

**ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IMPEDANCIA
ELÉCTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa.**

**CARLOS ANDRÉS AMAYA BAUTISTA
DAVID FERNANDO TORRES FLÓREZ**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO – MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA
2013**

**ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IMPEDANCIA
ELÉCTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa.**

**CARLOS ANDRÉS AMAYA BAUTISTA
DAVID FERNANDO TORRES FLÓREZ**

**Proyecto de Grado en modalidad de Trabajo de Investigación como requisito
parcial para optar al título de Ingeniero Electrónico**

**Director:
David A. Miranda, PhD**

**Co-director
Sandra P. Corzo, M. Sc(c).
Stelia C. Méndez, PhD.
Fernando Martínez, PhD**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FÍSICO – MECÁNICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y
TELECOMUNICACIONES
BUCARAMANGA
2013**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

Dios por los dones y talentos

Mi querida madre Dora Bautista por su amor, paciencia y siempre soñar que se puede.
Mi hermano Daniel por permitirme ser su referente.
Mis abuelos y familiares crearon por motivarme.
Adriana por su apoyo y amor incondicional.
Amigos y compañero de proyecto que lucharon junto a mí en este proceso.
Y la música por ser el más efectivo canal de felicidad.

El afán de una flor es dar su fruto, el afán de un árbol es dar su sombra y siempre cumplen con su tarea. Al culminar un arduo trabajo el afanoso corazón se llena de alegría y felicidad y no se puede ocultar la necesidad de compartir esa felicidad con las personas más queridas.

INTELIGENCIA:

"El hombre inteligente no es el que tiene muchas ideas, sino el que sabe sacar provecho de las pocas que tiene." (Anónimo).

PACIENCIA:

Se paciente. Te pasará, tarde o temprano: y la vida te abrirá la puerta, y te permitirá entrar y dar una gran fiesta!" (Louis Brown)

SER:

"Existe al menos un rincón del universo que con toda seguridad puedes mejorar, y eres tú mismo." (Aldous Huxley).

FELICIDAD:

"La felicidad es dos cosas al mismo tiempo: meta vital y ruta hacia una vida mejor" (Stefan Rilkin).

Carlos Andrés Amaya B.

A Dios porque todo lo que hice fue por la voluntad de Él.

A mi madre Maria Eugenia que es y siempre será el motor de mis logros, mis alegrías y mi vivir.

A mis abuelos que supieron inculcarme directa e indirectamente los valores más preciados.

A mis tíos y tías porque siempre tener una palabra de aliento para poder terminar este proyecto.

A mis primos y primas, porque su juventud me llenaban de energía.

*A mis amigos Eduardo, Cristian y Samir quienes son mis hermanos y
mis compañeros de aventura.*

*A Carlos porque por convencerme de esta gran idea, su paciencia y por
ser un excelente compañero y amigo.*

*Y a todos mis compañeros de la Universidad, quienes compartieron sus
alegrías, fracasos y conocimientos.*

David Fernando Torres Flores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la oportunidad no sólo de soñar sino también de cumplir un sueño.

A nuestras Familias por su apoyo sin condiciones y desinteresadamente, desde el primer momento.

A nuestro director de proyecto David Alejandro Miranda, PhD, por sus enseñanzas, dedicación, paciencia y confianza en nosotros.

A nuestras codirectoras Msc. Sandra Patricia Corzo y Stelia Carolina Mendez, PhD, por su colaboración, paciencia y tiempo en todo el transcurso de nuestra investigación.

A nuestro codirector Fernando Martínez Ortega, PhD, por su colaboración y aporte científico y central de esta investigación.

A Ms(c) Linda E. Bertel por su amistad y diligente colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A Msc. Samuel Jaimes por sus oportunos aportes y siempre tener una respuesta satisfactoria a nuestras inquietudes.

A nuestro grupo de investigación en Ciencia de Materiales Biologicos y Semiconductores (CIMBIOS), por compartir todo su conocimiento.

A nuestros compañeros del Seminario (Semillero): Biofisiocoquímica del Cáncer, por compartir con nosotros los logros, avances, estudios y dificultades durante esta etapa de nuestras vidas.

Al profesor Ángel Meléndez, coordinador del laboratorio de Electroquímica, por facilitarnos el espacio para el uso del potencióstato, así como al Centro de Materiales y Nanociencias (CMN) al cual pertenece dicho laboratorio.

A la Universidad Industrial de Santander especialmente a la escuela de Ingenierías eléctrica, electrónica y telecomunicaciones y la escuela de Física y Química por el suministro de equipos y por tener en cuenta nuestras solicitudes.

A nuestros amigos y compañeros por compartir los buenos y malos momentos durante nuestra carrera universitaria.

Y finalmente a todas las personas que de alguna u otra manera nos colaboraron en la culminación de esta etapa de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	19
1. FUNDAMENTACIÓN TEORICA.....	21
1.1. ANTECEDENTES DEL PROYECTO	21
1.1.1. Cáncer.....	22
1.1.2. Cáncer cervical y problemática	22
1.2. LA CÉLULA	23
1.2.1. Membrana celular y transporte.....	23
1.2.2. Transporte	24
1.2.2.1. Las bombas	25
1.3. CÉLULAS HeLa	27
HeLa: Las primeras células humanas inmortales	27
1.3. NANOTECNOLOGÍA Y NANOCIENCIA.....	28
1.3.1. Nanopartículas	29
1.3.2. Síntesis de las nanopartículas.....	30
1.4. ÁCIDO FÓLICO	31
1.5. PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN, MODELOS Y PROPIEDADES ELÉCTRICAS	32
1.6. MÉTODOS PARA MEDIR IMPEDANCIA ELÉCTRICA	33
1.6.1. Método de tres electrodos (3EM).	34
1.6.2. Método de cuatro electrodos (4EM).	34
1.6.3. Método de Van der Pauw.....	35
1.7. BIOIMPEDANCIA	36
1.8. PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS TEJIDOS	37
2. MATERIALES Y METODOS	40
2.1. EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADO.....	40

