

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES**



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES**

**“Síntesis verde de nanoestructuras de oro y caracterización fitoquímica
del extracto de la planta *Taraxacum officinale*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

PRESENTA:

IBQ. Amalia Inés Del Moral Gómez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo

CO-DIRECTOR:

Dr. Alejandro Bravo Patiño

MORELIA, MICHOACÁN

MARZO 2019

Agradecimientos y dedicatoria

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de muchas personas que estuvieron presentes a mi lado ayudándome con su presencia y conocimientos. Quiero expresar mi total gratitud a cada uno de ellos, ya que bajo la frustración de no lograr los objetivos planteados a corto plazo, la desesperación llega a ser grande y pareciera que no se culminara con el trabajo pero estas personas de diversas maneras ayudan a dar ánimo y continuar sin rendirnos.

En primer lugar quiero agradecer al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la UMSNH y al CONACYT, ya que sin ayuda de los mismos esta investigación no se podría haber realizado y por ser el lugar donde se formaron lazos entre amigos y profesores los cuales me llevaron a crecer personal y profesionalmente, de igual manera por el apoyo y los equipos brindados.

Agradezco de igual manera al Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo, ya que a través de sus conocimientos en el campo de la metalurgia y los materiales me apoyo para descubrir que además del mundo exterior que conocemos, a manera de nanoescala suceden fenómenos que aún nos quedan por descubrir, para mí el Doctor Rosas tiene la paciencia y amor por la investigación que cualquiera de nosotros como estudiantes algún día quisiéramos adquirir, quiero agradecer todo el tiempo brindado y sus consejos para la elaboración de la presente tesis profesional y por abrirme las puertas de su línea de investigación, me llevo además muchas experiencias al haber trabajado con él y agradezco el buen trato fuera de las aulas de clases, es una excelente persona con la que siempre estaré agradecida.

Ahora bien el alumno siempre necesita del apoyo de un asesor que nos guíe en el camino tan inmenso del conocimiento, quiero expresar mi total gratitud al Dr. Alejandro Bravo Patiño que fue uno de mis asesores de tesis que en todo momento mostro gran interés y apoyo generándome la inquietud de la investigación por saber que hay más allá de las células, ya que sus comentarios, sugerencias siempre nos llevan a tratar de buscar nuevas ideas de trabajo, en mi opinión personal es un docente totalmente capacitado para inculcar el deseo de adquirir cada vez más conocimientos, agradezco también al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la UMSNH y al M.C. German Saucedo Correa por su apoyo

dentro de la presente investigación. Agradezco también al Dr. Alfredo Saavedra Molina por su aportación dentro del área biológica apoyándonos siempre y en todo momento con equipos y conocimientos, así mismo el Dr. Mario Armando Gómez Hurtado por su apoyo en las pruebas fitoquímicas que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Si bien las instituciones son nuestra segunda casa, también quiero agradecer de manera muy importante a mi familia ya que sin ellos esto no hubiera sido posible, ya que en todo momento estuvieron ahí presentes mostrándome su cariño, apoyo y comprensión. Comenzare diciendo que amo profundamente a mis padres Yesica Gómez Cervantes y Jorge Alberto Del Moral Hernández que siempre estuvieron al pendiente de mi apoyándome para que culminara mis estudios profesionales, el gran esfuerzo de ellos se refleja en todos y cada uno de mis logros profesionales. Y no menos importantes mis hermanos Rebeca Del Moral Gómez, Jorge Alberto Del Moral Gómez y mis sobrinitas Tania, Alexa y Hanna, ellos que siempre están en mi vida para pelear, reír y disfrutar de los momentos en los que estamos juntos, una parte fundamental de mi vida es mi abuelita María Inés Cervantes Villalobos que es uno de mis ejemplos de vida, ella siempre me ha mostrado que las cosas se logran si uno se las propone, ella ha sido y seguirá siendo el pilar de toda mi familia, la que siempre está ahí para cualquier cosa, quiero agradecerle que siempre nos ha dado su apoyo incondicional, por brindarme su casa y estar conmigo siempre y en todo momento, es una de las personas que agradezco a Dios que este en mi vida. A mi novio Mario Alejandro Villalpando Nieves que muchas veces se quedó a trabajar a mi lado para culminar las investigaciones en el transcurso de la maestría y durante el trabajo de esta tesis profesional, ya que me ha comprendido y brindado cariño y conocimientos en todo momento, así como a su familia porque ya también han sido parte de éste proceso.

A todos les quedo totalmente agradecida, tengan por seguro que seré una buena persona y profesionista, pensando que todo lo que hago va con ayuda de Dios sin el nada sería posible, he tenido momentos en la vida en los que solo él ha estado presente y he salido adelante, somos hombres de ciencia pero nunca debemos olvidar que hay un ser supremo al que rendiremos cuentas algún día.

CONTENIDO

CAPÍTULO I	15
INTRODUCCIÓN	15
1.1 Objetivo general	16
1.2 Justificación	17
1.3 Hipótesis	18
1.4 Metas científicas	19
CAPÍTULO II	20
REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE	20
2.1 Nanotecnología	20
2.2 Nanomateriales	21
2.3 Síntesis de nanopartículas y ensamblajes	24
2.4 Características de la planta <i>Taraxacum officinale</i>	26
2.5 Características del cisplatino	27
2.6 Cáncer de mama	29
2.7 Líneas celulares	30
2.7.1 Línea MCF-12F (Línea celular normal)	30
2.7.2 Línea MCF-7 (carcinoma)	30
2.7.3 Línea MDA-MB-231 (carcinoma metastásico)	31
2.8 Antecedentes	31
2.8.1 Análisis fitoquímico de los componentes de extracto de planta.	32
2.8.2 Estudio bromatológico de extracto de planta.	34
2.8.3 Síntesis de nanopartículas de oro mediante extracto para uso biomédico.	35
2.8.4 Uso de nanopartículas de oro funcionalizadas contra cáncer de mama.	40
2.8.5 Nanopartículas de oro reforzadas con cisplatino	52
2.8.6 Síntesis de auto-ensamblajes de oro y su toxicidad.	57
2.8.7 Análisis de muestras orgánicas en Resonancia Magnética Nuclear	63
CAPÍTULO III	65
DESARROLLO EXPERIMENTAL	65
3.1 Adquisición de la planta y molienda	65
3.2 Preparación del extracto	66

3.3 Análisis Proximal e Identificación de metabolitos de Taraxacum officinale.	66
3.3.1 Análisis fitoquímico	66
3.3.2 Análisis Proximal.	70
3.3 Elaboración de sal precursora	76
3.4 Síntesis de nanomateriales y su caracterización	76
3.5 Fármaco posible para ligar a los nanomateriales en futuras investigaciones.....	77
CAPÍTULO IV	78
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
4.1 Análisis proximal e identificación de metabolitos presentes en el extracto de la planta.	78
4.1.1 Identificación de metabolitos	78
4.1.1.1 Cuantificación de fenoles totales	80
4.1.2 Análisis Proximal	82
4.2 Síntesis de nanomateriales y su caracterización morfológica-estructural.....	84
4.2.1 Nanopartículas de oro.....	84
4.2.1.1 Espectroscopía de UV-Vis.....	85
4.2.1.2 Espectroscopía de IR.	88
4.2.1.3. Resonancia Magnética Nuclear	91
4.2.1.4 Microscopía Electrónica de Barrido.	92
4.2.1.5 Microscopía Electrónica de Trasmisión.	94
4.2.1.6 Difracción de RX.....	97
4.2.1.7 Espectrometría de Fluorescencia.	99
4.2.2 Ensamblados de oro.	101
4.2.2.1 Espectroscopía de UV-Vis.....	101
4.2.2.2 Espectroscopía IR.	102
4.2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido.	104
4.2.2.4 Microscopía Electrónica de Trasmisión.	106
4.2.2.5 Difracción de RX.....	112
4.2.2.6 Espectroscopía de Fluorescencia.	113
4.3 Cuantificación de los nanomateriales sintetizados.	114
4.3.1 Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) y determinación de pH.	115

CAPÍTULO V	118
CONCLUSIONES.....	118
6. Referencias bibliográficas	120
7. ANEXOS.....	126
7.1 Análisis Bromatológicos.....	126
7.1.1. Determinación de humedad.....	126
7.1.2. Determinación de materia mineral o ceniza.....	127
7.1.3. Determinación de proteína cruda o nitrógeno total.....	127
7.1.4. Determinación de extracto etéreo o grasa cruda.....	129
7.1.5. Determinación de fibra cruda.....	130
7.1.6. Determinación de energía.....	132

INDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 Diferentes objetos desde la escala de tamaño nanométrico “Nanotecnología”[17].....	21
Figura 2. 2 Clasificación de los nanomateriales por sus dimensiones dentro del rango nanométrico [22].....	22
Figura 2. 3 Enlace de nanopartículas para la formación de ensamblados.....	23
Figura 2. 4 Estabilización de nanopartículas por medio de a) ligantes orgánicos y b) estérica [25].	24
Figura 2. 5 Métodos de síntesis de nanopartículas Top-down y Bottom-up. [27]	24
Figura 2. 6 Proceso de formación de nanopartículas [29].....	25
Figura 2. 7 Planta Taraxacum officinale en su hábitat natural	26
Figura 2. 8 Mecanismo de unión de cisplatino al ADN.....	27
Figura 2. 9 Conformación de la molécula de cisplatino.....	28
Figura 2. 10 Principales tejidos constituyentes del pecho materno [34].	29
Figura 2. 11 Resultados de la síntesis de nanopartículas de oro a) UV-Vis, b) imagen de MET (campo claro), c) patrón de difracción de electrones, d) difractograma de rayos X [35].....	37
Figura 2. 12 Espectros de FTIR de a) nanopartículas de oro y b) extracto de semilla de Elettaria cardamomum [35].....	37
Figura 2. 13 Comparación de efectividad de las nanopartículas de oro contra ácido gálico en a) DPPH, b) radical NO y c) radical OH [35].	38

Figura 2. 14 Resultados del análisis de inhibición de las nanopartículas de oro contra a) <i>S. aureus</i> , b) <i>E. coli</i> , c) <i>P. aeruginosa</i> y d) gráfica de la zona de inhibición comparada a la concentración de nanopartículas en las 3 bacterias [35].....	38
Figura 2. 15 Gráfica de porcentaje de viabilidad celular de las nanopartículas de oro dependientes de la concentración [35].....	39
Figura 2. 16 Imágenes microscópicas de contraste de fases de líneas celulares HeLa impregnadas con a) DMSO y AuNps (B3) a diferentes concentraciones b) 6,25 μ L c) 12,5 μ L d) 25 μ L e) 50 μ L f) 100 μ L [35].	39
Figura 2. 17 Resultados del análisis de fluorescencia de emisión y excitación de los AuNCs al tiempo 0 y 6 meses de sintetizados [36].	43
Figura 2. 18 Resultados del análisis de fluorescencia de emisión y excitación de los siete AuNCs conjugados a MUA (a-g) [36].....	44
Figura 2. 19 Imágenes de alta resolución de microscopía electrónica de transmisión (HRTEM) e histogramas de los siete AuNCs [36].....	45
Figura 2. 20 Espectros FTIR correspondientes a los siete AuNCs ligados a MUA [36].	46
Figura 2. 21 Gráficas de comparación de los 7 AuNCs a) Potencial Zeta y b) Prueba de endotoxinas [36].	47
Figura 2. 22 Respuestas de fluorescencia de diferentes concentraciones de AuNC contra células MDA-MB-231 (1000 células). Las barras de error representan la desviación estándar de seis mediciones independientes [36].	49
Figura 2. 23 Resultados de las pruebas de citotoxicidad de los AuNCs contra diferentes células mamarias mediante ensayos de MTT [36].....	50
Figura 2. 24 Patrones de respuesta de fluorescencia de AuNCs contra varias células (1000 células): MDA-MB- 231, SKBR3, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MCF7, HCC1569, MDA-MB-468, HCC1806, Células Hs578T y MCF10A [36].	50
Figura 2. 25 Patrones de respuesta de fluorescencia de AuNCs contra (a) proteínas de membrana, (b) lípidos de membrana y (c) carbohidratos de diferentes tipos de células de mama (1000 células) [36].....	50
Figura 2. 26 Imágenes de microscopía confocal de MDA-MB-231, SKBR3, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MCF7, HCC1569, MDA-MB-468, HCC1806, Hs578T y MCF10A tratadas con MH-MUA-AuNC, NSH- MUA-AuNCs, MBA-MUA-AuNCs, MEN-MUA-AuNCs, GSH-MUA-AuNCs, MSA-MUA-AuNCs y MPA-MUA-AuNCs duran [36].	51

Figura 2. 27 Caracterización de las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX (A) Espectros UV-vis (B) TEM (C) DLS (D) Potencial Zeta [37].....	54
Figura 2. 28 Resultados de a) Espectros FTIR de CIS y DOX, y b) Conjugados con B-AuNPs de cisplatino puro y doxorubicina [37].	55
Figura 2. 29 Estudio de citotoxicidad (dependiente de la dosis) de B-AuNPs, B-AuNPs conjugó CIS y DOX en (A) MG-63 (B) Saos-2 y, (C) células de osteoblastos primarios [37].	56
Figura 2. 30 Efecto del pH sobre la microestructura de nanopartículas de oro en la reacción. Imágenes TEM de Bac-AuNPs obtenidas en las soluciones de a) ácido y b) álcali débil [38].....	58
Figura 2. 31 Efecto de la concentración del agente de reducción en la microestructura de nanopartículas de oro. Imágenes TEM de los Bac-AuNPs obtenidos a partir de a) 5 mM de NaNH ₄ y b) 10 mM de reducción de NaNH ₄ [38].	59
Figura 2. 32 Efecto de la temperatura en la microestructura de nanopartículas de oro. Imágenes TEM de Bac-AuNPs obtenidos, a) temperatura ambiente y b) 70 ° C [38].....	59
Figura 2. 33 Morfología y distribución del tamaño de Bac-AuNPs. Imágenes TEM (a-b) de las Bac-AuNP en diferentes escalas (500 nm-a, 100 nm-b) y c) la distribución de tamaño de Bac-AuNP con curva de ajuste basada en imágenes TEM [38].	60
Figura 2. 34 Caracterización de las Bac-AuNPs. a) Espectro EDS de las Bac-AuNPs, b) Espectro de XRD y patrón SAED de las Bac-AuNPs, c) Espectros de UV-Vis de las muestras preparadas (Bac, AuNPs monodispersas y Bac-AuNP) y d) Potenciales zeta de superficie de Bac-AuN [38].....	61
Figura 2. 35 Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersadas y las Bac-AuNPs con diferentes concentraciones, a) Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersas y Bac AuNPs para células Hela y b) Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersados y AuNP de Bac a células HEK293 [38].	62
Figura 2. 36 Espectros de 1H de RMN de diversos extractos de plantas utilizados para sintetizar nanopartículas de plata.	63
Figura 2. 37 Espectros de RMN 1H de extractos acuosos de Arabidopsis.	64
Figura 3. 1 Metodología experimental para la síntesis de nanopartículas de oro.....	65
Figura 3. 2 Polvo de la planta Taraxacum officinale y extracto del mismo.	66
Figura 4. 1 Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones.	81

Figura 4. 2 Cambio de color en el proceso de síntesis que va de marrón (extracto) y amarillo (soln. de oro) a morado (AuNPs).....	85
Figura 4. 3 Espectro de UV-Vis de a) solución de oro a 5 mM, b) extracto de T. officinale y c) cisplatino.....	86
Figura 4. 4 Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de oro sintetizadas con una solución de oro a 5 mM y una concentración de extracto a 0.015 g/ml.	87
Figura 4. 5 Espectro de IR del extracto de la planta T. officinale.....	89
Figura 4. 6 Espectro de IR de las AuNPs (solución de oro a 5 mM y extracto a 0.015 g/ml).	90
Figura 4. 7 Espectro de IR de la solución de cisplatino.	91
Figura 4. 8 Espectros de RMN 1H a) extracto entero de T. officinale y b) residuo de la síntesis de los nanomateriales de oro.....	92
Figura 4. 9 Micrografías electrónicas de barrido de las AuNPs, a-b) mayor amplificación (1 µm), c-d) menor amplificación (100 nm) y e) análisis químico elemental (EDS).	93
Figura 4. 10 Micrografías electrónicas de transmisión, a) HAADF, b,d-f) campo claro y c) patrón de difracción de electrones.	95
Figura 4. 11 Histograma de tamaño de las AuNPs.....	95
Figura 4. 12 Micrografía electrónica de transmisión, a) AuNP, b) alta resolución denotando las distancias interplanares del Au y c) transformada rápida de Fourier.....	96
Figura 4. 13 Difractograma de RX, a) extracto de T. officinale y b) cisplatino.....	98
Figura 4. 14 Difractograma de las AuNPs (solución de oro a 5 mM y extracto a 0.015 g/ml).	99
Figura 4. 15 Espectro de Fluorescencia de a) AuNPs, b) Soln de oro a 5 mM, c) extracto de T. officinale (0.015g/ml) y d) cisplatino.	100
Figura 4. 16 Espectro de UV-Vis de a) ensambles de oro a 1 hr de reacción y b) ensambles a 9 meses de reacción.	102
Figura 4. 17 Espectro de IR de los ensambles de oro (soln. De oro a 5 mM y extracto a 0.02 g/ml).	103
Figura 4. 18 Micrografías electrónicas de barrido de los ensambles a diferentes amplificaciones a-e) y análisis químico elemental (EDS).	104
Figura 4. 19 Mapeo químico elemental de a) ensambles, b) Au, c) K y d) Cl.	105
Figura 4. 20 Micrografías de contraste Z mostrando los ensambles de oro (cota de 200 nm).	106
Figura 4. 21 Micrografías de contraste Z para los ensambles de oro (cota 50 nm).....	107
Figura 4. 22 Micrografías electrónicas de transmisión (campo claro) de los ensambles.	107

Figura 4. 23 Micrografías electrónicas de transmisión (campo claro) de los ensambles de oro individuales (cota 50 nm).	108
Figura 4. 24 Micrografías de contraste Z para los ensambles de oro individuales (cota 50 nm). ...	109
Figura 4. 25 Mecanismo de crecimiento para los ensambles propuesto en 4 pasos.....	110
Figura 4. 26 Histograma de tamaño de ensambles de oro obtenido mediante análisis de imágenes.	111
Figura 4. 27 Micrografía de alta resolución de una rama floral apartado a), trasformada rápida de Fourier apartado b), patrón de difracción de electrones apartado b) y estructura interna del ensamble de oro en apartado d).	111
Figura 4. 28 Difractograma de RX de los ensambles de oro FCC.	113
Figura 4. 29 Espectro de Fluorescencia perteneciente a los ensambles de oro.	114
Figura 4. 30 Recta de calibración de los estándares de oro a 5, 10 y 15 PPM.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1 Propiedades de los nanomateriales [20].	21
Tabla 2. 2 Descripción técnica de la planta Taraxacum officinale [31].....	26
Tabla 2. 3 Análisis fitoquímico cualitativo de fruto entero, semilla y pulpa en extracto con etanol y hexano [11].	33
Tabla 2. 4 Taninos y fenoles totales en la fruta entera, pulpa y semilla, y contenido de antocianina de la pulpa y semilla del extracto de carnauba [11]......	34
Tabla 2. 5 Porcentaje de rendimiento cuántico (QY) de las nanopartículas cofuncionalizadas AuNCs-MUA [36]......	41
Tabla 2. 6 Resultados de la caracterización de espectrometría de masa de los ligantes en la superficie de las AuNCs [36]......	47
Tabla 2. 7 Diez diferentes tipos de líneas celulares de cáncer de mama [36].	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4. 1 Resultados cualitativos de las pruebas de identificación de diversos metabolitos.	80
Tabla 4. 2 Datos experimentales para cálculo de porcentaje fenólico total.	81
Tabla 4. 3 Resultados del análisis bromatológico del polvo de la planta T. officinale.	84
Tabla 4. 4 Datos de PPM y absorbancias obtenidos mediante EAA.	116
Tabla 4. 5 Eficiencia del proceso de formación de nanomateriales.	116
Tabla 4. 6 Resultados de la medición de pH.	117

RESÚMEN

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas y ensambles de oro por medio del extracto de la planta *Taraxacum officinale* (*T. officinale*) y del precursor ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), las cuales se caracterizaron por medio de Espectroscopía Ultravioleta Visible, Espectroscopía de Infrarrojo, Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía Electrónica de Trasmisión, Difracción de Rayos X, Espectroscopía de fluorescencia, Espectroscopía de Absorción Atómica y Resonancia Magnética Nuclear.

Una aplicación importante de las nanopartículas y ensambles de oro es el uso de éstos materiales para tratamientos contra el cáncer de mama, lo cual primordialmente se prueba en las líneas celulares de las cuales se origina éste cáncer (MCF-12F línea celular normal, MCF-7 carcinoma, MDA-MB-231 carcinoma metastásico), en algunos estudios se utilizan adicionalmente fármacos ligados al nanomaterial para combatir de doble manera el cáncer, es decir, por la liberación del medicamento que va ligado a su superficie y por la generación de calor de los nanomateriales de oro, debido a las radiaciones incidentes por quimioterapia para tratar el cáncer de mama. Ahora bien, una alternativa eficaz contra este tipo de enfermedad es utilizar cisplatino como fármaco de tratamiento, por su rápida eliminación del cuerpo y por su alta efectividad contra diversos tipos de cáncer; el problema es que al ser administrado al paciente, éste fármaco destruye tanto las células normales como las cancerígenas, provocando daños secundarios tales como lesiones en el ADN, enfermedades renales, ototoxicidad, etc. La solución a éste problema es ligar mediante las sustancias orgánicas provenientes del extracto de la planta *T. officinale* lo cual se podría realizar en estudios futuros a la presente investigación. Por otra parte, el cáncer de mama en México representa la principal neoplastia maligna, por lo cual éste trabajo busca ser un análisis inicial de tratamiento quimioterapéutico, aprovechando que las nanopartículas y ensambles de oro tienen afinidad por las células cancerígenas, funcionando así como agente direccionado, llevando consigo el fármaco que se podría liberar al entrar en contacto con el cáncer debido al pH que presenta éste mismo, lo cual genera la ruptura del enlace ligante-fármaco, permitiendo que actúen las nanopartículas, ensambles y cisplatino, todo al mismo tiempo, para destruir las células cancerígenas. Las propiedades fotocatalíticas del oro permiten por medio de radiación, la detección del mismo manteniendo el control de su ubicación.

Debido a lo anterior mencionado, se realizaron las caracterizaciones respectivas a los nanomateriales de oro, para así mismo generar información que en trabajos subsecuentes funcione como base para la aplicación de estos mismos en las líneas celulares de cáncer de mama y respecto al extracto de la planta se le realizaron estudios fitoquímicos detectando las posibles sustancias que actúan como agentes estabilizantes, reductores y sustancias de residuo que puedan afectar a las líneas celulares.

Palabras clave: Análisis Bromatológico, Nanopartículas, Ensamblados, Biosíntesis, Oro.

ABSTRACT

In the present investigation, nanoparticles and gold assemblies were synthesized using the plant extract of *Taraxacum officinale* (*T. officinale*) and the precursor salt tetrachloroauric acid (HAuCl₄), which were characterized by Visible Ultraviolet Spectroscopy, Infrared Spectroscopy, Electron Microscopy of Scanning, Electron Microscopy of Transmission, X-ray Diffraction, Fluorescence Spectroscopy, Atomic Absorption Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance.

An important application of nanoparticles and gold assemblies is the use of these materials for treatments against breast cancer, which is primarily tested in the cell lines from which this cancer originates (MCF-12F regular cell line, MCF-7 carcinoma, MDA-MB-231 metastatic carcinoma). In some studies drugs linked to the nanomaterial are additionally used to combat cancer in two ways, that is, by the release of the drug that is bound to its surface and by the generation of heat of gold nanomaterials, due to radiation incident by chemotherapy to treat breast cancer. Now, an effective alternative against this type of disease is to use cisplatin as a treatment drug, for its rapid elimination from the body and its high effectiveness against various types of cancer. The problem is that when administered to the patient, this drug destroys both healthy and cancerous cells, causing secondary damage such as DNA damage, kidney diseases, ototoxicity, etc. The solution to this problem is to bind using organic substances from the extract of the plant *T. officinale* which could be done in future studies to the present investigation.

On the other hand, breast cancer in Mexico represents the main malignant neoplasm, which is why this work seeks to be an initial analysis of chemotherapy treatment. Taking advantage of the fact that nanoparticles and gold assemblies have an affinity for cancer cells, functioning as a targeted agent, bringing with it the drug that could be released when coming into contact with cancer due to the pH it presents itself. The rupture of the binding ligand-drug due to this pH, allowing the nanoparticles, assemblies, and cisplatin to act, all at the same time, to destroy cancer cells. The photocatalytic properties of gold allow utilizing radiation, the detection of it while maintaining control of its location. Due to those as mentioned earlier, the respective characterizations were made to the gold nanomaterials, to generate information that in subsequent works function as a basis for the application of these in the breast cancer cell lines. And concerning the extract of the plant Phytochemical studies were carried out detecting the possible substances that act as stabilizing agents, reducing agents and waste substances that may affect cell lines.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología está enfocada a la fabricación molecular de materiales que permitan construir, transportar, distribuir y manipular equipos en base al reordenamiento de átomos con la posibilidad de desarrollar medicinas, sanitizantes, piezas, etc. en lugares remotos donde no sea posible la instalación de grandes fábricas [1].

Algunas de las ventajas de estos materiales son sus propiedades que dependen de su forma, tamaño y superficie [2], que les permitan agruparse o permanecer en estado libre y ser aprovechables en la purificación de aguas residuales, desarrollo de dispositivos de visualización de bajo costo, mejora de productos medicinales, reducción del impacto ambiental negativo por el uso de productos químicos debido al crecimiento industrial, etc. [3]

Con el desarrollo de la nanotecnología aumenta la necesidad de sintetizar nanomateriales, en donde la síntesis química se ha tornado cada vez más importante, el problema de este tipo de síntesis son la gran cantidad de residuos tóxico-peligrosos que se generan y el elevado costo que implica llevar a cabo ésta síntesis. Una alternativa derivada de éste método es la “síntesis verde” [4], que promueve el uso de organismos y microorganismos [5] con ayuda de sales precursoras para producir y estabilizar materiales nanométricos de manera más económica, fácil y amigable con el medio ambiente [6]. En el presente estudio, la síntesis de nanopartículas y ensambles se llevó a cabo utilizando extracto de una planta michoacana, de fácil adquisición como lo es *Taraxacum officinale* comúnmente llamada diente de león.

La planta contiene más de 40 componentes identificados, se han podido aislar diversos flavonoides y derivados cumarínicos. Entre éstos, al menos ocho flavonas y glucósidos flavónicos, destacando tres glucósidos flavonoides: luteolina 7-glucósido y dos luteolina 7-diglucósidos, que se obtuvieron de las flores y las hojas junto con luteolina libre y crisoeriol [7].

Los ácidos hidroxycinámicos, el chicórico, el monocateiltartárico y el clorogénico, se han localizado en todos los órganos de la planta. El mayor contingente corresponde a diversos derivados de ácido tartárico, mono y dicafeiltartárico, siendo el principal componente el ácido chicórico.

De la raíz se ha logrado determinar el ácido 14-O-beta-D-glucosil-11,13-dihidro-taraxínico y el ácido 14-O-beta-D-glucosil-taraxínico, también de éste mismo órgano 5 sesquiterpenolactonas, junto con los compuestos benzilglucósidotaraxínicos, dihidroconiferina, siringina y dihidrosiringina y otras tres lactonas, libeta, 13-dihidrolactucina ixerina D y ainsliosida, además una enzima del tipo de la serinproteínasa, la taraxalisina, de la familia de la subtilisina y diversas frutofuranosidasas.

El *Taraxacum* contiene esteroides en toda su estructura, siendo el sitosterol, el más abundante en estado libre. Los ésteres del tipo 4,4-dimetilesterol son las formas libres más abundantes, especialmente durante el invierno. Por lo tanto, todos esos compuestos hacen a ésta planta un agente de síntesis, estabilización y ligante adecuado para su uso en la elaboración de nanopartículas y ensamblajes de oro.

Se ha comprobado que las nanopartículas de oro son afines a las células cancerígenas [8], aprovechando ésta propiedad se buscó en este trabajo, caracterizar por diversas técnicas éstos nanomateriales y el cisplatino para así futuramente en trabajos posteriores enlazar al fármaco cisplatino por medio de agentes ligantes provenientes del extracto de la planta, los cuales son los mismo que forman el ensamble de oro acarreador del fármaco hacia el cáncer, ya que algunos de los químicos ligantes anteriormente utilizados en la ciencia son residuos tóxicos altamente perjudiciales al ser humano [9].

Por otro lado, según la INEGI [10], en 2017 aumentó la tasa de mortalidad por cáncer en México, siendo el de mama el principal causante de decesos en mujeres a nivel mundial, por su recurrencia e importancia del diagnóstico y tratamiento temprano, se ha puesto principal interés en desarrollar un tratamiento direccionado y con menor impacto negativo comparado a la utilización de quimioterapias invasivas en diversos órganos y células sanas [5].

1.1 Objetivo general

1.1.1 Sintetizar nanopartículas y ensamblajes de oro utilizando como agente reductor y estabilizador el extracto de la planta *T. officinale*, caracterizando las sustancias activas por técnicas fitoquímicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis proximal e identificación de metabolitos del extracto de la planta *T. officinale*.
- Sintetizar nanopartículas y ensambles de oro mediante el extracto de la planta *T. officinale* y Ácido tetracloruro áurico (HAuCl₄).
- Determinar su dispersión y fluorescencia por medio de la espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis) y Espectroscopía de Fluorescencia (EF) respectivamente.
- Evaluar las características estructurales de las nanopartículas, ensambles y extracto de la planta *T. officinale* por medio de la Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Difracción de Rayos X (DRX).
- Determinar el tamaño, forma y figura de las nanopartículas y ensambles de oro sintetizadas, a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (MET)

1.2 Justificación

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño que les confiere diferentes propiedades comparadas al material en granel que podrían aprovecharse en un auto-ensamblado de las mismas, lo cual permitiría transportar mayor cantidad de cisplatino funcionalizado hacia las células cancerosas. La síntesis por reducción química convencional es completamente funcional para éstos fines, ya que genera nanopartículas y ensambles perfectamente ordenados, no obstante, el problema de éste método resulta en que se necesitan reactivos que generan residuos tóxicos [11], tales como el citrato trisódico, tartrato de sodio y borohidruro sódico, en el caso de este último, produce ecotoxicidad aguda en la zona de vertido, ya que reacciona con el agua y es difícil de recuperar o limpiar, además es altamente flamable, y provoca quemaduras graves en la piel e irritación severa de los ojos y también puede producir intoxicación por ingesta [12].

Es por ello que la síntesis de nanopartículas y ensambles por medio de extractos de plantas en este caso mediante *T. officinale*, representa una posibilidad viable, con bajos costos y de fácil operación [13]. La planta *T. officinale* es de fácil adquisición y crece en ambientes de poca humedad y luz solar, además con ésta planta aún no se han realizado investigaciones sobre la síntesis de nanomateriales.

Otra ventaja del método de síntesis verde por medio de extractos de plantas, es que no tiene restricciones de manipulación que representen un daño a la salud, de tal manera se busca encontrar una planta o microorganismo que sea eficaz y rápido para la síntesis, permitiendo generar mayores cantidades de nanopartículas y ensamblados, de tamaño más pequeño y ordenados. Cabe destacar que, si se pensara en el escalamiento del proceso, no se necesitan altas cantidades de energía, elevadas temperaturas, agitación al sistema, grandes presiones o reactivos para estabilizar o reducir las nanopartículas ya que el mismo extracto de la planta es el encargado realizar todo a la vez de manera más económica comparada con la síntesis por reducción química convencional.

Para el caso del análisis proximal e identificación de metabolitos, ya existen bastantes estudios y metodologías practicadas con anterioridad [14], aunque son escasos los relacionados a la síntesis de nanopartículas y ensamblados funcionalizados con un fármaco y dirigidos hacia el cáncer de mama sin causar daño a células sanas como lo genera por sí solo el cisplatino. De este modo, este estudio aporta información al conocimiento de las plantas en específico de *Taraxacum Officinale* por medio de la cuantificación fenoles totales (método Folin-ciocalteau) [15] esteroides, estilbenoides, acetilénicos, saponinas, benzopirona (flavonoides), taninos, compuestos aromáticos, monosacáridos, Nafto y antraquinonas [16], para el análisis proximal se realizó la cuantificación de humedad final, cenizas, extracto etéreo, proteína, fibra cruda, extracto no nitrogenado, nutrientes digestibles totales y energía total [17]; además de esto se genera una posibilidad del tratamiento quimioterapéutico contra cáncer de mama, no obstante, podría implementarse contra varios tipos de cáncer, ya que los agregados presentan un 600% de interacción con las células cancerígenas debido al distinto pH que éstas presentan comparadas con las células normales, ayudando a detectar el cáncer rápidamente, por medio de su actividad fototérmica al desprender calor ante la luz UV (380-510 nm) [18].

1.3 Hipótesis

Las sustancias extraídas de la planta *Taraxacum Officinale* permitirán a temperatura ambiente la reducción, estabilización y funcionalización de nanopartículas y ensamblados de oro a diferentes relaciones volumétricas de extracto y solución de sal precursora, además el análisis proximal e

identificación de metabolitos ayudarán a conocer la dosificación posible del extracto como residuo de la síntesis, para así generar información sobre los posibles efectos en células (MCF-12F línea celular normal, MCF-7 carcinoma, MDA-MB-231 carcinoma metastásico), esperando que el cisplatino funcionalizado al nanomaterial de oro mejore en futuros trabajos la eficiencia destructiva de las células cancerígenas.

1.4 Metas científicas

- ✓ Obtener nanopartículas de Oro homogéneas con tamaño menor a 50 nm.
- ✓ Sintetizar ensambles nanoestructurados de oro ligados con extracto de *Taraxacum officinale* con tamaño menor a 200 nm.
- ✓ Conocer cuantitativamente los componentes fitoquímicos y bromatológicos del extracto de la planta.
- ✓ Determinar los posibles agentes reductores y estabilizantes en el proceso de síntesis de los nanomateriales.

CAPÍTULO II.

REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

Es importante conocer la nanociencia para poder identificar los campos posibles de aplicación de los nanomateriales, sus efectos y ventajas de los mismos, además de las características del extracto de la planta *T. officinale*, el fármaco cisplatino y las líneas celulares donde se podrían aplicar los nanomateriales, ya que con ésta información es posible adentrarse en temas relacionados al trabajo realizado en la presente investigación, lo cual se anexa en el éste capítulo, apoyado de antecedentes respecto a estudios similares realizados en años recientes.

2.1 Nanotecnología

Se podría definir de manera general nanotecnología como la fabricación de materiales, estructuras, dispositivos, medicamentos y sistemas funcionales a través del control y ensamblado de la materia a la escala del nanómetro siendo esta de 1 a 100 nanómetros, desde el átomo hasta un poco por debajo de la célula [19]. Estos materiales poseen propiedades nuevas (físicas, químicas, biológicas, mecánicas, eléctricas, etc.) por ser compuestos que se encuentran cerca de las dimensiones atómicas, las leyes que definen su comportamiento son las mismas que gobiernan el nivel atómico, es decir, la mecánica cuántica [20]. Actualmente, se cuenta con equipos que nos permiten visualizar y manipular materiales nanométricos favoreciendo áreas industriales como: productoras de cerámicos, metalurgia, producción de láminas delgadas, electrónica, materiales magnéticos, dispositivos ópticos, catalizadores, almacenadores de energía y biomedicina. La Figura 2.1 nos muestra la escala y unidad de medida de materiales nano-micro métricos y algunos de mayor tamaño [21].

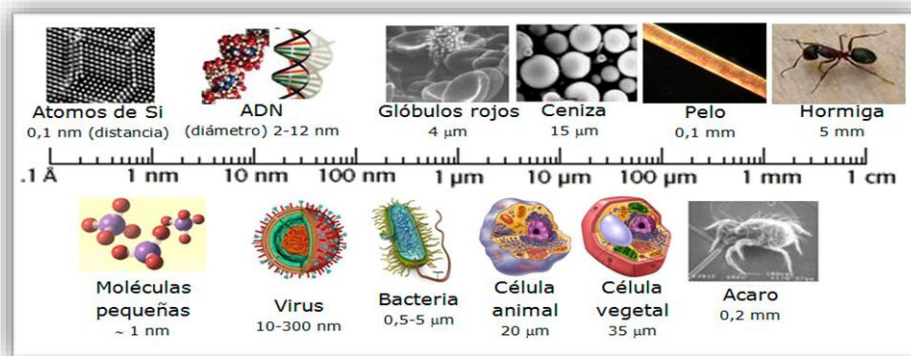


Figura 2. 1 Diferentes objetos desde la escala de tamaño nanométrico “Nanotecnología”[22]

2.2 Nanomateriales

Son una nueva clase de materiales, ya sean, metálicos, cerámicos, semiconductores, polímeros o bien una combinación de estos, [23] con propiedades morfológicas más pequeñas que un micrómetro en al menos una dimensión, una definición lógica situaría la nanoescala entre la microescala (1 micrómetro) y la escala atómica/molecular, alrededor de 0.2 nanómetros [24], en la tabla 2.1 se describen de manera general algunas de las propiedades de los nanomateriales.

Tabla 2. 1 Propiedades de los nanomateriales [25].

Propiedades	Descripción
Temperatura de fusión	Ésta es menor en comparación con el material en bulto, gracias a la enorme fracción de átomos superficiales.
Propiedades mecánicas	Son mejores con la disminución de tamaño, como el caso de la resistencia a la tensión.
Características ópticas	Son diferentes a las del bulto, el color de las nanopartículas metálicas cambia en función del tamaño de las mismas, debido a la resonancia del plasmón superficial.
Conductividad eléctrica	Disminuye en una dimensión reducida, debido a la dispersión de la superficie. Sin embargo, la conductividad eléctrica puede aumentar debido al mejor ordenamiento de la estructura.

Características magnéticas	Son diferentes en comparación de los materiales a granel, en algunos materiales el ferromagnetismo desaparece al pasar a la nanoescala, y el paramagnetismo aparece debido a la enorme energía superficial.
----------------------------	---

Muchas de las propiedades de los materiales dependen de cómo se comporten los electrones, ya sea en movimiento u ordenados, limitándose por las dimensiones del propio material. Además, la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es mayor que en materiales de tamaño más elevado, es decir, cuentan con mayor área superficial. Por consiguiente, si se reducen las dimensiones de un material, se modifican sus propiedades y en consecuencia se pueden diseñar materiales con propiedades específicas.

De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico [26], los nanomateriales pueden clasificarse en cuatro diferentes tipos (Figura 2.2):

1. Materiales en dimensión cero: Las tres dimensiones del material se ubican en el régimen nanométrico, a esta corresponden las nanopartículas.
2. Materiales en una dimensión: Tienen una longitud variable, conservan dos de sus dimensiones en el régimen de nanómetros, como es el caso de los nanoalambres y nanotubos.
3. Materiales de dos dimensiones: Presentan áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como el caso de las películas delgadas.
4. Materiales de tres dimensiones: En este régimen, los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas.

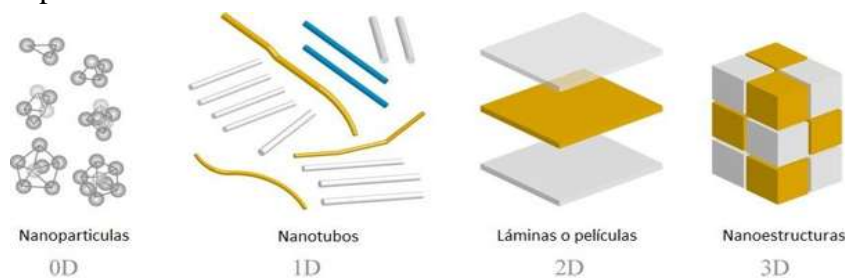


Figura 2. 2 Clasificación de los nanomateriales por sus dimensiones dentro del rango nanométrico [27].

El estudio y análisis de los nanomateriales implica a su vez aspectos de caracterización estructural, composicional y de propiedades diversas (magnéticas, eléctricas, mecánicas, ópticas, biológicas) que requieren de instrumentación especializada. Para ello son utilizadas diversas técnicas de observación microscópicas, espectroscópicas y de difracción, por tanto es importante conocer las características de las nanopartículas y ensambles metálicos. En el caso de las nanopartículas metálicas su principal característica es que contienen un número determinado de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño. Esto les da propiedades como la resonancia plasmónica, que es la propiedad que interactúa específicamente con la luz, la cual se puede ver claramente en el caso del oro, donde soluciones de distintos tamaños de nanopartículas presentan colores que van desde el púrpura hasta el marrón. Este cambio de color es resultado de la oscilación colectiva de los electrones y la luz [28]. El autoensamblaje es la organización autónoma y espontánea de los nanocomponentes en patrones o estructuras, es ubicuo en la naturaleza, por ejemplo, en el crecimiento de cristales y organismos, proporciona la base para nuevas e importantes técnicas de fabricación industrial, especialmente para los componentes de las escalas mili, micro y nano [29]. Se considera que los sistemas de auto-montaje serán capaces de crear dispositivos complejos, heterogéneos, no periódicos, en tres dimensiones mediante procesos de producción masiva, ya que al tener nanoestructuras involucradas, las propiedades serán una suma en conjunto de todas aquellas de los componentes individuales (Figura 2.3)



Figura 2. 3 Enlace de nanopartículas para la formación de ensamblés [30].

La fuerza de unión que mantiene estables a los ensamblés, es un enlace estérico por ligantes orgánicos (Figura 2.4a), como lo son fosfinas, aminas, alcanotioles y tioéteres que por lo general contienen átomos donadores de electrones como P, N, S, etc. Además se utilizan estabilizadores como THF (Tetrahidrofurano), THF/MeOH, carbonato de propileno, alcoholes de cadena larga, surfactantes y compuestos organometálicos, que actúan rodeando los centros metálicos, por capas de materiales que son estéricamente más voluminosos. Estos proveen una barrera estérica (Figura 2.4b) que previene el contacto próximo entre los centros metálicos de las partículas evitando la coalescencia de las nanopartículas [31].

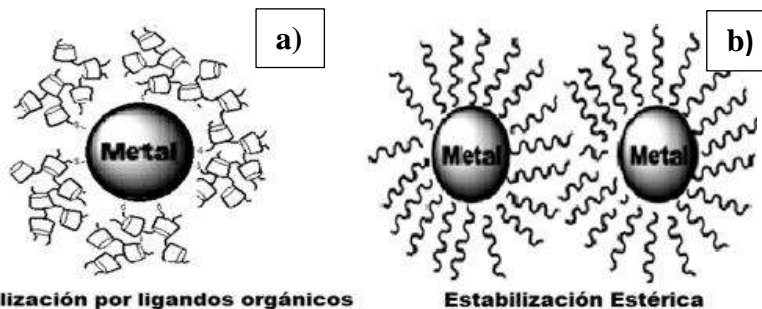


Figura 2. 4 Estabilización de nanopartículas por medio de a) ligandos orgánicos y b) estérica [31].

2.3 Síntesis de nanopartículas y ensambles

El procedimiento y las condiciones de síntesis influyen directamente en la forma y tamaño de los nanomateriales, por lo que existen diversos tipos de elaboración que utilizan métodos químicos, físicos y biológicos [32], los cuales pueden ser establecidos por medio de diferentes criterios dependiendo si son arriba-abajo o abajo-arriba (Top- down y bottom-up, por sus siglas en inglés) [33]. En los primeros se reestructura un material a granel para obtener individuos más pequeños, parcialmente separados, procesados o depositados, ya sea por medio de molienda, métodos químicos y la volatilización de un sólido seguido de la condensación del mismo, con el fin de formar los nanomateriales. En segundo caso, los nanomateriales se ensamblan a partir de bloques de construcción básicos como moléculas o nanoclusters con propiedades adecuadas que ayudan a crecer, a partir de precursores elementales formando un montaje de mayor tamaño (Figura 2.5).

