar con precisión la morfología de éstas. Con la finalidad de constatar la composición química de estas entidades, se realizó un análisis químicos por EED en la zona marcada en la Figura 4.4 (b). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.4 (c), donde se pueden apreciar varios elementos como consecuencia de la presencia de los residuos sólidos del extracto (Cl, Mg, K, O). La presencia de C es atribuida a la película de carbono amorfo utilizada para fijar la muestra y a los compuestos orgánicos de la misma. Y, las señales de oro detectadas corresponden a la composición de las nanopartículas observadas.

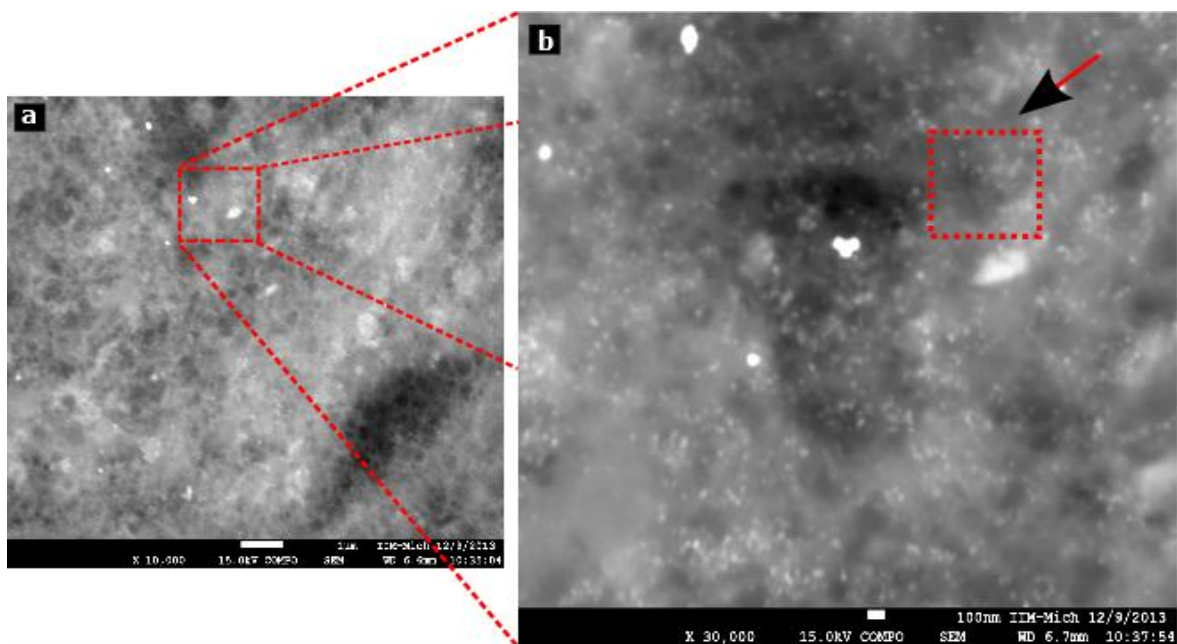


Figura 4.4. Imágenes de MEB (eR) de la suspensión coloidal, (a) magnificación de 10,000 X, (b) 30, 000 X, de la zona seleccionada en (a).

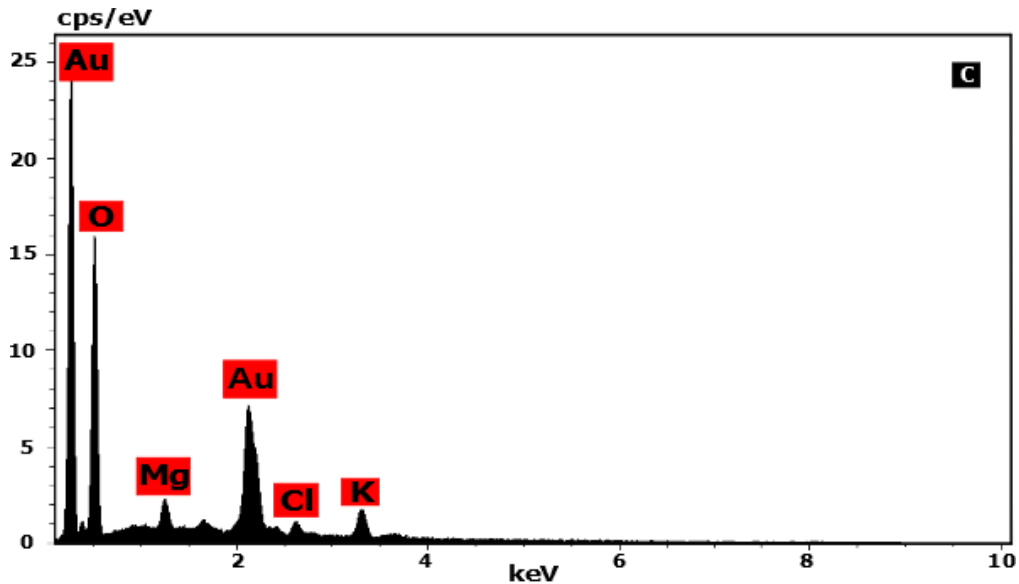


Figura 4.4. (c) análisis químico puntual por EED de la zona indicada en la Figura 4.4 (b).

c. Microscopía electrónica de transmisión.

La morfología de las nanopartículas se estudió mediante MET. En la Figura 4.5 (a), se presenta una micrografía de campo claro a una magnificación de 50,000X, en ella se observan nanopartículas dispersas con forma esferoidal y menores a 100 nm. Con respecto a la micrografía de la misma zona, pero en la modalidad de campo oscuro, Figura 4.5 (b), se observa que solo algunas de las nanopartículas exhiben un contraste intenso. Esto se debe a que en las partículas, que son policristalinas, no todos los cristalitos que las constituyen se encuentran en la misma orientación respecto a la dirección del haz de electrones, por lo que presentan diferentes condiciones de difracción. De tal manera que aquellos que se encuentran en condición de difracción, ocasionan que las partículas se vean más brillantes, mientras que el resto, se distinguen tenuemente. También se aprecia en la figura 4.5 (b) que las nanopartículas están cubiertas por una capa orgánica, que es posible observar, debido a que el contraste en la imagen está relacionado con la diferencia en número atómico. De modo que pueden distinguirse tanto las nanopartículas de oro como la materia orgánica que integran la muestra, ya que dispersan los electrones de forma distinta, es decir, presentan diferente condición de difracción [70-73].

Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis químico por espectroscopia de energía dispersiva en la misma zona, que corresponde a la Figura 4.5 (c). El cual confirma la

naturaleza metálica de las nanopartículas y, que el resto de los elementos detectados, corresponden a los residuos del extracto de nopal. Cabe mencionar que a diferencia del análisis químico realizado por MEB, que es puntual, el análisis EED en MET determina los elementos presentes en el cuadrante observado, cuyos resultados corroboran los obtenidos por las técnicas de microscopía de electrónica de barrido y espectroscopía de UV-vis.

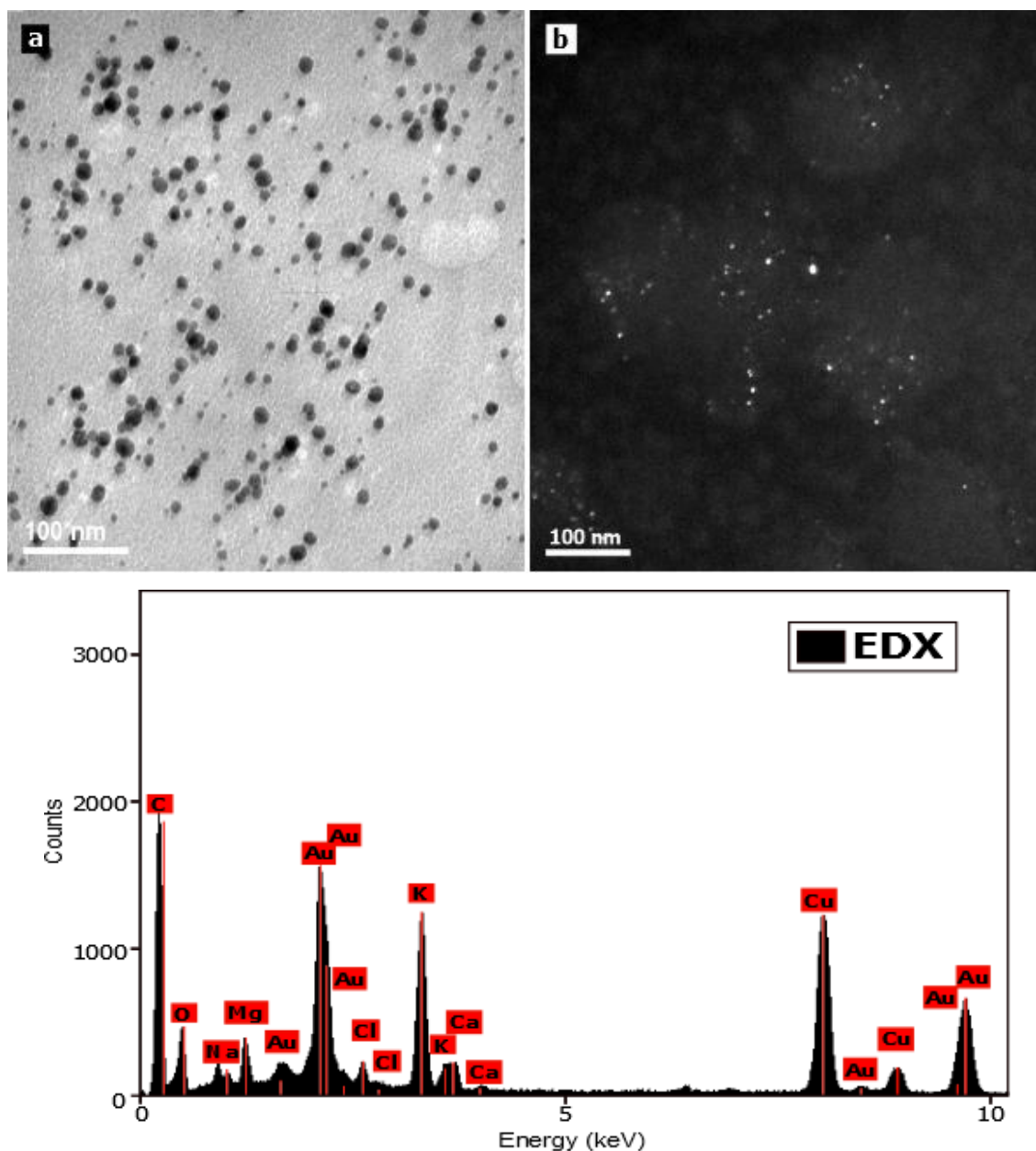


Figura 4.5. (a) Imágenes de campo claro, (b) campo oscuro, por MET, con una magnificación de 50,000X, de la suspensión coloidal, (c) análisis químico por EED de la zona observada.

Las Figuras 4.6 (a, c, e), corresponden a micrografías de campo claro a una magnificación de 78,000X (a) y 99,000X (c, e), tomadas en diferentes zonas de la muestra. En las que se observan grupos de nanopartículas esféricas de tamaños diversos, pero todas menores a 50 nm. Se muestran también los histogramas correspondiente (4.6 (b, d, f)) de las distribuciones de los tamaños de las NPsAu, los cuales se obtuvieron mediante el análisis de las micrografías utilizando un programa de procesamiento de imagen (ImageJ).

En el histograma, Figura 4.6 (b), que corresponde a la micrografía de la Figura 4.6 (a), se encuentran mediciones que van desde los 3 hasta los 23 nm. Sin embargo la valor modal (m) más frecuente se encuentra alrededor de los 7 nm, aproximadamente el 65% del total de las mediciones, y de acuerdo con el coeficiente de curtosis estimado, $g_2 = 1.4$, corresponde a una distribución leptocúrtica con simetría positiva; con una media muestral $\bar{x} = 8$ nm y una desviación estándar muestral $s = 3$ nm. En la Figura 4.6 (d) se observan las mediciones realizadas en la Figura 4.6 (c), que presenta mediciones comprendidas entre 2 a 11 nm, en la que los diámetros más observados son 7.5, 5.5, 6.5 y 4.5 nm, dando como resultado una distribución multimodal mesocúrtica, con un $g_2 = 0.5$, una $\bar{x} = 7$ nm y $s = 3$ nm. La Figura 4.6 (f) muestra las mediciones realizadas en la Figura 4.6 (e), en la que se aprecia que los diámetros exhiben una distribución con simetría mesocúrtica, cuyo g_2 es de 0.3, una \bar{x} de 7 nm y $s = 2$ nm; aunque, las dimensiones donde se concentran cerca del 35% de las partículas están alrededor de 5.5 y 7.5 nm.

Por último, al estimar la distribución muestral de \bar{x} dio como resultado un valor esperado $[E(\bar{x})]$ de 7.3 nm, con una desviación estándar de $\bar{x}(\sigma_{\bar{x}})$ de 2.7 nm. Es decir, el tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas es 7 nm, con una desviación estándar de 3 nm. Por lo que, de acuerdo con estos análisis es posible decir que se cuenta con una distribución de diámetros monodispersa. Las nanopartículas obtenidas por la metodología propuesta presentan diámetros inferiores a los obtenidos en otros trabajos, como por ejemplo, el de Suman y col. [47], quienes obtuvieron nanopartículas de oro con una distribución de tamaños de 12 a 38nm, empleando extracto de *Morinda citrifolia*, así como Noruzi y col. [48], que reportan la síntesis de nanopartículas de oro con diámetros alrededor de los 15 a 40 nm, utilizando el extracto acuoso de pétalos de *Rosa hybrida*.