2.1.1. Sondas y electrodos.....	41
2.1.1.1. Electrodo de Oro Serigrafados	41
2.1.1.2. Sonda de 4 Puntas.....	42
2.1.2. Potenciostato	43
2.1.3. Nanopartículas.....	44
2.1.3.1. *Síntesis.....	44
2.1.3.2. Características	45
2.2. PRUEBAS DE TOXICIDAD	46
Metodología de la citotoxicidad	46
3. RESULTADOS	48
3.1. RESULTADOS DE TOXICIDAD	50
3.1.1. Evaluación de la citotoxicidad en cultivos de células HeLa	50
3.1.2. Análisis de la citotoxicidad	50
3.1.3. Análisis para 40 minutos	50
3.1.4. Análisis para 2 horas.....	52
3.2. CALIBRACION DEL POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO (AUTOLAB PGSTAT302N - HIGH PERFORMANCE).....	54
3.3. MEDICIONES DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa.....	56
3.4. MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON AuNPs.	58
3.5. MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON ÁCIDO FÓLICO.....	58
3.6. MEDICION DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON AuNPs- AF.....	59
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	61
5. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.....	66
REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas, por William C. Wimley, profesor de Bioquímica en la U. de Tulane en Nueva Orleans, USA [28].	24
Figura 2. Bomba que intercambia sodio y potasio, ayudando a establecer los gradientes de estos iones en la membrana plasmática [29].	25
Figura 3. Esquema de los distintos tipos de transporte llevado a cabo por los transportadores [30].	26
Figura 4. Formas de transportes [31].	26
Figura 5. Las moléculas pueden ser incorporadas por endocitosis de forma específica unidas a receptores de la membrana plasmática [32].	27
Figura 6. Escala del tamaño de objetos nano y microscópicos [25].	29
Figura 7. a, b. Vitrales y la copa de Licurgo formados por nanopartículas de oro y de plata [39].	29
Figura 8. Estructura química del AF [12].	31
Figura 9. Contraíón polarizado cerca de la superficie de una partícula esférica [47].	32
Figura 10. Esquema de dipolos de polarización inducidos por el campo en la interfaz partícula-medio K_m y K_p son las conductividades eléctricas de la partícula y el medio, respectivamente j_{em} y j_{ep} son flujos de electromigratorios de carga libre en partícula y medio [49].	33
Figura 11. Configuración del método de tres electrodos [53].	34
Figura 12. Configuración del método de cuatro electrodos [53].	34
Figura 13. Posición de los electrodos en una de las configuraciones de la técnica de Van der Pauw [55].	35
Figura 14. Zonas de dispersión [62].	39
Figura 15. Cubetas UV/VIS, desechables [64].	41
Figura 16. Electrodo de Oro serigrafiado utilizados en la toma de datos [65].	42
Figura 17. Sonda Van der Pauw, con geometría cuadrada.	43
Figura 18. Autolab PGSTAT302N - High Performance [65].	43
Figura 19. Interfaz gráfica software NOVA [66].	44
Figura 20. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) [25].	45
Figura 21. Espectros tomados con el electrodo serigrafiado sumergido (ESS), gota (ESG) y la sonda Van der Pauw.	49
Figura 22. Citotoxicidad de nanopartículas funcionalizadas en células HeLa después de 40 minutos de incubación [Autores].	50

Figura 23. Citotoxicidad de NPs y AF en células HeLa después de 2 horas de incubación [Autores]. 52

Figura 24. Citotoxicidad de 300 fM de NPs en células HeLa [Autores]..... 53

Figura 25. Parte real de la Impedancia a diferentes concentraciones de solución salina con sus valores respectivos de conductividad (recuadro) [Autores]..... 54

Figura 26. Espectro obtenido con el electrodo serigrafiados sumergido. Tiempo cero minutos (t_0), tiempo después de 40 minutos (t_1) y tiempo después de 2 horas (t_2) [Autores]. 56

Figura 27. Espectro obtenido con el electrodo serigrafiados aplicando una gota [Autores]. 57

Figura 28. Espectro obtenido con la sonda Van der Pauw [Autores]. 57

Figura 29. Espectro del medio celular con AuNPs y su dinámica en el tiempo [Autores]. . 58

Figura 30. Espectro del medio celular con AF y su dinámica en el tiempo [Autores]. 59

Figura 31. Espectro del medio celular con AuNPs-AF y su dinámica en el tiempo [Autores]. 60

Figura 32. Comparación de los espectros medio MEM, células y nanopartículas [Autores]. 62

Figura 33. Espectro del medio celular con AuNPS y AuNPs-AF [Autores]..... 63

Figura 34. Dinámica del AF con las células [Autores]..... 64

Figura 35. Dinámica del AF con las células [Autores]..... 65

Figura 36. Comparación de la dinámica del AF y AuNPs-AF [Autores]. 65

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: MEDIDAS A BAJAS FRECUENCIAS.....	76
ANEXO B: MODELO CIRCUITAL.....	78
ANEXO C: BITACOTA.....	78
ANEXO D: RUTINA EN MATLAB PARA LA CALIBRACION DE LOS DATOS.....	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características principales del POT / GAL.....	45
Tabla 2. Concentraciones de las NPs.....	47
Tabla 3. Resultados del test de TUKEY con STATISTICA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

AF. Ácido Fólico.

ANFIPÁTICAS. Moléculas que poseen un extremo hidrofílico.

ATP. Trifosfato de adenosina (adenosín trifosfato', del inglés denosineTriPhosphate) es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular.

ATPasa. Subconjunto de enzimas que son capaces de producir la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP)

AuNPs. Nanopartículas de Oro.

AuNPs-AF. Nanopartículas de Oro funcionalizadas con Ácido Fólico.

AuNRs. Nanobarras de oro.

CITOSOL. O hialoplasma es la parte soluble del citoplasma de la célula

CMN. Centro de Materiales y Nanociencias.

DMSO. Dimetilsulfóxido

EIS. Espectroscopia de impedancia eléctrica.

ENDOCITOSIS. Proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana.

FOSFORILACIÓN. Es la adición de un grupo fosfato inorgánico a cualquier otra molécula.

GLÚCIDOS. Azúcares.

HeLa. Células de cultivo celular cervicouterino.

LÍPIDOS. Conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas,

MEM. *Minimum Essential Media*.

MFQ. Método físico químico.

MTT: (Metil tiazol tetrazalio).

NPs. Nanopartículas

NUCLEÓTIDOS. Son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa).

PINOCITOSIS. Proceso biológico que permite a algunas células y organismos unicelulares obtener líquidos orgánicos del exterior para ingresar nutrientes.

PIRÓLISIS. Descomposición química de materia orgánica y todo tipo de materiales.

RF. Receptores de folato.

SERIGRAFIADO. Procedimiento de impresión sobre cualquier material.

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL ESPECTRO DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa.¹

AUTOR: Carlos Andrés Amaya Bautista, David Fernando Torres Flórez²

PALABRAS CLAVES: Espectro, impedancia, Nanopartículas de oro, células, HeLa, funcionalización, ácido fólico, receptor de folato, electrodo serigrafiado, Van der Pauw cáncer.

DESCRIPCIÓN:

Se presentan los resultados de un estudio de las propiedades eléctricas de células HeLa y su interacción con nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico desde el punto de vista de la espectroscopia de impedancia eléctrica.

Las medidas se tomaron con el potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT302N - High Performance) en un rango de 10 Hz a 900kHz, usando electrodos serigrafiados circulares de oro de la empresa Dropsens y una sonda de 4 puntas con geometría cuadrada, electrodos de oro y factor de forma constante. Cada espectro fue tomado después de 40 minutos y 2 horas de incubación de las células HeLa con nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico (AuNPs-AF), nanopartículas de oro (AuNPs) o ácido fólico (AF), esto para ver la dinámica que describe el AF, AuNPs y AuNPs-AF.

Se encontró que la técnica de Van der Pauw comparada con la técnica de tres puntos que usa el electrodo serigrafiado, muestra mejores resultados para medir la impedancia de estos medios celulares sugiriendo una interacción de la AuNPs-AF con las células.

Con este estudio se desarrolló una metodología para identificar en que parte del medio (intracelular o extracelular) puede encontrarse las nanopartículas de oro (AuNPs). Estos resultados permiten buscar alternativas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer en proyectos futuros.

¹ Proyecto de grado

² Facultad de físico mecánicas, escuela de Ing. eléctrica, electrónica y telecomunicaciones.

ABSTRACT

TITLE: STUDY ELECTRICAL IMPEDANCE SPECTRUM OF GOLD NANOPARTICLES HeLa CELL CULTURES ³

AUTHOR: Carlos Andrés Amaya Bautista, David Fernando Torres Flórez⁴

KEYWORDS: Spectrum, impedance, gold nanoparticles, cells, HeLa, functionalization, folic acid receptor, folate and screen printed electrode.

Description:

Study of the electrical properties of HeLa cells and its interaction with nanoparticles of gold functionalised with folic acid from the standpoint of electrical impedance spectroscopy.