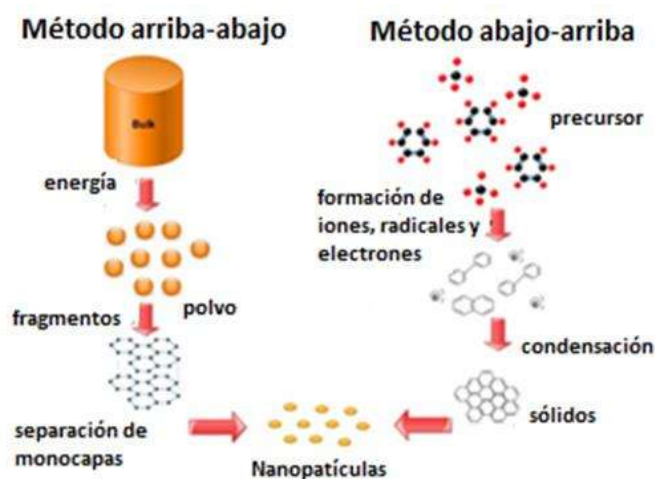


Figura 2. 5 Métodos de síntesis de nanopartículas Top-down y Bottom-up. [34]

Para la síntesis de las nanopartículas y ensamblados de oro se usó el método biológico denominado química verde, fue adoptada como una propuesta novedosa para reducir y/o eliminar los problemas ambientales derivados de actividades industriales, planteando 12 principios básicos para conseguir estos objetivos: [25] 1.- Prevenir la creación de residuos, 2.- Maximizar la economía atómica, 3.- Realizar síntesis química menos peligrosa, 4.- Diseñar productos y compuestos menos peligrosos, 5.- Utilizar disolventes y condiciones seguras de reacción, 6.- Diseñar procesos para la eficiencia energética, 7.- Utilizar materias primas renovables, 8.- Evitar derivados químicos, 9.- Utilizar catalizadores, 10.- Diseñar productos fácilmente degradables al final de su vida útil, 11.- Monitorear los procesos químicos en tiempo real para evitar la contaminación, 12.- Prevenir accidentes.

Para nuestro caso la síntesis de nanopartículas y ensamblados cumple con la mayoría de estos principios de esta manera se denomina a este método biológico síntesis verde, basado principalmente en la síntesis química convencional a partir de una sal precursora del metal a utilizar, que en nuestro caso de estudio es ácido tetracloro áurico (HAuCl_4), y los agentes estabilizadores y reductores son los componentes de la planta *Taraxacum officinale* los cuales se encuentran presentes en el extracto de la misma. Algunos de los factores que comúnmente afectan la síntesis de nanopartículas son la temperatura, agitación, pH, concentraciones de la solución de la sal precursora, concentración del extracto de la planta, agitación mecánica o ultrasónica y uso de microondas, los cuales nos afectan directamente en el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas y ensamblados [35]. Los mecanismos de síntesis biológica por medio de plantas son aún desconocidos, debido a que es difícil predecir cuál de los componentes de la planta o conjuntos de ellos mismos son los encargados de estabilizar y reducir la sal precursora para obtener las nanopartículas. La Figura 2.6 nos describe de manera general el proceso para obtener las nanopartículas [36].

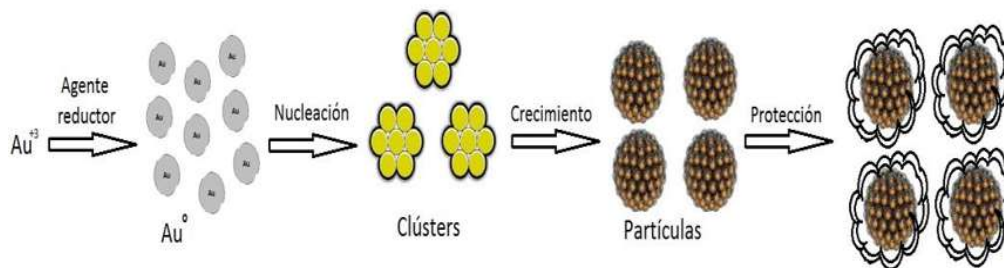


Figura 2. 6 Proceso de formación de nanopartículas [36].

2.4 Características de la planta *Taraxacum officinale*

Ésta planta comúnmente llamada Diente de León (Figura 2.7), se introdujo a muchos países proveniente del Norte de América, crece en regiones templadas, se conoce su distribución en los siguientes estados de México: Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas [37], es una planta perenne, con un hábitat ruderal y arvense, crece en pastizales [38]. Se puede encontrar fácilmente y por lo general la población la utiliza en infusiones.



Figura 2. 7 Planta *Taraxacum officinale* en su hábitat natural

Las características técnicas de esta planta se describen en la tabla 2.2 [38].

Tabla 2. 2 Descripción técnica de la planta *Taraxacum officinale* [38]

Descripción técnica	
Tamaño	De 10 a 50 cm de alto.
Tallo	Escapo uno o varios, erecto, hueco, sin brácteas, glabro a lanoso, llevando una sola cabezuela.
Hojas	Arrosetadas en la base, oblongas a oblanceoladas en contorno general, de 2 a 40 cm de largo, más o menos profundamente divididas, glabras a algo pubescentes y látex blanco.
Inflorescencia	Involucro campanulado, sus brácteas interiores 13 a 21, lineares a lanceoladas, de 10 a 25 mm de largo, creciendo con la edad de la

	cabezuela, las exteriores en menor o mayor número, más cortas, más o menos pronto reflejas.
Cabezuela/Flores	Flores 80 a 250, sus corolas amarillas, de 7 a 15 mm de largo, lígula oblonga, más larga que el tubo.
Frutos y semillas	Aquenio fusiforme, tuberculado-espinoso en la parte superior, de 2.5 a 4 mm de largo, glabro, el pico 2 a 4 veces más largo que el cuerpo del aquenio, café amarillento, café claro o verdoso, con numerosas costillas longitudinales con espinas; vilano de ± 60 cerdas blancas o blanquecinas, de 5 a 8 mm de largo. La superficie del fruto es casi lisa.
Plántulas	Hipocótilo de hasta de 3 mm de largo, con o sin pelos; cotiledones de lámina obovada, de 5 a 10 mm de largo y 2.5 a 6 mm de ancho, sin pelos; sin epicótilo; hojas alternas y en roseta.
Raíz	Gruesa y napiforme, a veces ramificada.

2.5 Características del cisplatino

Éste medicamento quimioterapéutico es también conocido como cis-diaminodicloroplatino(II) $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, ha sido utilizado para el tratamiento de diversos tipos de cánceres humanos, incluidos los cánceres de vejiga, cabeza y cuello, pulmón, ovarios, testículos, carcinomas, los tumores de células germinales, linfomas y sarcomas. El modo de acción del cisplatino se ha relacionado con su capacidad de entrecruzarse con las bases de purina en el ADN (Adenina y Guanina); interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN, causando daño en el ADN y, posteriormente, induciendo la apoptosis en las células cancerosas (Figura 2.8).

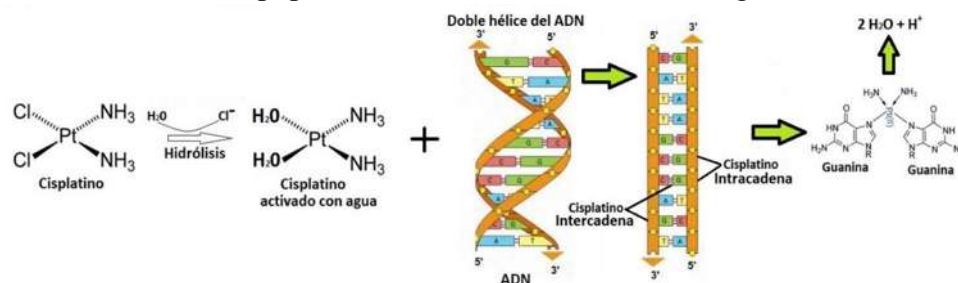


Figura 2. 8 Mecanismo de unión de cisplatino al ADN.

Desde la perspectiva molecular, el cisplatino es un ejemplo perfecto de cómo una pequeña alteración en la estructura química puede afectar significativamente la actividad biológica en la célula diana. Como se ilustra en la Figura 2.9, el cisplatino, está compuesto de un ion de platino rodeado por cuatro ligandos; con los ligandos de amina de lado izquierdo formando interacciones más fuertes con el ion platino, y los ligandos de cloruro a la derecha formando grupos que pueden liberarse fácilmente permitiendo al ión platino formar enlaces con las bases de ADN [39].

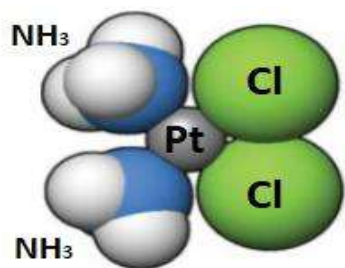


Figura 2. 9 Conformación de la molécula de cisplatino.

Sin embargo, debido los numerosos efectos secundarios indeseables como problemas renales graves, reacciones alérgicas, disminución de la inmunidad a las infecciones, trastornos gastrointestinales, hemorragia y pérdida de la audición, especialmente en pacientes jóvenes, se han utilizado otros medicamentos contra el cáncer que contienen platino como carboplatino, oxaliplatino, ormaplatino y enloplatino [40]. Además, se ha considerado que las terapias de combinación de cisplatino con otros fármacos reducen su toxicidad por ejemplo plactaxel y anvirzel para cáncer de mama, es por ello que se ha propuesto el uso de ensamblajes de oro como agente acarreador del cisplatino a las células cancerígenas para evitar daño por fármaco libre. También su reactividad se limita debido a los complejos proteína-cisplatino, que se excretan. La mayor tasa de excreción de mismo significa que se retiene menos en el cuerpo y, por lo tanto, sus efectos secundarios son menos duraderos, éste fármaco tiene una vida media de retención de 1.5 - 3.6 horas, además la eficacia del cisplatino tiene una relación de 1:4 comparada con otros fármacos, es decir, se requieren más cantidades de otros fármacos para que alcancen la efectividad del cisplatino. Los primeros informes de compuestos de Pt se basaron en el enlace de una molécula fluorescente (por ejemplo, cianina) a cisplatino, pero estudios más recientes se han centrado en estrategias para sintetizar derivados intrínsecamente fluorescentes. Debido a esto, el modo de unión de estos compuestos al ADN puede analizarse fácilmente mediante técnicas de fluorescencia, en éste caso las nanopartículas de oro presentan propiedades fotocatalíticas que ayudarán a detectar el lugar de acción del cisplatino.

2.6 Cáncer de mama

El pecho o mama se compone de tres principales tipos de tejidos, glandulares, estromales y además tejido linfático. Los primeros tejidos albergan las glándulas productoras de leche (lóbulos) y los conductos (los pasajes de la leche) mientras los segundos incluyen tejidos grasos y fibroso-conectivos de la mama, por último el tejido linfático el cual contiene el sistema inmunitario que elimina los líquidos y los desechos celulares (Figura 2.10).

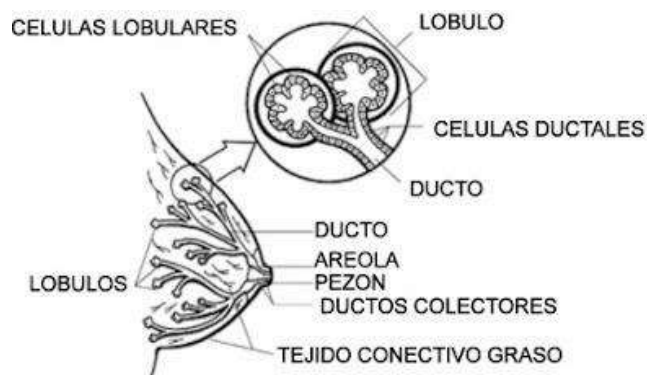


Figura 2. 10 Principales tejidos constituyentes del pecho materno [41].

Hoy en día, el cáncer de mama es el cáncer mortal potencialmente más diagnosticado y la principal causa de decesos en mujeres. Éste tipo de cáncer es originado en las células del tejido mamario, la mayoría comúnmente desde el revestimiento interno de los conductos lácticos o los lóbulos, éste cáncer presenta un ADN Y ARN muy similar a las células de las cuales éste se originó, lo que hace que el sistema inmune no las detecte [41].

Las células cancerígenas se forman a partir células normales debido a una modificación (mutación de ADN y/o ARN). Éstas pueden ocurrir espontáneamente o pueden ser inducidos por otros factores tales como: radiación nuclear, radiación electromagnética (microondas, Rayos X, Rayos Gamma, Rayos Ultravioletas, etc.), virus, bacterias, hongos, parásitos (debido a la inflamación de los tejidos o irritación), productos químicos en el aire, agua y comida, lesión mecánica a nivel celular, radicales libres, evolución y envejecimiento de ADN y ARN, dieta pobre (entorno celular no saludable), personas con predisposiciones genéticas y personas de avanzada edad (más de 80), por lo cual los métodos de detección y tratamiento son muy variados.

Las técnicas de tratamiento dependen de la etapa en la cual se encuentre desarrollado el cáncer, pueden variar desde una extracción del tumor (lumpectomía) hasta la extirpación del seno (mastectomía) o pueden llevarse a cabo cirugías de ganglios linfáticos centinela que contienen al

cáncer, para así permitirle a las mujeres conservar el seno. Otros tipos de tratamiento son la radioterapia que implica el uso de rayos X de alta energía o rayos gamma que apuntan a un tumor o sitio de tumor post cirugía, la quimioterapia que es el uso de medicamentos anticáncer para tratar células cancerosas, siendo esas las más comunes aunque actualmente se encuentra en desarrollo el uso de terapia génica, inactivación oncogénica, inducción de suicidio celular, aumento de genes supresores tumorales, quimioprotección, expresión de citoquinas ectópicas, oncólisis mediada por virus, mejoramiento del sistema inmune y medicina nanotecnológica [41].

2.7 Líneas celulares

Dentro de los enfoques de este trabajo es funcionar como base de información para aplicar las nanopartículas (con y sin purificación) y ensamblajes de oro, extracto de *Taraxacum officinale*, cisplatino y complejo nanomaterial, en 3 líneas celulares (MCF-12F línea celular normal, MCF-7 carcinoma, MDA-MB-231 carcinoma metastásico), para lo cual las características de cada línea celular se describirán a continuación.

2.7.1 Línea MCF-12F (Línea celular normal)

Organismo: Homo sapiens (humano), Tejido: glándula mamaria, Enfermedad: normal, tipo de célula: epitelial, Edad: 60 años, Género femenino, Morfología: epitelial, Propiedades de crecimiento: adherente, Isoenzimas: AK1 (1), ESD (1), G6PD (B), GLOI (12), PGM1 (1), PGM3 (1), Perfil de ADN: Amelogenina (X), CSF1PO (10,11), D13S317 (9,11), D16S539 (9,12), D5S818 (11,13), D7S820 (8,11), THO1 (7), TPOX (8), vWA (18), Análisis citogenético: aneuploide.

2.7.2 Línea MCF-7 (carcinoma)

Organismo: Homo sapiens (humano), Tejido: glándula mamaria (mama), derivado del sitio metastásico: derrame pleural, Enfermedad: adenocarcinoma, Tipo de célula: epitelial, Edad: 69 años adulto, Género: femenino, Morfología: epitelial, Propiedades de crecimiento: adherente, Isoenzimas: AK1 (1), ESD (12), G6PD (B), GLOI (12), PGM1 (12), PGM3 (1), Perfil de ADN:

Amelogenina (X), CSF1PO (10), D13S317 (11), D16S539 (11,12), D5S818 (11,12), D7S820 (8,9), THO1 (6) TPOX (9,12), vWA (14,15), Análisis citogenético: número modal (82), rango (66 a 87). Los números del cromosoma de línea madre oscilaron entre hipertriploide a hipotetraploide, con el componente 2S ocurriendo al 1%. Hubo 29 a 34 cromosomas marcadores por metafase S, se produjeron de 24 a 28 marcadores en al menos 30% de las células, y generalmente una gran submetacéntrica (M1) y 3 grandes subtelocéntricas (M2, M3 y M4) los marcadores fueron reconocibles en más del 80% de las metafases. No se detectaron DM (El cromosoma 20 era nulisómico y X era disómico).

2.7.3 Línea MDA-MB-231 (carcinoma metastásico)

Organismo: Homo sapiens (humano), Tejido: glándula mamaria (mama), derivado del sitio metastásico: derrame pleural, Enfermedad: adenocarcinoma, Tipo de célula: epitelial, Edad: 51 años adulto, Género femenino, Morfología: epitelial, Propiedades de crecimiento: adherente, Isoenzimas: AK1 (1), ESD (1) G6PD (B), GLOI (2), Me2 (12), PGM1 (12), PGM3 (1), Perfil de ADN: Amelogenina (X), CSF1PO (12,13) D13S317 (13), D16S539 (12), D5S818 (12), D7S820 (8,9), THO1 (7,9.3), TPOX (8,9), vWA (15,18), Análisis citogenético: la línea celular es femenina aneuploide con número modal (64), rango (52 a 68), con recuentos de cromosomas en el rango cercano a triploide. Los cromosomas normales N8 y N15 estaban ausentes. Se observan once cromosomas marcadores reordenados estables y además de la mayoría de los autosomas que son trisómicos.

2.8 Antecedentes

En la actualidad ha aumentado el interés por el uso de nanopartículas de oro como tratamiento en diversos tipos de cáncer para disminuir los efectos que conlleva la quimioterapia tradicional, por lo cual se han desarrollado diversas investigaciones conjugando fármacos a las nanopartículas, funcionalizándolas por medio de agentes de dirección específica a células cancerígenas reduciendo así la toxicidad.

Por otra parte los estudios proximales también llamados organolépticos, se podrían definir como esquemas de análisis químicos mediante los cuales se determina la composición de un alimento en

términos de sus principales nutrimentos, evaluando la calidad del alimento, en el caso del presente estudio es la planta *Taraxacum officinale*, en función de grupos de compuestos con características físico-químicas semejantes, pero con diferente valor nutrimental.

El análisis organoléptico consta de las siguientes determinaciones: humedad (el agua es un nutrimento esencial que se necesita en cantidades relativamente grandes, la cual diluye el contenido de nutrimentos sólidos y los hace más susceptibles de sufrir fenómenos de descomposición por enzimas tisulares, bacterianas o de hongos), proteína cruda (Dado que el elemento característico de las proteínas es el nitrógeno, los métodos de cuantificación de proteínas se basan esencialmente en la determinación de éste mismo en la muestra, suponiendo que todo el nitrógeno se encuentra en forma de proteína), materia mineral o cenizas (Esto es el residuo de la calcinación de la muestra o sea la eliminación de la materia orgánica y el agua); grasa cruda o extracto etéreo (los aceites y grasas presentes en la muestra seca se extraen para cuantificarse con un disolvente orgánico), fibra cruda [Esto es una mezcla heterogénea de glúcidos (celulosa y hemicelulosa) y otros materiales como lignin, esencialmente indigeribles por animales de estómago simple] y por diferencia a 100, extracto libre de nitrógeno (Está constituido por almidones, azúcares solubles, pectinas, ácidos orgánicos, mucílagos y también incluye cantidades variables de celulosas y ligninas), además de la energía bruta de la planta.

2.8.1 Análisis fitoquímico de los componentes de extracto de planta.

Una de las variables desconocidas dentro de la síntesis química a partir de extractos de plantas son los componentes orgánicos involucrados, por lo cual muchas investigaciones están enfocadas en cuantificar los compuestos de los extractos, para así conocer los posibles agentes de reducción y estabilización de los nanomateriales. Un ejemplo de un estudio sobre análisis fitoquímico fue reportado por Silva y Col. [16] en el cual se analizó la composición química y actividad antioxidante del fruto (semilla, pulpa y entera) *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore. Las muestras las obtuvieron en Aracati, Ceará al noreste de Brasil, las cuales fueron deshidratadas al aire libre, moliéndolas posteriormente a temperatura ambiente.

Para la detección fitoquímica se realizó una extracción inicial con hexano seguido de una extracción de etanol, luego la muestra se dejó en contacto con el solvente por 7 días, este proceso fue realizado por triplicado. Después, los extractos fueron filtrados y se concentró por evaporación

rotatoria bajo presión reducida, obteniendo por lo tanto los extractos de hexano y etanol. Éstos extractos fueron analizados cualitativamente para fenoles, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonoides a pH de 11, saponinas, catequinas, triterpenos, esteroides, leucoantocianidinas, flavonas, xantonas, fenoles totales, taninos y potencial antioxidante. Obteniendo resultados positivos (tabla 2.3) para fenoles, taninos, antocianinas, antocianidinas y flavonoides (a excepción del extracto de hexano del fruta entera), saponinas (exclusivas del extracto de etanol de la semilla), esteroides libres (excepto los extractos de etanol de la pulpa y semilla), leucoantocianidinas y flavonas (únicamente en el extracto de etanol del conjunto fruta), flavonoles, flavanonas, flavonoides y xantonas (solo en el extracto de etanol de la semilla).

Tabla 2. 3 Análisis fitoquímico cualitativo de fruto entero, semilla y pulpa en extracto con etanol y hexano [16].

Compounds	Whole fruit		Pulp		Kernel	
	HE	EE	HE	EE	HE	EE
Phenols and tannins	(+)	(+)	(+) for flaboblenics tannins	(+) for flaboblenics tannins	(+) for flaboblenics tannins, condensed or catechin	(+) for flaboblenics tannins, condensed or catechin
Anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids	(-)	(-) for pH 8.5 (+) for pH 11	(-) for pH 3 and 8.5 (+) for pH 11	(-) for pH 3 and 8.5 (+) for pH 11	(-) for pH 3 and 8.5 (+) for pH 11	(-) for pH 3 and 8.5 (+) for pH 11
Saponins	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Steroids and triterpenoids	(+) for free steroids	(+) for free steroids	(+) for free steroids	(-)	(+) for free steroids	(-)
Leucoanthocyanidins, catechins and flavones	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Flavonols, flavanones, flavanonols and xanthonas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

EE = Ethanol extract; HE = hexane extract; (+) = Positive; (-) = Negative.

Ahora bien como se muestra en la Tabla 2.4, el contenido fenólico total en el extractos de etanol, fue 44.60 mg GAE (Equivalentes de ácido gálico, por sus siglas en inglés)/g en el extracto de fruta entera, 0.04 mg de extracto GAE/g en la pulpa y 0.69 mg GAE/g extracto en la semilla. En el extracto de hexano, hubo 33.2 mg GAE/g en toda la fruta extracto, 0.8326 mg GAE/g en el extracto de semilla y ninguno detectado en la pulpa. Estos datos muestran que los compuestos fenólicos tienen más solubilidad en etanol, justificado por las interacciones del enlace de hidrógeno del hidroxilo del alcohol con los grupos hidroxilo característicos del fenol, presentando, por lo tanto, una mayor concentración de fenoles en el extracto con etanol.

Tabla 2. 4 Taninos y fenoles totales en la fruta entera, pulpa y semilla, y contenido de antocianina de la pulpa y semilla del extracto de carnauba [16].

Evaluation	Whole fruit	Pulp	Kernel
Phenols (mg GAE/g extract)			
Ethanol extract	44.8000	0.0447	0.6930
Hexane extract	33.2000	Not detected	0.8260
Tannins			
Total	1590.9262 ppm	2977.7234 ppm	147.6531 ppm
Condensed	15.4950 mg eq leucocyanidin/100 g DM	-	-
Anthocyanins (mg/50 g sample)	-	9.84	5.63

El contenido total de taninos fue 1590.93, 2977.72 y 147.65 ppm en toda la fruta, pulpa y semilla, respectivamente y mostró 9.84 mg de antocianinas / 50g de pulpa fresca. El contenido de tanino en las plantas puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas y geográficas, por lo que comúnmente hay variación al ser reportados al igual que las antocianinas por el grado de inmadurez de la fruta. Por otra parte las actividades antioxidantes de extractos con etanol y hexano de las frutas enteras fueron 15.4 y 1845.8 ppm respectivamente.

Ahora bien dada la cantidad de pruebas realizadas en ésta investigación, se utilizó como referencia metodológica para el análisis de *T. officinale*, además se considera un estudio fitoquímico completo ya que ellos mismos reportan que anteriormente ya han realizado el análisis bromatológico a carnauba.

2.8.2 Estudio bromatológico de extracto de planta.

Los análisis bromatológicos nos ayudan a conocer los compuestos que juegan un papel importante en la farmacología, ya que nos indican que tanta concentración de metabolitos estamos introduciendo al cuerpo humano. Es por eso que Susanto y Col. [17] realizaron un estudio detallado de las sustancias presentes en las hojas del manglar *Calophyllum inophyllum* procedente de Indonesia, para el cual la muestra se secó al sol durante 3 días reduciendo su contenido de agua de las hojas secas de *C. Inophyllum* (1000 g) se cortaron a un tamaño homogéneo en un molino (aproximadamente 1 cm de diámetro) y se dejó reposar en 3L de metanol durante 72h cada uno, luego las soluciones se filtraron a través de papel filtro, la extracción se repitió por duplicado. El filtrado se combinó de todas las muestras cortadas y luego se evaporó a sequedad por destilación a 80 °C para obtener extractos sólidos semi-crudos. En la metodología propuesta por Susanto y Col, ellos analizaron humedad (1g de muestra a 105°C), ceniza (a 600°C por 30 mins), lípido crudo (2

g por extracción en Soxhlet a 105°C por 6 h), proteína cruda (2 g por método Kjeldahl), energía total (los valores de energía se obtuvieron al multiplicar los carbohidratos, proteínas y grasas por los factores de 3.5, 4.0 y 9.0 kcal/g, respectivamente), fibra cruda (2 g de muestra a 105°C), carbohidratos (5 g por método iodométrico), contenido de hierro, sodio, calcio, magnesio y potasio (5 g por método de espectroscopía de absorción atómica), fósforo (5 g por método de espectrofotometría) y un análisis fitoquímico de alcaloides, triterpenoides, flavonoides, taninos, saponinas y polifenoles por medio del método espectrofotométrico de UV-Vis (205-315 nm).

El contenido de humedad fue aproximadamente de 11.24%, para el caso de las hojas no mostraron resultado de cantidad lipídica, el contenido de proteína fue de 6.43%, el análisis de fibra cruda arrojó un resultado correspondiente a 23.96%, el contenido de carbohidratos resultó ser de 9.91%, la energía total mostró ser de 79.17 kcal / 100 g, la cantidad de ceniza se encontró aproximadamente de 4.75%, el porcentaje de hierro presente en las hojas fue 0.007%, el contenido de calcio y fósforo fue relativamente de 1.240% y 0.040% respectivamente, para el caso de sodio, potasio y magnesio el contenido fue de 0.075%, 0.100% y 0.195%, el extracto crudo mostro un 2.88% de rendimiento al ser extraído con metanol con un color marrón oscuro, del estudio fitoquímico se obtuvo un contenido de alcaloides de 1.58%, los flavonoides presentaron un resultado aproximadamente de 11.13%, el porcentaje de taninos fue 16.23% y el contenido de saponinas estuvo aproximado a 18.11% y 2.53% de polifenoles.

En éste trabajo se reporta también que ellos estudiaron algunos componentes fitoquímicos de las hojas del manglar mediante cromatografía, para compuestos específicos pero se considera que para utilizar éste método es necesario antes conocer cualitativamente si la planta contiene dichos compuestos, por eso para éste análisis se tomó la metodología de Silva y Col. anteriormente mencionada, además el secado mediante luz solar que ellos proponen ahorra energía pero puede hacer que la muestra se contamine.

2.8.3 Síntesis de nanopartículas de oro mediante extracto para uso biomédico.

Para la biosíntesis de nanopartículas de oro se utilizan diferentes partes de alguna planta ya que contienen metabolitos tales como alcaloides, flavonoides, fenoles, terpenoides, alcoholes, azúcares y proteínas que actúan como agentes reductores para producir nanopartículas que a la vez también actúan como agentes de cobertura y estabilizadores de las mismas. Es por ello que se han

desarrollado diversas investigaciones alrededor de este tema como es el caso de Rajan y Col. [42], donde ellos sintetizan nanopartículas de oro utilizando el extracto acuoso de semillas de *Elettaria cardamomum* a las cuales se le analizó el potencial antioxidante (DPPH) además de una prueba de radicales NO y OH.

Para la síntesis se utilizaron semillas lavadas con agua desmineralizada y secadas al aire libre mediante luz solar, posteriormente se utilizaron 2 gramos de semillas en 100 ml de agua desmineralizada hirviendo durante 5 minutos para posteriormente filtrarse, en seguida se utilizó 1 ml de extracto que se mezcló con 30 ml de solución de H₂AuCl₄ preparada a 2.5×10^{-4} M, permaneciendo ésta reacción durante 2 minutos a ebullición (B1), obteniendo rápidamente una coloración violeta, también se repitió el experimento con 5 ml, 10 ml, 15 ml y 20 ml de volumen del extracto para obtener los coloides B2, B3, B4 y B5, respectivamente, éstos coloides obtenidos fueron estables durante catorce días a temperatura ambiente. Por otra parte, los nanomateriales permiten una interacción única con sistemas biológicos a escala atómica, lo que puede facilitar un avance importante en el diagnóstico y tratamiento de cánceres humanos que conduce a una nueva disciplina de la nanooncología, debido a eso ellos mismos (Rajan y Col .) analizaron las nanopartículas como agentes antibacteriales contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* empleando el método de difusión en disco con agar Muller Hilton y su efecto citotóxico contra carcinoma de cuello uterino humano (HeLa) a partir de la prueba MTT unidas a GMSO (dimetil sulfóxido).

Los resultados de UV-Vis en esta investigación arrojan que las nanopartículas de oro sintetizadas a 100°C (Figura 2.11a), muestran que las absorbancias aumentan hasta 10 ml del extracto para los coloides B1 a B3 y luego disminuyen en el caso de los coloides B4 y B5, con picos de plasmón superficial entre los 563 y 527 nm indicando tamaño de nanopartícula pequeño. Para el caso del análisis morfológico de las nanopartículas la Figura 2.11b muestra una imagen de MET con formas cuasiesféricas con tamaño promedio de 18.3 nm calculado por medio de la ecuación de Debye-Scherrer, por otra parte el patrón de difracción de las mismas indica las correspondientes reflexiones de los planos (111), (200), (220), (311) y (222) (Figura 2.11c) respectivamente de la estructura de oro *fcc* corroborado por los picos de difracción a 38.47 °, 44.53 °, 64.80 °, 77.86 ° y 82.65 ° (Figura 2.11d).

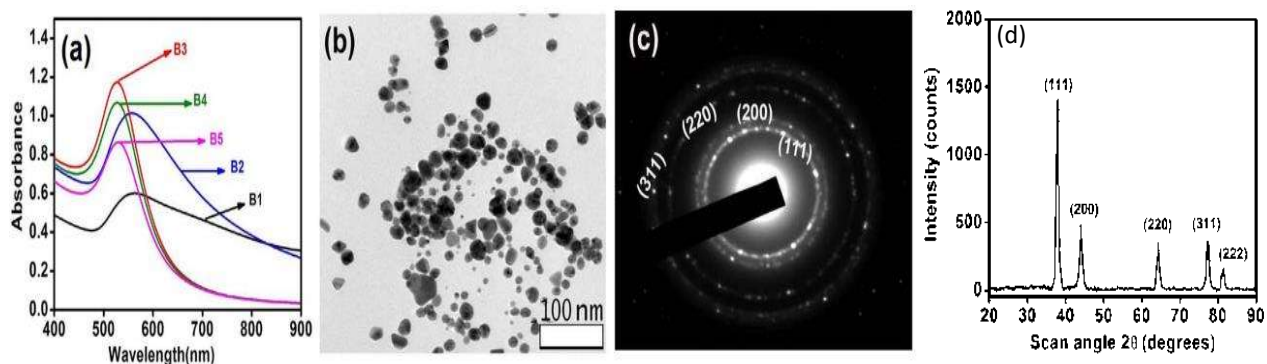


Figura 2. 11 Resultados de la síntesis de nanopartículas de oro a) UV-Vis, b) imagen de MET (campo claro), c) patrón de difracción de electrones, d) difractograma de rayos X [42].

Además se muestran los espectros de FTIR de las nanopartículas y el extracto de semilla en la Figura 2.12, con bandas prominentes en 1689 cm^{-1} correspondientes a los flavonoides y grupos carbonilo, 1632 cm^{-1} correspondiente a la vibración de las amidas, 1536 cm^{-1} perteneciente a las aminas, 1360 cm^{-1} de vibración de aminas aromáticas, 1159 cm^{-1} para polisacáridos, 1024 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} para aminas alifáticas y 760 cm^{-1} por los fenoles aromáticos.

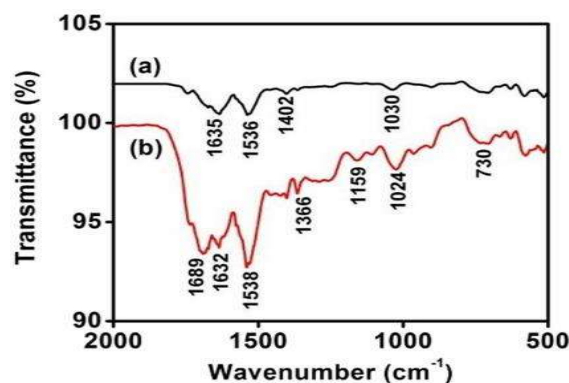


Figura 2. 12 Espectros de FTIR de a) nanopartículas de oro y b) extracto de semilla de *Elettaria cardamomum* [42].

En el análisis DPPH se observa que la actividad de eliminación de radicales tiende a aumentar con la concentración de nanopartículas de oro (B3). A concentraciones de $1.25\text{--}20\text{ }\mu\text{L}$, la muestra B3 presenta una tasa de eliminación que oscila de $19.87 \pm 0.9\%$ a $62.18 \pm 2.4\%$ (Figura 2.13a), éste mismo nanomaterial de oro sintetizado muestra una notable capacidad de recolección de radicales NO de una manera dependiente a la concentración, además para mayores concentraciones se encuentra que el porcentaje de inhibición es comparable con la de referencia elegida (R) ya que a una concentración de $200\text{ }\mu\text{L}$, se observa la acción de reacción con las nanopartículas de $64.44 \pm 2.1\%$ (Figura 2.13b), por último la Figura 2.13c muestra que la reactividad para OH de B3 es

comparable a la del ácido gálico (R), éste efecto aumenta con la concentración incrementando hasta 200 μL con un porcentaje de inhibición de $67.5 \pm 1.7\%$, lo que indica una mayor actividad de eliminación de radicales por las nanopartículas sintetizadas.

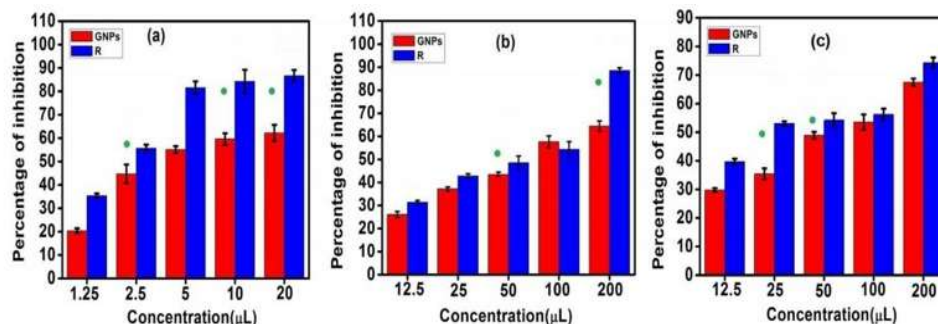


Figura 2.13 Comparación de efectividad de las nanopartículas de oro contra ácido gálico en a) DPPH, b) radical NO y c) radical OH [42].

De los ensayos biológicos se muestran las diferencias en la zona de inhibición (Figura 2.14) que pueden deberse a la susceptibilidad de las diferentes bacterias a las nanopartículas (B3). En comparación con el control, B3 exhibe una considerable sensibilidad antibacteriana contra los tres agentes patógenos (bacterias). La eficacia antibacteriana de las mismas se debe a su mayor superficie total por unidad de volumen y al alto poder de penetración, teniendo mayor eficiencia en *S. aureus* que en *E. coli* y *P. aeruginosa* mostrado en la Figura 2.14d.

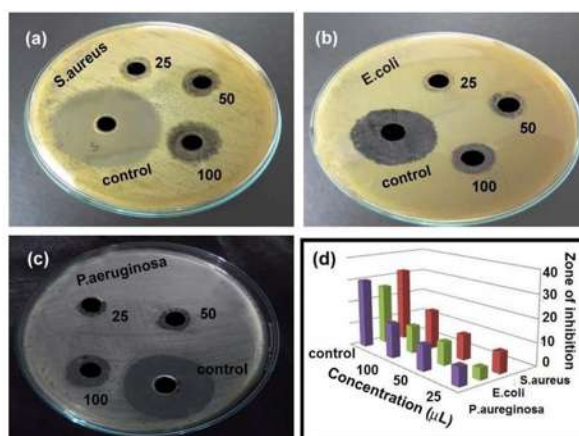


Figura 2.14 Resultados del análisis de inhibición de las nanopartículas de oro contra a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *P. aeruginosa* y d) gráfica de la zona de inhibición comparada a la concentración de nanopartículas en las 3 bacterias [42].

La Figura 2.15 muestra que se tiene más de $65 \pm 1.6\%$ de muerte celular para una concentración de 100 μL de nanopartículas, además el 50% de la concentración inhibitoria obtenida por las mismas se observó que fue del 42.6 μL . Los cambios detectables en la morfología (Figura 2.16) de las células tales como redondeo, contracción y granulación en el citoplasma se consideran como

signo de citotoxicidad. La actividad de las nanopartículas contra las líneas celulares de cáncer HeLa, podría deberse posiblemente a la naturaleza de penetración celular de las mismas cargadas con el fármaco GMDA, lo que puede fomentar el fácil transporte del medicamento a través de la membrana de la célula cancerosa.

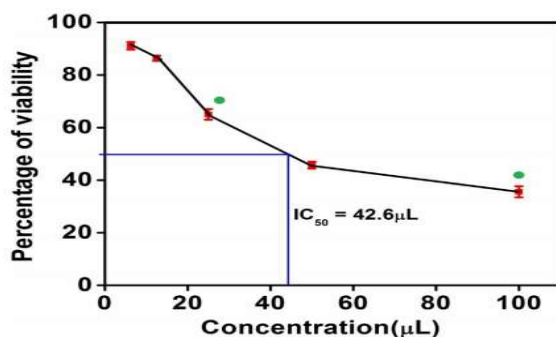


Figura 2. 15 Gráfica de porcentaje de viabilidad celular de las nanopartículas de oro dependientes de la concentración [42].

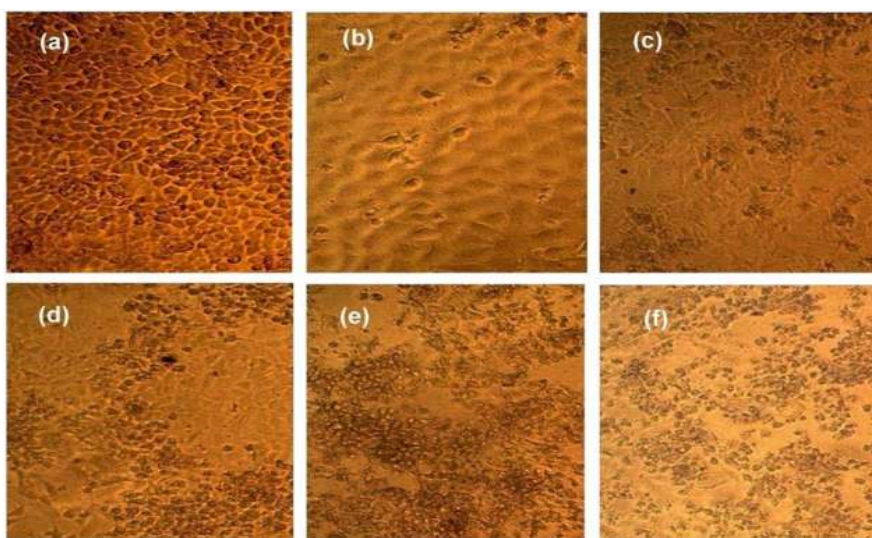


Figura 2. 16 Imágenes microscópicas de contraste de fases de líneas celulares HeLa impregnadas con a) DMSO y AuNps (B3) a diferentes concentraciones b) 6,25 μL c) 12,5 μL d) 25 μL e) 50 μL f) 100 μL [42].

Esta investigación muestra que las nanopartículas de oro pueden llegar a tener toxicidad en bacterias, aunque no exactamente son antibacteriales sino que su tamaño tan pequeño penetra las células y las daña, se considera que podrían llevar acabo más ensayos en donde utilicen diferente tamaño de nanopartículas y no solo con la concentración de las mismas.

2.8.4 Uso de nanopartículas de oro funcionalizadas contra cáncer de mama.

La detección temprana del cáncer de mama es una variante crítica en el pronóstico del paciente y el establecimiento de un efectivo régimen de terapia, por lo cual Tao y Col. [43] desarrollan un fotosensor de fácil acceso pero potencialmente eficaz para detectar células cancerígenas utilizando siete nanoclusters de oro cofuncionalizados por doble ligando (AuNCs) como elementos efectivos de reconocimiento de células y transductores de señales, la base de este sensor multicanal AuNC logró distinguir con éxito células mamarias humanas sanas, cancerosas y metastásicas, además fueron identificados receptores en células de cáncer de mama triples negativas (TNBC), el receptor de estrógeno, receptor de progesterona y factor de crecimiento epidérmico humano (receptor-2), que normalmente muestran baja expresión. Además, las AuNCs cofuncionalizadas de doble ligando de tiolato lograron diferenciar de manera eficiente distintas células de la sangre en la periferia de las células libres de tumor y en ratones con tumor. En conjunto, esta matriz fluorescente basada en AuNCs proporciona una potente herramienta de análisis de células con aplicaciones potenciales en diagnósticos biomédicos, los análisis de estos materiales incluyeron espectrometría de fluorescencia y masa, rendimiento cuántico, microscopía electrónica de transmisión, prueba de endotoxina, análisis de citotoxicidad, extracción de membrana proteica, lipídica y carbohidratos de células de mama.

Las nanopartículas fueron sintetizadas por medio de 100 μl de NaOH (1M), 24 μl de tetrakis (hidroximetilo) cloruro de fosforo (al 8% en peso), 8 μl de agua purificada en agitación violenta por 5 minutos y luego fueron añadidos 400 μl de solución de ácido tetra cloro áurico a 24 mM (HAuCl_4), posteriormente para ligar las nanopartículas se adicionó 100 μl de tiolato al 10 mM, agitándose 15 minutos a temperatura ambiente, después se dejaron envejecer 1 día protegidas con tiolato, para mezclarse con 200 μl de buffer de carbonato (0.1 M con pH de 9.0) y 75 μl de solución etanólica MUA (0.1 M) en un termomezclador. La solución cambia a color amarillo claro (de marrón) en 1 h y emite luz verde bajo iluminación UV (365 nm), lo que indica la formación de nanoclusters de oro fluorescentes.

Una vez transcurridas 2 h, la reacción fue detenida, los nanoclusters de oro resultantes fueron purificados por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min para eliminar agregados grandes y, a continuación, se filtró con ultrafiltración de corte de 10 kDa en tubos de centrífuga para eliminar el exceso de reactivos (MUA, tiolatos, sales, etc.). Los nanoclusters de oro purificados se

almacenaron bajo oscuridad para un uso posterior, siendo estos 7 nanomateriales incluyendo 6-mercaptop-1-hexanol-MUA-AuNCs (MH-MUA-AuNCs), (11-mercaptopundecil)-Bromuro de N, N-trimetilamonio-MUA-AuNCs (NSH-MUAAuNCs), ácido 4-mercaptopbenzoico-MUA-AuNCs (MBA-MUA-AuNCs), (2-mercaptopetil) amina-MUA-AuNCs, (MEN-MUA-AuNCs), glutati6n-MUA-AuNCs (GSH-MUA-AuNCs), 6cido mercaptosucc6nico -MUA-AuNCs (MSA-MUA-AuNCs), y 3- 6cido mercaptopropi6nico -MUA-AuNCs (MPA-MUA-AuNCs).

Los resultados del an6lisis de fluorescencia mostraron que los AuNCs exhibieron emisiones notablemente fuertes, y se encontraron estables durante seis meses (Figura 2.17). Los espectros revelaron que los siete AuNCs mostraron fluorescencias similares caracter6sticas con m6ximos de excitaci6n y emisi6n de aproximadamente 380 y 510 nm, respectivamente (Figura 2.18). Por otra parte los rendimientos cu6nticos (QY) de los AuNCs se calcularon oscilando entre 2.01% y 2.51% (tabla 2.5) mediante el uso de sulfato de quinina como referencia.

Tabla 2. 5 Porcentaje de rendimiento cu6ntico (QY) de las nanop6rticulas cofuncionalizadas AuNCs-MUA [43].

	MH-	NSH-	MBA-	MEN-	GSH-	MSA-	MPA-
QY.	2.28%	2.51%	2.01%	2.40%	2.02%	2.35%	2.17%

La Figura 2.19 muestra las im6genes de alta resoluci6n de microscop6a electr6nica de transmisi6n (HRTEM) e histogramas de los siete AuNCs. Todos los AuNCs exhiben formas esf6ricas y uniformidad de tama1o con un promedio menor de 2 nm.

Ahora bien, para investigar m6s a fondo las propiedades de superficie de los AuNCs fluorescentes, se utiliz6 espectroscop6a infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y se realizaron mediciones del potencial zeta mostrando que la AuNCs-MUA-MBA tiene mayor energ6a superficial con -30mV.

Mostrando que los espectros FTIR sugieren que las bandas el6sticas C-S ($610-630\text{ cm}^{-1}$) identificadas en todos los AuNC, indican la presencia de ligandos de tiolato en la superficie de AuNCs. Adem6s, las bandas de absorci6n emergentes alrededor de 1650 , 1560 y 1046 cm^{-1} en todos los AuNCs se pudieron asignar a dos bandas el6sticas C=O y un estiramiento de C-O de los grupos carboxilo, implicando adicionalmente presencia de MUA en las superficies de los AuNC.

