

**ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO TÉRMICO GENERADO POR LA  
INTERACCION DE NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON  
PTERINAS EN CÉLULAS TIPO *HeLa* CON RADIACIÓN IR**

**LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY**

**(Química)**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA  
POSTGRADO EN QUÍMICA, MAESTRÍA EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

**ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO TÉRMICO GENERADO POR LA  
INTERACCION DE NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON  
PTERINAS EN CÉLULAS TIPO *HeLa* CON RADIACIÓN IR**

**LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY**

**(Química)**

Trabajo de Investigación como requisito para optar al título de:

**MAGÍSTER EN QUÍMICA**

**Director:**

**Fernando Martínez Ortega, Ph.D.**

**Co-directora:**

**Stelia C. Mendez Sanchez, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA  
POSTGRADO EN QUÍMICA, MAESTRÍA EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

## **DEDICATORIA**

*Al Químico por excelencia, que diseñó y creó la vida y todo lo que existe:*

*Abba, Dios.*

*Y a mis Padres: Rocio Garay y Julio Bertel.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme la vida y el amor por la ciencia, por guiar mis pasos y hacer posible la obtención de los resultados de este trabajo.*

*A mis padres: Rocio y Julio por amarme, por sus voces de aliento y esa confianza que siempre han tenido en mí.*

*A mis hermanos Danny y Julio Cesar, por su respaldo, su cariño y porque alentaron mis ánimos para trabajar en los momentos difíciles.*

*Al profesor Fernando Martínez, por la dirección de esta investigación, porque los pilares de este trabajo están basados en su insistencia en hacer siempre lo mejor y de buscar la excelencia académica.*

*A la profesora Stelia Carolina, por su guía paciente y dedicada en mis inicios en el trabajo de laboratorio a nivel celular. Su dirección hizo posible la realización de este trabajo interdisciplinario.*

*A Diana Blach, por sus ideas y aportes.*

*A Viviana Ramirez y Yenny Bueno por su apoyo en el cultivo celular.*

*A Edna Pinto y a su familia, por tanto cariño, por acogerme en su hogar como a un miembro de su familia durante mi estadía en Piedecuesta.*

*Al Centro de Investigaciones en Catálisis (CICAT) y Al Grupo de investigación en Bioquímica y microbiología, de los cuales obtuve herramientas valiosas para poder realizar mi trabajo de investigación.*

*Al equipo de trabajo del laboratorio de microscopia de la UIS del parque tecnológico Guatiguará, por las imágenes SEM.*

*Al laboratorio de espectroscopia de la UIS del parque tecnológico Guatiguará por las mediciones ATR-FTIR.*

*A Lucia y Don Alejandro por su colaboración en la toma de medidas en el laboratorio de instrumentación Química de la Escuela de Química UIS.*

*Al Centro de Investigación Científica y Tecnológica en Materiales y Nanociencias, CMN por los fondos e instalaciones usadas en esta investigación y por el apoyo económico recibido en mi primer semestre de maestría.*

*A la escuela de química, por el crédito condonable en mis semestres 2do, 3ro y 4to.*

## CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	24
<b>1. MARCO DE REFERENCIA Y ESTADO DEL ARTE</b> .....	28
1.1 <b>NANOMATERIALES, NANOESTRUCTURAS Y NANOTECNOLOGÍA</b> ..	28
1.2 <b>NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	29
1.3 <b>SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	32
1.4 <b>FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	33
1.5 <b>TERAPIA FOTO-TÉRMICA PLASMÓNICA CON NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	37
1.6 <b>PTERINAS</b> .....	40
1.6.1 <b>Estudio de los equilibrios ácido –base por absorción en el UV-Vis de las pterinas</b> .....	41
1.6.1.1 <b>Ácido Pterina-6-carboxílico</b> .....	42
1.6.1.2 <b>Ácido Fólico</b> .....	43
<b>2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON PTERINAS</b> .....	45
2.1 <b>SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO</b> .....	45
2.1.1 <b>Síntesis de nanopartículas de oro</b> .....	45
2.1.2 <b>Síntesis fotoquímica y funcionalización de nanopartículas de oro – pterinas en una sola etapa</b> .....	46

<b>2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON Y SIN FUNCIONALIZACIÓN</b> .....	47
2.2.1 Caracterización espectroscópica .....	47
2.2.2 Determinación de potencial z y tamaño por dispersión dinámica de la luz.....	48
2.2.3 Caracterización microscópica .....	48
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
2.3.1 Análisis de las AuNP desnudas .....	49
2.3.2 Análisis de la síntesis de AuNP-AP6C .....	51
2.3.2.1 Efecto de la relación molar AP6C/HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O en la síntesis de AuNP-AP6C1 .....	51
2.3.2.2 Efecto del pH en la absorbancia UV-Vis y en el tamaño de las AuNP-AP6C1. ....	52
2.3.2.3 Estudio comparativo de dos concentraciones de ácido tetracloroaurico empleadas en la síntesis de nanopartículas de oro-ácido pterina-6-carboxílico a pH 11.....	57
2.3.2.4 Análisis del tamaño y estabilidad de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 con el paso del tiempo por DLS.....	61
2.3.3 Análisis de las AuNP-AF .....	65
2.3.3.1 Análisis del tamaño y estabilidad de AuNP-AF con el paso del tiempo por DLS.....	68
2.3.4 Análisis SEM de las nanopartículas funcionalizadas .....	71
2.3.5 Estudio por fluorescencia de las nanopartículas funcionalizadas.....	84
<b>3. FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO-PTERINA Y SU EFECTO EN CÉLULAS HELA</b> .....	90

<b>3.1 SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>90</b>
<b>3.1.1 Irradiación de soluciones de nanopartículas de oro-pterina .....</b>	<b>90</b>
<b>3.1.2 Preparación de las soluciones de AuNP-Pterinas y NPD para los ensayos en células .....</b>	<b>92</b>
<b>3.1.3 Ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas de oro-pterina en células HeLa y A549 con y sin irradiación IRC.....</b>	<b>93</b>
<b>3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>3.2.1 Efecto térmico generado por la interacción de nanopartículas de oro- pterina y radiación IRC.....</b>	<b>95</b>
<b>3.2.2 Citotoxicidad de las AuNP-Pterinas en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación IRC.....</b>	<b>101</b>
<b>3.2.3 Citotoxicidad de las AuNP-Pterinas en células A549 en ausencia y presencia de irradiación IRC.....</b>	<b>110</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>
<b>5. RECOMENDACIONES GENERALES .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Aplicación de la terapia TFP en células cancerosas con AuNPs.....	39
<b>Tabla 2.</b> Potencial Z de AuNP-AP6C1 a pH ácido y básico.....	56
<b>Tabla 3.</b> Potencial Z de soluciones de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 obtenido por Zetasizer Malver. Medidas 13 h después de la síntesis.....	60
<b>Tabla 4.</b> Potencial Z (PZ) de las soluciones de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C1 tiempo después de su síntesis. ....	64
<b>Tabla 5.</b> Potencial Z de las soluciones de AuNP-AF tiempo después de su síntesis. ....	70
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de las NPs acuosas usadas en los experimentos de irradiación con IRC. La concentración está expresada en términos de masa de Au por mililitros de solución.....	91
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones de las NPs usadas en los experimentos con células. La concentración está expresada en términos de masa de Au por mililitros de solución (medio con células tratadas).....	92
<b>Tabla 8.</b> Resultados de viabilidad celular de células A549 tratadas con AP6C y AF. ....	121

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Imágenes de la copa de Lycurgus. ....	30
<b>Figura 2.</b> Esquema de la interacción de una NP esférica con la luz. El campo electromagnético de la luz induce una oscilación coherente dipolar de los electrones de conducción a través de la NP. ....	31
<b>Figura 3.</b> Esquema de la interacción de una Nanobarra con la luz, a la izquierda se muestra el dipolo transversal y a la derecha el longitudinal (Liz-Marzan, 2004). ....	32
<b>Figura 4.</b> Ligando folato-oligoetilenglicol unido a la superficie de la AuNB. ....	35
<b>Figura 5.</b> Preparación de AuNP-GSH-AF. ....	37
<b>Figura 6.</b> Estructuras químicas de (A) y (B) las pteridinas y (C) pterina.....	40
<b>Figura 7.</b> Estructura química del ácido fólico. ....	41
<b>Figura 8.</b> Equilibrio amida-fenolato presente en todos los derivados pterínicos ...	42
<b>Figura 9.</b> Espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AP6C. ....	43
<b>Figura 10.</b> Espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AF. ....	44
<b>Figura 11.</b> Equipo usado en la síntesis fotoquímica de AuNPs y AuNP-pterinas. (A) Fotoreactor y (B) baño termostatado. ....	46
<b>Figura 12.</b> Características de las NPDs. (A) Fotografía de la solución de NPDS. (B) Espectro UV-Vis. (C) Distribución de tamaño por DLS (triplicado). (D) Imagen SEM. (C) Ampliación de una zona de la imagen D.....	50
<b>Figura 13.</b> Espectros UV-Vis de los productos de la síntesis de AuNP-AP6C1 con relaciones molares de AP6C/HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O de 0,44/1; 0,56/1; 0,50/1 y 0,62/1. Los espectros negro, azul y rojo indican tiempos de irradiación UV de 10, 25 y 45 min respectivamente.....	52
<b>Figura 14.</b> Espectros UV-Vis de soluciones de AuNP-AP6C1 a pH ácido y básico de la mezcla de reacción, medidos 13 h después de la síntesis. ....	53

<b>Figura 15.</b> Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C1, obtenida a pH=11 y 4,41 indicada con los colores rojo y verde respectivamente.....	55
<b>Figura 16.</b> Seguimiento de la foto-reacción de (A) AuNP-AP6C1 y (B) AuNP-AP6C2, espectros UV-Vis medidos 13 h después de la síntesis. ....	58
<b>Figura 17.</b> Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para las soluciones de (A) AuNP-AP6C1 y (B) AuNP-AP6C2. En rojo se tienen los resultados para 25 min de irradiación y en verde para 45 min. ....	60
<b>Figura 18.</b> Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C1, medida a las 13, 38, 158, 230 y 350 h (A-E).....	62
<b>Figura 19.</b> Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C2, medida a las 13, 38 y 158 h indicada con los colores rojo, verde y azul respectivamente. ....	63
<b>Figura 20.</b> Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AP6C1 tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.....	64
<b>Figura 21.</b> Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AP6C2 tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.....	65
<b>Figura 22.</b> Espectros UV-Vis de soluciones de AuNP-AF sintetizadas a diferentes relaciones molares de AF/HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O: 0,4/1; 0,5/1; 0,56/1 y 0,63/1. ....	66
<b>Figura 23.</b> Espectros UV-Vis de soluciones de AF libre, mezcla de reacción antes de irradiación UV y AuNP-AF. Imagen interna: banda APS de las AuNP-AF y la fotografía de la solución de AuNP-AF.....	67
<b>Figura 24.</b> Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AF, medida a las 23, 120, 168, 264 y 336 h (A-E).....	69
<b>Figura 25.</b> Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AF tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.....	70
<b>Figura 26.</b> Imágenes SEM de AuNP-AP6C1s (A) y (B). La imagen interior (C) corresponde una imagen SEM de una nanopartícula con una barra de escala de 100nm.....	72
<b>Figura 27.</b> Espectros EDS de la solución de AuNP-AP6C1 (A) y del soporte (B). 73	

<b>Figura 28.</b> Imágenes SEM de las AuNP-AP6C2, tomada a las primeras horas después de la síntesis. ....	75
<b>Figura 29.</b> Imagen SEM de las AuNP-AP6C2, tomada varios días después de la síntesis.....	76
<b>Figura 30.</b> Espectro EDS de la solución de AuNP-AP6C2.....	76
<b>Figura 31.</b> Imagen SEM de AuNP-AF. Preparadas con una relación molar AF/Au de 0,56/1 y 10 min de irradiación UV.....	78
<b>Figura 32.</b> Espectro EDS de la solución de AuNP-AF.....	79
<b>Figura 33.</b> Imágenes SEM de las partículas formadas en la mezcla de reacción de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ( $3 \times 10^{-6}$ moles) y AF ( $1,65 \times 10^{-6}$ moles) en agua (9,37mL).....	79
<b>Figura 34.</b> Espectros ATR-FTIR del AP6C libre y de las AuNP-AP6C1.....	80
<b>Figura 35.</b> Espectros ATR-FTIR del AP6C libre y de las AuNP-AP6C2.....	81
<b>Figura 36.</b> Espectros ATR-FTIR del ácido fólico libre y de las AuNP-AF.....	83
<b>Figura 37.</b> Espectros de EF de las soluciones de: NPD+AP6C (en verde), AP6C libre (en negro), AuNP-AP6C1 (en rojo) y AuNP-AP6C2 (en azul).....	85
<b>Figura 38.</b> Espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones de: AF libre (en negro), AuNP-AF (en verde), mezcla de Reacción Au+AF (en rojo) y NPD+AF (en azul).....	87
<b>Figura 39.</b> Imagen SEM de la solución de AuNPs estudiada por Horimoto et al., 2008.....	88
<b>Figura 40.</b> Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AuNP-pterina. (A) Sensor de temperatura, (B) solución de AuNP-pterina, (C) láser IRC (808nm), (D) y (E) reguladores de temperatura y potencia respectivamente. ....	90
<b>Figura 41.</b> Montaje experimental para la irradiación con IRC de las células tratadas con las AuNP-Pterinas y NPD dentro de una cabina de flujo laminar.....	94
<b>Figura 42.</b> Curvas de calentamiento del agua (en naranja) y de la solución AuNP-AP6C1 (en azul) a diferentes potencias del diodo láser y 10 min de irradiación. La temperatura inicial de la solución estuvo en el rango de 31,1-31,8°C. ....	96
<b>Figura 43.</b> Curvas de calentamiento de las soluciones acuosas de AuNP-AP6C2 y AuNP-AF. Mayor concentración (en azul), y sus diluciones: 1/2 (en amarillo), 1/10	

(en rojo) a diferentes potencias del diodo láser. Solución blanco agua (en verde). .....	97
<b>Figura 44.</b> Curvas de calentamiento de las soluciones acuosas de AuNP-Pterinas con una irradiación IRC durante 15 min.....	99
<b>Figura 45.</b> Aumento de temperatura de las soluciones de todas las AuNPs preparadas al ser irradiadas durante 10min con el diodo láser a 800mW. ....	100
<b>Figura 46.</b> Efecto de las AuNP-AP6C1 sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. * Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs, $p < 0,05$ .....	102
<b>Figura 47.</b> Células HeLa tratadas con AuNP-AP6C1 a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	103
<b>Figura 48.</b> Efecto de las AuNP-AP6C2 sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3 $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. * Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs, $p < 0,05$ .....	105
<b>Figura 49.</b> Células HeLa tratadas con AuNP-AP6C2 a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3 $\mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	105
<b>Figura 50.</b> Efecto de las AuNP-AF sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4 $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. * Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs, $p < 0,05$ .....	107

<b>Figura 51.</b> Células HeLa tratadas con AuNP-AF a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	107
<b>Figura 52.</b> Células HeLa tratadas con NPD, luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	109
<b>Figura 53.</b> Efecto de las AuNP-AP6C1 sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y $6,4 \mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. * Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs, $p < 0,05$ . ....	111
<b>Figura 54.</b> Células A549 tratadas con AuNP-AP6C1 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	113
<b>Figura 55.</b> Efecto de las AuNP-AP6C2 sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y $64,3 \mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. ....	115
<b>Figura 56.</b> Células A549 tratadas con AuNP-AP6C2 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y $64,3 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	116
<b>Figura 57.</b> Efecto de las AuNP-AF sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y $6,4 \mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. * Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs, $p < 0,05$ . ....	118
<b>Figura 58.</b> Células A549 tratadas con AuNP-AF a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ; $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X. ....	119

**Figura 59.** Células A549 tratadas con NPs desnudas (NPD) y sin NPs (Control), en ausencia y presencia de irradiación IRC, vistas al microscopio óptico 40X.....120

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo A.</b> Mecanismo para la síntesis de AuNPs en presencia de radiación UV y etilenglicol	129
<b>Anexo B.</b> Formas ionizadas del AP6C en función del pH.	130
<b>Anexo C.</b> Fotografías de la solución de AuNP-AP6C2 antes y después de precipitar.	131
<b>Anexo D.</b> Fotografías de soluciones de AuNP-AP6C1 a varios tiempos después de la síntesis.	132
<b>Anexo E.</b> Fotografías del proceso de preparación de las AuNP-AF.	133
<b>Anexo F.</b> Formas ionizadas del AF en función del pH.	134

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**A549.** Línea celular de carcinoma de pulmón humano.

**AF.** Ácido Fólico.

**ANOVA.** (*Analysis of variance*) Análisis de varianza.

**AP6C.** Ácido pterina-6-carboxílico.

**APS.** Absorción de Plasmones de Superficie.

**ATR-FTIR.** Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier en modo de reflectancia total atenuada.

**AuNB.** Nanobarra de Oro.

**AuNB-AF.** Nanobarras de Oro funcionalizadas con Ácido Fólico.

**AuNP.** Nanopartícula de Oro.

**AuNP-FA.** Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido Fólico.

**AuNP-GSH-AF.** Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido Fólico usando Glutación.

**AuNP-P6C1.** Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido pterina-6-carboxílico con una relación de Au/AF alta.

**AuNP-P6C2.** Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido pterina-6-carboxílico con una relación de Au/AF baja.

**AuNP-Pterinas.** Nanopartículas de Oro funcionalizada con Ácido pterina-6-carboxílico o con AF.

**CTAB.** (*cetyltrimethylammonium bromide*) Bromuro de cetiltrimetilamonio.

**CICAT.** Centro de Investigaciones en Catálisis.

**DLS.** (*Dynamic Light Scattering*) Dispersión dinámica de la luz.

**DMSO.** Dimetil sulfóxido.

**EDS.** (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) Espectrometría de dispersión de energía de rayos X.

**EF.** Emisión de fluorescencia.

**EGFR.** (*Epidermal Growth Factor Receptor*) Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal.

**EMEM.** (Eagle's Minimum Essential Medium) Medio Eagle mínimo esencial.

**GSH.** (*Glutathione*) Glutati6n

**h.** Horas.

**HBSS.** (*Hank's Balanced Salt Solution*) Soluci6n salina equilibrada de Hank.

**HeLa.** Lnea celular de carcinoma de cuello uterino.

**IR.** Infrarrojo.

**IRC.** Infrarrojo Cercano.

**MDA-MB-435S.** Carcinoma ductal glndula mamaria.

**MFQ.** M6todo Fotoqu6mico.

**MTT.** Sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio.

**NP.** Nanopart6cula.

**NPD.** Nanopart6culas desnudas.

**PARP.** poli (ADP-ribosa) polimerasa

**PEG.** Polietilenglicol.

**PZ.** Potencial Z.

**RF.** Receptor de Folato.

**s.** Segundos.

**SEM.** (*Scanning Electron Microscopy*) Microscopía electrónica de barrido.

**TFP.** Terapia Foto-térmica Plasmónica

**UV-Vis.** Ultravioleta Visible.

## Resumen

**Título:**

Estudio *in vitro* del efecto térmico generado por la interacción de nanopartículas de oro funcionalizadas con pterinas en células tipo *HeLa* con radiación IR\*.

**Autora:**

Linda Esperanza Bertel Garay‡

**Palabras claves:**

Nanopartículas de oro, ácido fólico, ácido pterina-6-carboxílico, funcionalización, células HeLa, fototerapia.

**Descripción:**

El ácido fólico (AF) ha sido utilizado en la funcionalización de nanopartículas de oro (AuNP) para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. El AF es reconocido por los receptores folato sobre-expresados en la membrana de algunas células cancerosas epiteliales. En este sentido, en este trabajo se proponen metodologías sencillas para la síntesis de AuNP funcionalizadas con ácido pterina-6-carboxílico (AP6C) y AF, mediante reacciones fotoquímicas. Las AuNPs funcionalizadas fueron evaluadas como agentes terapéuticos en células de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa) y células epiteliales de adenocarcinoma alveolar humano (A549), utilizando una radiación en el Infrarrojo cercano (IRC).

Los espectros UV-Vis de las soluciones de AuNP-Pterinas preparadas mostraron sus bandas de plasmones superficiales, confirmando la formación de NPs. El análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS) permitió conocer el potencial zeta y el diámetro hidrodinámico de las AuNPs funcionalizadas con el paso del tiempo, para estudios de la estabilidad de las mismas. La microscopia electrónica de barrido (SEM) permitió conocer la morfología y en conjunto con la técnica EDS se pudo determinar la presencia de elementos propios de las pterinas en la superficie metálica de Au. Otras evidencias de la funcionalización fueron obtenidas por espectroscopia IR y fluorescencia. La viabilidad celular de AuNP funcionalizadas con pterinas fue medida en ausencia y presencia de irradiación IRC, por medio de ensayos de MTT.

Las nanopartículas funcionalizadas fueron obtenidas en condiciones suaves de reacción y presentaron tamaños entre 20 a 1000nm. Las AuNP-AP6C y AuNP-AF afectaron la viabilidad de las células A549, mientras que no fueron citotóxicas para las HeLa en ausencia de radiación. Por otro lado, estos conjugados irradiados con IRC durante 5min fueron citotóxicos para las células HeLa, de forma dosis dependiente.

---

\*Trabajo de Investigación de maestría

‡Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Fernando Martínez O., Stelia Carolina Mendez Sanchez.

## Abstract

### Title:

*In Vitro* Study of thermal effect generated by the interaction between pterins-functionalized gold nanoparticles and IR radiation in HeLa cells\*.

### Author:

Linda Esperanza Bertel Garay<sup>‡</sup>

### Keywords:

Gold nanoparticles, folic acid, pterin-6-carboxylic acid, functionalization, HeLa cells, phototherapy.

### Description:

The folic acid (FA) have been used to functionalize gold nanoparticles (AuNP) to achieve the diagnostic and therapy of cancer. The AF is recognized by the overexpressed folate receptors on the membrane of some epithelial cancer cells. In this work, simple methodologies for synthesis of AuNP functionalized with pterine-6-carboxylic acid and folic acid were proposed through photochemistry reactions. The functionalized AuNPs were evaluated as therapeutic agents in human adenocarcinoma cells cervix (HeLa) and human alveolar epithelial adenocarcinoma cells (A549) using a near infrared radiation (NIR).

The UV-Vis spectrums of the solutions of gold nanoparticles prepared showed their surface plasmon bands, checking the gold nanoparticles formation. Analysis by dynamic light scattering (DLS) allowed measure the zeta potential and hydrodynamic diameter of AuNPs functionalized over time, for colloidal stability studies. The scanning electron microscopy (SEM) allowed to know the morphology and in conjunction with EDS technique was possible determinate the presence of elements of the pterins on the metal surface of Au. Other evidences of functionalization were obtained by IR and fluorescence spectroscopy. Cell viability of AuNP functionalized with pterins was measured, in the absence and presence of near infrared, by MTT assays.

The functionalized nanoparticles were obtained under mild reaction conditions and showed size from 20 to 1000nm. AuNP-AP6C and AuNP-FA affected the viability of A549 cells while they were not cytotoxic to HeLa in the absence of NIR. Furthermore, these conjugates irradiated for 5 min with NIR were cytotoxic to HeLa cells, dose-dependently.

---

\*Master's research paper

<sup>‡</sup>Science Faculty. School of chemistry. Director: Fernando Martínez O. Codirectora: Stelia Mendez S.

## INTRODUCCIÓN

Durante la última década numerosos trabajos de investigación se han enfocado en el uso de nanopartículas (NP) para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Nanopartículas metálicas como las nanopartículas de oro (AuNP) han tenido gran interés debido a sus propiedades únicas: 1-son las nanopartículas metálicas más estables; 2- este tipo de NP ha presentado baja citotoxicidad y buena biocompatibilidad; 3-presentan el fenómeno de absorción de plasmones de superficie (APS), que hace posible que la NP sea un buen convertidor de energía radiante en energía calórica; 4-su superficie es capaz de unirse a una variedad de grupos funcionales (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, -PH<sub>3</sub>) permitiendo a su vez diferentes aplicaciones (Daniel y Astruc, 2004).

La funcionalización de las AuNP con biomoléculas, que presentan afinidad con receptores sobre-expresados en células cancerosas, cómo las células HeLa, ha sido un enfoque que ha permitido usar las NP en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Se han funcionalizado AuNPs con ácido fólico (AF) con el fin de lograr una internalización de las NPs funcionalizadas en células cancerosas, a través de una endocitosis mediada por receptor, debido a que el AF es una vitamina que se une con gran afinidad a los receptores folato (Sega y Low, 2008) . En este sentido, el presente trabajo estudia la internalización de NPs funcionalizadas con AF en células cancerosas tipo HeLa, pero además se propone la funcionalización de las NPs con una pterina más sencilla como el ácido pterina-6-carboxílico (AP6C), ya que el AP6C presenta un anillo pteridínico como el ácido fólico y por lo tanto se espera su reconocimiento por los receptores folato de la célula.

El aporte de éste trabajo de maestría fue estudiar metodologías sencillas para la síntesis de AuNP funcionalizadas con AF y AP6C. Además de evaluar los nanoconjugados como agentes terapéuticos en células HeLa y A549. Cabe resaltar

que el uso de AP6C como agente funcionalizante y facilitador de la internalización de las AuNP no se encuentra reportado en la literatura. El desarrollo de estos nuevos nanocompuestos funcionalizados abre las puertas a aplicaciones como la detección y terapia fotodinámica de enfermedades como el cáncer.

- **Pregunta de investigación**

El desarrollo de esta investigación tuvo como motivación la búsqueda de respuestas a las siguientes preguntas: ¿Puede lograrse la funcionalización de las AuNP con pterinas empleando metodologías húmedas y en condiciones suaves de reacción? ¿Pueden las AuNP funcionalizadas con algunas pterinas internalizarse en células cancerosas y lograr un aumento de temperatura localizado al interactuar con radiación IRC?

- **Objetivo del trabajo de investigación**

Evaluar el efecto térmico localizado de las nanopartículas de oro funcionalizadas con pterinas, internalizadas en células cancerosas, al interactuar con radiación IRC.

Para alcanzar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- ✚ Evaluar condiciones de síntesis de nanopartículas de oro con tamaño y forma controlada.
- ✚ Estudiar metodologías que permitan funcionalizar nanopartículas de oro con dos tipos de pterinas de manera sencilla.
- ✚ Evidenciar la formación y funcionalización de las nanopartículas de oro, mediante técnicas espectroscópicas, microscópicas y por DLS.
- ✚ Estudiar las condiciones apropiadas para lograr la activación térmica de las nanopartículas de oro funcionalizadas con pterinas.

- ✚ Evaluar el efecto térmico de las nanopartículas funcionalizadas en células HeLa al irradiar con IRC.

- **Hipótesis**

Es posible que AuNPs funcionalizadas con pterinas y utilizando una radiación infrarroja cercana generen un aumento localizado de la temperatura, capaz de causar hipertermia en las células cancerosas tipo HeLa *in vitro*.

- **Resumen del trabajo de investigación**

- ✚ **Capítulo 1**

Este capítulo es una síntesis de las propiedades y métodos de preparación de AuNP con y sin funcionalización (con AF y otros). Además incluye de forma breve una explicación de la terapia foto-térmica plasmónica y de los trabajos más relevantes realizados en esta área. Finalmente se enfatiza en algunas características importantes de las pterinas.

- ✚ **Capítulo 2**

Aquí se hace una descripción detallada de la metodología fotoquímica usada para la síntesis, funcionalización y caracterización de las AuNPs con y sin funcionalización. Las técnicas analíticas empleadas para evidenciar la obtención de AuNPs fueron: absorción en el UV-Vis, dispersión dinámica de la luz, microscopía electrónica de barrido. Mientras que la absorción en el IR, espectroscopia de fluorescencia, SEM-EDS permitieron obtener información acerca de la interacción entre la superficie metálica de Au con las pterinas.

### **Capítulo 3**

En este capítulo se indican los procedimientos de irradiación IRC (808nm) de soluciones acuosas de AuNPs desnudas y funcionalizadas, que permitieron obtener las condiciones apropiadas de irradiación celular. Adicionalmente, son descritas las condiciones de cultivo celular de las dos líneas cancerosas y de los ensayos MTT realizados. Las AuNP-Pterinas no fueron tóxicas para las HeLa, mientras que para las A549 se obtuvo citotoxicidad aportada por las AuNPs. La terapia fototérmica plasmónica logró una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad de las células HeLa tratadas con AuNP-AP6C1 y AuNP-AF. Los experimentos celulares fueron realizados en el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología, bajo la dirección de la Dra. Stelia Carolina Mendez.

#### ○ **Anexos**

En primer anexo contiene el mecanismo de reacción propuesto por Eustis y col, 2005 para la síntesis fotoquímica de AuNPs en presencia de etilenglicol, ya que este mecanismo puede explicar la producción de AuNP-Pterinas obtenidas por el método fotoquímico del presente trabajo.

Se anexan dos gráficos de la dependencia de las formas iónicas del AP6C y AF con el pH de la solución, debido a que el pH es determinante en la síntesis de las AuNP-Pterinas.

Además se incluyen algunas evidencias fotográficas del trabajo realizado en la síntesis y funcionalización de AuNPs.

## 1. MARCO DE REFERENCIA Y ESTADO DEL ARTE

### 1.1 NANOMATERIALES, NANOESTRUCTURAS Y NANOTECNOLOGÍA

El término nanomaterial es usado en dos connotaciones diferentes: por un lado para designar materiales cuyo tamaño está comprendido en la nanoescala (1-100nm) y por el otro, puede ser usado para referirse a un material masivo que contiene estructuras de tamaño en la nanoescala (Kreyling *et al.*, 2010). En este trabajo se empleará el término nanomaterial en el contexto de la primera definición.

Sin embargo, existe un término que pretende describir mejor las dimensiones en la nanoescala denominado: nanoestructura. Se conoce como nanoestructura a un material que tiene por lo menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica. Así, una nanopartícula, puede ser considerada como un elemento cero dimensional que constituye la forma más simple de una nanoestructura. Un nanotubo es un elemento uni-dimensional, que puede servir de base para elaborar nanoestructuras más complejas. Por último, un nanodisco es un ejemplo de una nanoestructura bi-dimensional (Haghi *et al.*, 2015).

Las nanoestructuras constituyen el objeto de estudio y aplicación de la nanotecnología. Haghi *et al.* dieron la siguiente definición: “La nanotecnología literalmente significa cualquier tecnología a nanoescala que tiene aplicaciones en el mundo real. Incluye la producción y aplicaciones de sistemas físicos, químicos, biológicos en escalas que van desde átomos individuales o moléculas a dimensiones submicrónicas, así como la integración de las nanoestructuras resultantes en sistemas más grandes. Se consideró en general que la nanotecnología será la próxima revolución industrial”.

En la síntesis de nanomateriales de diferente naturaleza se tiene el reto de controlar la forma y tamaño de las partículas. El efecto del radio de la partícula sobre las propiedades físicas, químicas, ópticas, electrónicas y catalíticas del material puede ser estudiado y correlacionado con la teoría cuántica moderna. Hasta la fecha, las nanopartículas más estudiadas han sido de metales, semiconductores y materiales magnéticos. Una vez que el control del tamaño y de la monodispersidad ha sido logrado, el siguiente paso es el control sobre la síntesis de nanopartículas no esféricas, donde no sólo el tamaño, sino también otros aspectos topológicos se pueden controlar a través de una elección apropiada de las condiciones experimentales. Por ejemplo, los materiales pueden moldearse como varillas, tubos o estructuras concéntricas de núcleo-corteza, como cápsulas huecas o aleaciones, entre otras (Perez-Juste *et al.*, 2005).

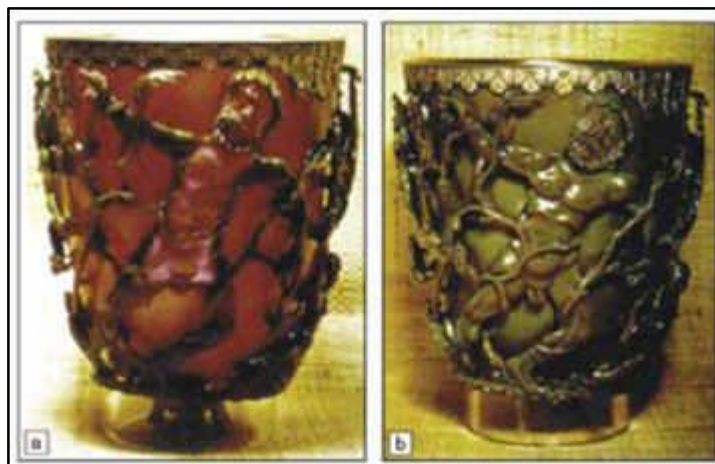
## 1.2 NANOPARTÍCULAS DE ORO

El descubrimiento de las nanopartículas de oro (AuNPs) no es reciente, ya que los coloides de oro han sido usados desde los tiempos de la antigua Roma para colorear los vitrales de las iglesias (Tseng *et al.*, 2009)

En la antigüedad, las AuNPs eran usadas tanto para propósitos artísticos como curativos. El oro coloidal era usado para hacer vidrio rubí y cerámicas coloridas. Un ejemplo muy famoso es la Copa de Lycurgus que fue manufacturada en el siglo 5-4 a.c (ver **figura 1**). La copa es de color rojo rubí con luz transmitida y verde como luz reflejada, debido a la presencia de coloides de oro. En la edad media se hizo popular el llamado “oro soluble” debido a sus excelentes propiedades curativas tratando enfermedades, tales como: problemas venéreos y del corazón, disentería, epilepsia, tumores, y en el diagnóstico de la sífilis (Daniel y Astruc, 2004).