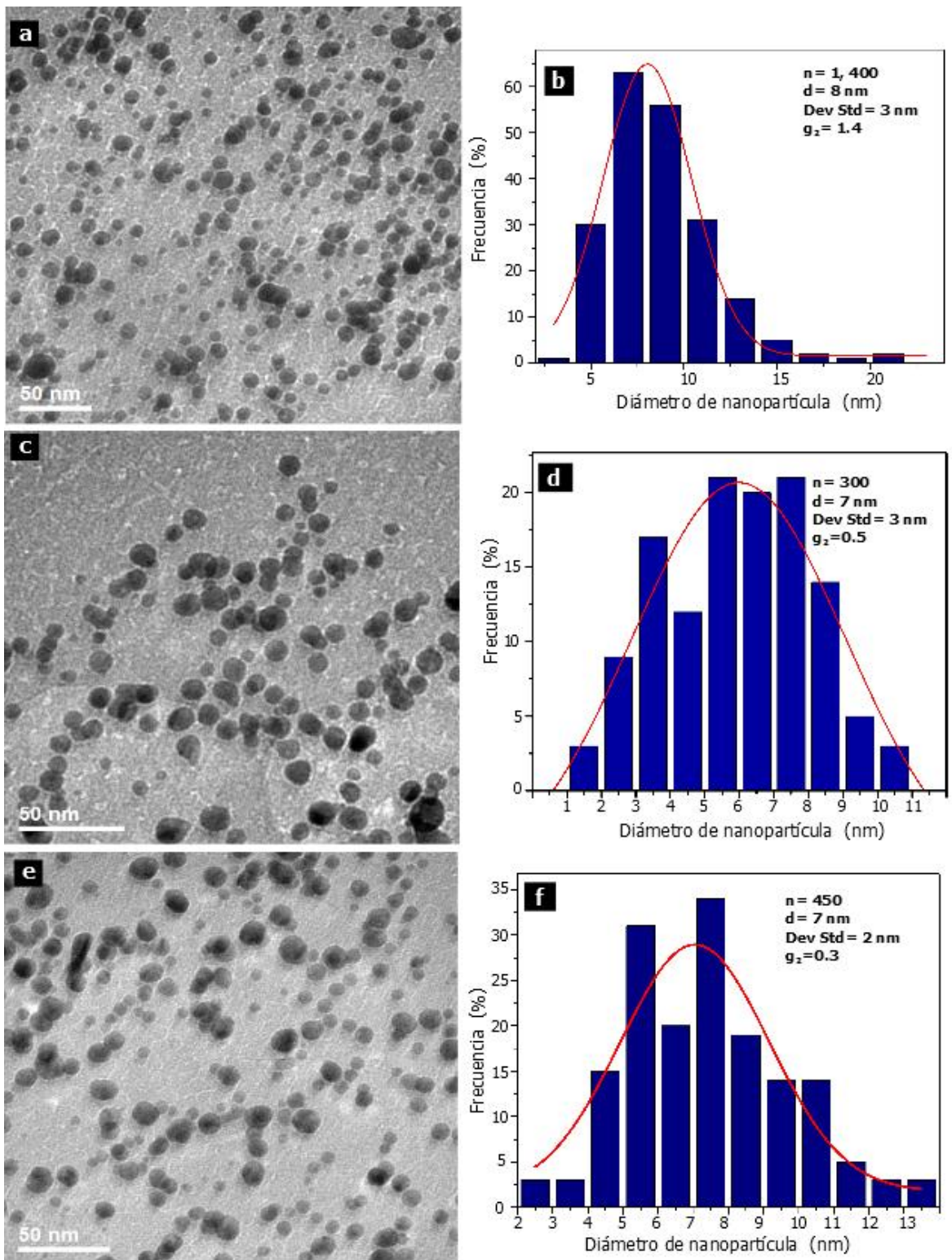


Figura 4.6. (a, c, e) Micrografías de campo claro con una magnificación de 99,000 X, obtenidas por MET, en las cuales se observan cúmulos de nanopartículas de oro, cuya forma corresponde a la esferoidal. (b, d, f) Estadística descriptiva de los tamaños de partículas observados en (a, c, e, respectivamente).

En la Figura 4.7 (a) se presenta una micrografía de campo claro a una magnificación de 185,000X, donde se observan nanopartículas esféricas con diámetro menor a 20 nm. Si bien se observan algunos pequeños cúmulos de nanopartículas en las zonas indicadas con flechas, estas no se encuentran aglomeradas, como se aprecia en su correspondiente imagen de falso color. En la Figura 4.7 (b), se asigna a los electrones con menor profundidad de penetración el color azul y el rojo a aquellos con mayor capacidad de penetración en la muestra. Se sabe que, cuando una onda pasa de un medio a otro sufre un efecto de amortiguamiento, llamado absorción. De este modo, a medida que la onda penetra en el medio es generalmente atenuada, ya que depende de la profundidad de penetración de la misma. Así, se tiene que para que un material sea transparente, la profundidad de penetración de la onda debe ser más grande que el espesor del material. Sin embargo, la profundidad de penetración para metales es excesivamente pequeña [71]. Es por ello, que en la Figura 4.7 (b) las zonas donde las nanopartículas se acumulan (indicadas con flechas) adquieren un marcado contraste oscuro. Ahora bien, la moderada aglomeración observada se puede evitar mediante el tratamiento de la muestra en baño de ultrasonido.

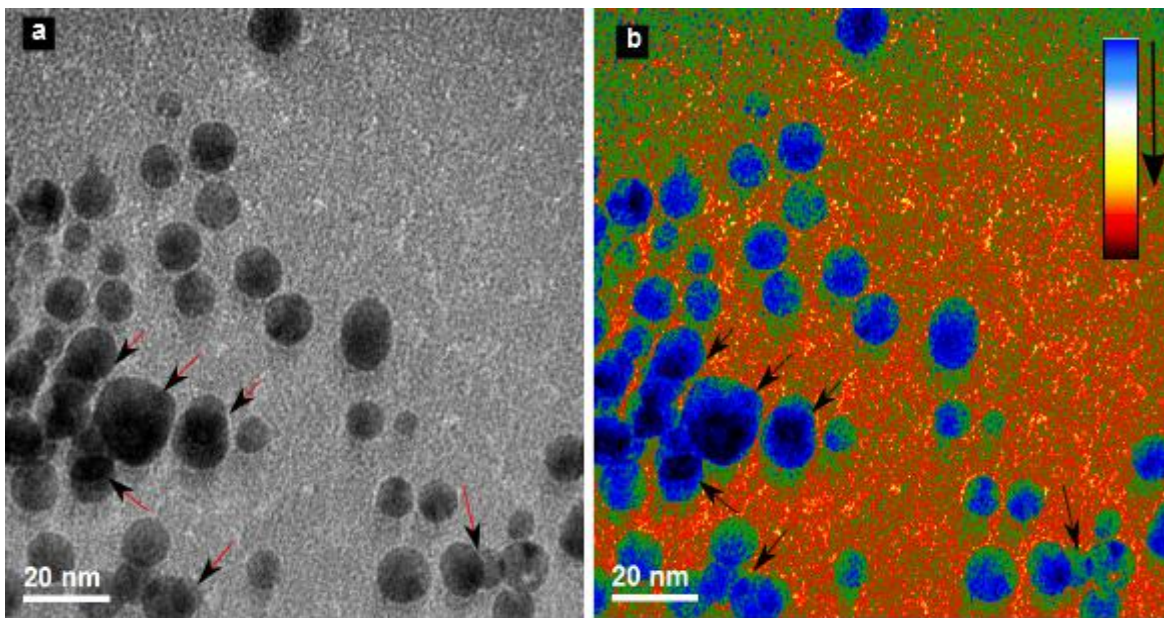


Figura 4.7. (a) Micrografía de campo claro obtenida por MET, a una magnificación de 185,000X, donde se pueden observar cúmulos de nanopartículas de forma esférica. (b) Imagen de falso color de la micrografía (a), donde se observa el contraste asociado al espesor de la muestra.

En las Figuras 4.8 (a, b), se presentan imágenes obtenidas mediante MET con una magnificación de 690,000X, acompañadas de sus respectivas imágenes de superficie en falso color (Figuras 4.8 (c, d)). Estas micrografías ratifican la morfología esférica de las nanopartículas, así como el hecho de que no presentan coalescencia. Donde lo indican las flechas, no se aprecian los cuellos de botella típicos, que se dan por la difusión de átomos que se genera en la superficie de una partícula al acercarse a la vecindad de otra [73].

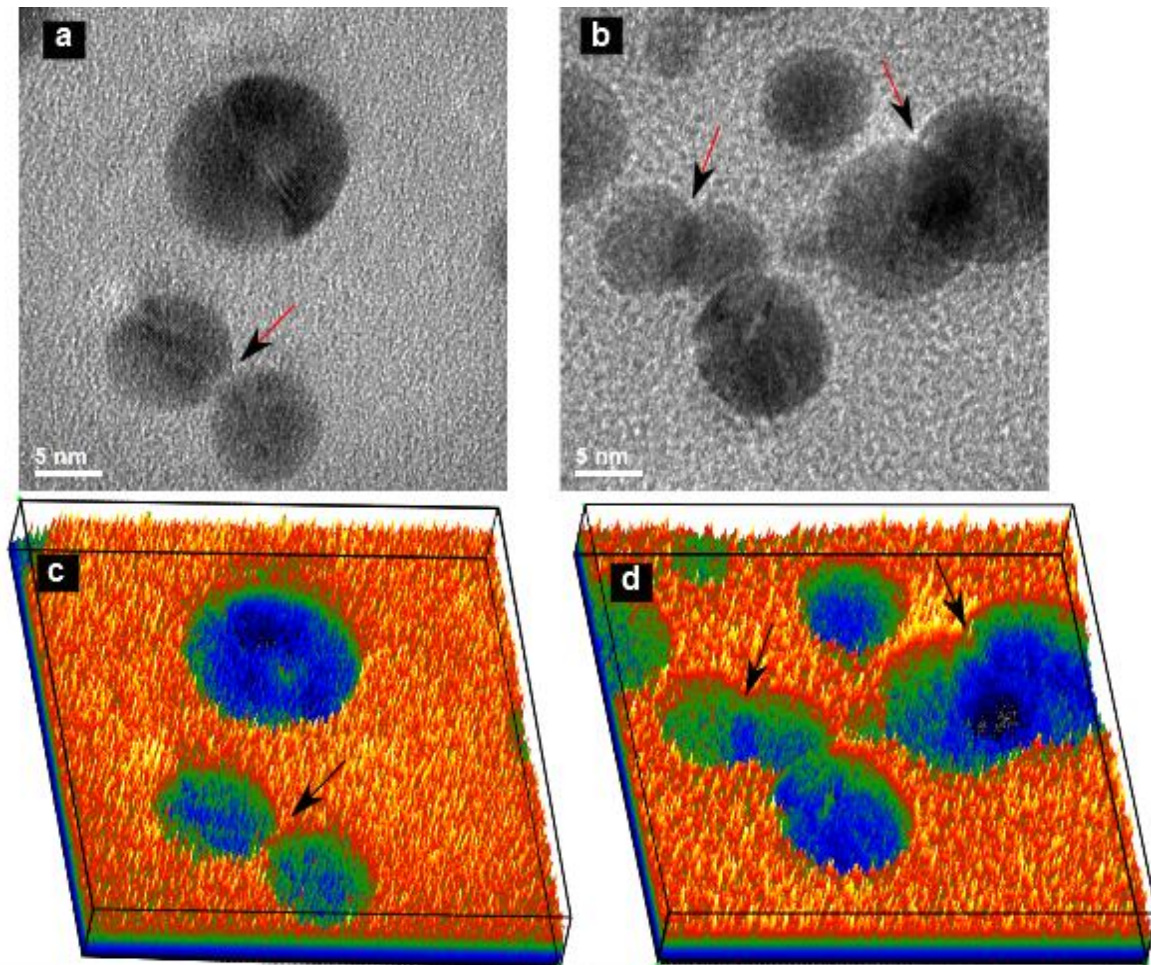


Figura 4.8. (a, b) Imágenes obtenida por MET, con magnificación de 690,000X, en la que se observa que las nanopartículas no presentan coalescencia. (c, d) Imágenes de superficie en falso color de las micrografías (a, b), donde se observa el contraste asociado al espesor de la muestra.

Por otro lado, las Figuras 4.9 (a, b), presentan imágenes de alta resolución, acompañadas de las TRF correspondientes (Figuras 4.9 (c, e)). Las dos nanopartículas seleccionadas tienen un tamaño que está alrededor de 10 nm, y en las cuales pudo ser medida una distancia

interplanar de aproximadamente 2.29 Å, que corresponde a los planos (111) de la estructura cubica fcc del oro. Así mismo, en sus respectivas TRF, el arreglo periódico de los puntos hace evidente el carácter cristalino de la partícula. Adicionalmente, en las Figuras 4.9 (a, b) se observan varias regiones que exhiben pérdida de contraste en los puntos, que de acuerdo con Rosas y col. [72], se trata de regiones que debido al empaquetamiento denso de las partículas presentan una densidad importante de vacancias. Dos regiones donde se observa la presencia de vacancias, se indican mediante flechas en las Figuras 4.9 (d, f).

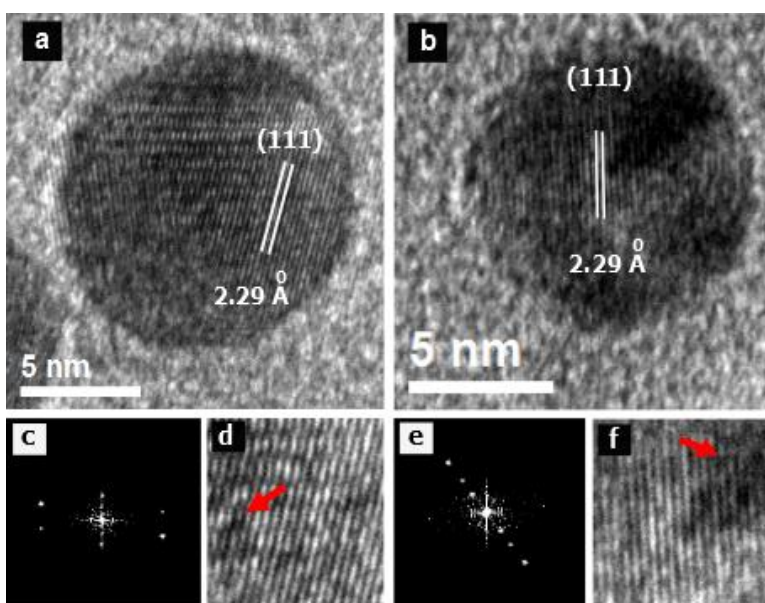


Figura 4.9. (a, b) Micrografías de alta resolución de nanopartículas mostrando una distancia interplanar de 2.29 Å. (c, e) TRF de las imágenes (a, b). (d, f) Segmentos de las imágenes filtradas tomadas de (a, b).

Las Figuras 4.10 (a, b) muestran imágenes de alta resolución a una magnificación de 880,000X, en las cuales se observan nanopartículas que presentan patrones de *Moiré*, debido a que los cristalitas que constituyen las partículas difieren ligeramente en orientación quedando sobrepuestos; por lo que, la imagen de campo claro de estos patrones resultan de la interferencia entre el haz doblemente transmitido y el haz doblemente difractado por los cristalitas que conforman las nanopartículas [71]. En la Figura 4.10 (a) se aprecian dos nanopartículas con tamaño menor a los 5 nm, sin embargo, no fue posible apreciar alta resolución debido a que estas no se encontraban en condición de difracción.