En cuanto a MEN-MUA-AuNCs y GSH-MUA-AuNC, podría ser validado por la aparición de bandas alrededor de 1150 cm^{-1} , que se atribuyeron a la vibración del enlace amina C-N, NSH-MUA-AuNCs exhibió el típico pico agudo de $-\text{CH}_3$ (1340 cm^{-1}), que se atribuye a la conjugación covalente de NSH-MUA-AuNCs. El espectro de MBA-MUA -AuNCs exhibió una señal de estiramiento C=C alrededor de 1600 cm^{-1} eso siendo característico de los anillos de benceno de MBA. Por otra parte MH, MPA y MSA mostraron espectros FTIR similares en comparación con MUA (Figura 2.20). Además, las mediciones de espectroscopía de masa confirmaron el éxito de la cofuncionalización del doble ligando de AuNCs (tabla 2.6).

Las mediciones del potencial Zeta indicaron que todos los AuNC estaban cargados negativamente debido a la forma aniónica de MUA en las superficies de los AuNC (Figura 2.21a). Notablemente, las cargas en la superficie de los AuNC fueron diferentes entre sí, demostrando la existencia de otros ligandos de tiolato en AuNCs aparte de MUA, además para la prueba de endotoxinas todos los AuNCs exhibieron niveles por debajo del estándar de la FDA para agua estéril (Figura 2.21b).

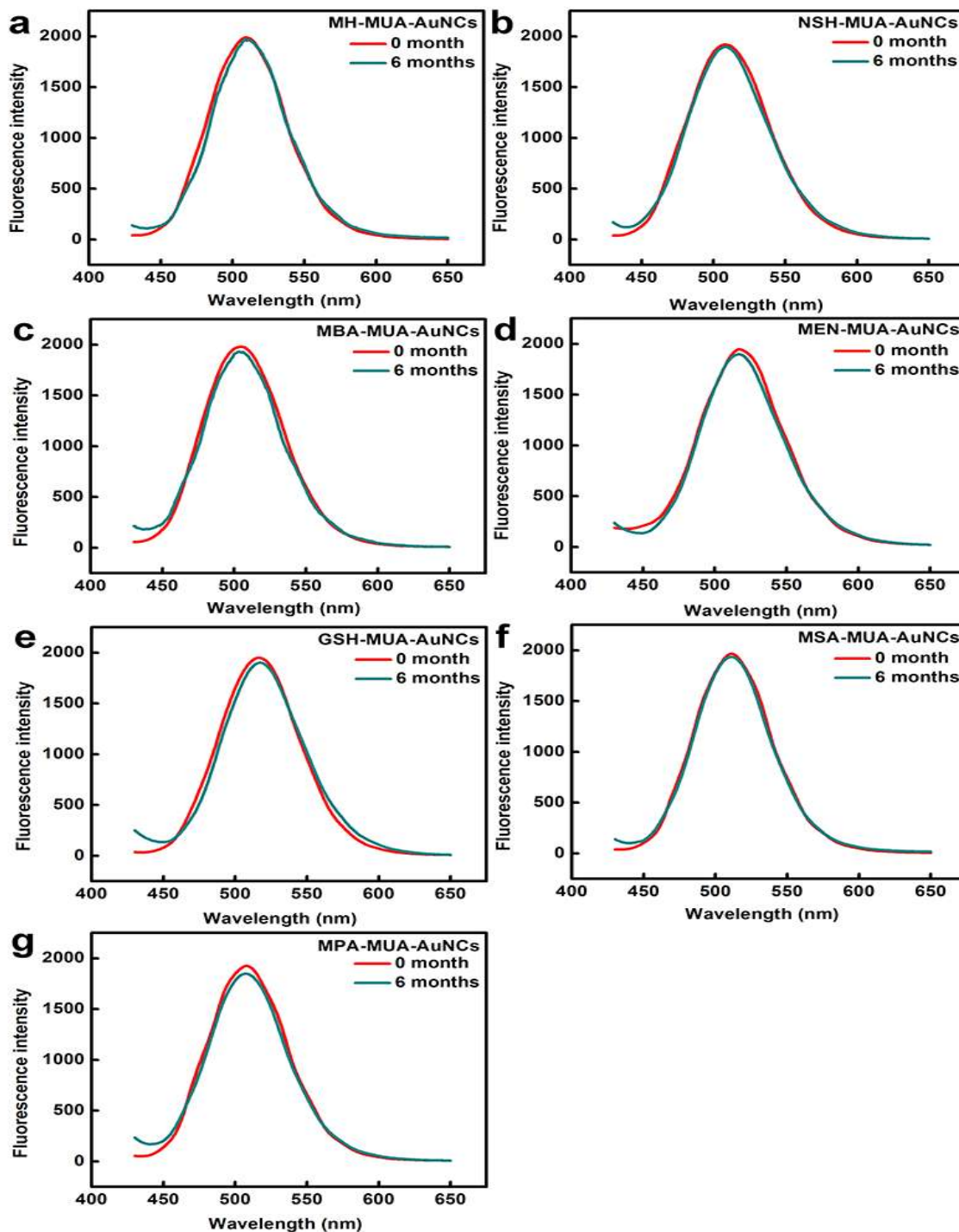


Figura 2. 17 Resultados del análisis de fluorescencia de emisión y excitación de los AuNCs al tiempo 0 y 6 meses de sintetizados [43].

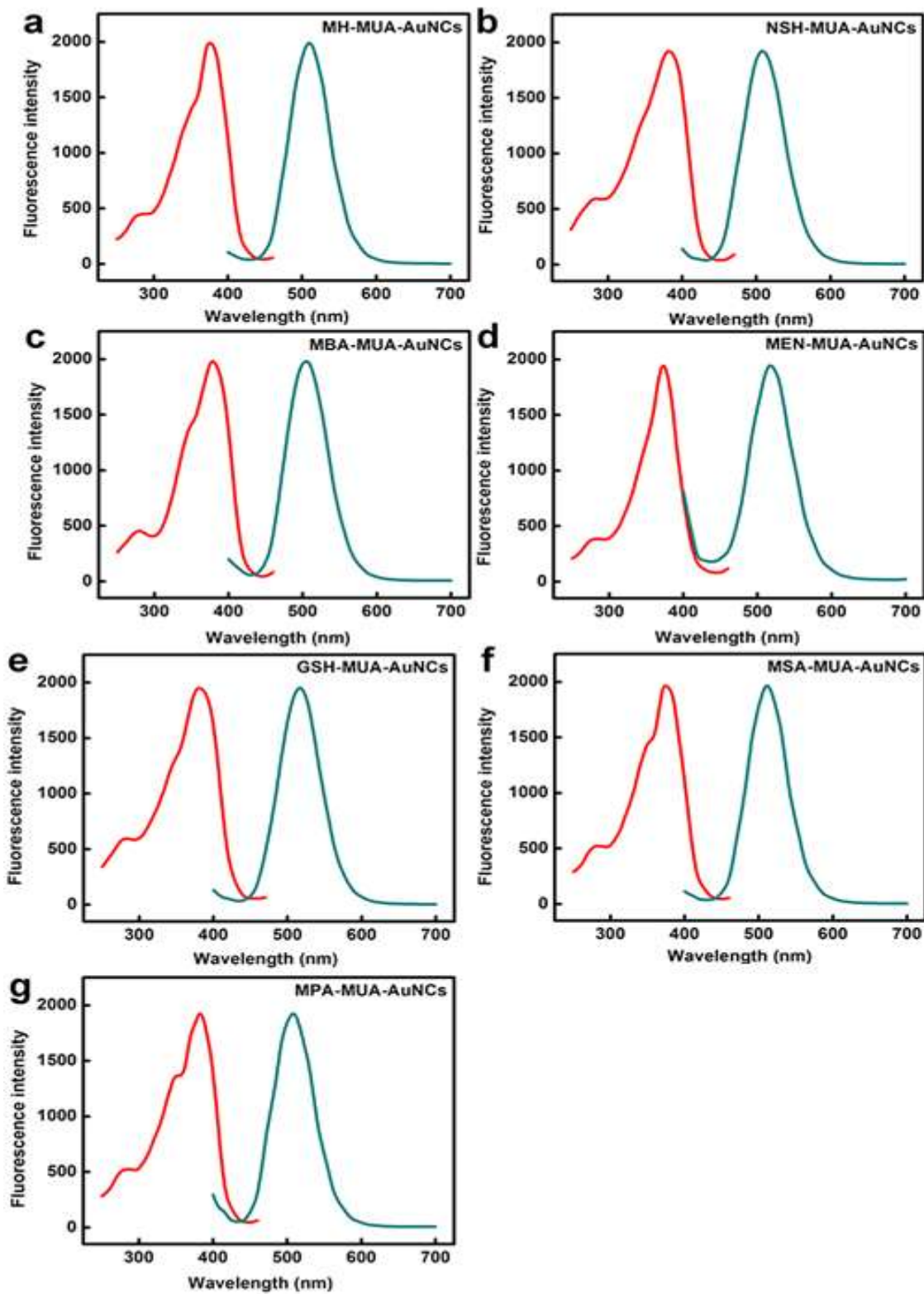


Figura 2. 18 Resultados del análisis de fluorescencia de emisión y excitación de los siete AuNCs conjugados a MUA (a-g) [43].

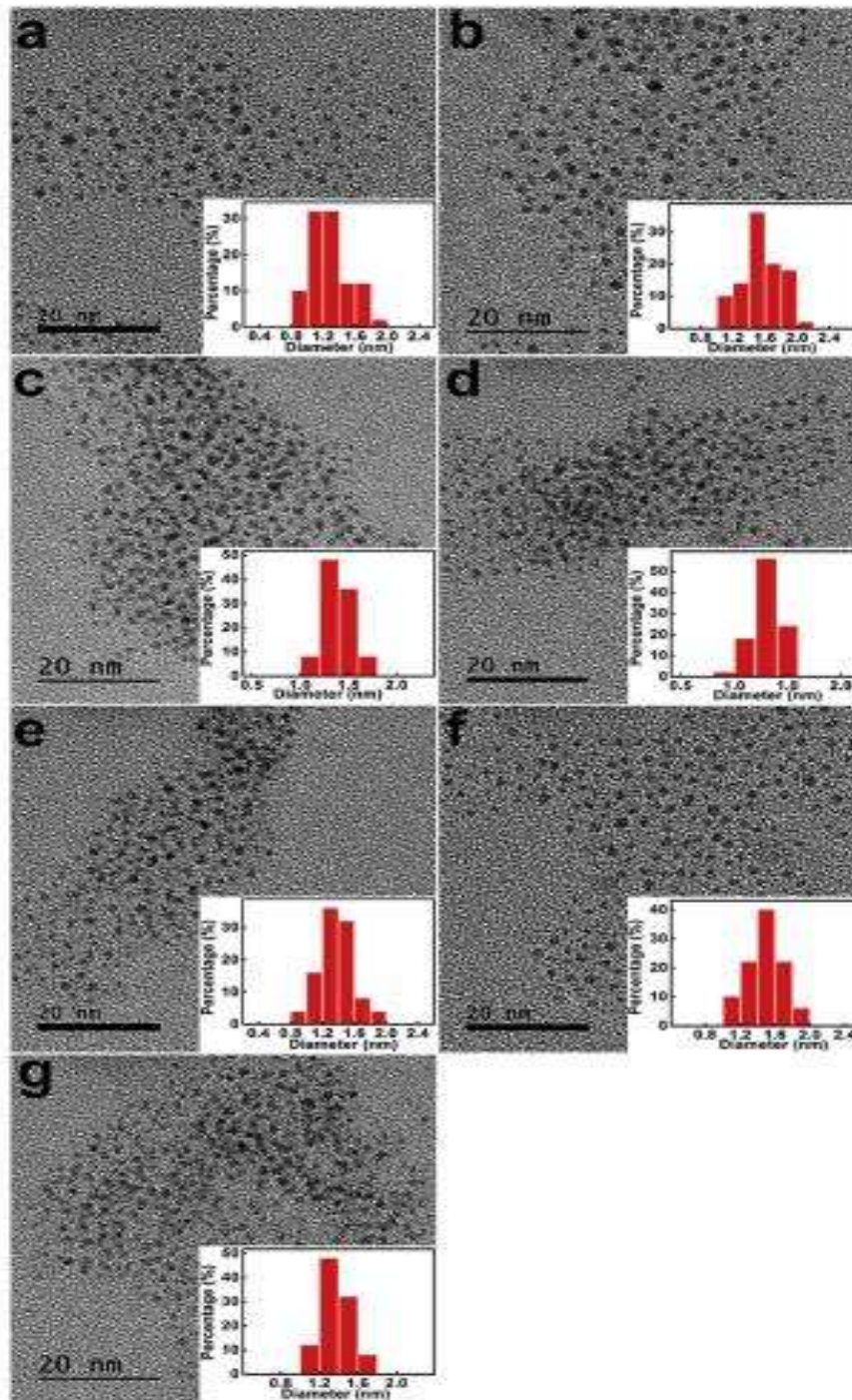


Figura 2. 19 Imágenes de alta resolución de microscopía electrónica de transmisión (HRTEM) e histogramas de los siete AuNCs [43].

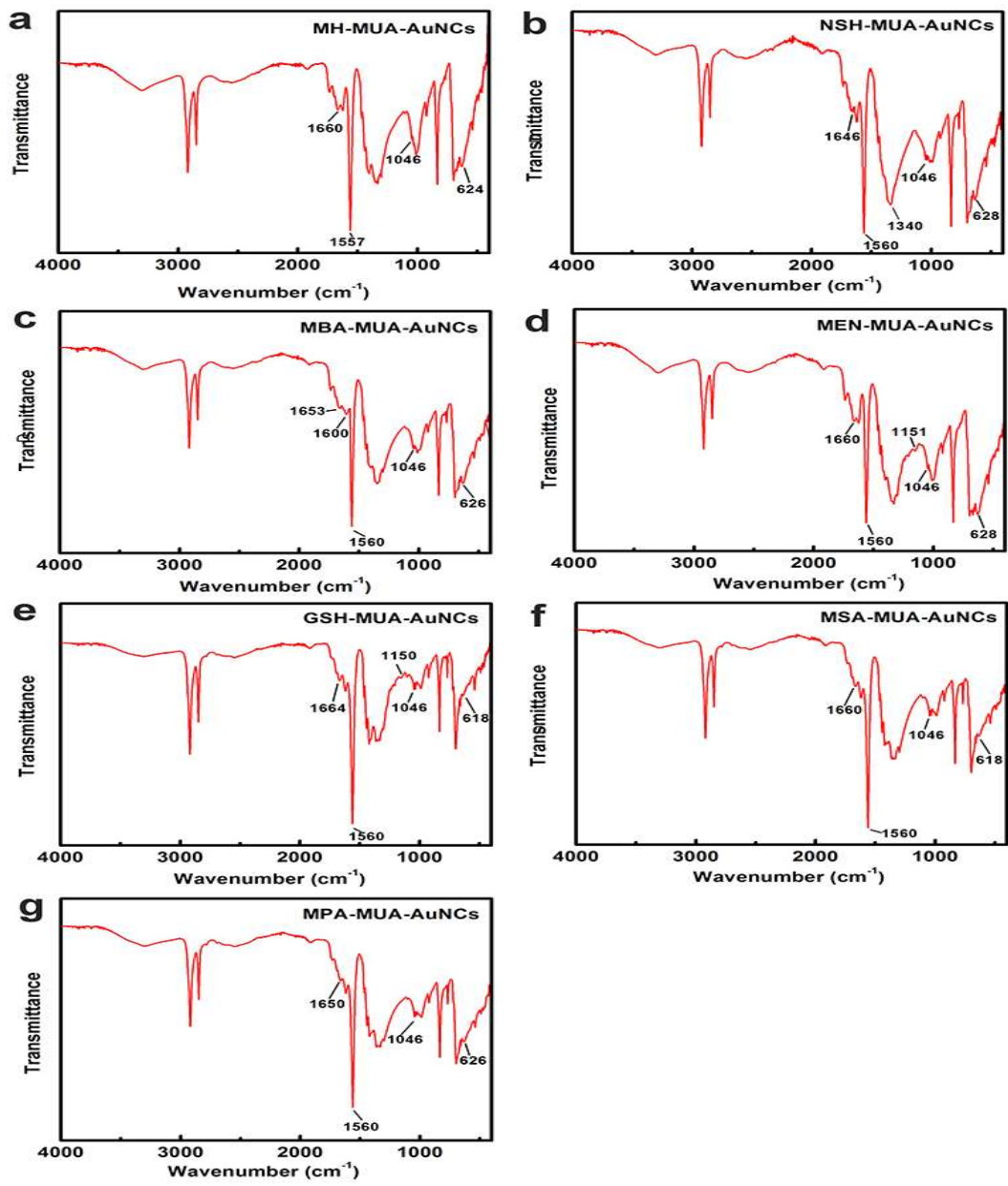


Figura 2. 20 Espectros FTIR correspondientes a los siete AuNCs ligados a MUA [43].

Tabla 2. 6 Resultados de la caracterización de espectrometría de masa de los ligantes en la superficie de las AuNCs [43].

AuNCs	Thiolate number (per AuNC)	MUA number (per AuNC)	Thiolate percentage (%)
MUA-AuNCs	0	565	0
MH-MUA-AuNCs	25	356	6.6
NSH-MUA-AuNCs	15	262	5.4
MBA-MUA-AuNCs	18	285	5.9
MEN-MUA-AuNCs	38	278	12.0
GSH-MUA-AuNCs	22	254	8.0
MSA-MUA-AuNCs	19	292	6.1
MPA-MUA-AuNCs	28	295	8.7

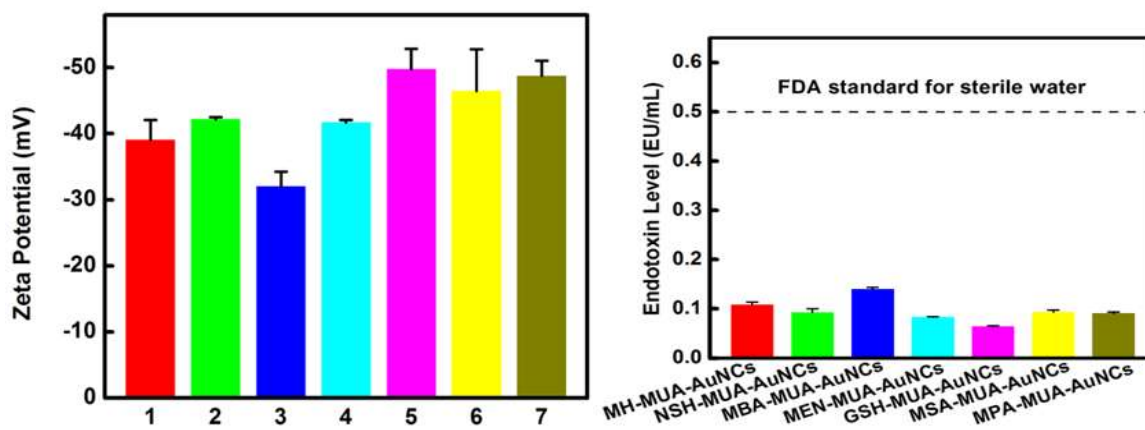


Figura 2. 21 Gráficas de comparación de los 7 AuNCs a) Potencial Zeta y b) Prueba de endotoxinas [43].

Para determinar el funcionamiento de la sensibilidad de detección de los AuNCs doble-ligando y cofuncionalizados, éstos se incubaron con diez diferentes tipos de células mamarias (tabla 2.7), analizando los cambios en la medición de las intensidades de fluorescencia. Estas diferentes líneas de células mamarias humanas incluyen cinco líneas celulares de cáncer de mama altamente metastásico (MDAMB-231, MDA-MB-157, HCC1569, HCC1806 y Hs578T), cuatro líneas celulares de cáncer bajo o no metastásico (SKBR3, MDA-MB-436, MCF7 y MDA-MB-468), así como una línea celular mamaria fibroquística no neoplásica (MCF10A). La concentración final de AuNCs para la discriminación celular fue de 25 nM (Figura 2.22). Antes de la aplicación de los AuNC en la discriminación celular, se examinó la citotoxicidad de los AuNCs por un ensayo estándar de Metil Tiazolil Tetrazolio (MTT), por medio del cual se evaluó la actividad mitocondrial de células viables. Como era de esperar, todas las células mamarias se mantuvieron por encima del 90% de viabilidad celular después de la incubación con AuNCs en concentraciones probadas durante 24h, lo que demuestra una baja citotoxicidad (Figura 2.23).

Tabla 2. 7 Diez diferentes tipos de líneas celulares de cáncer de mama [43].

Cell line	ER	PR	HER2	Invasiveness
MCF10A	–	–	–	Low
MCF7	+	–	–	Low
SKBR3	–	–	+	Low
MDA-MB-436	–	–	–	Medium
MDA-MB-468	–	–	–	Low
MDA-MB-231	–	–	–	High
MDA-MB-157	–	–	–	Medium
HCC1806	–	–	–	Low
HCC1569	–	–	+	Low
Hs578T	–	–	–	High

Las células que interactúan con AuNCs dependen no solo de sus afinidades sino también de las composiciones y estructuras de las células. Los cambios de fluorescencia para cada tipo de célula fueron únicos debido a la discriminación en la interacción entre los AuNCs y las células. Como se muestra en la Figura 2.24, la incubación de AuNC con diferentes células de mama dio como resultado una diversidad de respuestas de fluorescencia.

Los aumentos de las intensidades de fluorescencia pueden ser el resultado de una mejor protección de las AuNC por parte de las células contra el entorno y la inhibición del enfriamiento mediado por oxígeno (O₂). La extinción de la fluorescencia puede atribuirse a un proceso de transferencia de energía o de electrones o la agregación de AuNCs inducidas por las células.

Por otra parte, para investigar más a fondo el mecanismo de identificación de células de mama basado en el doble ligando cofuncionalizado en AuNCs, se extrajeron proteínas de la membrana celular, lípidos y carbohidratos de las células mamarias para incubarlas con los AuNCs, en la Figura 2.25a-c se puede observar que los componentes contribuyen a cambios en la intensidad de la fluorescencia de los AuNCs.

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) es un factor importante de fracaso de la quimioterapia contra el cáncer ya que más del 90% de los pacientes con tumores malignos mueren de las complicaciones derivadas de la resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, la identificación de las células cancerosas resistentes a los medicamentos sería extremadamente útil para proporcionar una forma efectiva de monitorear la progresión de las enfermedades del cáncer y facilitar la selección de enfermedades estratégicas terapéuticas. Las respuestas de fluorescencia para las AuNC cofuncionalizadas de doble ligando dependen de la clase de células y su reproducibilidad. Las imágenes de microscopía confocal de las células de la mama tratadas con AuNCs mostraron que la mayoría permanecen de manera extra-celular para el proceso de detección (Figura 2.26).

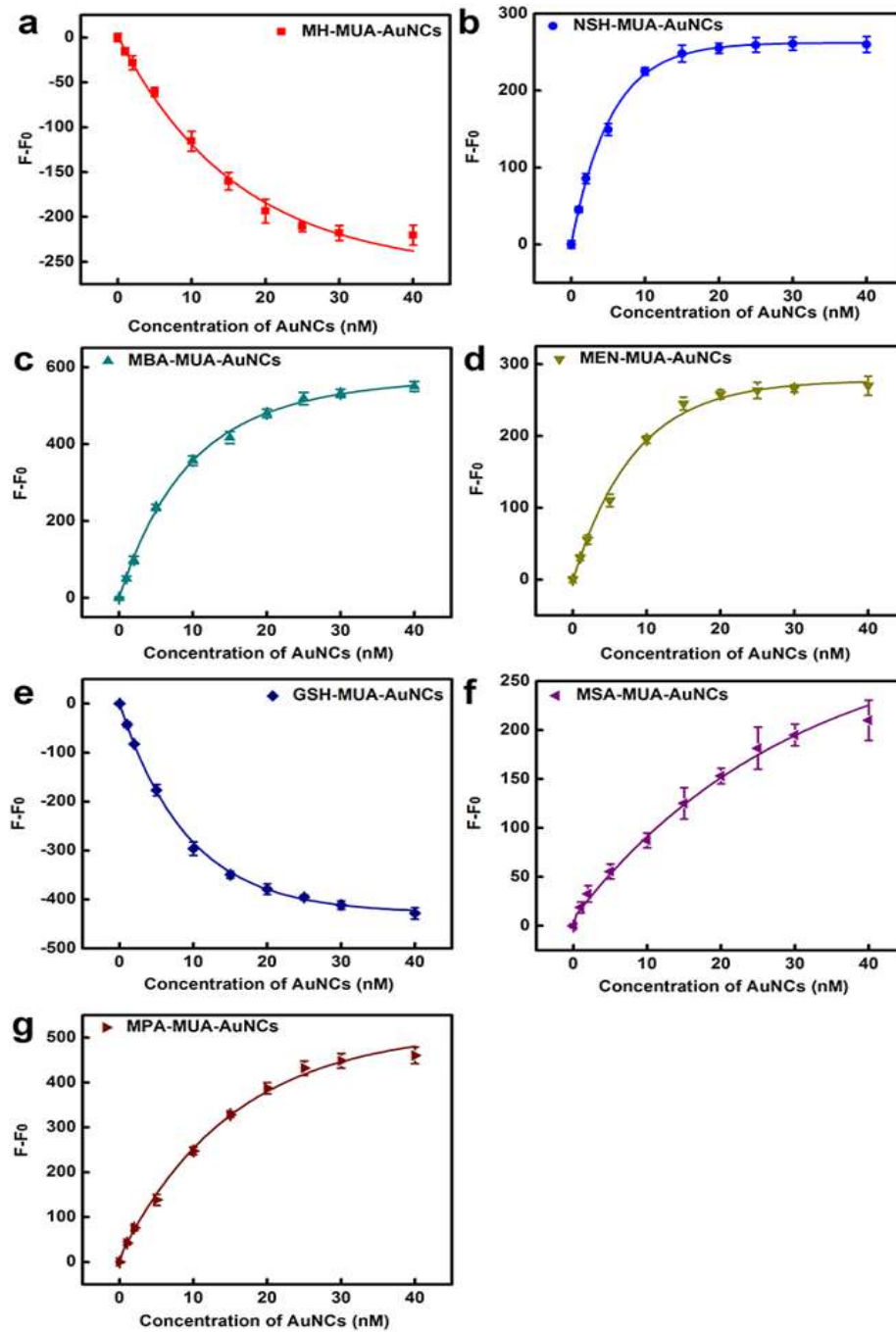


Figura 2. 22 Respuestas de fluorescencia de diferentes concentraciones de AuNC contra células MDA-MB-231 (1000 células). Las barras de error representan la desviación estándar de seis mediciones independientes [43].

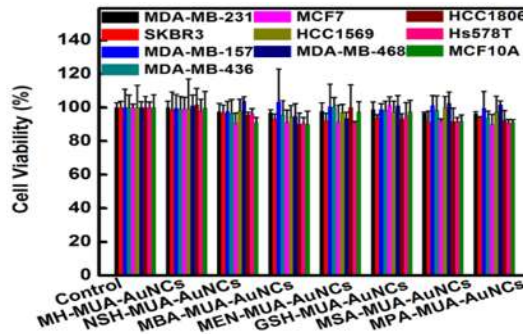


Figura 2. 23 Resultados de las pruebas de citotoxicidad de los AuNCs contra diferentes células mamarias mediante ensayos de MTT [43].

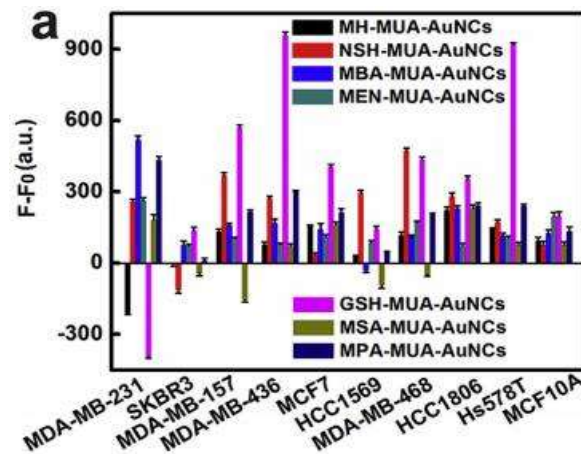


Figura 2. 24 Patrones de respuesta de fluorescencia de AuNCs contra varias células (1000 células): MDA-MB- 231, SKBR3, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MCF7, HCC1569, MDA-MB-468, HCC1806, Células Hs578T y MCF10A [43].

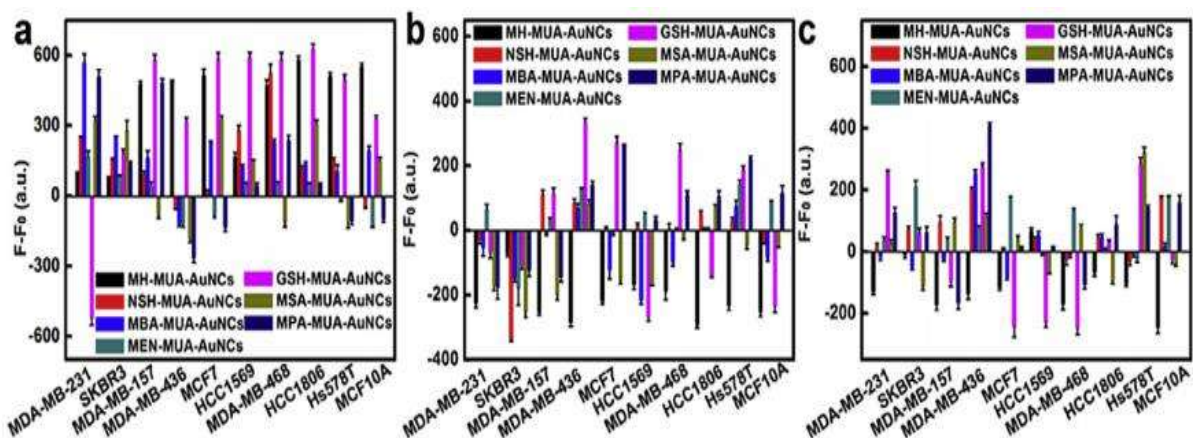


Figura 2. 25 Patrones de respuesta de fluorescencia de AuNCs contra (a) proteínas de membrana, (b) lípidos de membrana y (c) carbohidratos de diferentes tipos de células de mama (1000 células) [43].

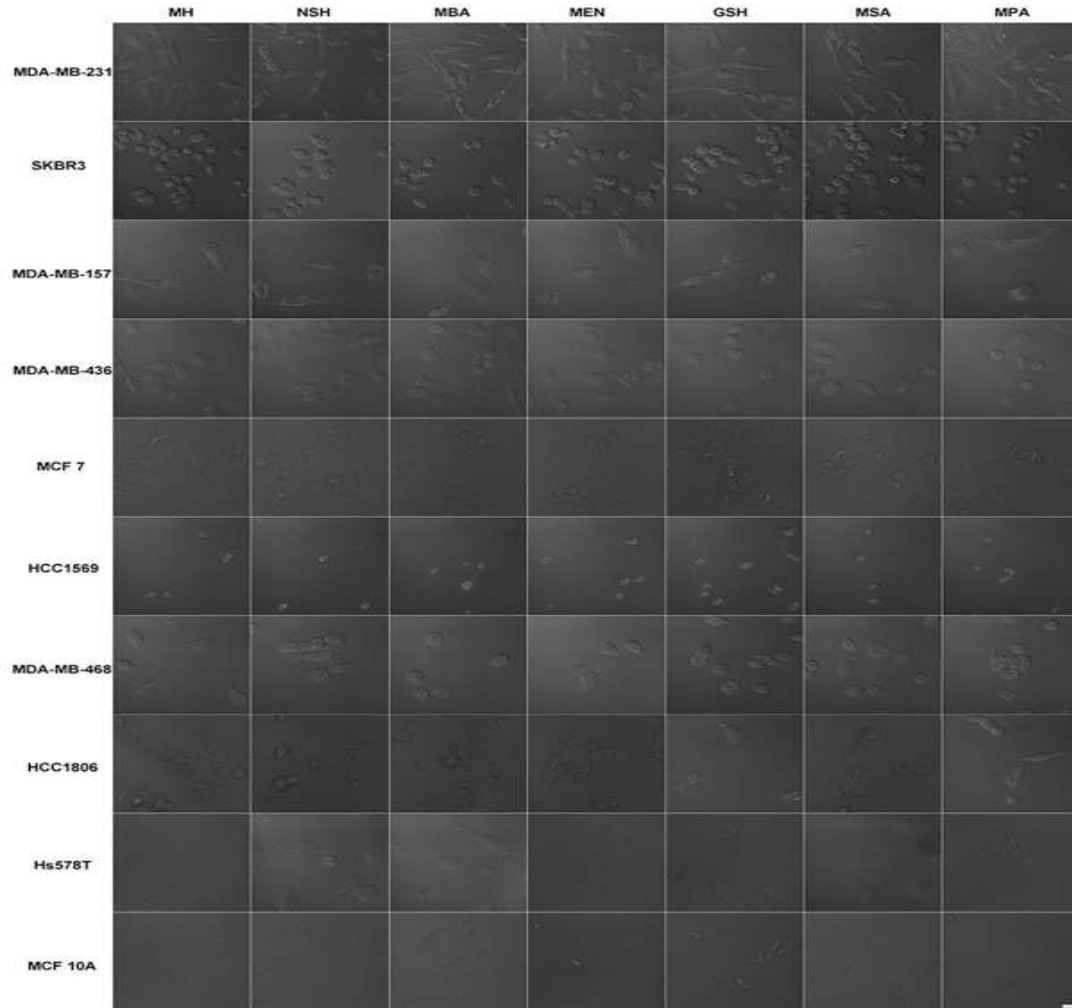


Figura 2. 26 Imágenes de microscopía confocal de MDA-MB-231, SKBR3, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MCF7, HCC1569, MDA-MB-468, HCC1806, Hs578T y MCF10A tratadas con MH-MUA-AuNC, NSH- MUA-AuNCs, MBA-MUA-AuNCs, MEN-MUA-AuNCs, GSH-MUA-AuNCs, MSA-MUA-AuNCs y MPA-MUA-AuNCs duran [43].

Éste trabajo se encuentra muy bien desarrollado en cuanto investigación de las nanopartículas y su aplicación, siendo similar al trabajo de investigación que se realizará con *Taraxacum officinale*, aunque les hace falta reportar la corroboración de oro por medio de difracción de rayos X para asegurar la presencia de éste metal, también es importante destacar que ellos usan síntesis química convencional, lo cual les generó partículas de tamaño más pequeño y uniforme aunque requirieron mayor grado de purificación.

2.8.5 Nanopartículas de oro reforzadas con cisplatino.

Una de las variantes importantes en el uso de nanopartículas es su unión con fármacos ya que potencializan el efecto de muerte en células cancerosas llamándose terapia combinatoria, un ejemplo de tipo de investigaciones es el caso de Iram y Col. [44] ellos sintetizan nanopartículas de oro con bromelina (B-AuNPs) y las ligan a cisplatino (CIS) y doxorubicina (DOX) para el tratamiento contra osteosarcoma, las pruebas de caracterización incluyen espectroscopía UV-vis, TEM, DLS, FTIR y potencial zeta para asegurar la síntesis, tamaño, forma, distribución de tamaño y estabilidad de las nanopartículas, para la evaluación de los fármacos ligados se calculó el porcentaje de enlace y además para la viabilidad celular se utilizaron células de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2) y células primarias de osteoblastos mediante el ensayo MTT.

La síntesis de las nanopartículas de oro in vitro se realizó tomando mezclas de reacción de 3 ml, cada una conteniendo 1 mM de [HAuCl₄] [buffer preparado de fosfato (50 mM)] y 1 mg/ml de bromelina recién preparada. La mezcla de reacción se incubó a 40°C durante 48 h. Para el control, se realizó una reacción separada en ausencia de bromelina. La agitación de la reacción se detuvo a intervalos regulares de tiempo y el análisis se realizó mediante espectroscopía UV-vis para confirmar la síntesis de nanopartículas. Después de completar la reacción, se utilizó 50% v / v de etanol para eliminar la bromelina libre, y además por centrifugación (30000 g, 30 min) se recogieron las nanopartículas, la mezcla de reacción se lavó dos veces con agua Milli-Q y se usó para una caracterización adicional.

Las nanopartículas sintetizadas fueron bioconjugados a la mezcla de fármacos anticancerosos cisplatino y doxorubicina. El activador 1-etil-3-(3-dimetil) carbodimida (EDC) fue utilizado para unir los grupos amino libres de todos los fármacos con los grupos carboxilatos presentes sobre la bromelina. La mezcla de reacción de 5 ml contiene buffer HEPES 50 mM, fármacos de 250 µg (125 µg CIS + 125 µg DOX), y se usaron 250 µg de B-AuNPs para el acoplamiento, mientras que se añadió 5 mM de EDC en alícuotas dentro de las 3 horas a 30°C en el mezcla de la reacción.

El porcentaje de carga total de cisplatino y doxorubicina fue estimado mediante la prueba del cambio en la intensidad de la longitud de onda, antes y después de la bioconjugación, a 300 nm para cisplatino y a 481 nm para la doxorubicina. Estas absorbancias finalmente se sumaron para conocer el porcentaje de carga total de los fármacos en las B-AuNPs.

Se usó bromelina (una cisteína proteasa) para reducir el ácido tetra cloruro áurico en nanopartículas de oro. Este es un enfoque abajo-arriba, donde la bromelina funciona tanto como agente reductor como estabilizador. Los estudios espectrales de las B-AuNPs mostraron un pico intenso a 527 nm (Figura 2.27a). La banda del plasmón superficial de las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX se trazaron en la misma figura. Las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX han demostrado una disminución en la intensidad del

pico con un cambio de color rojo notable de 527 nm a 531 nm en comparación con B-AuNPs. El desplazamiento del rojo o azul en SPR confirma un cambio en la química de la superficie de las B-AuNPs debido a la bioconjugación de CIS y DOX en su superficie.

Las micrografías TEM (Figura 2.27b) confirmaron el aumento en el tamaño de B-AuNPs conjugado CIS y DOX (9.9 nm) en comparación con B-AuNPs (9.2 nm). Esto también confirmó que B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX tenían forma esférica, monodispersas y distribuidas uniformemente. Además, DLS se llevó a cabo para estimar el aumento en radio hidrodinámico de las B-AuNPs conjugado CIS y DOX (65.23 nm) en comparación con B-AuNPs de 54.76 nm (Figura 2.27c). Por lo tanto, cuando los tamaños de nanopartículas se miden en DLS, se estima el diámetro hidrodinámico de las partículas y proporciona información del núcleo inorgánico junto con el material de recubrimiento y la capa de solvente unida a la partícula.

El potencial Zeta puede proporcionar fácilmente la información sobre la concentración, distribución, exposición o protección de cargas, ionización y adsorción de las nanopartículas. El cambio en el potencial zeta de las B-AuNPs conjugado CIS y DOX también encontró que era -13.3 mV (Figura 2.27d) mientras que el potencial zeta para B-AuNPs se midió que era -19.5 mV. La carga negativa en nanopartículas puede ser debido a los grupos funcionales presentes en los aminoácidos de la bromelina, lo que confirma la alta estabilidad de B-AuNPs y B-AuNP conjugados CIS y DOX. Todos los cambios confirmar aún más la bioconjugación de CIX y DOX con B-AuNPs.

Por otra parte la espectroscopía FTIR se utilizó para evaluar la presencia de CIS y DOX en la superficie de las B-AuNPs. El espectro obtenido de las B-AuNPs conjugado CIS y DOX se comparó con los espectros de las B-AuNPs, cisplatino puro y doxorubicina. El contorno de banda ancha que aparece en el rango $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ se debe a N-H por el estiramiento de un enlace peptídico. Los picos a 1760 y 1570 cm^{-1} representan la vibración del estiramiento del anhídrido de C-O. Los espectros también mostraron un desplazamiento máximo del estiramiento carboxílico (C-

O) de 1641 a 1622 cm^{-1} sugiriendo las interacciones intermoleculares entre los fármacos y las B-AuNPs (Figura 2.28a). Los picos característicos de CIS desde 1600 a 1500 cm^{-1} (flexión asimétrica de aminas) y 1300-1200 cm^{-1} (flexión simétrica de amina) también se observaron en los espectros la aparición de nuevos picos a 1285 cm^{-1} (estiramiento C-O-C), 1407 cm^{-1} (estiramiento C-C), 1442 cm^{-1} (acoplamiento de C-N y N-H), 996 cm^{-1} (estiramiento C-O) los cuales se pueden atribuir a la conjugación de DOX y CIS a las B-AuNPs.

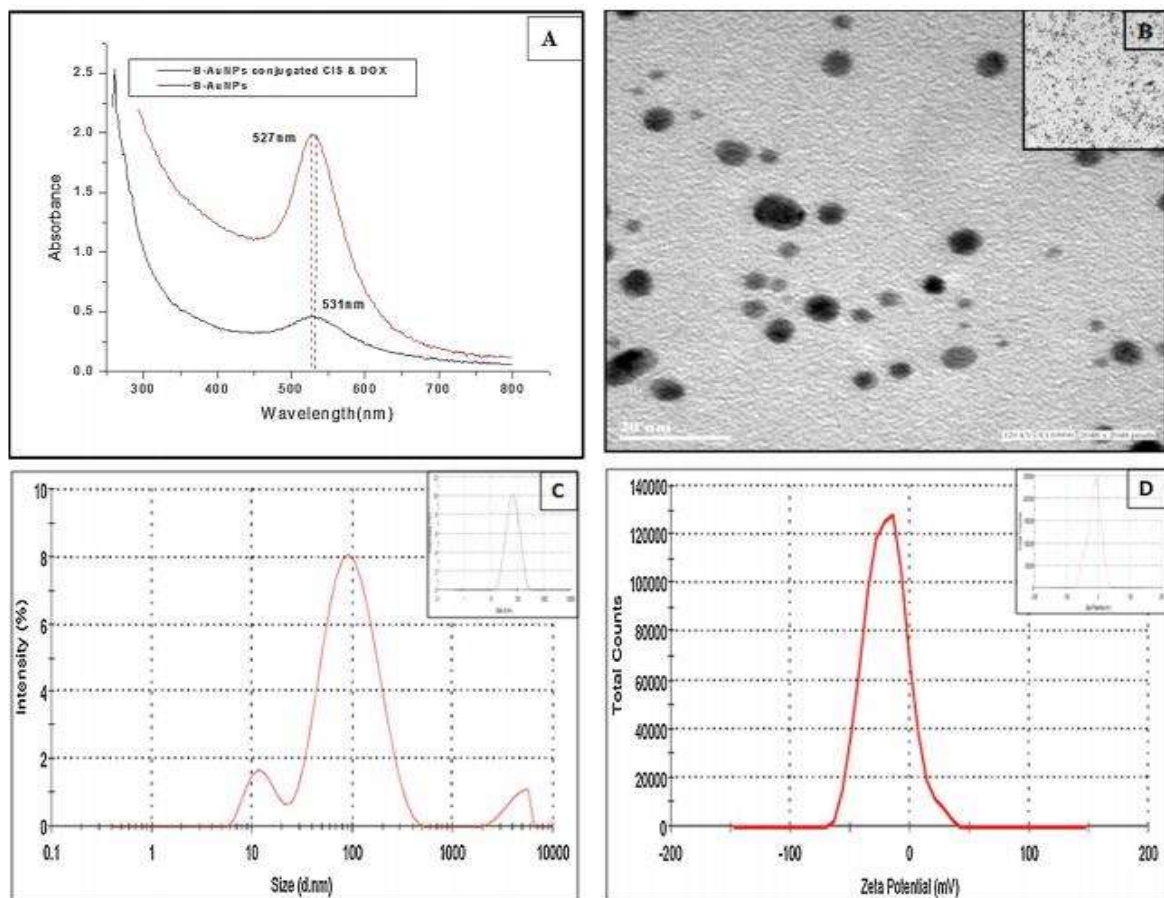


Figura 2. 27 Caracterización de las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX (A) Espectros UV-vis (B) TEM (C) DLS (D) Potencial Zeta [44].

El porcentaje de carga de CIS en el conjugado de B-AuNPs, CIS y DOX ha sido calculado utilizando ecuaciones de carga lo que resulto en un 47.5% que indica una unión eficaz de cisplatino a las B-AuNPs. Los valores de A y B se obtuvieron como 0.040 y 0.021 respectivamente y sustituidos las ecuaciones. El porcentaje de carga de DOX en el conjugado de las B-AuNPs, CIS y DOX también se calculó siendo éste de 34.4% que indica una unión eficiente del fármaco a las B-AuNPs. Los valores de A y B se obtuvieron como 0.090 y 0.050 respectivamente.