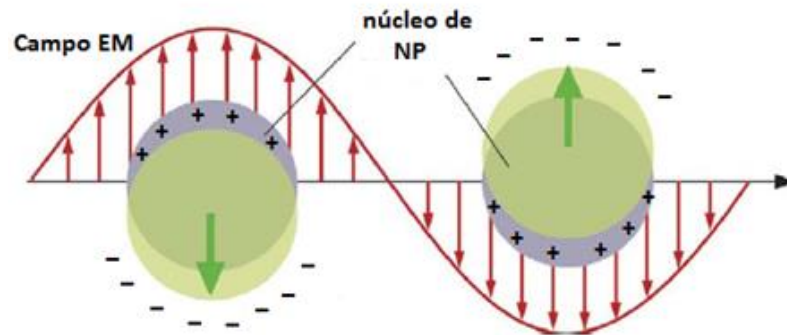
Las AuNPs exhiben una fuerte absorción llamada resonancia de plasmones superficiales localizada, o absorción de plasmones de superficie (APS), que resulta de la oscilación colectiva y coherente de los electrones de la banda de conducción a través de la nanopartícula (NP) al interactuar con luz de una longitud de onda de resonancia específica (ver **Figura 2**). La longitud de onda de la APS depende del tamaño y de la forma de la partícula, así como de las propiedades dieléctricas del medio circundante de la NP. Las soluciones de AuNPs esféricas se distinguen por presentar coloraciones intensas que van desde el rojo hasta el púrpura y sus máximos de APS están entre 517 y 575nm para partículas con diámetros entre ~9 y 99 nm. Las partículas con menos de 2nm no exhiben banda APS (Sapsford *et al.*, 2013).

**Figura 1.** Imágenes de la copa de Lycurgus.



Fuente: BLANCO, Duani; *[et al.]*. Nanomedicina: aspectos generales de un futuro promisorio. En: Revista Habanera de Ciencias Médicas. Vol. 10, p. 410-421.

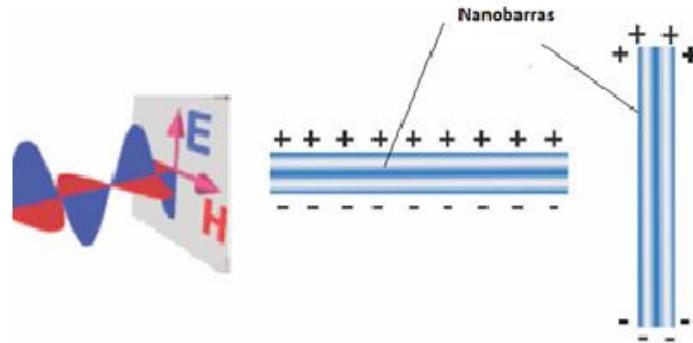
**Figura 2.** Esquema de la interacción de una NP esférica con la luz. El campo electromagnético de la luz induce una oscilación coherente dipolar de los electrones de conducción a través de la NP.



Fuente: JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Au nanoparticles target cancer. En: Nano Today. 2007, Vol. 2, p. 19-29.

A diferencia de las AuNPs esféricas que sólo presentan un máximo de absorción, las AuNPs en forma de barras (AuNB) exhiben dos bandas APS (ver **Figura 3**): una debida a la oscilación transversal de los electrones y cuya frecuencia de resonancia está en el visible (esta frecuencia es semejante a la de una esfera con dimensión análoga) y la otra banda es debida a la oscilación longitudinal, la cual exhibe una resonancia en el IRC y se corre a longitudes de onda e intensidades mayores a medida que se incrementa la relación largo/ancho, que se conoce como aspecto e identificado con la letra R. Otras formas como poliedros, platos y estructuras huecas o “*nanoshell*” pueden ser preparadas y se ha observado que presentan propiedades ópticas interesantes (Sapsford *et al.*, 2013).

**Figura 3.** Esquema de la interacción de una Nanobarra con la luz, a la izquierda se muestra el dipolo longitudinal y a la derecha el transversal.



Fuente: LIZ-MARZAN, Luis M. Nanometals: formation y color. En: Materials Today. 2004, Vol. 2, p. 26-31.

### 1.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Entre los métodos convencionales de síntesis de AuNPs se usan los métodos de reducción de derivados de oro (III), el más popular ha empleado el citrato como agente reductor del  $\text{HAuCl}_4$  acuoso, este método fue introducido por Turkevitch en 1951 (Daniel y Astruc, 2004). Esta síntesis permite obtener AuNPs de 20nm. Una preparación practica de AuNPs estabilizadas con 3-mercaptopropionato de sodio fue reportado (Daniel y Astruc, 2004), en la cual se adicionó simultáneamente citrato y un surfactante anfifílico; el tamaño fue controlado variando la relación estabilizante/oro.

Se han reportado síntesis de NPs de formas diferentes a la esférica, por métodos químicos y fotoquímicos. Un método químico fue realizado por Murphy *et al.*, 2005, mediante la preparación de una solución semilla de AuNPs esféricas (de alrededor de 5nm), a partir de  $\text{HAuCl}_4$ . Se utilizó el citrato de sodio y el borohidruro de sodio como agentes reductores del Oro. Además, se preparó una solución stock mezclando:  $\text{HAuCl}_4$ , bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y ácido ascórbico.

Finalmente se mezcló la solución semilla y el stock, obteniéndose nanobarras de oro (AuNBs). El agente tensoactivo CTAB es el único reactivo conocido que permite moldear a la NP hasta obtener una forma de barra (Murphy *et al.*). Un método fotoquímico fue descrito por Huang W-C *et al.*, 2008 en donde se utiliza  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , oxalato de sodio. La mezcla de reacción fue irradiada con una lámpara de mercurio (longitud de onda de emisión: 306nm). La reacción condujo a la generación de AuNPs poligonales.

La funcionalización de las AuNPs se ha realizado comúnmente con grupos tiol, que se ligan fuertemente al metal debido al carácter blando tanto del metal como del azufre. Los tioles orgánicos son particularmente efectivos para el anclaje a la superficie de las nanopartículas por la presencia de un enlace tipo  $\sigma$ , en el cual el azufre es el donador de densidad electrónica y el átomo metálico es el aceptor, más un enlace tipo  $\pi$ , en el cual los electrones del metal están parcialmente deslocalizados en los orbitales moleculares formados entre los orbitales d llenos del metal y los orbitales d vacíos del azufre (Amendola, 2008).

#### **1.4 FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO**

El receptor de folato es potencialmente útil para el tratamiento de muchos cánceres. Esta proteína de membrana se une a folatos extracelulares con una afinidad muy elevada y mediante un proceso de endocitosis, los transporta dentro de la célula para la formación de precursores purina y pirimidina necesarios en la síntesis de ADN y ARN (Jhaveri *et al.*, 2001). En la actualidad hay muchos ejemplos de cómo este sistema fisiológico puede ser usado para la administración dirigida de moléculas biológicamente activas contra el cáncer. En efecto, evidencias preclínicas y clínicas muestran cómo los receptores de folato pueden ser positivos para: (1) identificar anatómicamente células cancerosas usando conjugados de folato con

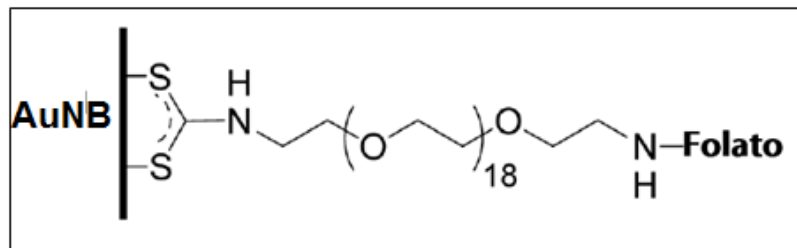
agentes de formación de imágenes de radiodiagnóstico y (2) los cánceres pueden ser tratados eficientemente con compuestos unidos al folato. Si bien los resultados biológicos son convincentes, se requiere entender la química de conjugación que se desarrolla para producir estas moléculas activas (Vlahov *et al.*, 2012).

El AF muestra una alta afinidad por el receptor de folato, una proteína de membrana unida a glicosilfosfatidilinositol que captura sus ligandos desde el medio extracelular y los transporta dentro de la célula a través de una vía endosomal no destructiva. Debido al hecho de que la expresión de receptores de folato es mínima en los tejidos normales, el receptor de folato es también un antígeno / biomarcado de reconocimiento de tumores. Debido a ello, los métodos terapéuticos y de diagnóstico explotan la función del receptor para desarrollar tratamientos contra el cáncer (Vlahov *et al.*, 2012).

Stella *et al.*, 2000 sintetizaron nanopartículas utilizando un copolímero anfifílico de cianoacrilato y el polietilenglicol (PEG) con grupos amino terminales. Este copolímero permitió la preparación de nanopartículas estables y de tamaño pequeño, que mostraron ser un excelente soporte sólido para el acoplamiento de ácido fólico. El análisis por resonancia del plasmón superficial mostró que los conjugados de nanopartículas-folato fueron capaces de unirse específicamente a las proteínas de enlace del folato, mientras que las nanopartículas sin ácido fólico mostraron una interacción mucho más baja. Esto permitió proponer las nanopartículas-PEG como potenciales portadores de medicamentos para el tratamiento selectivo de tumores.

Huff *et al.*, 2007 prepararon AuNB-AF usando: AuNB (previamente preparadas con CTAB), oligoetilenglicol, CS<sub>2</sub>, DMSO y NHS-folato. El ligando folato-oligoetilenglicol fue conjugado a la superficie de la nanobarra por formación de ditiocarbamato *in situ* (ver **Figura 4**). Se demostró que las AuNBs conjugadas con ligandos folatos podían ser usadas para terapias hipertérmicas de células cancerosas orales KB con un láser CW Ti:Sapphire (Huff *et al.*, 2007).

**Figura 4.** Ligando folato-oligoetilenglicol unido a la superficie de la AuNB.



Fuente: HUFF, Terry B. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. En: Nanomedicine. 2007, Vol. 2, p.125-132.

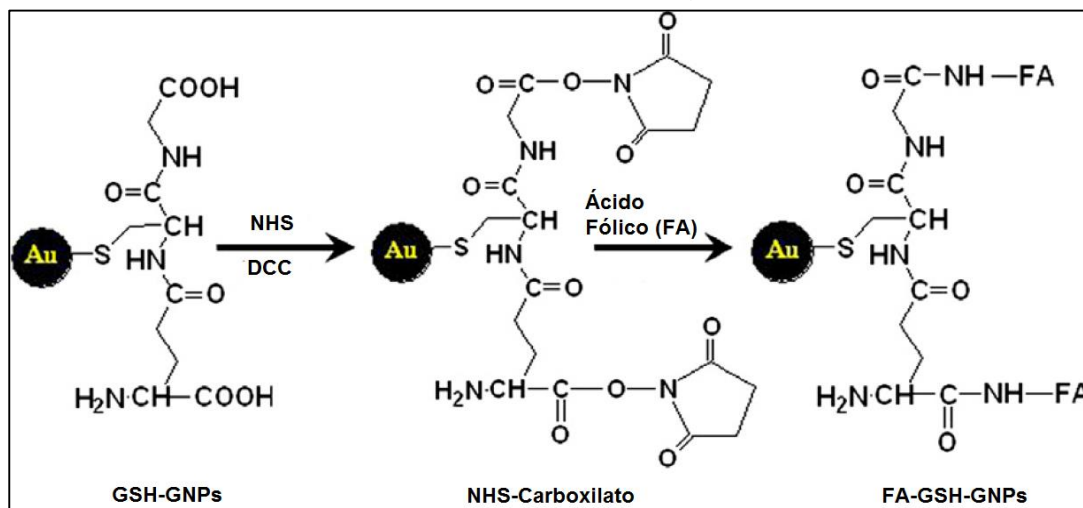
Tsai y *et al.*, 2008 desarrollaron una metodología en la cual los grupos carboxílicos del AF son activados por una carbodiimida para formar un enlace amida con las moléculas mercaptoetilamina unidas a AuNPs. Se observó que los conjugados empezaron a internalizarse en células cancerosas MDA-MB-435S a partir de los primeros 5 min de tratamiento.

En la aplicación médica de las nanopartículas se ha demostrado que la tasa de internalización de nanopartículas de oro se puede aumentar significativamente, si la superficie de la nanopartícula se modifica con ácido fólico. Li *et al.*, 2009, trabajaron en la funcionalización de AuNPs con AF por medio de un procedimiento en el cual se sintetiza y funcionaliza la NP en un solo paso; sin embargo se requieren

8h de calentamiento (a 50°C) y 2h más de agitación. Sus resultados sugieren que el AF en la superficie de las AuNPs facilita la captación de las NPs por las células HeLa por medio de endocitosis mediada por receptores folatos. Esto último implica que el acople del AF con la NP no afecta el reconocimiento específico del AF por los receptores de folato en la superficie celular. Además, esta investigación indicó que no existía citotoxicidad de las AuNP-AF, después de la incubación de las células HeLa con AuNP-AF durante 24 h. Esto puede ser atribuido a la esencia inerte y no tóxica del núcleo de Au y a la biocompatibilidad de la superficie compuesta por AF.

En la funcionalización de AuNPs también se ha usado el Glutati6n (GSH) como agente estabilizador y acoplador en la s3ntesis de AuNP cubiertas por GSH (AuNP-GSH). El GSH fue inmovilizado en la superficie de la AuNP a trav3s del grupo tiol de la porci6n de ciste3na, y el AF fue conjugado a la AuNP (ver **Figura 5**) por medio de una reacci6n entre el grupo carbonilo del GSH y el grupo amino del AF. La AuNP-GSH-AF mostr6 sensibilidad y selectividad para la detecci6n de c3lulas HeLa (Zhang *et al.*, 2010).

**Figura 5.** Preparación de AuNP-GSH-AF (Zhang et al., 2010).



Fuente: ZHANG, Zhaowu; [et al.] Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. *En:* Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010, Vol. 18, p. 5528–5534.

## 1.5 TERAPIA FOTO-TÉRMICA PLASMÓNICA CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro han sido estudiadas como agentes de terapia foto-térmica plasmónica (TFP), gracias al fenómeno de APS, en células cancerosas (Huang *et al.*, 2008).

Se ha demostrado, por medio de análisis de espectroscopia de absorción transitoria de femtosegundo, que la foto-excitación de nanoestructuras metálicas permite la formación de un gas caliente de electrones. Posteriormente ocurre un intercambio de energía entre el gas con la red de la NP ocasionando un enfriamiento del gas en  $\sim 1$ ps. Este evento es seguido por interacciones fonón - fonón que causa que la red de la NP se enfríe rápidamente por medio de intercambios de energía con el medio circundante en  $\sim 100$ ps. Esta rápida conversión y disipación puede ser empleada para el calentamiento focalizado usando una radiación con una

frecuencia que se superponga fuertemente con la banda APS de la NP (Huang *et al.*, 2008).

Para las terapias foto-térmicas empleando nanopartículas es importante considerar los siguientes aspectos:

1. Es preferible utilizar AuNPs cuyas características de forma y tamaño les permitan entrar en resonancia con radiación en la región del infrarrojo cercano (IRC). La irradiación de tejidos o células con IRC permite minimizar efectos citotóxicos debidos a la absorción de luz por parte de los cromóforos presentes en los tejidos normales (Huang *et al.*, 2006).

Las AuNPs de formas diferentes a la esférica, que tienen por lo menos una banda APS ubicada en la región IRC, son las indicadas para la irradiación con IRC.

2. Se hace necesario implementar AuNPs funcionalizadas con biomoléculas especiales que permitan su reconocimiento e internalización específica por células cancerosas y no por las sanas. El calentamiento se genera de forma focalizada en las células cancerosas, donde se concentran las AuNPs, generándose hipertermia celular. En este sentido se espera que la terapia foto-térmica sea selectiva o dirigida a células cancerosas.

En la **Tabla 1** se muestra una revisión de trabajos dedicados a la TFP de células cancerosas implementando AuNPs.

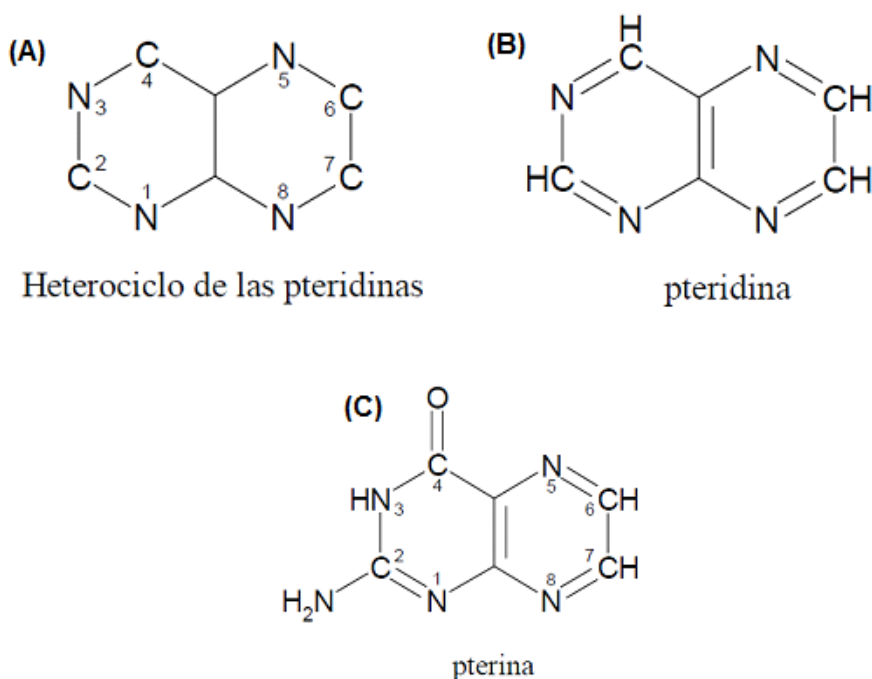
**Tabla 1.** Aplicación de la terapia TFP en células cancerosas con AuNPs.

<b>Características de la NP. Célula tratada con NP. Tiempo de tratamiento con NP.</b>	<b>Tipo de fuente, potencia y tiempo de Irradiación</b>	<b>Observaciones de la terapia FTP</b>	<b>Autor</b>
<p>-AuNB-anticuerpos monoclonales del receptor de factor de crecimiento anti-epidérmico.  <b>-Células tratadas:</b> epiteliales sanas (HaCat) y epiteliales orales cancerosas (HOC 313 clon 8 y HSC 3).  <b>-Tiempo de tratamiento:</b> 30 min</p>	<p><b>-Fuente:</b> láser rojo continuo a 800nm (cw Ti:sapphire)  <b>-Potencia umbral:</b> 80mW  <b>-Tiempo:</b> 4 min</p>	<p>Ambas células cancerosas sufrieron lesiones observadas al microscopio óptico por medio del ensayo de viabilidad con azul de trypan. Mientras que las células sanas no presentaron lesiones evidentes.</p>	<p>Huang <i>et al.</i>, 2006</p>
<p>-AuNP-anticuerpos monoclonales del receptor de factor de crecimiento anti-epidérmico.  <b>-Células tratadas:</b> HSC 3  <b>-Tiempo de tratamiento:</b>40 min</p>	<p><b>-Fuente:</b> láser de femtosegundos a 800nm (Ti: Sapphire)  <b>-Potencia:</b> 1,1 mW  <b>-Tiempo:</b> 2 min</p>	<p>Las células presentaron lesiones observadas al microscopio óptico por medio del ensayo de viabilidad con azul de trypan. Mientras que las células sanas no presentaron lesiones evidentes.</p>	<p>Huang <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>AuNB-AF  <b>-Células tratadas:</b> KB con receptores folato (RF) y NIH/3T3 sin RF  <b>-Tiempo de tratamiento:</b> 6 y 17h</p>	<p><b>-Fuente:</b> láser Ti:Sapphire con dos modos: cw y fs-pulsado a 765nm.  <b>-Potencia:</b> 60mW  <b>-Tiempo:</b> 81,4 s</p>	<p>Hipertermia detectada por bromuro de etidio.          6h de tratamiento las NPs se encuentran en la superficie celular -&gt; irradiación a 6mW: Hipertermia positiva. A 17h de tratamiento las NPs han entrado a las células -&gt; irradiación a 60mW: Hipertermia positiva. Las células NJH/3T3 No experimentan hipertermia a las mismas condiciones.</p>	<p>Tong <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>-AuNPs desnudas y AuNPs-citrato  <b>-Células tratadas:</b> HeLa  <b>-Tiempo de tratamiento:</b> 24h</p>	<p><b>-Fuente:</b> lámpara de Xenón (400-600nm)  <b>-Potencia:</b> monitoreada por un espectro-radiómetro.  <b>-Tiempo:</b> 5min</p>	<p>La viabilidad celular de las células alcanzó a estar por debajo del 20% con la máxima concentración de NPs empleada.          Las células no tratadas perdieron 10-15% de viabilidad.</p>	<p>Abdulla-Al-Mamun <i>et al.</i>, 2009</p>

## 1.6 PTERINAS

La estructura base de las pterinas está constituida por un anillo de pteridina, sustituido en la posición 2 por un grupo amino y en la posición 4 por un oxígeno (ver **Figura 6**). Este grupo fundamental se conoce como doble anillo pterínico

**Figura 6.** Estructuras químicas de (A) y (B) las pteridinas y (C) pterina (Thomas, 2001).

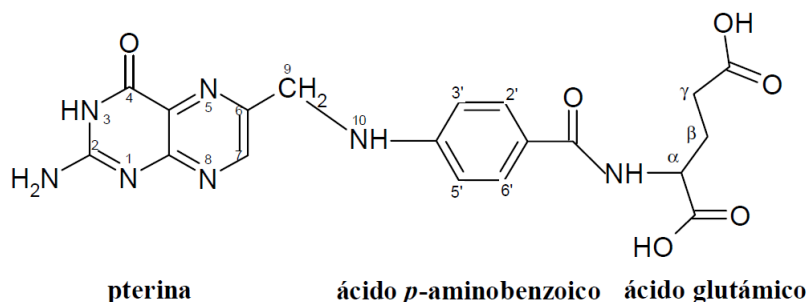


Fuente: THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingeniería.

En este sentido el ácido fólico (AF) puede ser considerado una pterina, ya que éste contiene una porción correspondiente al doble anillo pterínico. Así, en este trabajo de maestría se incluye al AF dentro del grupo de las pterinas. Sin embargo es de resaltar que el sustituyente en la posición 6 es mucho más grande que el de las

pterinas naturales, aportándole propiedades fisicoquímicas y bioquímicas diferentes a la de las demás pterinas. Este sustituyente está conformado por dos porciones: el ácido *p*-aminobenzoico y el ácido glutámico, ver **Figura 7** (Thomas, 2001).

**Figura 7.** Estructura química del ácido fólico.

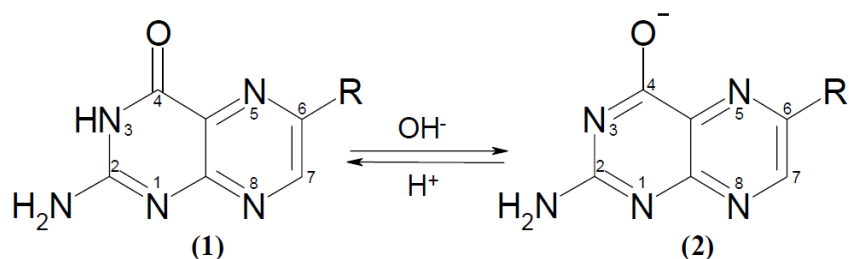


Fuente: THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingeniería.

### 1.6.1 Estudio de los equilibrios ácido –base por absorción en el UV-Vis de las pterinas.

El pH de las soluciones de pterinas determina las distintas formas ácido – base presentes, que difieren entre sí en la carga neta de la molécula. Existe un equilibrio importante conocido como el equilibrio amida-fenolato (ver **Figura 8**), donde se obtiene el fenolato al alcalinizar la solución. En este trabajo se optará la expresión “la forma ácida” cuando se haga alusión a la estructura (1) del equilibrio de la **Figura 8**, mientras que “la forma básica” se referirá a la (2) (Thomas, 2001).

**Figura 8.** Equilibrio amida-fenolato presente en todos los derivados pterínicos.

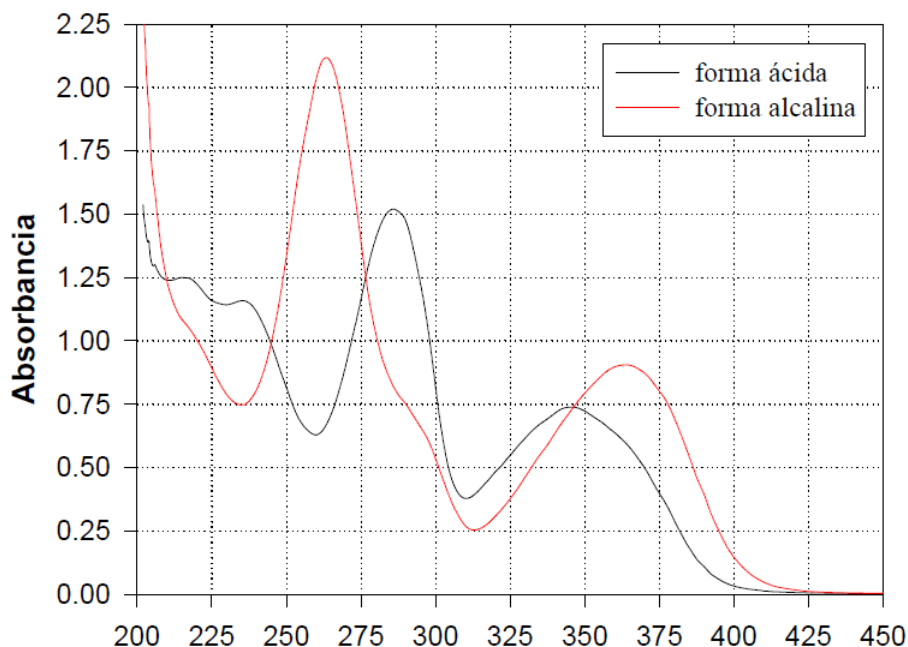


Fuente: THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingeniería.

#### 1.6.1.1 Ácido Pterina-6-carboxílico

En la **figura 9** se pueden observar los espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AP6C. Cabe aclarar que la forma básica del AP6C tiene carga neta -2, mientras que la ácida tiene carga neta de -1 por tener el carboxilo desprotonado, ver **anexo B** (Thomas, 2001).

**Figura 9.** Espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AP6C.



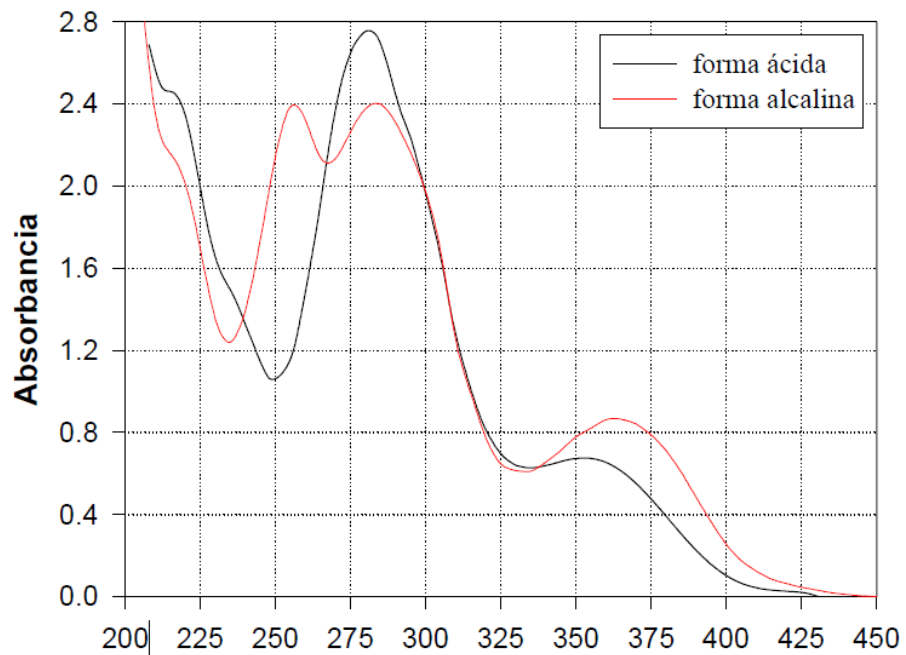
Fuente: THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingeniería.

### 1.6.1.2 Ácido Fólico

El AF, posee dos grupos carboxílicos en su posición de ácido glutámico que se encuentran ionizados en soluciones levemente ácidas, neutras o alcalinas. Estas dos cargas le proporcionan al AF una solubilidad muy alta en relación con las demás pterinas. Sin embargo al acidificarse la solución, la solubilidad disminuye fuertemente. Esto es debido a la protonación de los grupos carboxílicos, reduciendo la repulsión electrostática entre las moléculas de ácido fólico (Thomas, 2001).

En la **Figura 10** se muestran los espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AF.

**Figura 10.** Espectros UV-Vis de la forma ácida y básica del AF.



Fuente: THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingeniería.

## 2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON PTERINAS

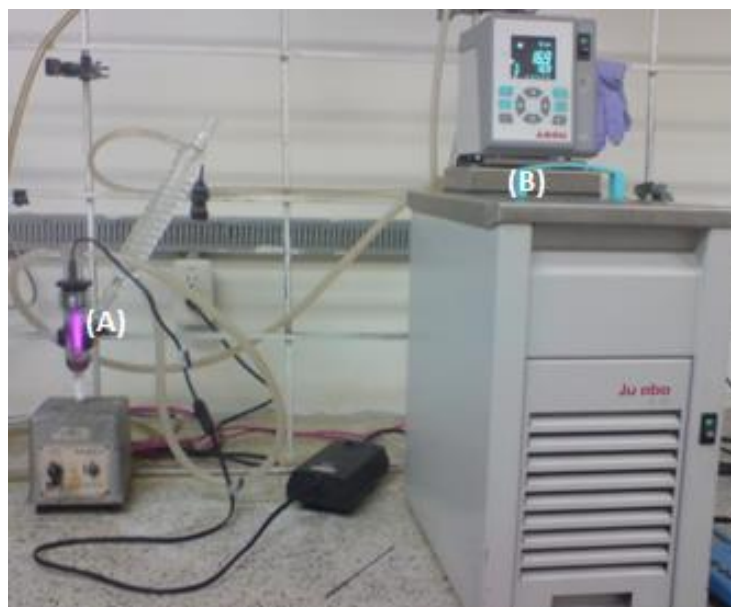
### 2.1 SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

#### 2.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro

Fara fines comparativos en este trabajo se sintetizaron, empleando un método fotoquímico, nanopartículas de oro desnudas y nanopartículas de oro funcionalizadas con pterinas.

Se utilizó un fotoreactor (**Figura 11A**) que permite el uso de una lámpara de longitud de onda de 254nm (UV P/N: 90-0012-01, Modelo 11SC-1, 5mW), colocada dentro de un tubo cilíndrico de cuarzo rodeado por una chaqueta que facilita la circulación de agua para mantener la temperatura a 19°C, mediante un baño termostatado (**Figura 11B**). Se adicionó al fotoreactor 300µL de una solución acuosa de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,01M) y 9,7mL de agua milliQ. Esta solución fue agitada e irradiada durante 45 min. El producto se designó: AuNPs desnudas (NPD).

**Figura 11.** Equipo usado en la síntesis fotoquímica de AuNPs y AuNP-pterinas. (A) Fotoreactor y (B) baño termostatado.



### 2.1.2 Síntesis fotoquímica y funcionalización de nanopartículas de oro – pterinas en una sola etapa

#### ✓ Nanopartículas de oro-ácido pterina-6-carboxílico.

Para esta síntesis se empleó el montaje del método fotoquímico de la **Figura 11**. Se mezcló una solución acuosa de AP6C (5mM, 336  $\mu$ L) con una solución acuosa de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,01M y 0,1M; 300 $\mu$ L) en el fotoreactor con agitación magnética. Se adicionó 9364 $\mu$ L de gua miliQ. La mezcla se ajustó a un pH=11 mediante la adición de una pequeña cantidad de solución NaOH 0,1M y posteriormente se irradió con la lámpara de 254 nm (5mW), durante 10, 25 y 45 minutos, con agitación magnética constante. La temperatura del baño termostatado fue de 19°C, con el fin de evitar reacciones adicionales no deseadas debido al calentamiento de la lámpara.