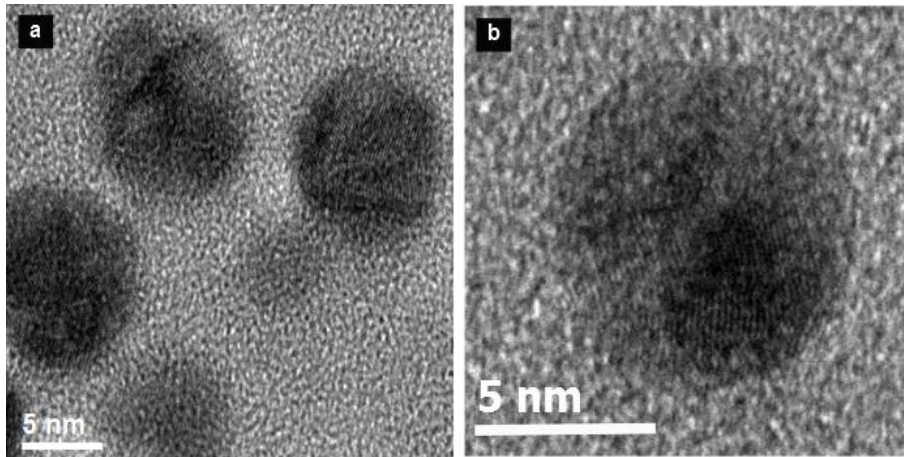


Figura 4.10. (a, b) Imágenes de alta resolución obtenidas en MET, en la que se aprecian nanopartículas que presentan patrones de *Moiré*.

Las Figuras 4.11 (a, b) presentan imágenes de alta resolución con una magnificación de 690,000X (a) y 880,000X (b). En la imagen del inciso (a) se observa una nanopartícula de forma ovalada que presenta reconstrucción superficial. El oro es un metal cuyas superficies presentan reconstrucción, es decir la última capa del metal tiene un arreglo periódico diferente a las capas del seno del cristal [10]. Este fenómeno se debe a que los átomos de la superficie del metal poseen un índice de coordinación distinto a los átomos del seno, por lo que se crea un defecto de densidad electrónica en esa zona superficial. Este defecto de densidad electrónica lo puede compensar el metal aumentando la densidad atómica en la superficie, en algunos casos sin cambiar la periodicidad con respecto al seno y en otros, cambiando dicha periodicidad. En el primer caso, las distancias entre la capa superficial y la capa inferior son distintas a las del seno del cristal. En el último caso, se dice que la superficie de la nanopartícula, ha sufrido reconstrucción, que se presenta como forma escalonada, que pueden considerarse como una combinación de los distintos planos de base en diferentes proporciones, formando terrazas, escalones monoatómicos y recovecos en esos escalones [75]. De acuerdo con Lang y col. [76], estas superficies escalonadas presentan terrazas de átomos con la orientación correspondiente a uno de los planos de la base, separadas por escalones monoatómicos con determinado tipo de simetría, y pueden ser nombradas a partir de los índices de Miller de la terraza y el escalón. En base a lo anterior, en la Figura 4.11 (b) se aprecia con mayor claridad una nanopartícula que exhibe reconstrucción superficial

escalonada de terraza en el plano (111) correspondiente al eje de zona $[0\bar{1}1]$, acompañada de su TRF, que muestra el carácter cristalino de la partícula.

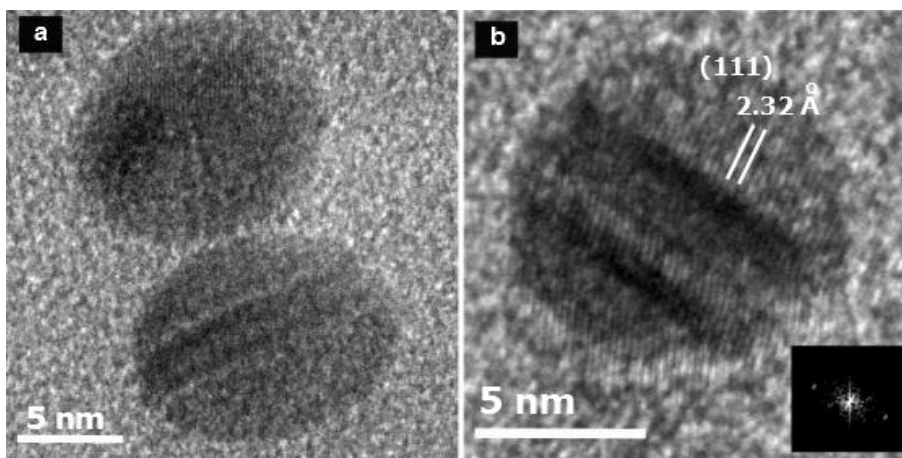


Figura 4.11. (a, b) Imágenes de alta resolución en la que se observan dos nanopartículas que presentan reconstrucción superficial.

d. Caracterización por difracción de Rayos-X.

La Figura 4.12, corresponde al patrón de difracción de la suspensión de nanopartículas. A partir del análisis del patrón de DRX, puede aseverarse que la muestra está compuesta de 3 fases. Se observaron reflexiones de Bragg correspondientes a 2θ igual a 38.2° , 44.5° , 64.7° y 77.7° , la presencia de estas intensidades ha sido reportada también por Suman y col. [32]. Los picos observados se asocian a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura fcc del oro, que se indexan con la tarjeta JCPDS# 01-071-4615. Además, fueron localizados picos correspondientes a la silvita (KCl) y clorato de sodio (NaClO_3), tarjetas JCPDS#01-073-0380 y JCPDS#01-074-0900, respectivamente. Como se aprecia en el patrón, los picos que corresponden al oro se presentan deprimidos, esto se debe a que: a) la masa total de NPsAu es pequeña en relación a la cantidad total de muestra, por lo que se tienen menos conteos de oro y acumulan poco en la estadística, también, b) la intensidad de la señal medida en el pico de difracción está en función del tamaño de las partículas del material (volumen de interacción), y con base en las observaciones realizadas en MET, la muestra analizada consiste de partículas con tamaño promedio de 7 nm, lo que provoca no solamente que los picos se depriman, sino también su ensanchamiento; c) si la muestra es policristalina los picos se deprimen y por último, d) la presencia de más fases pueden ser otro factor, ya que pueden ocasionar que los RX queden absorbidos por estas, debido a la diferencia en número atómico

y tamaño de cristal que presenten [77]. Este hecho se corrobora al observar los picos de la silvita, los cuales son más intensos, indicando con ello que presentan un mayor tamaño de cristal así como peso atómico.

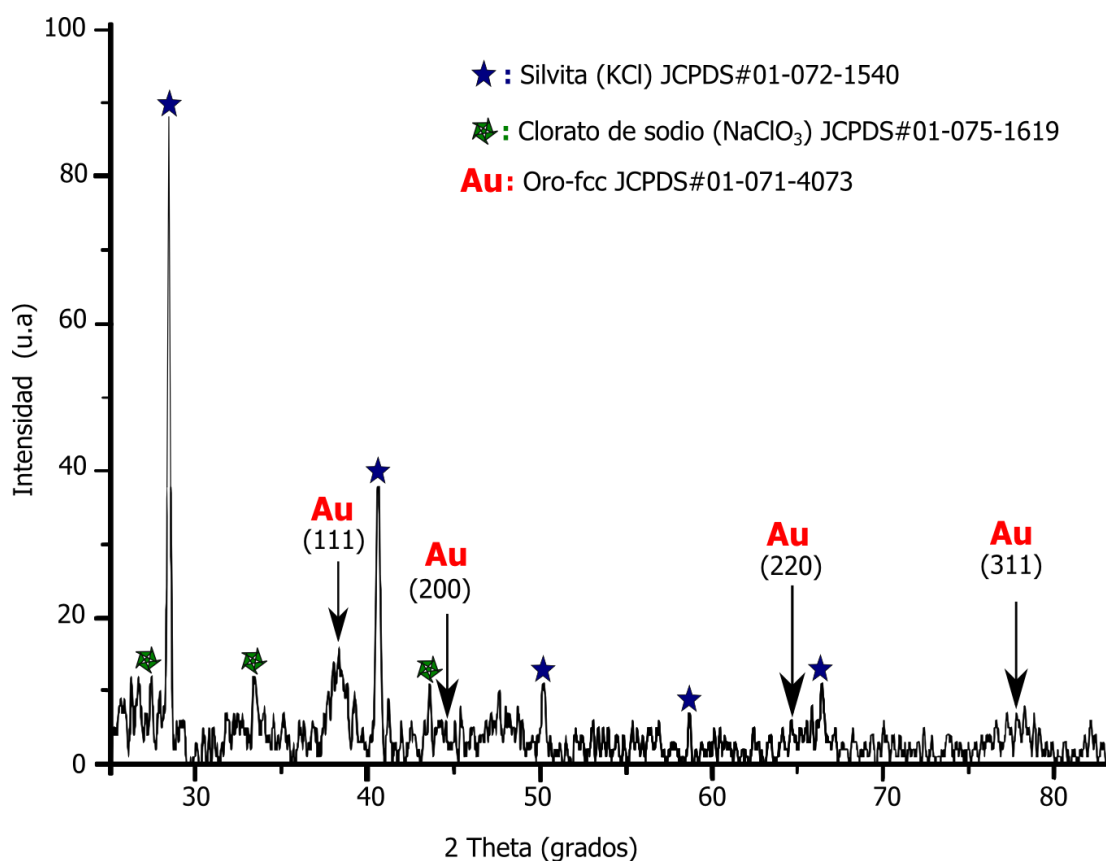


Figura 4.12. Patrón de difracción obtenido de la suspensión de las partículas.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO.

4.2.1 Conjugación de la 6-Mercaptopurina a nanopartículas de oro.

La conjugación de la mercaptopurina a la superficie de las nanopartículas de oro se manifestó al virar el color de la suspensión de rojo-rubí a morado (Figura 4.13). El cambio de coloración se atribuye a la aglomeración de las nanopartículas como resultado del remplazo de los agentes modificadores en su superficie por las moléculas del fármaco [32, 34], cabe resaltar que el proceso de conjugación se llevó a cabo de forma directa en el extracto, y que las nanopartículas en suspensión no se sometieron a procedimiento alguno de limpieza, sin que esto afectara el mecanismo de anclaje.

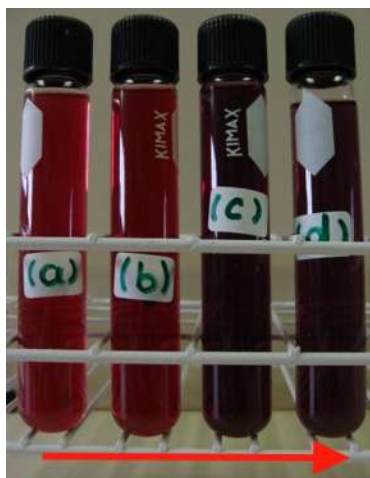


Figura 4.13. Imagen que muestra el cambio de coloración de, rojo a morado al llevarse a cabo el proceso de conjugación con 6MP.

4.2.2 Limpieza de las nanopartículas conjugadas.

Una vez conjugadas las NPsAu, se llevó a cabo su lavado para eliminar los restos del extracto y los reactivos utilizados en la funcionalización; sobre todo de las moléculas de tiol (-SH) libres, es decir la 6MP no conjugada a las nanopartículas. El proceso de lavado consistió en centrifugar la suspensión de conjugación 4 veces con dimetilformamida (DMF). Este solvente permite, por su polaridad, la disolución de las moléculas de tiol libre, pero a la vez, no forma suspensiones estables de las NPs [32]. Finalmente, las nanopartículas se resuspendieron en NaOH y se almacenaron en un recipiente transparente a 4 °C protegido de la luz, hasta su caracterización y utilización en los ensayos de citotoxicidad.

4.2.3 Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas.

a. Espectroscopía Ultravioleta-visible.

Posterior al lavado de las nanopartículas, se llevó a cabo su análisis por Espectroscopía de UV-vis, cuyo resultado se presenta en la Figura 4.14. La débil banda de absorción a 530 nm corresponde a las nanopartículas conjugadas al fármaco [31-34]. Se ha reportado que las NPsAu recubiertas por mercaptopurina, presentan una RPS claramente más débil y ancha que aquellas sin recubrir. Este hecho, se ha asociado al amortiguamiento extra en la oscilación colectiva de los electrones de conducción del oro, al formarse los enlaces con los átomos de azufre del fármaco [17, 78-79]. En algunos casos, el recubrimiento con este

fármaco incluso puede producir la ausencia de banda de absorción de plasmones de superficie en el espectro. El pico observado a 240 nm se asocia a la vibración del grupo cromóforo de la molécula de 6Mp; en tanto que, el pico a 280 nm es atribuido a la agregación de las nanopartículas debido al recubrimiento del fármaco sobre su superficie [32-34]. Además, de acuerdo con [32, 78- 79], si el análisis se lleva a cabo previo al lavado de las nanopartículas, puede aparecer una cuarta banda alrededor de los 650 nm, debido a la presencia de moléculas de tiol (-SH) libres.

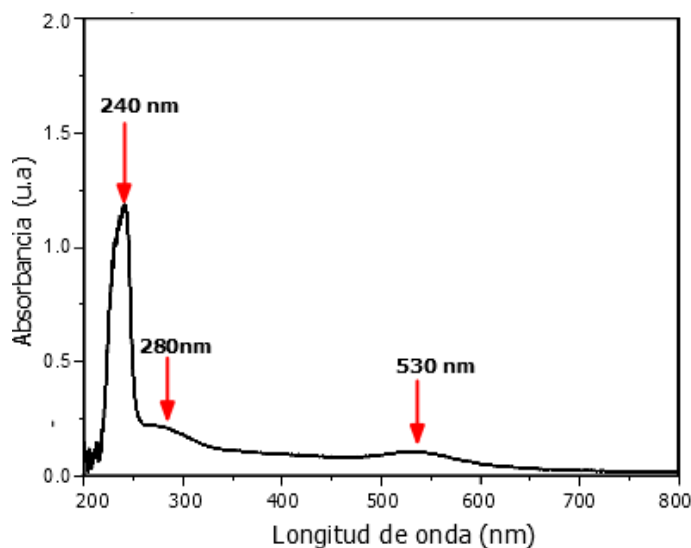


Figura 4.14. Espectro de UV-vis de la suspensión de NPs Au conjugada a la 6Mp.

b. Microscopía electrónica de barrido.

Las Figura 4.15 (a, b), corresponden a micrografías de MEB obtenidas en el modo de eR a una amplificación de 20,000X y 40,000X, de una muestra de la suspensión previa al lavado, en las cuales se aprecia a las nanopartículas nuevamente embebidas en un sustrato poroso. El análisis químico -EED realizado en la zona indicada, Figura 4.15 (c), confirmó que se trata de los remanentes del extracto de nopal. Así mismo, el análisis revelaron la presencia de azufre y nitrógeno*, el azufre corresponde al radical funcional sulfhidrilo del grupo pirimida, y el nitrógeno del grupo imidazol de la molécula 6Mp, a través de los cuales se da la unión a la superficie de la nanopartícula [32, 34, 78].

* Comparar con el análisis de la Figura 4.4, que corresponde a la suspensión de NPs Au sin funcionalizar.