La curva estándar de CIS puro y DOX se estableció en 300 nm y 481 nm respectivamente, y se calculó el medicamento sin conjugar desde la curva estándar. La cantidad de fármacos bioconjugados fue calculado restando el medicamento sin enlazar de la cantidad total de fármacos agregados. La cantidad exacta de CIS y DOX bioconjugados totales fue calculada sumando el porcentaje de carga de CIS y DOX dando un resultado de 81.9% (Figura 2.28b).

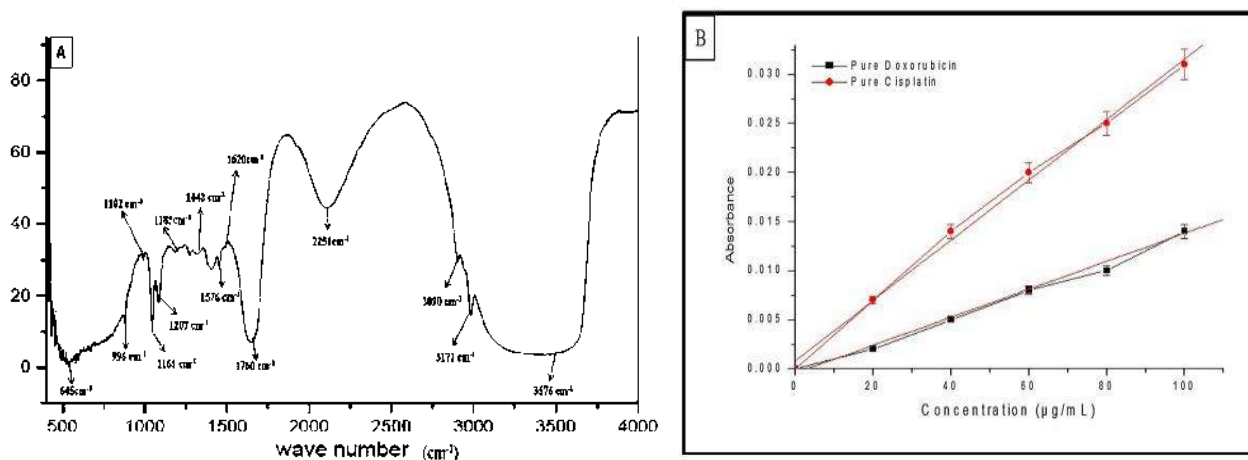


Figura 2. 28 Resultados de a) Espectros FTIR de CIS y DOX, y b) Conjugados con B-AuNPs de cisplatino puro y doxorubicina [44].

El efecto citotóxico in vitro de las B-AuNPs, CIS y DOX conjugados además de las B-AuNP, DOX puro y CIS puro fueron evaluados en líneas celulares de osteosarcoma Saos-2 y MG-63 a diferentes concentraciones (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 g / ml) usando el ensayo MTT ensayo (Figura 2.29), mientras que las células de osteoblastos primarios se tomaron como controles. El efecto citotóxico de B-AuNPs conjugado CIS y DOX en las líneas celulares fue dependiente de la dosis. En las células MG-63, con aumento en la concentración de las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX de 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 a 1 g/ml, el efecto anticanceroso también aumenta de 49%, 58%, 67%, 79%, a 94%, respectivamente. Del mismo modo, en las células Saos-2 con aumento en la concentración de 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 a 1 g/ml, el efecto anticanceroso también aumenta del 47%, 53%, 62%, 74%, a 91%, respectivamente. Los resultados analizados revelaron efectos sustancialmente buenos con los valores de IC_{50} de CIS conjugado a las B-AuNPs y DOX, con respecto a DOX puro y CIS puro, que se encontró que fueron de 0,071 g/ml y 0,09 g/ml en células MG-63 y Saos-2, respectivamente (Figura 2.29a-b). Las B-AuNPs conjugadas a CIS y DOX no mostraron toxicidad significativa en células de osteoblastos primarios (Figura 2.29c). Los valores de IC_{50} de doxorubicina pura en MG-63 y Saos-2 resultaron ser de 0.144 g/ml y 0.177 g/ml

respectivamente, las B-AuNPs (hasta 10%) y CIS puro (hasta 41%) tratados con células de osteosarcoma (MG-63 y Saos-2) no mostraron toxicidad significativa en a la concentración suministrada.

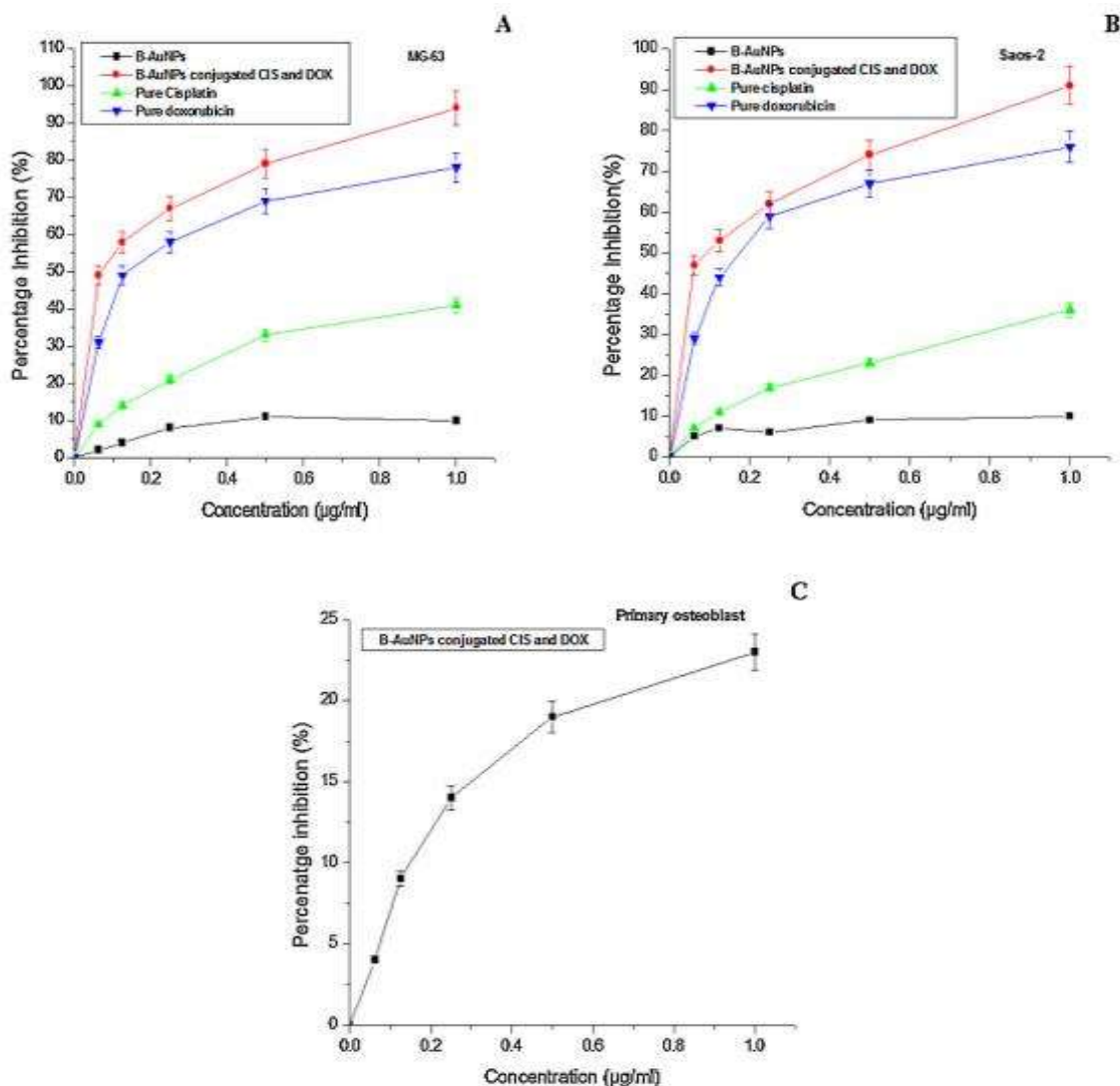


Figura 2. 29 Estudio de citotoxicidad (dependiente de la dosis) de B-AuNPs, B-AuNPs conjugó CIS y DOX en (A) MG-63 (B) Saos-2 y, (C) células de osteoblastos primarios [44].

De manera comparativa éste trabajo con el anteriormente mencionado de Tao y Col. se propondría que incorporaran un análisis morfológico con microfotografías para el estudio de citotoxicidad y de igual manera adicionar difractogramas de rayos X de oro, aunque se aprecia la propuesta por utilizar 2 fármacos en lugar de solo uno aumentando la eficiencia de muerte celular cancerígena.

2.8.6 Síntesis de auto-ensambles de oro y su toxicidad.

Dado que el uso de nanopartículas de oro (AuNP) en la administración de fármacos está en auge, el control preciso del tamaño y la morfología de los AuNPs se requiere con especial atención. Por lo cual Li y Col. [45] presentaron un método novedoso para fabricar nanopartículas monodispersas de oro de gran tamaño, basadas en el autoensamblaje de la bacitracina. Los AuNP pueden ser fáciles, de bajo costo, con repetibilidad y controlabilidad en el método de síntesis verde.

Las nanopartículas (Bac-AuNPs), compuestas por un núcleo de bacitracina y una coraza de oro fueron analizadas detectando el efecto generado por modificaciones en la concentración del agente reductor, pH y temperatura, mediante espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis), Microscopía electrónica de transmisión (MET), Potencial Zeta, Difracción de rayos X (DRX) y de electrones, por otra parte para las pruebas biológicas se utilizó el ensayo MTT para conocer el efecto de las Bac-AuNPs en la viabilidad celular en las líneas HepG2 y HEK 293.

Se disolvieron 0,7 mg de Bac en 1 ml de solución ácida (pH = 2,0) o solución alcalina débil (pH = 8.0) para obtener las soluciones template a 0.5 mM. Luego, 200 μ L de soluciones acuosas de HAuCl₄ con una concentración de 2.5 mM se mezclaron con 200 μ L de solución de bacitracina preparada y las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente en agitación con baño de aire (120 rpm) durante 24 h. Después de la incubación, se añadió NaBH₄ recién preparado (5 mM y 10 mM) gota a gota, y finalmente el color de las soluciones cambió gradualmente de amarillo a gris oscuro que indicó que los Bac-AuNPs se fabricaron con éxito.

Por la parte del efecto que tiene el pH como se muestra en las imágenes TEM (Figura 30a), en la solución de pH 2, se recubrió Bac completamente con AuNPs y presentó una morfología globular con un diámetro alrededor de 90 nm, los productos fueron monodispersos y generalmente homogéneos. Como era de esperarse, la observación en TEM revela que en el entorno ácido existen complejos de iones de oro (AuCl₄⁻) unidos a la bacitracina a través de interacciones electrostáticas. Esto se atribuye al hecho de que cuando el valor de pH de la solución acuosa está por debajo del punto isoelectrico (pI = 6.4) de la bacitracina, el template poseerá más cargas positivas que puedan combinarse con [AuCl₄⁻].

Por el contrario, como se muestra en la Figura 2.30b, las Bac-AuNPs irregulares en el álcali acuoso parecían apilarse con una morfología similar a cadenas esféricas con pequeñas partículas metálicas en la superficie. Tal fenómeno se atribuye al mayor valor de pH que conduce a la formación de

cargas negativas en la superficie de la bacitracina. La razón principal radica en que los sitios de unión específica, posiblemente la lisina en el sexto aminoácido de Bac que actúa como el donador de electrones, están expuestos en el exterior de Bac, lo que atrajo a las partículas de oro distintivamente.

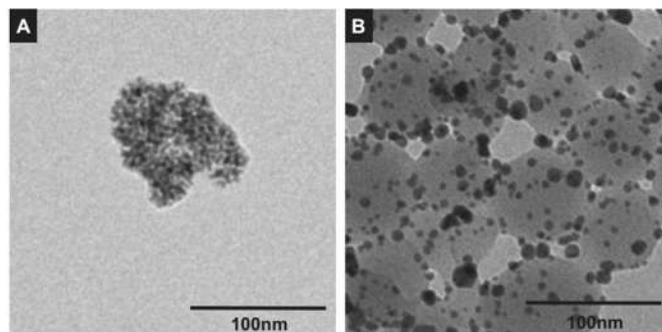


Figura 2. 30 Efecto del pH sobre la microestructura de nanopartículas de oro en la reacción. Imágenes TEM de Bac-AuNPs obtenidas en las soluciones de a) ácido y b) álcali débil [45].

En el proceso de reducción, las partículas de oro "añadidas" que se unen covalentemente al núcleo de Bac sirven como sitios de nucleación donde una mezcla de ácido tetracloroáurico se reduce en la solución con la presencia de borohidruro de sodio. Con el fin de investigar los efectos de diferentes concentraciones de soluciones de NaBH_4 sobre las Bac-AuNPs, se incubaron 0.5 mM de bacitracina y 5.0 mM de solución de HAuCl_4 a temperatura ambiente durante 24 h, y luego las soluciones de NaBH_4 recién preparadas a diferentes concentraciones (5.0 mM y 10.0 mM) se añaden a las mezclas gota a gota hasta que el color cambia a gris claro. Como se muestra en la Figura 30a, el compuesto homogéneo exhibió una morfología esférica con bordes bien definidos. Al mismo tiempo, las AuNP de Bac preparados en la condición de NaBH_4 10 mM, se fragmentan seriamente (Figura 2.31). Se atribuye al hecho de que la concentración excesivamente alta de solución de NaBH_4 puede romper las fuerzas de interacción entre Bac y HAuCl_4 , lo que perturba gravemente la formación y el crecimiento de los nanocristales.

Para investigar si la alta temperatura aceleraría la formación de Bac-AuNPs, se estableció la reacción a 70°C . Como se muestra en la Figura 2.32, el tratamiento de calentamiento tuvo efecto en la morfología de Bac, que exhibía una estructura de línea. El calentamiento perturbó en lugar de mejorar la unión entre las AuNP y la del templete. Es posible que el calentamiento conduzca al cambio de conformación de los péptidos Bac y al entere el sitio de unión para las nanopartículas de oro, reduciendo por lo tanto la deposición de AuNP en el templete de Bac.

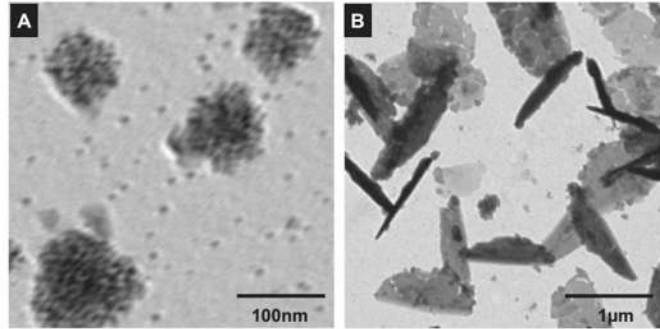


Figura 2. 31 Efecto de la concentración del agente de reducción en la microestructura de nanopartículas de oro. Imágenes TEM de los Bac-AuNPs obtenidos a partir de a) 5 mM de NaNH_4 y b) 10 mM de reducción de NaNH_4 [45].

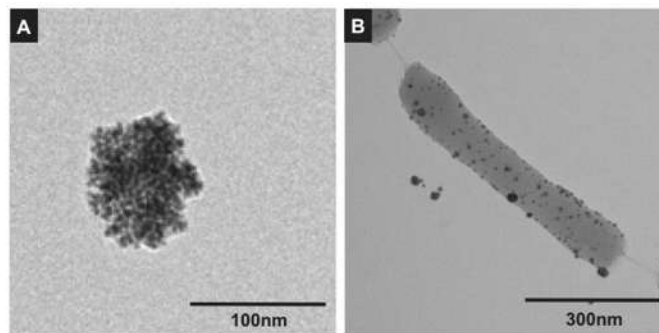


Figura 2. 32 Efecto de la temperatura en la microestructura de nanopartículas de oro. Imágenes TEM de Bac-AuNPs obtenidos, a) temperatura ambiente y b) 70 ° C [45].

Como se muestra en las imágenes de TEM (Figura 2.33a-b), el producto, compuesto por un núcleo de proteína y una coraza de oro, presentó una morfología esferoidal dorada con una superficie rugosa. El tamaño de partícula observado en las micrografías de TEM estuvo distribuido entre los 80 y 100 nm, con un diámetro promedio de 89.3 nm (Figura 2.33c). El tamaño alrededor de 100 nm es en un rango apropiado para el uso de AuNP en la terapia contra cáncer.

El análisis de espectroscopía de energía dispersiva (EDS) se realizó para confirmar la estequiometría química. El cual mostró un evidencia adicional para la síntesis de nanopartículas de núcleo de péptido Bac revestidas con coloides de oro. A partir de la Figura 2.34a se observa que los picos de Au son más fuertes claramente junto con los picos de C, N, O y S, que provienen principalmente del núcleo de proteína compuesto de Bac. El pico C también provino de la rejilla de Cu de TEM recubierta con carbono. No se evidenciaron otras impurezas en su figura, lo que implica que los AuNPs estaban puros en la composición química.

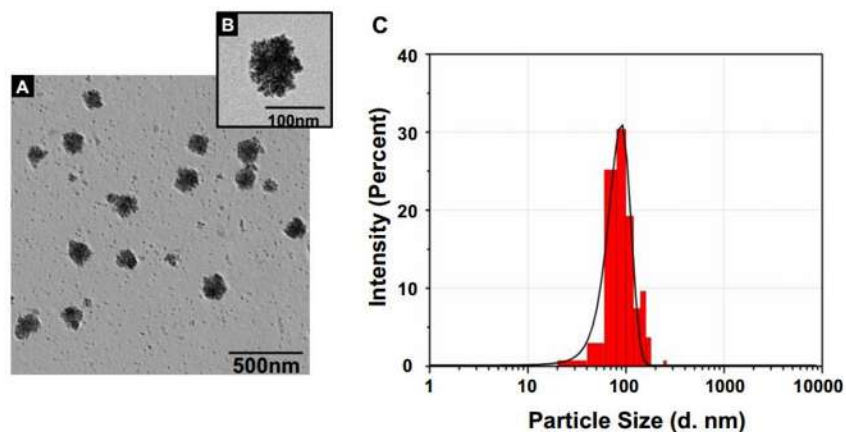


Figura 2. 33 Morfología y distribución del tamaño de Bac-AuNPs. Imágenes TEM (a-b) de las Bac-AuNP en diferentes escalas (500 nm-a, 100 nm-b) y c) la distribución de tamaño de Bac-AuNP con curva de ajuste basada en imágenes TEM [45].

La estructura cristalina de las Bac-AuNPs se analizó mediante el patrón de difracción de rayos X (XRD). En el cual se obtuvieron cinco picos intensos en todo el espectro (Figura 2.34b), las difracciones a 38.18° , 44.39° , 64.58° , 77.55° y 81.72° se pueden indexar a (111), (200), (220), (311), (222) planos cúbicos centrados en las caras (fcc) del Au. El grosor promedio de la pared de la coraza de oro (19.331 ± 0.137 nm) se calculó mediante la fórmula de Debye-Scherrer. Además, los patrones de difracción de electrones de área selecta (SAED), presentaron anillos cristalográficos con los diámetros de 2.36, 2.03, 1.44, 1.23, 1.18 Å, que se indexaron a (111), (200), (220), (311), corroborando adicionalmente la naturaleza policristalina de los AuNP observados desde el XRD. La espectroscopía UV-Vis es uno de los métodos más comunes para la verificación de la formación de nanomateriales. El color de los Bac-AuNPs preparados se observa como gris oscuro, que se atribuye a las excitaciones de las vibraciones de plasmón de superficie (SPR). Como se muestra en la Figura 2.34c, las bandas de SPR de solución acuosa de HAuCl_4 mostraron un pico de plasmón superficial característico a 528 nm, mientras que el pico de absorción de la solución de bacitracina se encuentra en 245 nm. El pico de plasmón de Bac-AuNPs se desplazó al rojo con 585 nm. Los cambios en la resonancia de plasmón superficial confirmaron aún más la interacción de Bac y AuNPs. Además la relación núcleo/coraza ($R_1/R_2 = 70/89.3 = 0.784$) estaba en un rango muy cercano en el que los AuNP podían usarse en terapia fototérmica (típicamente de 650 a 900 nm). Por otra parte, el potencial zeta fue un indicador importante de la estabilidad del sistema de dispersión coloidal. Los potenciales zeta se determinaron mediante medición de movilidad electroforética. La única solución de Bac a pH 2 se cargó positivamente con el potencial zeta superficial de 5.23 ± 0.10 mV, al incubarse con HAuCl_4 aumentó el potencial zeta superficial a

14.1 ± 0.64 mV (Figura 2.34d). El alto potencial zeta puede ayudar a una mejor dispersión y estabilidad para la suspensión de las Bac-AuNPs. Y la carga positiva facilitó la aplicación de Bac-AuNP como vehículo de fármaco, ya que las nanopartículas catiónicas tienen velocidades de penetración transvasculares más rápidas que las partículas neutras o aniónicas.

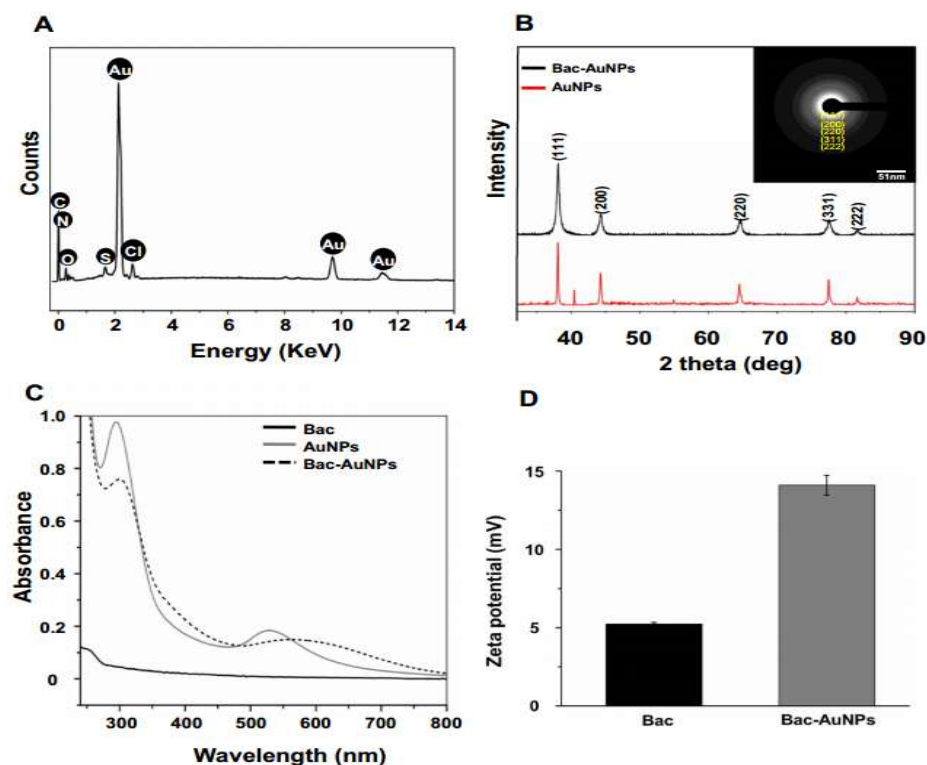


Figura 2. 34 Caracterización de las Bac-AuNPs. a) Espectro EDS de las Bac-AuNPs, b) Espectro de XRD y patrón SAED de las Bac-AuNPs, c) Espectros de UV-Vis de las muestras preparadas (Bac, AuNPs monodispersas y Bac-AuNP) y d) Potenciales zeta de superficie de Bac-AuN [45].

Por último en los resultados presentados por Li y Col. muestran un ensayo de viabilidad celular, utilizando células no tratadas con el 100% de supervivencia, e investigaron la citotoxicidad del templete de Bac, las nanopartículas de oro que se obtuvieron simplemente por reducción directa de la solución HAuCl_4 y las Bac-AuNP a diferentes concentraciones. El Bac exhibió poca citotoxicidad, como se muestra en la Figura 2.35, lo que afirma que el Bac se usó solo como biotemplate. Además tanto las Bac-AuNPs como los coloides de oro mostraron una toxicidad dependiente de la dosis para las células, Bac-AuNPs mostraron mejor biocompatibilidad en todos los gradientes de dosis una concentración relativamente baja ($<2.5 \times 10^{-5}$ mM), Bac-AuNPs indujeron poca citotoxicidad a Células HepG2 (Figura 2.35a). El resultado se confirmó

adicionalmente en otro ensayo de MTT en células HEK293, que es una cepa de línea celular específica derivada originalmente de células de riñón embrionario humano cultivadas en medio tisular, siendo éstas más próximas a células humanas normales (Figura 2.35b). De manera sorprendente, las células HEK293 mostraron más tolerancia a las Bac-AuNPs. Este fenómeno puede ser atribuido a la diferencia de tipos de células, pero de todos modos, este resultado sugiere que las Bac-AuNPs fueron poco tóxicas para las células humanas. Aunque las Bac-AuNP mostraron citotoxicidad, su tamaño determinó que no se retendrían en los tejidos normales, por lo tanto, la toxicidad posiblemente no tendría consecuencias devastadoras para los tejidos normales. Este resultado indicó que las nanopartículas de oro con mayor tamaño eran más seguras si se usaban como portadores de fármacos en comparación con las nanopartículas de oro de pequeño tamaño, y más adecuadas para la administración de fármacos en la terapia tumoral.

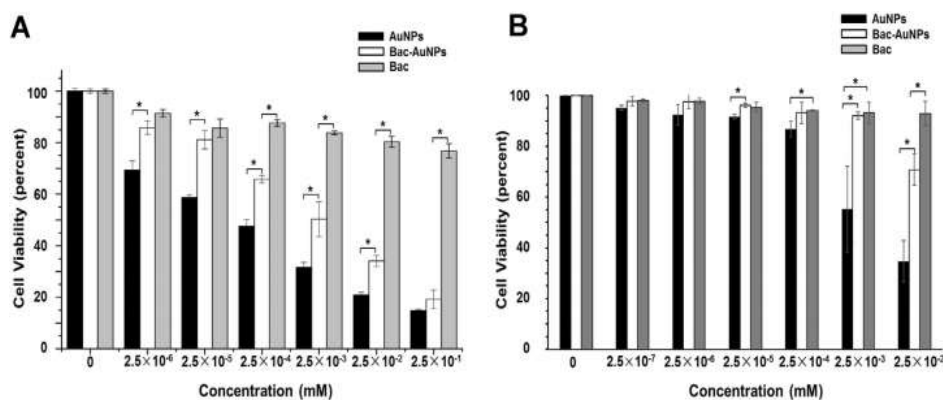


Figura 2. 35 Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersadas y las Bac-AuNPs con diferentes concentraciones, a) Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersas y Bac AuNPs para células Hela y b) Citotoxicidad de Bac, AuNPs monodispersados y AuNP de Bac a células HEK293 [45].

Éstas pruebas realizadas por Li y Col. ayudarán en gran manera a la presente investigación dentro del caso de los ensambles de oro, ya que de igual manera los nanomateriales se aplicaran en medios con diferentes pH (células cancerígenas y normales), temperatura y concentración lo cual exhibe modificaciones morfológicas similares a las que ellos obtuvieron, también las pruebas de caracterización que se realizaran en los ensambles de oro por medio de *T. officinale* son las parecidas a las de Li y Col. como Espectroscopía de Infrarrojo, Difracción de rayos X, Microscopía electrónica de Trasmisión y las pruebas biológicas de citotoxicidas por el método MTT, en comparación de ellos las células y la unión del fármaco son distintas, en general ésta revisión de literatura proporciona buena información del comportamiento de los ensambles de oro en medios biológicos.

2.8.7 Análisis de muestras orgánicas en Resonancia Magnética Nuclear

Una parte importante de este trabajo es la síntesis verde de nanomateriales mediante el uso de plantas, donde una de las principales incógnitas se encuentra en los compuestos involucrados en la reducción y estabilización de los nanomateriales [46], por lo cual la técnica de RMN ayuda a detectar esos compuestos a partir del método del protón ^1H , el cual se encarga de identificar aquellos compuestos con enlaces de Hidrogeno.

En el caso de la investigación desarrollada por Kumar y Co [47], se presentan los resultados de RMN correspondientes a los extractos enteros de las plantas *Potamogeton pectinatus*, *Enteromorpha intestinalis*, *Gracilaria verrucosa* y *Scenedesmus acuminatus*, donde se aprecia que arrojaron señales en el rango de las 3 a 4 ppm, correspondientes a carbohidratos (Figura 2.36 c-d). Los patrones de intensidad de los picos en estas regiones se correlacionaron con la capacidad de los extractos para sintetizar nanomateriales, sugiriendo que los oligosacáridos probablemente actuaron como agentes reductores y a su vez estabilizantes, en todos los casos analizados. De acuerdo a los estudios que ellos realizan, indican que, lo más probable es que estos carbohidratos se encuentren en diferentes concentraciones en las distintas especies de plantas, lo que podría ser la razón de las variaciones en tamaños y cantidades de nanomateriales sintetizados por diferentes extractos. Lo cual se espera que sea el mismo caso que la presente investigación con *T. officinale*.

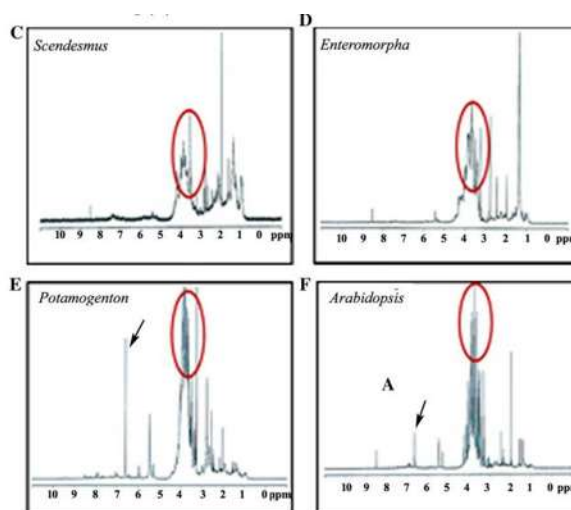


Figura 2. 36 Espectros de ^1H de RMN de diversos extractos de plantas utilizados para sintetizar nanopartículas de plata.

Por otra parte, ellos mismos reportan en su estudio la influencia que tienen los polifenoles, por lo cual eliminan los fenoles del extracto para observar que pasa con las nanopartículas indicando en la figura 2.37c, que las señales respectivas a *Arabidopsis* (por ser sus mejores resultados, con y sin fenoles, respectivamente) se eliminaron, conduciendo a su vez a una disminución en la biosíntesis de AgNPs, lo que sugiere un papel de los polifenólicos en la reducción de los metales en los nanomateriales hasta valencia cero. Sin embargo, debe observarse que en *Arabidopsis*, el agotamiento de los carbohidratos por la precipitación con acetona no solo indujo una disminución en la intensidad de los picos en la región de 3 a 4 ppm, sino que también provocó que el pico en la región polifenólica desapareciera en 7.27 ppm. Dando respuesta así, que los polifenoles están encargados también de la reducción de los metales en el proceso de síntesis [48].

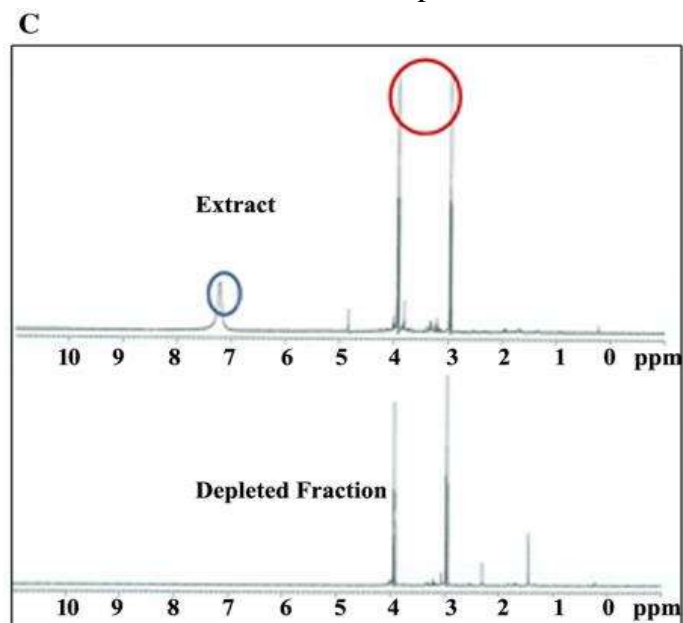


Figura 2. 37 Espectros de RMN ¹H de extractos acuosos de *Arabidopsis*.

Con la revisión anteriormente mencionada, se espera que utilizando ésta técnica se genere una respuesta más específica de los compuestos que están actuando como agentes reductores y estabilizantes. De manera general, dado todas las revisiones bibliográficas anteriormente descritas se espera que en primer lugar los agentes orgánicos presentes en el extracto de la planta de *T. officinale* permitan sintetizar a temperatura ambiente y sin agitación las nanoestructuras de oro; que a su vez puedan funcionalizarse en trabajos futuros al fármaco cisplatino por medio de los agentes ligantes del mismo extracto para aplicarse en líneas celulares de cáncer de mama.

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

La base de la metodología experimental (Figura 3.1) que se realizó en éste trabajo comprende los siguientes pasos; adquisición de la planta, elaboración del extracto de la planta *Taraxacum officinale*, realización de un análisis proximal e identificación de metabolitos del extracto, elaboración de la solución de sal precursora de oro (HAuCl_4), síntesis de las nanopartículas y ensambles de oro, caracterización de los nanomateriales, adquisición y caracterización del fármaco cisplatino.

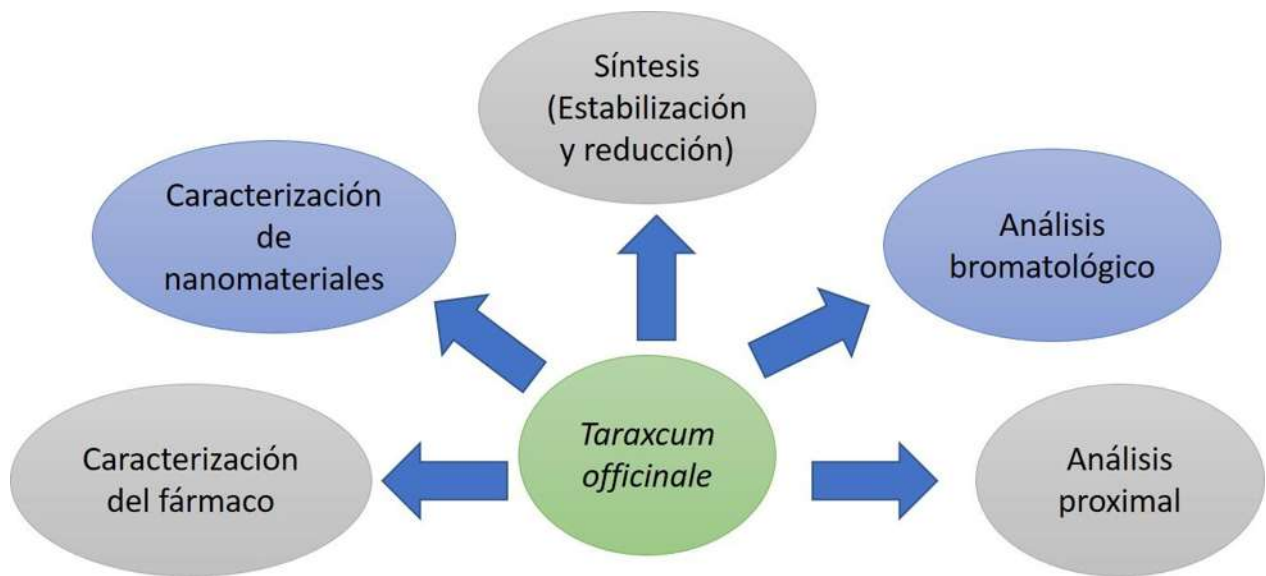


Figura 3. 1 Metodología experimental para la síntesis de nanopartículas de oro.

3.1 Adquisición de la planta y molienda

La planta *Taraxacum officinale* la encontramos en un mercado local de la ciudad de Morelia, Michoacán, realizando una molienda mecánica solamente de las hojas secas de la planta, en un molino de bolas para aumentar la superficie de contacto con el agua para elaborar el extracto y extraer de mejor manera los componentes de la planta, el proceso duró aproximadamente 10 minutos y el polvo fino en conjunto de las semillas blancas volátiles, se guardaron en un frasco de plástico hermético y libre de humedad.

3.2 Preparación del extracto.

Se mezclaron 1.5 g de polvo de la planta *T. officinale* (coloración verde y olor dulce) anteriormente molida adicionándose de manera separada las semillas volátiles blancas, con 100 mililitros de agua (concentración de 0.015g/ml), posteriormente cada mezcla se agitó a 12 000 rpm, a una temperatura de 65°C y a un tiempo de 25 minutos en una parrilla eléctrica, después se dejó reposar la mezcla 10 minutos y se filtró con papel Whatman de 150 mm, la solución final presentó un color café oscuro, el extracto se usó inmediatamente, éstas condiciones fueron para la generación de nanopartículas de oro, ya que para ensambles se varió la concentración de extracto a 0.02 g/ml.



Figura 3. 2 Polvo de la planta *Taraxacum officinale* y extracto del mismo.

3.3 Análisis Proximal e Identificación de metabolitos de *Taraxacum officinale*.

3.3.1 Análisis fitoquímico

Estas pruebas de estudio son metodologías que arrojan resultados positivo-negativo por lo que solo funcionan como indicadores de la presencia de ciertos compuestos como lo son esteroides, terpenoides,

acetilénicos, saponinas, benzopirona (flavonoides), taninos, compuestos aromáticos, monosacáridos, Nafto y antraquinonas y fenoles totales; para en trabajos futuros hacer pruebas cuantitativas de aquellos compuestos que den positivo, las pruebas cualitativas realizadas se describen a continuación.

a) **Prueba Liebermann-Buchard**, la cual consiste en mezclar 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrían a 0°C y se les añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. Una porción de éste reactivo se pone en contacto con la muestra de planta, la prueba es positiva para esteroides cuando hay formación de colores azul, verde, rojo y naranja.

b) **Prueba de permanganato de potasio**, se adicionó 0.1 g de la muestra de planta en 2 ml de agua, se añadió una solución de permanganato de potasio al 2% gota a gota con agitación, hasta que persista el color púrpura del permanganato de potasio; la prueba es positiva para compuestos que tienen enlaces etilénicos, acetilénicos, con decoloración de la solución de permanganato.

c) **Prueba de espuma**, se colocó 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo, se agregó agua caliente y se agitó vigorosamente si hay formación de espuma abundante y estable es prueba positiva para saponinas.

d) **Prueba Shinoda**, Esta prueba indica un núcleo benzopirona (flavonoides). Se utilizó 1 mg de la muestra con 0.5 ml de ácido clorhídrico al 10% agregándose luego limadura de magnesio, produciéndose una reacción exotérmica mostrando un color que va del rojo pálido al oscuro.

e) **Prueba de cloruro férrico**. Unas gotas de cloruro férrico al 20% se ponen en contacto con unos miligramos de la muestra de planta, la presencia de un precipitado azul verdoso aparece si hay taninos.

f) **Prueba de Mayer para alcaloides**, se preparó el reactivo disolviendo 1.36 g de cloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua. Se mezclan las 2 soluciones aforándose a 100 ml. Se añadieron cuatro gotas de reactivo a una solución de la muestra previamente acidulada con ácido clorhídrico diluído obteniéndose un precipitado, cuando éste se disuelve al agregarle exceso de reactivo significa que la prueba es positiva.

g) **Prueba de formaldehído-ácido sulfúrico**, se preparó una solución con 30 mg de la muestra de planta en 1 ml de hexano (solvente no aromático). Se le adicionaron 2 gotas del reactivo que se prepara al momento, el cual consiste en una gota de formalina (formaldehído al 40%) a 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y agitando ligeramente la solución, se debe observar el color en la capa superficial de reactivo después de adicionar la muestra de planta, y el color del reactivo después de

que el tubo se ha agitado. Una coloración rosa, roja, naranja, azul, verde, púrpura, que al final con el tiempo cambiará a café o negro, son los indicativos de que la prueba dio positivo para compuestos aromáticos.

h) **Reactivo de Benedict**, A una solución de 0.2 g de la muestra se le añaden 5 ml de agua y se le agregan 5 ml de la solución de Benedict. Observar si se produce un precipitado amarillo o amarillo verdoso; entonces caliente la mezcla hasta ebullición y observar si se formó un precipitado y si lo hubiera, observar su color. El reactivo se prepara disolviendo 173 g de citrato de sodio y 100 g de carbonato de sodio anhidro, se disuelven con calentamiento en 800 ml de agua destilada. Se adiciona más agua hasta ajustar el volumen de la solución a 850 ml. Se disuelven por separado 17.3 g de sulfato de cobre hidratado en 100 ml de agua y la solución resultante se vierte lentamente, agitando, en la solución de citrato y carbonato. La solución final se afora a 1 litro añadiéndole agua destilada. La prueba es positiva para azúcares reductores.

i) **Reactivo de Barfoed**, el reactivo se elabora disolviendo 16.6 g de acetato cúprico en 245 ml de agua y se le adicionan 2.4 ml de ácido acético glacial, se toman 2 ml del reactivo de Barfoed en un tubo de ensayo y se le adicionan 15 mg de la muestra, se calienta el tubo en un baño de agua hirviendo por 3 minutos, la formación de un precipitado amarillo-naranja, o rojo naranja es prueba positiva para monosacáricos.

j) **Prueba de Nafto y antraquinonas**, Para la detección de este tipo de metabolitos secundarios se empleó la reacción de Bornträger-Kraus. Para ello, el extracto etanólico seco de la planta fue mezclado con 5 ml de una solución etanólica en agua (1:7), a la cual se adicionó 0.5 ml de peróxido de hidrógeno y 0.5 ml de ácido sulfúrico y se procedió a calentar; bajo estas condiciones se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas, las cuales se extrajeron con tolueno y se agitaron en presencia de 0.5 ml de una solución de hidróxido de sodio al 5% que contiene a su vez hidróxido de amonio al 2%. En caso de presencia de nafto o antraquinonas, al dejar separar las fases la capa alcalina (inferior) toma una coloración de rosa a rojo intenso lo cual resulta ser positivo para nafto y antraquinonas.

k) **Prueba de fenoles**, para este análisis se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L para lo cual se pesó 25 mg de ácido Gálico en 25 ml de agua destilada y de esta solución se realizó otra disolución 1:10 con agua destilada nuevamente, la solución debe usarse inmediatamente.

Esta solución patrón ayuda a obtener las absorbancias del ácido gálico en el espectrofotómetro UV-Vis , a partir de la solución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L antes descrita, se procedió a realizar una serie de diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 1, 1,5 , 2, 3 y 4 mg/L. Para ello se colocó en distintos tubos protegidos de la luz; 40, 60, 80, 120 y 160 μ L de la solución patrón antes descrita. A cada tubo se le adicionó 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó y luego se agregó 1.5 mL de carbonato de sodio anhidro al 20%. La mezcla se llevó a volumen final de 3 mL usando agua destilada y se dejó reposar . Finalmente, se tomó la lectura a 760 nm en el espectrofotómetro de ultravioleta visible.

La solución referencia se realizó los mismos componentes excepto el ácido gálico. Posterior a esto los datos obtenidos se graficaron y se aplicó una regresión lineal para obtener los valores de las constantes m y b de la siguiente formula:

$$\text{Ec. 3.1} \quad \text{Cant. de ácido gálico} = \frac{(abs+b)}{m}$$

Los valores de m y b corresponden a los datos de la concentración del ácido gálico (mg/ml), la absorbancia requerida para la fórmula se obtiene a partir de los datos del extracto de las planta.

El resultado de la ecuación anterior se incorpora posteriormente a la siguiente ecuación para obtener el porcentaje total de los fenoles presentes en el extracto, para la cual es necesario tener los datos de volúmen y peso utilizado de extracto.

$$\text{Ec. 3.2} \quad \text{Porcentaje de fenólico total} = \frac{\text{cant. de ácido gálico}}{\frac{\text{peso de extracto (polvo)}}{\text{volumen de extracto}}} * 100$$

Posteriormente al tener ya los valores de las muestras estándar, se procedió a pesar 1 g de la muestra de planta y se se disolvió en 50 mL de agua destilada. Se tomó 1 mL de la disolución a la cual se le adicionó 1.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Se dejó reposar alrededor de 5 minutos y se adicionó 1.5 mL de carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se dejó reposar por 2 h. Se analizó la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 760 nm para usarse en la ecuación antes descrita y así obtener el porcentaje de fenoles totales de la planta *T. officinale*.