Measurements were taken with the potentiostat / galvanostat (Autolab PGSTAT302N - High Performance) in a range of 10Hz to 900 kHz, using screen-printed electrodes (by Dropsens Factory) and a gold circular 4-point probe with square geometry, gold electrodes and a constant factor. Every spectrum was taken after 40 minutes and 2 hours of incubation of the cells HeLa with golden nanoparticles functionalised with folic acid (AuNPs-AF), golden nanoparticles (AuNPs) or folic acid (AF), this to see the dynamics that describes the AF, AuNPs and AuNPs-AF.

We found that the technique of Van der Pauw compared with the technique of 3 points that uses the electrode serigrafiado, shows better results to measure the impedance of these cellular means, suggesting an interaction of the AuNPs-AF with the cells.

This study developed a methodology to identify where in the medium (intracellular or extracellular) gold nanoparticles (AuNPs) can be found. These results allow to find alternatives for the diagnosis and treatment of cancer in future projects.

³ Degree project

⁴ Faculty of mechanical physical, school Ing. electrical, electronics and telecommunications

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que puede presentarse a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo, se define como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células, su carga creciente en el perfil de salud amerita intervenciones oportunas, siendo así una problemática mundial de alta incidencia e impacto socio-económico. El cáncer requiere que ingenierías y ciencias, estudien técnicas de diagnóstico temprano con alta sensibilidad y especificidad [1-8]. Y herramientas de monitoreo en tiempo real [2, 9, 10, 11].

Esta investigación es de tipo experimental y uso nanotecnología y espectroscopia de impedancia eléctrica para estudiar el comportamiento de células HeLa en presencia de nanopartículas, como eje central de la investigación [12]. Los datos se tomaron durante 15 sesiones de 12 horas haciendo mediciones (*in vitro*) en diferentes cultivos de células HeLa, en las instalaciones de los laboratorios de electroquímica (perteneciente al CMN) del Parque Tecnológico de Guatiguara y laboratorios del campus central de la Universidad Industrial de Santander.

Este documento se encuentra dividido en cinco capítulos. En el capítulo uno se presenta una fundamentación teórica, enfocada más hacia el estado del arte de la investigación que a una descripción detallada de cada tema.

En el capítulo dos se describe el desarrollo de cada fase de la investigación y las pruebas de toxicidad para establecer las concentraciones más adecuadas para la toma de datos. En el capítulo tres se presentan los resultados obtenidos y algunas características de los espectros. En el capítulo cuatro se hace un análisis cualitativo y más detallado de cada resultado. Adicionalmente se muestra la diferencia entre dos técnicas, el electrodo serigrafiado que trabaja con la técnica de 3 puntas y el método de Van der Pauw que trabaja con 4 puntas.

Como primer paso trabajamos con el electrodo serigrafiado encontrando que este método mide la interfaz que hay entre el medio y el electrodo concluyendo que la técnica no sirve para medir medios celulares, direccionando la investigación a trabajar con la sonda Van der Pauw la cual nos mostró mejores resultados presentando diferencias notorias para cada medio, apoyando la hipótesis de que el espectro de impedancia eléctrica de células HeLa difiere significativamente si nanopartículas de oro agregadas al cultivo celular se encuentran en el medio de cultivo a cuando éstas ingresan, o se adhieren a las células. Identificar en que parte

del medio (intracelular o extracelular) se encuentra las nanopartículas de oro, planteando con este estudio alternativas para la detección y el tratamiento del cáncer en futuros proyectos de investigación.

Y el capítulo cinco se expone las observaciones, conclusiones y sugerencia para trabajos futuros.

1. FUNDAMENTACIÓN TEORICA

1.1 ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Desde finales del siglo XIX se han realizado estudios acerca de las propiedades eléctricas que poseen los tejidos biológicos, durante los últimos años el desarrollo de esta línea de investigación se ha acelerado gracias al gran número de aplicaciones médicas que aprovechan las propiedades dieléctricas de los tejidos biológicos [4, 5, 13].

Son considerables las investigaciones previas que sirven de base hoy en día para avanzar en el estudio de la ciencia en la medición de espectro de impedancia eléctrica en tejido de cuello uterino. En primera instancia es importante resaltar el aporte hecho por los hermanos Cole en el año 1941 [14], quienes desarrollaron una ecuación empírica dependiente de la frecuencia que describe el comportamiento de disipación y conservación de energía en dieléctricos, siendo posible su representación en términos de un circuito equivalente.

En 1950 Hernán Paul Schwan introduce el concepto de dispersión al reportar la dependencia en frecuencia de las capacitancias de los músculos, [15] habla de las propiedades dieléctricas de los tejidos. En el año 2000 Brian Brown, propone el uso de la espectroscopia de impedancia eléctrica en el rango de 1kHz a 1MHz, como técnica diagnóstica de cáncer de cuello uterino y deja entrevisto las bondades de utilizar propiedades eléctricas del tejido epitelial de cuello uterino para la detección temprana de cáncer cervical: bajo costo, fácil aplicación, resultado inmediato y alta especificidad y sensibilidad [16, 17].

En el año 2000, B. H. Brown, K. Boston, R. H. Smallwood, usaron una sonda en forma de lápiz y midieron el espectro de impedancia eléctrica en ocho puntos diferentes de la cerviz uterina en 124 mujeres con tejidos cervicales anormales. Paso siguiente, estas medidas fueron comparadas con las del tejido normal. Los resultados del estudio de Brown muestran que este método puede ser usado para dar una estimación de la diferencia entre el tejido cervical normal y precanceroso (displásico) [18].

Siguiendo la línea de estas investigaciones, en la Universidad Industrial de Santander se han desarrollado trabajos referentes al estudio de impedancia

eléctrica aplicada al diagnóstico de cáncer cervical, [4, 5, 19], esto fortalecido con trabajos de desarrollo de hardware y software enfocados a ser herramientas que enriquecen estas exploraciones, [20, 21].

Además se han desarrollado modelos físico-matemáticos que utilizan espectroscopia de impedancia eléctrica, en el cual se tiene uno que sugiere que el número de diferentes tipos de capas celulares que forman el tejido biológico, la conductividad intracelular y extracelular podría ser utilizado para explicar las diferencias eléctricas entre espectros de bioimpedancia en los tejidos normales y neoplásicos [22].

1.1.1 Cáncer

Se denomina cáncer al crecimiento y propagación incontroladas de células, presentándose a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo. Puede deberse a factores externos como el tabaco y organismos infecciosos, o internos como desordenes hormonales. [1, 2, 3].

Se calcula que cada año se presenta en el mundo más de 11 millones de casos nuevos de cáncer, los cuales un 80% se presenta en países en vía de desarrollo, que en múltiples casos estas enfermedades vienen acompañadas con necesidades básicas insatisfechas [2].

Esto impone retos particulares que tienen como objetivos el control del riesgo, la detección temprana, el tratamiento y rehabilitación y el cuidado paliativo [1, 2].

A pesar que la mayoría de cánceres son evitables, el cáncer es la segunda causa de muerte mundial, precedido por las enfermedades cardiovasculares [23].

1.1.2 Cáncer cervical y problemática

El cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública en el mundo. Esta patología afecta principalmente a las mujeres pertenecientes a zonas rurales y/o con problemas socioeconómicos, a causa de la dificultad que representa para ellas acceder a programas de detección precoz. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las tasas de Cáncer cervicouterino son mayores en los países del Tercer Mundo, especialmente en América Latina [24, 25]. Más de 400.000 casos nuevos de cáncer cervicouterinos y de mama se diagnostican por año en las Américas (80.710 y 320.400 respectivamente) y aproximadamente 120.000 mujeres mueren como consecuencia de ellos (36.100 y 82.550 respectivamente). Para 2030, los casos nuevos en América Latina y el

Caribe podrían crecer un 70% (pasarían de 114.900 a 199.300 los nuevos casos de cáncer de mama, y de 68.220 a 111.000 los de cuello uterino) [2].