Las soluciones fueron llamadas AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 según la concentración de solución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  usada para la síntesis: 0,01M y 0,1M respectivamente.

✓ **Nanopartículas de oro-ácido fólico.**

Para esta síntesis se usó el mismo montaje del procedimiento anterior (ver **Figura 11**), siguiendo un procedimiento similar al reportado por Castillo *et al.*, 2012. Una solución acuosa (330 $\mu\text{L}$ ) de AF 5mM se mezcló con 9370 $\mu\text{L}$  de agua miliQ en el foto-reactor de cuarzo. Posteriormente, una solución acuosa (300 $\mu\text{L}$ ) de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,01M se adicionó al micro reactor. La mezcla se irradió con una lámpara UV de 254nm (5mW) por 10 minutos con agitación magnética constante. Durante la irradiación la temperatura se mantuvo a 19°C, mediante el baño termostataado.

Por último se ajustó el pH de la mezcla de reacción, adicionando una pequeña cantidad de una solución de NaOH 0,1mM, hasta un pH de 10,41.

El producto de esta reacción se designará en adelante con el nombre de AuNP-AF.

## **2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO CON Y SIN FUNCIONALIZACIÓN**

### **2.2.1 Caracterización espectroscópica**

Se tomaron espectros UV-Vis de las soluciones de AuNPs, AuNP-pterinas y pterinas depositadas en celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud, en la región de 200 a 900 nm, utilizando un espectrómetro Shimadzu de doble canal modelo 2401PC. Para

los análisis por fluorescencia de las soluciones de pterinas y de AuNP-pterinas se utilizó un Espectrofluorímetro Perkin Elmer L-55, empleando celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud. Unas gotas de las soluciones de pterinas y de las AuNP-pterinas fueron depositadas en el diamante porta-muestras de un equipo Nicolet IS50 FT-IR: S/N AuP1300181 y secadas al aire para mediciones IR-ATR. Todos los espectros fueron graficados y analizados por el software OriginPro 8.5.

### **2.2.2 Determinación de potencial z y tamaño por dispersión dinámica de la luz**

Se realizaron mediciones de potencial z y tamaño de partícula en un equipo Zetasizer Nano, para cada solución de AuNPs y AuNP-pterinas preparadas.

### **2.2.3 Caracterización microscópica**

Se obtuvieron imágenes de las AuNPs y AuNP-pterinas utilizando un microscopio electrónico de barrido Quanta™ 650 FEG empleando dos detectores: Everhart-Thornley (ETD) y electrones retrodispersados (BSE). Se realizó un análisis elemental de las AuNP-pterinas mediante la Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (Energy Dispersive X-rays Spectroscopy, EDS).

## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La discusión tiene enfoques tales como: efectos del pH, tiempo de irradiación UV y concentración de la sal precursora, en la síntesis de las nanopartículas de oro funcionalizadas con AP6C usando un método fotoquímico. Esto se hará analizando las medidas de tamaño de partícula, potencial Z y banda APS de las NPs preparadas. Igualmente, se hará un estudio de la estabilidad de las AuNP-Pterinas en función del tiempo después de la síntesis midiendo el potencial Z, el tamaño por DLS y espectro UV-Vis.

Los análisis IR, fluorescencia, y EDS fueron usados para obtener información acerca de la interacción de las nanopartículas de oro con las pterinas.

La estabilidad será un tema importante, por lo cual se hace necesario definir algunos conceptos claves. Para fines de este trabajo de investigación se adoptará la terminología usada por Whitesides *et al.*, 1996, que emplea el término de “floculación” para describir una dispersión coloidal inestable, el de “aglomeración” para los casos sueltos de asociación reversible de nanopartículas, y “agregación” como la asociación irreversible. Se conoce como “floc” a una asociación de algunas partículas primarias, agregadas y/o aglomeradas. La floculación consiste en el proceso de formación de “flocs”.

### 2.3.1 Análisis de las AuNP desnudas

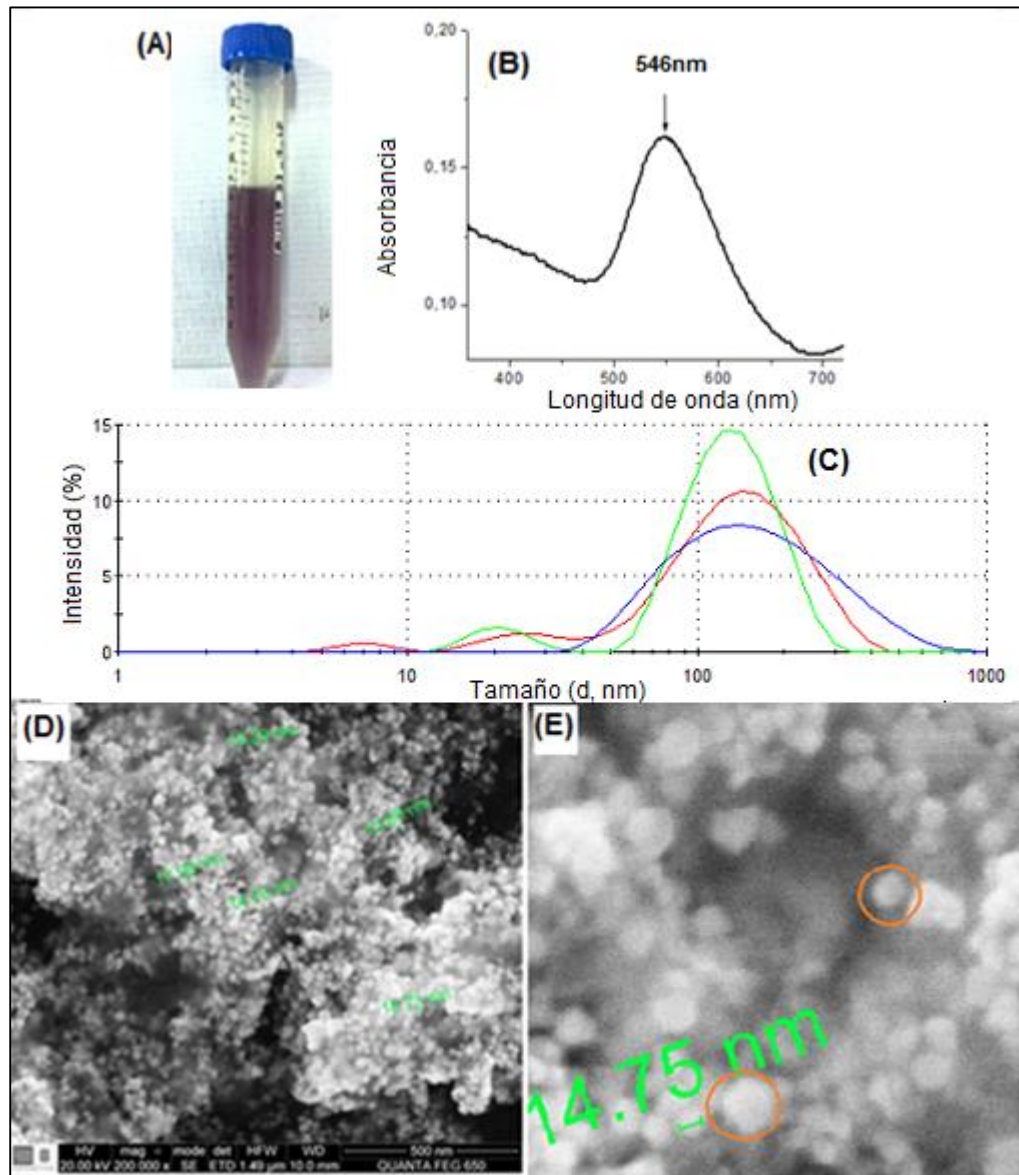
Las AuNP desnudas (NPD) fueron sintetizadas con fines comparativos en relación con las AuNP-pterinas. La principal característica de estas NP es que no cuentan con un agente estabilizante. Las partículas revelan un potencial Z de  $\approx 0 \pm 0,19$  mV en solución. Este resultado indica que la densidad de carga superficial de la NP es muy baja.

El espectro UV-Vis (ver **Figura 12B**) de las NPD muestra una banda APS a 546nm, confirmando la presencia de AuNP esféricas. Una imagen SEM (ver **figura 12E**) permitió observar una morfología que podría aproximarse a una esfera.

La distribución de tamaño por DLS (**Figura 12C**) permite observar la presencia de partículas con tamaños variados en la solución, con máximos en  $153,2 \pm 71,0$  nm y

25,8±7,0 nm (para el gráfico rojo). La micrografía de la **Figura 12D** muestra que las NPDs se encuentran formando *flocs* de gran tamaño. Esto explicaría los tamaños grandes de partículas determinados por DLS.

**Figura 12.** Características de las NPDs. (A) Fotografía de la solución de NPDS. (B) Espectro UV-Vis. (C) Distribución de tamaño por DLS (triplicado). (D) Imagen SEM. (E) Ampliación de una zona de la imagen D.

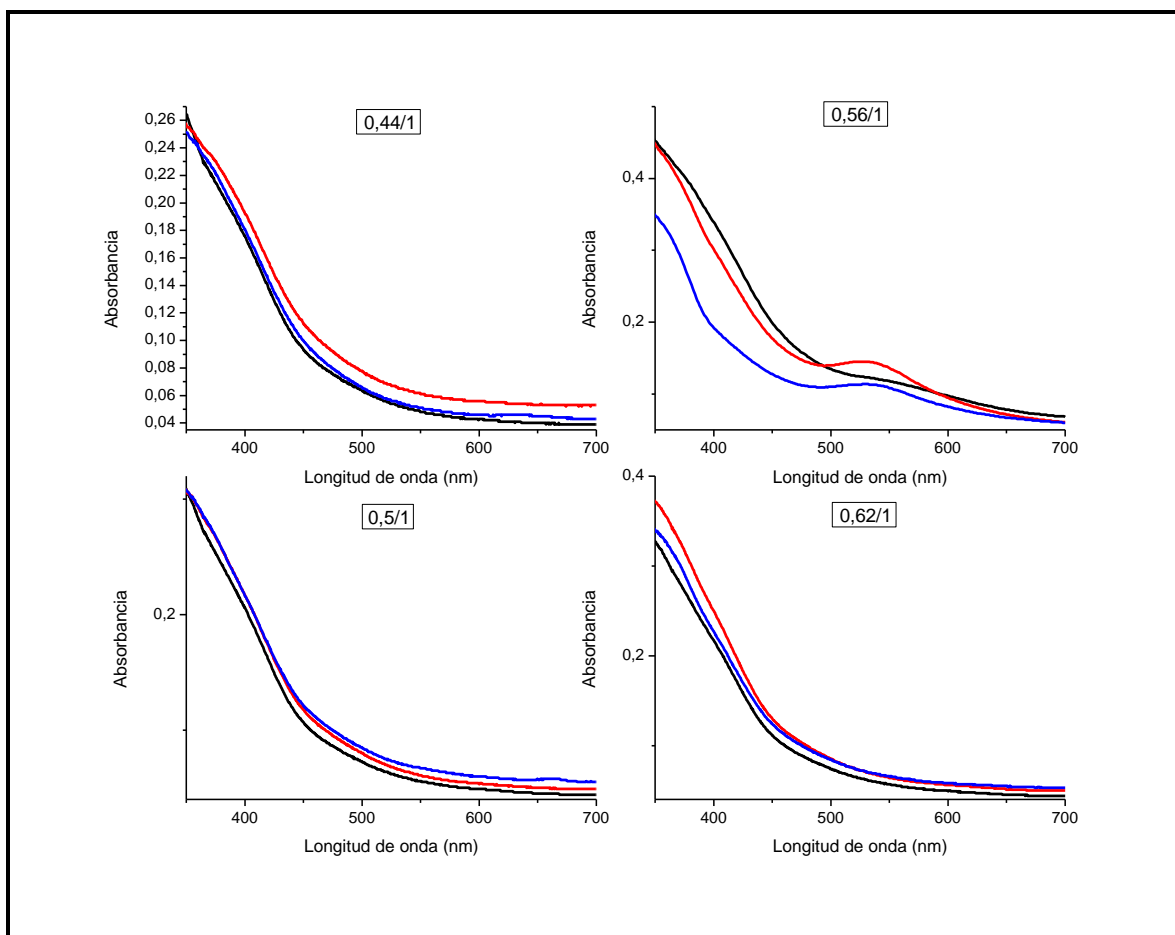


## **2.3.2 Análisis de la síntesis de AuNP-AP6C**

### **2.3.2.1 Efecto de la relación molar AP6C/HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O en la síntesis de AuNP-AP6C1**

Para evaluar el efecto de la relación molar AP6C/HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O se usaron 4 relaciones molares: 0,44/1; 0,50/1; 0,56/1 y 0,62/1 para la síntesis de AuNP-AP6C1, donde la mezcla de reacción se mantuvo a pH ácido (~4). El análisis UV-Vis de los productos permitió identificar la banda APS, característica de las nanopartículas, sólo para el caso de la relación molar: 0,56/1 para 25 y 45 min de irradiación, ver **Figura 13**.

**Figura 13.** Espectros UV-Vis de los productos de la síntesis de AuNP-AP6C1 con relaciones molares de AP6C/HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O de 0,44/1; 0,56/1; 0,50/1 y 0,62/1. Los espectros negro, azul y rojo indican tiempos de irradiación UV de 10, 25 y 45 min respectivamente.



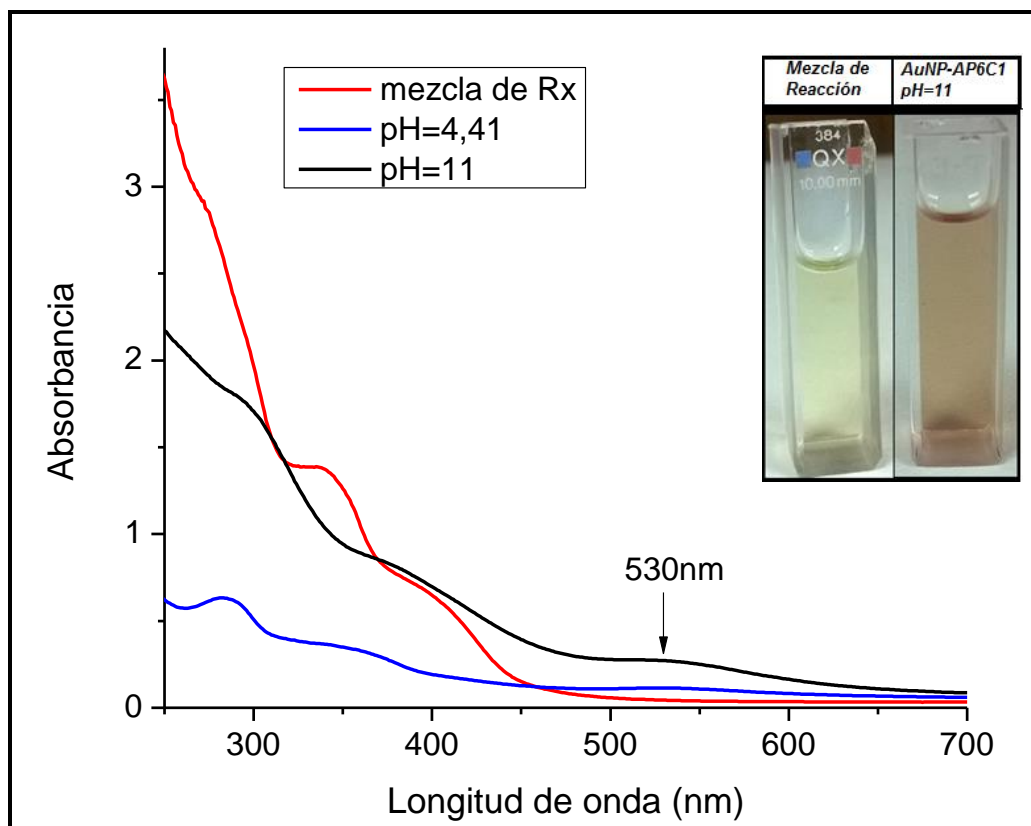
### 2.3.2.2 Efecto del pH en la absorbancia UV-Vis y en el tamaño de las AuNP-AP6C1.

El espectro UV-Vis de la mezcla de reacción antes de ajustar pH y de realizar la irradiación (ver **Figura 14**), permite ver como el AP6C a temperatura ambiente no tiene poder reductor alguno, al no evidenciarse formación de una banda APS. El espectro fue medido 4h después de realizar la mezcla de los reactivos. La banda APS solo es apreciada cuando la mezcla de reacción es irradiada. Y cómo se vio en la **Figura 13** para la relación molar 0,56/1 la banda APS aumenta su intensidad

cuando el tiempo de irradiación aumenta. Así, se puede decir que la radiación UV está cumpliendo un papel importante en la reducción del  $\text{Au}^{3+}$  a  $\text{Au}^0$ .

El pH de la mezcla de reacción para producir AuNP-AP6C1 se ajustó a 4,41 y 11 utilizando una solución de NaOH 0,1M. Estas mezclas se irradiaron durante 45min. Los espectros UV-Vis de los dos productos muestran que el aumento del pH hasta 11, causa un pequeño aumento en la intensidad de la banda a 530nm, lo que podría indicar una mayor formación de las Nanopartículas, ver **Figura 14**.

**Figura 14.** Espectros UV-Vis de soluciones de AuNP-AP6C1 a pH ácido y básico de la mezcla de reacción, medidos 13 h después de la síntesis.

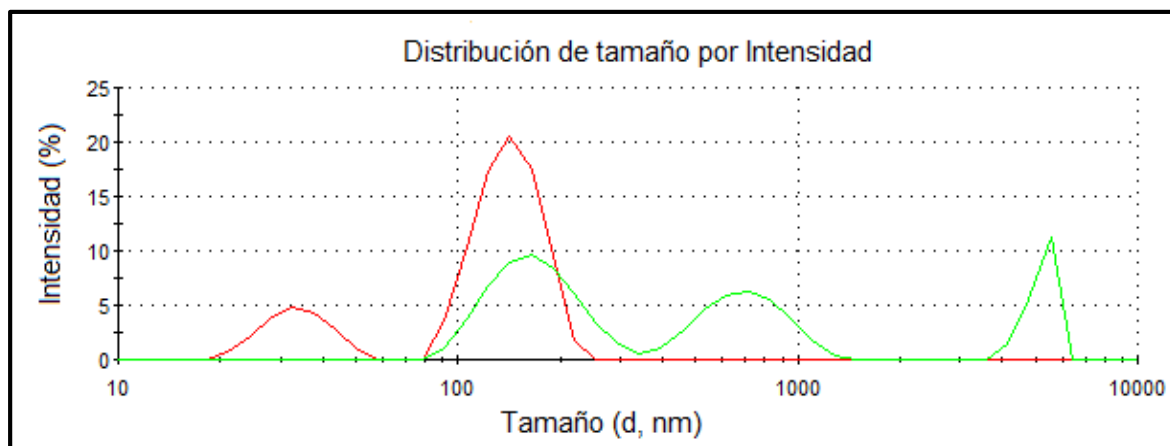


La solubilidad del AP6C en agua aumenta a medida que el pH es más básico. Un aumento de pH hasta 11 causa la desprotonación del grupo carboxílico de la posición 6 del doble anillo y la aparición de la especie fenolato del mismo anillo, manteniendo el AP6C una carga neta de -2. Así, a un pH=11 se tiene que las moléculas de AP6C se repelen entre sí, disminuyendo su interacción y permitiendo una mejor interacción entre las especies  $[\text{Au}^{3+}\text{Cl}_4]^-$  y AP6C.

En este sentido, al ser el pH determinante en la cantidad de AuNP-AP6C1 formadas, entonces el AP6C debería estar interviniendo en el proceso de reducción de especies de oro. El AP6C podría reducir especies  $\text{Au}^{m+}$  (con  $m+=3+, 2+, 1+$ ) excitadas por la radiación UV, tal como lo sugiere Eustis *et al.*, 2005 para el caso de la preparación de AuNP usando  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , etilenglicol e irradiación ( $\approx 250\text{-}400\text{nm}$ ). Estos autores sugieren que el etilenglicol puede reducir especies de oro a temperatura ambiente gracias a la excitación causada por la radiación, el mecanismo propuesto se muestra en el **anexo A**.

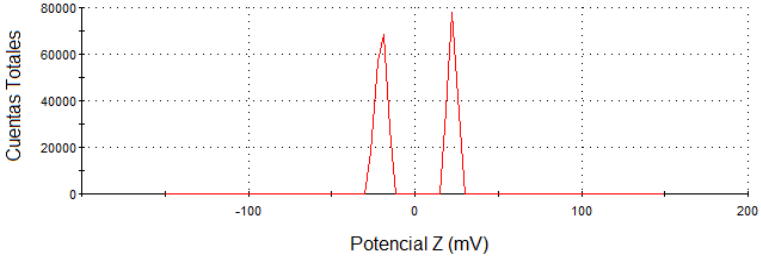
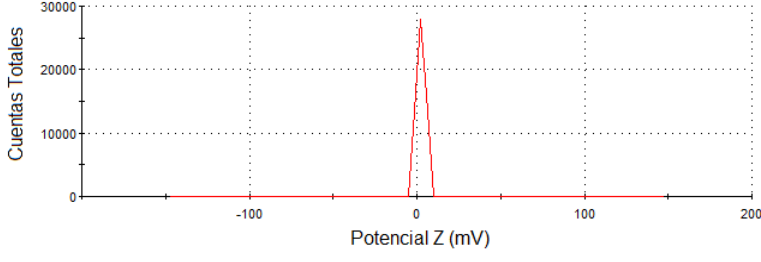
Por medio del análisis de tamaño obtenido por el Zetasizer Malvern se pudo deducir que un incremento del pH de la mezcla de reacción de 4,41 a 11 conduce a la formación de partículas más pequeñas (un grupo de nanopartículas), ver **Figura 15**.

**Figura 15.** Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C1, obtenida a pH=11 y 4,41 indicada con los colores rojo y verde respectivamente.



El potencial Z de las AuNP-AP6C1 (ver **Tabla 2**) sintetizadas a pH ácido evidencia dos grupos de cargas: una positiva y otra negativa. La única fuente de cargas positivas es el AP6C, que a este pH=4,41 se puede encontrar en una pequeña proporción en su forma catiónica con carga neta (+1). Las cargas negativas podrían ser aportadas por especies de  $[AuCl_2]^-$  y por la especie iónica del AP6C con carga neta (-1), ver formas iónicas del AP6C según el pH en el **anexo B**. Sin embargo, el promedio del potencial Z arroja un valor de  $\approx 0$ , entendiéndose que se produce una compensación entre cargas negativas y positivas.

**Tabla 2.** Potencial Z de AuNP-AP6C1 a pH ácido y básico.

pH mezcla de reacción AuNP-AP6C1	Distribución del potencial Z de las AuNP-AP6C1 por DLS
4,41	
11	

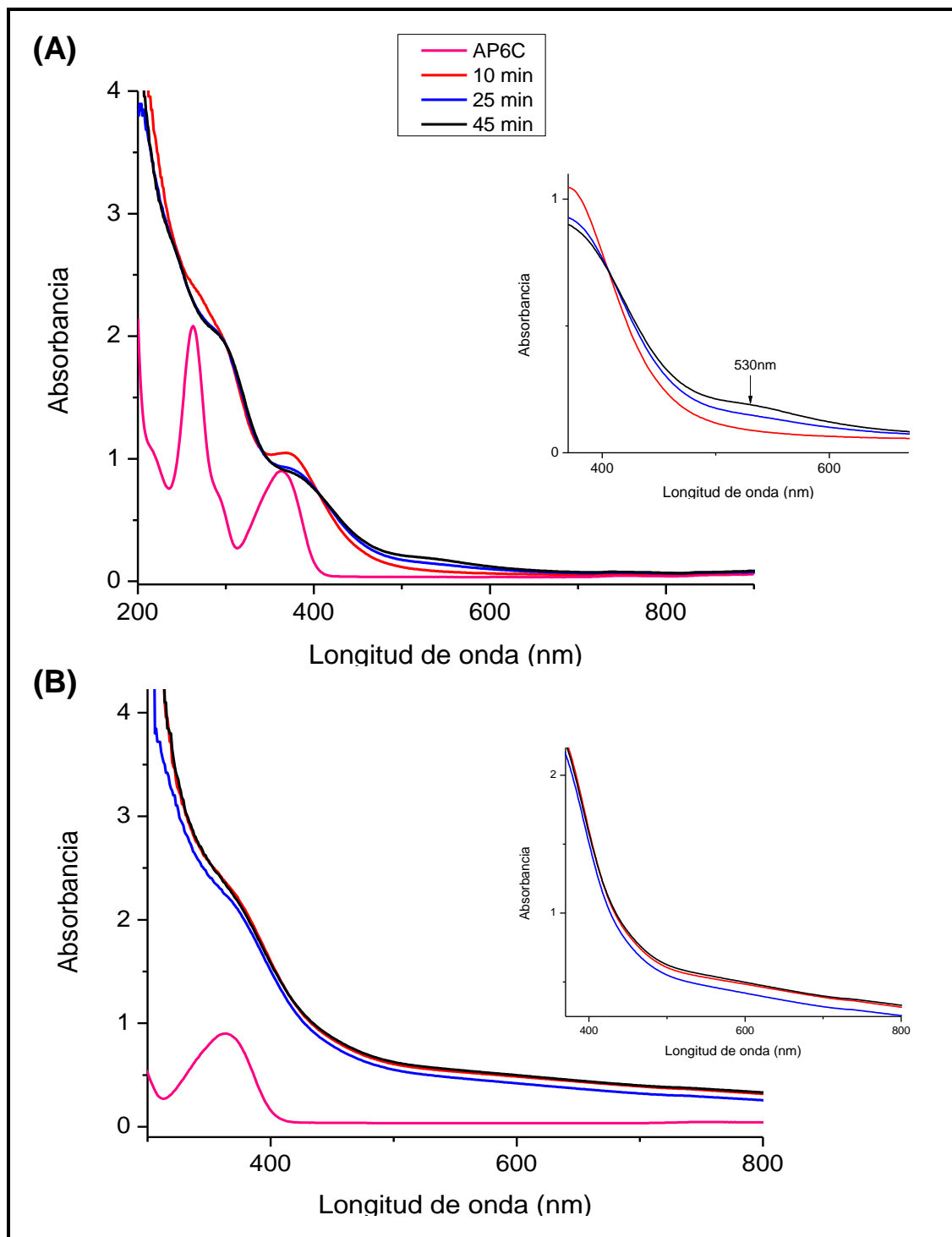
La carga superficial de las AuNP-AP6C1 (ver **Tabla 2**) sintetizadas a pH básico presentan un grupo de cargas con pico máximo en cero, es decir la densidad de cargas es muy baja.

### **2.3.2.3 Estudio comparativo de dos concentraciones de ácido tetracloroaurico empleadas en la síntesis de nanopartículas de oro-ácido pterina-6-carboxílico a pH 11.**

Para la síntesis de Nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido pterina-6-carboxílico (AuNP-AP6C) se emplearon dos soluciones de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : de 0,01M y 0,1M. Se usó el método fotoquímico, utilizando cada solución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  para mezclas de reacción diferentes. El pH de cada mezcla de reacción fue ajustado a 11, previo a la irradiación (10, 25 y 45 min), debido a que a éste pH el AP6C es totalmente soluble en agua y conduce a la formación de NPs más pequeñas. La reacción fue monitoreada por UV-Vis. Los espectros UV-Vis de los productos a los diferentes tiempos de irradiación se muestran en la **Figura 16A**.

La síntesis de AuNP-AP6C1 mostró una dependencia directa entre la intensidad de la banda APS, traducida en una mayor producción de NPs, con el tiempo de irradiación, de tal forma que con 10min de irradiación no se observa una formación evidente de NPs al no apreciarse la banda APS en el espectro UV-Vis (ver **Figura 16A**). Al aumentar el tiempo de irradiación hasta 25 min empieza a notarse la banda ASP, mientras que a los 45 min de irradiación se obtiene una banda mejor definida a 530nm.

**Figura 16.** Seguimiento de la foto-reacción de (A) AuNP-AP6C1 y (B) AuNP-AP6C2, espectros UV-Vis medidos 13 h después de la síntesis.



En contraste con las AuNP-AP6C1, la síntesis de AuNP-AP6C2 no evidencia una relación directa con el aumento del tiempo de irradiación. Los espectros UV-Vis (ver **Figura 16B**) muestran una banda ancha y de baja intensidad para los tres tiempos de irradiación.

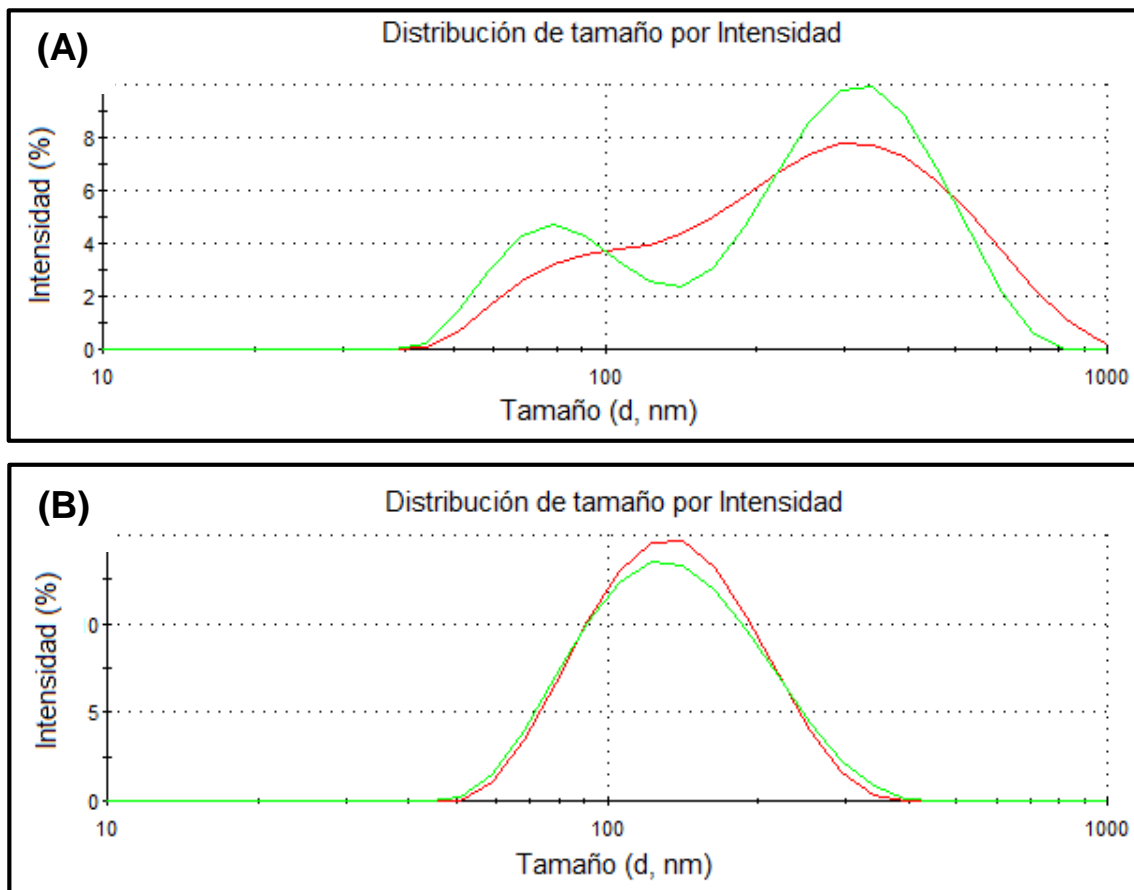
El potencial Z de las AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2, obtenidas con 25 y 45 min de irradiación respectivamente, es muy cercano a cero para ambos (ver **Tabla 3**).

Cuando se aumenta el tiempo de irradiación a 45min la dispersión de tamaño de partícula muestra una definición de dos grupos de partículas en la síntesis de AuNP-AP6C1 (ver **Figura 17**). Uno de los grupos se ubica en el rango de las NPs, indicando entonces que el aumento en el tiempo de irradiación favorece la formación de NPs. Estas observaciones están en concordancia con los resultados UV-Vis, en donde la banda APS es de mayor intensidad para las AuNP-AP6C1 irradiadas durante 45min que para las obtenidas al irradiar por 10 min. En contraste, la distribución de tamaño para las AuNP-AP6C2 se mantiene muy similar para los dos tiempos de irradiación. Por esta razón se consideró suficiente un tiempo de irradiación de 45min y de 25min para las síntesis de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 respectivamente.

**Tabla 3.** Potencial Z de soluciones de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 obtenido por Zetasizer Malver. Medidas 13 h después de la síntesis.

Tiempo de Irradiación [min]	Potencial Z (mV)	
	Soluciones de AuNP-AP6C1	Soluciones de AuNP-AP6C2
25	0±0,5	0±0,4
45	-0,2±0,2	-0,2±0,1

**Figura 17.** Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para las soluciones de (A) AuNP-AP6C1 y (B) AuNP-AP6C2. En rojo se tienen los resultados para 25 min de irradiación y en verde para 45 min.