3.3.2 Análisis Proximal.

La metodología de éstas pruebas es parecida a la de Silva y Col. [16] y Susanto y Col. [17], para la determinación de **humedad** (ya con el polvo fino de la planta), se colocaron a secar en una cápsula de aluminio aproximadamente 2 g de muestra hasta peso constante a 95-100°C en un horno cuya presión no debía exceder de 100 mm Hg. La operación requirió un tiempo de 5 horas, se consideró la humedad como la pérdida de peso (Anexo 8.1.1). En el caso de la determinación de la **materia mineral o cenizas** se pesaron 2 g en un crisol de porcelana y se calcinaron durante 3 horas en la mufla precalentada a 550-600°C. Se enfrió el crisol en desecador y se pesó rápidamente calculando % de ceniza hasta la primera cifra decimal. Se debe evitar sobrecargar la mufla y no abrirla durante las 3 horas de ignición de la muestra, para evitar pérdidas de la misma (Anexo 8.1.2).

Por otra parte para la determinación de **proteína cruda o nitrógeno total** (Anexo 8.1.3), en forma de amonio (ésta prueba no determina el contenido de nitrógeno en forma de nitratos o nitritos) se utilizó el método de Kjeldahl, para lo cual se necesitaron los siguientes reactivos:

- a) Ácido sulfúrico concentrado (93-95).
- b) Catalizador; mezcla de K_2SO_4 con HgO en proporción 20:1 con $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ en la misma proporción.
- c) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente al 33% (500 g NaOH en 1lt H_2O). La densidad de la solución debe ser 1.36.
- d) Zinc en gránulos
- e) Solución de ácido bórico; 40g en 1 lt H_2O .
- f) Solución aproximadamente 0.1 N de HCl, titulada con Na_2CO_3 , anhidro, usando naranja de metilo como indicador.
- g) Solución indocadora de rojo de metilo-verde de bromocresol. Mezclar 1 parte de una solución alcohólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de una solución de alcohólica de verde de bromocresol al 0.2%.

Para la digestión los pasos del proceso a seguir se describen a continuación:

- 1) Pesar de 1 a 2 g de muestra sobre una hoja de papel filtro, se dobló cuidadosamente el papel y se introdujo en un matraz Kjeldahl de 500 ml.
- 2) Añadir 6 g de catalizador.

- 3) Adicionar 20 ml de H₂SO₄ concentrado.
- 4) Calentar en el digestor, primeramente a temperatura moderada (80°C) hasta que la formación de espuma cese y después a modo de mantener una ebullición activa hasta que la solución se clarifique. Continuar por 15 minutos más después de alcanzar este punto.
- 5) Dejar enfriar y añadir aproximadamente 200 ml de agua con agitación constante.

El proceso a seguir es la destilación:

- 1) Colocar 75 ml de solución de ácido bórico en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 500 ml marcado a 225ml. Añadir 2 o 3 gotas de indicador. Asegurarse de que la punta del condensador se encuentre bajo la superficie del líquido en el Erlenmeyer.
- 2) Introducir unos 8 o 10 gránulos de Zn al matraz Kjeldahl.
- 3) Sosteniendo el matraz Kjeldahl en posición inclinada, añadir cuidadosamente una mezcla de 100 ml de solución de NaOH al 33%, a modo que resbale por las paredes y se formen dos capas.
- 4) Conectar inmediatamente al destilador, mezcla el contenido del matraz Kjeldahl mediante agitación rotatoria y calentar hasta que todo el NH₃ haya sido destilado (150 ml de destilado son generalmente suficientes).
- 5) Bajar el matraz Erlenmeyer de manera que el extremo del condensador quede fuera de la solución de ácido bórico y apagar el sistema de calentamiento. Enjuagar con agua destilada la punta del condensador.

El último paso del proceso es realizar una titulación:

Se tituló con una solución 0.1 N de ácido clorhídrico el contenido del matraz Erlenmeyer hasta el cambio de color del indicador (debe titularse inmediatamente). Los cálculos para determinar el porcentaje de nitrógeno o proteína cruda se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 3.3} \quad \%N = \frac{(\text{ml de ácido} \times \text{normalidad del ácido}) \times (1.40)}{(\text{peso de la muestra en gramos})}$$

$$\text{Ec. 3.4} \quad \% \text{ Proteína calculada} = \%N \times 6.25$$

Por otra parte para la determinación de **extracto etéreo o grasa cruda** se cuantificaron las sustancias extraíbles en éter etílico, el procedimiento consta de extraer en un aparato soxhlet aproximadamente 2 g de muestra seca con el solvente en un dedal de papel filtro que permita el

paso rápido del disolvente. El tiempo de extracción puede variar desde 4 hrs a velocidad de condensación de 5 a 6 gotas por segundo, hasta 16 horas, de 2 a 3 gotas por segundo. Se recuperó el éter y se evaporó el disolvente residual sobre baño maría en un lugar con ventilación, se secó el residuo a 100°C durante 30 minutos, se enfrió y se pesó (Anexo 8.1.4).

El penúltimo proceso es el de **fibra cruda** (Anexo 8.1.5) el cual se realizó por el método del filtrado con fibras cerámicas, éste análisis determina la fibra común como la pérdida por calcinación del residuo de las digestiones ácidas y alcalinas de la muestra. Los reactivos se enlistaran a continuación:

- a) Solución de ácido sulfúrico 0.255 N (1.25 g de N_2SO_4 /100 ml de agua).
- b) Solución de hidróxido de sodio 0.313 N (1.25 NaOH/100 ml de agua libre de Na_2CO_3).
- c) Fibra cerámica preparada. Se colocaron 60 g de fibra cerámica (Cat. No. 1740 M Lab. Safety Supply) en un vaso de licuadora y se le agregaron 800 ml de agua y se mezcló 2 minutos a baja velocidad.
- d) Alcohol etílico al 95%
- e) Antiespumante (Antiespumante A de Dow Corning diluido 1:4 con éter de petróleo que a su vez también esta diluido 1:4 con agua).
- f) Fragmentos de porcelana como cuerpos para regular la ebullición.

Los aparatos utilizados en esta prueba con los mismos que el análisis anterior los cuales son:

- 1) Aparato digestor con vasos de Berzelius de 600 ml. (Labconco Corp.)
- 2) Crisoles de porcelana de 70 x 15 mm de 30 ml.
- 3) Desecador con material desecante.
- 4) Aparato para filtración con embudos Büchner cubiertos con criba No. 200 tipo 304 de acero inoxidable tipo California (Labconco Corp.)
- e) Aparato para succión de matraces en línea con lo embudos, con una válvula para detener la succión.
- f) Aparatos de calentamiento automático para ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y agua.

El procedimiento requiere tener la muestra totalmente molida en polvo fino, posteriormente para la digestión ácida se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Pesar 2 gramos de muestra seca y desengrasada con éter etílico y transferirla a un vaso de 600 ml.

2) Agregar de 1.5 a 2 g en peso seco de fibra cerámica preparada (20-26 ml), 200 ml de ácido sulfúrico 1.25% hirviendo y 1 gota de antiespumante. También se le agregaron algunos pocos gránulos para regular la ebullición. Colocar el vaso inmediatamente en el digestor precalentado y hervir exactamente por 30 min., rotando el vaso cada 10 minutos a manera de mantener las partículas sólidas dentro de la solución.

3) Filtrar el contenido a través de una capa delgada de cerámica en un crisol Gooch y lavar con 4 porciones de agua hirviendo de 50 ml c/u. Cuidadosamente se evitó que la capa de fibra cerámica no se secase antes de pasar todo el contenido restante a un vaso para la digestión alcalina.

Seguidamente de la digestión ácida se procedió a realizar la digestión alcalina para lo cual una vez transferido el residuo al vaso incluyendo la cubierta de fibra cerámica de la filtración anterior, se le añadieron 200 ml de la solución de NaOH 1.25% hirviendo y se colocó en una estufa a hervir por 30 minutos. Se filtró como el paso anterior en la digestión ácida y posteriormente se lavó con una porción de 25 ml de H₂SO₄ 1.25% con tres porciones de 50 ml de agua y 25 ml de alcohol. Secar el residuo y transferir a un crisol de porcelana. Secar este crisol y su contenido a 130 °C por 2 horas. Enfriar en desecador y pesar. Finalmente calcinar a 600 °C por 30 minutos. Enfriar nuevamente en desecador y volver a pesar (balanza analítica de precisión +/- 5 mg). Las fórmulas para los cálculos del % de fibra cruda se muestran a continuación:

$$\% \text{ fibra cruda en la muestra seca y desengrasada} = C$$

$$\text{Ec. 3.5} \quad C = \frac{(\text{Peso del crisol con residuo seco} - \text{Peso después de la calcinación}) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\text{Ec. 3.6} \quad \% FC = (C)(100 - \% \text{ humedad} - \% \text{ grasa cruda})/100$$

Ahora bien una vez que se tienen los cálculos de los procesos anteriores por diferencia a 100 se obtiene el **extracto libre de nitrógeno** (ELN), para lo cual:

$$\text{Ec. 3.7} \quad \% ELN = 100 - (\%H + \%M.M. + \%P.C. + \%E.E. + \%F.C.)$$

Donde;

% H= % Humedad

% M.M.= % Materia Mineral

% P.C. = % Proteína Cruda

% E.E = % Extracto Etéreo

% F.C. = % Fibra cruda

Por último la análisis de la **energía bruta** (Anexo 8.1.6) se realiza mediante un método que determina el calor de combustión total, la combustión se lleva a cabo bajo un atmósfera rica en oxígeno y el calor producido se mide como la diferencia de temperatura antes y después de la combustión, los equipos necesarios son:

- a) Calorímetro con bomba de oxígeno, tipo adiabático (Calorimeter Oxigen Bomb, adiabatic type, automatic temperatura control with Double Valve Bomb Parr Serial 1241, Parr Instrument Co.)
- b) Calentador de agua para el calorímetro (Parr Serial 1541- Parr Instrument Co.)
- c) Prensa para pastillador (Parr Serial 2811 – Parr Instrument Co.)

Los reactivos necesarios para esta prueba son:

- 1) Carbonato de sodio 0.0725 N (Se disolvieron 3.84 g de Na_2CO_3 previamente deshidratado a 100°C / 2 horas en 1 litro de agua)
- 2) Solución indicadora de anaranjado de metilo al 0.1 % en agua.
- 3) Ácido benzoico RA, estándar para calorimetría.
- 4) Tanque de oxígeno.
- 5) Alambre de fusión de níquel- cromo (Parr 145C10).

La preparación de la muestra consistió en colocar 1 gramo del polvo fino de la planta en la cápsula del aparato y generar ligeramente una pastilla al fondo de éste recipiente, manejar siempre con guantes y pinzas evitando tocar con las manos la capsula y los materiales.

Poner la cápsula dentro de la bomba sobre el soporte y colocar 1 ml de agua en el fondo de la bomba. Introducir el alambre de fusión en posición correcta en los electrodos. Cerrar la bomba y pasarle de 25 a 35 atmósferas de oxígeno. Poner la bomba dentro de la cubeta que contiene exactamente 2 kg de agua (pesar la cubeta y agregarle 2 kg de agua destilada). Colocar la cubeta en su posición en el baño de agua. Encender el aparato para hacer funcionar los agitadores. Ajustar la temperatura del baño a la de la cubeta que contiene la bomba, por comparación de los termómetros respectivos. Si el calorímetro es de tipo automático y el ajuste se realiza con facilidad, ya que está controlado eléctricamente. Establecer la temperatura de la cubeta y baño a $\pm 0.01^\circ\text{C}$ por lo menos durante 4 minutos, registrar la temperatura de la cubeta como T_i , posteriormente accionar el mecanismo de ignición para iniciar la combustión de la muestra. A los 13 minutos

(exactamente 9 minutos después de iniciar la ignición, tomar nuevamente la temperatura (Tf). Apagar el equipo y purgar el baño de agua, abrir el calorímetro, sacar la cubeta, abrir la bomba y realizar las siguientes determinaciones:

La energía bruta de una muestra es igual a la cantidad de calor liberado cuando la muestra se quema completamente en la presencia de oxígeno. En estas condiciones el nitrógeno y el azufre son liberados como óxidos gaseosos. Bajo las condiciones que se emplean en el calorímetro, la oxidación continúa y forma productos muy oxidados que son disueltos en el agua que existe en la bomba.

a) Titulación del ácido. Lavar con un 100 ml de agua destilada en el interior de la bomba y la cápsula que contenía la muestra. Recoger en un vaso de precipitado de 250 ml los lavados, agregarle unas gotas de indicador anaranjado de metilo. Titular con la solución de carbonato de sodio 0.0725 N.

b) Medir el alambre de fusión que no se fundió y que debe estar aún unido a los electrodos del soporte de la cápsula. Registrar los cm residuales del alambre de níquel-cromo.

Para calcular el equivalente en energía se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Ec. 3.8} \quad W = \frac{Hm + e_1 + e_2}{t}$$

Donde;

W = Equivalente de energía del calorímetro en calorías por grado centígrado o por grado Fahrenheit.

H = Calor de combustión de la muestra de ácido benzoico en calorías por gramo. Generalmente considerado como 6318 Cal/g.

m = g de ácido benzoico usados en la prueba.

t = Diferencia en grados de la temperatura final e inicial.

e₁ = Corrección por calor de formación de ácido nítrico en calorías. Para Na₂CO₃ 0.0725 N es generalmente considerado como 1 Cal / ml.

e₂ = Corrección por calor de combustible del alambre de fusión en calorías: El alambre de níquel-cromo es equivalente a 2.3 Cal / cm.

Los cálculos del calor de combustión de la muestra se obtienen a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 3.9} \quad H = \frac{(T_f - T_i) \times (W) - C_1 - C_2 - C_3}{m}$$

Donde;

H = Calor de combustión de la muestra.

Ti = Temperatura inicial de la cubeta.

Tf = Temperatura final después de la ignición.

C1 = Equivalente en calorías por la formación HNO₃ (ml de NaCO₃ 0.072 N x 1).

C2 = Equivalente en calorías por la formación de H₂SO₄ (14 x % de azufre en la muestra x gramos de muestra).

C3 = Equivalente en calorías por el calor de combustión del alambre de fusión usado (cm de alambre usado x 2.3)

W = Equivalente en energía del calorímetro en calorías por grado centígrado o Fahrenheit.

m = Peso de la muestra en gramos.

3.3 Elaboración de sal precursora

Se preparó una solución molar de ácido tetracloroaurico HAuCl₄ (Reactivo Sigma Aldrich al 99.4% de pureza) a la concentración de 5 mM para las nanopartículas, se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente, debido a que ésta sal reacciona de manera inmediata con la luz solar, para los ensambles se varió la relación volumétrica del extracto- sal (4:1), pero se utilizó la misma sal 5 mM.

3.4 Síntesis de nanomateriales y su caracterización

La síntesis de nanopartículas se realizó con 2 ml solución 5 mM de sal precursora de oro y 4 ml de 0.015 g/ml de extracto de *T. officinale* a temperatura ambiente, sin agitación, una vez sintetizadas se separaron por medio de centrifugación a una velocidad 12000 rpm por un periodo de 25 minutos, monitoreando el sobrenadante por medio de UV-Vis hasta purificarlas de residuos de extracto y los ensambles de oro fueron sintetizados variando la concentración final de 1 mM, es decir, 1.4 ml de solución de oro a 5 mM mezclado con 7 ml de extracto de planta a 0.02 g/ml, a temperatura ambiente y sin agitación, los ensambles no se centrifugaron ya que se desestabilizan.

Los nanomateriales fueron caracterizados mediante Ultravioleta Visible (UV-Vis), los nanomateriales de oro tienen la característica de exhibir una banda de absorción característica, que se encuentra a los 475 nm y 600 nm, por lo tanto, esta técnica fue la primordial para garantizar que

en la solución se formaron dichos materiales, lo cual se llevó a cabo en el equipo Ocean Optics USB-4000, para la Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR) se dio uso del equipo Bruker Tensor 27 por el método de pastillas con KBr a una temperatura de 26.7°C con humedad relativa del 37%, la Difracción de Rayos X (DRX) se realizó en el difractómetro de rayos X Bruker D8 Advanced, DAVINCI por método de polvos y se corrieron en un rango angular de 20 hasta 70° para nanopartículas y de 10° a 100° para ensambles, utilizando un tubo de cobre α a una longitud de onda de 1.54 Ångstroms, a temperatura ambiente y presión atmosférica, para la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se utilizó el equipo Jeol JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope, el análisis de las muestras por Microscopía Electrónica de Trasmisión (MET) se llevó a cabo en el equipo Phillips Tecnai F20, la Espectroscopía de fluorescencia (EF) se llevó a cabo en el espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5301PC con una lámpara de xenón, a una longitud de onda de excitación en 375 nm y emisión en los 530 nm, la Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) se llevó a cabo en el equipo Perkin Elmer 3100 a una longitud de onda de 242.8 nm y una flama oxido-acetilenica, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizó en un espectrómetro Varian Mercury Plus-400.

A través de UV-vis se confirmó la síntesis de las nanopartículas y ensambles, variando las condiciones ya mencionadas anteriormente. FTIR y RMN nos ayudaron a corroborar los compuestos involucrados en la síntesis de los nanomateriales, ya que se ha reportado que la reducción, estabilización y enlace se debe a compuestos aromáticos, fenoles, carbohidratos (azúcares reductores) y flavonoides. Por medio de MEB observamos la distribución y forma de las nanopartículas y ensambles, además con DRX y MET se determinó la cristalinidad y tamaño promedio los nanomateriales obtenidos. Finalmente para las pruebas biológicas se analizaron las nanopartículas y ensambles con EF para conocer la energía de emisión, excitación y comportamiento de los mismos.

3.5 Fármaco posible para ligar a los nanomateriales en futuras investigaciones.

El medicamento tiene una presentación líquida con 50 mg de cisplatino en solución, de marca Noveldexis proveniente de los laboratorios Pisa, el cual es el fármaco que se podría enlazar a las nanopartículas y ensambles de oro, por medio de los agentes ligantes presentes en el extracto de la planta *T. officinale*.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas de síntesis, caracterización morfológica-estructural y funcionalización de las nanopartículas y ensamblajes de oro con el extracto de la planta *Taraxacum officinale*, así mismo se anexan los resultados del análisis químico de los metabolitos de la planta.

4.1 Análisis proximal e identificación de metabolitos presentes en el extracto de la planta.

4.1.1 Identificación de metabolitos

La determinación de la composición química de las plantas medicinales permite conocer sus constituyentes biológicamente activos, por lo cual pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico, hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados, aunque éstos últimos resultan ser más costosos y es necesario contar con un antecedente de la presencia o ausencia de ciertos compuestos, por lo cual uno de los objetivos del presente estudio es identificar si los esteroides, compuestos etilénicos, saponinas, flavonoides con grupos benzopirona, taninos, compuestos aromáticos, azúcares reductores y monosacáridos se encuentran presentes en el extracto de *Taraxacum officinale* para intentar deducir cuales compuestos están asociados al proceso de síntesis de nanomateriales; Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con algunas actividades biológicas específicas, partiendo de esto es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados.

En el presente estudio se obtuvieron los resultados con agua como solvente ya que es el medio en el cual se realiza la síntesis de los nanomateriales, siendo este un solvente universal, poco costoso y nulamente tóxico comparado con otros solventes que se utilizan para extracción de sustancias activas, por la parte de Silva y Co. [16] ellos utilizaron hexano y etanol como solvente mezclado con la materia orgánica, dejándola reposar por 7 días y posteriormente la filtraron. La primera de estas pruebas arrojó positivo para esteroides en el caso de *Taraxacum officinale* al igual que Silva con el extracto de la fruta *Copernicia prunifera*, éste tipo de compuestos están asociados a

actividades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas; el análisis de los compuestos etilénicos es una de las pruebas adicionales que no fueron elaboradas por Silva, pero en el presente, sí se realizaron con *T. officinale* mostrando un resultado positivo, lo cual está asociado a procesos oxidantes y formadores de vitaminas como la K1.

En el caso de la prueba para detección de saponinas se encontró negativo para *T. officinale* y para el fruto *C. prunifera*, la función de este tipo de compuestos es la misma que realizan los esteroides, por lo cual si alguno de ellos no se encuentra presente en el extracto el otro podría tener la misma función; Por otra parte, la prueba realizada para estudiar la presencia de flavonoides resultó positiva para *T. officinale* a pH de 5.63, y en el caso de Silva y Co. presentó ausencia de los mismos a un pH de 3, los flavonoides representan un ejemplo atractivo de bioactivos provenientes de plantas con usos prometedores como son anticáncer, prevención de enfermedades cardiovasculares, reducción de radicales libres de oxígeno, antialérgico y antiviral. Ahora bien, la prueba de detección de taninos en el presente estudio arrojó un resultado negativo y comparado con la planta de *C. prunifera* en el trabajo reportado por Silva ellos indican que fue positivo y además en su cuantificación obtienen una concentración entre 1500 y 3000 ppm, los taninos son polímeros con funciones valiosas en las plantas, que contribuyen al sabor, olor y color, y son responsables de la astringencia de muchos productos.

Las plantas ricas en taninos se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades porque tanto los taninos hidrolizables como los condensados tienen la capacidad de generar complejos con ciertos elementos, como lo son hierro, vanadio, manganeso, cobre y aluminio, presentando capacidades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, funciones que en el caso de *T. officinale* lo podrían realizar los flavonoides. Cabe destacar que, el contenido de taninos en las plantas puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas y geográficas, y puede presentar una composición química variada que a menudo es poco conocida.

Las últimas tres pruebas de detección de compuestos aromáticos, azúcares reductores y monosacáridos solo fueron realizadas en el presente estudio, arrojando resultados positivos excepto para la prueba de Tollens que, a pesar de ser una prueba para análisis de azúcares reductores, como la de Benedict, dio resultado negativo, esto se puede atribuir a que para la prueba de Tollens se deben adicionar directamente los oligosacáridos extraídos de la muestra, pero para efectos de comparación con las demás pruebas se decidió utilizar el extracto directo.

Los carbohidratos sirven como fuente de energía para todas las actividades celulares vitales, forman parte de la pared celular de las células vegetales y son los causantes de la fibrosidad del alimento pero no están disponibles para el metabolismo energético de la planta.

Tabla 4. 1 Resultados cualitativos de las pruebas de identificación de diversos metabolitos.

Prueba Cualitativa	Compuesto	Resultado
Liebermann-Buchard	Esteroles	Positivo
Permanganato de Potasio	Compuestos etilénicos,	Positivo
Espuma	Saponinas	Negativo
Shinoda	Flavonoides con grupos benzopirona	Positivo
Cloruro Férrico	Taninos	Negativo
Formaldehído	Compuestos aromáticos	Negativo
Benedict	Azúcares reductores	Positivo
Barfoed	Monosacáridos	Positivo
Tollens	Azúcares reductores	Negativo

4.1.1.1 Cuantificación de fenoles totales

El contenido total de fenoles en el extracto estudiado se determinó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu mencionada en el capítulo anterior, la cual se basa en la reacción que tienen los fenoles frente a agentes oxidantes .

Esta cuantificación de fenoles se realizó por duplicado y los datos obtenidos de la absorbancia se someten a un análisis de regresión lineal, lo cual nos arroja los parámetros m y b de la ecuación de la recta (Figura 4.1), que se utilizaron en la ecuación 3.1 antes mencionada.

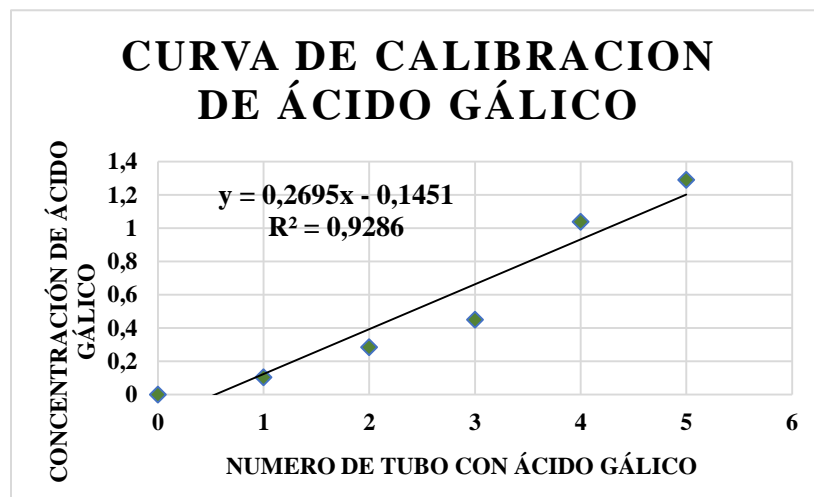


Figura 4. 1 Curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones.

Los datos obtenidos de la gráfica anterior se utilizan para colocarse en la ecuación 3.2 la cual involucra el peso y volumen del extracto utilizado (tabla 4.2) para obtener así finalmente el porcentaje total de fenoles presentes en el extracto. El último dato de la tabla muestra el valor de la ecuación 3.1 del extracto analizado, dicho valor se utilizó en la ecuación 3.2.

Tabla 4. 2 Datos experimentales para cálculo de porcentaje fenólico total.

Datos	Valor
m	0.26
b	0.14
Peso de extracto (Polvo)	2 mg
Volumen de extracto	1.5 ml
<i>Taraxacum Officinale</i>	9.28 (dato de ec. 3.1)

El dato del porcentaje obtenido se realizó por duplicado presentado una diferencia de ± 0.0001 , de esta manera tenemos que *Taraxacum officinale* obtuvo un **70.37% [1.4 Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) / g de extracto]**, todas las lecturas de los datos fueron tomadas a las 2 h de actividad. Comparado con Garima y Co. [49] en su trabajo realizado con raíces de *Thalictrum foliolosum*, expresan positivo para contenido fenólico en solución acuosa, presentando resultados del material orgánico proveniente de 4 sitios a diferentes altitudes de la India, siendo éstas Kedarkantha (1.54

± 0.56 EAG/g de extracto), Taluka (1.4 ± 0.82), Sankri (1.24 ± 0.72) y Bhowali (1.01 ± 0.23), los cuales analizándolo con el presente trabajo resultan ser muy similares, demostrando buena cantidad de fenoles para *Taraxacum officinale*. Los fenoles son compuestos que tienen actividades como agentes antitumorales y exhiben propiedades antioxidantes, lo cual en el caso de reducción de metales resulta positivo para síntesis de materiales.

4.1.2 Análisis Proximal

Una de las principales incógnitas en el proceso de síntesis de nanomateriales por medio de plantas son los componentes orgánicos o grupos de ellos presentes en el extracto, los cuales funcionan como agentes reductores y estabilizadores de los metales de interés, debido a esto se realizó un análisis proximal, bromatológico y estructural de la planta *T. officinale* en polvo, para así definir que componentes pueden estar involucrados en la reducción del oro.

Todos los análisis fueron realizados en base fresca (Bf) y base seca (Bs). En la primera prueba se analizó la humedad en la planta (ver tabla 4.3), sin presentar diferencia alguna en Bf y Bs lo cual es atribuido a que previó a la realización de las pruebas, para evitar que la planta adquiriera humedad del ambiente adicional a la que contiene, después de su trituración hasta obtener partículas finas, se colocó en un desecador por 24 h. Al realizar la prueba de “materia seca” se obtuvo el mismo valor en Bf y Bs, considerando que la suma de estos resultados nos arrojen 100% de la materia orgánica analizada (peso de muestra con humedad + peso de muestra deshidratado). Cabe destacar que comparando éstos resultados con el trabajo previo de Susanto y Co. [17], ellos utilizaron 1000 g de hojas de la planta *Calophyllum inophyllum* extraídas en metanol y en el caso presente, se utilizaron 2 g de la planta en seco de *Taraxacum officinale* para cada prueba. Ahora bien, ellos obtuvieron 11.24 % de humedad, lo que ligeramente supera a lo obtenido en el presente estudio. Esto puede ser atribuido a sus diferencias en el ambiente de crecimiento, ya que *T. officinale* crece en terrenos secos por lo cual en su estructura almacena solo la cantidad disponible y necesaria de humedad para las épocas de sequía que atraviesa; y *C. inophyllum* crece en zonas bajas y costeras lo que genera disponibilidad de mayores cantidades de agua, aunque esto las hace susceptibles a contaminación microbiana, por otra parte también, éste alto contenido de humedad proporciona la mayor actividad de enzimas solubles en agua y coenzimas necesarias para su metabolismo, ahora bien, en cuanto al extracto etéreo, encontramos que la planta utilizada por

Susanto no mostró alguna cantidad significativa de aceites y, por la parte de *T. officinale* se obtuvo un 2.85%, lo que indica que las plantas de manera general, no requieren altas cantidades de grasas como método de obtención de energía, ya que si se almacenarán grandes cantidades de grasa en las hojas (generalmente es en la raíz donde se almacena), les generaría arteriosclerosis y envejecimiento.

En cuanto a la determinación de ceniza se obtuvo el valor de 23.37 %, nuevamente comparando con el trabajo de Susanto ellos obtuvieron 4.75 % lo cual es una cantidad 5 veces menor, indicando la posible presencia de un alto contenido de minerales tales como cloro, magnesio, hierro, sodio y potasio, en general, los minerales de las plantas son menos biodisponibles que los de origen animal no obstante, los minerales son importantes para el desarrollo físico y mental, y son componentes esenciales de los huesos, dientes, tejidos, músculos, sangre y células nerviosas.

En cuanto a la medición de proteína los valores registrados para *T. officinale* fue de 24.02%, mientras que comparando nuevamente con el estudio de Susanto, ellos obtuvieron un 6.43%. Esto significa que *T. officinale* presenta 4 veces más cantidad en proteína lo que la constituye una fuente rica en proteína, aunque, se debe realizar un estudio adicional para identificar si pudieran estar biodisponibles para la dieta de mamíferos.

Por la parte de la fibra cruda, en la planta de *C. inophyllum* obtienen un 23.96 %, mientras que el presente trabajo obtiene un 18.19%, siendo menor que aquel en donde ese valor es alto para los niveles de fibra no digestible, dado que su estructura se conforma de ramas fibrosas alargadas comparadas a las de *T. officinale* que son alargadas pero blandas. Ahora bien, las plantas o verduras sin almidón, son las fuentes más ricas de fibra dietética y se emplean en el tratamiento de enfermedades como la obesidad, la diabetes, el cáncer y desórdenes gastrointestinales, ya que ayudan a mantener la salud humana por reducir el nivel de colesterol.

En penúltimo lugar tenemos las concentraciones de carbohidratos los cuales por parte de *T. officinale* son superiores que las de *C. inophyllum*, lo cual la hace ser una fuente rica de energía disponible en el caso de usarla como fuente alimenticia. Para el caso de procesos de síntesis de materiales los azúcares presentes podrían estar involucrados en la reducción de los metales a nanomateriales.

Por último, se presenta el resultado de la energía bruta, en donde la planta *T. officinale* obtuvo un valor de 8748.21 Cal/g que en comparación con el estudio de Susanto ellos obtienen 791.7 Cal/g (79.17 kCal/100g) lo cual es absolutamente inferior a el resultado obtenido en el presente trabajo.

Este resultado se asocia a la posible digestibilidad que puede tener una planta debido a los carbohidratos ya mencionados, aunque se requiere un análisis detallado de digestibilidad en caso de que se pretenda emplear la planta como fuente alimenticia.

Tabla 4. 3 Resultados del análisis bromatológico del polvo de la planta *T. officinale*.

Análisis proximal de la planta <i>Taraxacum officinale</i>		
DETERMINACIÓN	BASE FRESCA (%)	BASE SECA (%)
HUMEDAD	8.20	8.20
MATERIA SECA	91.80	91.80
EXTRACTO ETÉREO	2.62	2.85
CENIZAS	21.45	23.37
PROTEÍNA CRUDA	22.05	24.02
FIBRA CRUDA	16.70	18.19
EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO (CARBOHIDRATOS)	37.18	23.27
ENERGÍA BRUTA	8748.21 Cal / g	8748.21 Cal / g

4.2 Síntesis de nanomateriales y su caracterización morfológica-estructural.

4.2.1 Nanopartículas de oro

En esta parte experimental y pieza clave de éste proyecto, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro, para la cual se preparó el extracto de *Taraxacum officinale* a una concentración de 0.015 g/ml y la solución de ácido tetracloroáurico utilizada a una concentración de 5 mM en una relación volumétrica de 2:1 respectivamente, el primer indicativo de una síntesis efectiva es el cambio de color del café claro a morado característico de la formación de estructuras nanométricas, debido a la excitación relacionada a los electrones libres del oro (Figura 4.2), a continuación en éste apartado se presentan los resultados obtenidos mediante las técnicas de caracterización morfológica y estructural de las nanopartículas.

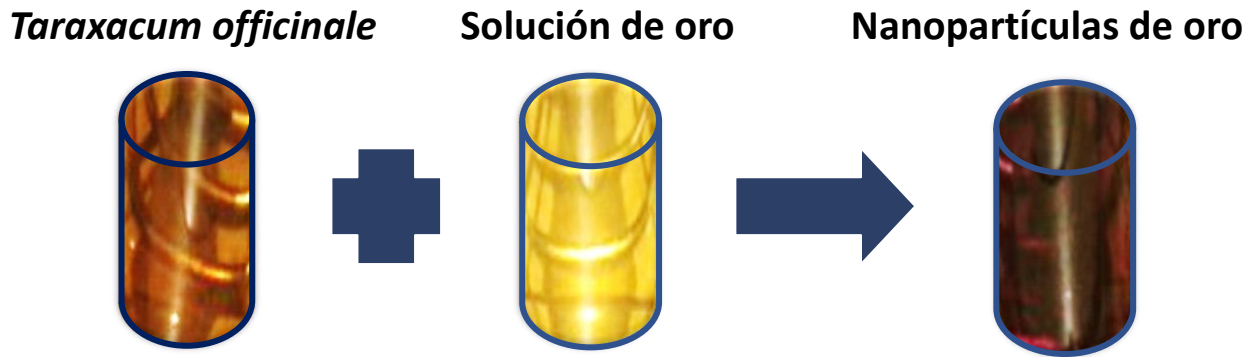


Figura 4. 2 Cambio de color en el proceso de síntesis que va de marrón (extracto) y amarillo (sln. de oro) a morado (AuNPs).

4.2.1.1 Espectroscopía de UV-Vis.

Como se mencionó con anterioridad, el cambio de color es el principal indicativo de la formación de nanopartículas, pero este resultado debe ser confirmado mediante espectroscopía de UV-Vis, ya que éstas, presentan el fenómeno del plasmón superficial, el cual, se debe a la oscilación en conjunto de los electrones cuando una radiación con longitud de onda dentro del espectro visible incide sobre ellas. De esta manera, la técnica de UV-Vis es un método importante, sencillo y rápido para determinar la formación de las mismas, para lo cual se colocaron los materiales precursores y la muestra con la síntesis en celdas de poliacrilico de 3.5 mm respectivamente y se analizaron en el espectrofotómetro.

Primeramente, se analizó mediante ésta misma técnica el extracto de la planta y la solución de oro de manera individual como control de los medios (Figura 4.3), se puede apreciar que la solución de oro a una concentración de 5 mM en el apartado a), muestra una banda asimétrica entre los 250 y 450 nm resultado de la respuesta a la excitación de los iones presentes en la solución; por otra parte en el apartado b) observamos una banda ruidosa que inicia en los 180 nm y aproximadamente hasta los 600 nm, mostrando señales debido a los compuestos orgánicos presentes en la planta. Por último, como ya se ha mencionado, los nanomateriales sintetizados se funcionalizarán futuramente con el fármaco cisplatino y se aplicaran en 3 líneas celulares de cáncer de mama, por lo cual se analizó dicho fármaco en el apartado c), mostrando la aparición de una banda mínima, indicando que no se verá reflejada ninguna respuesta característica del fármaco, por lo cual para la detección del mismo en la superficie del material es necesaria la espectroscopía de fluorescencia [50].

Por otra parte, la Figura 4.4 presenta el resultado de la síntesis de las nanopartículas de oro a temperatura ambiente y sin agitación donde se logra apreciar una banda entre los 500 y 550 nm característica del oro, con un pico máximo de plasmón superficial en los 538 nm, lo cual si se compara con el resultado obtenido por Rajan y Col. [42] donde ellos a partir del extracto de las semillas de *Elettaria cardamomum* a 373 K, obtienen un pico máximo de plasmón superficial de 527 nm en su muestra B3, utilizando la misma sal de ácido tetracloroáurico con una concentración de 0.25 mM y una concentración de extracto de 0.015 g/ml en una relación volumétrica de 1:30 ml respectivamente, por lo cual se puede afirmar que la síntesis se ha llevado de manera efectiva a una menor concentración de extracto, a pesar de que ellos utilizan una menor concentración de sal, promueven la nucleación por la alta temperatura utilizada generando nanopartículas semiesféricas.

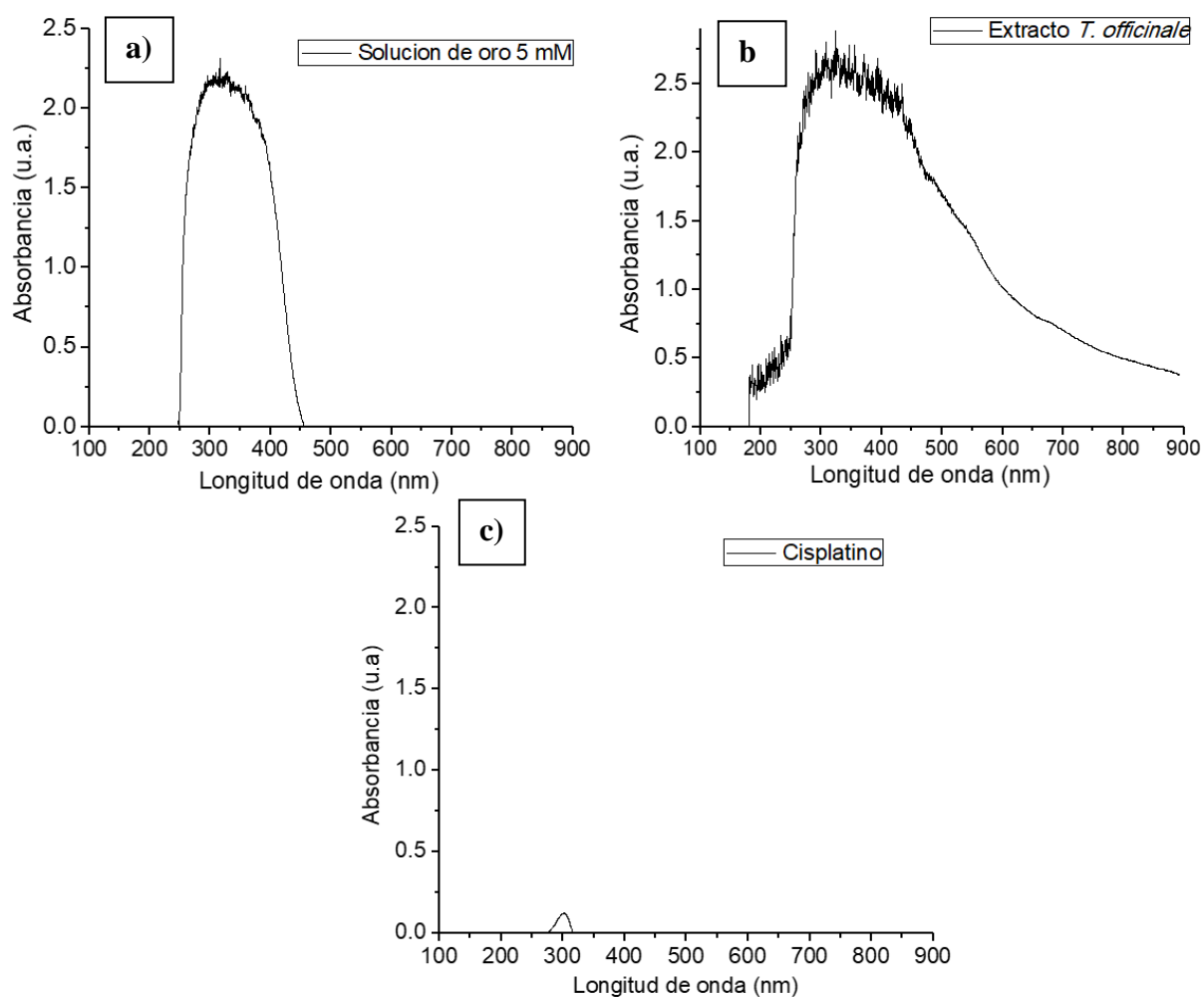


Figura 4. 3 Espectro de UV-Vis de a) solución de oro a 5 mM, b) extracto de *T. officinale* y c) cisplatino.

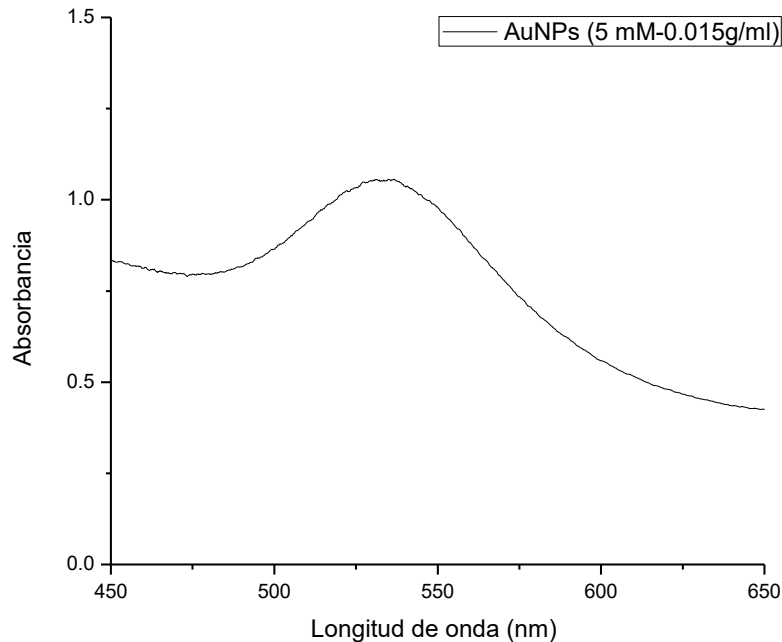


Figura 4. 4 Espectro de UV-Vis de las nanopartículas de oro sintetizadas con una solución de oro a 5 mM y una concentración de extracto a 0.015 g/ml.

Ésta figura nos muestra que efectivamente la planta de *T. Officinale* tiene la suficiente cantidad de sustancias orgánicas, las cuales ayudan a reducir y estabilizar las nanopartículas de oro, éste proceso se llevó a cabo en un periodo de 1 h para la reducción y estabilización, posterior a esto se preservó la muestra a 4°C para evitar la formación de hongos por alguna posible contaminación. Ahora bien, cualquier cambio en el medio dieléctrico en el que se encuentran las nanopartículas afecta el espectro de la resonancia generado por el plasmón superficial, causando el movimiento o desviación de la curva en la longitud de onda del espectro, ya que la resonancia depende de las propiedades que tenga el medio y de las nanopartículas, dado que las densidades de carga tienen que acoplarse, no solo a los campos incidentes sino también a los campos causados por la polarización, modificándose debido a las propiedades de absorción y dispersión de las nanopartículas, el tamaño y la forma de las mismas, cabe mencionar que para evitar modificaciones por alteración del medio se realizaron lavados a 12 000 rpm por 10 min hasta eliminar el extracto remanente y se le adicionó agua destilada para dispersarlas nuevamente, por lo tanto, comparando éste resultado con los obtenidos de los materiales precursores en solución acuosa, se descarta la posible formación de ese tipo de banda debido a los medios.

4.2.1.2 Espectroscopía de IR.

Esta técnica es una alternativa eficaz para conocer los compuestos orgánicos presentes en las muestras, en nuestro caso utilizamos esta prueba para conocer los grupos funcionales que contiene el extracto de la planta, los cuales están involucrados en la síntesis de las nanopartículas en base a la aparición o eliminación de bandas en el espectro de infrarrojo, para así mismo después lograr establecer mecanismos de formación de las nanopartículas de oro. Para realizar este método, es necesario secar el extracto de la planta, el cisplatino (control) y la muestra con nanopartículas de oro, para eliminar la presencia de agua y otros componentes que puedan generar ruido en el espectro, los cuales interfieran el análisis de los componentes funcionales, además la presencia de humedad en el equipo de infrarrojo genera un mal funcionamiento del mismo, cabe destacar, que esta prueba se realizó a una humedad específica de 39% y una temperatura de 26.7 °C.

La figura 4.5 nos muestra el espectro de infrarrojo del extracto de *Taraxacum Officinale*, en el cual logramos apreciar absorciones características de ciertos grupos funcionales, marcados con los enlaces y números de onda correspondientes, de lado izquierdo comenzamos con la presencia de una banda con número de onda de 3400 cm^{-1} la cual se atribuye a las vibraciones que sufre el enlace O-H de los alcoholes debido a un estiramiento del mismo. En la siguiente banda ubicada en 2922 cm^{-1} corresponde también a un estiramiento del enlace de los alcanos (C-H), siendo este del metileno. En tercer lugar tenemos la banda de 1630 cm^{-1} generada por tensión de grupos aromáticos con enlace C=C, esta banda al estar ligeramente cercana a los 1600 cm^{-1} representan un núcleo bencénico. El siguiente pico en 1382 cm^{-1} corresponde a la flexión de los grupos con enlace C-N, en la banda de 1260 cm^{-1} encontramos la aparición de enlaces de C-C respectivo a carburos. La banda con número de onda 1053 cm^{-1} del enlace C-O corresponde a los ácidos carboxílicos y finalmente, tenemos la presencia de una banda de 609 cm^{-1} que se atribuye a los compuestos halogenuros que en este caso pertenece a la unión C-Cl.