El Instituto Nacional de Cancerología, reportó un incremento importante en el número de casos nuevos de cáncer en Colombia del año 2009 al 2010. En este, los tres principales grupos de tumores malignos, en orden descendente, son: piel, sistema digestivo y aparato genital femenino; por otra parte, se presentó un descenso en los casos nuevos de cáncer pediátrico [3].

La OMS, interesada en intervenir oportunamente y lograr un impacto a nivel poblacional, presenta una iniciativa multisectorial que busca la prevención de casos nuevos de cáncer cervicouterinos y de mama en las mujeres [2]. En Colombia, el gobierno también ha expresado su preocupación por esta problemática y ha fijado como objetivo reforzar los programas de detección temprana y prevención en el plan nacional de control de cáncer 2010 - 2019 [1].

1.2 LA CÉLULA

La célula es la mínima parte en que se puede dividir a un organismo y es la entidad más pequeña que reúne el conjunto de propiedades que se pueden asociar con la materia viviente. Dicho de otra manera, la célula tiene la capacidad de nutrirse, de aprovechar substancias extrañas y de transformarlas realizando la síntesis en su propio citoplasma, además es capaz de reproducirse para asegurar la supervivencia de la especie [26].

La célula está cubierta por una membrana que separa el medio intracelular del extracelular, estos dos son conductores pasivos de corriente, mientras que en la membrana se ubican elementos eléctricamente activos, como las proteínas, algunas de estas proteínas funcionan como bombas y usan energía para transportar iones a través de la membrana; por lo que la célula actúa como un capacitor de placas paralelas donde la membrana representa las placas que son muy delgadas $\sim 75\text{Å}$, ocasionando alta capacitancia por unidad de área ($\sim 1\mu\text{F}/\text{cm}^2$) [27].

1.2.1 Membrana celular y transporte

La membrana celular es una barrera física que separa el medio celular interno del externo. En las células eucariotas, y en algunas procariotas, también hay membranas intracelulares que delimitan a los orgánulos, separando el medio interno del orgánulo del citosol. Entre las múltiples funciones necesarias para la célula que realizan las membranas están la creación de gradientes iónicos, los

cuales hacen sensible a la célula frente a estímulos externos, permiten la transmisión de información y la producción de ATP, y son necesarios para la realización del transporte selectivo de moléculas. En las membranas se disponen múltiples receptores que permiten a la célula "sentir" la información que viaja en forma de moléculas por el medio extracelular [26]. La estructura y la organización de las membranas celulares, así como sus propiedades, están condicionadas fundamentalmente por los lípidos. Éstos son moléculas anfipáticas, con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas se encuentran en el centro de la membrana y las hidrofílicas en contacto con el agua (ver **Figura 1**).

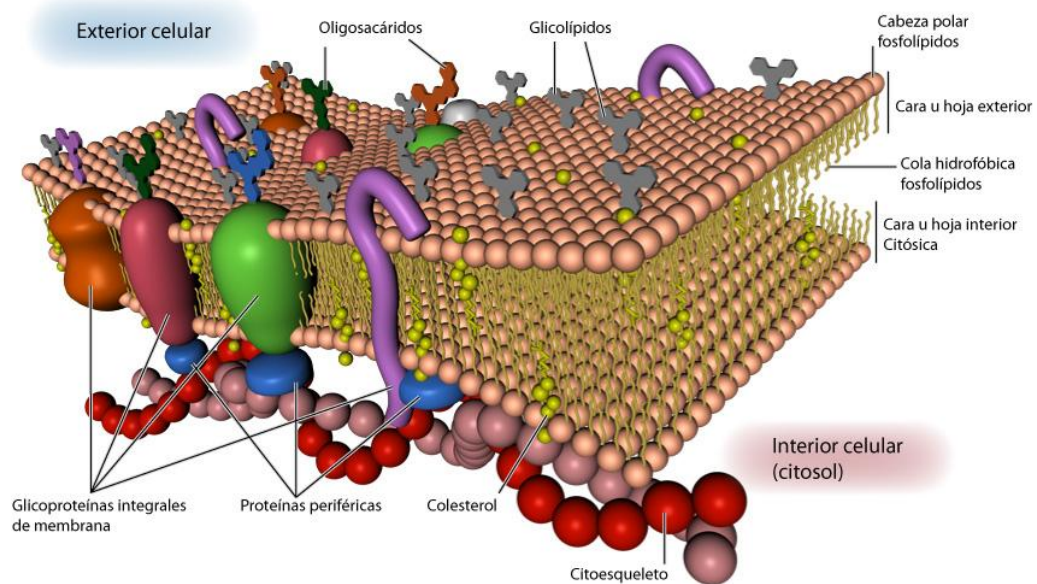


Figura 1. El modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas, por William C. Wimley, profesor de Bioquímica en la U. de Tulane en Nueva Orleans, USA [28].

1.2.2. Transporte

Las membranas suponen una barrera a la libre difusión de iones y moléculas cargadas eléctricamente. Como dijimos en apartados anteriores la creación de gradientes entre ambos lados de la membrana es necesaria puesto que se usan en muchos aspectos de la fisiología celular, pero para que estos gradientes sean útiles es necesario que la célula pueda crearlos, regularlos y romperlos cuando lo necesite. En la membrana existen unas proteínas especializadas tanto en el transporte de moléculas necesarias para el metabolismo como en la creación y modificación de los gradientes electroquímicos [29].

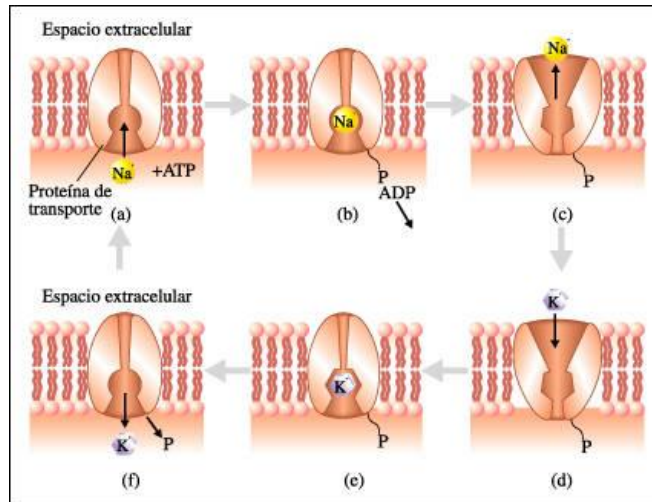


Figura 2. Bomba que intercambia sodio y potasio, ayudando a establecer los gradientes de estos iones en la membrana plasmática [29].

1.2.2.1 Las bombas

Son proteínas integrales que transportan iones o moléculas de un lado al otro de la membrana en contra de sus gradientes de concentración, con gasto de energía. Obteniendo energía frecuentemente de la hidrólisis del ATP. (Ver **Figura 2.**) A este grupo pertenecen también las bombas que transportan cationes como el calcio, y las bombas denominadas ABC que usan ATP para mover una gran variedad de moléculas entre ambos lados de la membrana. [29].

1.2.2.2 Los transportadores

Son proteínas integrales que usan gradientes electroquímicos para mover moléculas entre ambos lados de la membrana. Este tipo de movimiento se denomina difusión facilitada: difusión porque es un movimiento pasivo generado por el gradiente electroquímico existente y facilitada puesto que es el transportador el que la permite.