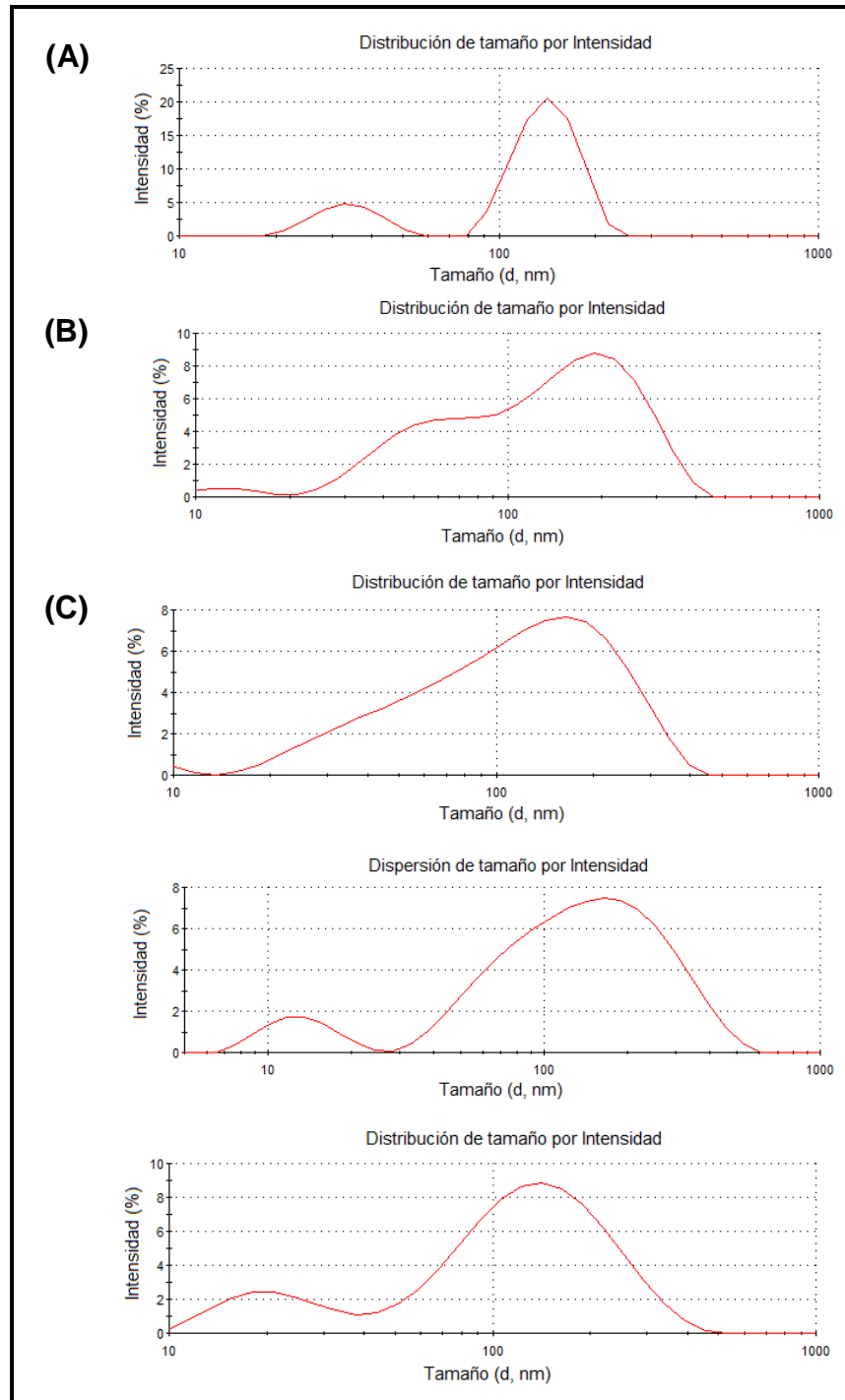
#### 2.3.2.4 Análisis del tamaño y estabilidad de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 con el paso del tiempo por DLS

Se le hizo un seguimiento a las soluciones de AuNP-AP6C1 y de AuNP-AP6C2, midiendo el tamaño de partícula y el potencial Z mediante la técnica DLS transcurridas varias horas después de la síntesis, ver **Tabla 4**. La solución de AuNP-AP6C1 muestra ser una dispersión estable en el tiempo sin evidencia de floculación hasta por más de 6 meses. Mientras que la solución de AuNP-AP6C2 presenta floculación apreciable con tan sólo 3 días de síntesis (ver **anexo C**), siendo así la solución de AuNP-AP6C2 catalogada como una solución coloidal inestable. El potencial Z de las dos soluciones continúa cercano a cero con el paso del tiempo, ver **Tabla 4**, aunque sí existen cambios en la distribución de tamaño de partícula.

Se puede observar en la **Figura 18** como en la distribución de tamaño de las AuNP-AP6C1 tiende a aparecer una proporción de nanopartículas más pequeñas con el aumento de las horas, alrededor de 10nm, comparada con la solución inicial. La solución de AuNP-AP6C1 intensifica su coloración con el paso del tiempo (ver **anexo D**). Estos son indicios de que la producción de nanopartículas continúa con el tiempo.

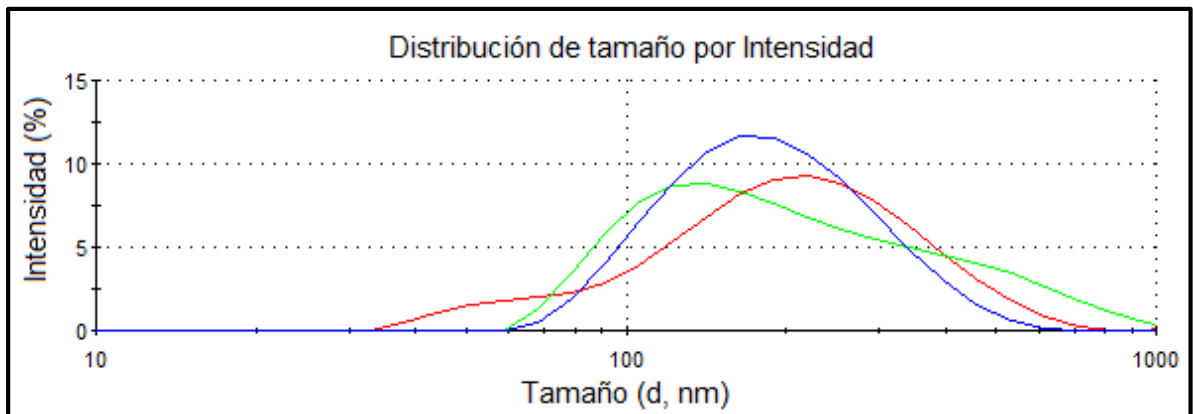
Por otro lado la distribución de tamaños de las AuNP-AP6C2 en el tiempo (ver **Figura 19**) muestra la definición de una sola banda, perdiéndose una población de partículas grandes. Esto último está en concordancia con el hecho de que a partir de 38 h se nota la aparición de un precipitado en la solución de AuNP-AP6C2 y por ende el sobrenadante analizado está libre de éstas partículas grandes que se agregaron hasta precipitar.

**Figura 18.** Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C1, medida a las 13, 38, 158, 230 y 350 h (A-E).



Ahora, al analizar lo que sucede con el espectro UV-Vis de la solución de AuNP-AP6C1 al transcurrir el tiempo (ver **Figura 20**), una vez terminada la síntesis, se ve cómo la intensidad de la banda APS aumenta sin observar un corrimiento de la banda. Eustis *et al.*, 2005 observaron que la intensidad del plasmón (a 545nm) de soluciones de AuNP, sintetizadas con excitación continua (250-400nm) en etilenglicol y polivinilpirrolidona, aumentaba con el paso de las horas sin afectar la posición de la banda APS, después de finalizada la síntesis. Ellos siguieron el plasmón hasta trascurridas 44,7h. En este caso el seguimiento se hizo hasta 230h observando de forma similar un incremento progresivo de la intensidad. Así, se puede inferir que la población de nanopartículas incrementa en el tiempo, estando en concordancia con los resultados obtenidos por el análisis de tamaño por DLS.

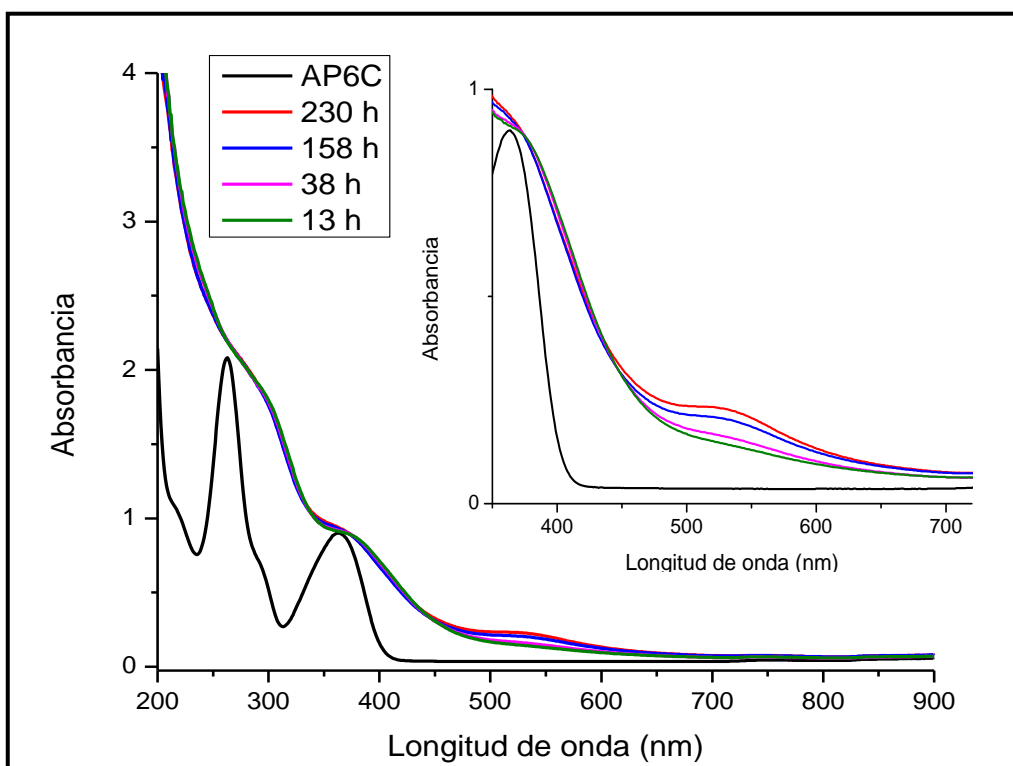
**Figura 19.** Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AP6C2, medida a las 13, 38 y 158 h indicada con los colores rojo, verde y azul respectivamente.



**Tabla 4.** Potencial Z (PZ) de las soluciones de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 tiempo después de su síntesis.

Horas	PZ de AuNP-AP6C1 (mV)	PZ de AuNP-AP6C2 (mV)
13	-1,0±0,3	0±0,7
38	0,2±0,7	0±0,4
158	-0,1±0,4	0±0,3
230	0,3±0,6	No fue medido*

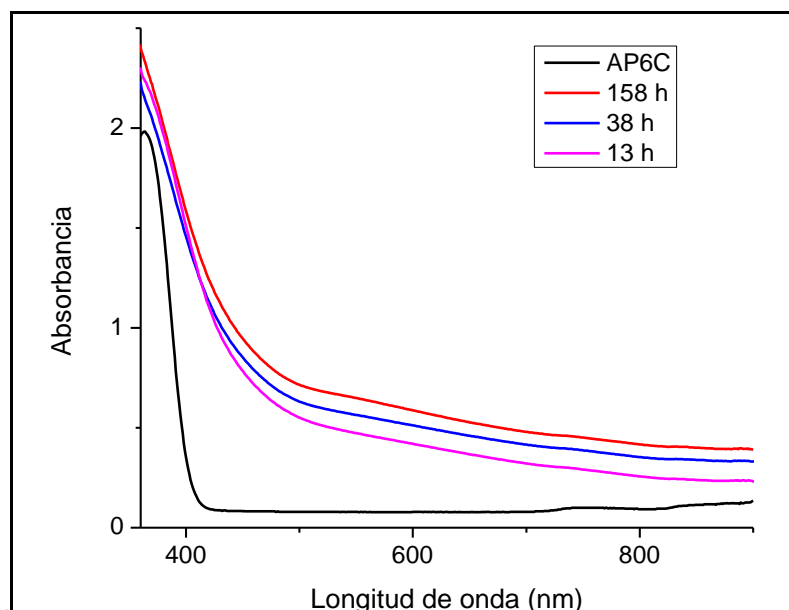
**Figura 20.** Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AP6C1 tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.



En el caso de los espectros UV-Vis obtenidos para la solución de AuNP-AP6C2 al transcurrir las horas (ver **Figura 21**), se puede confirmar que no existe formación

progresiva de NPs, como si ocurría para las AuNP-AP6C1. El espectro para los distintos tiempos de las AuNP-AP6C2 es similar.

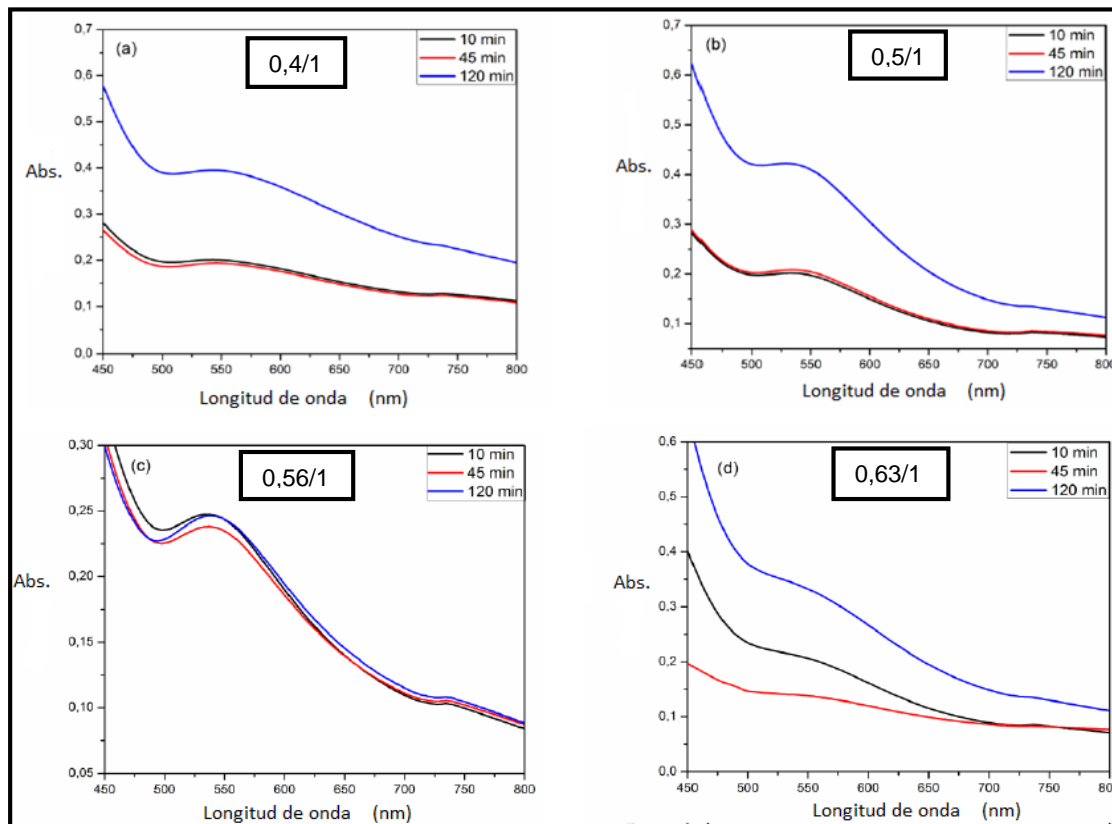
**Figura 21.** Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AP6C2 tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.



### 2.3.3 Análisis de las AuNP-AF

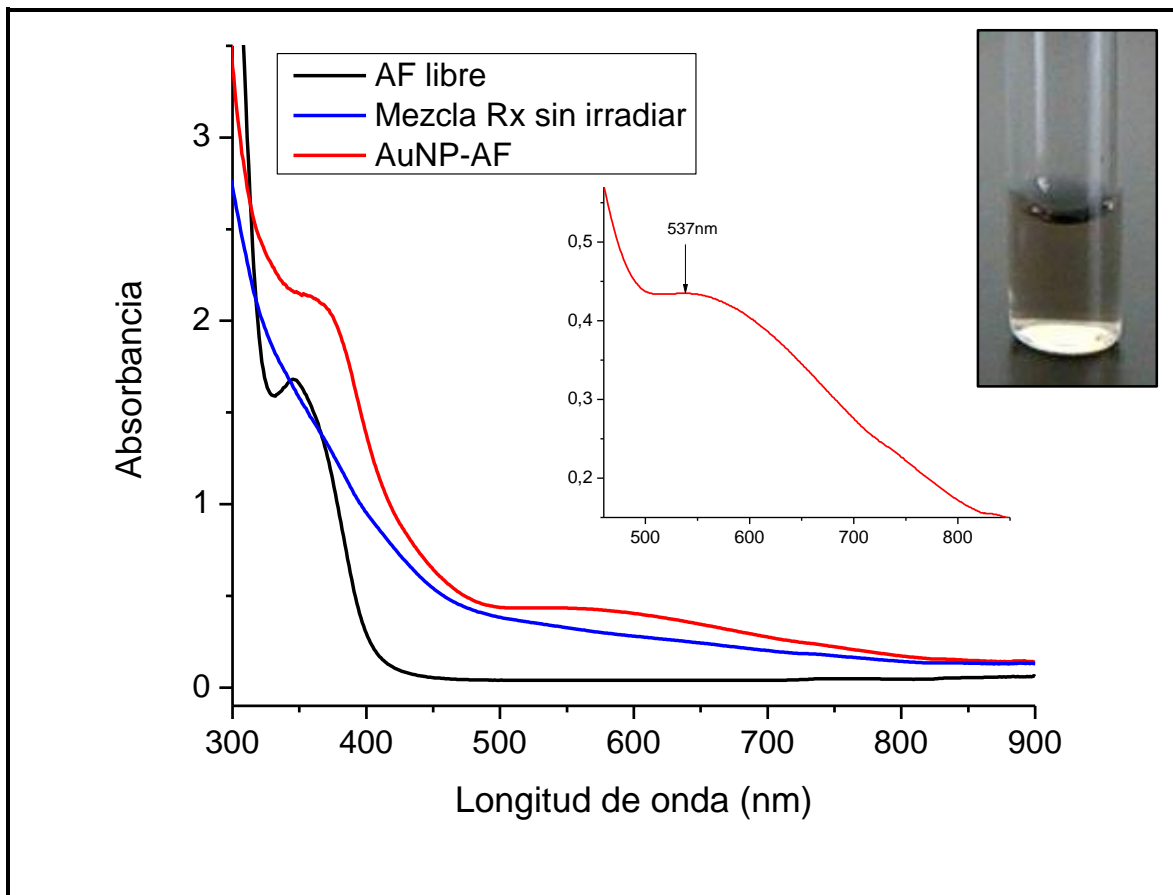
La síntesis de las AuNP-AF se realizó a pH ácido, variando la relación molar AF/HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,4/1; 0,50/1; 0,56/1 y 0,63/1). Los espectros UV-Vis (ver **Figura 22**) permitieron observar la aparición de la banda APS en todos los casos; sin embargo es de notar que con la relación 0,56/1 se obtiene una banda más pronunciada con tan solo 10 min de irradiación. La aparición de una pequeña banda alrededor de 750nm puede ser atribuida a la presencia de *flocs*, que se hacen visibles en la solución, tal como lo demostraron Toma *et al.*, 2010. Estos autores encontraron que las soluciones de AuNPs estabilizadas con citrato sufren un proceso de floculación lento responsable de la aparición de una banda de plasmón de acoplamiento por encima de 700nm.

**Figura 22.** Espectros UV-Vis de soluciones de AuNP-AF sintetizadas a diferentes relaciones molares de AF/HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O: 0,4/1; 0,5/1; 0,56/1 y 0,63/1.



Luego de ajustar el pH a 10,41 de la solución de AuNP-AF (relación 0,56/1) se logró redissolver algunos *flocs* que se habían hecho evidentes (ver **anexo E**) y el espectro UV-Vis fue tomado (ver **Figura 23**, imagen interior), en éste se puede apreciar la banda APS a 537nm. Esta banda APS abarca longitudes de onda en el visible y del infrarrojo cercano, pudiendo indicar la presencia de una distribución heterogénea de partículas (en tamaño y forma), debido a que las absorciones en el infrarrojo son propias de nanopartículas de formas diferentes a la esférica (Huang *et al.*, 2008).

**Figura 23.** Espectros UV-Vis de soluciones de AF libre, mezcla de reacción antes de irradiación UV y AuNP-AF. Imagen interna: banda APS de las AuNP-AF y la fotografía de la solución de AuNP-AF.



En la **Figura 23** puede observarse que la radiación UV de la mezcla de reacción permite la formación de una banda APS más significativa que la absorción de la mezcla sin irradiar (ver el color de la mezcla de reacción en el **anexo E**) en la misma región del espectro. Además la irradiación UV hace posible que se conserve la banda del AF libre (de la región 300-400nm), aunque desplazada a 364nm. Hay que tener en cuenta que tanto el pH del AF libre y de la mezcla de reacción es ligeramente ácido mientras que el de la solución de AuNP-AF es básico. Se conoce que los espectros de la forma ácida y básica de las pterinas son un poco diferentes. La banda mencionada para el AF básico siempre está corrida hacia el rojo con respecto a la del AF ácido (Thomas, 2001).

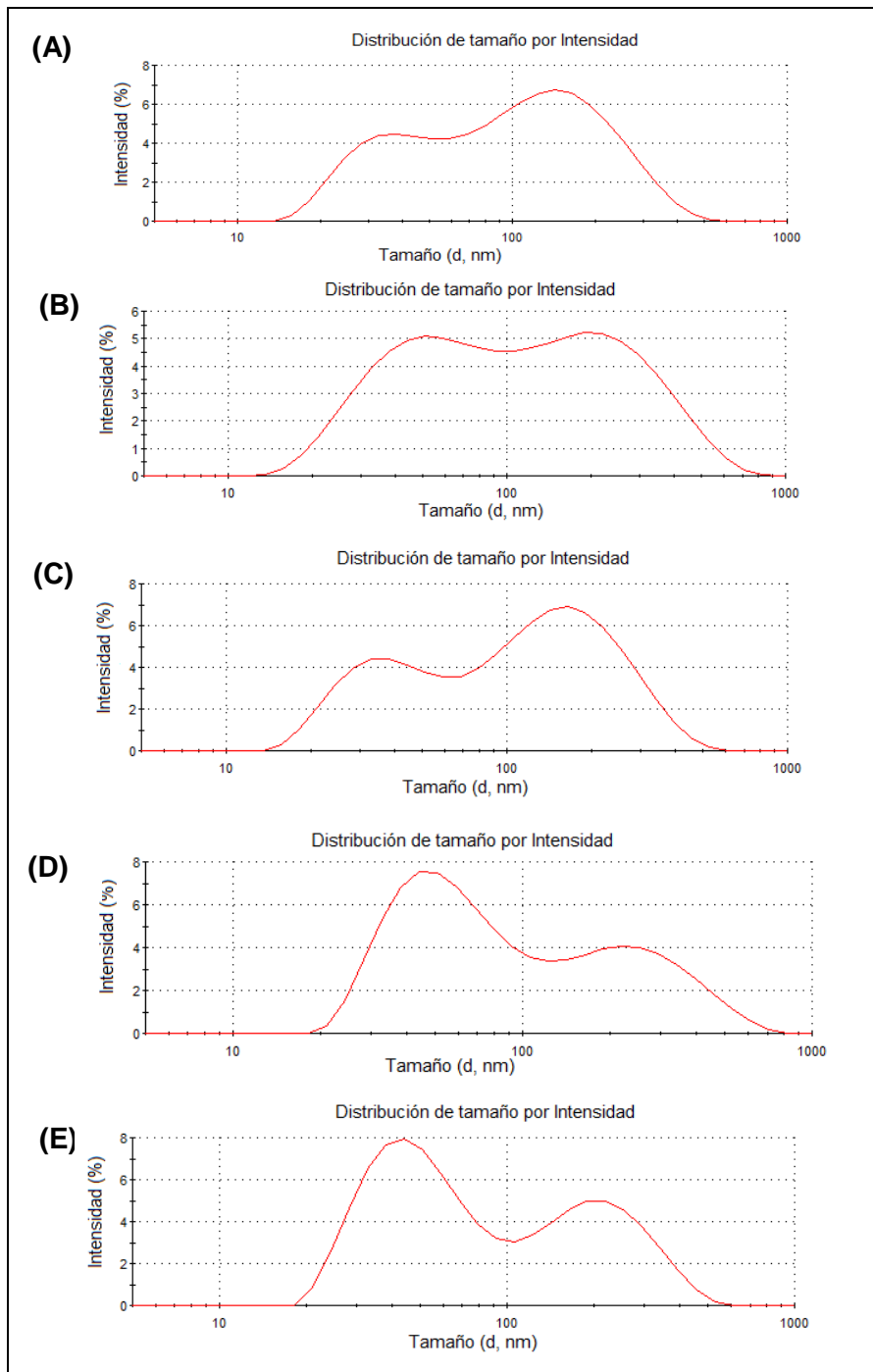
### 2.3.3.1 Análisis del tamaño y estabilidad de AuNP-AF con el paso del tiempo por DLS.

La solución de AuNP-AF fue seguida en el tiempo después de su síntesis por medio de mediciones en el equipo Zetasizer de tamaño y potencial Z. Así, se obtuvieron las distribuciones de tamaño presentadas en la **Figura 24**.

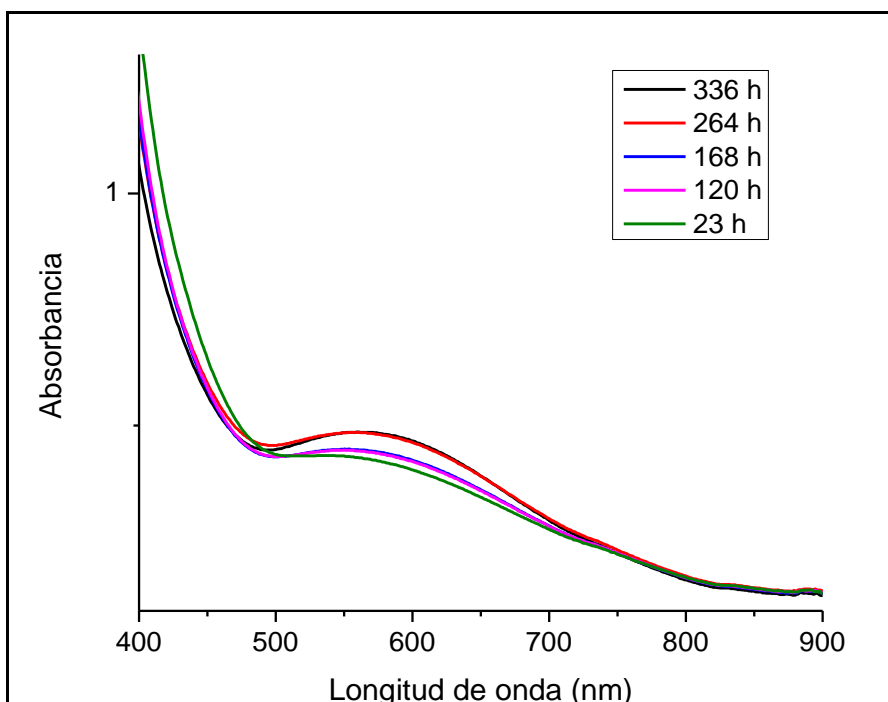
Las distribuciones de tamaño por DLS, obtenidas para diferentes tiempos después de la síntesis de AuNP-AF, evidencian la formación progresiva de nanopartículas después de finalizada la síntesis. Esto se correlaciona con el seguimiento de la banda APS en la **Figura 25**. Este resultado es congruente con los resultados obtenidos por Eustis *et al.*, 2005 en su estudio de AuNPs sintetizadas fotoquímicamente. Adicionalmente, se puede ver en la **Figura 25** que al llegar a 264h la intensidad de la banda APS se estabiliza y no continúa aumentando para el tiempo de 336h. Las soluciones de AuNP-AF permanecen sin precipitado hasta un poco más de 3 meses.

El potencial Z de las soluciones a diferentes tiempos se mantiene cercano a cero, ver **Tabla 5**, de forma similar para el caso de la solución de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2, ver forma iónica .del AF A pH=10,41 en el **anexo F**.

**Figura 24.** Distribución de tamaño por Intensidad medida por DLS para la solución de AuNP-AF, medida a las 23, 120, 168, 264 y 336 h (A-E).



**Figura 25.** Espectros UV-Vis de la solución de AuNP-AF tomados a diferentes tiempos después de la síntesis.



**Tabla 5.** Potencial Z de las soluciones de AuNP-AF tiempo después de su síntesis.

Horas	Potencial Z de AuNP-AF [mV]
23	0,3±0,7
120	0,4±0,4
168	0,2±0,1
264	0,3±0,6
336	0,4±0,7

Aunque algunas condiciones de reacción se mantuvieron constantes (relación pterina/ácido tetracloroáurico, temperatura del baño y presencia de radiación UV) en la preparación de las AuNP-AF y AuNP-AP6C1, las AuNP-AF presentaron una

banda APS mejor definida que la de las AuNP-AP6C. Este resultado indica que la estructura de la pterina es importante en la formación de AuNP-Pterinas.

El AF es un mejor agente reductor que el AP6C, como pudo apreciarse en el análisis UV-Vis de las mezclas de reacción (sin irradiación UV) de cada NP preparada. Este hecho favorece la formación de AuNP-AF, en relación a las AuNP-AP6C1.

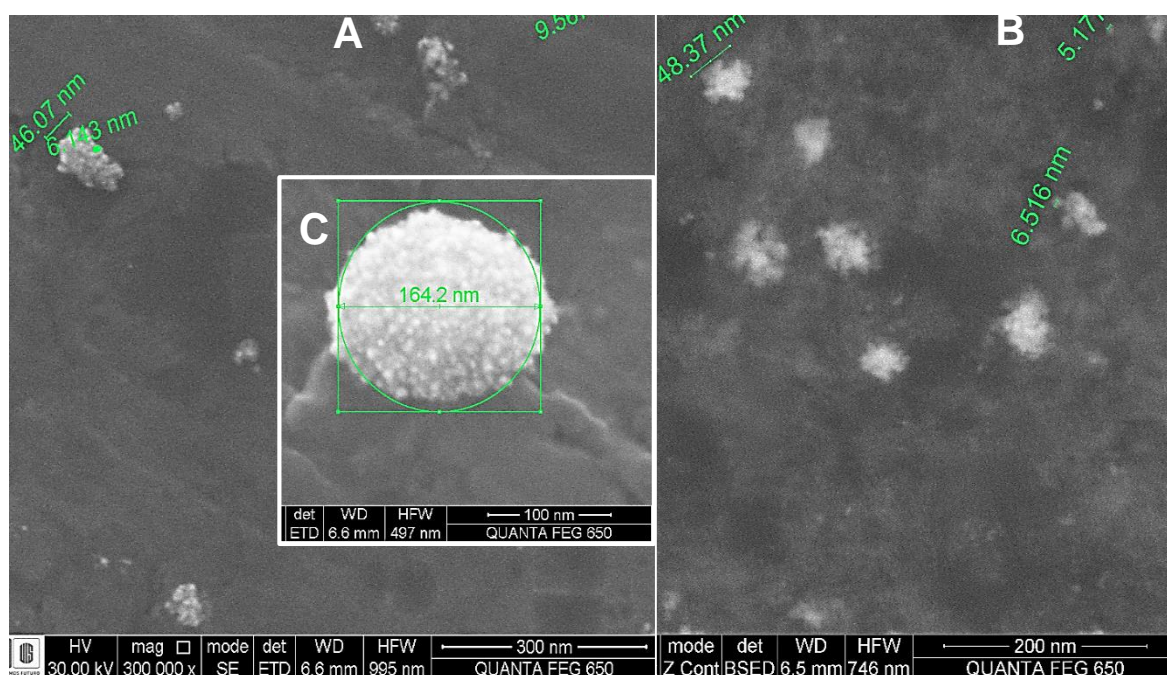
#### **2.3.4 Análisis SEM de las nanopartículas funcionalizadas**

##### **✓ Nanopartículas de oro funcionalizadas con AP6C**

La **Figura 26** muestra imágenes SEM de una gota de una solución AuNP-AP6C1 tomadas 13 horas después de la síntesis, en donde se observan *flocs* de nanopartículas presentes en la solución, probablemente, antes de la evaporación del solvente.