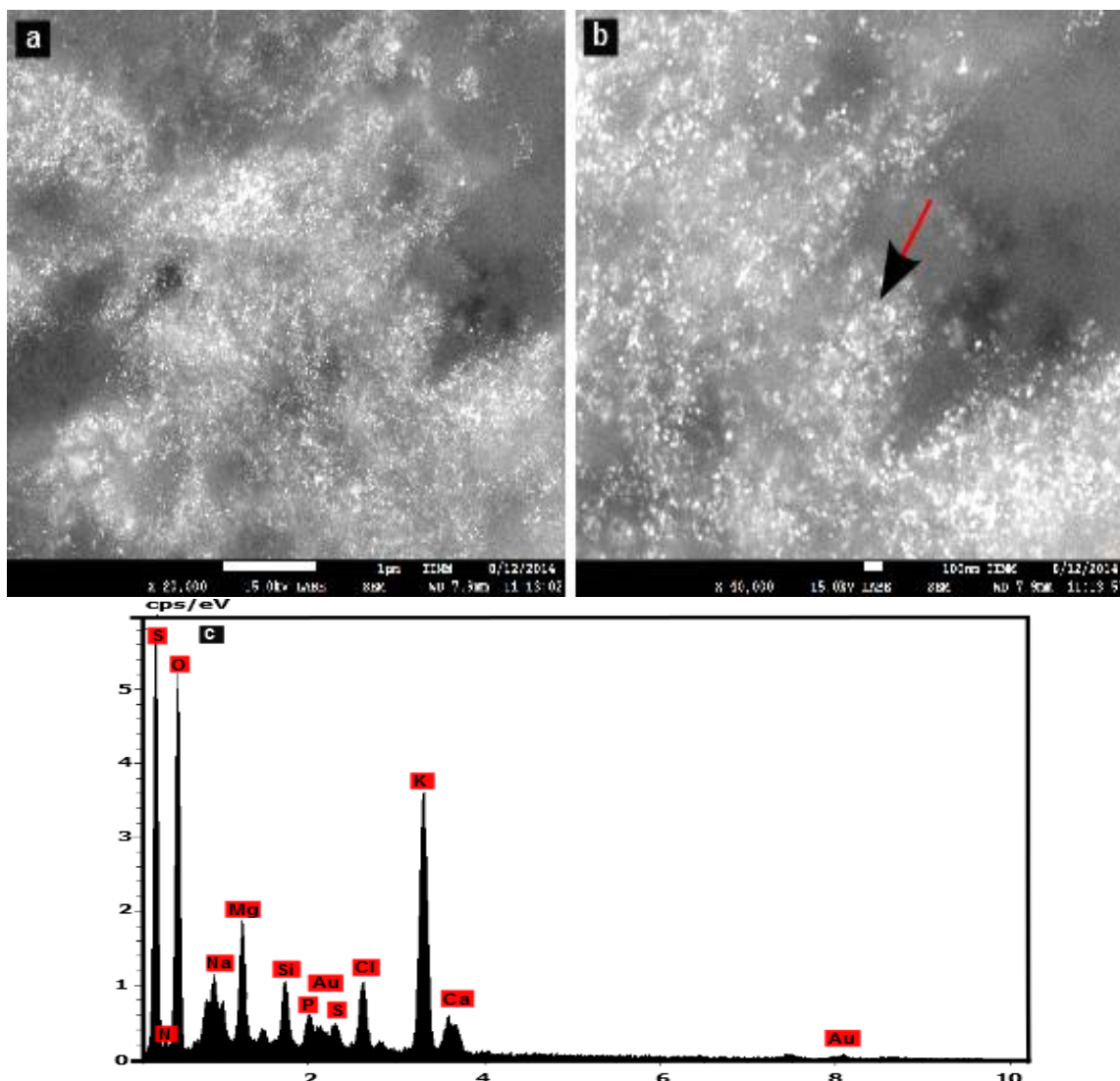


Figura 4.15. Micrografías obtenidas en MEB-eR de la suspensión de nanopartículas conjugadas a 6MP, (a) a una magnificación de 20,000X, (b) a una magnificación de 40,000X, (c) análisis químico -EED realizado en la zona indicada en la micrografía (b).

La Figura 4.16 (a-c), ilustra una serie de imágenes en el modo de electrones secundarios (eS) a una amplificación de (a) 500X, (b) 2,000X y (c) 10,000X obtenidas de la muestra después de ser sometida al proceso de limpieza. En ellas se observa un sustrato que presenta dos zonas bien diferenciadas entre sí, marcadas con los números 1 y 2. Al tomarse una micrografía en el modo de eR a una amplificación de 50,000X (Figura 4.16 (d)) de la zona 2; marcada por el recuadro de la Figura 4.16 (c). Se aprecia con mayor claridad que en este punto se encuentra depositadas las nanopartículas, las cuales están recubiertas por una capa orgánica (color claro en la imagen) [71-73]. En esta misma zona del sustrato se realizó un análisis químico.

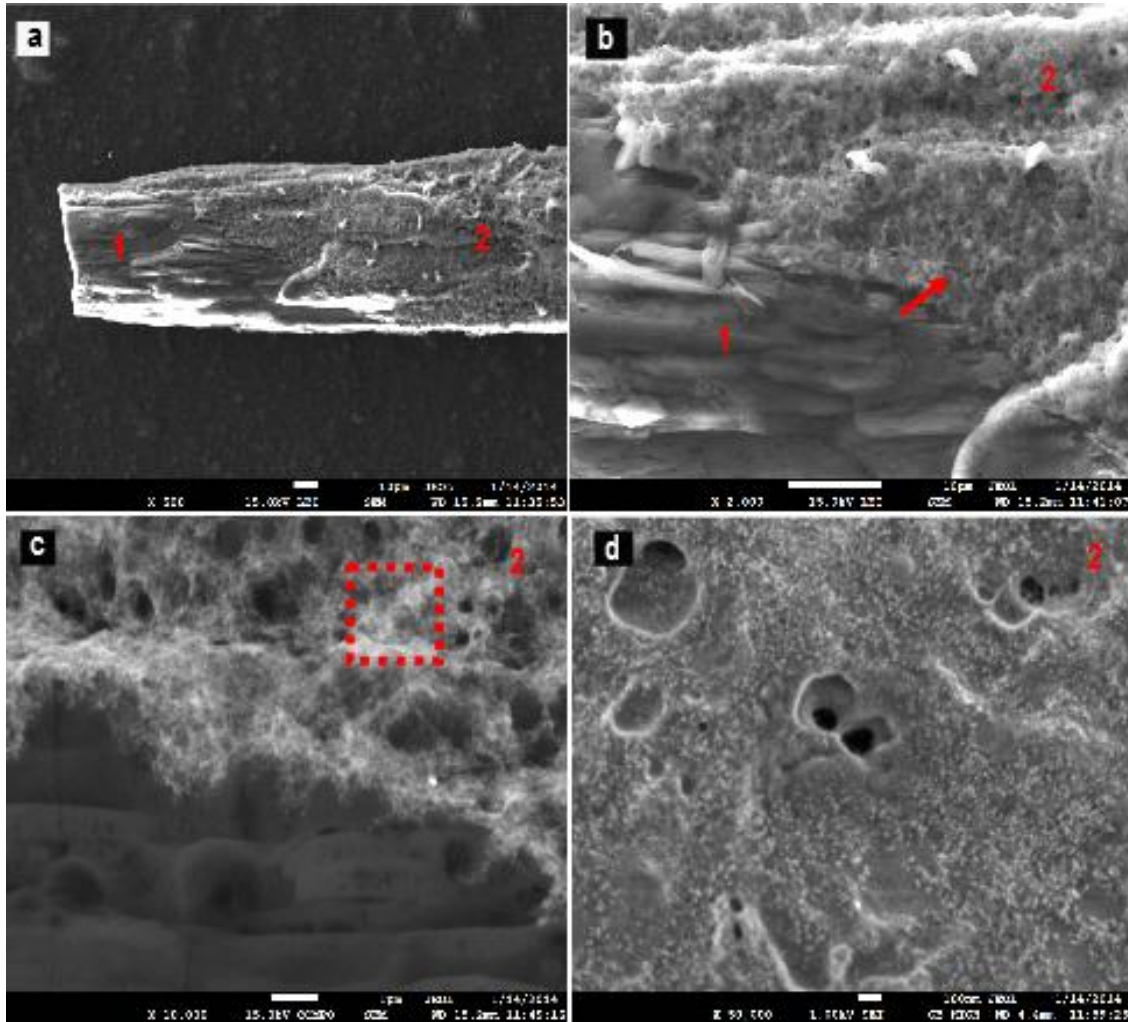


Figura 4.16. Micrografías obtenidas por MEB en el modo eS de la suspensión de NPs conjugadas a la 6MP posterior al proceso de limpieza, (a) a una magnificación de 500X, (b) 2,000X, (c) 10,000X, (d) Imagen obtenida en el modo de eR a una magnificación de 50,000X.

La Figura 4.16 (e) muestra el espectro de -EED, acompañada de los porcentajes atómicos de los elementos detectados. Aparecen las señales del Au, Si, P, K, Ca, Cl, Mg, C, O y S. Las señales del azufre apuntan a que, efectivamente, se ha dado la conjugación entre la mercaptopurina y las nanopartículas de oro [32, 34]. La presencia de Si, P, K, Ca, Cl, Mg, aún después del procedimiento de limpieza, sugiere que estas especies se encuentran adsorbidas en la superficie de la nanopartícula, por lo que es posible que el proceso de estabilización de las partículas durante la síntesis se haya dado por la vía electrostática [41, 47-79].

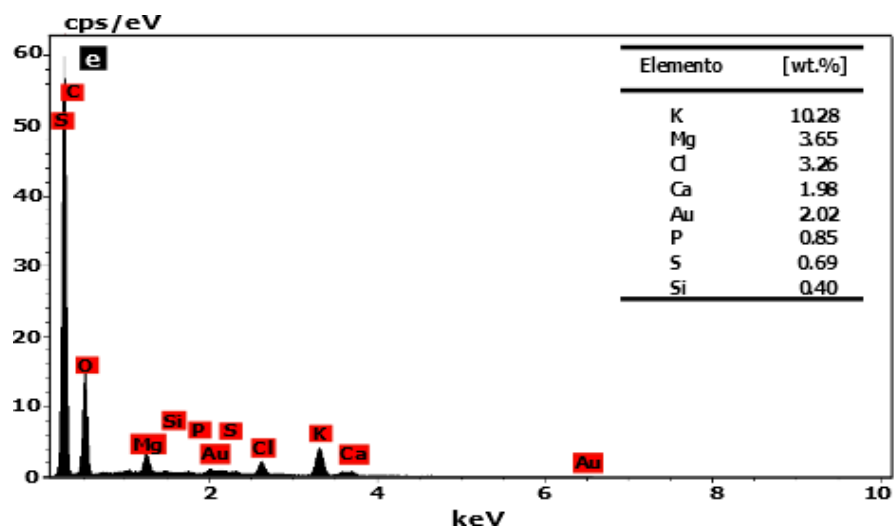


Figura 4.16. (e) Análisis químico-EED realizado en la zona indicada en la micrografía (d).

c. Microscopía electrónica de transmisión.

En la Figura 4.17 (a, b), se muestran las micrografías de MET en las modalidades de campo claro y campo oscuro de la muestra después del procedimiento de limpieza a una magnificación de 12,000X. Ambas micrografías corresponden a la misma zona de observación. En la micrografía de campo oscuro se observa con mejor contraste como las nanopartículas presentan nuevamente la capa orgánica (color claro) asociada a la presencia del fármaco.

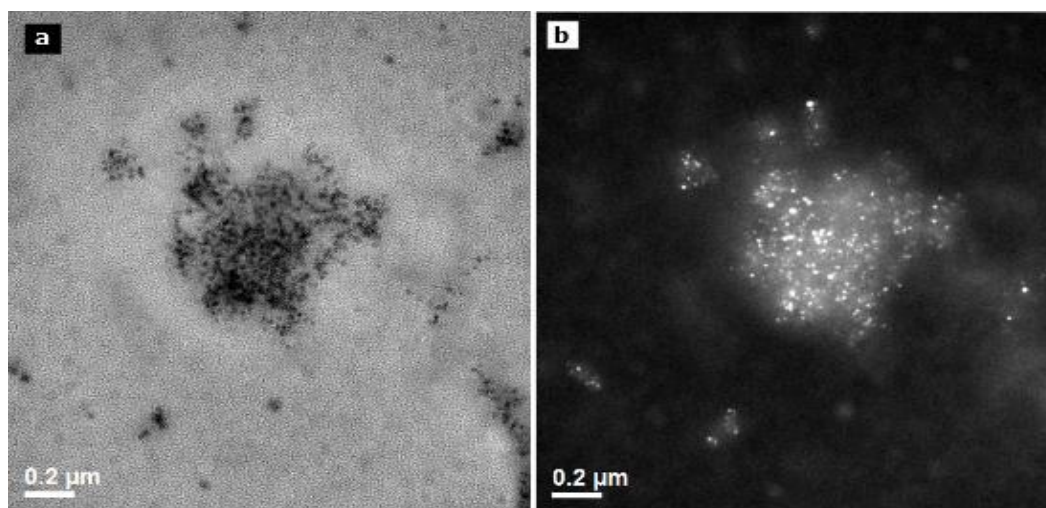


Figura 4.17. (a, b) Imágenes de campo claro y campo oscuro obtenidas por MET a una magnificación de 12,000X.

El análisis químico, presentado en la Figura 4.17 (c), revela la presencia del azufre, con lo que se corrobora el anclaje de la mercatopurina a la superficie de las nanopartículas.

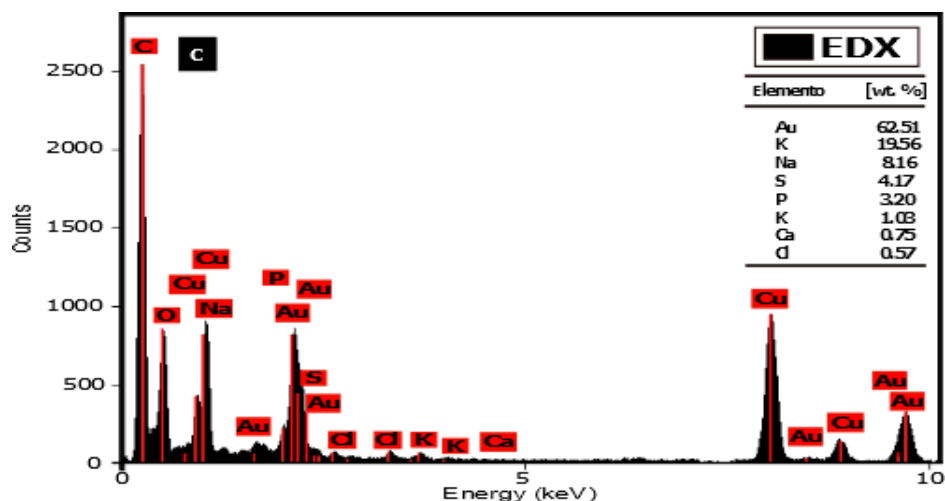


Figura 4.17. (c) análisis químico de la zona de observación.