El transporte puede ser de distintos tipos: Uniporte y Contraporte, el uniporte mueve una molécula a favor de su gradiente de concentración. El cotransporte permite la translación simultánea de dos moléculas entre ambos lados de la membrana. Si el sentido en el que viaja una molécula es contrario al

de la otra se denomina antiporte y si las dos moléculas viajan en el mismo sentido se denomina simporte. (Ver **Figura 3.**) [30].

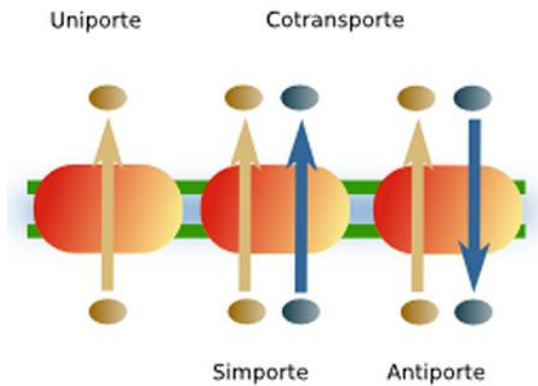


Figura 3. Esquema de los distintos tipos de transporte llevado a cabo por los transportadores [30].

1.2.2.3 Los canales

Son proteínas integrales que crean poros o conductos hidrofílicos que comunican ambos lados de la membrana. Su principal función es regular los gradientes iónicos entre ambos lados de la membrana, por tanto alterar el potencial electroquímico de ésta, hecho que se transformará en información para la célula (ver **Figura 4.**). También son necesarios para la secreción o absorción de sustancias. En cualquier caso es siempre un transporte pasivo puesto que los iones siempre viajan a favor de gradiente de concentración y la selección de los iones por los distintos tipos de canales depende del diámetro del canal hidrofílico [31].

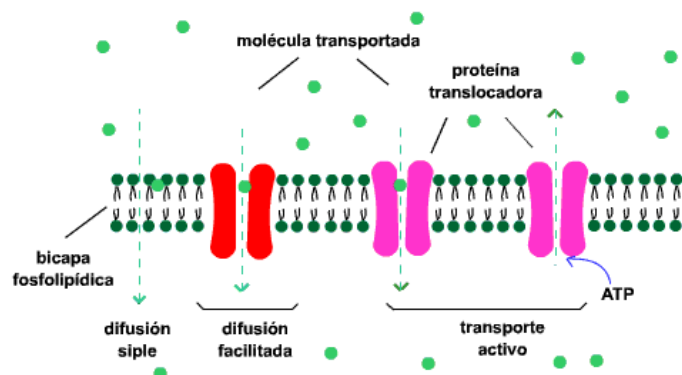


Figura 4. Formas de transportes [31].

La célula también puede incorporar grandes cantidades de moléculas al interior por endocitosis o incorporación de moléculas englobadas en vesículas.

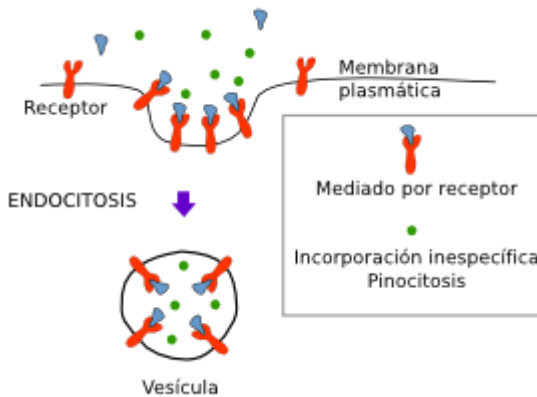


Figura 5. Las moléculas pueden ser incorporadas por endocitosis de forma específica unidas a receptores de la membrana plasmática [32].

En esta incorporación masiva, las moléculas extracelulares pueden entrar al interior de la vesícula de forma inespecífica, en solución, o de forma específica unidas a receptores de membrana. El término pinocitosis se refiere a este tipo de endocitosis inespecífica de moléculas disueltas.

Al mecanismo de incorporación de moléculas específicas reconocidas por receptores de la membrana plasmática se le llama endocitosis mediada por receptor. Se han descrito unos 25 tipos de receptores que actúan en este tipo de endocitosis. Con ellos la célula puede incorporar de forma muy eficiente moléculas o partículas que se encuentran disueltas a bajas concentraciones. Estas moléculas se unen a sus receptores y los complejos receptor-ligando convergen en una zona de la membrana plasmática donde se produce la formación de la vesícula que posteriormente viaja hacia el interior celular [33].

1.3 CÉLULAS HeLa

HeLa: Las primeras células humanas inmortales

Las células HeLa son un tipo particular de células de cultivo. El linaje al cual pertenecen estas células deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951. Puede considerarse la primera línea de células humanas inmortales.

Hoy los investigadores sospechan que su crecimiento agresivo y su resistencia a la apoptosis se deben principalmente a una combinación de papiloma virus 18 que produce una proteína que degrada la p53 sin mutarla [34], pero nadie sabe aun exactamente por qué las HeLa poseen estas características de supervivientes natas, sin permiso de la naturaleza [35].

Las células HeLa presentan una sobre-expresión de receptores de folato sobre su membrana. En los últimos años se ha incrementado el interés por los receptores de folato (RF) como blanco estratégico para la detección y diagnóstico del cáncer [36]. Los RF son proteínas ligadoras de folatos que poseen una gran afinidad por el ácido fólico con una constante de asociación (*relación matemática que se establece a partir de las concentraciones de los compuestos químicos que se forman en una reacción de disociación al alcanzar su punto de equilibrio*) de aproximadamente 0.1 nano-molar (nM) y tienen un peso de 38 kilo-Dalton (kDa). Se encuentran sobre-expresadas en la superficie de la membrana celular de células cancerígenas y de parásitos de la leishmaniasis [37].

1.3 NANOTECNOLOGÍA Y NANOCIENCIA

Respecto a qué es la Nanotecnología, empecemos por aclarar el significado del prefijo que proviene del latín nanus, que significa “enano” y actualmente significa una milmillonésima parte de un metro [38].

La nanociencia es el estudio de los sistemas cuyo tamaño es de unos pocos nanómetros y es la encargada de comprender su comportamiento a esta escala. La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nano escala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nano escala [24]. En la **Figura 6**, se puede apreciar la escala de tamaños de algunos materiales en el micro y nanomundo.

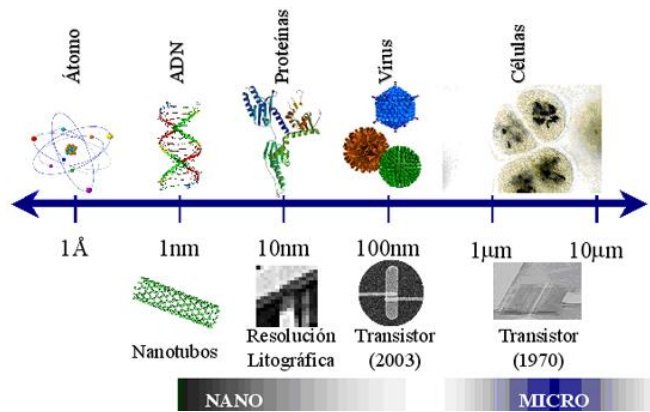


Figura 6. Escala del tamaño de objetos nano y microscópicos [25].

Nos interesa, más que su concepto, lo que representa potencialmente dentro del conjunto de investigaciones y aplicaciones actuales cuyo propósito es crear nuevas estructuras y productos que tendrían un gran impacto en la industria, la medicina (nanomedicina), etc.