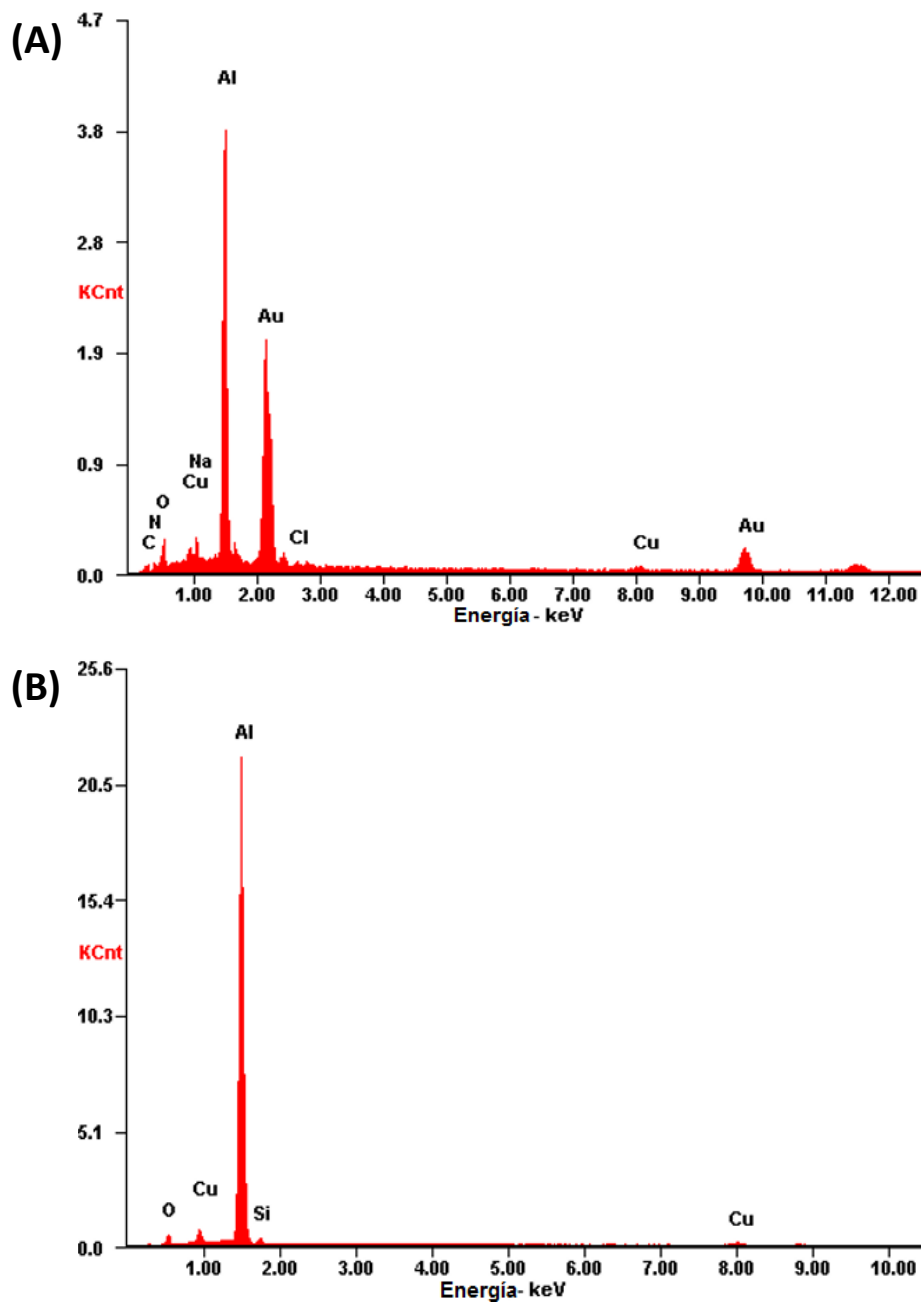
En la **Figura 26C** se puede observar la forma esférica de las AuNP-AP6C1s preparadas, aunque ésta es una partícula de gran tamaño. Sin embargo esta forma esférica se correlaciona con el espectro UV-Vis de ésta solución de AuNP-AP6C1, ya que la banda APS se encuentra ubicada en el visible, tal y como se ha encontrado para las AuNPs de forma esférica (Toma *et al.*, 2010).

**Figura 26.** Imágenes SEM de AuNP-AP6C1s (A) y (B). La imagen interior (C) corresponde a una imagen SEM de una nanopartícula con una barra de escala de 100nm.



El análisis EDS de las AuNP-AP6C1s (ver **Figura 27A**) indica que las nanopartículas están formadas en su mayoría por Au. Las bandas pertenecientes a los elementos de cobre, aluminio y oxígeno son observadas en el espectro del soporte, ver **Figura 27B**. Mientras que las bandas asociadas a los elementos de carbono, nitrógeno y sodio son propias de la estructura del AP6C, recordando que el NaOH fue usado para diluir el AP6C y ajustar el pH de la mezcla de reacción. Esto último podría ser una evidencia de la funcionalización de las AuNPs con el AP6C. Además se nota que existe una pequeña cantidad de cloro proveniente del ácido tetracloroaurico en proximidad a las nanopartículas.

Figura 27. Espectros EDS de la solución de AuNP-AP6C1 (A) y del soporte (B).



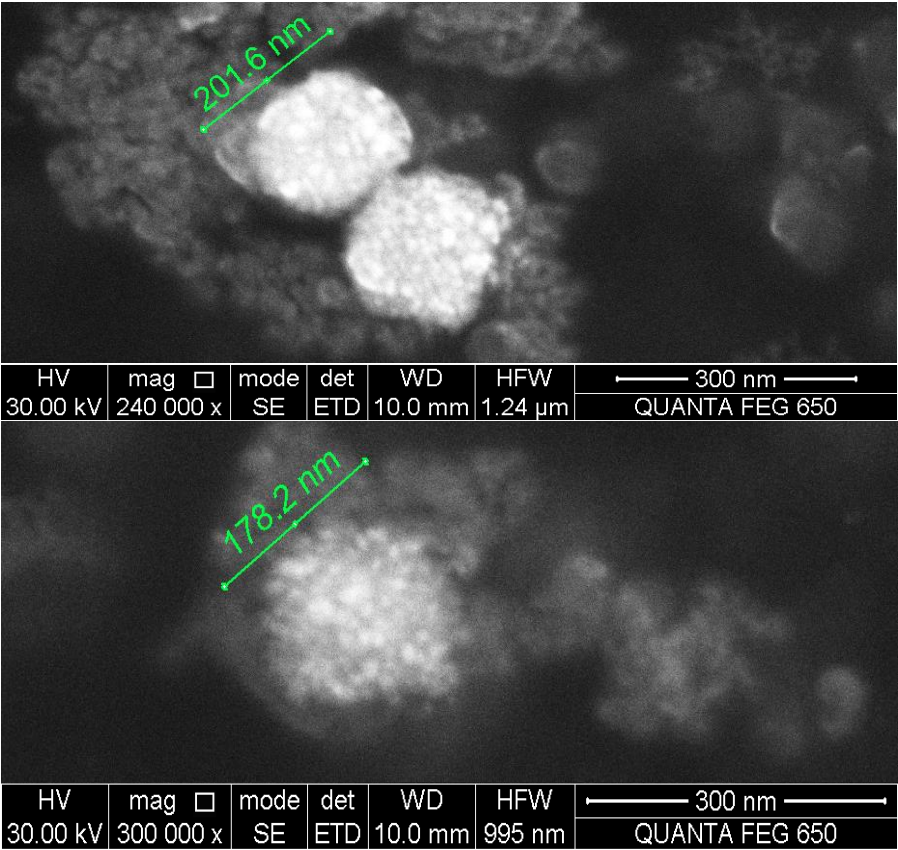
Por otro lado las imágenes SEM de la solución de AuNP-AP6C2 (ver **Figura 28**) muestran *flocs* de tamaños no nanométricos. Sin embargo al tomar una imagen SEM de una solución envejecida de AuNP-AP6C2 (la muestra corresponde al

sobrenadante), ya no son apreciables éstos *flocs* sino unas pocas NPs esféricas de menor tamaño (ver **Figura 29**) debido a que las partículas grandes han precipitado.

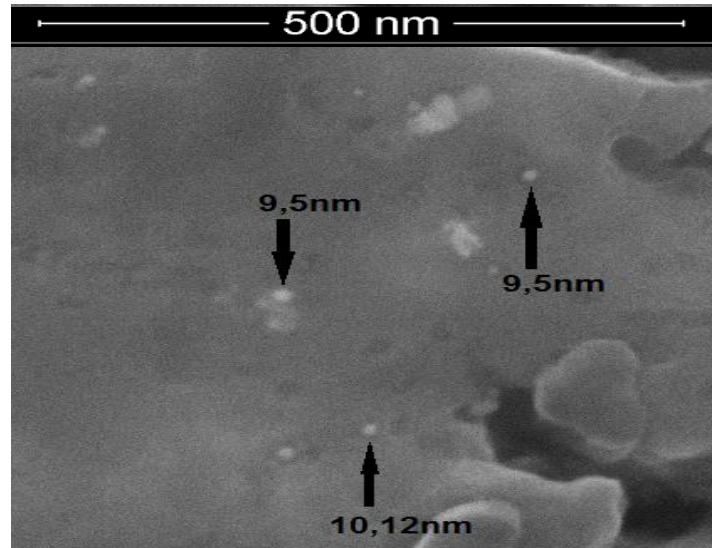
El espectro EDS de las AuNP-AP6C2 (ver **Figura 30**) muestra las señales características del Au, componente principal de las NPs. Además evidencia la presencia de los elementos C, N y O pertenecientes a la estructura química del AP6C. Sin embargo es de notar que el soporte puede estar aportando a la señal del oxígeno (ver **Figura 27B**). La señal del Na corresponde al NaOH usado en la preparación de la solución del AP6C.

En el espectro EDS de las AuNP-AP6C2 se observan unas señales relativas intensas del Cl y del Na a diferencia del espectro de las AuNP-AP6C1, debido a la mayor concentración de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  empleada en la preparación de las AuNP-AP6C2 (para esta solución de NP se requiere una mayor cantidad de NaOH para llevar el pH a 11).

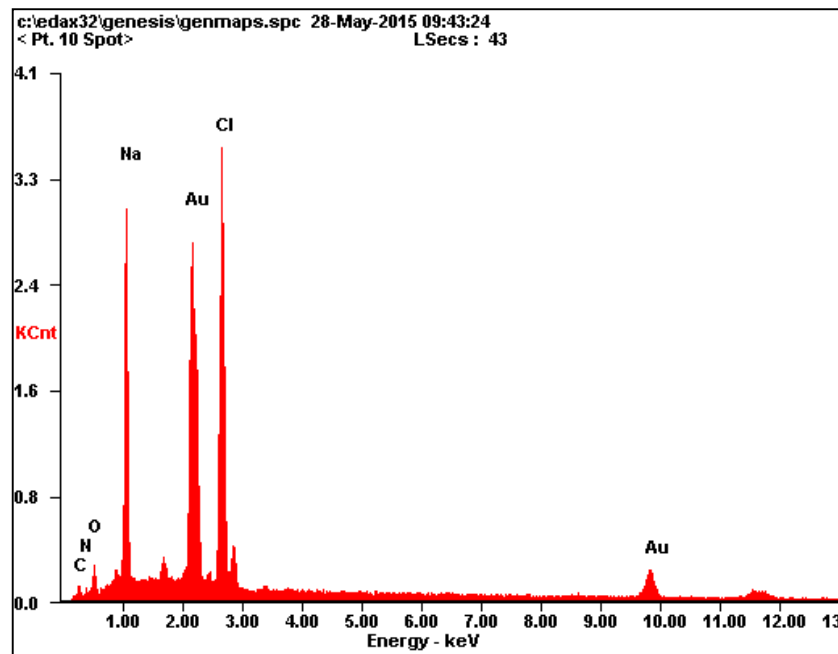
**Figura 28.** Imágenes SEM de las AuNP-AP6C2, tomada a las primeras horas después de la síntesis.



**Figura 29.** Imagen SEM de las AuNP-AP6C2, tomada varios días después de la síntesis.



**Figura 30.** Espectro EDS de la solución de AuNP-AP6C2.



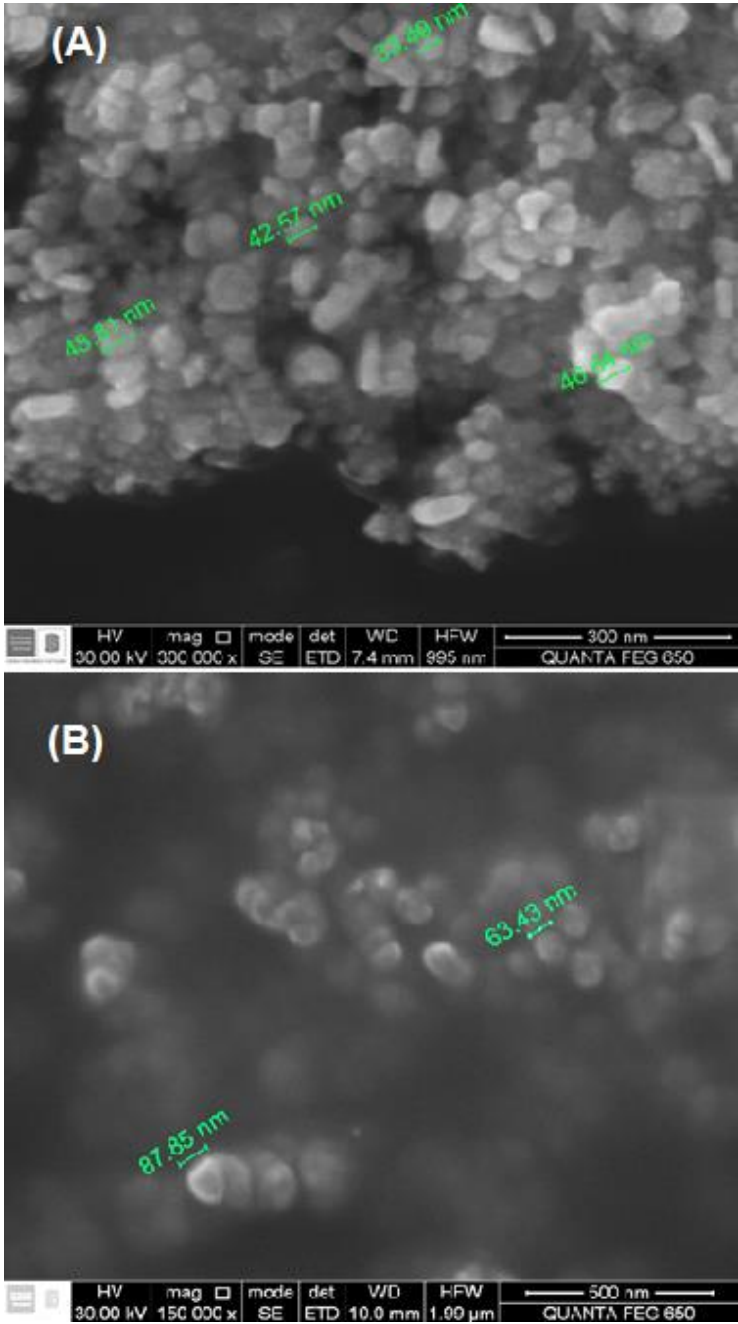
### ✓ Nanopartículas funcionalizadas con AF

Se obtuvieron imágenes SEM de las AuNP-AF en donde pudo apreciarse que en la solución existen partículas de varias formas, algunas alargadas parecidas a barras, poligonales e irregulares (ver **Figura 31A**). En otra fotografía es posible observar un grupo de AuNPs cuya forma tiende a ser más esférica, ver **Figura 31B**. Este resultado podría explicar que el espectro UV-Vis de la solución de AuNP-AF abarque absorciones en el visible y en el infrarrojo cercano.

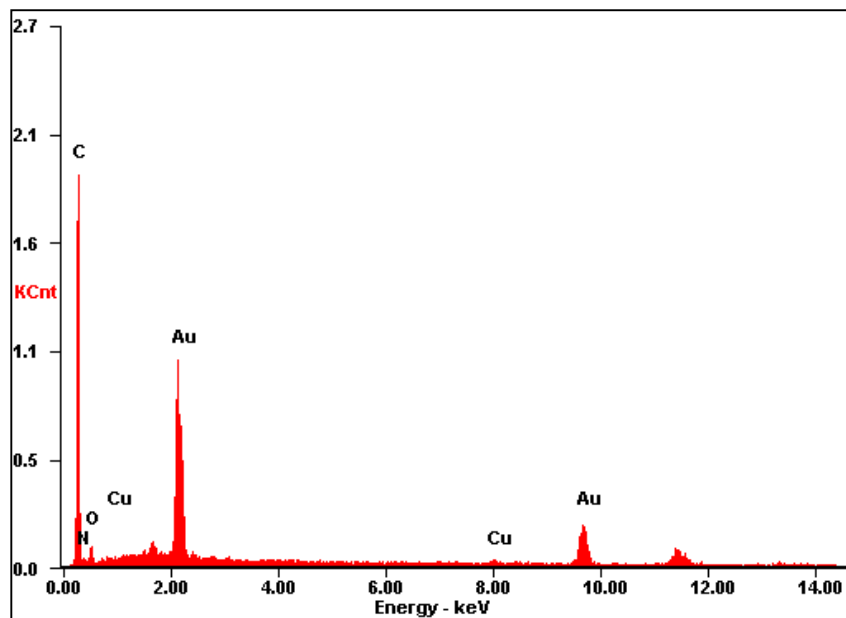
El análisis elemental de las AuNP-AF realizado por la técnica EDS (ver **Figura 32**) permite observar las bandas características del Au, que conforma el núcleo de las AuNP-AF. Además pudo detectarse la presencia de los elementos: C, N y O pertenecientes a la molécula del AF, evidenciando así la funcionalización de las AuNPs con ésta molécula. No obstante, debe considerarse que una porción del C detectado puede ser debido a la cinta de carbono usada como soporte en este caso.

La mezcla de reacción antes de la irradiación UV también fue estudiada para comprender el efecto del AF y de la radiación en el proceso de reducción del Au<sup>3+</sup>. En la **Figura 33** pueden observarse imágenes SEM de la mezcla de reacción, en donde se pueden apreciar esferas de gran tamaño. En este sentido, se puede deducir que la radiación UV (además de ayudar en la reducción del Au<sup>3+</sup>) también presenta un efecto en la generación de nanopartículas pequeñas y de formas poligonales cuando el AF es usado como molécula funcionalizante.

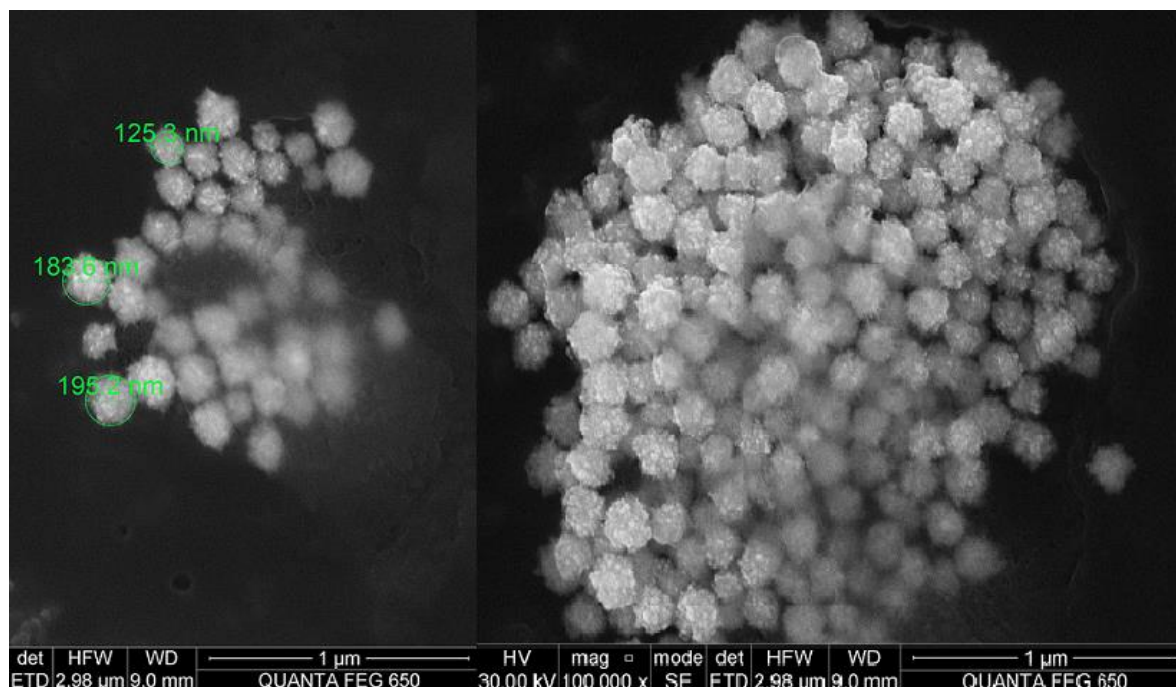
**Figura 31.** Imagen SEM de AuNP-AF. Preparadas con una relación molar AF/Au de 0,56/1 y 10 min de irradiación UV.



**Figura 32.** Espectro EDS de la solución de AuNP-AF.



**Figura 33.** Imágenes SEM de las partículas formadas en la mezcla de reacción de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \times 10^{-6}$  moles) y AF ( $1,65 \times 10^{-6}$  moles) en agua (9,37mL).

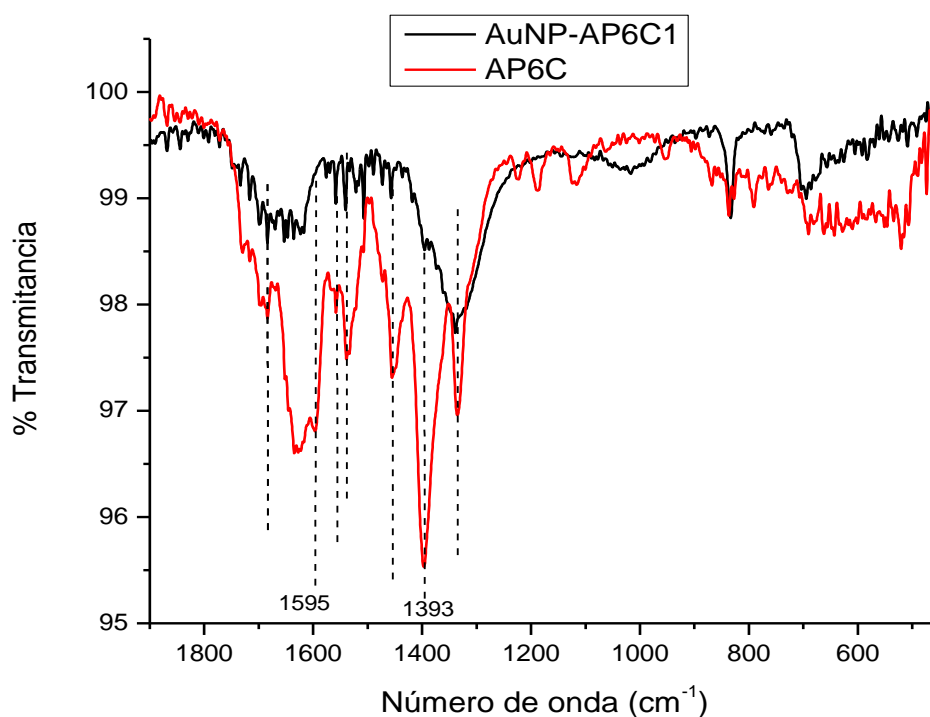


### 2.3.5 Análisis IR de las pterinas y nanopartículas-pterinas.

#### ✓ Nanopartículas de oro funcionalizadas con AP6C

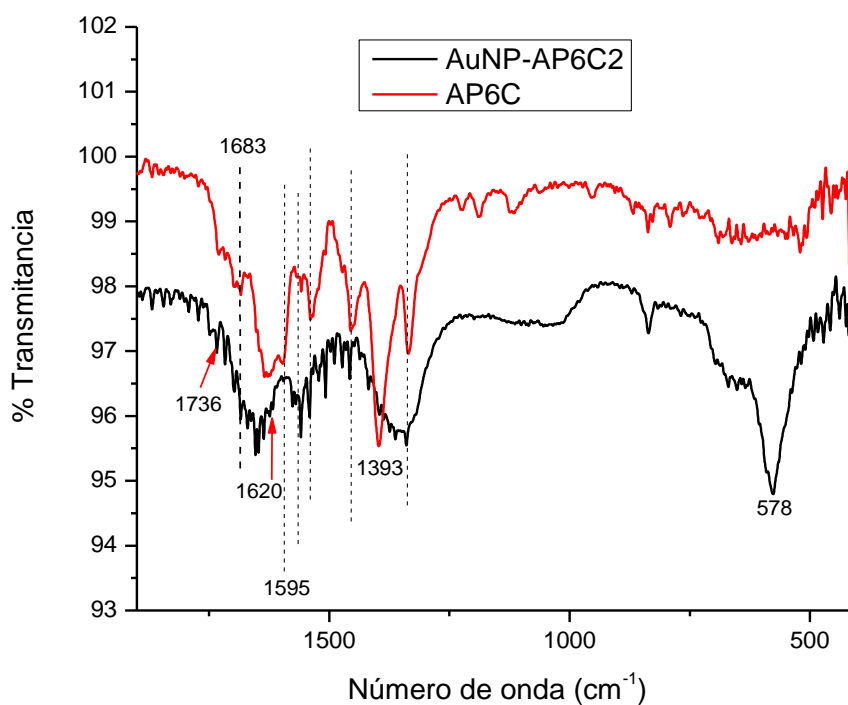
Los espectros ATR-FTIR del AP6C y AuNP-AP6C1 se muestran en la **Figura 34**. Aquí se puede notar que entre 1300 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  hay un cambio significativo en la intensidad de las bandas, por ejemplo la vibración del grupo carboxilato del AP6C ( $1393 \text{ cm}^{-1}$ ) se ve fuertemente disminuida y se presenta un ensanchamiento de la banda alrededor de  $1330 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro de la AuNP-AP6C1. Además el pico a  $1595 \text{ cm}^{-1}$ , debido a la deformación del grupo amino (sustituyente del anillo pteridínico), se desplaza a  $1620 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro de las AuNP-AP6C1. Esto permite sugerir que existe una interacción entre la superficie metálica del Au y las moléculas de AP6C a través del grupo amino de la pterina y del grupo carboxilato.

**Figura 34.** Espectros ATR-FTIR del AP6C libre y de las AuNP-AP6C1.



El análisis IR de la solución de AuNP-AP6C2 permitió encontrar diferencias entre el espectro del AP6C y de las AuNP-AP6C2, ver **Figura 35**. La señal correspondiente a la vibración del grupo carboxilato ( $1393\text{ cm}^{-1}$ ) del AP6C no logra apreciarse en el espectro de las AuNP-AP6C2. Por otro lado el pico de la vibración del grupo amino de la pterina experimenta un corrimiento hacia  $1620\text{ cm}^{-1}$ , indicando así que las moléculas de AP6C pueden unirse a la AuNP ya sea por medio del grupo carboxilato o por el grupo amino. En adición a esto el pico correspondiente a la vibración del anillo pteridínico a  $1683\text{ cm}^{-1}$  se ve desplazado a  $1736\text{ cm}^{-1}$  ratificando una interacción cercana entre la AuNP y el anillo pteridínico.

**Figura 35.** Espectros ATR-FTIR del AP6C libre y de las AuNP-AP6C2

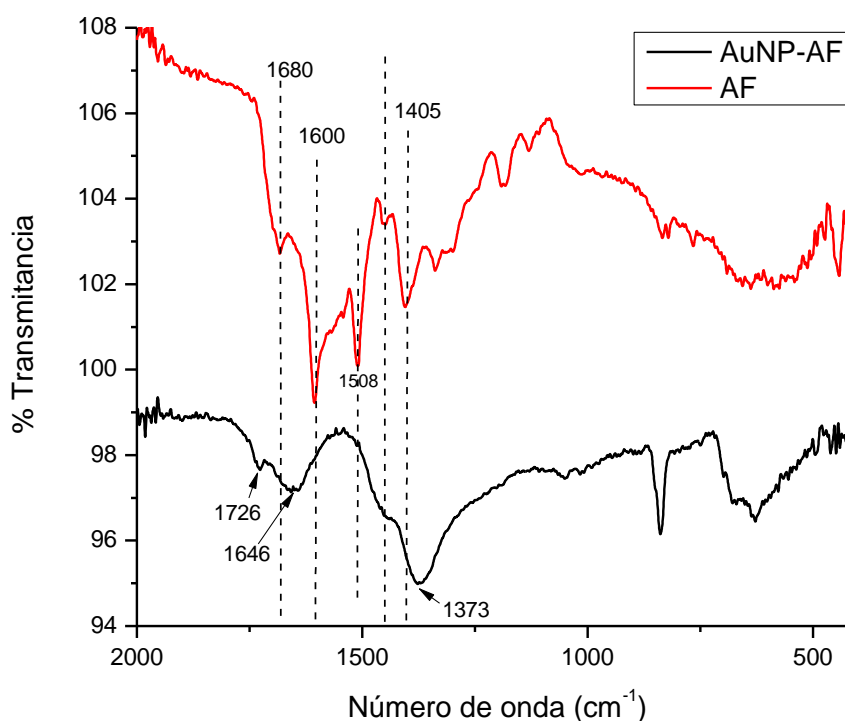


En el espectro IR de las AuNP-AP6C2 aparece una nueva señal a  $578\text{ cm}^{-1}$  que puede ser atribuido a una interacción entre el Cl y el C formada entre átomos de cloro provenientes del ácido tetracloroáurico y un carbono de la pterina. Algunas AuNPs tienen una capa de iones  $[\text{AuCl}_2]^-$  en su superficie que estabilizan a los coloides (Zhang *et al.*, 2007). Estos iones pueden unirse a moléculas o ser reemplazados por ellas; sin embargo se ha encontrado que los complejos formados entre AuCl y C=C no son estables, descomponiéndose a temperatura ambiente (Lu *et al.*, 2008). De esta manera, es posible que la pterina interaccione con los iones  $[\text{AuCl}_2]^-$  presentes en la superficie de la NP, lo cual podría explicar la baja estabilidad de la solución de AuNP-AP6C2.

#### ✓ Nanopartículas de oro funcionalizadas con AF

En la **Figura 36** se muestran los espectros ATR-FTIR del ácido fólico libre y de la solución de AuNP-AF. Las vibraciones pertenecientes a la porción pterina del AF libre:  $1680$  (vibración de tensión C=O, Li y Dyer, 2012) y  $1600\text{ cm}^{-1}$  (vibración de tensión del C-N del grupo  $-\text{C}(\text{NH}_2)$ , Li y Dyer, 2012) experimentan un corrimiento, a  $1726$  y  $1646\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, en el espectro de la AuNP-AF. La ausencia del pico debido a la vibración del esqueleto del anillo de la pterina a  $1508\text{ cm}^{-1}$  indica claramente que las AuNPs interaccionan fuertemente con la porción pterina del AF. El pico a  $1405\text{ cm}^{-1}$  (vibración de los grupos carboxilatos de la porción glutamato) en el espectro del AF, se observa desplazado a  $1373\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de la AuNP-AF. Esto podría indicar que la AuNP interacciona con el AF no sólo por la porción pterina (a través del amino sustituyente y del carbonilo del doble anillo) sino también por medio de los grupos carboxilatos de la porción del ácido glutámico.

**Figura 36.** Espectros ATR-FTIR del ácido fólico libre y de las AuNP-AF.



El pico a 875 cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración de un enlace C-H aromático aislado que puede corresponder a la porción pterina del AF. Esta vibración se ve intensificada en el espectro de la AuNP-AF.

Para las tres AuNP-Pterinas se encontró que las bandas correspondientes a las vibraciones de los grupos carboxilato y amino del AP6C y AF eran alteradas por la presencia de la AuNP. Esto es un indicio de la formación de enlaces entre el Au y las pterinas. Se ha reportado que el oro puede formar enlaces de coordinación o quelación con grupos carboxílicos y aminos (Li *et al.*, 2009).