Las Figuras 4.18 (a, c), corresponden a micrografías de MET de campo claro a una magnificación de 99,000X, tomadas en dos zonas de la muestra. En ellas se observan grupos de nanopartículas esféricas y ovaladas de tamaños diversos, con un tamaño inferior a los 50 nm. Se muestran también los histogramas (4.18 (b, d)) de las distribuciones de los tamaños de las NPsAu conjugadas a la 6-Mp. En el histograma, Figura 4.18 (b), que corresponde a la micrografía de la Figura 4.18 (a), se encuentran mediciones que van desde los 7 hasta los 23 nm, en la que los diámetros más observados son 12.5, 14, 16.5 y 18 nm, dando como resultado una distribución multimodal con simetría leptocúrtica negativa, con un $g_2 = 1$, $\bar{x}=14$ nm y $s=3$ nm. Mientras que, el histograma de la Figura 4.6 (d), de la Figura 4.6 (c), presenta mediciones comprendidas entre 6 a 23 nm, en la que el diámetro más observado es de 14.5 nm, dando como resultado una distribución con simetría normal mesocúrtica, presentando un $g_2 = 0.4$, una $\bar{x}=14$ nm y $s= 3$ nm.

Por último, al determinar la distribución muestral de \bar{x} , dio como resultado un valor esperado $[E(\bar{x})]$ de 14 nm, con una $\sigma_{\bar{x}}=3$ nm. Es decir, el tamaño promedio de las nanopartículas obtenidas posterior a la funcionalización es de aprox. 14 nm, con una desviación estándar de 3 nm, duplicando su dimensión en comparación con las nanopartículas previo al contacto de las mismas con el fármaco. Se ha reportado que el grupo sulfhidrico, también llamado tiol, presente en la molécula del fármaco, puede producir ligeros cambios en la estructura geométrica y electrónica de las NPsAu [32, 34, 78-79], de ahí el incremento en tamaño y cambio en las nanopartículas.

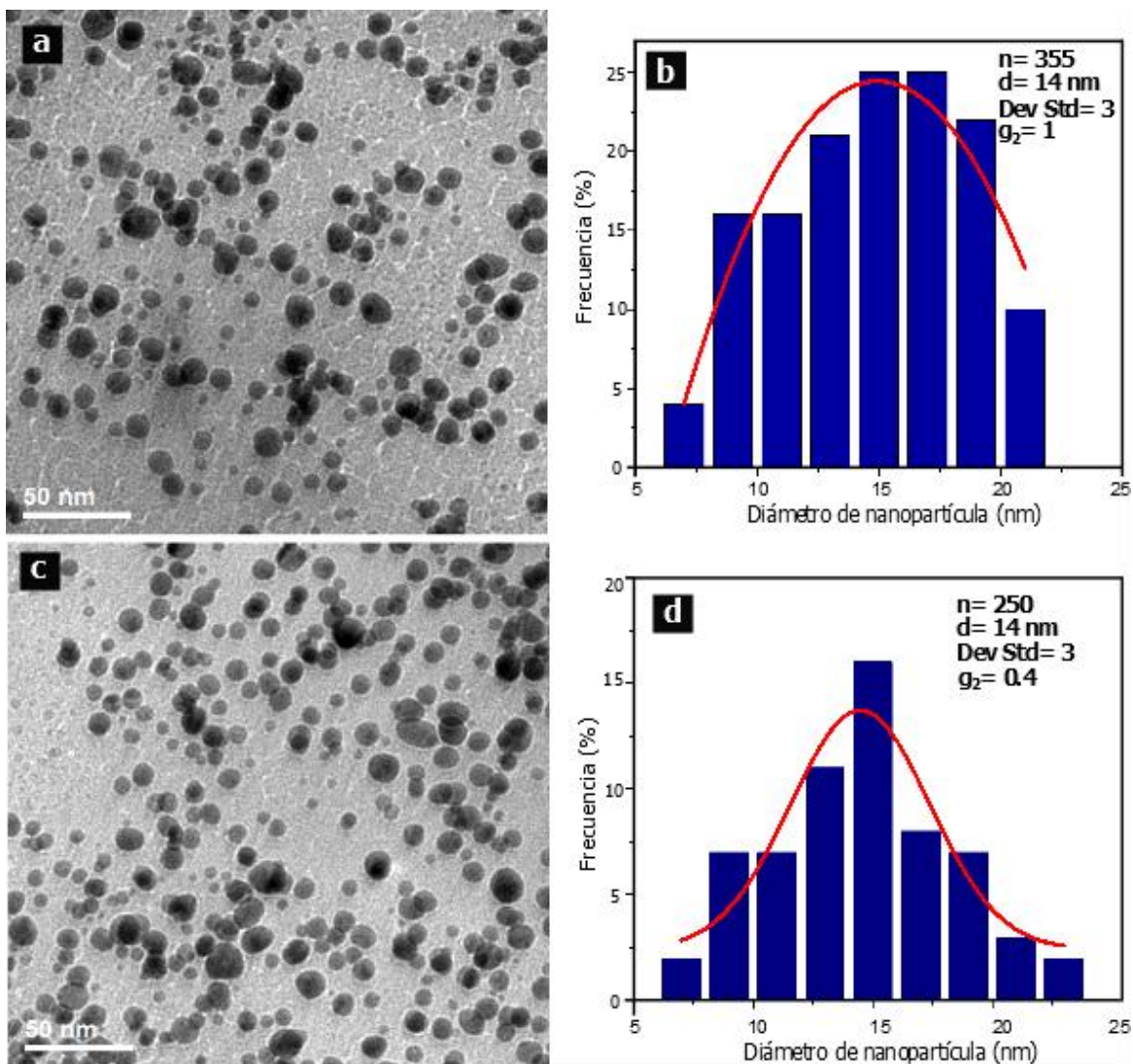


Figura 4.18. Micrografías de campo claro con una magnificación de 99,000 X, obtenidas por MET, en las cuales se observan cúmulos de nanopartículas de oro conjugadas al fármaco 6Mp, cuya forma corresponde a la esferoidal y ovalada. (b, d) Estadística descriptiva de los tamaños de partículas observados en (a, c).

Como resultado de la conjugación de las nanopartículas con el fármaco, no se provoca la difusión de átomos en la nanopartículas vecinas, como se ilustra en las Figuras 4.22 (a, b). Que corresponden a imágenes obtenidas mediante la técnica de MET-AR tomadas a una magnificación de (a) 490,000X y (b) 880,000X; se muestran acompañadas de sus respectivas imágenes de superficie en falso color (Figuras 4.8 (c, d)), que confirman, donde lo indican las flechas, que no se presenta coalescencia; dado que no se aprecian los cuellos de botella

típicos que se dan por la difusión de átomos que se genera en la superficie de una NP en la vecindad de otra [73].

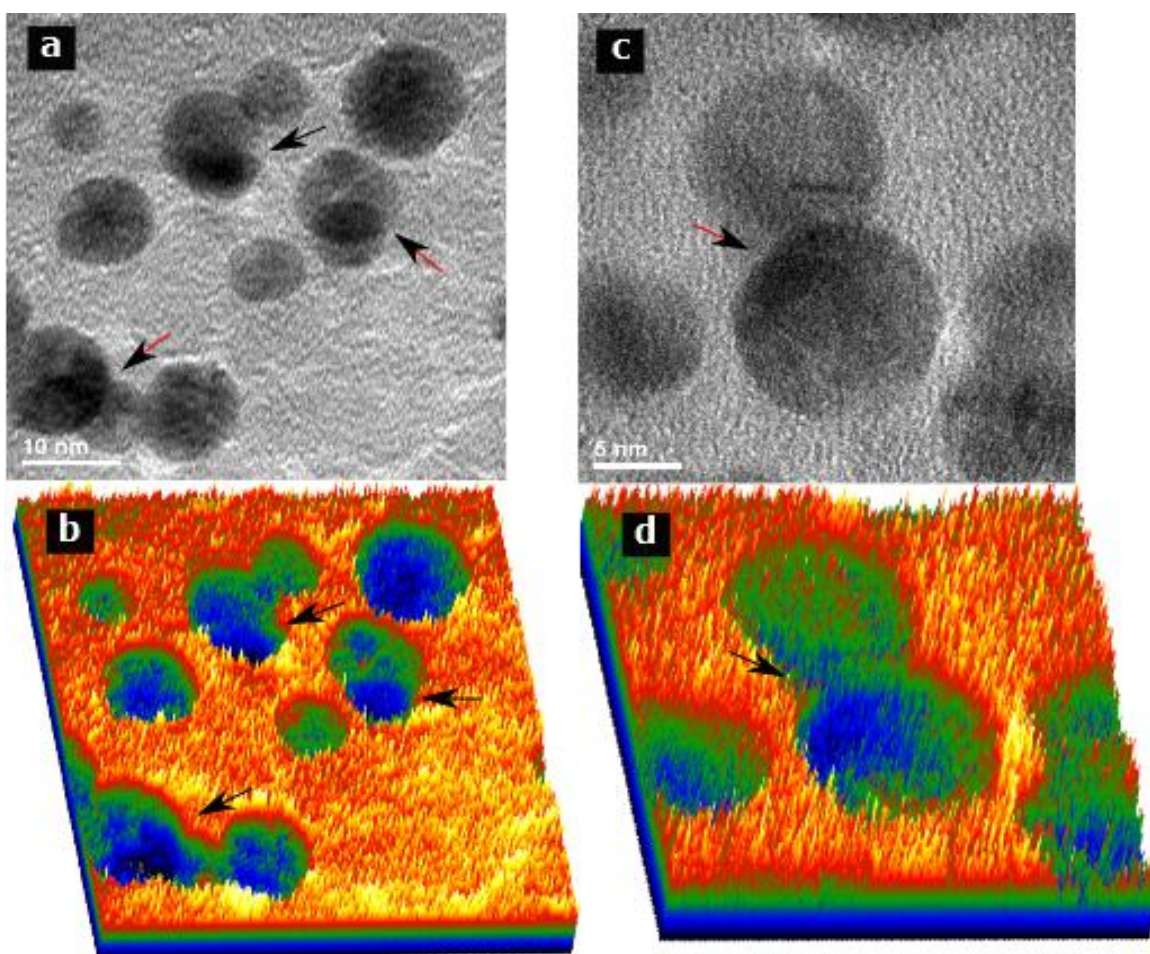


Figura 4.19. Imágenes obtenida por MET, (a) con magnificación de 490, 000 X y (b) 880,000X en las que se observan que las nanopartículas no presentan coalescencia pese a la proximidad de unas a otras. (c, d) Imágenes de superficie en falso color de las micrografía (a, b), donde se observa el contraste asociado al espesor de la muestra.

d. Espectroscopia de Infrarrojo.

La Figura 4.20 muestra los espectros de infrarrojo de 6-Mercaptopurina y las nanopartículas de oro conjugadas a esta molécula. En el espectro de la 6Mp libre se observa una banda a 1271 cm^{-1} que se debe a la tensión del enlace S-H en el anillo pirimidínico. Esta banda, aunque presenta muy baja intensidad, aparece siempre en los espectros de 6Mp. Una vez que la 6Mp interaccionó con las nanopartículas esta banda desaparece, este hecho suele tomarse

como una prueba fundamental de que la molécula se ha unido a la superficie del oro [19-20]. Así mismo, se aprecia un ligero desplazamiento de los bandas asignadas al grupo funcional amina (3425 cm^{-1}) e imidazol (1611 cm^{-1}), como resultado de la conjugación fármaco-nanopartícula. Cabe resaltar, que debido a la interacción del fármaco con la superficie de las nanopartículas, las bandas presentes se desplazaron ligeramente [32, 34].

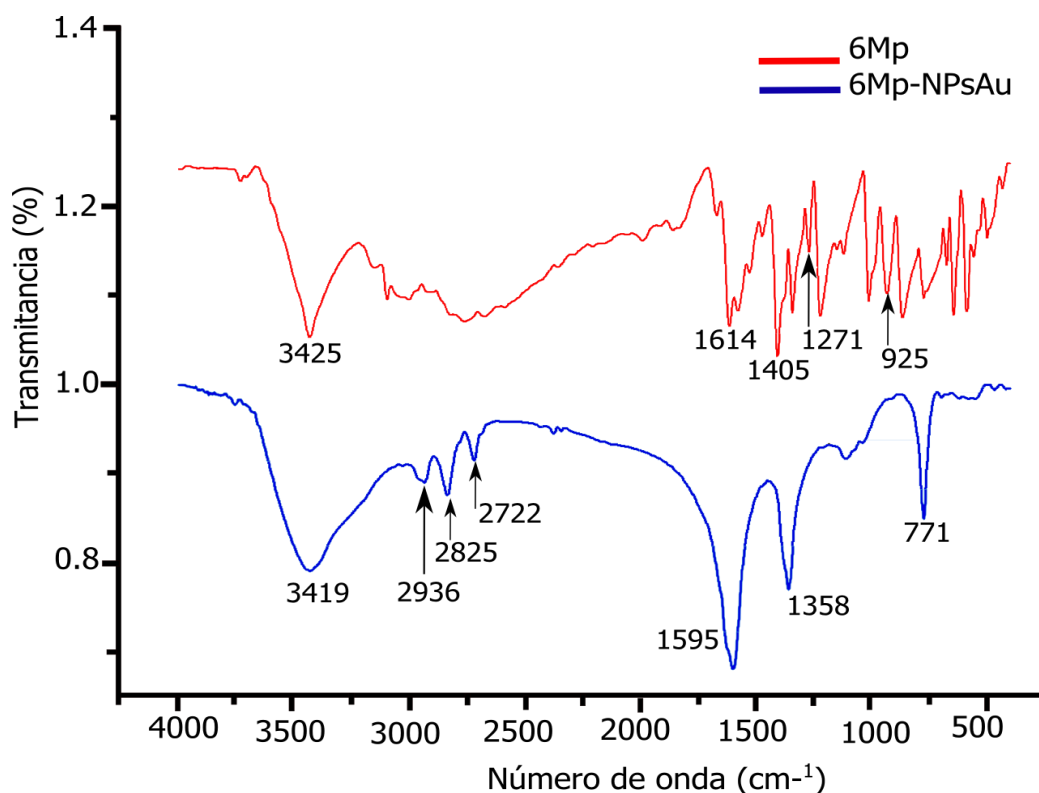


Figura 4.20. Espectros de infrarrojo de 6-Mp y 6-Mp-NPsAu.

A continuación, se hace un análisis más detallado de las regiones encontradas en las bandas al pasar desde el estado libre de la 6Mp, al estado en que se encuentra unida a las nanopartículas:

Análisis de la región entre 3800 y 2400 cm^{-1} .

- La banda a 3425 cm^{-1} aparece tanto en el espectro de la 6Mp libre como en el correspondiente a la NPsAu-6Mp. Esta se asigna a la tensión del enlace N-H, dependiendo del tautómero tiona o tiol, y además, de si es N(7)-H ó N(9)-H, puede deberse a las tensiones N(7)-H y N(1)-H en tiona ó, N(7)-H en el tiolN(7)-H ó N(9)-H en el tiol N(9)-H. Esta banda podría deberse también al agua que queda en la muestra.

Sin embargo, se observa que cuando se calienta la muestra suavemente ($\sim 50^\circ\text{C}$) en atmosfera reducida por varias horas, esta banda aumenta. Lo cual permite descartar que se deba únicamente a agua [32-34].