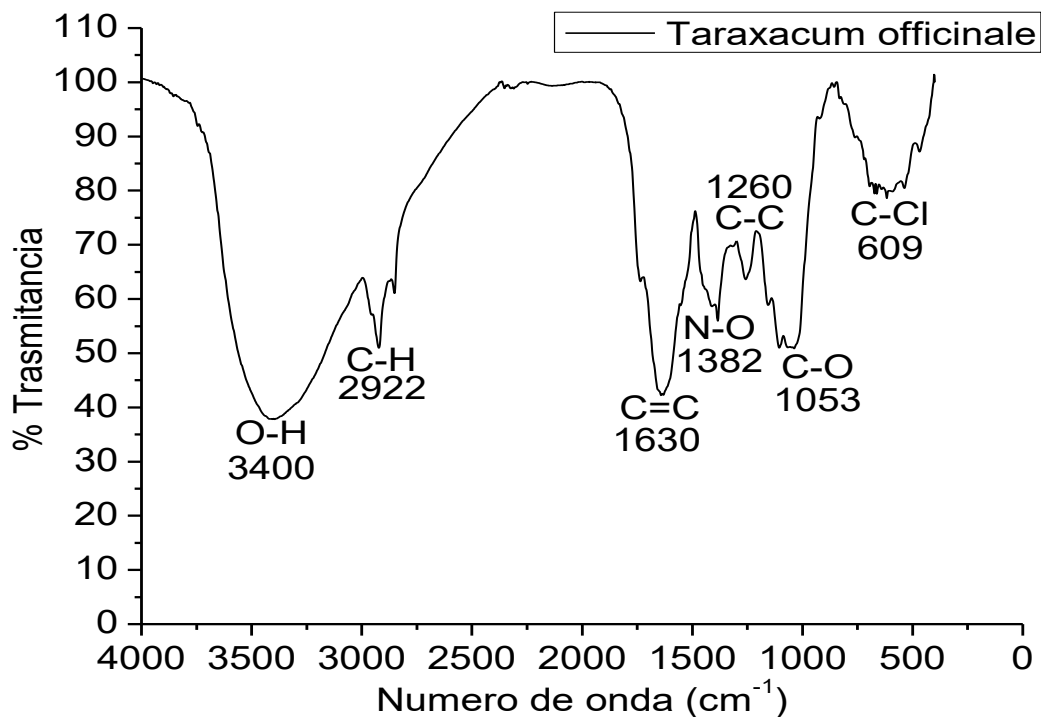


Figura 4. 5 Espectro de IR del extracto de la planta *T. officinale*.

La Figura 4.6 presenta el espectro de las nanopartículas de oro y del extracto de *Taraxacum Officinale*, en el cual logramos apreciar diversos enlaces correspondientes a grupos funcionales que disminuyeron su presencia en las bandas de transmitancia por la acción de estos mismos en la síntesis y estabilización de las nanopartículas. Al igual que el espectro mostrado en la figura 4.5, se ubica la presencia de la banda por vibraciones de estiramiento del enlace correspondiente a O-H el cual, se desplaza a un mayor número de onda siendo este 3431 cm⁻¹. En la región del grupo metileno antes mencionado se observa la desaparición del mismo teniendo una tensión débil en 2923 cm⁻¹, seguido se aprecia el pico correspondiente a un grupo con compuestos aromáticos con un numero de onda de 1610 cm⁻¹, el cual se observa disminuido y desplazado ligeramente hacia menores longitudes de onda con respecto al extracto puro, teniendo en cuenta que este se encuentra cercano a los 1600 cm⁻¹ por lo que se confirma la existencia de algún anillo bencénico. El enlace N-O con la banda de 1386 cm⁻¹ corresponde aun a los grupos nitro observándose una disminución de esta banda a comparación del espectro anterior, en la banda de 1210 cm⁻¹ encontramos la aparición de enlaces de C-C, corrida a la derecha correspondiente a carburos, el siguiente enlace corresponde a los grupos carboxilo con un numero de onda de 1089 cm⁻¹, el cual se recorrió hacia

longitudes mayores y por último tenemos la presencia de los grupos halogenados los cuales presentan un enlace C-Cl con números de onda de 3685 cm^{-1} y 657 cm^{-1} corrido también a mayores longitudes. En general se logra observar en todos los compuestos una baja intensidad, que se asocia a la desaparición de los mismos debido a que se encuentran involucrados en la síntesis de las nanopartículas de oro, afirmando de esta manera la presencia de los diversos flavonoides y derivados cumarínicos identificados en investigaciones por Sánchez y Col [2].

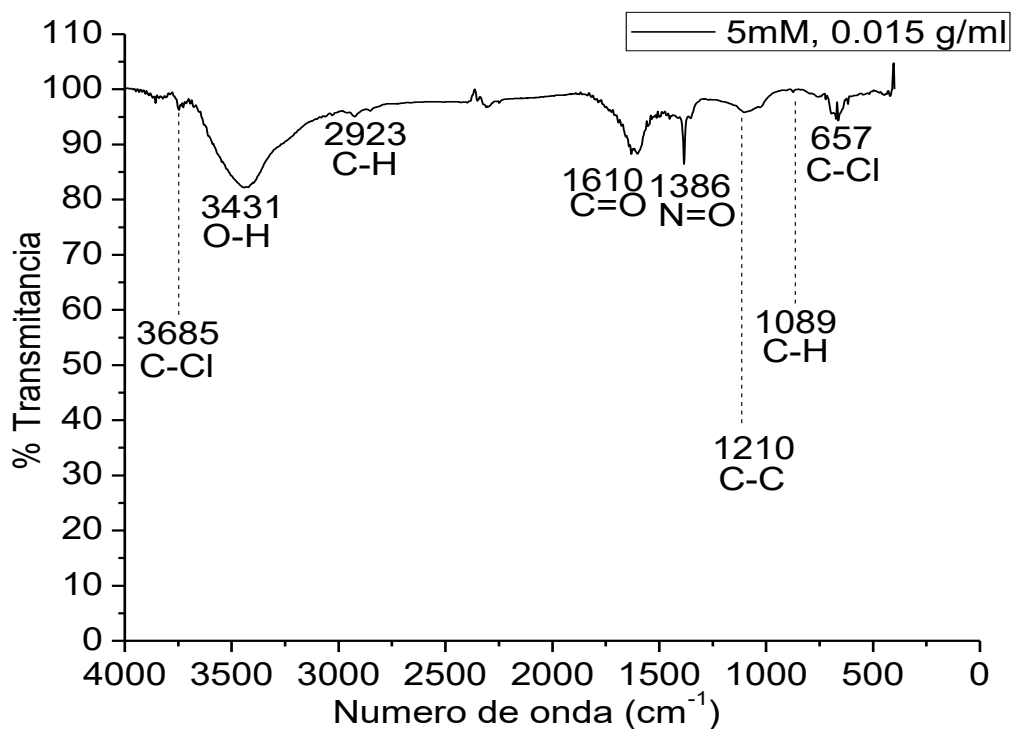


Figura 4. 6 Espectro de IR de las AuNPs (solución de oro a 5 mM y extracto a 0.015 g/ml).

Por último analizando el fármaco cisplatino a manera de obtener un control detallado estructural del mismo, se generó el espectro de infrarrojo en el cual se aprecia la primera señal en 3463 cm^{-1} por vibraciones de estiramiento del enlace correspondiente a O-H, la segunda banda se presenta en los 2225 cm^{-1} correspondiente al enlace C=C respectiva a los carburos insaturados, seguida de los carburos saturados con número de onda en 1698 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace de los alcanos (C-H). En penúltimo lugar tenemos una banda con número de onda de 1367 cm^{-1} con enlace C-O correspondiente a los ácidos carboxílicos y finalmente tenemos la aparición de una banda de 655 cm^{-1} que se atribuye a los compuestos halogenuros que en este caso el enlace pertenece a C-Cl.

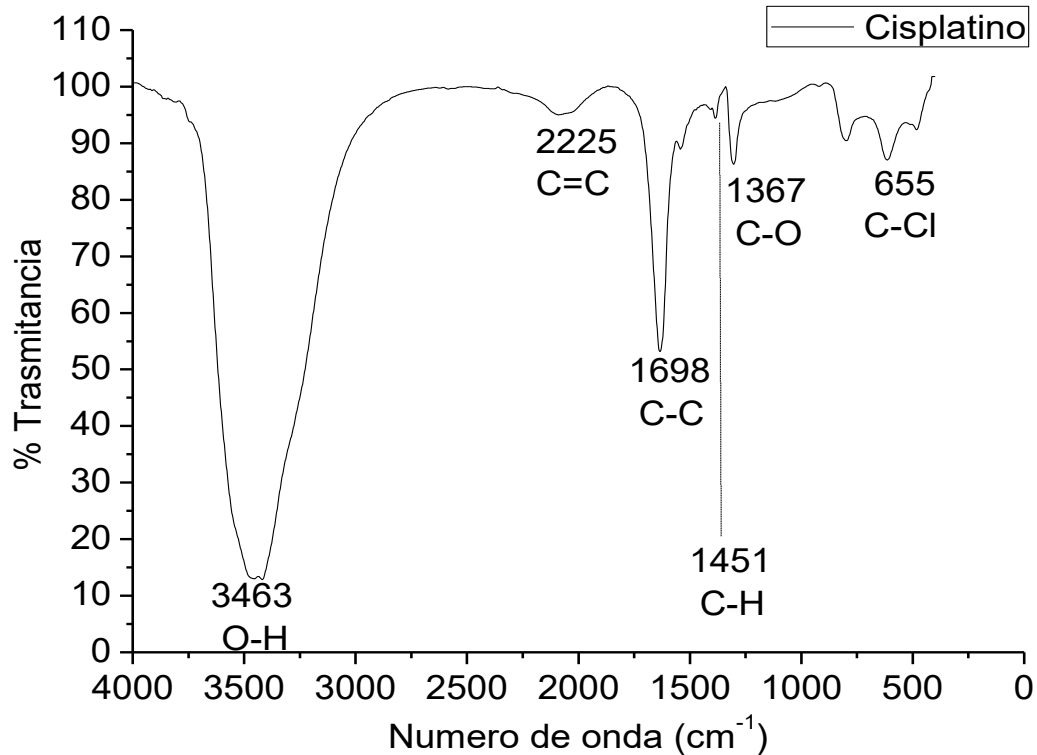


Figura 4. 7 Espectro de IR de la solución de cisplatino.

De manera comparativa con el trabajo realizado por Mona y Col. [51] ellos aprecian un patrón muy similar al del extracto de las hojas y fruto de *Pistacia Atlantica*, aunque con un ligero cambio en los números de onda y aumento en la transmitancia, dando respuesta al efecto de reducción de Au⁺³ a Au⁰ y estabilización de las nanopartículas, en el que están inmiscuidos dichos compuestos, ellos reportan que generan respuesta significativa en el números de onda 3452 cm⁻¹ relacionado con el grupo hidroxil-amina el cual se movió a un número de onda menor indicado en 3382 cm⁻¹, lo cual demuestra la unión de esos compuestos a la superficie de las AuNPs.

4.2.1.3. Resonancia Magnética Nuclear

El extracto acuoso total de la planta *Taraxacum officinale* se analizó por RMN del protón ¹H con la finalidad de identificar señales características de mismo antes y después de la síntesis de los nanomateriales [52], en la Figura 4.8a se muestran señales protónicas entre 7.5 y 6.25 ppm correspondientes a compuestos aromáticos, que comparado con el inciso b se aprecia que dichos compuestos desaparecen del espectro dando razón a que están actuando como agentes

estabilizantes, seguido de esto se encuentra un pico en 4.75 ppm característico de los protones del agua, posteriormente se encuentran señales respectivas a los azúcares reductores que se ven modificados del extracto puro a) y el residuo de síntesis b) debido a su liberación de electrones para la reducción del metal de oro trivalente a cerivalente, por lo cual se indica que son los encargados de actuar como reductores, a continuación también se encuentran señales respectivas a grupos metilo que se modifican su intensidad y multiplicidad de picos (señales dobles, triples y cuádruples), atribuyéndose a que posiblemente actúan como donadores de hidrógenos para las moléculas de agua que actúa como solvatante de los iones de oro, finalmente se aprecian señales de metilenos que tienen una ligera modificación de su intensidad posiblemente a la poca unión de los mismos a algún metal, en éste caso al oro. Lo cual comparado con el trabajo por Kumar y co. [47], es totalmente similar encontrando los resultados de grupos aromáticos entre 7 y 8 ppm, y los azúcares reductores entre 3 y 4 ppm, dando razón de las funciones que desempeñan en el proceso de síntesis.

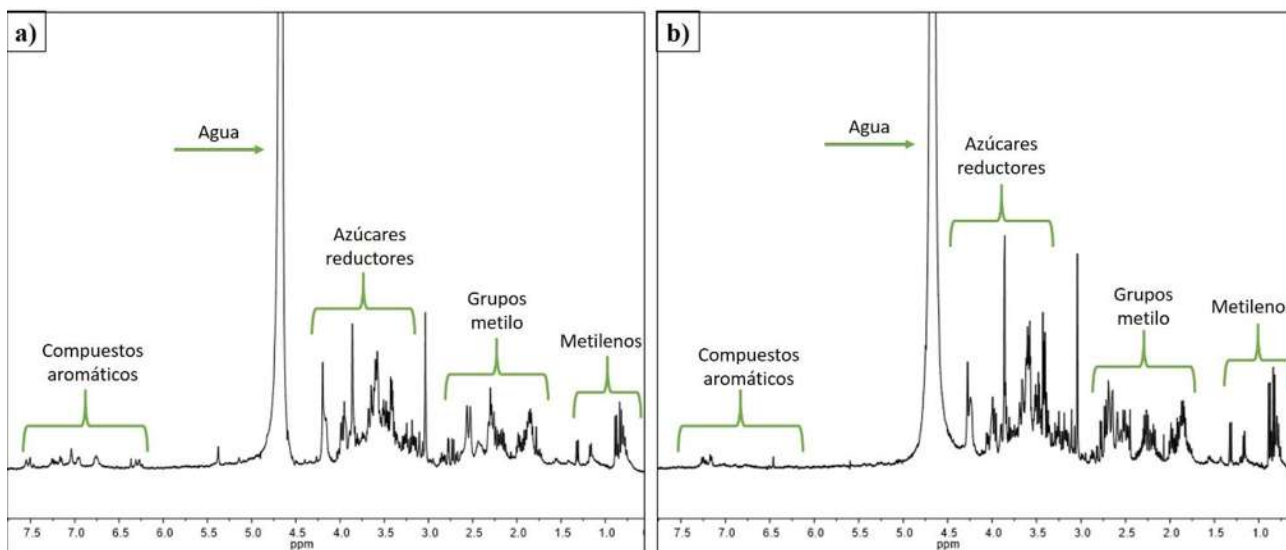


Figura 4. 8 Espectros de RMN 1H a) extracto entero de *T. officinale* y b) residuo de la síntesis de los nanomateriales de oro.

4.2.1.4 Microscopía Electrónica de Barrido.

Dados los resultados afirmativos de la síntesis de nanopartículas de oro (solución de oro a 5 mM y 0.015 g/ml de extracto en una relación volumétrica 1:2 respectivamente) por medio de UV-Vis e IR, se procedió a caracterizar mediante MEB arrojando los siguientes resultados.

En la figura 4.9 se presentan las micrografías de barrido; en los apartados a-b) de mayor amplificación y, c-d) de menor amplificación, las nanopartículas se encuentran libres, es decir, nulamente agregadas en el extracto demostrando que la planta contiene las sustancias orgánicas adecuadas para estabilizar las AuNPs, se aprecia también que las Nps tiene un tamaño en general menor a los 30 nm, aunque en el apartado d) se distingue una polidispersividad de tamaños, no obstante, presentando homogeneidad en forma principalmente esférica, debido a la gran cantidad de tensoactivos que permiten estabilizarlas, los cuales se unen a su alrededor y no permiten que su núcleo crezca de manera acelerada desde el ion reducido, controlando así las morfologías y tamaños de las mismas, cabe mencionar que la preservación de la muestra a 4 °C, genera que haya menores movimientos de átomos o nanopartículas por lo cual se reduce la cantidad de coalescencias.

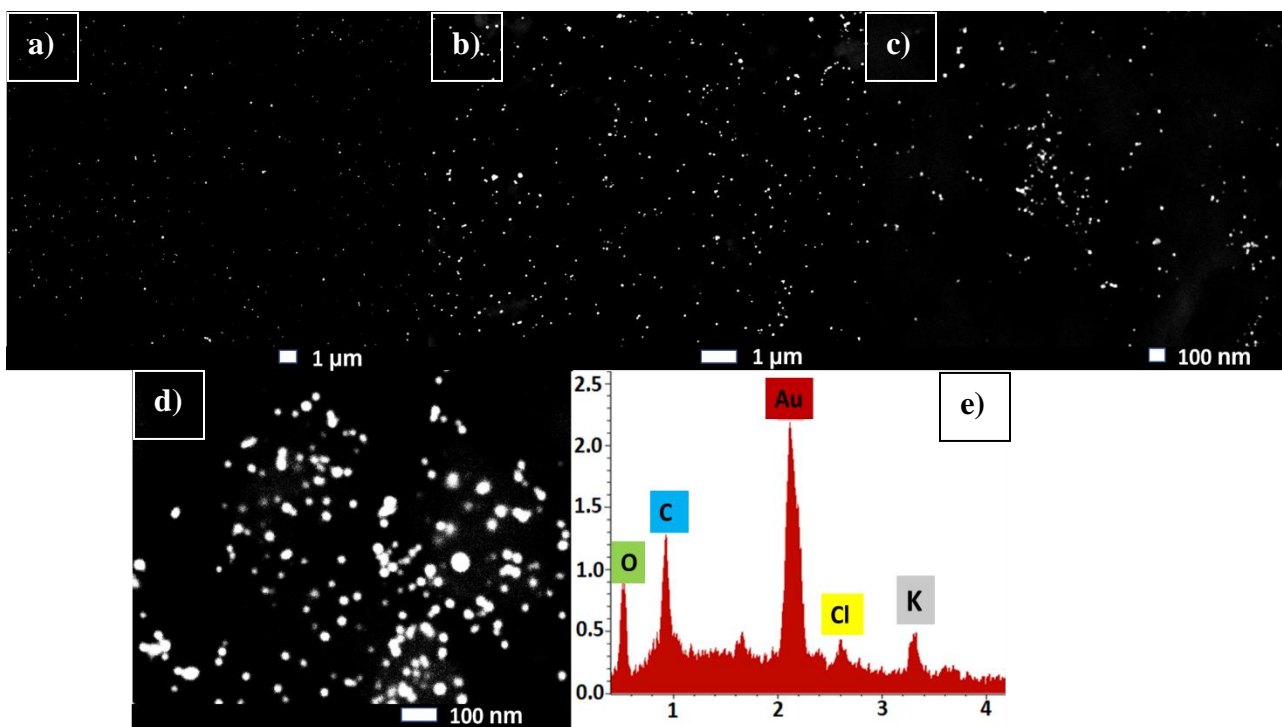


Figura 4. 9 Micrografías electrónicas de barrido de las AuNPs, a-b) mayor amplificación (1 μm), c-d) menor amplificación (100 nm) y e) análisis químico elemental (EDS).

En el apartado e) de la misma figura se presenta el análisis químico elemental de la muestra (EDS, por sus siglas en inglés), como se observa las señales marcadas corresponden al elemento oro, los demás picos a carbono y oxígeno provenientes de los residuos del extracto, además, de que una

capa de carbono se usa para fijar los portamuestras. Finalmente, se aprecian los elementos Cl y K los cuales provienen del extracto remanente de la planta, que forman una sal residual de KCl.

Haciendo una comparación de las morfologías de las nanopartículas con aquellas obtenidas por Rajan y Col [42], ellos sintetizaron formas triangulares truncas y semiesféricas, las cuales aplican en levaduras y bacterias como lo son *S.aureus*, *E.coli* y *P.aeruginosa*; por otra parte colocan nanopartículas en el medio de crecimiento de las líneas de cancer Hella a diferentes concentraciones, empleando un tamaño de 15.2 nm, sugiriendo que a menor tamaño será más efectivo el daño a las células, por lo cual, resulta satisfactorio el resultado obtenido mediante *Taraxacum officinale* para la aplicación de las mismas en células de cancer de mama.

4.2.1.5 Microscopía Electrónica de Trasmisión.

En la figura 4.10 podemos observar en el apartado a) una imagen de Contraste Z (HAADF, por sus siglas en inglés), ilustrando el mapeo de composición del oro metálico el cual aparece brillante dado su mayor número atómico, se aprecia también en esa misma micrografía una gran distribución de nanopartículas. Por otra parte, los apartados b, d, e -f) muestran las imágenes de campo claro, donde se aprecia que las nanopartículas son de tamaño inferior a 20 nm, se pueden distinguir formas esféricas y semiesféricas, de la segunda de estas imágenes (apartado b) se realizó una medición de tamaño de las AuNPs, con la cual se elaboró un histograma y obteniendo un tamaño promedio en el rango de los 5 a 30 nm (Figura 4.11), aunque se aprecia de manera visual en esa figura una mayor frecuencia de las mismas entre los 10 y 15 nm, una vez que se midieron y se graficaron los datos, se afirma que el tamaño promedio fue de 13 nm. El apartado c), muestra el patrón de difracción de electrones de área selecta, en el cual se aprecian los anillos característicos del oro nanométrico, en los cuales se indexan las familias de planos correspondientes a la estructura cristalina cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés).

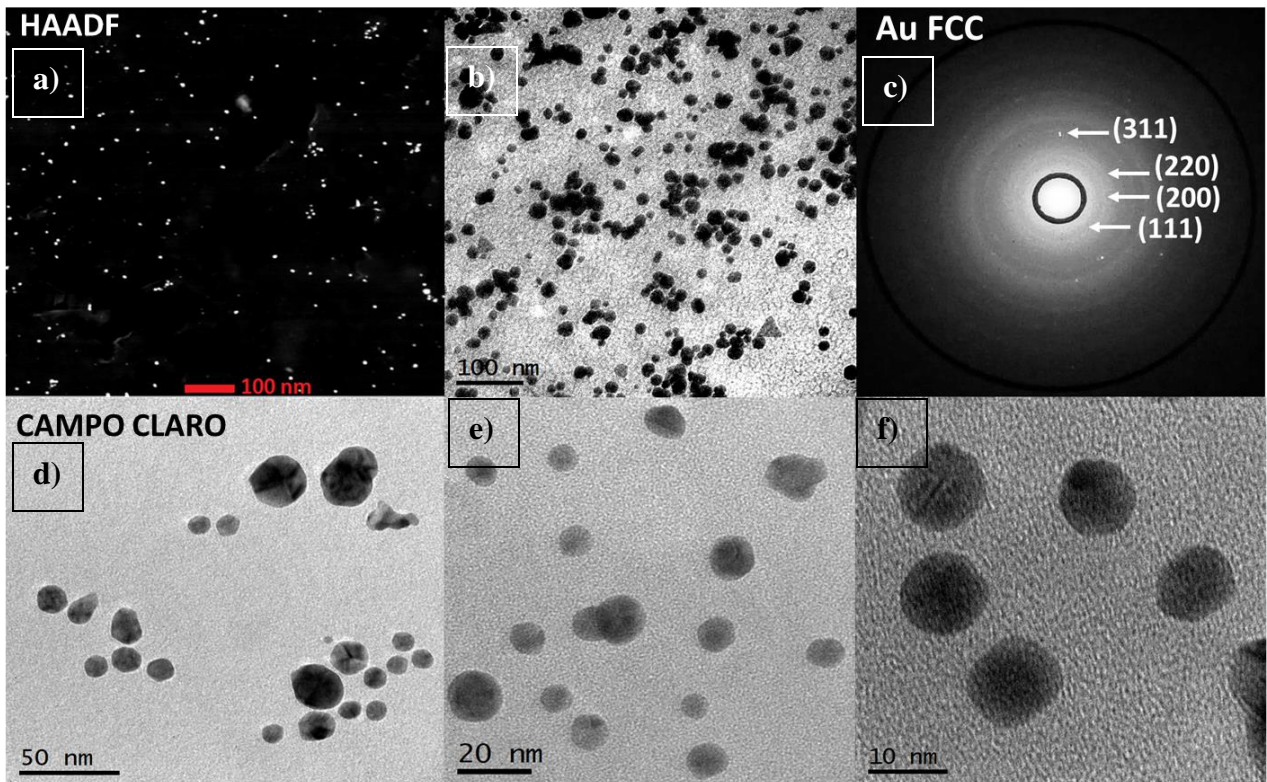


Figura 4. 10 Micrografías electrónicas de trasmisión, a) HAADF, b,d-f) campo claro y c) patrón de difracción de electrones.

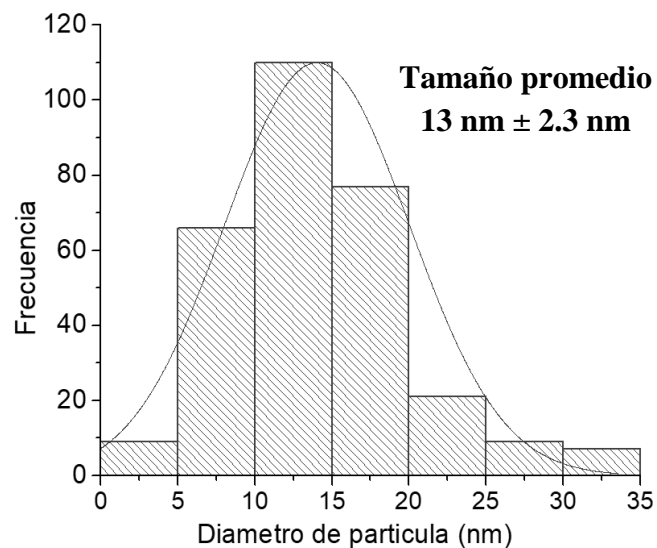


Figura 4. 11 Histograma de tamaño de las AuNPs.

La figura 4.12 muestra en el apartado a), la micrografía de una nanopartícula utilizando la técnica de microscopía de alta resolución cuya forma tiende a ser esférica, con la cual se aprecia la estructura interna de las nanopartículas denotada por planos creciendo en una sola dirección

(indicado mediante las líneas en el apartado b), ahora bien, mediante la transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés) se obtienen las distancias interplanares entre las líneas de difracción interiores (apartado c), para las cuales obtenemos 2.32\AA correspondiente a la familia de planos $[1\ 1\ 1]$ de la estructura cúbica centrada en las caras del oro metálico mencionada con anterioridad.

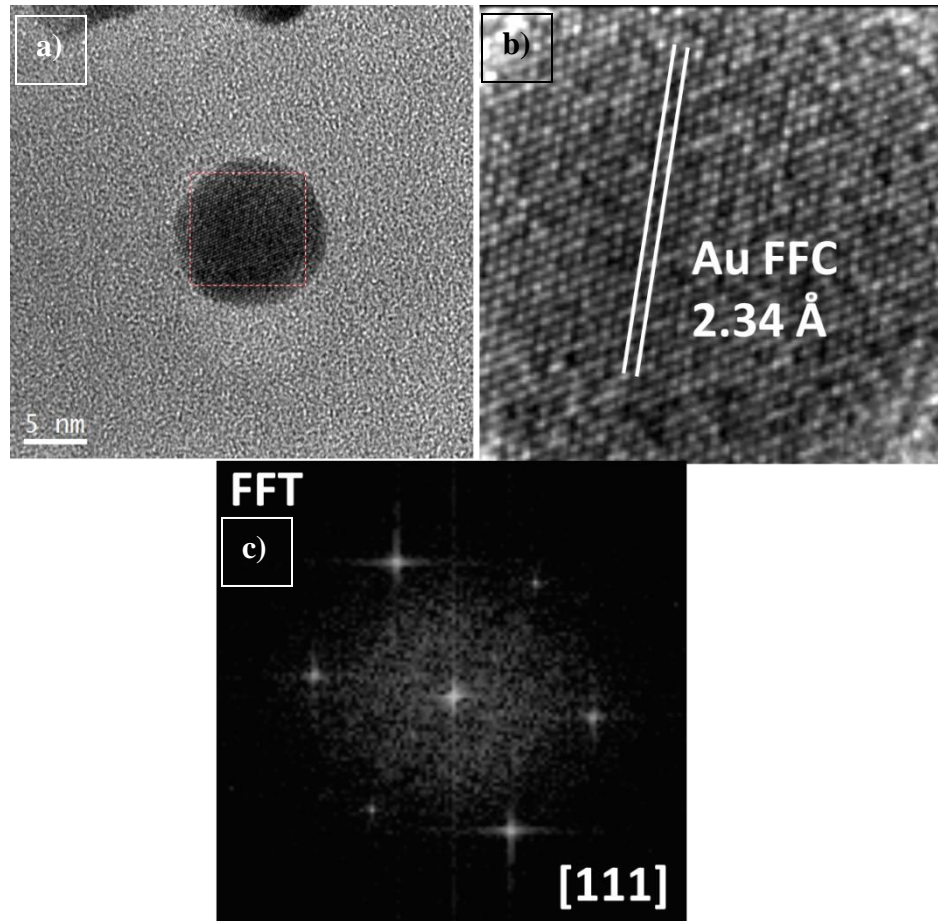


Figura 4. 12 Micrografía electrónica de trasmisión, a) AuNP, b) alta resolución denotando las distancias interplanares del Au y c) transformada rápida de Fourier.

Los resultados obtenidos mediante MET respecto a nanopartículas de oro utilizando *Taraxacum officinale* como agente reductor y estabilizador, resulta ser mejor que el generado por Rajan y Col. [42] ya que ellos encuentran una amplia distribución de formas y en el caso del presente estudio se sintetizaron en su mayoría esféricas, de igual manera ellos presentan su patrón de difracción de área selecta demostrando la naturaleza cristalina del nanomaterial.

Otro ejemplo comparativo del análisis de nanopartículas mediante MET a diferentes ampliaciones, utilizando el método por síntesis verde de nanopartículas de oro, es de Mona y Col. [51] en donde reportan un reconocimiento inicial de la morfología y el tamaño del nanomaterial sintetizado a partir del extracto de *Pistacia Atlántica* (10 ml, a una concentración de 0.03 g/ml) con solución de ácido tetracloroáurico (100 ml, a una concentración de 1 mM) a temperatura ambiente con relación volumétrica 1:30 respectivamente, lo cual indicó una distribución homogénea de las mismas en un rango de diámetro entre los 40 a 50 nm con forma poco simétrica tendiendo a semiesférica. Cabe destacar que indican nanopartículas de oro más grandes debido a la coalescencia de algunas más pequeñas.

Por lo que se demuestra que el uso del extracto de *Taraxacum officinale* resulta ser más efectivo al necesitar menor cantidad de extracto y obteniendo nanopartículas de tamaños menores (12 nm) con forma esférica.

4.2.1.6 Difracción de RX.

Para la realización de esta técnica es necesario contar con muestras secas, para lo cual se colocaron el extracto de *Taraxacum officinale*, cisplatino y las nanopartículas de oro en vidrios de reloj, para posteriormente introducirse en una estufa a 60°C por alrededor de 72 h, la recolección del polvo de las nanopartículas debe realizarse rápidamente porque son susceptibles a tomar humedad del ambiente.

La figura 4.13 muestra en el apartado a) el patrón de difracción de rayos X de la planta *Taraxacum officinale* en la cual se indexan los picos correspondientes a los compuestos SiO₂, KCl y NaCl con números de tarjeta (JCPDS, por sus siglas en inglés) 99-100-07-91, 99-100-32-23 y 99-100-72-35 respectivamente, provenientes del suelo donde se cultiva la planta y las condiciones ambientales, por otra parte en el apartado b), se aprecia el patrón de difracción característico del cisplatino (Dicloro Diamino Platino, JCPDS #00-025-06-10) a manera de control del fármaco, el cual se podría funcionalizar con los nanomateriales, cabe destacar que éste mismo se disuelve en un medio al 9% en vol. de NaCl como vehículo excipiente, de ahí la razón de la aparición de los picos en su difractograma.

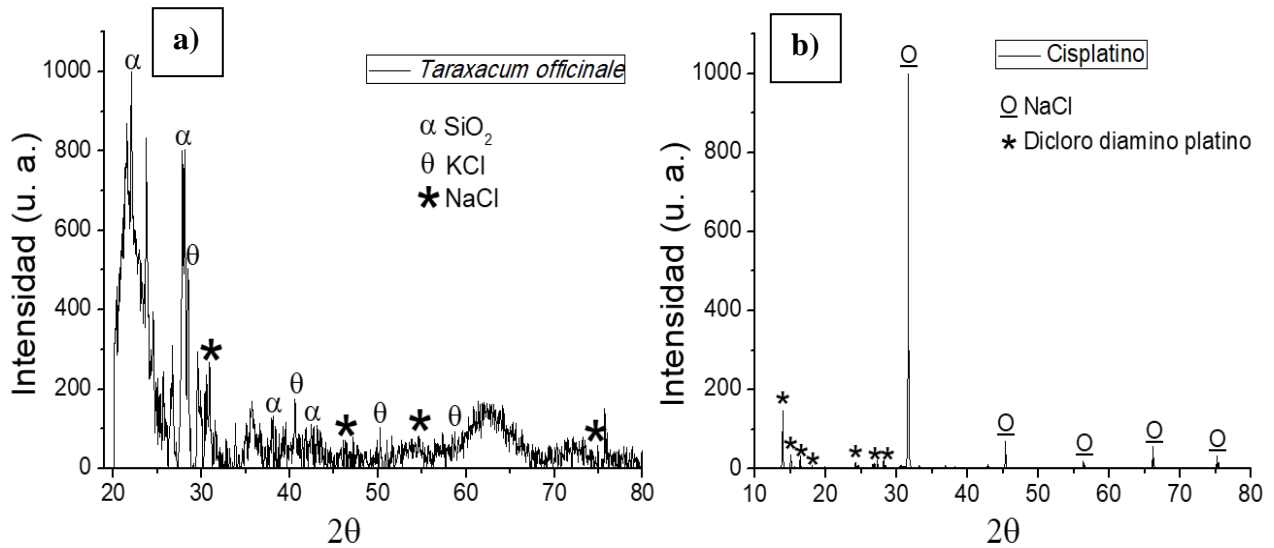


Figura 4. 13 Difractograma de RX, a) extracto de T. officinale y b) cisplatino.

En la figura 4.14 se aprecian 4 picos de difracción a 37, 44.5, 64.8°, los cuales se atribuyen a los planos (1 1 1), (2 0 0) y (2 2 0) respectivamente de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de los cristales de oro (JCPDS #03-065-28-70). Por lo que se afirma la presencia de oro sólido.

A partir del semiancho del pico principal y la altura media se calculó mediante la ecuación de Debye-Scherrer el tamaño promedio de cristal siendo éste de 12 nm, cabe destacar que el valor obtenido a partir del histograma mediante análisis de imágenes y esta ecuación, difieren ya que para el histograma se midieron 300 nanopartículas generando una mejor uniformidad de los datos; por otra parte, se aprecia que se encuentran picos no señalados, los cuales pertenecen al material orgánico que se encuentran en la superficie de las nanopartículas o de impurezas que acompañan a la planta. Se distingue también sal remanente de KCl (JCPDS #99-100-31-99) proveniente del extracto, por lo cual, para la aplicación de las nanopartículas en las líneas celulares, se realizaron 4 lavados, más exhaustivos, siendo estos de 12000 rpm efectuados durante 10 min, retirando el sobrenadante y adicionando nuevamente agua desionizada, mediante el cual, no solo se eliminó el NaCl remanente sino también el KCl.

Por otra parte, el patrón de DRX presentado por Deepika y Col. [53] en sus resultados obtenidos mediante extracto del fruto dragón (agente reductor y estabilizador) y ácido tetracloroáurico (agente precursor), mostró picos de difracción característicos de oro, con la estructura cristalina FCC en ángulos 38.3, 44.5, 64.5 y 77.8 ° correspondientes a las reflexiones de los planos (111),

(200), (220) y (311) respectivamente. Ahora bien, a diferencia con el presente estudio, ellos realizaron lavados exhaustivos del fruto y no obtienen sales residuales que interfieran en las aplicaciones biológicas que realizaron en células de cáncer de mama, de ahí, el motivo de realizar mayor número de centrifugaciones y dispersiones para purificar los nanomateriales obtenidos con diferentes extractos, particularmente con *Taraxacum officinale*.

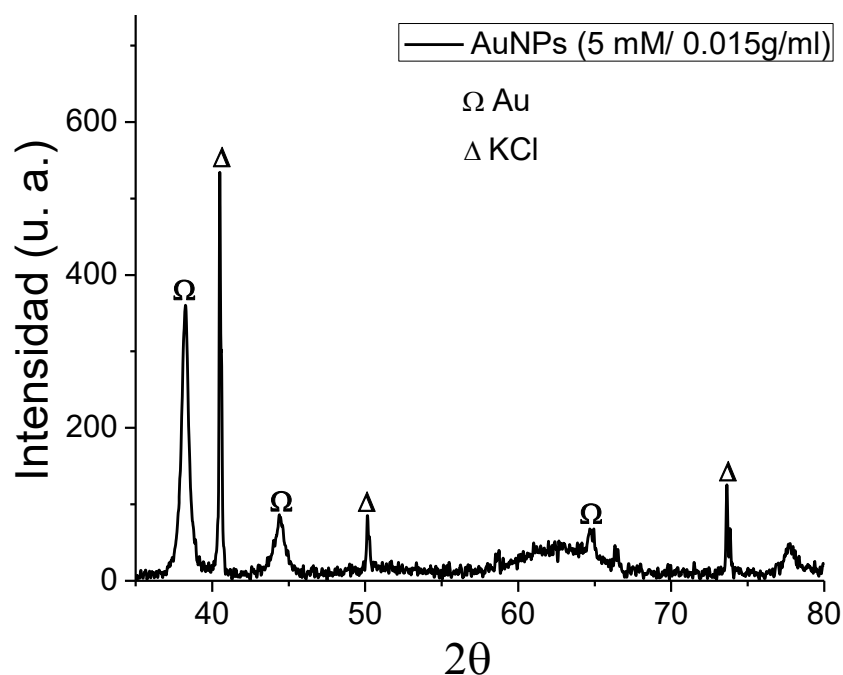


Figura 4. 14 Difractograma de las AuNPs (solución de oro a 5 mM y extracto a 0.015 g/ml).

4.2.1.7 Espectrometría de Fluorescencia.

Esta técnica, es una del tipo de las espectroscopías electromagnéticas, en particular con la cual se puede analizar la fluorescencia de una muestra, utilizando un haz de luz por lo general ultravioleta, que excita los electrones de ciertos materiales y provoca que emitan luz con una energía menor (visible).

Mediante éste análisis es posible detectar, en que parte del cuerpo, o en el caso de la presente investigación, donde interaccionan las AuNPs con las líneas celulares de cáncer de mama, por lo cual, es primordial estudiar la intensidad fluorescente de las mismas, exhibidas en la Figura 4.15. En el apartado a), se ubican intensidades notablemente fuertes, en 378 nm respectiva a la excitación (330 u.a de intensidad) y 520 nm de la emisión (280 u.a. de intensidad) pertenecientes a las AuNPs,

siendo ambas superiores a las de: solución de oro a una concentración de 5 Mm (apartado b), extracto de *T. officinale* (apartado c) y cisplatino (apartado d). Por lo cual, se debe destacar que la nula o mínima aparición de respuestas de fluorescencia demuestra que no contienen agentes fluoroforos que respondan a la excitación incidente proveniente de la lámpara de xenón. Cabe mencionar, que éste resultado favorable en las AuNPs, es útil para la detección del fármaco funcionalizado.

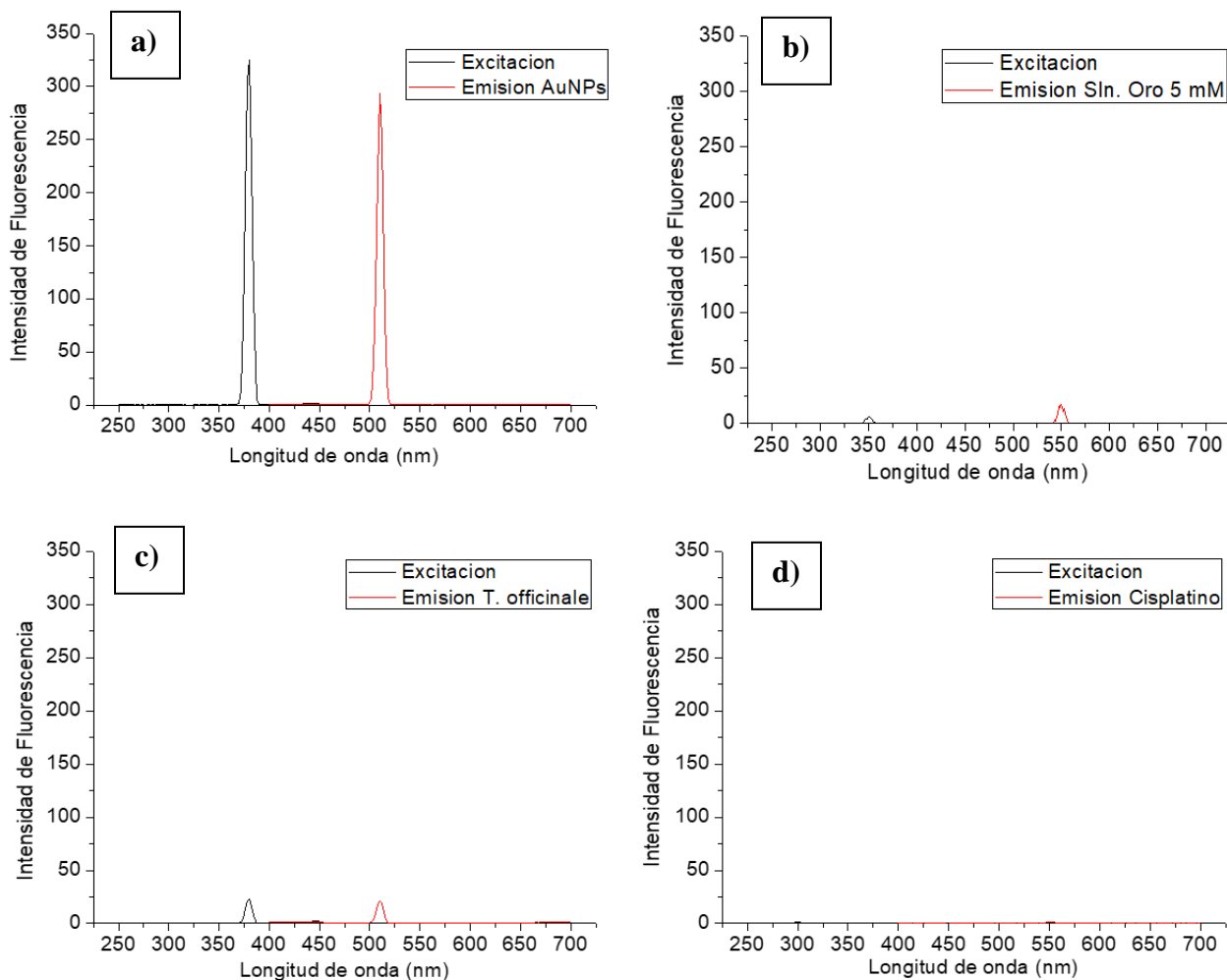


Figura 4. 15 Espectro de Fluorescencia de a) AuNPs, b) Sln de oro a 5 mM, c) extracto de *T. officinale* (0.015g/ml) y d) cisplatino.

Analizando estos resultados con los de Tao y Col. [43] en donde obtienen AuNPs con tamaños inferiores a 2 nm y utilizando una mezcla de: 24 μ L de cloruro de hidroximetil fosfonio (8% en peso), 100 μ L de hidróxido de sodio (1 M) y 400 μ L de ácido Tetracloroáurico (24 mM), que al

sufrir un cambio en la coloración de amarillo a café después de 1 min de reacción, indicó la síntesis del nanomaterial, por lo que adicionaron en ese momento 100 μ L de tiolato como agente de recubrimiento, para posteriormente preservarlas a 4° C. El resultado generado mediante fluorescencia indicó fuertes intensidades (cercasas a 2000 u.a.) en 380 nm para la excitación y 510 nm para emisión, estables hasta los 6 meses posteriores, aunque ellos adicionan agentes potenciadores de la fluorescencia, a modo de que sean mayormente detectables para los análisis de microscopía confocal.