### 2.3.6 Estudio por fluorescencia de las nanopartículas funcionalizadas

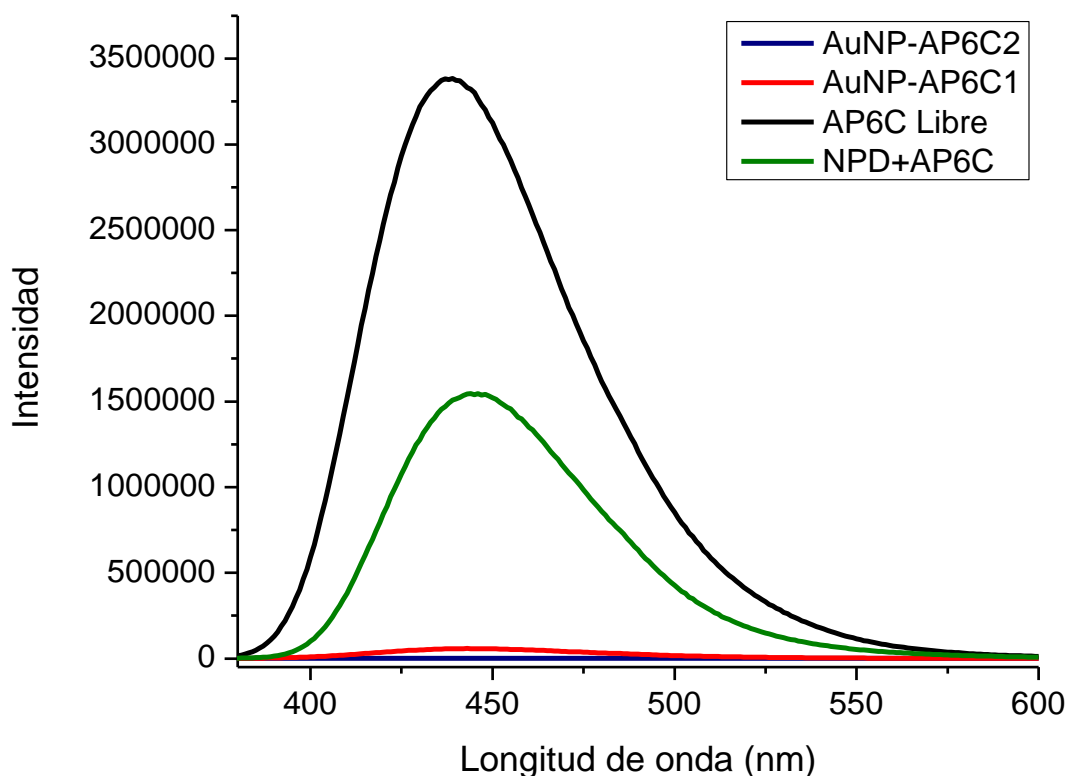
Un método para verificar la funcionalización de nanopartículas de oro con moléculas fluorescentes, consiste en observar el efecto de aumento o apagamiento de la intensidad de la fluorescencia de la molécula fluorescente al estar unida a la NP.

En el presente trabajo se determinó el espectro de emisión de fluorescencia (EF) de las soluciones de: pterina (AP6C y AF) libre y de AuNP-AP6C1, AuNP-AP6C2 y AuNP-AF, la mezcla de reacción para preparar AuNP-AF y mezclas de NPD con las pterinas, usando una longitud de onda de excitación de 364nm. Las intensidades de las bandas de emisión de fluorescencia fueron comparadas, teniendo en cuenta que la concentración de pterina era igual para todas las muestras analizadas.

#### ✓ **Nanopartículas de oro funcionalizadas con AP6C**

Se observó para ambas nanopartículas AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 un apagamiento de la intensidad de la fluorescencia del AP6C, ver **Figura 37**. Es conocido que las AuNPs transportan energía eficientemente, comportándose como apagadores del estado excitado (Wangoo *et al.*, 2008). El apagamiento o “*quenching*” de la EF es principalmente atribuido a un decaimiento no radiativo del estado excitado del fluoroforo vía estados electrónicos del metal.

**Figura 37.** Espectros de EF de las soluciones de: NPD+AP6C (en verde), AP6C libre (en negro), AuNP-AP6C1 (en rojo) y AuNP-AP6C2 (en azul).



Chhabra *et al.*, 2009 demostraron que la intensidad de la fluorescencia de la molécula funcionalizante depende fuertemente de la distancia de separación de la superficie metálica, para AuNPs. Además observaron que para AuNPs con mayor tamaño (comparando con AuNPs de diámetros de 5 y 10 nm), menores distancias de separación (entre el fluoróforo y la NP) y mayor solapamiento entre la banda de emisión del fluoróforo con la banda APS de la AuNP, ocurre un mayor apagamiento de la intensidad de la fluorescencia.

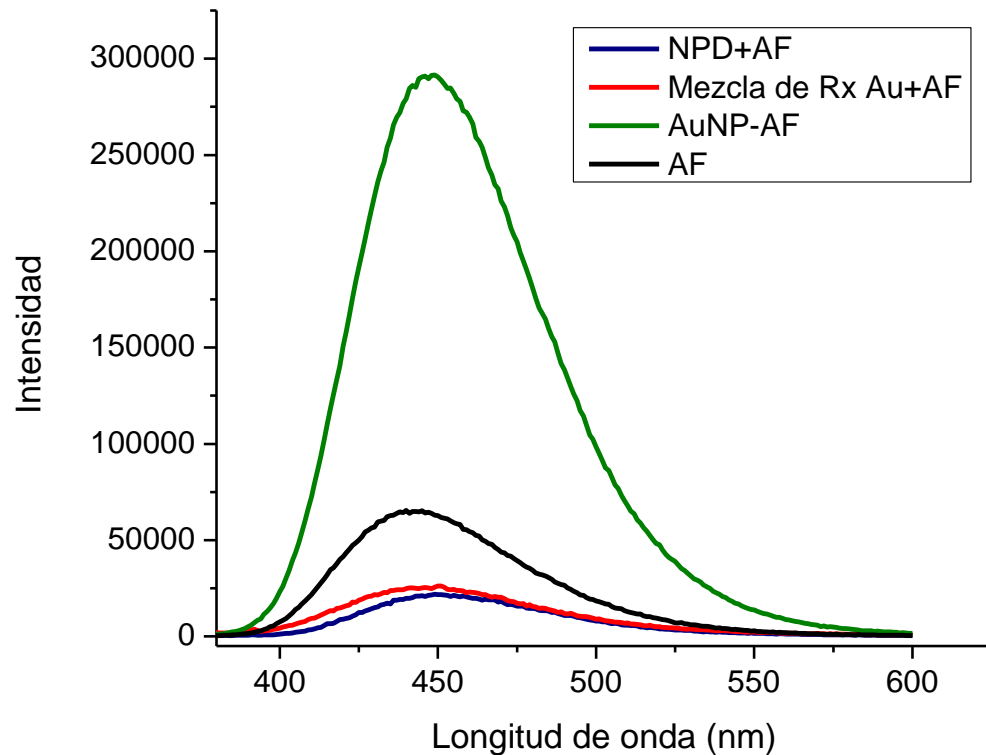
Al considerar el tamaño promedio obtenido por DLS para las AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 ( $193,3 \pm 65,3$  y  $211,5 \pm 5,2$ nm respectivamente) se obtiene un mayor *quenching* para las AuNP-AP6C2, ya que al presentar diámetros de partícula más grande también presentan una sección transversal de extinción mayor que el de las AuNP-AP6C1, por ende reducen más eficientemente la EF del AP6C. Sin embargo el apagamiento tan fuerte de la EF en las AuNP-AP6C2 también podría indicar que el AP6C se encuentra más próximo a la superficie metálica, en relación con las AuNP-AP6C1. Chhabra *et al.*, 2009 reportaron que distancias entre las AuNP y moléculas fluorescentes (Cy3 o Cy5) menores a 5nm permiten un fuerte apagamiento de la EF de los fluoróforos.

Así mismo se puede apreciar en la **Figura 37** el espectro de EF de una mezcla entre la solución de NPD previamente preparada y AP6C. En concordancia a lo encontrado por Chhabra *et al.*, 2009 con respecto a la dependencia de la EF con el tamaño de la NP, en este trabajo se encontró que las NPD apagan en menor grado la EF del AP6C en relación a las AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 debido a que el tamaño promedio determinado por DLS de las NPD ( $112,1 \pm 11,4$  nm) es menor que los tamaños de las AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2. Sin embargo otra explicación a este resultado debe estar relacionado con una interacción menos cercana entre el AP6C y la superficie metálica en la mezcla NPD+AP6C, en contraste con la interacción entre el AP6C y la superficie de la NP en las soluciones de AuNP-AP6C1 y AuNP-AP6C2 preparadas.

#### ✓ **Nanopartículas de oro funcionalizadas con AF**

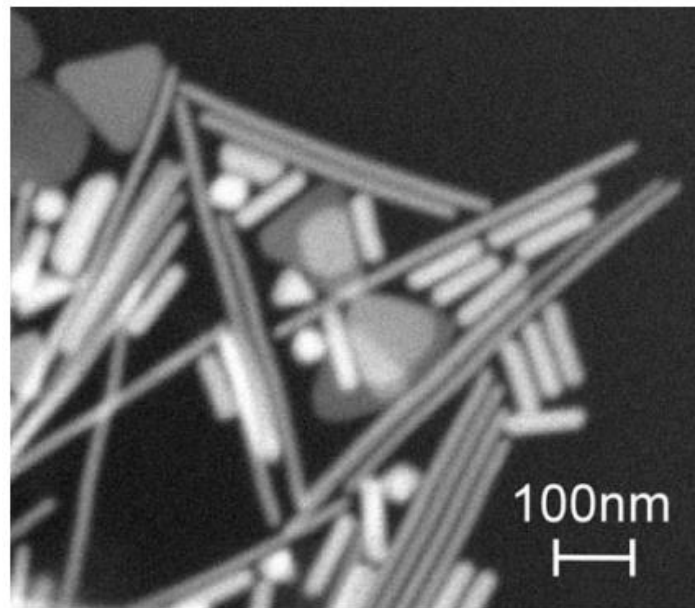
Se encontró que en las AuNP-AF ocurre una eficiente mejora de la EF del AF, ver espectro de EF en la **Figura 38**. El aumento de la EF de fluoróforos debido a NPs metálicas es debido, principalmente, al incremento del campo eléctrico cercano a la superficie metálica inducido por la luz incidente (Chhabra *et al.*, 2009).

**Figura 38.** Espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones de: AF libre (en negro), AuNP-AF (en verde), mezcla de Reacción Au+AF (en rojo) y NPD+AF (en azul).



Horimoto *et al.*, 2008 tomaron imágenes de microscopia de campo cercano y encontraron que la fluorescencia (de indocianina verde) era mejorada fuertemente por nanoplatos de oro y nanopartículas de oro agregadas, mientras que la transmisión de la luz era reducida debido a que el campo electromagnético local en la vecindad de las NPs aumentaba. Nanobarras de oro con relaciones de aspecto de 20nm y nanoesferas de 100nm también mostraron aumento en la EF, aunque en menor medida que los nanoplatos y las agregadas. Una imagen SEM de la solución de AuNPs estudiada por los autores se muestra en la **Figura 39**.

**Figura 39.** Imagen SEM de la solución de AuNPs estudiada por Horimoto *et al.*, 2008.



Fuente: HORIMOTO, Nishizawa; *[et al.]*. Dye fluorescence enhancement and quenching by gold nanoparticles: Direct near-field microscopic observation of shape dependence. En: Chem Phys Lett. 2008, Vol. 467, p. 105-109.

En este sentido es probable que la solución de AuNP-AF obtenida en este trabajo presente una eficiente mejora de la fluorescencia del AF, debido a la variedad en la forma de las NPs.

No obstante, un estudio realizado por Kang *et al.*, 2011 en donde se funcionalizaron AuNPs con Poli (clorhidrato de alilamina)-Cypate, se reporta que cuando la distancia es menor a 1nm ocurre *quenching* de la EF. Cuando la distancia es de 2,5nm, empieza a ocurrir mejora de la EF hasta 5 veces la del control (sin AuNP) y cuando la distancia era de 6,7nm la mejora de la fluorescencia era incluso mayor a 17 veces la del control. De esta manera se tiene que las AuNPs esféricas pueden generar

mejora o apagamiento de la EF del fluoróforo dependiendo a la proximidad del mismo a la NP.

La imagen SEM de la **Figura 31B** de las AuNP-AF evidencia la presencia de NPs de forma esférica, que pueden aportar al fenómeno de mejora de la EF si la distancia de separación entre el AF y la superficie metálica es el indicado. Sin embargo, no es posible utilizar los resultados obtenidos por Chhabra *et al.*, 2009 y Kang *et al.*, 2011 para asignar las distancias entre la AuNP-Pterina de este trabajo, debido a que el efecto de la distancia NP-fluoróforo depende del tipo de fluoróforo ensayado (Kang *et al.*, 2011).

Por otro lado la solución llamada “mezcla de reacción Au+AF” presenta una EF mucho menor a la del AF libre por lo que se considera un apagador de la fluorescencia del AF. Como las partículas obtenidas de la mezcla de reacción Au+AF son esféricas, es posible que la interacción NP-AF sea muy cercana según lo encontrado por Kang *et al.*, 2011. Adicionalmente una mezcla de NPD con AF fue ensayada. El efecto de estos dos últimos productos, en la EF del AF, fue similar.

### 3. FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO-PTERINA Y SU EFECTO EN CÉLULAS HELA

#### 3.1 SECCIÓN EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Irradiación de soluciones de nanopartículas de oro-pterina

La fuente de irradiación utilizada, de marca ThorLabs Newton USA, está compuesta por un diodo láser de 808 nm, un regulador de la temperatura del diodo y un regulador de potencia, ver **Figura 40**.

**Figura 40.** Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AuNP-pterina. (A) Sensor de temperatura, (B) solución de AuNP-pterina, (C) láser IRC (808nm), (D) y (E) reguladores de temperatura y potencia respectivamente.



Se irradiaron las soluciones de AuNP desnudas y AuNP-pterinas (1 mL) durante 10 min, registrando el aumento de temperatura cada 30 segundos para tres valores de potencia del láser: 400, 600 y 800 mW. Se ensayaron tres concentraciones de las

AuNP-AP6C2 y AuNP-AF: la primera solución se obtuvo directamente de la síntesis (ver concentraciones en la **Tabla 6**) y las dos soluciones siguientes fueron diluciones (1/2 y 1/10) de la primera en agua MilliQ. Las soluciones de AuNP desnudas y AuNP-AP6C1 no fueron diluidas debido a que el efecto foto-térmico de éstas NPs es menor que el de las AuNP-AP6C2 y AuNP-AF. La temperatura fue medida por un termómetro digital con sonda metálica sumergida en la solución estudiada. Para evitar medidas erróneas el haz de luz se direccionaba de tal forma que no tocara la sonda del termómetro. Para todos los experimentos la distancia entre la solución analizada y el diodo láser fue de aproximadamente 2,5 cm y la temperatura del láser de 20°C. Como blanco se usó agua desionizada libre de NPs y pterinas.

**Tabla 6.** Concentraciones de las NPs acuosas usadas en los experimentos de irradiación con IRC. La concentración está expresada en términos de masa de Au por mililitros de solución.

Concentración de NP Tipo de NP	Inicial $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$	Dilución 1/2 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$	Dilución 1/10 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$
NPD	64,3	---	----
AuNP-AP6C1	64,3	---	----
AuNP-AP6C2	643,2	321,6	64,3
AuNP-AF	64,3	32,2	6,4

La concentración de las soluciones de NPs se reporta (en la **tabla 6 y 7**) en términos de los gramos de oro presente. Los cálculos partieron de la masa inicial de Oro usada para la preparación de cada solución de AuNPs dividido en el volumen obtenido para cada NPs al final de la síntesis. Posteriormente se realizaron las respectivas diluciones.

### 3.1.2 Preparación de las soluciones de AuNP-Pterinas y NPD para los ensayos en células

Las nanopartículas fueron preparadas según los protocolos establecidos en el sección 2.2. y sometidas a un proceso de diálisis durante 8 horas, para eliminar el exceso de pterinas libres en la solución de NPs. La diálisis fue realizada bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar.

Se separaron cuatro concentraciones de las AuNP-pterinas: la primera fue la de la solución obtenida directamente de la síntesis, y las tres siguientes fueron diluciones (1/2, 1/10 y 1/100) en medio EMEM. La solución usada de AuNP desnudas (**NPD**) se usó en una sola concentración. En la **Tabla 7** se encuentran las concentraciones de tratamiento con NPs.

**Tabla 7.** Concentraciones de las NPs usadas en los experimentos con células. La concentración está expresada en términos de masa de Au por mililitros de solución (medio con células tratadas).

Concentración de NP Tipo de NP	N°1 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$	N°2 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$	N°3 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$	N°4 $\left[\frac{\mu g \text{ de Au}}{mL}\right]$
NPD	6,4	---	----	
AuNP-AP6C1	6,4	3,2	$6,4 \times 10^{-1}$	$6,4 \times 10^{-2}$
AuNP-AP6C2	64,3	32,2	6,4	$6,4 \times 10^{-1}$
AuNP-AF	6,4	3,2	$6,4 \times 10^{-1}$	$6,4 \times 10^{-2}$

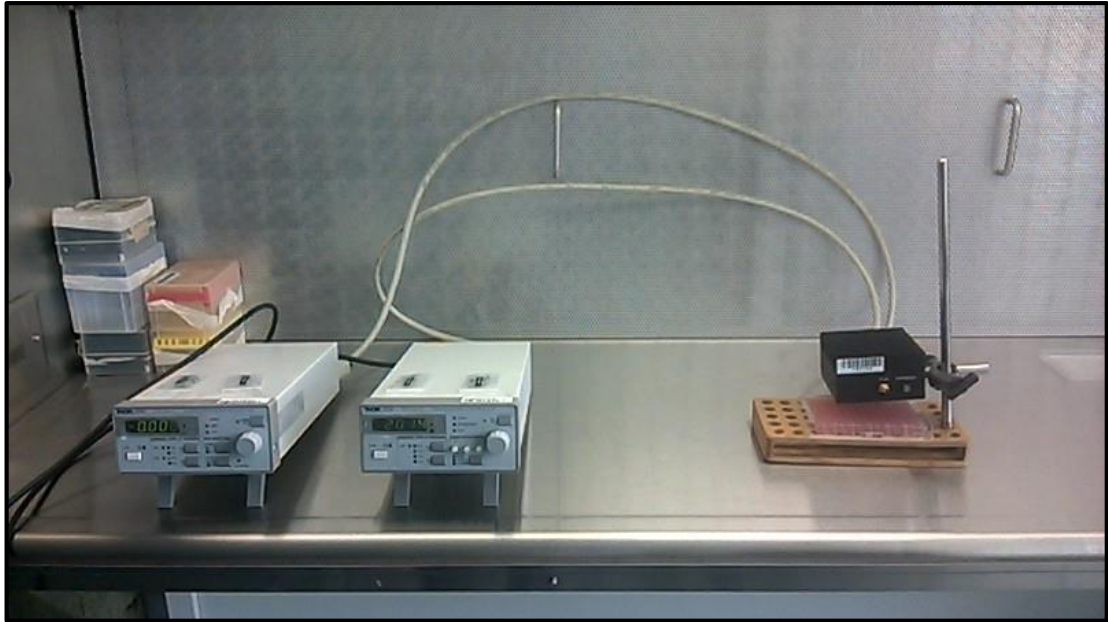
### 3.1.3 Ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas de oro-pterina en células HeLa y A549 con y sin irradiación IRC

La viabilidad celular se determinó por el método del MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio). Las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio formando cristales de formazan (cloruro de tetrazolio) solubles en DMSO y se cuantifican a 550 nm (Mosmann T. *et al.*, 1983).

Las células HeLa y A549 (5000 células/pozo) se adicionaron en placas de 96 pozos e incubaron a 37°C con atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%) durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, las células se trataron con NPDs y NP-pterinas (AuNP-AF, AuNP-AP6C1, AuNP-AP6C2) en medio EMEM, de acuerdo a las concentraciones descritas en la **Tabla 7**.

Pasadas 48 h de tratamiento las células fueron irradiadas durante 5 min a una potencia de 800mW (valor de potencia que permitió obtener los mejores resultados de calentamiento de las soluciones acuosas de AuNP-Pterinas) con el diodo láser (808nm), usando el montaje de la **Figura 41**. La distancia entre el diodo y las muestras fue de aproximadamente 2,5cm.

**Figura 41.** Montaje experimental para la irradiación con IRC de las células tratadas con las AuNP-Pterinas y NPD dentro de una cabina de flujo laminar.



El ensayo de MTT se realizó 12h después de la irradiación completando 74h de tratamiento. Paralelamente, en una placa diferente las células tratadas con AuNP-pterinas y las células control (tiempo de tratamiento=74h) fueron cultivadas sin irradiación.

Posteriormente, el medio fue descartado, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de MTT ( $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en HBSS) e incubaron las células durante 3h, después del tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para solubilizar los cristales formados. La lectura de absorbancia a 550 nm se realizó en un lector de microplaca, usando DMSO como blanco.

Los resultados de la viabilidad celular fueron comparados usando el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de análisis de comparación de múltiples medias: Tukey.

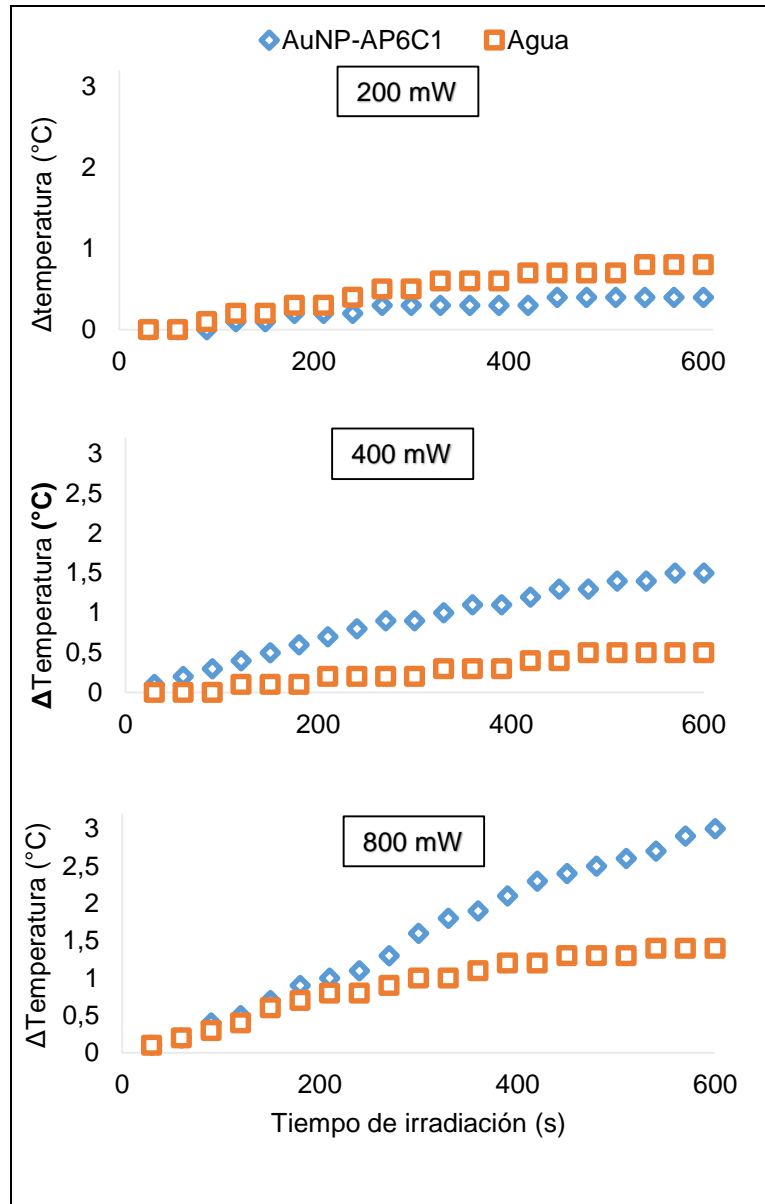
## **3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.2.1 Efecto térmico generado por la interacción de nanopartículas de oro-pterina y radiación IRC**

En la **Figura 42** se muestran las curvas de calentamiento de la solución de AuNP-AP6C1 (64,3 µg/mL) tras irradiar con el diodo láser variando la potencia (200, 400 y 800mW). Este experimento permitió observar que la solución de AuNP-AP6C1 es activada por la irradiación IRC con las potencias de 400 y 800mW, y que además exhibe un aumento de temperatura directamente proporcional a la potencia de irradiación.

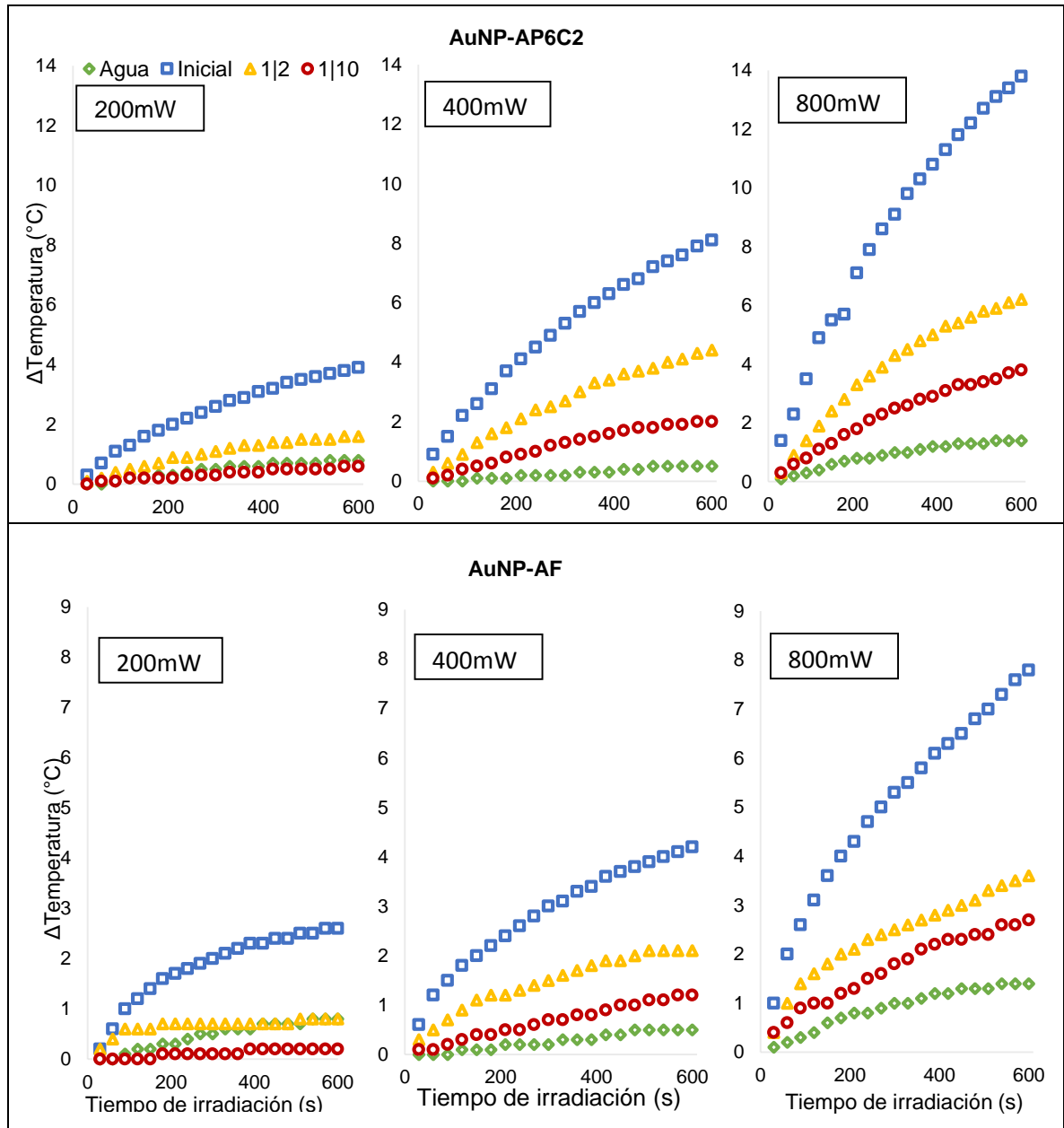
A una potencia del láser de 200mW la solución de AuNP-AP6C1 se calienta en menor grado que el agua indicando que ésta potencia de irradiación no es suficiente para generar el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales. Las nanopartículas pueden estar evitando que las moléculas de agua se exciten vibracionalmente y por ende el calentamiento es menor con relación al agua sin NPs.

**Figura 42.** Curvas de calentamiento del agua (en naranja) y de la solución AuNP-AP6C1 (en azul) a diferentes potencias del diodo láser y 10 min de irradiación. La temperatura inicial de la solución estuvo en el rango de 31,1-31,8°C.



En la **Figura 43** se pueden observar las curvas de calentamiento de las AuNP-AP6C2 y AuNP-AF utilizando tres concentraciones y con tres potencias del diodo láser.

**Figura 43.** Curvas de calentamiento de las soluciones acuosas de AuNP-AP6C2 y AuNP-AF. Mayor concentración (en azul), y sus diluciones: 1/2 (en amarillo), 1/10 (en rojo) a diferentes potencias del diodo láser. Solución blanco agua (en verde).



Al analizar las curvas de calentamiento de las **Figuras 42 y 43** se puede observar una tendencia análoga de las soluciones AuNP-AP6C2, AuNP-AP6C1 y AuNP-AF: el

calentamiento presentó una relación proporcional con la potencia del diodo láser. Además, el calentamiento es proporcional con la concentración de las soluciones de las NPs, tal como lo observaron Li *et al.*, 2011 al preparar diluciones de la una solución de AuNPs e irradiarlas con radiofrecuencia.

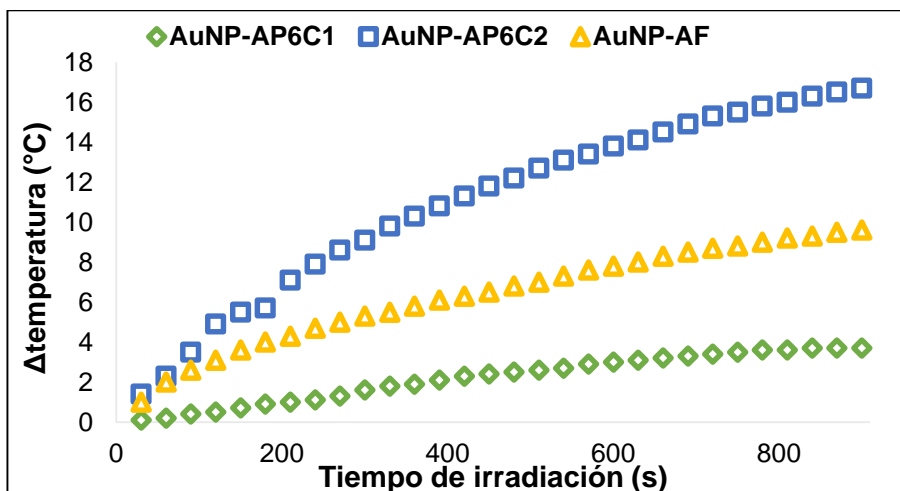
Al comparar el calentamiento de las tres soluciones de AuNP-pterinas con el blanco (agua desionizada) a la potencia respectiva, se observó un aumento de la temperatura para el agua entre 0,5-1,4°C para el rango de potencias usado y un tiempo de irradiación de 10min. Cuando se Irradió agua desionizada con radiofrecuencias se indicó un aumento de la temperatura de 5°C en tan sólo 2 min (Moran *et al.*, 2009). Esto indica que los resultados de calentamiento para los blancos usados en esta investigación fueron bajos en relación a los obtenidos por otros autores, usando otras fuentes de irradiación como la de radiofrecuencias. Además en esta investigación, cuando son irradiadas las soluciones acuosas de AuNP-pterinas con mayor concentración y mayor potencia del láser (800mW), se obtuvieron aumentos de temperatura de: 3,0; 7,8 y 13,8°C para las AuNP-AP6C1, AuNP-AF y AuNP-AP6C2 respectivamente, en 10 min de irradiación. En este sentido, los resultados del calentamiento observado están asociados a la interacción de la radiación IRC con las NPs presentes en la solución usada.

Las mayores velocidades de calentamiento ( $\Delta T/s$ ) 0,005; 0,013 y 0,32 °C/s fueron obtenidas para las soluciones de AuNP-AP6C1, AuNP-AF y AuNP-AP6C2 respectivamente, con la mayor concentración y a la mayor potencia del diodo láser (800mW). Sin embargo cabe resaltar que la máxima velocidad de calentamiento se alcanza en los primero 5-6 min de irradiación, y durante los minutos posteriores el calentamiento es muy lento. Debido a lo anterior la irradiación de las células cancerosas se realizó durante 5 min.

Se considera que es posible inducir hipertermia de células cancerosas con un aumento de temperatura en el rango de 39-45°C, causando un incremento en la permeabilidad de la membrana y una disminución de la presión hidrostática (Huang *et al.*, 2008). En este sentido, éste estudio preliminar de la fotoactivación de las NPs en solución proporciona buenos indicios de que las tres NPs funcionalizadas podrían causar hipertermia en células cancerosas, al irradiarlas con el diodo láser IRC a 800mW durante algunos minutos.