- En la zona $3200\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ aparecen en el espectro de la 6Mp libre bandas a 3158 , 3095 , 3006 , 2966 , 2924 y 2853 cm^{-1} . Las bandas en la región $3200\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ se asignan a las tensiones C(8)-H y C(2)-H. Estas bandas de tensión C-H desaparecen y aparecen tres bandas a 2966 , 2924 y 2853 cm^{-1} de gran intensidad en las NPsAu conjugadas. Se observa así, una disminución media en la frecuencia de las bandas de unos 200 cm^{-1} , aunque coinciden con bandas incipientes en la 6Mp libre. Una disminución de frecuencia en una vibración de tensión se interpreta como una mayor facilidad de este movimiento en la dirección del enlace. Podría pensarse que al ordenarse la 6Mp sobre las NPsAu, adquirieran una disposición, probablemente a través de apilamiento de los anillos heterocíclicos, en la que estos enlaces tuvieran una orientación definida. El hecho de que desaparezcan algunas de las bandas que existían en 6Mp libre, estaría de acuerdo con una disposición determinada de estos enlaces en el estado ordenado. Por otra parte, el aumento en la intensidad, se debería a la transformación de los diferentes tautómeros existentes en la molécula libre, debido al anclaje del radical tiol en la superficie de la NPsAu [32].
- En el espectro de la 6Mp libre se observa una banda a 2671 cm^{-1} que se debe a la tensión S-H. Esta banda, aunque de muy baja intensidad aparece siempre en los espectros de 6Mp. En esta región del espectro, por tanto, puede concluirse que aparecen bandas que se deben a especies tiol (-SH). Pero también habrá especies tiona, tanto N(7)-H como N(9)-H y que no pueden distinguirse inequívocamente. Cuando la 6Mp interacciona con las NPsAu, se observa la desaparición de la banda a 2671 cm^{-1} , correspondiente a -SH. Esto constituye la prueba fundamental de que la 6Mp se ha unido a las NPsAu [32, 34].

Análisis de la región entre 1800 y 400 cm^{-1} .

En cuanto a la región de 1800 a 400 cm^{-1} se observan numerosas bandas que hacen el análisis algo complicado. Sin embargo, pueden distinguirse una serie de detalles que se comentan a continuación.

- En el espectro de 6Mp libre, se observan bandas a 505 y 561 cm^{-1} (de prácticamente igual intensidad) y a 533 y 584 cm^{-1} . Estas bandas pueden corresponder a la flexión del grupo N(9)-H del tiol N(9)H y a la flexión N(7)-H del grupo tiona. Además, tendrían contribución de la flexión C-S [32, 33].
- Las bandas que aparecen a 644, 675, 695 y 757 cm^{-1} , corresponden a vibraciones de los anillos y todas desaparecen cuando 6Mp se une al Au, al igual que ocurre con las flexiones N-H. La desaparición de estas bandas en el espectro de NPsAu-6Mp, puede explicarse por la preferencia de todas las moléculas de 6Mp adsorbidas por una conformación tautomérica específica. Sin embargo, este hecho no puede dar cuenta de la eliminación completa de bandas por debajo de 750 cm^{-1} . La regla de selección superficial, predice que algunas bandas de absorción en el IR, pueden no aparecer en los espectros de moléculas adsorbidas a partículas metálicas. Así, aquellas bandas correspondientes a vibraciones moleculares con un momento dipolar oscilante paralelo a la superficie, se suprimirían para partículas de tamaños mayores de 2 nm. De esta manera, los detalles observados en este sistema, apuntan al hecho de que las moléculas que forman la capa protectora, mantendrían una orientación común. Por otra parte, la banda que aparece a 780 cm^{-1} , que corresponde también a la vibración de anillos, se mantiene al pasar a NPsAu-6Mp y además, aparece otra banda más importante a 802 cm^{-1} , que no está descrita en ninguna especie de 6MP libre. Esta banda tiene una intensidad media, lo que podría indicar que se debe a un tipo de vibración de anillo, que estaría más favorecida en el estado ordenado de las moléculas adsorbidas [32-34].
- La banda a 869 cm^{-1} , correspondería a la flexión C(8)-H en todas las especies y se mantiene al pasar al estado ordenado.
- Las bandas a 937 y 1013 cm^{-1} , corresponden a la flexión C(2)-H y a otras vibraciones que incluyen: tensión C-S, deformación S-H, entre otras. Estas dos bandas desaparecen, aunque podría pensarse que algunas de sus contribuciones dan lugar a las bandas a 1045 y 1105 cm^{-1} que aparecen al unirse a las NPsAu. En particular, la tensión C-S y la flexión C(2)-H. Un cambio en la vibración C-S hacia frecuencias más altas, indicaría un aumento en la constante de fuerza del enlace. Esto podría ocurrir

si el grupo tiol se une al Au, para lo cual tiene que perder el hidrógeno, y aumentaría así el carácter de doble enlace C-S [32].

- Las bandas a 1150 y 1227 cm^{-1} tienen una contribución importante de la flexión de C(8)-H, así como de las tensiones en que participa el N(1) con los C(2) y C(6). Antes se comentó que la tensión C(8)-H, así como la C(2)-H, disminuían en frecuencia como consecuencia de una disposición de las moléculas en el estado ordenado, lo que inducirá la vibración en la dirección del enlace. Esta misma razón podría argumentarse para la desaparición de las bandas de flexión que incluyen estos enlaces, ya que la flexión no tendría lugar.
- La banda a 1274 cm^{-1} tiene contribución de prácticamente todos los enlaces C-N de la molécula. Esta banda cambia a 1261 cm^{-1} y aumenta su intensidad. Esto indicaría que la unión de la molécula de 6Mp al Au implica ambos anillos, el de imidazol y el de pirimidina.
- Las bandas a 1345, 1384 y 1408 cm^{-1} se presentan también en el espectro de la molécula unida a las NPsAu. Sin embargo, la primera aumenta en la misma frecuencia de 18 cm^{-1} y disminuye en intensidad, mientras que las dos últimas se mantienen en la misma frecuencia; aunque la de 1384 cm^{-1} aumenta drásticamente en intensidad, mientras que la de 1408 cm^{-1} disminuye. El aumento podría deberse de nuevo a las contribuciones de las bandas C-N en 1384 cm^{-1} que se reforzarían. Y la disminución con la pérdida de la forma tiona, que contribuye en estas frecuencias con las tensiones N(1)-H y N(7)-H [32].
- Las tres bandas restantes a 1527, 1578 y 1615 cm^{-1} , se mantendrían al pasar a la molécula unida, aunque cambiarían sus frecuencias a la vez que aparecerían dos nuevas bandas. Las frecuencias en las NPsAu-6Mp serían 1464, 1544, 1578, 1594 y 1667 cm^{-1} . Estos cambios son atribuidos a la interacción del oro con los anillos de imidazol y pirimidina de la molécula del fármaco. El cambio de la banda de 1615 a 1667 cm^{-1} desde la especie libre a la especie unida al Au, produce un cambio importante en la tensión C(5)-N(7) y C(8)-N(7) de las formas tiol lo que, de alguna manera, implica al N(7) en la coordinación con el Au. En este caso, un aumento de frecuencia en la tensión C-N, estaría de acuerdo con una mayor constante de fuerza

de los enlaces C(5)-N(7) y C(8)-N(7), que podría tener su origen en la interacción con el Au, que le proporcionaría la densidad electrónica necesaria. Este dato estaría en consonancia con el comportamiento observado en estudios electroquímicos en medio alcalino [34], apoyando la hipótesis de que la 6MP se coordina con el oro a través, no sólo de su unión con el grupo -SH, sino también mediante una interacción con el N(7) [32-34].

4.3 EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO NANOTRASPORTADORES DE ANTINEOPLÁSICOS.

4.3.1 Determinación de la curva de crecimiento de las células Jurkat y RPMI

A través de este procedimiento se logró: conocer la densidad celular del inóculo inicial en condiciones de crecimiento exponencial para cada célula y, establecer los periodos de dosificación para llevar a cabo los tratamientos con nanopartículas conjugadas a 6-mercaptopurina, y nanopartículas libres del fármaco. De acuerdo con Mayoral y col. [80], el establecimiento de estos periodos permite garantizar que los ensayos se lleven a cabo en condiciones de crecimiento exponencial, y que los resultados obtenidos en los mismos, no sean producto de la senescencia celular.

Utilizando las células previamente adaptadas a crecer en suspensión en medio RPMI, para la caracterización del ciclo celular se siguió su crecimiento, durante 10 días para RPMI y 14 para Jurkat; tiempo tras el cual, las células habían llegado a la fase estacionaria de crecimiento. Para esto se utilizaron placas de 24 pozos de 2 mL y se sembraron las células a una concentración de 2×10^6 células/1.5 mL/pozo, para su monitoreo por triplicado cada 24 h; mediante la determinación de su densidad celular a través de su recuento en una cámara de Neubauer [81].

En la Figura 4.21 (a) se presenta la curva de crecimiento de las células RPMI. Se observa la ausencia de la fase de latencia (*lag*), que consiste en el período de adaptación del inóculo a las nuevas condiciones del medio fresco en el que se ha sembrado, iniciándose la etapa exponencial desde el inicio del cultivo. Esto puede ser debido a que: las células están creciendo en un medio en el cual ya están acostumbradas, y/o, que la manipulación y las condiciones de cultivo eran las adecuadas; por lo cual no requirieron adaptarse al ser

inoculadas. El crecimiento se siguió por 10 días, observándose que la etapa de crecimiento exponencial en las células se prolongó hasta los 6 días posteriores a la inoculación, para entrar en la etapa estacionaria. Como resultado de los recuentos celulares se estimó un decremento del 48.23% de la viabilidad celular, para el último día de cultivo, con un margen de error asociado a los conteos de aprox. 5% (barra de error vertical) y del 8% debido al tiempo invertido durante los mismos (barra de error horizontal).

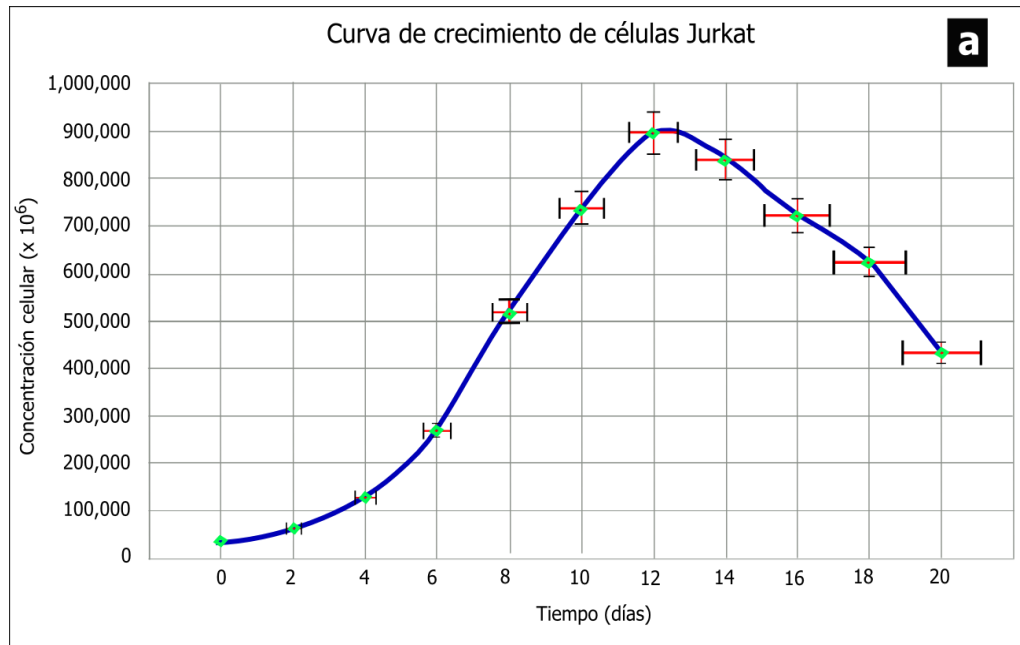


Figura 4.21. (a) Periodo de división celular de RPMI.

En la Figura 4.21 (b) se presenta la curva de crecimiento de las células Jurkat. Al igual que en las células RPMI, se observa la ausencia de la fase de latencia (lag), iniciándose la etapa exponencial desde el inicio del cultivo. El crecimiento se siguió por 20 días, como puede apreciarse la etapa exponencial se prolongó hasta el día 12 después de la inoculación de las células al medio del cultivo, iniciando la etapa estacionaria. De acuerdo con los recuentos en cámara de Neubauer la viabilidad celular disminuyó hasta en un 50.26% el último día de cultivo, con un porcentaje de error del 6 % asociado a los conteos (barra de error vertical) y del 8% debido al tiempo invertido durante los mismos (barra de error horizontal).

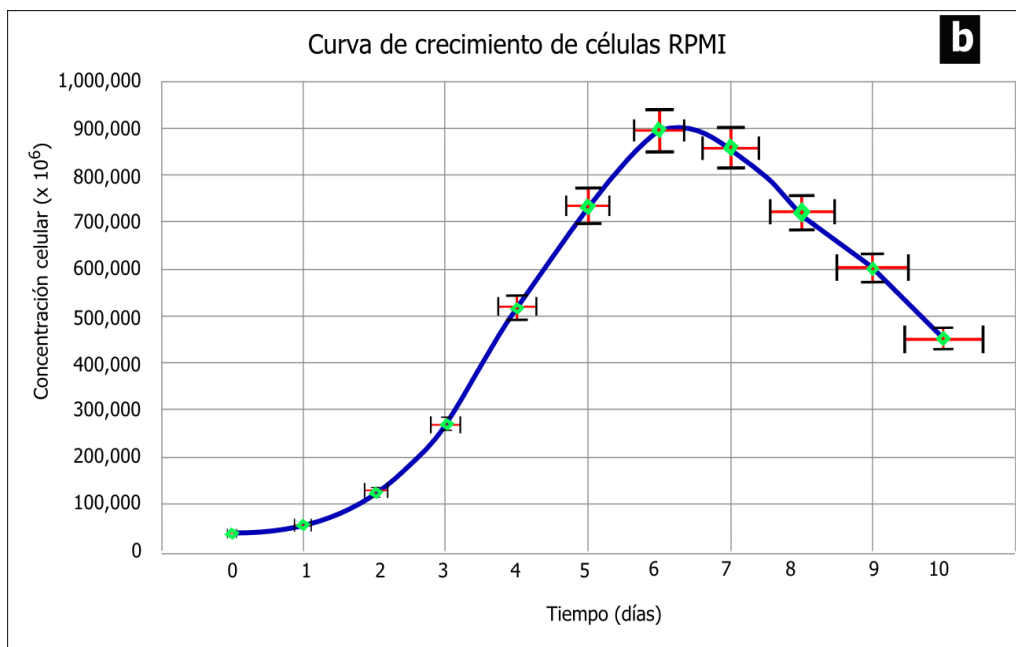


Figura 4.21. (b) Periodo de división de Jurkat.