4.2.2 Ensamblés de oro.

4.2.2.1 Espectroscopía de UV-Vis.

En el caso de la síntesis de los ensamblés, el cambio de color fue el mismo presentado anteriormente, el cual va del café oscuro del extracto, que al ser mezclado con la solución de oro amarilla genera como resultado una tonalidad violeta de la mezcla (solución de oro a 5 mM y 0.02 g/ml de extracto, en una relación volumétrica 1:4 respectivamente), por lo cual se procedió a analizar la muestra en espectroscopía de UV-Vis, la Figura 4.16 presenta el resultado de ésta síntesis a temperatura ambiente y sin agitación en el apartado a), donde se logra apreciar una banda entre los 500 y 600 nm característica del oro, que al paso del tiempo (9 meses posteriores) muestra una doble distribución del pico máximo de plasmón superficial, en los 544 nm y 575 nm aproximadamente, lo cual se debe a una mayor distribución de tamaños y formas. Cabe mencionar, que los ensamblés se preservaron bajo las condiciones de temperatura de 4 °C y 1 atm, evitando la luz solar, ya que ésta produce la aceleración de la reacción y genera estructuras triangulares [30], la muestra posterior a éste periodo de tiempo presentó una tonalidad violeta oscura [54].

Un novedoso trabajo reportado por Li y Col [45] indica la síntesis de nanoensamblés de oro a partir de semillas de bacitracina (0.5 mM), a las cuales se le agrega ácido tetracloroaurico (5 mM) como solución precursora y NaBH₄ como agente reductor (10 mM), siendo éste un método de síntesis química convencional, con el cual obtienen una solución que va del color amarillo al gris oscuro, obteniendo un solo pico máximo de plasmón superficial en 585 nm, muy similar al segundo pico de plasmón obtenido en el presente trabajo por medio de síntesis verde.

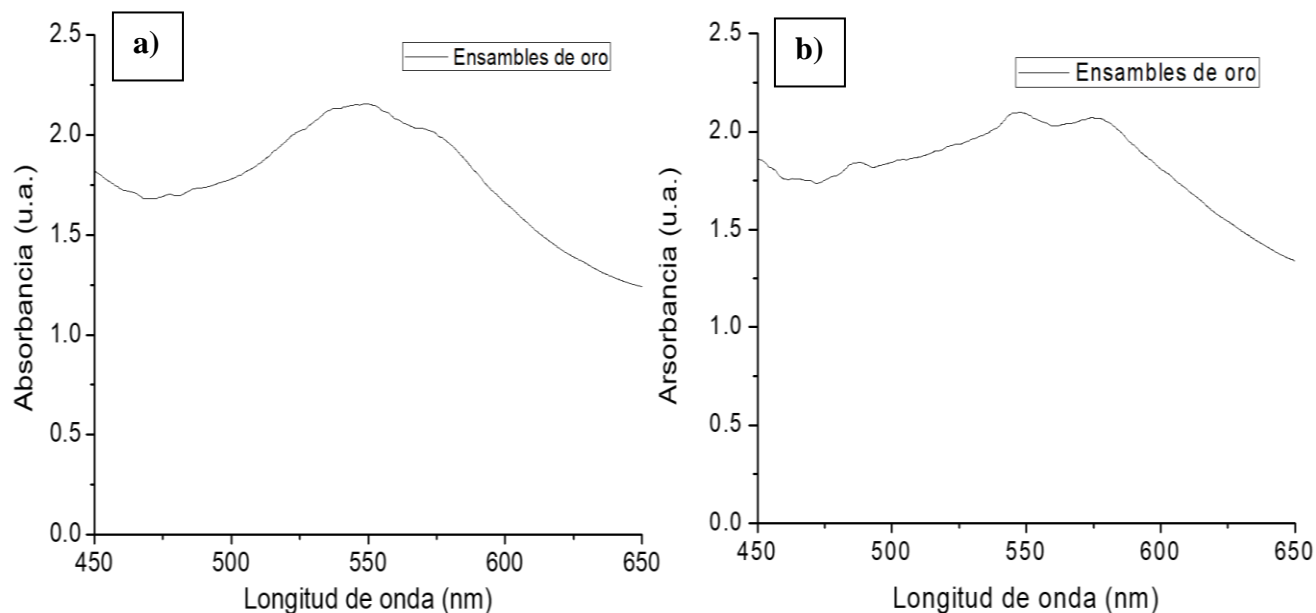


Figura 4. 16 Espectro de UV-Vis de a) ensambles de oro a 1 hr de reacción y b) ensambles a 9 meses de reacción.

4.2.2.2 Espectroscopía IR.

De igual manera, en los ensambles es necesario conocer los compuestos involucrados en el proceso de síntesis, por lo cual, un análisis realizado mediante espectroscopía de IR es importante para detectar, los grupos funcionales comparados con el extracto por la acción de estos mismos en la síntesis y estabilización. La Figura 4.17 presenta el espectro de los ensambles de oro, donde se nota la aparición de una banda por vibraciones de estiramiento del enlace respectivo a O-H el cual se desplaza a un mayor número de onda respecto al extracto pero menor que el de las nanopartículas, siendo este de 3425 cm^{-1} , en la segunda región se aprecian los grupos metileno correspondientes a la tensión débil en 2971 cm^{-1} , con un desplazamiento mayor que el extracto y las nanopartículas, en seguida se aprecia el pico correspondiente a los compuestos aromáticos con un numero de onda en 1633 cm^{-1} , el cual se observa disminuido y desplazado ligeramente hacia una mayor longitud con respecto al extracto puro, que al estar cercano a los 1600 cm^{-1} confirma la existencia de algún anillo bencénico. El enlace N-O con la banda de 1366 cm^{-1} , corresponde aun a los grupos nitro observándose un adelgazamiento de esta banda, en comparación del espectro del extracto (55%) y

de las nanopartículas (85%), de hecho ésta banda se encuentra en una transmitancia cercana al 86%, mientras que en la banda ubicada en 1123 cm^{-1} encontramos la aparición de enlaces C-O correspondientes a los grupos carboxilo, la cual se recorrió hacia longitudes menores. Por último tenemos la presencia de los grupos halogenados, los cuales presentan un enlace C-Cl con número de onda de 632 cm^{-1} que se desplaza también a menores longitudes, en general se logra observar que todos los compuestos disminuyen en % de transmitancia y varían en número de onda, en comparación al extracto, debido a que se encuentran involucrados en la síntesis de los ensambles de oro.

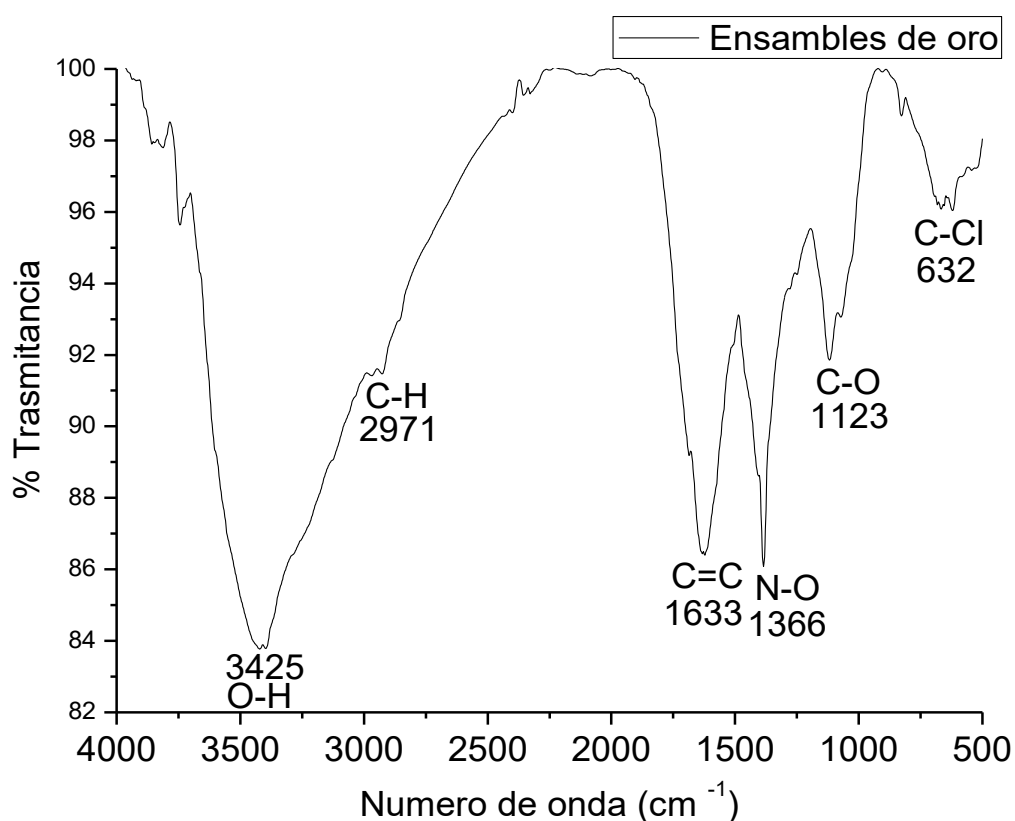


Figura 4. 17 Espectro de IR de los ensambles de oro (sln. De oro a 5 mM y extracto a 0.02 g/ml).

4.2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido.

Corroborado mediante las técnicas de caracterización anteriores, los resultados obtenidos para los ensambles de oro resultan ser afirmativos y por consiguiente, se procedió a realizar el análisis de las muestras por medio de Microscopía electrónica de barrido.

La Figura 4.18 presenta las micrografías de barrido, donde en el apartado a) se observa una diversidad de formas y tamaños, por ejemplo, ensambles florales cercanos a 200 nm y nanopartículas esféricas menores a 50 nm. En las micrografías de los apartados b-d) se observa que, los ensambles se encuentran libres, es decir, nulamente agregados en el extracto, pero en grupos cercanos, de 10 a 15 unidades, demostrando que la planta contiene las sustancias orgánicas adecuadas para reducir y dar forma a éste tipo de nanomaterial, se aprecian también Nps que tienen un tamaño en general menor a los 30 nm, de aquí la razón, que en espectroscopía de UV-Vis se presente una doble banda de absorción que ahora se puede atribuir a la distribución de dos formas.

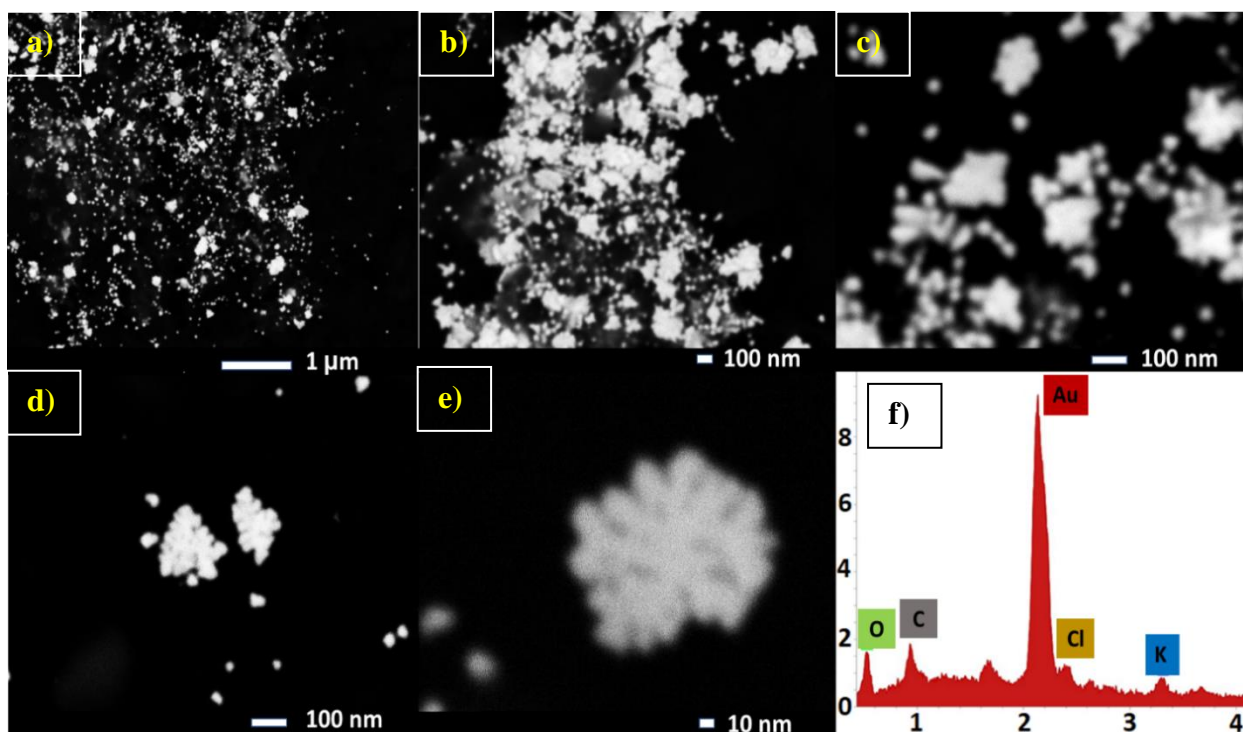


Figura 4. 18 Micrografías electrónicas de barrido de los ensambles a diferentes ampliaciones a-e) y análisis químico elemental (EDS).

En el apartado e), se distingue que el ensamble floral está conjuntado por arreglos nanométricos, generando una estructura de arreglos 2D con un tamaño aproximado a 150 nm de ancho y con forma aparentemente esférica, conformada a base de ramas tipo dendríticas, cabe destacar, que es necesaria, una técnica de mayor amplificación como lo es Microscopía electrónica de transmisión para distinguir exactamente más detalles sobre los ensambles. Por último en el apartado f) de la misma figura, se presenta el análisis químico elemental (EDS, por sus siglas en inglés) de la muestra, observando que la señal de mayor intensidad corresponde a oro, los demás picos corresponden a carbono y oxígeno provenientes de los residuos del extracto y finalmente se aprecian los elementos Cl y K, los cuales provienen del extracto remanente de *Taraxacum officinale*.

Ahora bien, debido a la presencia de Cl y K, es necesario descartar si éstos elementos están conformando los ensambles sintetizados, por lo cual mediante el mapeo químico elemental realizado mediante el microscopio de barrido, mostrado en la Figura 4.19 donde se confirma que estos elementos solo se encuentran disueltos en el medio pero no son parte de la estructura nanométrica menor a 200 nm.

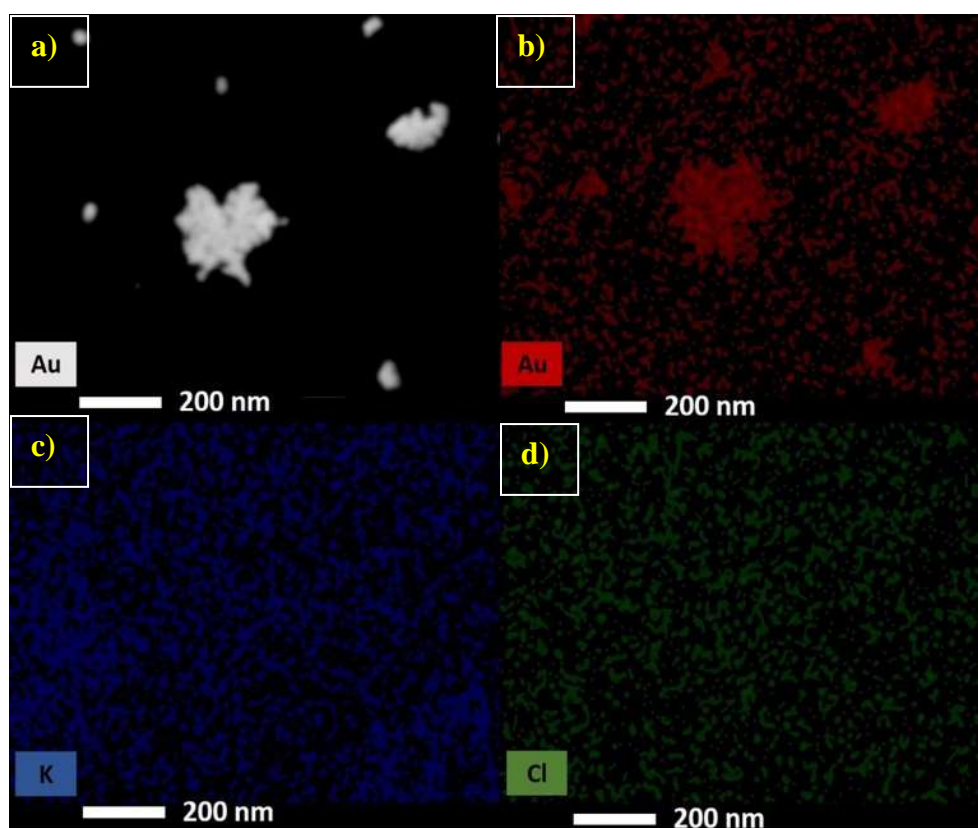


Figura 4. 19 Mapeo químico elemental de a) ensambles, b) Au, c) K y d) Cl.

4.2.2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión.

En la Figura 4.20 podemos observar en los apartados a-b) micrografías (cota de 200 nm) de Contraste Z (HAADF, por sus siglas en inglés), ilustrando el mapeo de composición del oro metálico el cual aparece de mayor intensidad dado su mayor número atómico, aunque se distinguen algunas estructuras de mayor contraste, lo cual indica mayor espesor de unas y otras, se aprecia también, en esta misma micrografía, una gran distribución de ensambles que no están agregados entre ellos, pero que tienden a formar grupos de 15 a 20 unidades, confirmando lo observado mediante MEB.

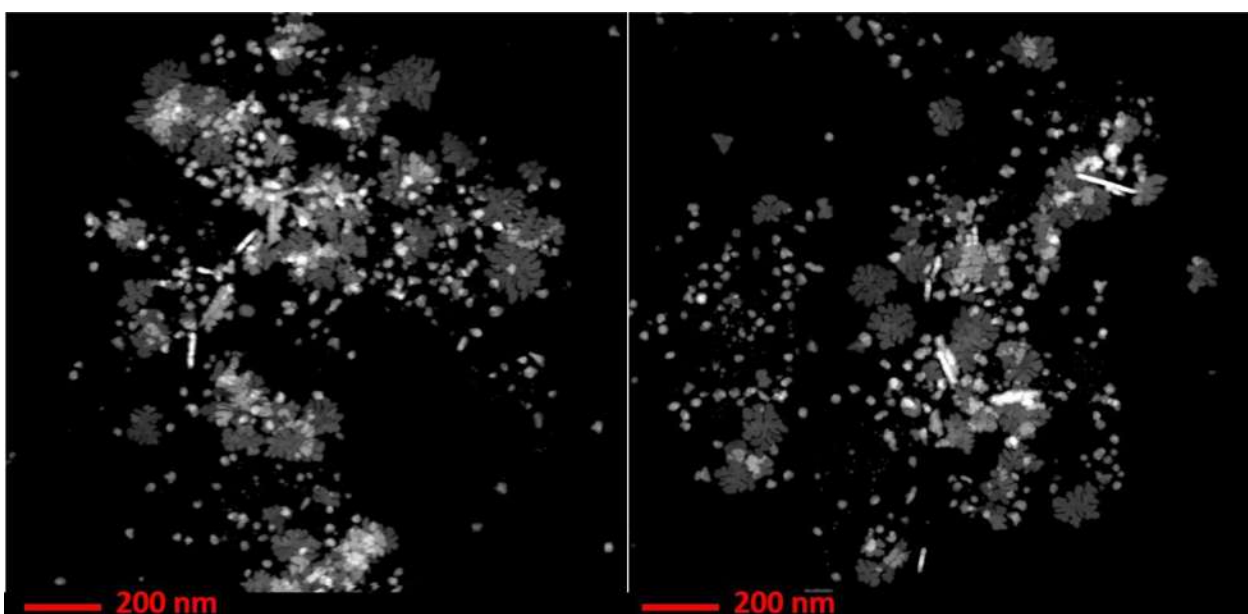


Figura 4. 20 Micrografías de contraste Z mostrando los ensambles de oro.

Por otra parte, la Figura 4.21 en los apartados a-b), muestra imágenes de HAADF (con una cota de 50 nm), donde notablemente se distingue que los ensambles cuentan con un tamaño inferior a 150 nm, en donde se pueden determinar formas de flores planas, al igual que nanopartículas cuasiesféricas de tamaño aproximado a 30 nm.

Mediante la técnica de campo claro en el mismo MET, se aprecia de la Figura 4.22 a-b, (con cota de 100 nm) los ensambles florales de oro con tamaños entre 150-200 nm y nanopartículas cuasiesféricas, demostrando que son arreglos planos, los cuales se encuentran unos sobre otros, generando una tonalidad más oscura debida al mayor espesor, cabe destacar, que de manera general las imágenes obtenidas informan una diversidad de formas tanto de nanopartículas esféricas

menores a 10 nm, nanopartículas cuasiesféricas truncadas de aproximadamente 40 nm y ensambles de oro, por lo cual, se realizó un método de separación procurando contar solamente con los ensambles de oro en las líneas celulares.

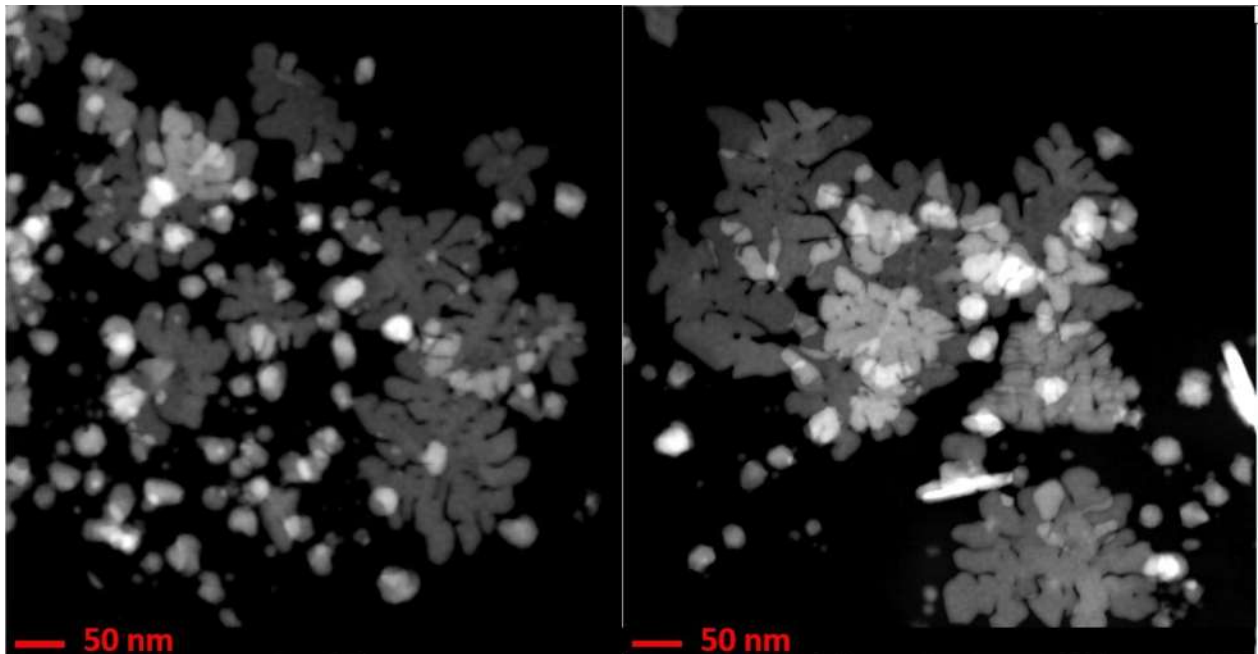


Figura 4. 21 Micrografías de contraste Z para los ensambles de oro.

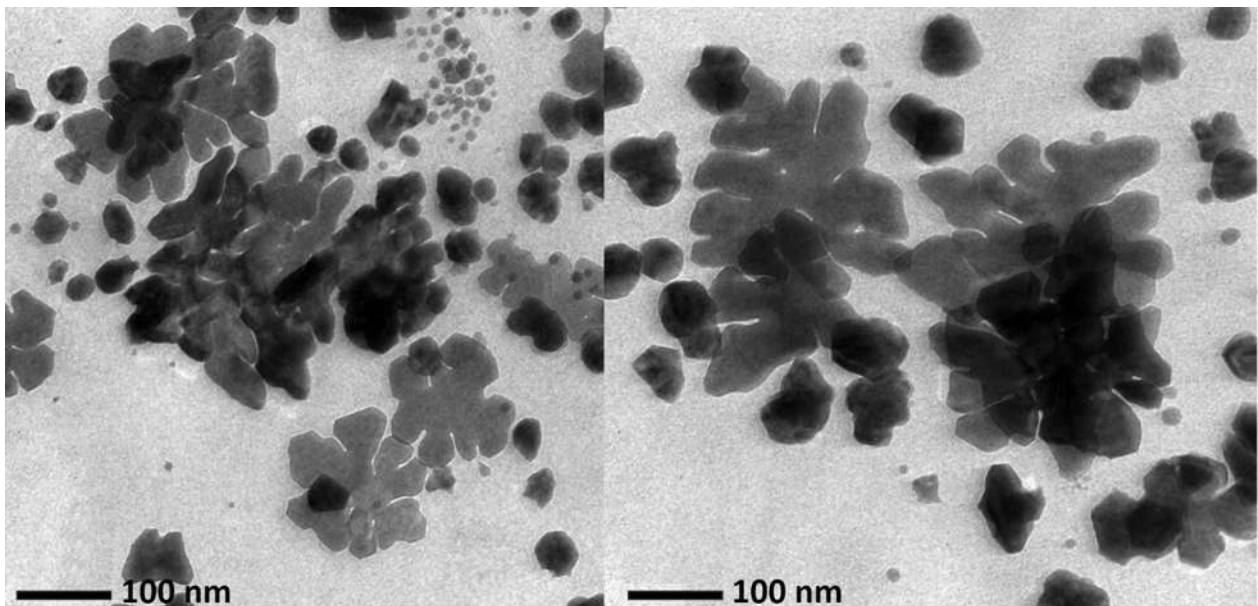


Figura 4. 22 Micrografías electrónicas de trasmisión (campo claro) de los ensambles de oro.

Para observar de manera más precisa los ensambles de oro, se realizó un análisis de micrografías a una mayor amplificación (con una cota de 50 nm) (Figura 4.23), los apartados a-f) muestran las

morfologías de flor más dispersas con las puntas facetadas, en donde cada punta de acuerdo a la medición directa de imágenes, tiene aproximadamente un tamaño de 35 nm y el perímetro total del ensamble es de aproximadamente 745 nm, no contando con el área superficial no expuesta.

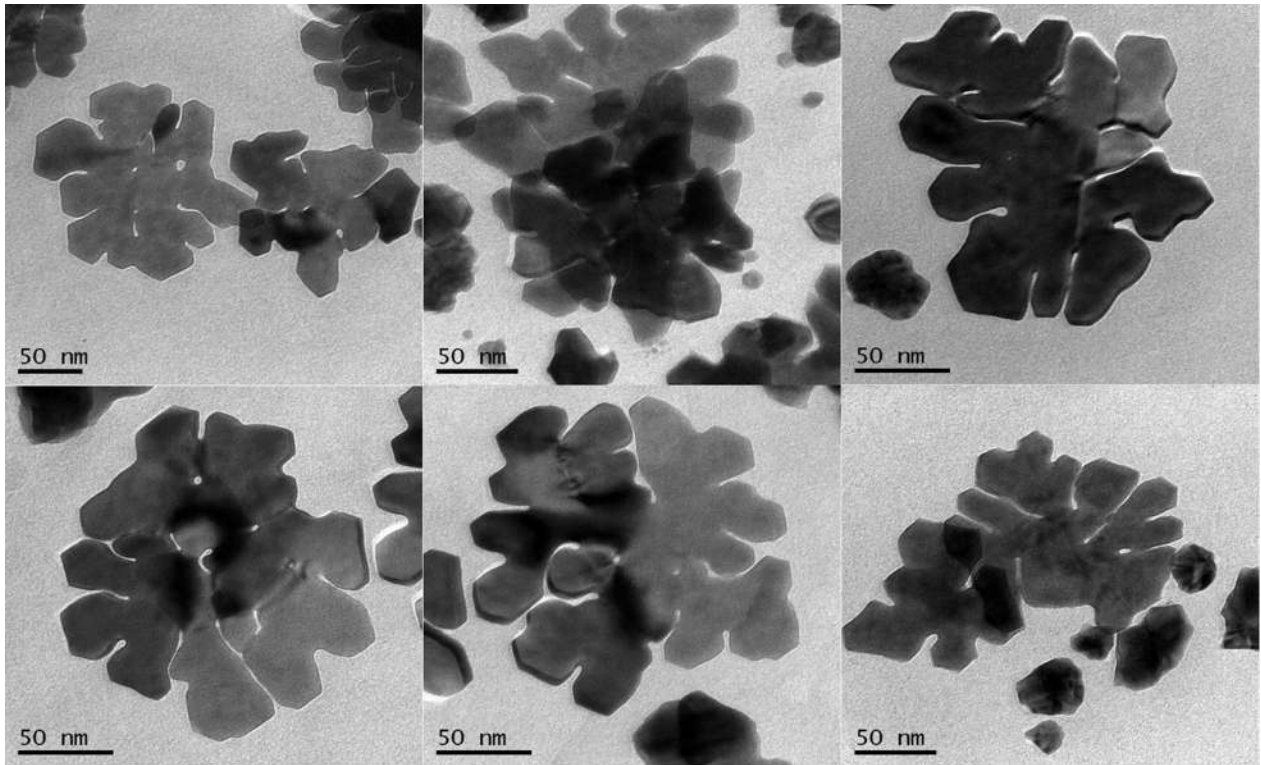


Figura 4. 23 Micrografías electrónicas de trasmisión (campo claro) de los ensambles de oro individuales (cota 50 nm).

Por otra parte en la Figura 4.24 en los apartados a-d), se muestran imágenes de HAADF (con una cota de 50 nm), donde notablemente se aprecia que los ensambles individuales, son de tamaño inferior a 150 nm, reafirmando lo observado mediante MEB, donde se pueden distinguir flores planas de una sola composición, aunque algunas con mayor brillantez por sus diferencias de espesor. Es importante destacar, que el crecimiento de cada una de éstas flores conlleva a una forma específica distinta en morfología, conservando la uniformidad en su tamaño.

Se cuenta hasta ahora con un mecanismo de crecimiento expresado en 4 pasos; inicialmente se forman nanopartículas de 10 nanómetros, que en una segunda etapa se unen en grupos de 3 unidades para conformar una morfología triangular con un tamaño de 35 nm; posteriormente, un tercer paso consiste en formar arreglos triparticulados que coalescen por sus esquinas, para formar

grupos de 5 a 6 unidades que nuevamente coalescen formando los complejos de mayor tamaño, es decir, la generación de los llamados ensamblados que alcanzan un tamaño de 150 nm (Figura 4.25).

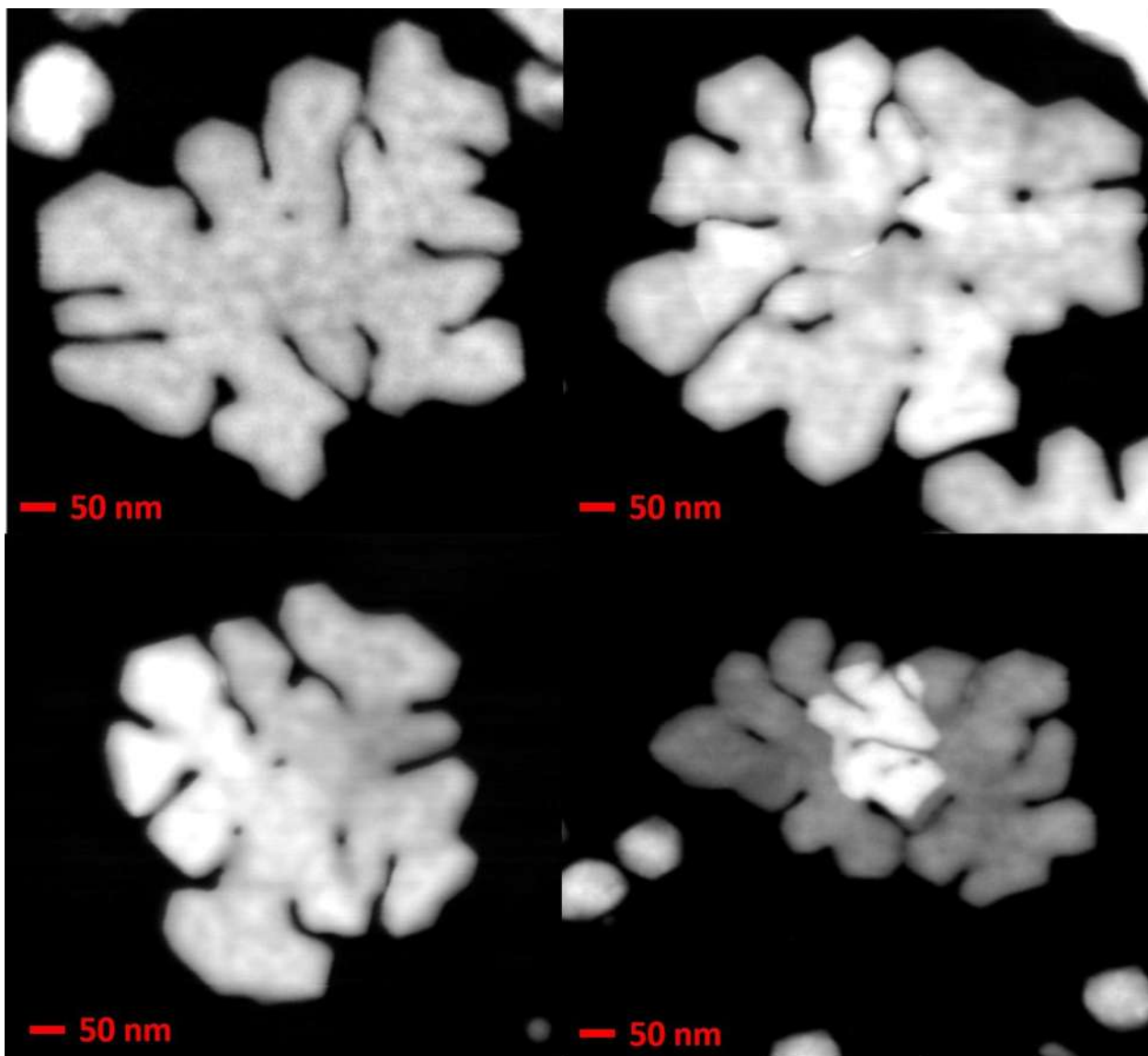


Figura 4. 24 Micrografías de contraste Z para los ensamblados de oro individuales (cota 50 nm).

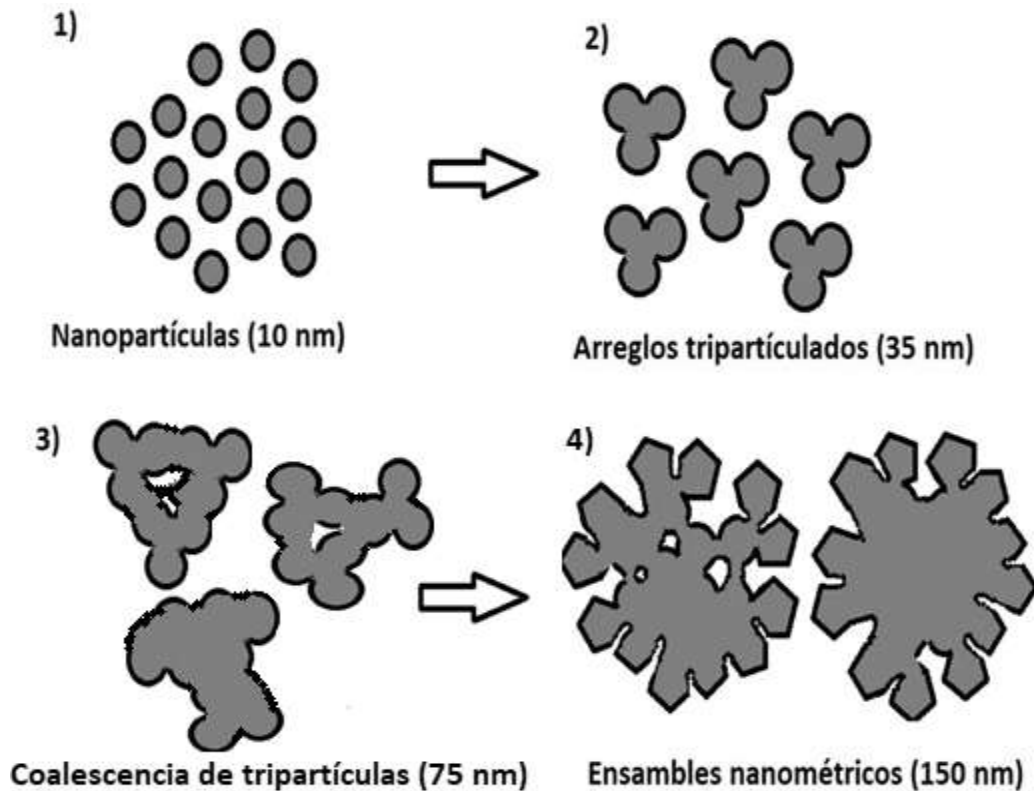


Figura 4. 25 Mecanismo de crecimiento para los ensambles propuesto en 4 pasos.

Mediante todas las imágenes registradas mediante MET, se realizó una medición de tamaño de los ensambles, para elaborar un histograma, obteniendo un tamaño promedio en el rango de los 130 a 190 nm (Figura 4.26), aunque se aprecia de manera visual en esa figura una mayor frecuencia de las mismas entre los 140 y 160 nm, una vez que se midieron y se graficaron los datos, se afirma que el tamaño promedio es de 158 nm.

Finalmente, durante el análisis de MET se obtuvieron imágenes la alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés) derivadas de una de las ramas del ensamble floral, presentada en la Figura 4.27 a), dentro de ella, se muestra la tendencia de las partículas hacia una forma triangular facetada, causado por un fenómeno llamado crecimiento anisotrópico, lo que se atribuye a los modificadores de forma presentes en el extracto que actúan sobre las nanopartículas y que finalmente dan la constitución al ensamble.

Dentro de la misma figura, se incluye en el apartado b) la transformada rápida de Fourier demostrando la naturaleza cristalina del ensamble, en el inciso c) se presenta el patrón de difracción de electrones de área selecta, en donde se indexan los planos característicos de oro representados

por anillos, los cuales corresponden a (111), (200), (220) y (311) de la estructura FCC de oro, por último se tiene en el inciso d), la estructura interna de los mismos, denotada por la resolución lineal cuya distancia interplanar es de 2.34 Å perteneciendo de igual forma a la red FCC del oro.

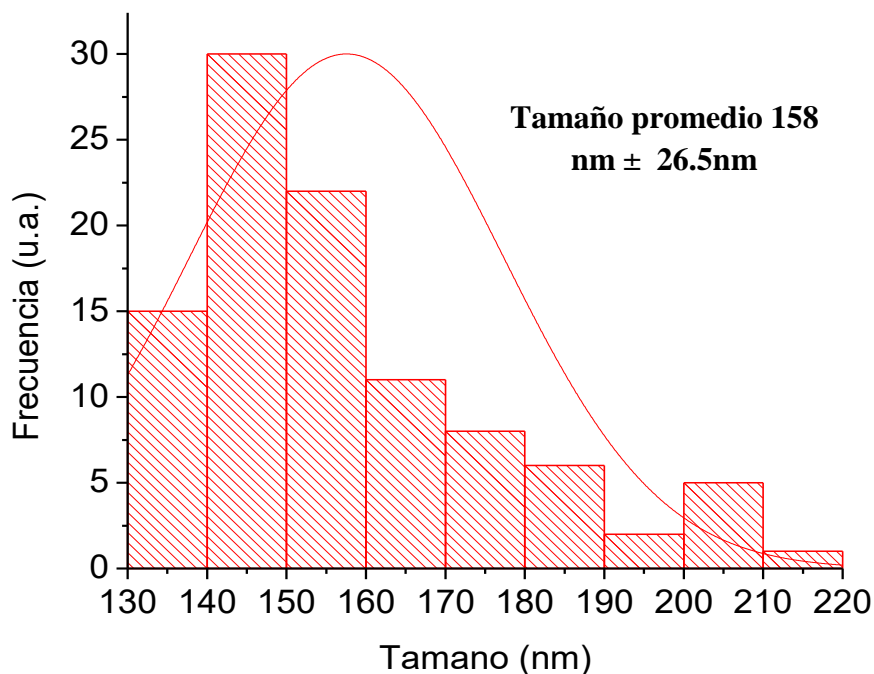


Figura 4. 26 Histograma de tamaño de ensambles de oro obtenido mediante análisis de imágenes.

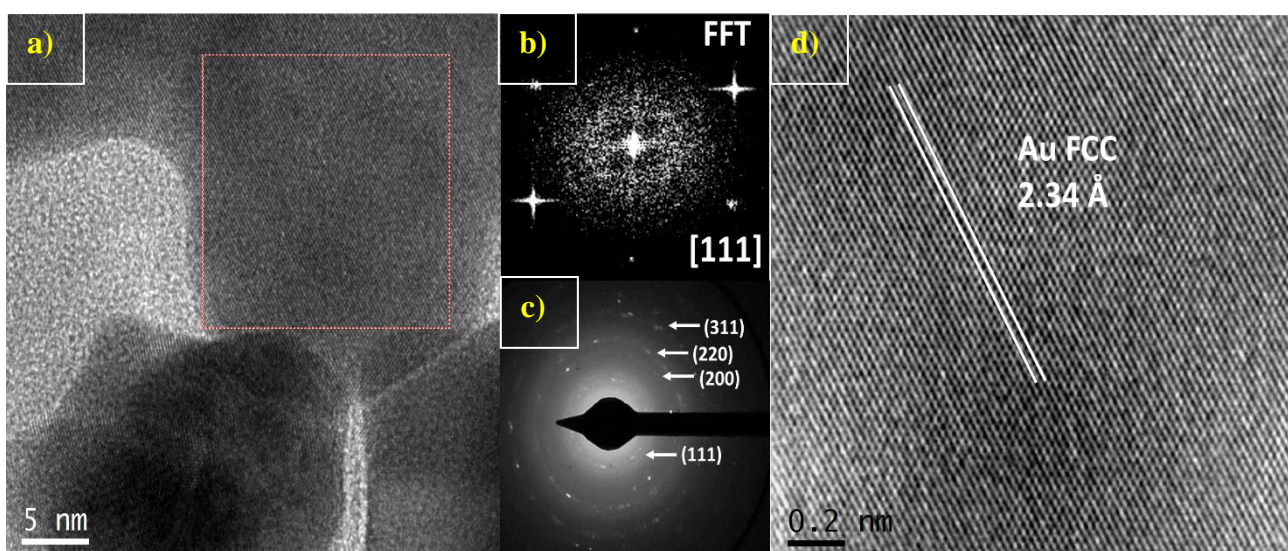


Figura 4. 27 Micrografía de alta resolución de una rama floral apartado a), trasformada rápida de Fourier apartado b), patrón de difracción de electrones apartado c) y estructura interna del ensamble de oro en apartado d).

Comparando estos resultados con aquellos presentados por Yin y Col. [55] ellos sintetizaron nanoflores de oro a partir de ácido tetracloroáurico (2.5 mM), borohidruro de sodio (10 mM) y acetato vapreotido ácido (pH 2, 0.25 mM) a 70°C por 24 h con un cambio de color de amarillo a violeta, con lo cual obtienen ensambles que al ser observados mediante MET exhiben una estructura similar a una flor con un núcleo denso y un borde anisotrópico. Esos ensambles presentan un tamaño promedio de 238.1 nm, lo cual resulta un tamaño superior al sintetizado en el presente trabajo empleando síntesis verde, demostrando la gran efectividad de los compuestos orgánicos presentes en el extracto de la planta de *T. officinale*, para sintetizar ensambles de oro.

4.2.2.5 Difracción de RX.

En la figura 4.28 se aprecian 4 picos de difracción ubicados en: 37, 44.5, 64.8 y 77.6 °, los cuales se atribuyen a los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (311) respectivamente, pertenecientes a la estructura cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés) del oro (JCPDS #03-065-28-70). Por lo que éste difractograma afirma la presencia de oro sólido que aunado a las técnicas anteriores, se presenta en forma nanométrica. A partir del semiancho del pico principal a la altura media y por medio de la ecuación de Debye-Scherrer, se calculó el tamaño promedio de cristal del ensamble siendo este de 163 nm. Cabe destacar que el valor obtenido a partir del histograma (Figura 4.26) resultante del análisis de imágenes (158 nm), difiere poco con los actuales resultados.

Por otra parte en el difractograma, se aprecian picos que son señalados referentes al material orgánico en la superficie del ensamble, los cuales no se lograron indexar, ya que pertenecen a una infinidad de compuestos o de impurezas que acompañan a la planta; se distingue también KCl (JCPDS #99-100-31-99) remanente que proviene del extracto por lo cual, para la aplicación de las nanopartículas en las líneas celulares, se realizó un lavado más exhaustivo de la planta con agua desionizada, ya que con el método de centrifugación se fracturan los ensambles.