1.3.1 Nanopartículas

A nivel histórico, la industria vidriera ha tenido mediante ensayos de prueba-error un precoz avance al campo de la Nanotecnología desde tiempos de los romanos. Prueba de ello son los antiguos vidrios del siglo IV a.C en los que se utilizaban nanopartículas metálicas con el fin de modificar las propiedades de color a las vidrieras. Al poseer un tamaño tan pequeño, una de las propiedades, como es la del color, había sido modificada, de modo que al ser excitada la partícula con un haz de luz, la señal emitida era diferente a la producida si la excitación se produjera en una partícula que presentara una escala de tamaño mayor (micrométrica o superior), proyectando un color atípico del metal (**Figura 7a**).



Figura 7. a, b. Vitrales y la copa de Licurgo formados por nanopartículas de oro y de plata [39].

Una reliquia bastante conocida es la copa de Licurgo, que contiene partículas de oro y plata de unos 50-70 nanómetros de diámetro, distribuidas en el interior del vidrio (**Figura 7b**).

Estas nanopartículas hacen que la copa sea verde al ser iluminada con luz reflejada y de color rubí al iluminarse con luz transmitida. En estas nanopartículas metálicas los electrones, al estar confinados en una estructura de tamaño nanométrico, oscilan o vibran a una misma frecuencia, denominada frecuencia de resonancia plasmónica, cuando son iluminados por la luz. Esa frecuencia se corresponde con el color que se observa, ya que en esa longitud de onda poseen un intenso pico de absorción de luz debido a la oscilación colectiva de sus electrones. Para las nanopartículas de oro, estos picos pueden estar en el rojo o el azul, dependiendo del tamaño nanométrico que posean o de la forma de las nanopartículas [40].

1.3.2 Síntesis de las nanopartículas

Uno de los aspectos donde la ciencia de la nanotecnología ha apostado más ha sido en el desarrollo de nuevos nanomateriales con propiedades mejoradas. Sin embargo, dentro de este tema el gran reto ha sido el de obtener la morfología, el tamaño, la composición química y las fases cristalinas adecuadas para que su efecto sea el más idóneo para el material sobre el cual se van a aplicar [41].

A continuación se mencionan algunos métodos para sintetizar AuNP:

- El método químico emplea un agente reductor, como por ejemplo el citrato de sodio, para llevar el oro hasta su forma metálica (Au^0) [42].
- El método fotoquímico involucra la irradiación con una lámpara UV de la mezcla de reacción conformada por una sal de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y el oxalato de sodio [43].
- El método de síntesis de Brust-Schiffrin, publicado en 1994, el cual permite producir AuNPs térmica y aéreamente estables y de tamaño controlado (1,5-5,2 nm) [44].

1.4 ÁCIDO FÓLICO

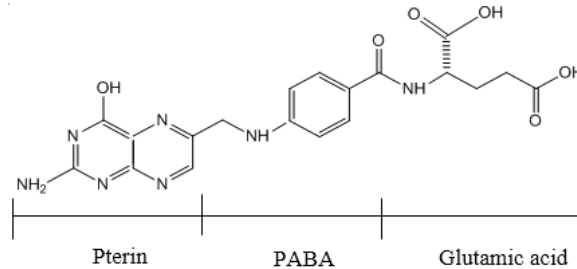


Figura 8. Estructura química del AF [12].

Descubierta en los años 40, el ácido fólico (ver **Figura 8**) es considerado como una vitamina hidrosoluble que hace parte del complejo B. También se lo conoce como folacina o folatos cuya etimología proviene del latín 'folium' que significa hoja.

Esta vitamina es fundamental para llevar a cabo todas las funciones de nuestro organismo. Su gran importancia radica en que el ácido fólico es esencial a nivel celular para sintetizar ADN (ácido desoxirribonucleico), que trasmite los caracteres genéticos, y para sintetizar también ARN (ácido ribonucleico), necesario para formar las proteínas y tejido del cuerpo y otros procesos celulares. Por lo tanto la presencia de ácido fólico en nuestro organismo es indispensable para la correcta división y duplicación celular [45].

Es importante señalar que el ácido fólico es básico para la formación del grupo hemo (parte de la hemoglobina que contiene el hierro), por eso está relacionado con la formación de glóbulos rojos.

Dada su gran importancia para el ser humano, muchos de los alimentos que hoy consumimos llevan ácido fólico adicionado.

Este ácido se forma en el intestino a partir de nuestra flora intestinal. Se absorbe principalmente en el intestino delgado (yeyuno), luego se distribuye en los tejidos a través de la circulación sanguínea y se almacena en el hígado. Se excreta por orina y heces [46].

1.5 PARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN, MODELOS Y PROPIEDADES ELÉCTRICAS

La primera descripción de partículas en suspensión fue realizada por Schwarz [47] quien modeló estas partículas en suspensión como esferas iguales de radio “a” rodeadas por una doble capa eléctrica en su superficie. La doble capa en la esfera atrae contraiones, los cuales estarán enlazados electrostáticamente a las cargas superficiales en la esfera, pero son libres de moverse alrededor de la superficie, (**Figura 9**). Cuando un campo eléctrico externo es aplicado, los contraiones se mueven hacia los electrodos pero sin abandonar la superficie de la esfera. Al quitar el campo eléctrico, la atmósfera de contraiones es restablecida a su estado original debido a un proceso de difusión controlado con constante $D = \mu kT/q_e$, donde T es la temperatura, μ es la movilidad y k la constante de Boltzmann. De acuerdo a la teoría de Schwarz la constante de tiempo para el restablecimiento de la atmósfera de contraiones está dada por [47]:

$$T_s = \frac{a}{2D} \quad (1),$$

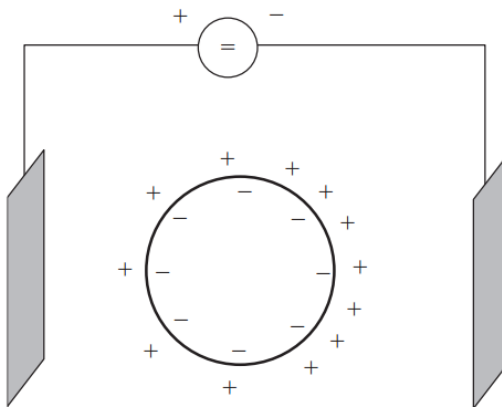


Figura 9. Contraión polarizado cerca de la superficie de una partícula esférica [47].

La descripción de las propiedades eléctricas de partículas en suspensión fue propuesta por Maxwell y Wagner, donde consideran ahora que el medio y la partícula tienen conductividades no nulas por lo que bajo la acción del campo se establecen flujos de cargas libres en ambas regiones, que son más lentos que los pequeños desplazamientos que supone la separación de carga en una molécula. Los iones positivos se desplazan en la dirección del campo y los negativos en la dirección opuesta. Debido a la diferencia de conductividad de partícula y medio, se origina una acumulación de carga sobre la superficie de la partícula, dependiendo su signo de la relación entre las mismas (**Figura 9**). La teoría de Maxwell-Wagner tiene en cuenta este fenómeno y predice el comportamiento de la suspensión,

suponiendo cargas libres de polarización en una región cuyo espesor es del orden de la doble capa [48].