Como puede observarse, el periodo de división en el caso de células RPMI es cada 24 h, mientras que para las Jurkat es de 48 h. Puede apreciarse también que, las células permanecen viables por 6 periodos de división celular, tras los cuales las células entran en la fase estacionaria, y posteriormente la muerte de las células por senescencia y agotamiento de nutrientes en el sustrato. En base a estos resultados, se determinó que la exposición de las células a los tratamientos se realizaría durante los primeros 6 periodos de división celular, durante los cuales permanecen viables.

4.3.2 Estudios de viabilidad celular.

Viabilidad celular determinada en la Fase 1.

Se llevó a cabo la evaluación de la citotoxicidad del fármaco 6-Mercaptopurina en los cultivos celulares Jurkat y RPMI, mediante el tratamiento de las células con 3 dosis: 0.5, 1.0 y 2.0 μL , de una solución del fármaco a una de 3mM. Al evaluar el efecto de la 6MP sobre la viabilidad celular en RPMI y Jurkat, se observó que en las tres dosis evaluadas, se produjo una disminución significativa en la concentración celular. El efecto de los tratamientos de siguió durante 10 días mediante conteos que se realizaron cada 24 h en el caso de células RPMI y 48 h en Jurkat, después del inicio de la evaluación.

Como se observa en las Figuras 4.22 (a)-(b), el tratamiento a una dosis de 0.5 μL corresponde a la IC_{50} , siendo la concentración a la cual se presentó una pérdida de viabilidad celular del 50% constante en el tiempo, en ambos tipos celulares. Por lo que se determinó que se tomarían 0.5 μL del fármaco como control positivo frente al tratamiento con nanopartículas funcionalizadas y libres de fármaco.

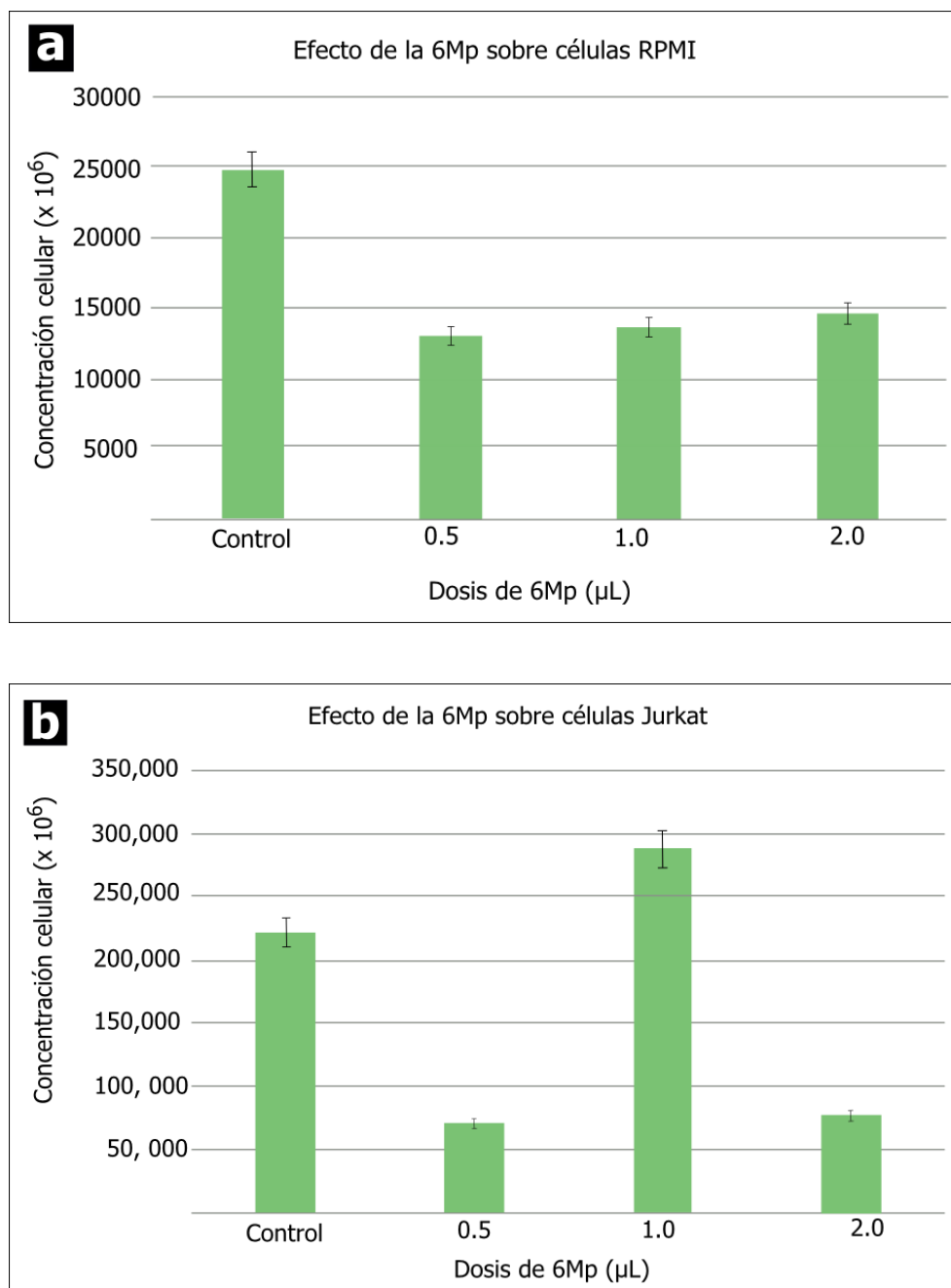


Figura 4.22. Tratamiento en células RPMI (a) y Jurkat (b), con tres dosis distintas de 6Mp a una concentración de 3 mM.

Viabilidad celular determinada en la Fase 2.

Se llevó a cabo el tratamiento de los dos tipos celulares añadiendo 1.6 μL de las formulaciones 1.2 mM de las formulaciones NPsAu-6Mp y NPsAu. Así mismo, los valores obtenidos de los conteos sirvieron para contrastar el porcentaje de viabilidad celular, en función del número de células vivas. Este contraste se realizó en cada uno de los tres tratamientos con el testigo negativo de referencia, y como control positivo, la solución 3mM de 6-Mercaptopurina a una dosis de 0.5 μL . La actividad citotóxica del tratamiento de nanopartículas conjugadas, se comparó entre los tratamientos con el testigo negativo de referencia, el control positivo y las nanopartículas libres de fármaco. Esto para los dos tipos celulares, RPMI y Jurkat, con base en las curvas de viabilidad celular.

Como se muestra en las curvas de viabilidad celular de las Figuras 4.23 (a)-(b). El tratamiento con las nanopartículas conjugadas al fármaco afectó la forma de crecimiento de las células RPMI y Jurkat, de forma similar. Siendo capaces de inhibir hasta 95 % del crecimiento de ambas células al final del tratamiento, de acuerdo con los recuentos realizados. Dicho efecto fue análogo al obtenido con la dosis empleada del fármaco libre. Estos resultados corroboran que las nanopartículas de oro pueden actuar como nanotransportadores de fármacos empleando una menor dosis. De tal manera que, se contrarrestan los efectos secundarios que son consecuencia de la bioacumulación de medicamento en el interior de las células.

Así mismo, por medio de estos bioensayos, se comprobó que las nanopartículas de oro por si solas, no presentan efecto nocivo en el desarrollo y proliferación en la línea celular linfoide, cuyo efecto es similar al control negativo. Lo que confirma la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro con las células linfoides. El efecto se representa como porcentaje de viabilidad celular calculado en relación a cada grupo control, negativo y positivo, para cada tiempo de conteo.

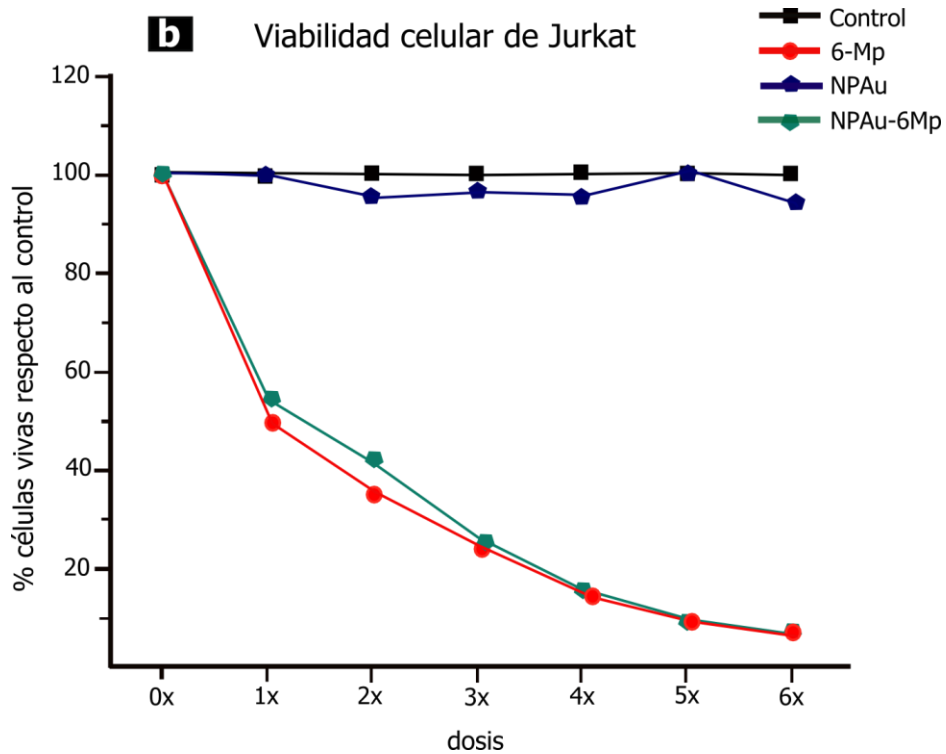
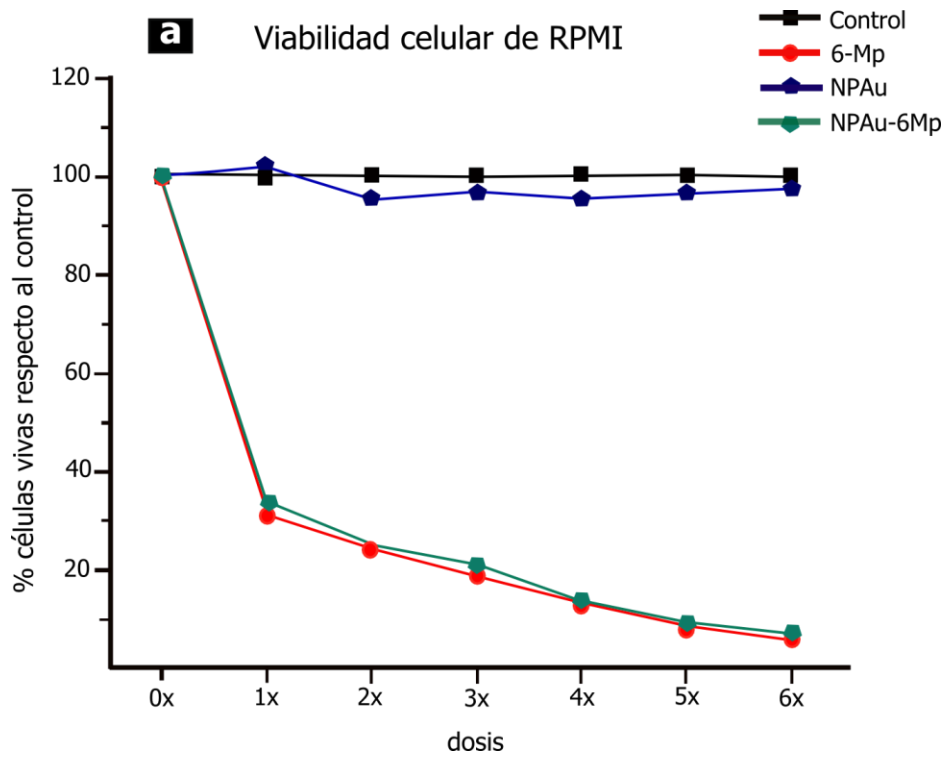


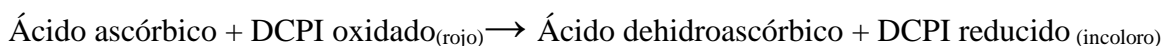
Figura 4.23. Viabilidad porcentual de células Jurkat (a) y RPMI (b) expuestas a las dosis de 6Mp, NPsAu y 6Mp-NPsAu. Cada punto es el valor promedio en tres experimentos independientes por triplicado.

5. CONCLUSIONES.

1. A través del método de secado por aspersión fue posible procesar el mucílago de nopal sin necesidad de agregar un agente encapsulante, obteniendo un polvo estable con un rendimiento de 0.88 g por cada 100 g de material vegetal. El método de extracción no tiene influencia negativa en la preservación de los principios activos, logrando recuperar hasta un 2.8 mg de ácido ascórbico por gramo de extracto pulverizado.
2. Mediante el método de síntesis biológica, se obtuvieron nanopartículas de oro de forma esferoidal, con un diámetro promedio de 7 nm y estables en solución coloidal. Esto sugiere que el extracto actúo como agente reductor y estabilizador en la síntesis de nanopartículas de oro.
3. Utilizando la técnica de espectroscopía de IR, se encontró que el anclaje de la 6-Mercaptopurina se dio por el enlace del grupo sulfhídrico de la molécula, en los planos (111) de la superficie de las nanopartículas de oro. Algunas características espectrales señalan la implicación de los dos anillos de la molécula en la interacción con el oro y, a partir de los cambios en las bandas de tensión C-H se concluye que los diferentes tautómeros existentes en 6-MP libre se transforman en la especie tiol.
4. En los bioensayos en células Jurkat y RPMI, los resultados de los conteos celulares indican que las nanopartículas libres de fármacos no inducen efecto adverso en los dos tipos celulares. Así mismo, a partir de las curvas de viabilidad celular, se determinó que la dosis de 1.6 μ L, a una concentración de 1.2 mM de nanopartículas conjugadas a 6MP, corresponde a la CI_{50} en los dos tipos celulares.

Anexo I.

El método de Tillmans. Keller 1988. AOAC967.21 (2000) se trata de un procedimiento de valoración oxido-reducción, en el que se usa el reactivo 2,6-diclorofenolindofenol (DCPI), que en condiciones alcalinas presenta color azul, rojo en condiciones ácidas e incoloro cuando es reducido por el ácido ascórbico, de acuerdo a la siguiente reacción química [65]:



- a. Procedimiento de titulación de la muestra.
 1. Preparación del extracto de nopal (polvo) en solución acuosa.
 2. Tratamiento ultrasónico por 20 min de la solución acuosa, para liberar el ácido ascórbico de los restos celulares y fibras.
 3. Separación de los restos celulares y fibra por centrifugado durante 15 min a 1500 rpm.
 4. Decantación de la suspensión obtenida. En esta suspensión es donde se encuentra el ácido ascórbico; mientras que en el precipitado quedan retenidas la fibra y restos celulares.
 5. Cuantificación de ácido ascórbico por titulación con 2,6-Dicloroindofenol.