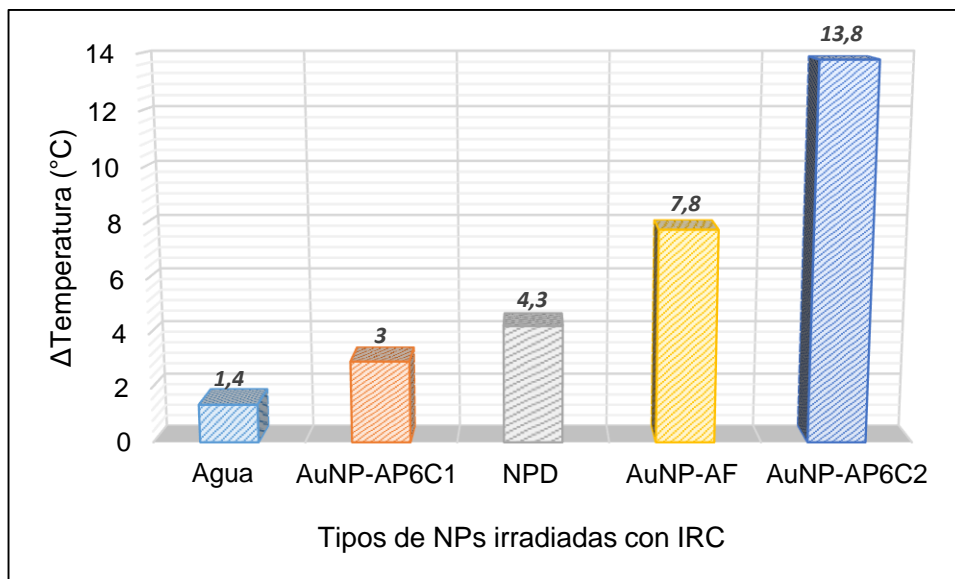
Con el objeto de conocer el comportamiento de las curvas de calentamiento para tiempos mayores de 10min, se realizó un experimento en el que se irradiaron las tres soluciones AuNP-Pterinas, a la mayor concentración, durante 15 min y a potencia del láser de 808nm. En la **Figura 44** se puede apreciar que el aumento de temperatura continúa aún después de 10 min de irradiación, aunque a una velocidad mínima.

**Figura 44.** Curvas de calentamiento de las soluciones acuosas de AuNP-Pterinas (a la mayor concentración) con una irradiación IRC durante 15 min.



Las NPD fueron irradiadas por el diodo láser a la potencia máxima de 800mW durante 10 min, con el objeto de conocer su comportamiento fototérmico en relación a las NPs funcionalizadas (a la mayor concentración). En la **Figura 45** se puede apreciar que el orden de aumento de temperatura para las NPs es: AuNP-AP6C2>AuNP-AF>NPD> AuNP-AP6C1, bajo condiciones de 10 min de irradiación a una potencia del diodo láser de 800mW.

**Figura 45.** Aumento de temperatura de las soluciones de todas las AuNPs preparadas (a la mayor concentración) al ser irradiadas durante 10min con el diodo láser a 800mW.



Las AuNP-AP6C1, AuNP-AP6C2 y NPD son partículas esféricas con bandas APS en el visible y no se solapan con la longitud de onda de la radiación IRC de la fuente de irradiación (808 nm); sin embargo, las soluciones presentaron aumento de la temperatura. Esto puede ser explicado, según otros estudios realizados, mediante dos fenómenos que permiten la emisión de calor por parte de NPs esféricas al ser irradiadas con IRC a 800nm: la generación del segundo armónico y un proceso de dos fotones (Agarwal *et al.*, 1982; Ballan *et al.*, 2010).

Se ha indicado que las AuNPs esféricas son buenas generadoras de armónicos (Agarwal *et al.*, 1982; Balla *et al.*, 2010). Además, Huang *et al.*, 2007 han propuesto que en la generación del segundo armónico, dos fotones a una frecuencia fundamental  $\omega$  en la región del NIR e IR se convierten en un fotón a la frecuencia armónica de  $2\omega$  en el visible donde las AuNPs muestran una fuerte ASP. La generación del segundo armónico sólo es posible en superficies de partícula donde la inversión de la simetría ha sido rota y la respuesta es dominada por la contribución dipolar resultante de AuNPs esféricas no centro-simétricas.

Por otro lado, las observaciones indicadas en la literatura podrían explicar que la irradiación de las AuNP-AF con IRC produjera un calentamiento significativo de la solución, a pesar de que una pequeña porción de su banda APS alcanza a solaparse con la longitud de onda de la radiación incidente del láser.

### **3.2.2 Citotoxicidad de las AuNP-Pterinas en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación IRC**

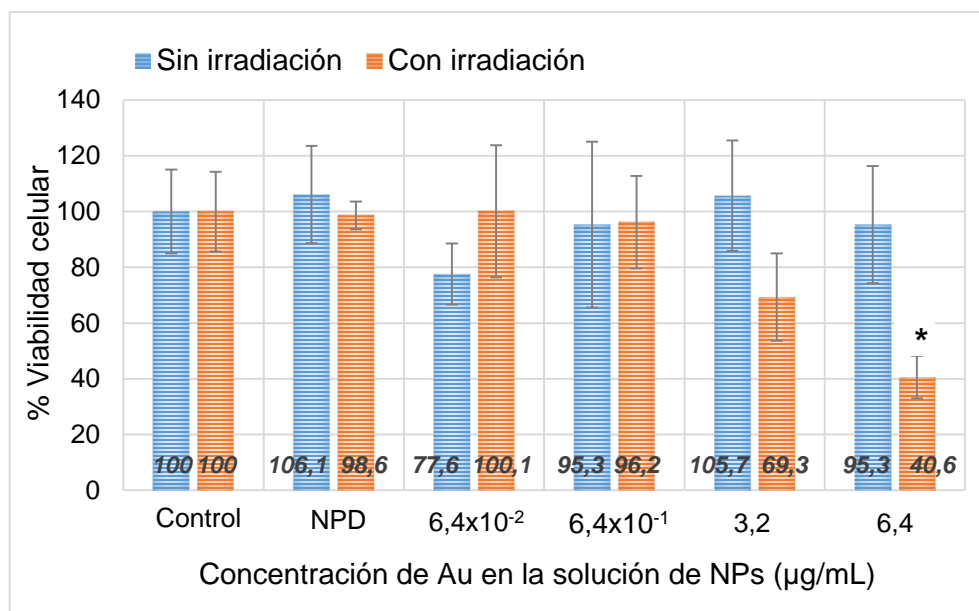
#### **✓ AuNP-AP6C1**

Las AuNP-AP6C1 no fueron tóxicas para las células HeLa en ninguna de las cuatro concentraciones testadas, ver **Figura 46**. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con respecto a las células no tratadas (control).

Luego de la irradiación con el diodo láser, las AuNP-AP6C1 mostraron una disminución de la viabilidad celular de forma dosis dependiente (ver **Figura 46**). El análisis ANOVA arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad obtenida para las AuNP-AP6C1, sin irradiar y con irradiación, sólo para la

mayor concentración de NPs. Esto indicaría que la irradiación está asociada al aumento de la citotoxicidad de las AuNP-AP6C1 para el caso de la concentración de **6,4 µg/mL**.

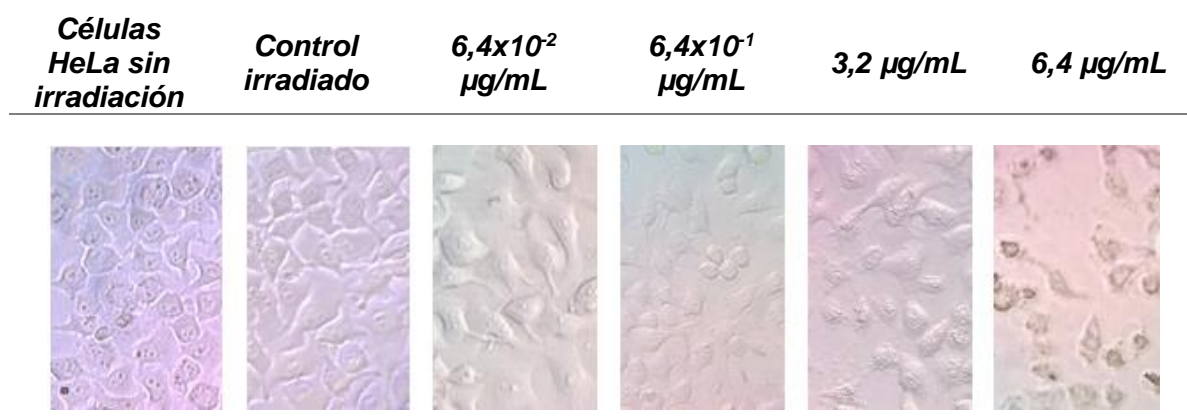
**Figura 46.** Efecto de las AuNP-AP6C1 sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4 µg/mL) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



Las células control irradiadas conservaron la morfología característica de las células HeLa viables, ver **Figura 47**. Esto se debe a que los cromóforos presentes en los tejidos no absorben en el rango del IRC (Huang *et al.*, 2006), haciendo de la fototerapia plasmónica inducida por IRC una técnica inocua para las células que no internalicen las NPs en una gran proporción, para las condiciones de irradiación aquí trabajadas.

En la **Figura 47**, puede apreciarse el cambio morfológico de las células HeLa (tratadas con AuNP-AP6C1) irradiadas con el diodo láser. Un cambio notorio empieza a observarse para la concentración de  $6,4 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ , donde las células toman una forma circular, indicando que éstas experimentan estrés. A las dos concentraciones más altas se evidencia la presencia de células estalladas, debido al efecto del aumento de temperatura generado por la irradiación.

**Figura 47.** Células HeLa tratadas con AuNP-AP6C1 a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y  $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.



#### ✓ AuNP-AP6C2

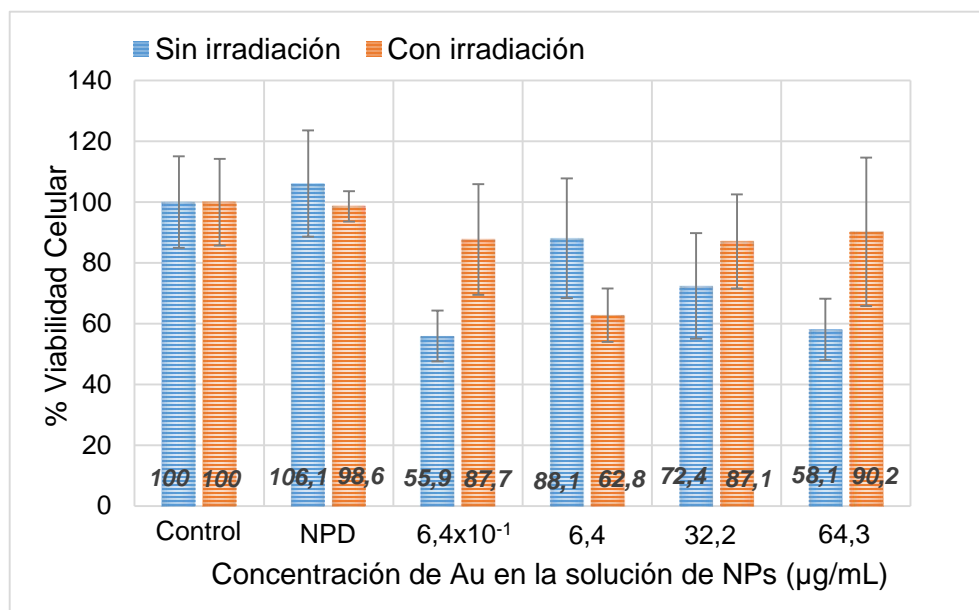
Las AuNP-AP6C2 presentaron citotoxicidad estadísticamente significativa para la menor y mayor concentración:  $6,4 \times 10^{-1}$  y  $64,3 \mu\text{g/mL}$ , con respecto al control, ver **Figura 48**. Es posible que las AuNP-AP6C2 estén formando agregados (debido a su inestabilidad), sobre la pared celular o en el interior de las células, hecho que fue indicado por Abdulla-Al-Mamun *et al.*, 2009 al tratar células HeLa con nanopartículas de oro estabilizadas con citrato durante 24 h (sin irradiación) y observaron la formación de agregados. Estos autores encontraron una pérdida del 10-15% de viabilidad que adjudicaron a dicha agregación.

Después de la irradiación de las células con AuNP-AP6C2 se pudo notar que la viabilidad celular, con las NPs a las concentraciones de  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$ , es mayor con respecto a la de las células no irradiadas.

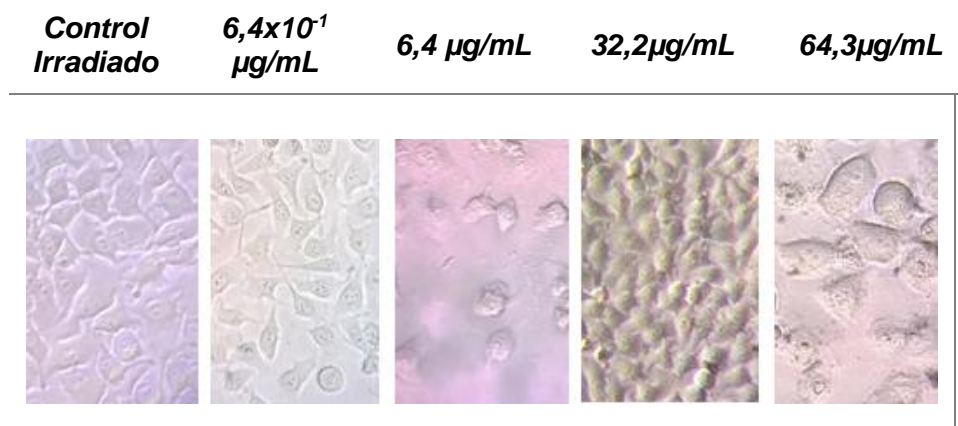
De forma general las AuNP-AP6C2 no resultan tóxicas para las células HeLa tras ser irradiadas con el diodo láser, en ninguna de las concentraciones empleadas (ver **Figura 48**). Una posible explicación de la no foto-toxicidad de las AuNP-AP6C2 puede estar asociada a la formación de agregados que no pueden entrar a las células y en consecuencia la irradiación no causó citotoxicidad en las células tratadas.

En la **Figura 49**, puede observarse que la forma típica de las células HeLa viables se mantiene para la mayoría de las células tratadas con AuNP-AP6C2 a diferentes concentraciones e irradiadas con IRC, sin embargo en la mayor concentración testada se observan algunas alteraciones morfológicas, como rompimiento de membranas plasmáticas y presencia de fragmentos celulares.

**Figura 48.** Efecto de las AuNP-AP6C2 sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



**Figura 49.** Células HeLa tratadas con AuNP-AP6C2 a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.



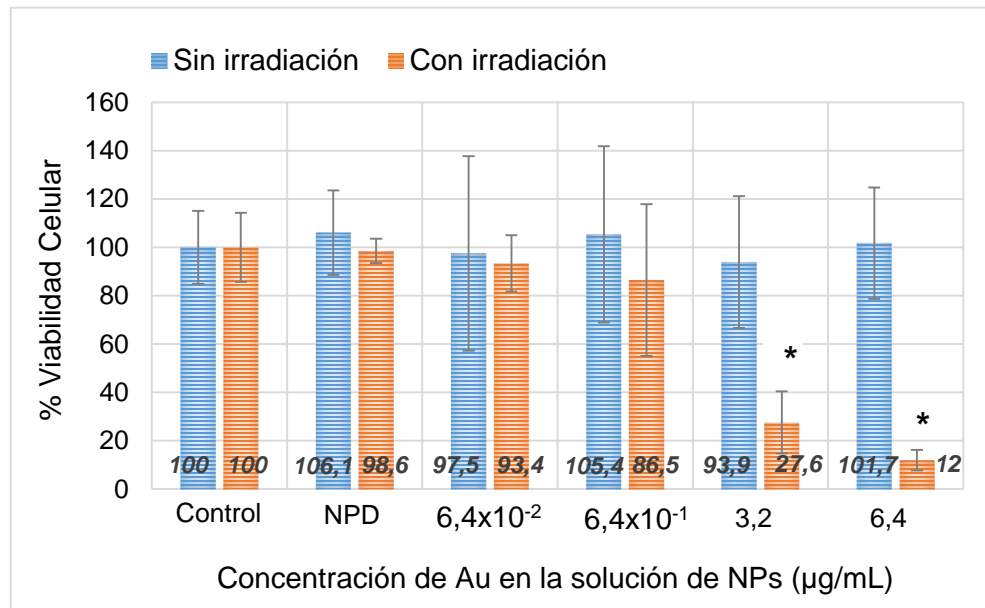
✓ **AuNP-AF**

Las AuNP-AF no irradiadas no mostraron citotoxicidad estadísticamente significativa a ninguna de las concentraciones testadas, con respecto al control, ver **Figura 50**.

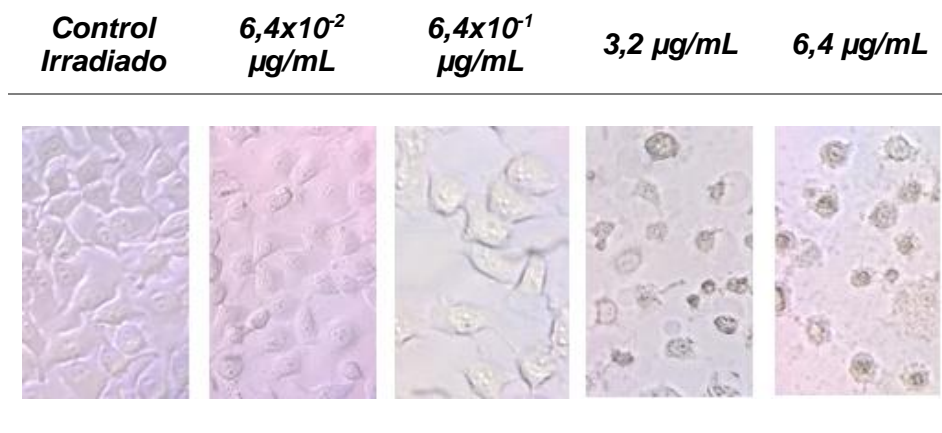
Por otro lado las AuNP-AF, tras la irradiación con IRC, afectaron la viabilidad de las células HeLa de forma dosis dependiente, comprobando que la irradiación es la causa principal de la disminución en la viabilidad celular de las AuNP-AF a las concentraciones mayores (**3,2 y 6,4 µg/mL**)

En la **Figura 51**, se observa que la morfología de las células tratadas con AuNP-AF, en las dos mayores concentraciones, se altera drásticamente como consecuencia de la radiación IRC. Mientras que a las dos concentraciones menores se mantiene la morfología de las células HeLa viables.

**Figura 50.** Efecto de las AuNP-AF sobre la viabilidad de células HeLa a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4  $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



**Figura 51.** Células HeLa tratadas con AuNP-AF a diferentes concentraciones de tratamiento ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4  $\mu\text{g/mL}$ ), luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.

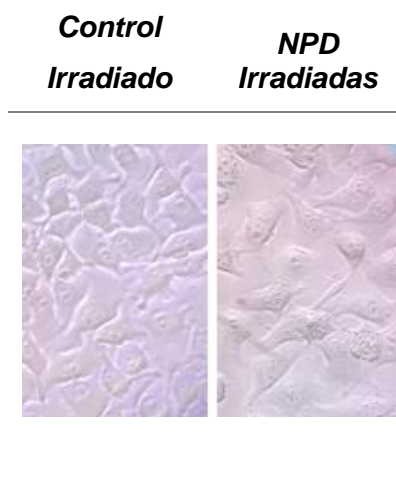


Las nanopartículas desnudas, irradiadas y no irradiadas, no presentaron citotoxicidad en las células HeLa. Esto ratifica la biocompatibilidad de las NPDs en células HeLa, en analogía con los resultados obtenidos para las AuNP-AP6C1 y las AuNP-AF.

En la sección 3.3.1 se obtuvo que la irradiación con el láser de la solución acuosa de NPD generó un mayor aumento de temperatura en relación a la solución acuosa de AuNP-AP6C1 (que si evidenció una reducción de la viabilidad de las células HeLa al interactuar con IRC). Se puede deducir que las NPD, al no estar funcionalizadas con pterinas, no son internalizadas y no pudieron entrar en gran proporción en las células. Chithrani *et al.*, 2006 han reportado que las células HeLa internalizan en mayor proporción a AuNPs de tamaños de 50nm en relación a AuNPs de tamaños de 14 y 100nm. Además encontraron que la internalización fue de unas pocas AuNPs para todos los tamaños de NP ensayados. Así, las NPDs no generaron el calentamiento focalizado necesario para causar citotoxicidad. Este resultado indica que la internalización de las AuNP-Pterinas es facilitada por las pterinas.

Las células HeLa tratadas con NPD e irradiadas, vistas al microscopio, tienen una morfología similar a la de las células viables, ver **Figura 52**.

**Figura 52.** Células HeLa tratadas con NPD, luego de la irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.



Las AuNP-AP6C1 y AuNP-AF resultaron biocompatibles con las células HeLa y mostraron resultados significativos de citotoxicidad luego de la irradiación. Para éstas NPs la reducción de la viabilidad celular, tras la irradiación con IRC, fue dependiente de la dosis usada.

Al comparar los efectos foto-térmicos obtenidos para las AuNP-AP6C1 y AuNP-AF, se puede notar que para obtener una citotoxicidad estadísticamente significativa (40,6% de células vivas) usando AuNP-AP6C1 se requiere la concentración más alta (**6,4 µg/mL**). Mientras que, usando AuNP-AF es posible causar citotoxicidad de forma estadísticamente significativa en las concentraciones de **3,2 µg/mL** y **6,4 µg/mL**, obteniendo viabilidades celulares del: 27,6 y 12% respectivamente. Aquí podría interpretarse que la internalización de las nanopartículas es más favorable usando el AF como molécula funcionalizante con respecto al AP6C1, ya que se requiere una menor concentración de AuNP-AF para generar un efecto foto-térmico.

Además los resultados de toxicidad observados para AuNP-AP6C1 (después de la irradiación), indican que las nanopartículas funcionalizadas con AP6C ingresan en las células HeLa, validando la hipótesis de este trabajo. El AP6C está funcionando como un agonista del AF, en el sentido que es reconocido por los receptores de folato e internalizado en las células HeLa.

Por otro lado, el menor efecto foto-térmico observado para las AuNP-AP6C1 en relación con las AuNP-AF, podría estar asociado a que las AuNP-AF son mejor activadas por la radiación IRC, tal como se observó en los experimentos de irradiación de sus soluciones acuosas. El aumento de temperatura para la solución de AuNP-AP6C1 fue de 3°C en 10 min de irradiación, mientras que para la de AuNP-AF fue de 7,8°C.

Sin embargo, no puede descartarse que una de las razones de la menor respuesta de citotoxicidad de las AuNP-AP6C1 esté relacionada con un menor grado de afinidad del AP6C con el receptor de folato, en relación con el AF, que disminuye la internalización de las AuNP funcionalizadas.

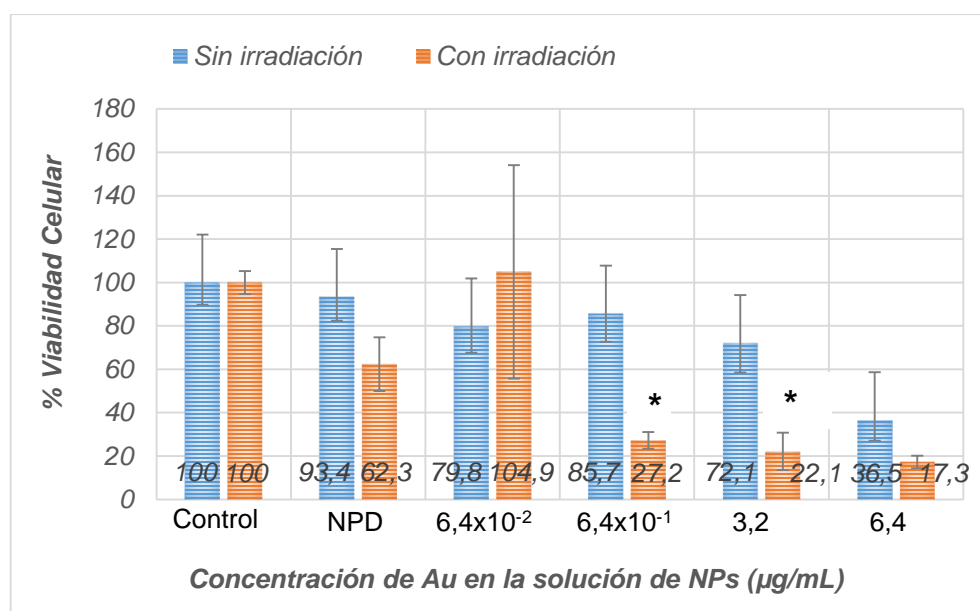
### **3.2.3 Citotoxicidad de las AuNP-Pterinas en células A549 en ausencia y presencia de irradiación IRC**

Se requiere conocer si la internalización de las nanopartículas está asociada a los receptores de folato, una forma de responder ello es usando células que no presentan receptores de folato: A549. En resumen no se espera internalización de las nanopartículas mediada por receptores.

### ✓ AuNP-AP6C1

Las AuNP-AP6C1 no presentaron efectos citotóxicos en las células no irradiadas a las concentraciones de  $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$  y  $3,2 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, en la concentración de  $6,4 \mu\text{g/mL}$  disminuyó la viabilidad, de forma estadísticamente significativa, con relación al control (ver **Figura 53**). Demostrando una citotoxicidad inherente de las AuNP en las células A549.

**Figura 53.** Efecto de las AuNP-AP6C1 sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ;  $3,2$  y  $6,4 \mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



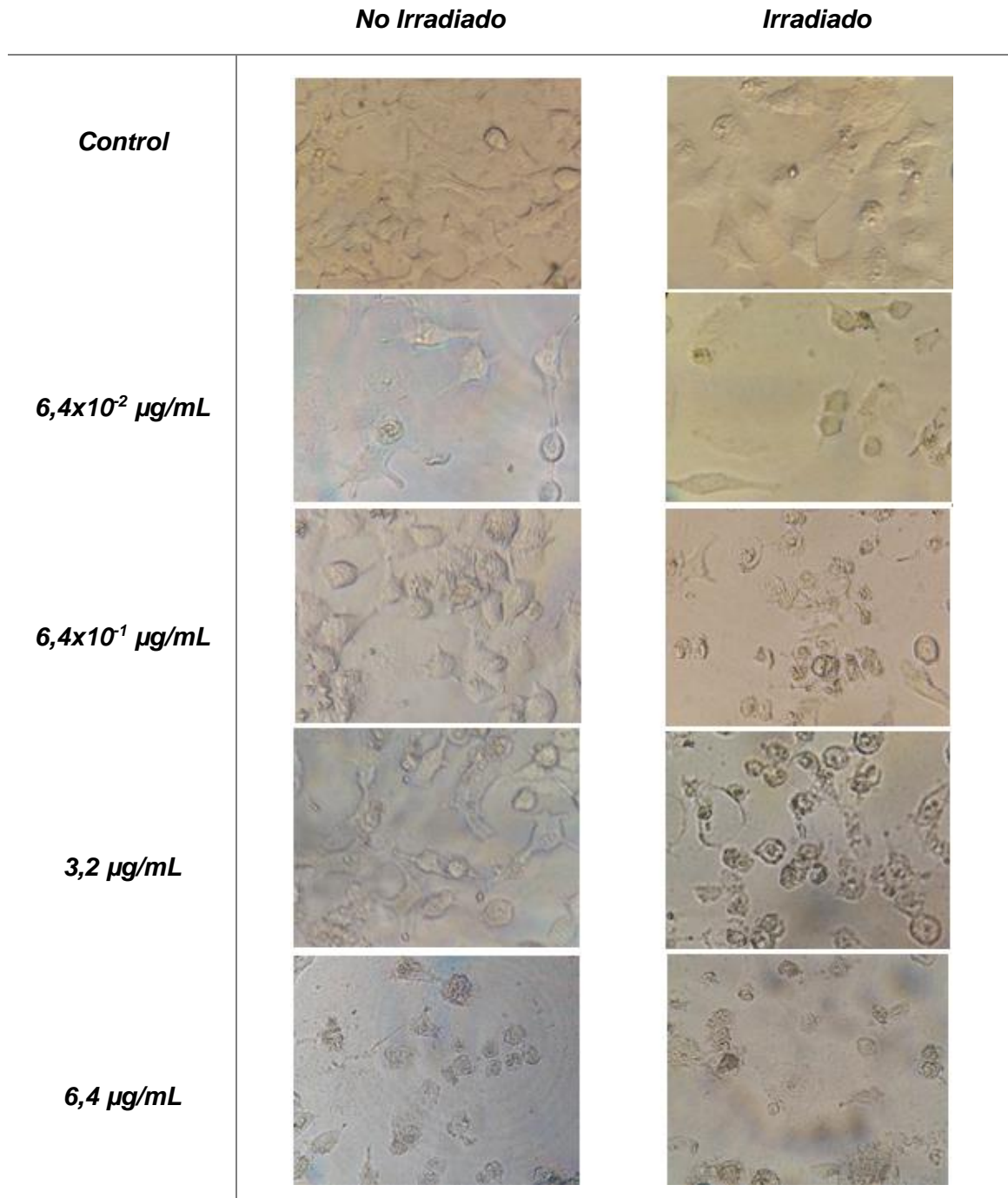
Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las células A549 tratadas con AuNP-AP6C1 no irradiadas e irradiadas, para las concentraciones de  $6,4 \times 10^{-1}$  y  $3,2 \mu\text{g/mL}$ , comprobando que para estas dos concentraciones la radiación tiene una contribución en la reducción de la viabilidad celular (en un 58,5 y 50% respectivamente). Mientras que la pérdida de viabilidad

restante del 14,3 y 27,9%, para las concentraciones respectivas, es debida a la toxicidad de las AuNPs en las A549.

Por otro lado, al comparar la viabilidad de las células tratadas a la máxima concentración de las AuNP-AP6C1, irradiadas y no irradiadas, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, indicando que la toxicidad de las AuNP-AP6C1 es alta y el aporte de la radiación en la muerte celular no es importante.

En las imágenes de las células A549 de la **Figura 54** puede notarse cómo la morfología de algunas de las células no irradiadas en cada grupo empieza a volverse esférica, indicando que las células experimentan estrés en presencia de las AuNP-AP6C1. Se logra ver un cambio brusco en las células irradiadas en contraste con su respectivo grupo sin irradiar.

**Figura 54.** Células A549 tratadas con AuNP-AP6C1 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y  $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.



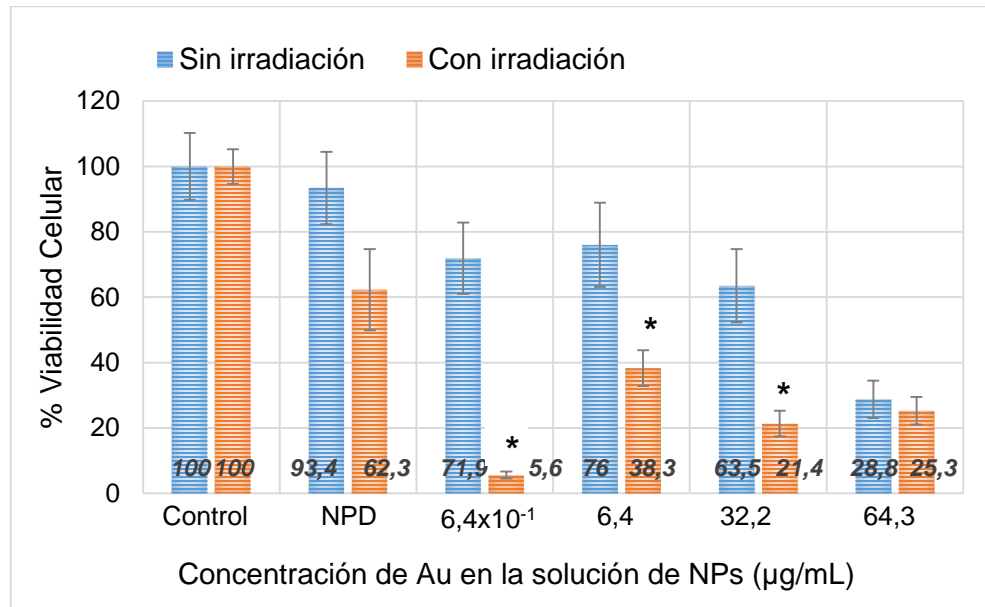
### ✓ AuNP-AP6C2

La **Figura 55** muestra los resultados de citotoxicidad de las AuNP-AP6C2. La viabilidad de las células no irradiadas e irradiadas mostró diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos con AuNP-AP6C2 a las concentraciones de  **$6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2  $\mu\text{g/mL}$** . La pérdida de la viabilidad celular debida a la radiación IRC fue del 66,3; 37,7 y 42,1 %, mientras que la contribución a la pérdida de viabilidad debida a la citotoxicidad de las AuNPs fue del 28,1; 24 y 36,5 % respectivamente.

El análisis ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las células A549 tratadas con AuNP-AP6C2 sin irradiar (**32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$** ) y el control.