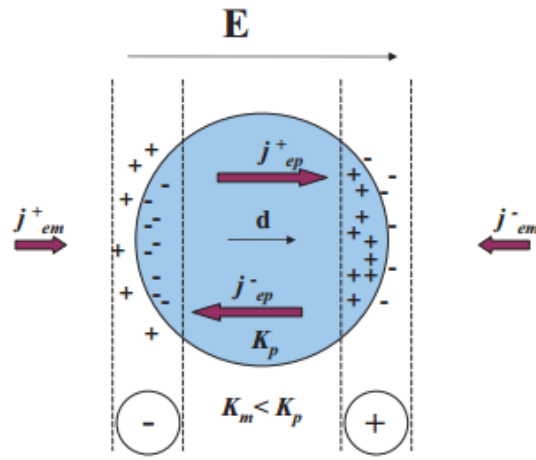


Figura 10. Esquema de dipolos de polarización inducidos por el campo en la interfaz partícula-medio K_m y K_p son las conductividades eléctricas de la partícula y el medio, respectivamente j_{em}^+ y j_{em}^- son flujos de electromigratorios de carga libre en partícula y medio [49].

Dos modelos han probado ser los que mejor describen el comportamiento de células en suspensión modeladas como partículas de igual forma pero diferente tamaño: el modelo de *Maxwell-Wagner-Hanai* [50], y el modelo de Looyenga [51]. En ambos modelos se describe la permitividad eléctrica del medio en términos de las dimensiones y propiedades eléctricas de las partículas en suspensión. *Bordi* y colaboradores aplicaron estos modelos a eritrocitos en suspensión y encontraron que el modelo de Looyenga describe mejor los datos experimentales [52].

1.6 MÉTODOS PARA MEDIR IMPEDANCIA ELÉCTRICA

Para la medición de impedancia eléctrica existen diversos métodos, cada uno de los cuales posee sus características y particularidades dependiendo del tipo de aplicación para el que se quiera usar. Entre estos se encuentran: el método de dos electrodos (2EM, del inglés *2 Electrode Method*), el método de tres electrodos (3EM) y el método de cuatro electrodos (4EM), los cuales pueden ser utilizados en modo potencióstato o galvanostato.

1.6.1 Método de tres electrodos (3EM).

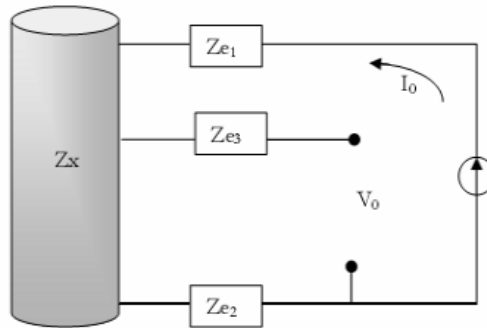


Figura 11. Configuración del método de tres electrodos [53].

Este método consiste en aplicar una señal de excitación de corriente o tensión, directa o alterna, al material en estudio, por medio de dos electrodos. Uno de ellos es tomado como electrodo de referencia (Z_{e2}) y el otro como el nodo por donde se inyecta la señal de excitación (Z_{e1}), ver **Figura 11**. Cuando se estimula el material, se produce una respuesta eléctrica que es medida como una caída de tensión V_0 , entre un tercer electrodo (Z_{e3}) y el electrodo de referencia.

El método de tres electrodos es utilizado para medir la impedancia de la piel (hidratación) [47] y se ha utilizado para realizar medidas transmurales en miocardio [47].

1.6.2 Método de cuatro electrodos (4EM).

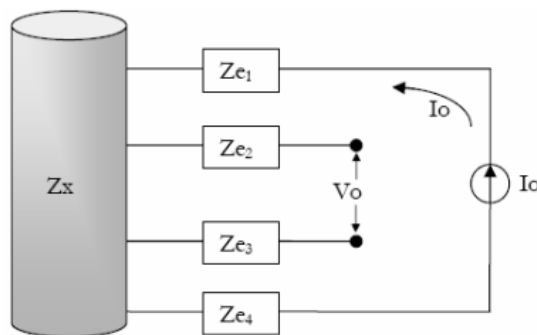


Figura 12. Configuración del método de cuatro electrodos [53].

Este método consiste en aplicar una corriente o una tensión, directa o alterna, a la impedancia de interés Z_x por medio de dos electrodos Z_{e1} y Z_{e4} , y cuya respuesta

de tensión ante el estímulo es medida entre los dos electrodos restantes Z_{e2} y Z_{e3} , ver **Figura 12**.

Con este método se logra evitar el error producido por la caída de tensión en los contactos de los electrodos, siempre y cuando, la impedancia de entrada del circuito utilizado para medir la tensión V_0 sea mucho mayor que la impedancia de entrada de los electrodos empleados para la medición.

El método de cuatro electrodos se puede aplicar en la caracterización de tejidos biológicos [4, 5] y en monitorización del crecimiento de microorganismos [54]. Ya que una de sus características es reducir el efecto que se da electrodo-interfaz se logran resultados que contienen mejor información.

1.6.3 Método de Van der Pauw.

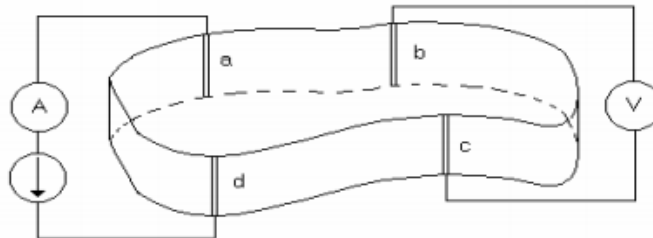


Figura 13. Posición de los electrodos en una de las configuraciones de la técnica de Van der Pauw [55].

Es una variación del método anterior, su ventaja permite la medición de muestras de forma arbitraria con espesor uniforme [55].

Para las mediciones en soluciones el método de 4 puntas y el método de Van der Pauw son muy utilizados, siendo la técnica de Van der Pauw la más usada cuando se requiere de mayor precisión.

La técnica de Van der Pauw: Es una técnica de cuatro electrodos para la medición de conductividad de un sólido. Esta técnica está soportada por el teorema de Van der Pauw el cual establece que:

$$e^{-\pi h R_{ad,bc}\sigma} + e^{-\pi h R_{ab,cd}\sigma} = 1 \quad (2),$$

Donde h es el espesor del material, σ la conductividad, $R_{ab,bc}$ es la tensión entre los electrodos b y c dividida entre la corriente que circula por los electrodos a y d, y $R_{ad,bc}$ la tensión entre los electrodos c y d dividida por la corriente que circula por los electrodos a y b (ver **Figura 13**) [56].

Una buena aproximación utilizada para el cálculo de la conductividad eléctrica consiste en realizar un promedio de las resistencias y multiplicarlo por un coeficiente f de la siguiente manera:

$$R_m = f(R_{ad,bc} + R_{ab,cd})/2 \quad (3),$$

Donde f depende de la relación:

$$R_{ad,bc}/R_{ab,cd} \quad (4),$$

Siendo R_m la nueva resistencia a utilizar en el teorema [57]. En una investigación realizada por *Morón et al*, se demostró que el método de Van der Pauw puede ser utilizado para la medición de conductividad de soluciones electrolíticas [57, 58, 59].

Celdas para la medición de conductividad eléctrica: Las celdas de conductancia pueden ser o no calculables. Una celda calculable es aquella cuyo factor de forma es constante y puede ser calculado a partir de la geometría de la celda. Por su parte las celdas no calculables requieren un proceso de calibración haciendo uso de soluciones estándar [56, 57].

1.7 BIOIMPEDANCIA

La impedancia eléctrica es una propiedad de los materiales dieléctricos que puede ser utilizada para la caracterización de sistemas biológicos de forma no invasiva.

Este concepto se ha visto complementado con estudios basados en crecimientos celulares, composición corporal, microbiología, movimiento de fluidos y distinción entre tejidos sanos y cancerosos, entre otros, que han constituido el núcleo de trabajo para las medidas de bioimpedancia, ya sean a una frecuencia específica o mediante el estudio de su espectro [60].