La cantidad, en miligramos, de ácido ascórbico en la suspensión titulada. Está correlacionada con la cantidad necesaria de DCPI (mg), de acuerdo a los valores de referencia [6]. Esta cantidad de DCPI, es la que se necesita para que la solución titulada vire de color verde a rosa tenue.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Hornyak, G. L., Moore, J.J., Tibbals, H. and Dutta, J., *Fundamentals of Nanotechnology*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group. 2009. p. 115-118.
- [2] Mohan, L., Prakasan, E., Kademani, B., Surwase, G., Kumar, A. and Kumar, V. Research trends in nanoscience and nanotechnology in India. *DESIDOC Journal of Library & Information Technology*, 30 (2), 40-58. 2010.
- [3] Frederix, F., Friedt, J.-M., Choi, K.-H., Laureyn, W., Campitelli, A., Mondelaers, D., et. al. Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles. *Analytical Chemistry*, 75 (24), 6894-6900. 2003.
- [4] Parsons, J., Peralta-Videa, J. and Gardea-Torresdey, J. Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. *Developments in Environmental Science*, (5), 463-485. 2007.
- [5] Leow, D., Lin, S., Chittimalla, S.K., Fu, X. and Tan, C.H. Enantioselective protonation catalyzed by a chiral bicyclic guanidine derivative. *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (30), 5641-5645. 2008
- [6] Thomas, J. E., & Gehm, M. E. Gases de Fermi atrapados ópticamente. *Investigación y ciencia*, 3, 36-43. 2005.
- [7] Su, K.-H., Wei, Q.-H., Zhang, X., Mock, J., Smith, D.R. and Schultz, S. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Letters*, 3 (8), 1087-1090. 2003.
- [8] Schmidbaur, H., Cronje, S., Djordjevic, B. and Schuster, O. Understanding gold chemistry through relativity. *Chemical Physics*, 311 (1), 151-161. 2005.
- [9] Dirac, P. A. The quantum theory of the electron. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 610-624. 1928.
- [10] Ford M. J., Masens C., and Cortie M. B. The application of gold surfaces and particles in nanotechnology, *Surf. Rev. Lett.*, ed. 2006, 13, p. 297-307.
- [11] Koga, K., Ikeshoji, T. and Sugawara, K.-i. Size and temperature dependent structural transitions in gold nanoparticles. *Physical Review Letters*, 92 (11), 115507. 2004.

- [12] Ramakrishna, S.A. and Pendry, J. Spherical perfect lens: Solutions of Maxwell's equations for spherical geometry. *Physical Review B*, 69 (11), 115115. 2004.
- [13] Romaniello, P. and de Boeij, P. The role of relativity in the optical response of gold within the time-dependent current-density-functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, 122 (16), 164303. 2005.
- [14] Weaver, J. and Frederikse, H. Optical properties of selected elements. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, ed. 2001. p. 12-133.
- [15] Pyykkö, P. Theoretical chemistry of gold. *Angewandte Chemie International Edition*. ed. 2004, 43(34). p. 4412-4456.
- [16] Blaber, M., Arnold, M., Harris, N., Ford, M. and Cortie, M. Plasmon absorption in nanospheres: A comparison of sodium, potassium, aluminium, silver and gold. *Physica B: Condensed Matter*, 394 (2), 184-187. 2007.
- [17] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. and Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105 (4), 1103-1170. 2005.
- [18] Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Gambari, R. and Nastruzzi, C. Effect of cationic liposome composition on in vitro cytotoxicity and protective effect on carried DNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 139 (1), 69-78. 1996.
- [19] Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J. and Wyatt, M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1 (3), 325-327. 2005.
- [20] Hauck, T.S., Ghazani, A.A. and Chan, W.C. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small*, 4 (1), 153-159. 2008.
- [21] Pissuwan, D., Valenzuela, S.M., Miller, C.M. and Cortie, M.B. A golden bullet? Selective targeting of *Toxoplasma gondii* tachyzoites using antibody-functionalized gold nanorods. *Nano Letters*, 7 (12), 3808-3812. 2007.

- [22] Pissuwan, D., Valenzuela, S.M., Killingsworth, M.C., Xu, X. and Cortie, M.B. Targeted destruction of murine macrophage cells with bioconjugated gold nanorods. *Journal of Nanoparticle Research*, 9 (6), 1109-1124. 2007.
- [23] Bernardi, R.J., Lowery, A.R., Thompson, P.A., Blaney, S.M. and West, J.L. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation in medulloblastoma and glioma: an *in vitro* evaluation using human cell lines. *Journal of Neuro-oncology*, 86 (2), 165-172. 2008.
- [24] Stern, J.M., Stanfield, J., Lotan, Y., Park, S., Hsieh, J.T. and Cadeddu, J.A. Efficacy of laser-activated gold nanoshells in ablating prostate cancer cells *in vitro*. *Journal of Endourology*, 21 (8), 939-943. 2007.
- [25] De la Fuente, J.M., Berry, C.C., Riehle, M.O. and Curtis, A.S. Nanoparticle targeting at cells. *Langmuir*, 22 (7), 3286-3293. 2006.
- [26] Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R. and Sastry, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21 (23), 10644-10654. 2005.
- [27] Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P., Larsen, A., et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol*, 4 (10), 10. 2007.
- [28] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. and Jahnen-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, 3 (11), 1941-1949. 2007.
- [29] Hyslop, R.M. and Jardine, I. Metabolism of 6-thiopurines. I. Irreversible binding of a metabolite of 6-thiopurine to mammalian hepatic protein *in vitro*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 218 (3), 621-628. 1981.
- [30] Elion, G.B. The purine path to chemotherapy. *Bioscience Reports*, 9 (5), 509-529. 1989.
- [31] Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1805-1834

- [32] Viudez, A.J., Madueño, R., Pineda, T. and Blázquez, M. Stabilization of gold nanoparticles by 6-mercaptopurine monolayers. Effects of the solvent properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (36), 17840-17847. 2006.
- [33] Selvaraj, V., Alagar, M. and Hamerton, I. Analytical detection and biological assay of antileukemic drug using gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 52 (3), 1152-1160. 2006.
- [34] Ganeshkumar, M., Sastry, T.P., Sathish Kumar, M., Dinesh, M.G., Kannappan, S. and Suguna, L. Sun light mediated synthesis of gold nanoparticles as carrier for 6-mercaptopurine: Preparation, characterization and toxicity studies in zebrafish embryo model. *Materials Research Bulletin*, 47 (9), 2113-2119. 2012.
- [35] Rao, C. N. R., Müller, A., and Cheetham, A. K. *The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications (Vol. 1)*. John Wiley & Sons. ed. 2006. p.688-693.
- [36] Bhushan, B. Introduction to nanotechnology. In *Springer handbook of nanotechnology*. Springer Berlin Heidelberg. ed. 2010. p. 1-13
- [37] Poole Jr, C. P., and Owens, F. J. *Introduction to nanotechnology*. John Wiley & Sons. ed. 2003. p. 226-233.
- [38] del Pilar, C. M. M., Pilar, C. R., Consuelo, E. L., Soledad, E. S., Angeles, F. M., Marta, P. T., y Dionisia, S. D. C. Procesos orgánicos de bajo impacto ambiental. *Química verde*. Editorial UNED. ed. 2012. p. 19-22.
- [39] Marcos, F. V. Prevención y control del riesgo de los productos químicos. *Rev Esp Salud Pública*, 70(4), 409-420. 1996.
- [40] Kharissova, O.V., Dias, H.V.R., Kharisov, B.I., Pérez, B.O. and Pérez, V.M.J. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31 (4), 240-248. 2013.
- [41] Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K.S., Santosh, P., Kavitha, H.U., Rao, Y., *et. al.* Plants: Emerging as Nanofactories towards *Facile Route* in Synthesis of Nanoparticles. *Bioimpacts: BI*, 3 (3), 111. 2013.

- [42] Salam, H.A., Rajiv, P., Kamaraj, M., Jagadeeswaran, P., Gunalan, S. and Sivaraj, R. Plants: green route for nanoparticle synthesis. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1 (5), 85-90. 2012.
- [43] Bhattacharya, D. and Gupta, R.K. Nanotechnology and potential of microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25 (4), 199-204. 2005.
- [44] Jha, A.K., Prasad, K., Rai, M. and Posten, C. Understanding the Involved Mechanisms in Plant-mediated Synthesis of Nanoparticles. *Green Biosynthesis of Nanoparticles: Mechanisms and Applications*, 122. 2013.
- [45] Edreva, A.V., Velikovo, T., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A. and Atkas, L. Stress protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology*, 34 67-78. 2008.
- [46] Meagher, R.B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (2), 153-162. 2000.
- [47] Suman, T., Radhika Rajasree, S., Ramkumar, R., Rajthilak, C. and Perumal, P. The Green synthesis of gold nanoparticles using an aqueous root extract of *Morinda citrifolia* L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118 11-16. 2014.
- [48] Noruzi, M., Zare, D., Khoshnevisan, K. and Davoodi, D. Rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Rosa hybrida* petal extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79 (5), 1461-1465. 2011.
- [49] Bankar, A., Joshi, B., Ravi Kumar, A. and Zinjarde, S. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80 (1), 45-50. 2010.
- [50] Rai, M. and Yadav, A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. *IET Nanobiotechnology*, 7 (3), 117-124. 2013.
- [51] Sáenz, C. Características y composición química de los nopales. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*, 162 7-22. 2006.

- [52] Cárdenas, A., Higuera-Ciapara, I. and Goycoolea, F. Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. Journal of the Professional Association for Cactus Development, 2 152-159. 1997.
- [53] Sepúlveda, E., Sáenz, C., Aliaga, E. and Aceituno, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia spp.* Journal of Arid Environments, 68 (4), 534-545. 2007.
- [54] Hernández, H.M. and Godinez, H. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica Mexicana, 26 33-52. 1994.
- [55] Vázquez-Ramírez, R., Olguín-Martínez, M., Kubli-Garfias, C. and Hernández-Muñoz, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. World Journal of Gastroenterology, 12 (27), 4318. 2006.
- [56] Gade, A., Gaikwad, S., Tiwari, V., Yadav, A., Ingle, A. and Rai, M. Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: *in vitro* antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis. Current Nanoscience, 6 (4), 370-375. 2010.
- [57] Kurata, T., Fujimaki, M. and Sakurai, Y. Red pigment produced by the oxidation of L-scorbamic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 21 (4), 676-680. 1973.
- [58] Friberg, S., Larsson, K. and Sjoblom, J., Food Emulsions. ed. 2003. p. 350-355.
- [59] Fennema, E. and Sherman, J.A. Fennema-Sherman mathematics attitudes scales: Instruments designed to measure attitudes toward the learning of mathematics by females and males. Journal for Research in Mathematics Education, 324-326. 1976.
- [60] Matsuhira, B., Lillo, L.E., Sáenz, C., Urzúa, C.C. and Zárate, O. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. Carbohydrate Polymers, 63 (2), 263-267. 2006.
- [61] León-Martínez, F., Rodríguez-Ramírez, J., Medina-Torres, L., Méndez Lagunas, L. and Bernad-Bernad, M. Effects of drying conditions on the

- rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). Carbohydrate Polymers, 84 (1), 439-445. 2011.
- [62] Harborne, J. B. Phytochemical methods (Vol. 278). London; New York: Chapman and Hall. ed. 1984. p. 123-125.
- [63] Helrich, K., Official methods of Analysis of the AOAC. Volume 2. ed. 1990. p. 231-240.
- [64] Luty-Błoch, M., Fitzner, K., Hessel, V., Löb, P., Maskos, M., Metzke, D., *et. al.* Synthesis of gold nanoparticles in an interdigital micromixer using ascorbic acid and sodium borohydride as reducers. Chemical Engineering Journal, 171 (1), 279-290. 2011.
- [65] Mexicana, N. O. Norma oficial mexicana nom-184-ssa1-2002, productos y servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, p. 42.
- [66] Walton, D. and Mumford, C. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. Chemical Engineering Research and Design, 77 (5), 442-460. 1999.
- [67] Contreras-Padilla, M., Gutiérrez-Cortez, E., del Carmen Valderrama-Bravo, M., Rojas-Molina, I., Espinosa-Arbeláez, D.G., Suárez-Vargas, R., *et al.* Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. Plant Foods for Human Nutrition, 67 (1), 44-49. 2012.
- [68] Hart, F. L., and Fisher, H. J. (1991). Análisis moderno de los alimentos, Acribia, Zaragoza (España), 1991. p. 252.
- [69] Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. Principios de análisis instrumental, Mc Graw-Hill/Interamericana de España, Madrid, 2001. p. 353-367.
- [70] Mercer, E. H., Birbeck, M. S. C., and Uruburu, F. Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos, Buenos Aires: Blume, 1972. p. 4-35.
- [71] Yacamán, M. J. y Reyes, J. Microscopía Electrónica: una Visión del Microcosmos (Vol. 1), Fondo de Cultura Económica, 1995. p. 2-30, 69-73.

- [72] Williams, D. B. and Carter, C. B. The Transmission Electron Microscope. In Transmission Electron Microscopy, Springer US, 2009. p. 75-75.
- [73] Ibach, H. Physics of Surfaces and Interfaces (Vol. 10), Berlin: Springer, 2006. p. 340-344.
- [74] Rosas, G., Perez, R. Quasicrystal Phase Structural Properties in the AlCuCo Ternary System. Journal of New Materials of Electrochemical Systems, 8 149-154. 2005.
- [75] Somorjai, G.A. and LI, Y. Introduction to surface chemistry and catalysis. ed. 2010. p. 468-473.
- [76] Lang, B., Joyner, R. and Somorjai, G. Low energy electron diffraction studies of chemisorbed gases on stepped surfaces of platinum. Surface Science, 30 (2), 454-474. 1972.
- [77] Waseda, Y., Matsubara, E., and Shinoda, K. X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems. Springer. ed. 2011. p. 73-77.
- [78] Hövel, H., Fritz, S., Hilger, A., Kreibig, U. and Völlmer, M. Width of cluster plasmon resonances: Bulk dielectric functions and chemical interface damping. Phys. Rev. B 48, 18178. 1993.
- [79] Zheng, J., Zhang, C. and Dickson, R.M. Highly fluorescent, water soluble, size tunable gold quantum dots. Physical Review Letters, 93 (7), 077402. 2004.
- [80] Mayoral, J. B., Fragoso, P. R., & Martínez, E. S. M. Identificación de células tumorales con nanopartículas semiconductoras (CdS) conjugadas con proteína Cry (*Bacillus thuringiensis*) y evaluación de su citotoxicidad. Libro de Memorias, 1364, 22.
- [81] Sánchez, M. A. A. Cáncer Hereditario. S. E. de Oncología Médica. SEOM. ed. 2006. p. 698-720.