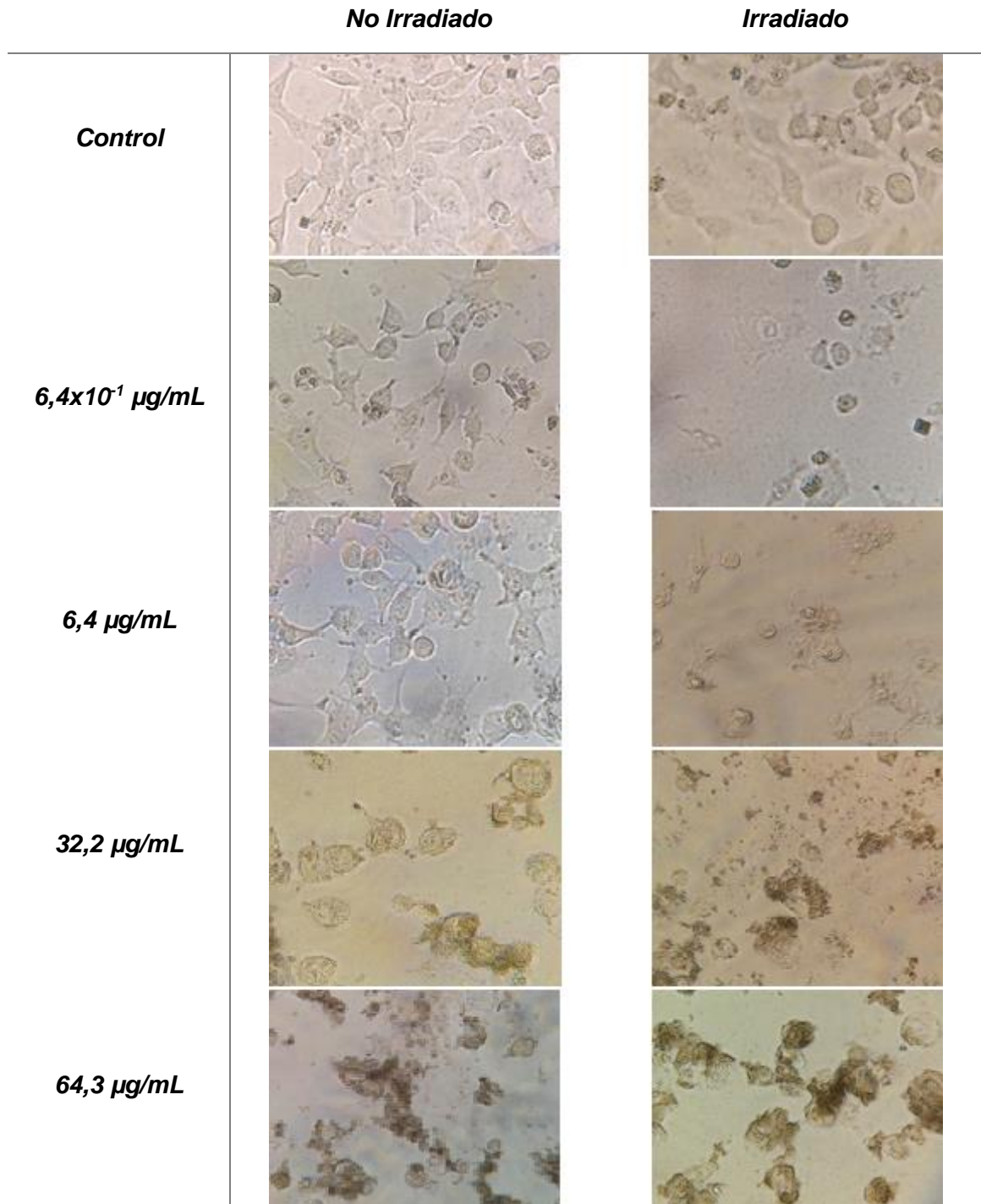
De forma similar a las AuNP-AP6C1, las AuNP-AP6C2 a la mayor concentración no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad celular no irradiada e irradiada, confirmando que las AuNP-AP6C2 **64,3  $\mu\text{g/mL}$**  son lo suficientemente citotóxicas para las A549 como para no necesitar de irradiación.

**Figura 55.** Efecto de las AuNP-AP6C2 sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



Las células A549 tratadas con AuNP-AP6C2 sin irradiación mantienen en su mayoría la forma de las células viables para las dos concentraciones menores, ver **Figura 56**. Mientras que para las concentraciones mayores ya hay presencia de células circulares. En las células irradiadas a las diferentes concentraciones de NPs se observan células redondas y amorfas.

**Figura 56.** Células A549 tratadas con AuNP-AP6C2 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-1}$ ; 6,4; 32,2 y 64,3  $\mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.

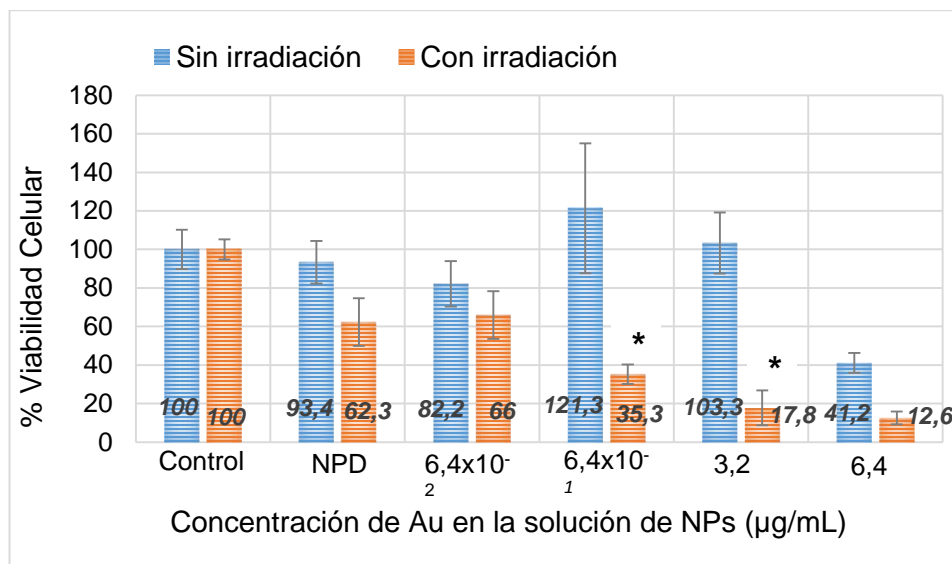


✓ **AuNP-AF**

Una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad celular de las células tratadas sin irradiación con la mayor concentración de AuNP-AF y la del grupo control, refleja una alta citotoxicidad de las AuNP-AF a ésta concentración, ver **Figura 57**.

Al comparar el efecto de muerte celular de las AuNP-AF en células A549 sin irradiar con respecto a las irradiadas, diferencias estadísticamente significativas permiten concluir que la radiación está contribuyendo a la reducción de la viabilidad celular para las concentraciones de  $6,4 \times 10^{-1}$  y  $3,2 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo para la mayor concentración puede notarse que la mayor contribución a la reducción de la viabilidad se debe a la citotoxicidad de las AuNP-AF ( $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), ver **Figura 57**.

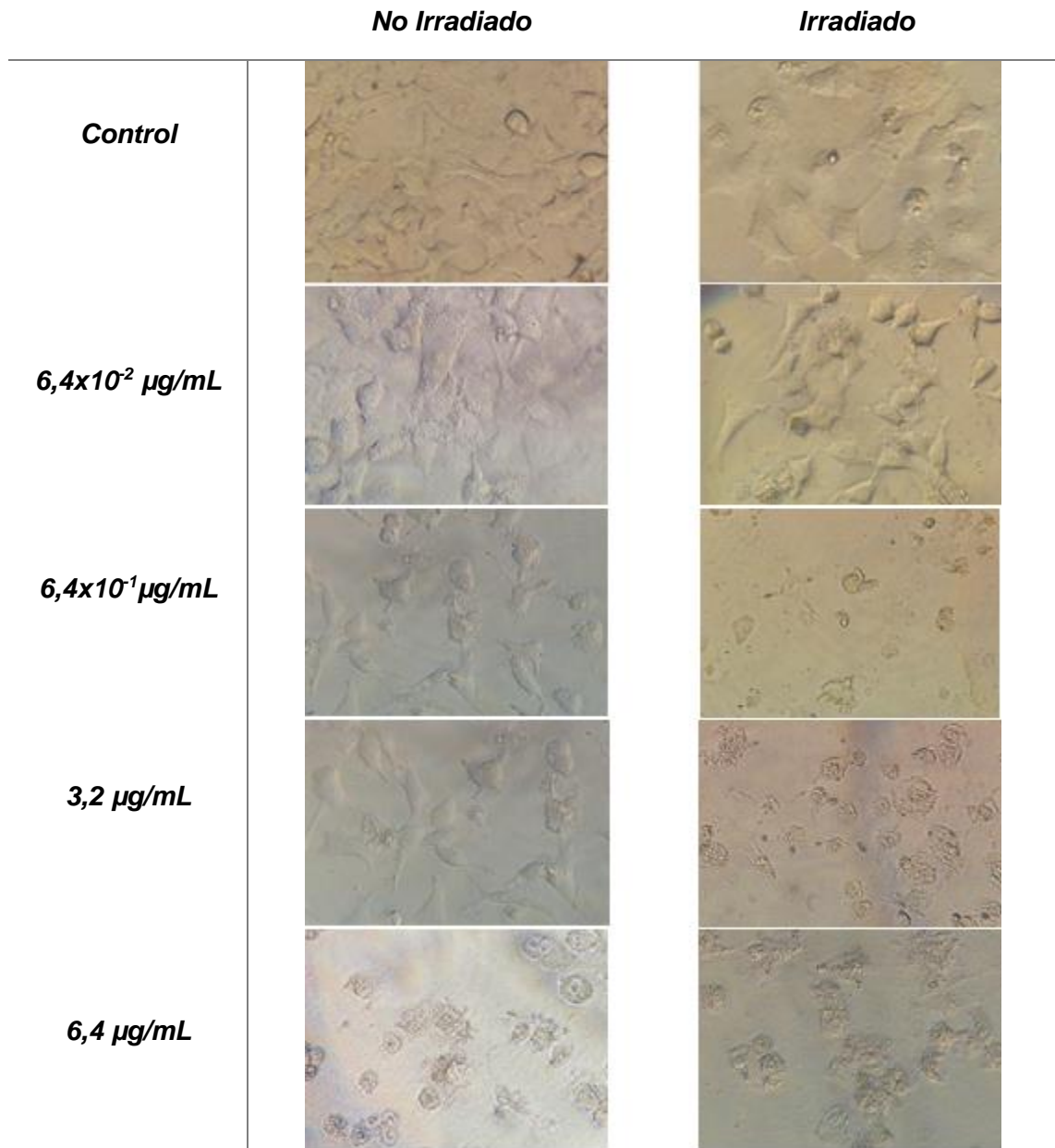
**Figura 57.** Efecto de las AuNP-AF sobre la viabilidad de células A549 a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y 6,4  $\mu\text{g/mL}$ ) con y sin irradiación IRC. Control: células no tratadas con NPs. NPD: células tratadas con AuNPs desnudas (NPD). Las células fueron tratadas por 74h. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación a las células no irradiadas y tratadas con la misma concentración de NPs,  $p < 0,05$ .



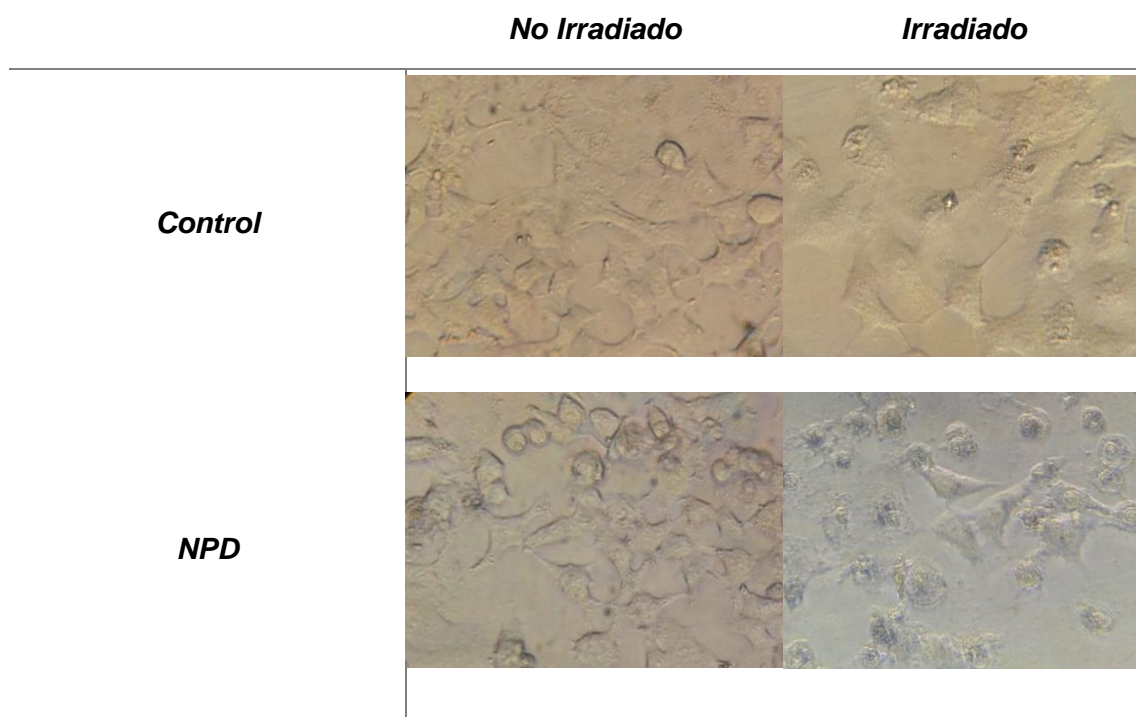
En la **Figura 58** se puede ver como las A549 sin irradiar mantienen la forma alargada característica de las células viables para las tres concentraciones menores, mientras que para la mayor concentración las células se ven alteradas. Las células irradiadas muestran células amorfas para las tres concentraciones mayores.

Las NPD no presentan una citotoxicidad significativa con respecto al control. Además, tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las células irradiadas y no irradiadas. En la **Figura 59** puede notarse que la mayoría de las células tratadas con NPD y sin irradiación no cambian su morfología, mientras que para las células irradiadas se observan algunas células circulares y unas pocas células alargadas viables.

**Figura 58.** Células A549 tratadas con AuNP-AF a diferentes concentraciones ( $6,4 \times 10^{-2}$ ;  $6,4 \times 10^{-1}$ ; 3,2 y  $6,4 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia y presencia de irradiación con IRC durante 5min, vistas al microscopio óptico 40X.



**Figura 59.** Células A549 tratadas con NPs desnudas (NPD) y sin NPs (Control), en ausencia y presencia de irradiación IRC, vistas al microscopio óptico 40X.



Las AuNP-Pterinas mostraron ser citotóxicas para las células A549 para una o dos de las concentraciones de las NPs trabajadas. Así, con el fin de descartar que la toxicidad esté relacionada con las moléculas funcionalizantes, se realizó un experimento para evaluar la citotoxicidad del AP6C y del AF mediante un ensayo de MTT con 70h de tratamiento. Los resultados mostrados en la **Tabla 8** permitieron comprobar el carácter inerte del AP6C y del AF en el rango de concentraciones empleadas en esta investigación.

**Tabla 8.** Resultados de viabilidad celular de células A549 tratadas con AP6C y AF.

	<b>Porcentaje de viabilidad celular (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Control</b>	100	8,2
<b>AP6C 140 <math>\mu</math>M</b>	92,9	2,7
<b>AP6C 70 <math>\mu</math>M</b>	100	8,0
<b>AP6C 14 <math>\mu</math>M</b>	85,4	12,4
<b>AP6C 1,4 <math>\mu</math>M</b>	90,6	11,4
<b>AF 120 <math>\mu</math>M</b>	114,7	5,9
<b>AF 60 <math>\mu</math>M</b>	90,6	7,2
<b>AF 12 <math>\mu</math>M</b>	108,9	7,2
<b>AF 1,2 <math>\mu</math>M</b>	69,3	13,9

De esta forma, se puede indicar que la citotoxicidad de las AuNP-Pterinas en las células A549 está asociada al *cluster* de oro. Patra *et al.*, 2007 demostraron que las AuNPs inducen citotoxicidad en células A549, ya que observaron que la pérdida de viabilidad de las estas células estaba acompañada por una internalización de yoduro de propidio. Estos autores sugieren que el efecto citotóxico es debido a una muerte celular programada, dado que pudieron evidenciar la fragmentación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La división de la PARP es un nodo terminal apoptótico seguido tanto por la ruta intrínseca como por la extrínseca.

La irradiación de las células A549 contribuye significativamente a la reducción de la viabilidad celular, en algunas concentraciones de NPs, indicando que las NPs debieron entrar en las células. Uboldi *et al.*, 2009 observaron que las AuNPs son fácilmente internalizadas en células A549 independientemente del diámetro de partícula.

#### 4. CONCLUSIONES

- ❑ El procedimiento de síntesis y la caracterización realizada sugiere la formación de nanopartículas funcionalizadas con pterinas.
- ❑ Las AuNP-Pterinas preparadas tardan mayor tiempo sin presentar floculación en contraste a las NPD; sin embargo este Método fotoquímico permite obtener AuNPs con variedad de tamaños y formas (AuNP-AF).
- ❑ Las AuNP-Perinas fueron citotóxicas en presencia de IRC en células HeLa, debido a que las pterinas favorecieron la entrada de las AuNP a la célula vía receptor de folato.
- ❑ Se pueden usar el AP6C y AF como ligandos de reconocimiento por parte de los receptores de folato, ya que permitieron la internalización de las AuNPs y al ser irradiadas generaron una reducción de la viabilidad celular.

## 5. RECOMENDACIONES GENERALES

Es recomendable evaluar tiempos más cortos de tratamiento (1-8 h) de las células con las AuNP-Pterinas. Esto con el fin de poder confirmar directamente el efecto de muerte celular obtenido principalmente por las AuNP-Pterinas internalizadas por los receptores folato y no por aquellas que pudiesen entrar pasivamente a través de la membrana lipídica o por vía de endocitosis activa (fagocitosis, pinocitosis o macropinocitosis).

En el presente trabajo se ensayó una línea celular diferente a las HeLa (A549, que no sobre-expresan receptores de folato) con fines de comparación. Sin embargo es importante usar otro tipo de línea celular que no sobre-exprese los receptores de folato y que además no presente citotoxicidad debida a las AuNPs. Esto con el fin de poder estudiar el efecto de la terapia foto-térmica en cada línea celular cancerosa y correlacionarlo con la internalización selectiva hacia las células que sobre-expresen los receptores de folato.

Para poder comparar el efecto del AP6C en relación con el AF en la internalización de las AuNPs se recomienda implementar AuNPs que tengan la misma respuesta foto-térmica plasmónica.

## BIBLIOGRAFÍA

AGARWAL, GS; JHA, SS. Theory Of Second Harmonic Generation At A Metal Surface With Surface Plasmon Excitation. En: Solid State Communications. 1982, Vol. 41, p. 499-501.

AL-MAMUN, Abdulla; *[et al.]*. Plasmon-induced photothermal cell-killing effect of gold colloidal nanoparticles on epithelial carcinoma cells. En: Photochem Photobiol Sci. 2009, vol. 8, p. 1125-1129.

AMENDOLA, Vincenzo. Synthesis of gold and silver nanoparticles for photonic applications. Padua, 2008, 21-22 p. Doctor en Materiales. Universita' Degli Studi di Padova. Facultad de ciencias.

BALLA, Naveen; *[et al.]*. Second harmonic scattering from small particles using Discrete Dipole Approximation. En: Opt Express. 2010, Vol.18, p. 21603-21611.

BLANCO, Duani; *[et al.]*. Nanomedicina: aspectos generales de un futuro promisorio. En: Revista Habanera de Ciencias Médicas. Vol. 10, p. 410-421.

CASTILLO, John; *[et al.]*. Photochemical Synthesis of the Bioconjugate Folic Acid-Gold Nanoparticles. En: Nanomaterials and Nanotechnology. 2013; Vol.18, p. 1-6.

CHHABRA, Rahul; *[et al.]*. Distance-dependent interactions between gold nanoparticles and fluorescent molecules with DNA as tunable spacers. En: Nanotechnology. 2009, Vol. 20, p. 1-10.

CHITHRANI, Devika; *[et al.]*. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. En: Nano Lett. 2006, Vol. 6, p. 662-668.

DANIEL, Marie-Christine; ASTRUC, Didier. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. En: Chem Rev. 2004, Vol. 104, p. 293-346.

EUSTIS, Susie; [et al.]. Gold Nanoparticle Formation from Photochemical Reduction of Au<sup>3+</sup> by Continuous Excitation in Colloidal Solutions. A Proposed Molecular Mechanism. En: *J. Phys. Chem. B*. 2005, Vol. 109, p.4811-4815.

HAGHI, A. K., [et al.]. Nanomaterials and Nanotechnology for composites Desing, Simulation and Applications. {20 mayo de 2015}. Disponible en [https://books.google.com.co/books?id=fN8\\_CQAAQBAJ&pg=PA172&dq=nanomaterials+and+nanotechnology&hl=en&sa=X&ei=82NrVZa8J4uogwTt9oPYCQ&ved=0CEYQ6AEwBg#v=onepage&q=nanomaterials%20and%20nanotechnology&f=false](https://books.google.com.co/books?id=fN8_CQAAQBAJ&pg=PA172&dq=nanomaterials+and+nanotechnology&hl=en&sa=X&ei=82NrVZa8J4uogwTt9oPYCQ&ved=0CEYQ6AEwBg#v=onepage&q=nanomaterials%20and%20nanotechnology&f=false)

HORIMOTO, Nishizawa; [et al.]. Dye fluorescence enhancement and quenching by gold nanoparticles: Direct near-field microscopic observation of shape dependence. En: *Chem Phys Lett*. 2008, Vol. 467, p. 105-109.

HUANG, Wei-Chieh; Chen Y-C. Photochemical synthesis of polygonal gold nanoparticles. En: *J Nanoparticle Res*. 2008, vol. 10, p. 697-702.

HUANG, Xiaohua; [et al.]. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. En: *J Am Chem Soc*. 2006, Vol. 128, p. 2115-2120.

HUANG, Xiaohua; [et al.]. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. En: *Lasers Med Sci*. 2008, Vol. 23, p. 217-228.

HUANG, Xiaohua; [et al.]. The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. En: *Lasers Surg Med*. 2007, Vol. 39, p. 747-753.

HUFF, Terry B. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. En: *Nanomedicine*. 2007, Vol. 2, p.125-132.

JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Au nanoparticles target cancer. En: *Nano Today*. 2007, Vol. 2, p. 19-29.

JHAVERI, Mona; *[et al.]*. Impact of Extracellular Folate Levels on Global Gene Expression. En: *Molecular Pharmacology*. 2001, Vol. 60, p. 1288-1295.

KANG, Kyung, *[et al.]*. Fluorescence manipulation by gold nanoparticles: from complete quenching to extensive enhancement. En: *J Nanobiotechnology*. 2011, Vol. 9, p. 6.

KREYLING, Wolfgang *[et al.]*. A complementary definition of nanomaterial. En: *Nano Today*. 2010; Vol. 5, p.165-168.

LI, Dongxiao; *[et al.]*. Negligible absorption of radiofrequency radiation by colloidal gold nanoparticles. En: *J Colloid Interface Sci*. 2011, Vol. 358, p. 47-53.

LI, Gaiping; *[et al.]*. One-step synthesis of folic acid protected gold nanoparticles and their receptor-mediated intracellular uptake. En: *Chemistry*. 2009, Vol.15, p. 9868-9873.

LI, Guifeng; *[et al.]*. Photoinduced Electron Transfer in Folic Acid Investigated by Ultrafast Infrared Spectroscopy. En: *J Phys Chem*. 2012; Vol. 116, p. 3467-3475.

LIZ-MARZAN, Luis M. Nanometals: formation y color. En: *Materials Today*. 2004, Vol. 2, p. 26-31.

LU, X; *[et al.]*. Facile synthesis of Gold Nanoparticles with Narrow Size Distribution by Using AuCl or AuBr as the Precursor. En: *Chemistry*. 2008, Vol. 14, p.1584-1591.

MORAN, Christine; *[et al.]*. Size-dependent joule heating of gold nanoparticles using capacitively coupled radiofrequency fields. En: *Nano Res*. 2009, Vol. 2, p.400-405.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. En: *J Immunol Methods*. 1983; Vol. 65, p. 55-63.

MURPHY, Catherine; *[et al.]*. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. En: *J Phys Chem B*. 2005, Vol. 109, p. 13857-13870.

PATRA, Hirak; [et al.]. Cell selective response to gold nanoparticles. En: Nanomedicine. 2007, Vol 3, p.111-119.

PEREZ-JUSTE, Jorge; [et al.]. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. En: Coord Chem Rev. 2005; Vol. 249, p.1870-1901.

SAPSFORD, Kim; [et al.]. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. En: Chem Rev. 2013, Vol.113, p.1904-2074.

SEGA, Emanuela; LOW, Philip. Tumor detection using folate receptor-targeted imaging agents. En: Cancer Metastasis Rev. 2008, Vol. 27, p. 655-664.

STELLA, B; [et al.]. Desing of folic acid-conjugates nanoparticles for drug targeting. En: Journal of pharmaceutical sciences. 2000, Vol. 89, p. 1452-1464.

THOMAS, Andrés. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. La Plata-Argentina, 2001, 1-284 p. Doctor en Ciencias exactas. Universidad de La Plata. Facultad de Ingenieria.

TOMA, Henrique; [et al.]. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. En: J. Braz. Chem. Soc. 2010, Vol 21, p. 1158-1176.

TONG, Ling; [et al.]. Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. En: Adv Mater. 2007, Vol. 19, p. 3136-3141.

TSAI, Shiao-wen; [et al.]. Surface-Modified Gold Nanoparticles with Folic Acid as Optical Probes for Cellular Imaging. En: Sensors. 200, Vol. 8, p. 6660-6673.

TSENG, Kuo-Hsiung; [et al.]. Preparation of gold ethanol colloid by the arc discharge method. En: J Alloys Compd. 2009, Vol. 472, p. 446-450.

UBOLDI, Chiara; [et al.]. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. En: *Part Fibre Toxicol*. 2009, Vol. 6, p. 18.

VLAHOV, Iontcho; LEAMON, Christopher. Engineering folate-drug conjugates to target cancer: from chemistry to clinic. En: *Bioconjug Chem.* 2012; vol. 23, p. 1357-1369.

WANGOO, Nishima; [et al.]. Facile synthesis and functionalization of water-soluble gold nanoparticles for a bioprobe. En: *Anal Chim Acta.* 2008, Vol. 610, p. 142-148.

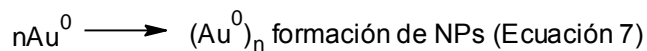
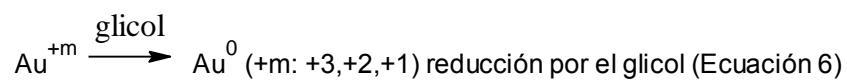
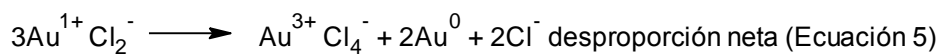
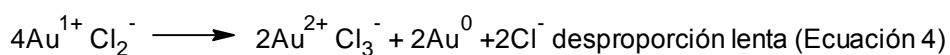
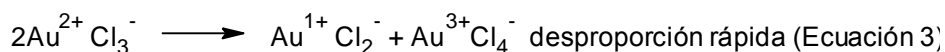
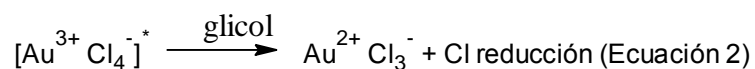
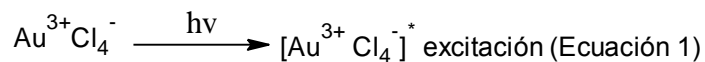
WEISBECKER, Carl; [et al.]. Molecular Self-Assembly of Aliphatic Thiols on Gold Colloids. En: *Langmuir.* 1996, Vol. 12, p. 3763-3772.

ZHANG, Zhaowu; [et al.]. Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. En: *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2010, Vol. 18, p. 5528–5534.

ZHANG, Zhi-juan; [et al.]. Fluorescent Property of Gold Nanoparticles with Different Surface Structures. En: *Chinese J Chem Phys.* 2007, Vol. 20, p. 796-800.

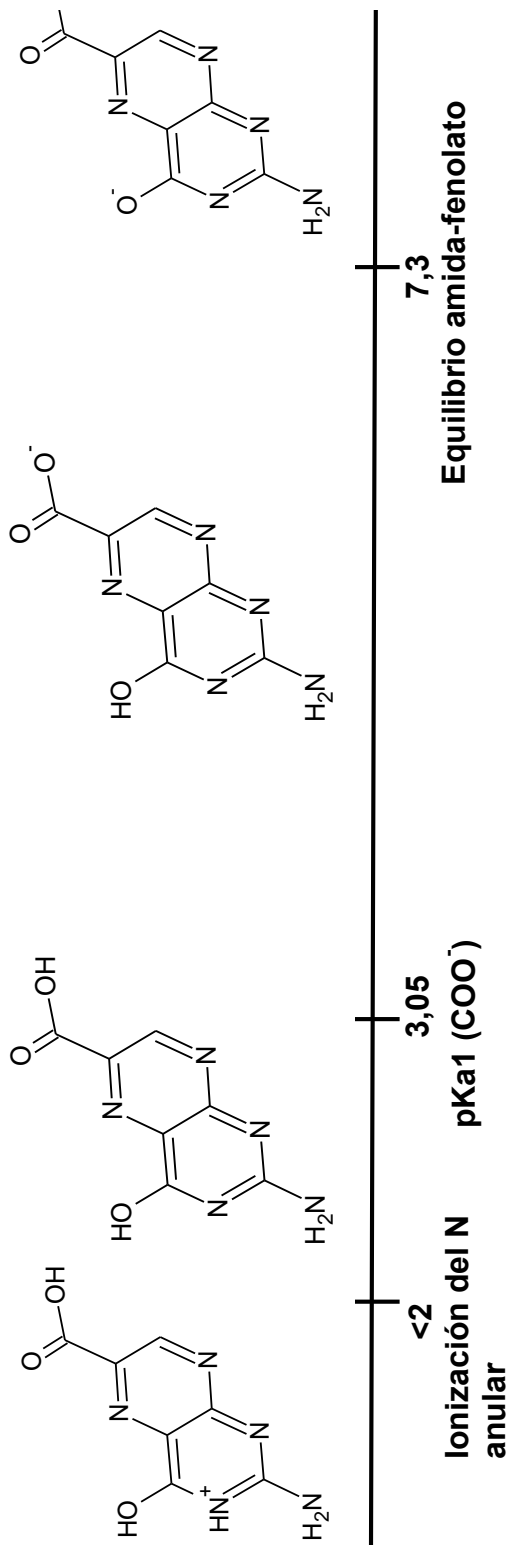
## ANEXOS

**Anexo A.** Mecanismo para la síntesis de AuNPs en presencia de radiación UV y etilenglicol.



Propuesta Eustis *et al.*, 2005.

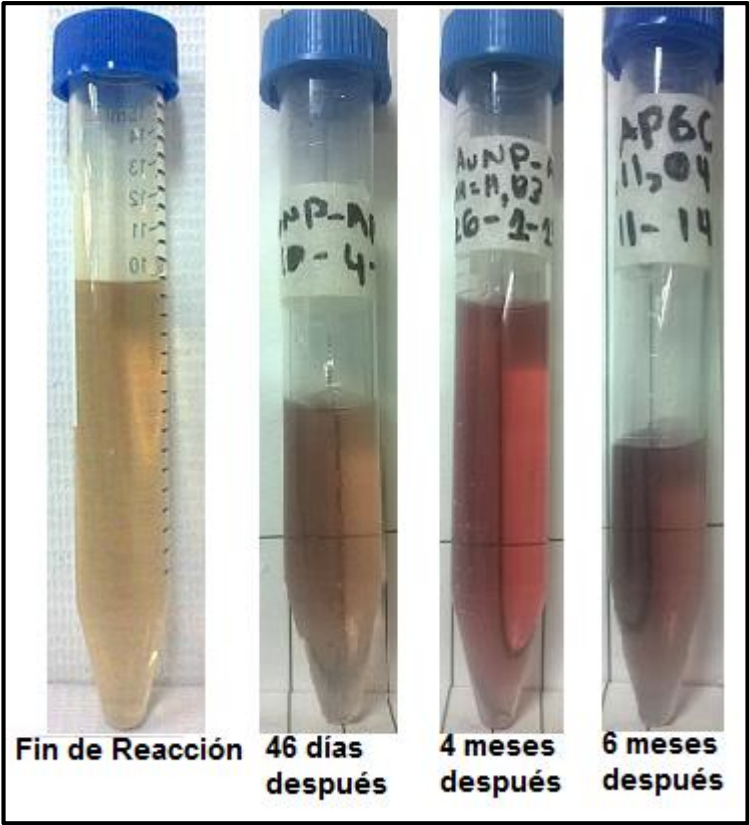
**Anexo B.** Formas ionizadas del AP6C en función del pH.



**Anexo C.** Fotografías de la solución de AuNP-AP6C2 antes y después de precipitar.



**Anexo D.** Fotografías de soluciones de AuNP-AP6C1 a varios tiempos después de la síntesis.



**Anexo E.** Fotografías del proceso de preparación de las AuNP-AF.



Anexo F. Formas ionizadas del AF en función del pH.