Es evidente que si se compara el presente trabajo con el de Li y Col. [45] donde obtienen ensambles por medio de síntesis química convencional, ellos obtienen nanoensambles de oro sin impurezas pero las morfologías que obtienen son relativamente similares a las del presente trabajo, debido a eso presentan en su patrón de difracción intensidades en 38.18, 44.39, 64.58, 77.55 y 81.72° con picos de relativamente agudos e intensos, indexándose en los planos (111), (200), (220), (311) y

(222) del cristal cúbico centrado en las caras (FCC) de Au y analizando el espesor medio de la pared mediante la fórmula de Debye-Scherrer obtienen 19.331 ± 0.137 nm.

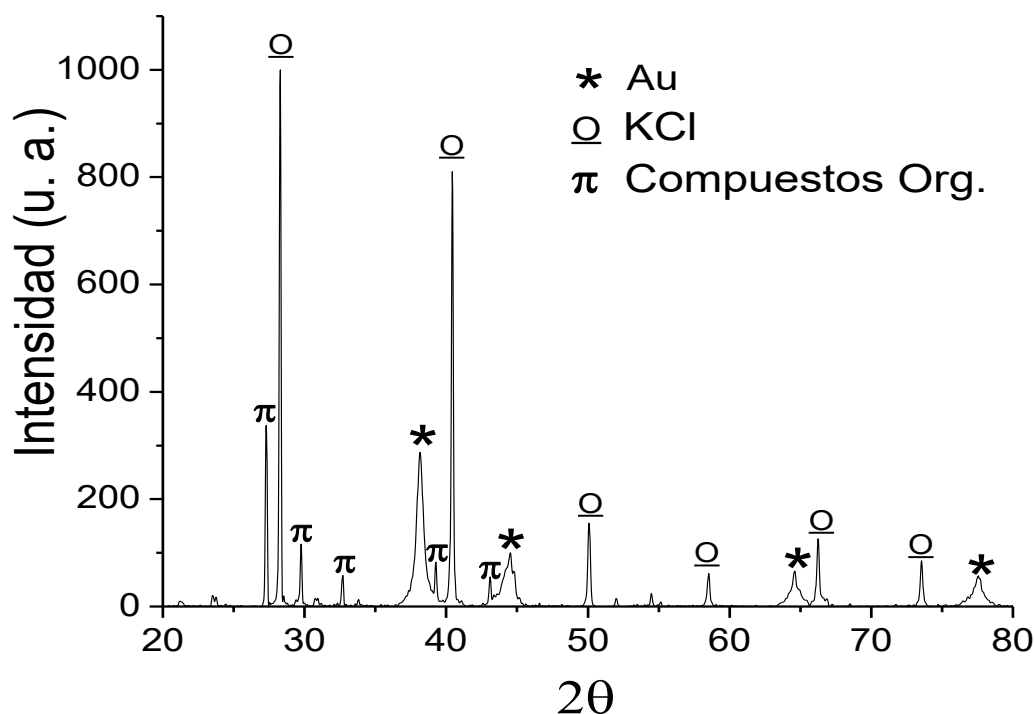


Figura 4. 28 Difractograma de RX de los ensambles de oro FCC.

4.2.2.6 Espectroscopía de Fluorescencia.

Como se mencionó anteriormente en el apartado 4.2.1.6, a partir éste análisis es posible detectar los nanomateriales de oro debido a su fluorescencia y eso ayuda a conocer su interacción con las líneas celulares de cáncer de mama. La Figura 4.29 muestra las intensidades de los ensambles en forma de flor en los 350 nm para excitación (158 u.a de intensidad) y 550 nm de emisión (240 u.a. de intensidad), las cuales comparadas con las intensidades de fluorescencia obtenidas a partir de las nanopartículas sintetizadas en el presente resultan ser menores, lo cual se debe a que en ese caso la intensidad se genera por cada una de las nanopartículas menores a los 30 nm y al aumentar su tamaño como es el caso de los ensambles, decrece su intensidad de fluorescencia por la disminución del área superficial. Sin embargo, éste resultado sigue siendo positivo para su detección mediante Microscopía Confocal ya que se encuentra dentro del rango permisible, para futuros trabajos con cáncer de mama.

Analizando éste resultado con el obtenido por Yin y Col. [55], en donde sintetizan nanoensambles de oro con forma de flores mediante química convencional, donde el vaporeotido actúa como núcleo de crecimiento para el oro, ahora bien, en dicho trabajo realizan pruebas del efecto fototérmico generado por los nanomateriales acompañados de células Hela, que fueron excitados por 10 minutos mediante un láser con longitud de onda de 808 nm, lo cual se refleja en sus imágenes obtenidas mediante una cámara térmica, una alta intensidad de respuesta a dicha incidencia, provocada como ellos mencionan al núcleo de la estructura que actúa como una antena, mejora el campo electromagnético en las puntas de oro de la estructura floral, aumentando dramáticamente la excitación de los electrones produciendo mejoras muy grandes en el campo eléctrico local, generando mayor intensidad de calor y fluorescencia.

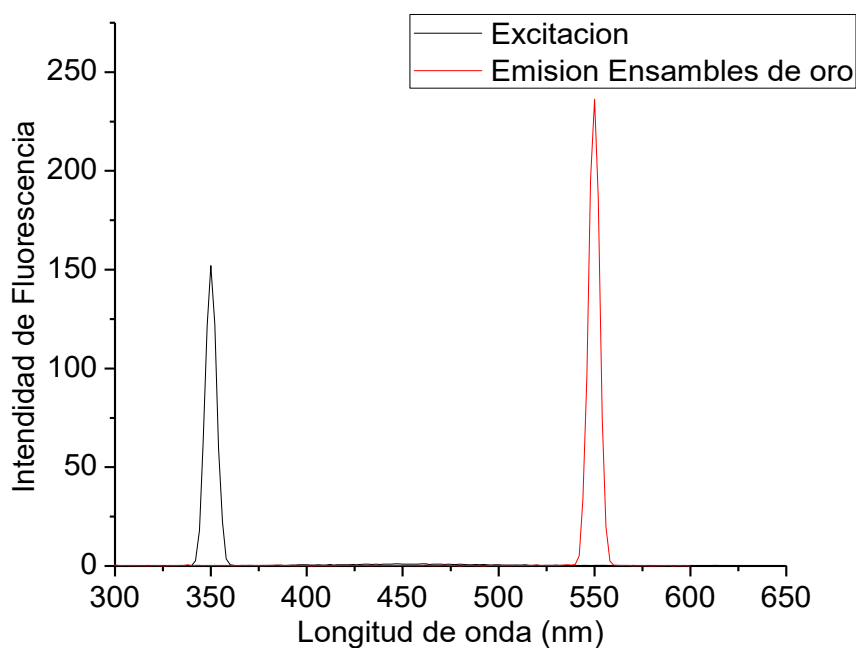


Figura 4. 29 Espectro de Fluorescencia perteneciente a los ensamblajes de oro.

4.3 Cuantificación de los nanomateriales sintetizados.

Uno de los objetivos fundamentales de éste proyecto fue determinar base de la información inicial para determinar el efecto de los nanomateriales sintetizados en líneas celulares de cáncer de mama, por esta razón, es importante conocer un aproximado de la concentración de éstos mismos.

4.3.1 Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) y determinación de pH.

La determinación de la concentración se realizó por medio de EAA de acuerdo a la cantidad de iones de Au que no reaccionaron en el proceso de reducción, así la diferencia con respecto a los iones totales será correspondiente a los iones que formaron nanopartículas de oro. La concentración de iones de Au se calculó de acuerdo a la curva ajustada a las soluciones estándar (Figura 4.30). Primeramente, se realizó el lavado por medio de centrifugación de las muestras que contenían las AuNPs monitoreando mediante espectroscopía de UV-Vis, la desaparición del pico del plasmón superficial de la solución sobrenadante y por otra parte, los ensambles de oro se analizaron directamente para evitar la fragmentación de los mismos en el proceso de centrifugación. Una vez que se obtuvo el residuo, se analizó la absorbancia de las soluciones por medio de EAA y mediante la curva patrón presentada anteriormente, se le asignó un valor en concentración, lo mismo se realizó para la solución de HAuCl₄ a una concentración de 5 mM, el empleo de éste valor se debe a que los mejores resultados para la síntesis de nanomateriales, contenidos en el presente trabajo, parten de ésta concentración, cabe mencionar que para la obtención de la concentración de los nanomateriales se realizó una dilución con un factor de 50, es decir, 0.2 ml de muestra en 10 ml de agua desionizada, con lo cual se evita la interferencia de matriz por diferencias en la densidad de las muestras y también permite que los valores de ppm pertenecientes a las AuNPs, ensambles y solución de oro entren dentro del rango de 5 a 15 ppm de los estándares.

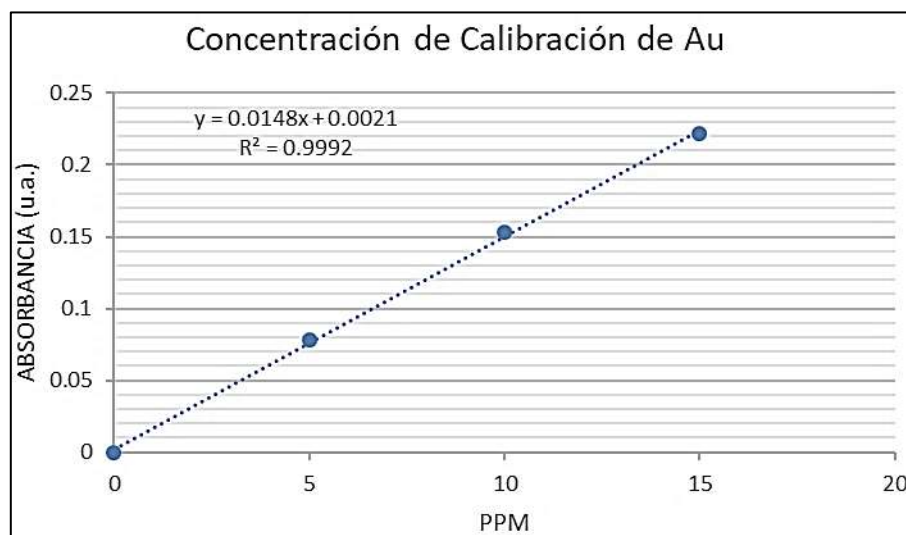


Figura 4. 30 Recta de calibración de los estándares de oro a 5, 10 y 15 PPM.

En la Tabla 4.4 se muestran los valores resultantes en ppm del análisis mencionado con anterioridad, así como la eficiencia del proceso de formación de nanomateriales (Tabla 4.5). Es importante mencionar, que con este ensayo se obtuvieron resultados aproximados, debido a que se supone que todos los iones de Au reaccionaron a nanomateriales y no hubo pérdidas durante los lavados por centrifugación.

Tabla 4. 4 Datos de PPM y absorbancias obtenidos mediante EAA.

CALIBRACIÓN		
	PPM	ABSORBANCIA (u.a.)
CONTROL 1	0	0
CONTROL 2	5	0.078
CONTROL 3	10	0.153
CONTROL 4	15	0.222
NANO Au	26	0.4
ENSAMBLE	111	1.8
SOLUCIÓN 5 mM	1007.5	14.15

Tabla 4. 5 Eficiencia del proceso de formación de nanomateriales.

MUESTRA	ppm (Au+)	Δ ppm (Au+)	EFICIENCIA (%)
SOLUCIÓN Au 5mM	1007.5		
NANOPARTÍCULAS	26	981.5	97.419
ENSAMBLES	111	896.5	88.982

Como se aprecia el proceso demostró tener una efectividad del 97.4% para las nanopartículas y 88.9% correspondiente a los ensambles de oro, de esa manera se indica que no hay gran pérdida de iones de Au remanentes de la síntesis verde aplicada al material, es decir, el extracto de la planta de *T. officinale* resulta muy efectivo para la síntesis de éste nanomaterial, por otro lado, aunque sean pocos iones los que no reaccionaron, se utilizó la solución de oro como control en las pruebas de viabilidad en las 3 líneas celulares. Ahora bien, solamente de manera corroborativa respecto a la solución de oro, se realizó la conversión de las ppm obtenidas mediante EAA a partir la ecuación 4.1, demostrando que efectivamente dicha solución tiene la concentración utilizada (5 mM).

$$\text{Ec. 4.1} \quad \text{Molaridad} = \frac{\text{ppm}}{\text{PM} \times 10^3} = \frac{1007.5}{196.96 \times 10^3} = 0.00511 \text{ M} = 5.11 \text{ Mm}$$

Adicionalmente se determinó el pH del extracto, cisplatino, solución de oro y nanomateriales, con lo cual se espera que ningún residuo de los materiales precursores de síntesis y el fármaco, afecte a las líneas celulares, debido a que éstas mismas se incuban en un pH de 6.7 aproximadamente y al crecer generan un ambiente ácido cercano a 3 y de acuerdo a los resultados obtenidos de éstas mediciones se aprecia que entran dentro del rango que podría no dañar las células permitiendo su viabilidad por lo menos al 95%, sin embargo una de las propuestas para futuro es igualar el pH de todos los precursores, nanomateriales y fármaco y evaluar los efectos con y sin modificación del pH.

Tabla 4. 6 Resultados de la medición de pH.

pH	
Extracto	5.63
Cisplatino	3.66
Solución de oro	2.15
Nanopartículas	7.1
Ensamblés	6.8

Debido a los resultados obtenidos alrededor de éste capítulo, se determina que se cumplió satisfactoriamente con la hipótesis planteada al inicio de éste proyecto de investigación, obteniendo nanoestructuras a partir de las sustancias orgánicas de la planta de *Taraxacum officinale*, siendo estos los carbohidratos y polifenoles, los cuales fueron los encargados de la reducción del oro en forma iónica y estabilización de los núcleos para formar así los ensamblés y nanopartículas de oro. Cabe mencionar que totalmente se cumplieron los objetivos tanto el general como los específicos y que las metas científicas originalmente planteadas fueron superadas al 100 %, con lo que se define que, en general se cumplió satisfactoriamente con lo propuesto para el presente proyecto.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En la presente investigación se lograron sintetizar nanopartículas de oro con un tamaño aproximado de 13 nm a partir de una concentración de solución precursora de oro a 5 mM y 0.015 g/ml de extracto en una relación volumétrica 1:2 respectivamente y ensambles de oro con un tamaño promedio en 158 nm provenientes de la mezcla de la solución de oro a 5 mM y 0.02 g/ml de extracto en una relación de volumen 1:4 respectivamente y analizados a los 9 meses posteriores de la síntesis, utilizando en ambos casos como el extracto de la planta *Taraxacum officinale* agente reductor y estabilizador a temperatura ambiente, sin agitación, evitando la incidencia de luz solar. Mediante el análisis proximal, espectroscopía de Infrarrojo y la identificación de metabolitos del extracto de la misma planta, se detectó que la mayoría de los compuestos involucrados en el proceso de reducción y estabilización de los nanomateriales son los azúcares reductores, proteínas y compuestos con anillos bencénicos (representado por el resultado de 70% respectivo a fenoles totales).

Es importante destacar que se logró determinar efectivamente la dispersión de los nanomateriales por medio de la espectroscopía Ultravioleta Visible denotando una doble distribución en el espectro respectiva a dos tipos de morfologías diferentes (nanopartículas y ensambles) y mediante Espectroscopía de Fluorescencia se obtuvieron intensidades de los nanomateriales cercanas a 300 u.a., lo cual será útil para la detección de los mismos cuando se apliquen en las líneas celulares de cáncer de mama.

Por otra parte se evaluaron las características estructurales de las nanopartículas, ensambles y extracto de la planta *T. officinale* por medio de Difracción de Rayos X, demostrando que se obtuvo oro nanométrico con estructura cúbica centrada en las caras para nanopartículas y ensambles; destacando que el KCl y NaCl proviene del extracto lo cual se eliminó mediante lavados exhaustivos a 12000 rpm durante cuatro periodos de 10 minutos.

A través de Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Trasmisión se observó que las nanopartículas tienen una morfología esférica y los ensambles presentan formas florales planas, ambos crecimientos promovidos por la preservación de las soluciones a 4°C, evitando también la proliferación de hongos contaminantes.

Mediante espectroscopía de absorción atómica se estimó que la cantidad aproximada de oro reducido fue de 981.5 ppm para las nanopartículas con una eficiencia en la reacción del 97.4% y 896.5 ppm con eficiencia de 88.9% para los ensambles, demostrando la alta capacidad del extracto para reducir oro.

La formación de los ensambles se favoreció debido a la limitante de iones de oro, respecto a la cantidad de agentes de reductores y estabilizantes provenientes del extracto, permitiendo su síntesis a los 9 meses posteriores de la mezcla.

La alta eficiencia al sintetizar nanomateriales con el extracto de *T. officinale* permite la disminución de las variables que afecten a las líneas celulares, por lo cual se espera tener un efecto directo de los nanomateriales y el fármaco sobre las mismas.

Por lo tanto, de manera general se cumple con los objetivos del presente trabajo de producir poca o nula contaminación al medio ambiente por medio de la síntesis verde de nanopartículas y ensambles de oro, esperando así que la aplicación de los mismos en las líneas celulares de cáncer de mama sea efectiva, para disminuir el uso terapéutico de cisplatino (libre) no ligado que dañe de manera drástica todas las células normales de los pacientes y que a su vez sea posible detectar por medio de la fluorescencia el sitio activo de los nanomateriales.

RECOMENDACIONES

Las propuestas que se tienen para futuras investigaciones dentro del mismo campo de investigación son: eliminar por completo el KCl de las muestras orgánicas, prevenir con tiempo el crecimiento de las líneas celulares para poder aplicar los nanomateriales y fármacos, buscar alternativas de separación de los ensambles del residuo orgánico, ya que la centrifugación rompe las ramas del ensamble y caracterizar mediante diversas técnicas complementarias el enlace de fármaco y nanomateriales.

TRABAJO FUTURO

Sintetizar nuevamente los nanomateriales de oro de acuerdo a las condiciones experimentales de la presente tesis, para aplicarlos en las tres líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MCF-12F y MDA-MB-231), realizar análisis de Espectroscopía Raman para corroborar los resultados obtenidos mediante *T. officinale*.

6. Referencias bibliográficas

- [1] BIEL B, GARCÍA-VIDAL F J, RUBIO A, FLORES F. Anderson Localization in Carbon Nanotubes: Defect Density and Temperature Effects. *Physical Review Letters*. 95(26), 266801, 2005.
- [2] SANCHEZ-MENDIETA V, VILCHIS-NESTOR A. 18. En; Green synthesis of noble metal (Au, Ag, Pt) nanoparticles assisted by plant extracts. SU Y-H. 1 ed. Shanghai, China. InTech. 391-407. 2012.
- [3] BINNIG G, QUATE C F, GERBER C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 56(9), 930-933, 1986.
- [4] MANSILLA D S, CELESTE MUSCIA G, UGLIAROLO E A. Una fundamentación para la incorporación de la química verde en los currículos de química orgánica. *Educación química*. 25, 56-59, 2014.
- [5] VEMURI S K, BANALA R R, MUKHERJEE S, UPPULA P, GPV S, A. V G R, T M. Novel biosynthesized gold nanoparticles as anti-cancer agents against breast cancer: Synthesis, biological evaluation, molecular modelling studies. *Materials Science and Engineering: C*. 99, 417-429, 2019.
- [6] VIJAYA KUMAR P, MARY JELASTIN KALA S, PRAKASH K S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Croton Caudatus* Geisel leaf extract and their biological studies. *Materials Letters*. 236, 19-22, 2019.
- [7] SANCHEZ A J. Diente de Leon: *Taraxacum officinalis* [en línea]. Disponible en: <<http://www.medizzine.com/plantas2/taraxacum.php>> [Consultado 07 de Noviembre 2017].
- [8] VIJAYAN R, JOSEPH S, MATHEW B. Anticancer, antimicrobial, antioxidant, and catalytic activities of green-synthesized silver and gold nanoparticles using *Bauhinia purpurea* leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 42(2), 305-319, 2019.
- [9] NAIMI-SHAMEL N, POURALI P, DOLATABADI S. Green synthesis of gold nanoparticles using *Fusarium oxysporum* and antibacterial activity of its tetracycline conjugant. *Journal de Mycologie Médicale*. 2019.
- [10] INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer [en línea]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf> [Consultado 08 de Noviembre 2017].

- [11] CAMACHO J D, DESCHAMPS L A. Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias. 2013.
- [12] MERCK. Ficha de datos de seguridad: Borohidruro de Sodio [en línea]. Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-INTL-Site/en_US/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-806373&DocumentType=MSD&Language=ES&Country=ES> [Consultado 07 de Noviembre 2017].
- [13] PAL G, RAI P, PANDEY A. En; Chapter 1 - Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. SHUKLA A K, IRAVANI S. ed. Elsevier. 1-26. 2019.
- [14] TOVAR D J. Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. Tesis de Licenciatura. Facultad de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. 2013.
- [15] CRUZADO M, PASTOR A, CASTRO N, CEDRÓN J C. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*cynara scolymus* l.). Revista de la Sociedad Química del Perú. 79(1), 57-63, 2013.
- [16] SILVA A M, OLIVEIRA C H A, FERNANDES C C L, COSTA M V O, DA SILVA F F M, GUEDES M I F, RONDINA D. Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore) fruit. African Journal of Food Science. 11(11), 353-361, 2017.
- [17] SUSANTO D F, APARAMARTA H W, WIDJAJA A, GUNAWAN S. Identification of phytochemical compounds in *Calophyllum inophyllum* leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 7(9), 773-781, 2017.
- [18] ALONSO J A. Las versátiles aplicaciones de las nanopartículas de oro [en línea]. Disponible en: <<http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2012/01/30/131723>> [Consultado 07 de octubre 2017].
- [19] CERECEDO H, HERNÁNDEZ E, PADILLA P. Nanociencia y nanotecnología. Divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. 23(2), 1-3, 2009.
- [20] MENDOZA URIBE G, RODRÍGUEZ-LÓPEZ J L. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Perfiles latinoamericanos. 15, 161-186, 2007.
- [21] ANÓNIMO. Nanotecnología, Nanopartículas y toxicidad. Enfermería del trabajo. 5(1), 21-27, 2015.

- [22] BRITTO F,CASTRO G. Nanotecnología, hacia un nuevo portal científico-tecnológico. *Química Viva*. 11(3), 171-183, 2012.
- [23] GUTIERREZ W C. Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto nuclear*. 39(1), 24-29, 2005.
- [24] DÍAZ-DEL CASTILLO R. Introducción a los nanomateriales. *Lecturas de ingeniería* 20. Facultad de estudios superiores de tecnología en materiales, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2012.
- [25] CASTRO N,VERBEL J. Química verde: Un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*. 21(2), 169-182, 2011.
- [26] POKROPIVNY V V,SKOROKHOD V V. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*. 27(5), 990-993, 2007.
- [27] CORNEJO L. Clasificación de los nano materiales [en línea]. Disponible en: <http://nuevastecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/> [Consultado 07 de Noviembre 2017].
- [28] QUINTANA M, HIRSCHBEIN L,PÉREZ E. Nanopartículas: principios y aplicaciones. *Revista Ciencia y Desarrollo*. 34(221), 62-67, 2008.
- [29] WHITESIDES G M,GRZYBOWSKI B. Self-Assembly at All Scales. *Science*. 295(5564), 2418, 2002.
- [30] MADHAVAN V, GANGADHARAN P K, AJAYAN A, CHANDRAN S,RAVEENDRAN P. Microwave-assisted solid-state synthesis of Au nanoparticles, size-selective speciation, and their self-assembly into 2D-superlattice. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 17, 218-222, 2019.
- [31] ZHOU B, HERMANS S,SOMORJAI G. *Nanotechnology in Catalysis*. First ed. New York, USA. Springer US. 2004.
- [32] WANARSKA E,MALISZEWSKA I. The possible mechanism of the formation of silver nanoparticles by *Penicillium cyclopium*. *Bioorganic Chemistry*. 2019.
- [33] WANG Y,XIA Y. *Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals*. ed. 2004.
- [34] HABIBA K, MAKAROV V, WEINER B,MORELL G. *Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis*. En; *Manufacturing Nanostructures*. WAQAR A. First ed. UK. One Central Press. 263-291. 2014.

- [35] YU W, XIE H. A Review on Nanofluids: Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. *Journal of Nanomaterials*. 2012, 17, 2012.
- [36] GUTIERREZ C J. Síntesis de nanoestructuras metálicas de oro y plata a partir de precursores organometálicos: propiedades plasmónicas y catalíticas. Tesis de Doctorado. Departamento de Química Inorgánica, Universidad de la Rioja. Logroño, España. 2014.
- [37] HEIKE V. *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg [en línea]. Disponible en: <<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/taraxacum-officinale/fichas/ficha.htm>> [Consultado 07 de Noviembre 2017].
- [38] RZEDOWSKI G C. Flora del Bajío y de regiones adyacentes: *Taraxacum Officinale*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 113, 1046-1048, 1997.
- [39] WILLIAMS J. Preparation of Gold Nanoparticle-Cisplatin Conjugates and Investigation of their Toxicity in Zebrafish. *Senior Projects Spring*. 24, 7-11, 2014.
- [40] DASARI S, BERNARD TCHOUNWOU P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 740(Supplement C), 364-378, 2014.
- [41] SHARMA G, DAVE R, SANADYA J, SHARMA P, SHARMA K. Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 1(2), 109-126, 2010.
- [42] RAJAN A, RAJAN A R, PHILIP D. *Elettaria cardamomum* seed mediated rapid synthesis of gold nanoparticles and its biological activities. *OpenNano*. 2(Supplement C), 1-8, 2017.
- [43] TAO Y, LI M, AUGUSTE D T. Pattern-based sensing of triple negative breast cancer cells with dual-ligand cofunctionalized gold nanoclusters. *Biomaterials*. 116(Supplement C), 21-33, 2017.
- [44] IRAM S, ZAHERA M, KHAN S, KHAN I, SYED A, ANSARY A A, AMEEN F, SHAIR O H M, KHAN M S. Gold nanoconjugates reinforce the potency of conjugated cisplatin and doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 160(Supplement C), 254-264, 2017.
- [45] LI X, WANG Z, LI Y, BIAN K, YIN T, GAO D. Self-assembly of bacitracin-gold nanoparticles and their toxicity analysis. *Materials Science and Engineering: C*. 82(Supplement C), 310-316, 2018.

- [46] SCROCCARELLO A, DELLA PELLE F, NERI L, PITTIA P, COMPAGNONE D. Silver and gold nanoparticles based colorimetric assays for the determination of sugars and polyphenols in apples. *Food Research International*. 119, 359-368, 2019.
- [47] KUMAR A, KUMAR A A, NAYAK A P, MISHRA P, PANIGRAHY M, SAHOO P K, PANIGRAHI K C S. Carbohydrates and polyphenolics of extracts from genetically altered plant acts as catalysts for in vitro synthesis of silver nanoparticle. *Journal of Biosciences*. 44(1), 6, 2019.
- [48] SARDAR M, MAZUMDER J A. En; *Biomolecules Assisted Synthesis of Metal Nanoparticles*. DASGUPTA N, RANJAN S, LICHTFOUSE E. ed. Cham. Springer International Publishing. 1-23. 2019.
- [49] PANDEY G, KHATOON S, PANDEY M M, RAWAT A K S. Altitudinal variation of berberine, total phenolics and flavonoid content in *Thalictrum foliolosum* and their correlation with antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 9(3), 169-176, 2018.
- [50] ABUBAKER M, NGAH C W Z C W, AHMAD M, KUSWANDI B. En; Chapter 19 - Functionalized gold nanoparticles as optical nanosensors for determination of aluminum (III) ions in water samples. SHUKLA A K, IRAVANI S. ed. Elsevier. 459-484. 2019.
- [51] HAMELIAN M, HEMMATI S, VARMIRA K, VEISI H. Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using *Pistacia Atlantica* extract. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 93, 21-30, 2018.
- [52] HERANCE J R, GARCÍA H, GUTIÉRREZ-CARCEDO P, NAVALÓN S, PINEDA-LUCENA A, PALOMINO-SCHÄTZLEIN M. A translational approach to assess the metabolomic impact of stabilized gold nanoparticles by NMR spectroscopy. *Analyst*. 144(4), 1265-1274, 2019.
- [53] DIVAKARAN D, LAKKAKULA J R, THAKUR M, KUMAWAT M K, SRIVASTAVA R. Dragon fruit extract capped gold nanoparticles: Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells. *Materials Letters*. 236, 498-502, 2019.
- [54] AL-RADADI N, N AL-YOUBI A. One-Step Synthesis of Au Nano-Assemblies and Study of Their Anticancer Activities. ed. 2018.

- [55] YIN T, LI Y, BIAN K, ZHU R, LIU Z, NIU K, LIU H, GAO Z,GAO D. Self-assembly synthesis of vapreotide-gold hybrid nanoflower for photothermal antitumor activity. *Materials Science and Engineering: C*. 93, 716-723, 2018.

7. ANEXOS.

A continuación se adicionarán algunas metodologías descriptivas complementadas con imágenes a manera de explicar la ejecución de algunos experimentos realizados en el presente trabajo.

7.1 Análisis Bromatológicos.

7.1.1. *Determinación de humedad.*



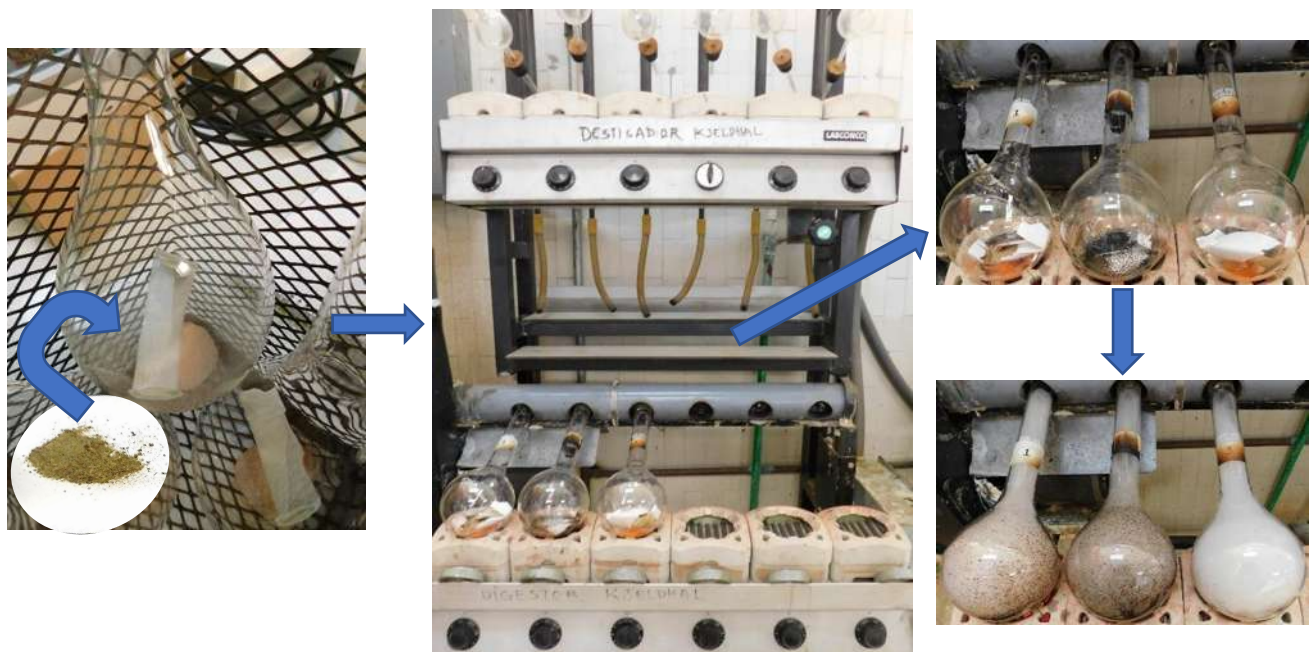
Figura de Anexo 1. Horno de combustión de muestras para la determinación de humedad.

7.1.2. Determinación de materia mineral o ceniza.



Figura de Anexo 2. Horno de calcinación para determinación de ceniza.

7.1.3. Determinación de proteína cruda o nitrógeno total.



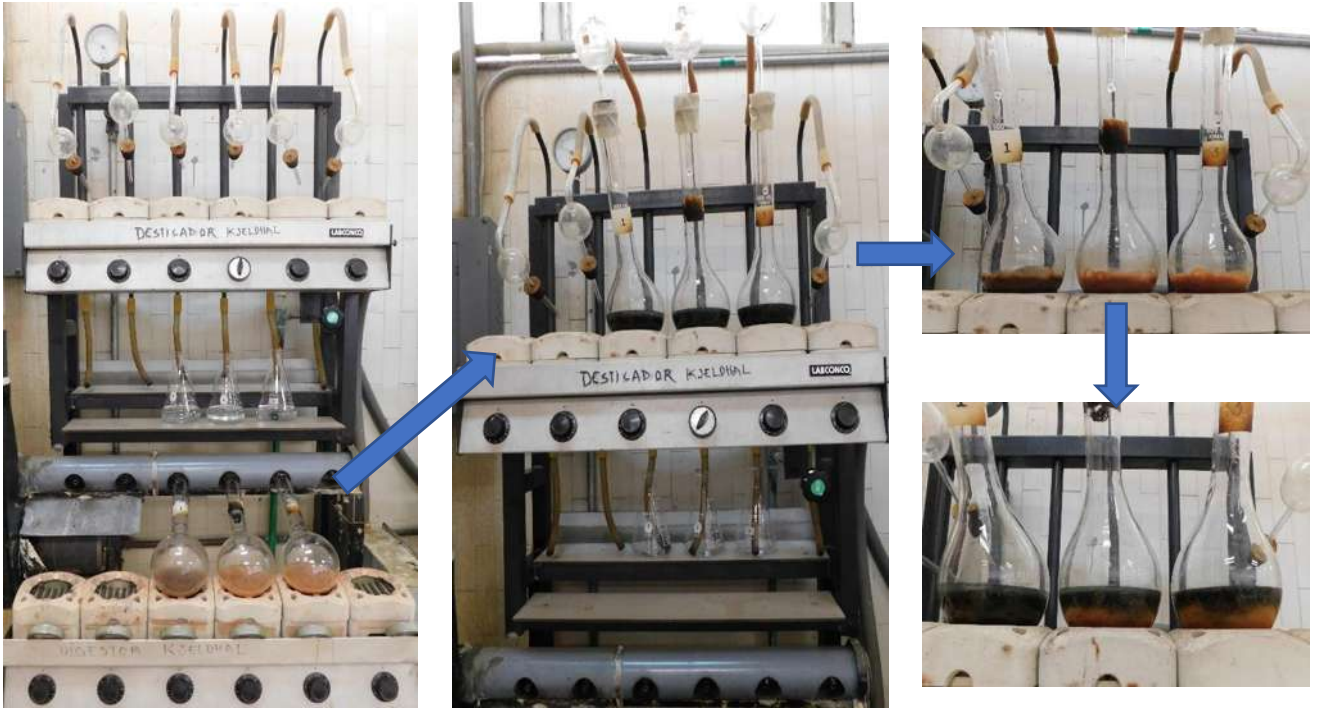


Figura de Anexo 3. Proceso de destilación por método Kjeldahl para determinación de proteínas.

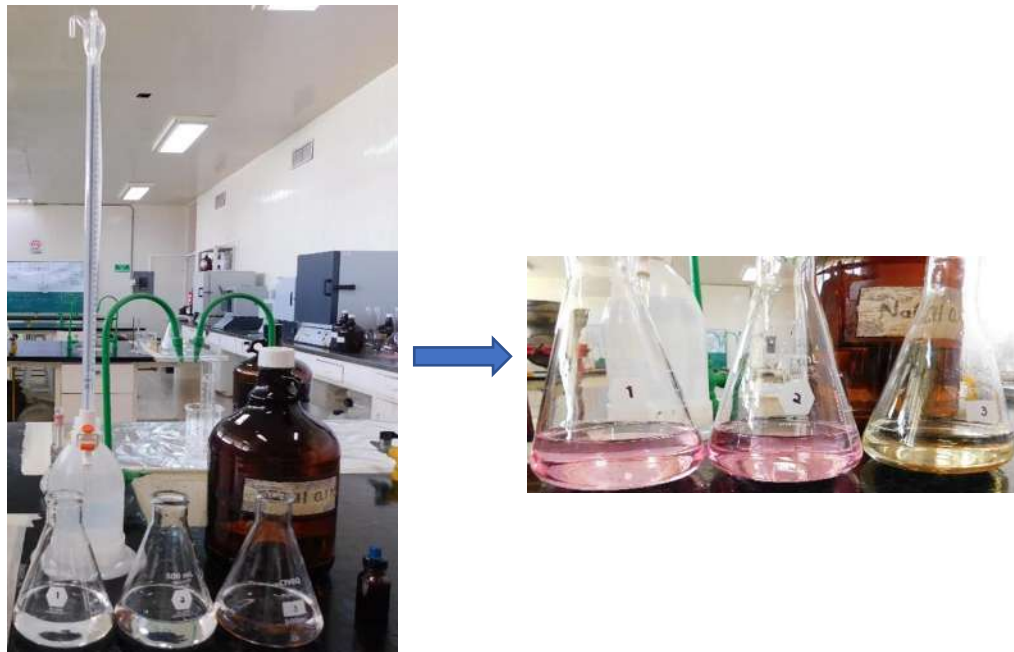


Figura de Anexo 4. Destilación para determinación de porcentaje de nitrógeno libre.

7.1.4. Determinación de extracto etéreo o grasa cruda.

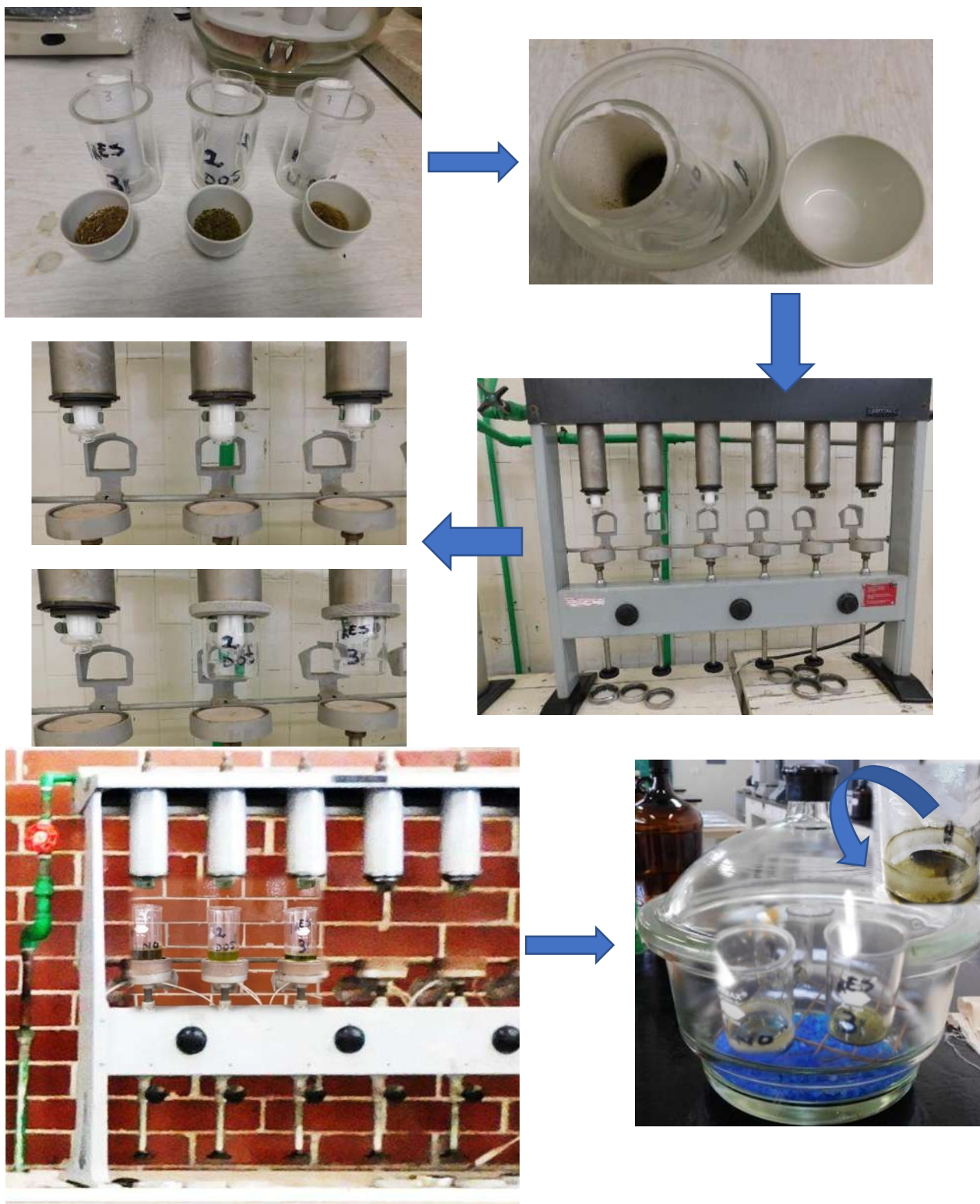


Figura de Anexo 5. Proceso de extracción de grasas de extractos crudos.

7.1.5. Determinación de fibra cruda.

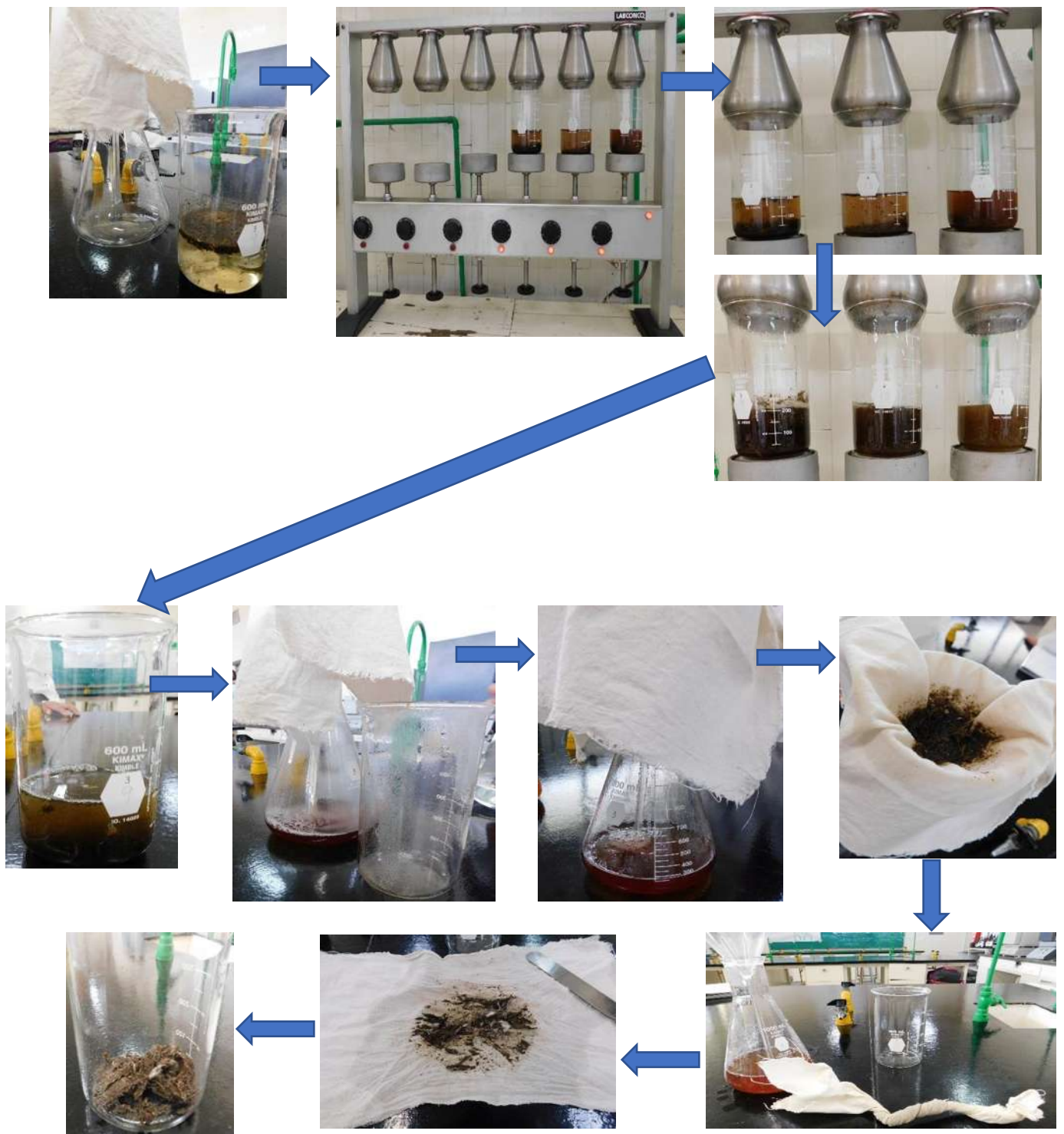




Figura de Anexo 6. Proceso de extracción de fibra presente en los extractos de *T. officinale*.

7.1.6. *Determinación de energía.*





Figura de Anexo 7. Proceso de determinación de la energía bruta por medio de oximetría.