El concepto de impedancia eléctrica se aplica en el dominio de la frecuencia con una respuesta dada por la función de transferencia:

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} = R(\omega) + jX(\omega) \quad (5),$$

Donde $R(\omega)$ es la parte real de la impedancia en términos de la componente resistiva y $jX(\omega)$ es la parte imaginaria de la impedancia en términos de la componente reactiva.

1.8 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LOS TEJIDOS

Interacción de la electricidad con tejidos biológicos

La espectroscopia de impedancia consiste en una serie de mediciones de impedancia eléctrica de una muestra a diferentes frecuencias.

Para estudiar las propiedades eléctricas de los tejidos se mide la resistividad (o conductividad) eléctrica del mismo utilizando señales de excitación que varían en el tiempo de forma sinusoidal:

$$x(t) = x_0 \text{sen}(2\pi f_0 t) \quad (6),$$

Tanto en los conductores como en los dieléctricos, las propiedades eléctricas de los tejidos biológicos dependen de la amplitud, x_0 , y frecuencia, f_0 , de la señal de excitación. Para amplitudes bajas, es decir, densidades de corrientes y campo eléctricos inferiores a 1mA/cm^2 y 1V/cm , respectivamente, el tejido cumple con la ley de Ohm, en otras palabras, exhibe un comportamiento lineal. En el caso de la dependencia con respecto a la frecuencia de excitación, hasta aproximadamente 10kHz las propiedades eléctricas de un tejido están determinadas por los procesos en la interfaz electrodo-tejido así como por la relajación y polarización de los espacios cargados.

Las propiedades dieléctricas de los tejidos biológicos resultan de la interacción de la radiación electromagnética con los componentes celulares a nivel ultra estructurales y moleculares [61]. Schwan reporta tres zonas de dispersión [15] en las que esta interacción tiene diferentes efectos en el tejido, estas son:

Zona de Dispersión α : Representa la zona de bajas frecuencias (Hz), está asociada con procesos de difusión iónica en el sitio de la membrana celular o acumulación de carga en la membrana. Se puede considerar que en esta región la corriente atraviesa solamente el espacio extracelular de las capas superficiales, por

tanto la célula posee una elevada impedancia. Tal como se reporta en Robles [19], una de las razones por las cuales no se realizan mediciones en la región de dispersión α es que esta no proporciona información relacionada con el estado y la forma de un tejido, y por consiguiente trabajando en esta zona no es posible diferenciar entre un tejido sano y uno displásico. (Ver **figura 14**). Aunque cabe destacar que esta zona es trabajada para fenómenos de interfaz y también es importante en electroquímica y en corrosión.

Zona de Dispersión β : Corresponde a la banda de frecuencias de unos pocos kHz a 1MHz, donde las estructuras celulares son el principal determinante de la impedancia del tejido. Esta dispersión es esencialmente debida a mecanismos de carga capacitivos de las membranas celulares.

Cuando la frecuencia aumenta, la reactancia capacitiva de la célula disminuye, lo cual induce un incremento en el flujo de corriente que circula a través del medio intracelular, y por consiguiente una disminución en la impedancia del tejido. Es decir, la corriente puede penetrar las membranas de la célula y atravesar los espacios intracelular y extracelular. Dentro de la dispersión β , a bajas frecuencias, la corriente pasa alrededor de las células, y a alta frecuencia atraviesa la membrana celular y pasa por las células, se determinará así por el volumen del espacio intracelular y, el tamaño del núcleo. El rango de frecuencias que caracteriza esta región es el concerniente al área de interés en el presente trabajo ya que esta dispersión se hace especialmente atractiva para la detección de tejidos patológicos [62], tales como los correspondientes al cáncer de cérvix; conociendo la estructura de los tejidos con la medición de la bioimpedancia. (Ver **Figura 14**).

Zona de Dispersión γ : Pertenece a la región a altas frecuencias (GHz), donde la estructura molecular es el factor determinante. Es debida a la polarización de moléculas de agua. Según [19] a altas frecuencias el tejido pierde su especificidad eléctrica, y su comportamiento es similar a un electrolito, desde entonces su permeabilidad e impedancia están dominadas por la relajación del agua libreen el tejido. (Ver **Figura 14**).

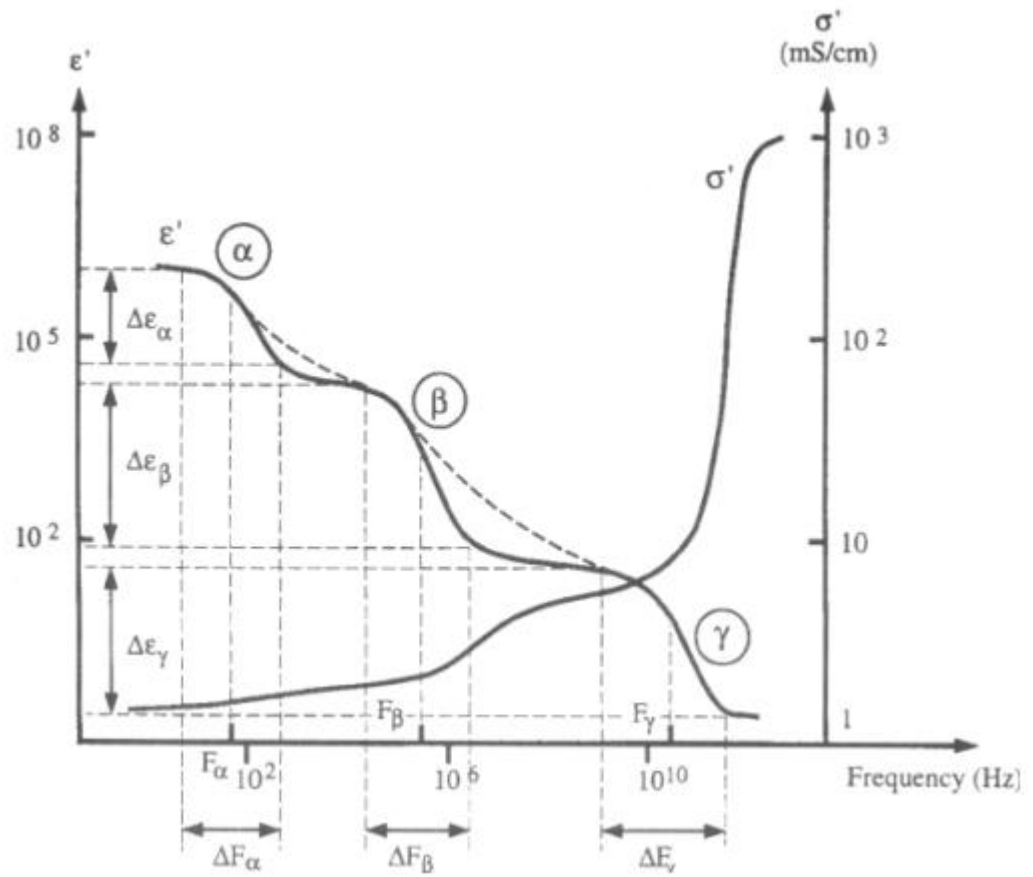


Figura 14. Zonas de dispersión [62].

2. MATERIALES Y METODOS

Este proyecto tiene como objetivo estudiar las propiedades eléctricas de cultivos de células HeLa en medios dispuestos con 3 sustancias diferentes, ácido fólico, AuNPs y AuNPs-AF.

Para alcanzar el objetivo general de este trabajo se propusieron los siguientes objetivos específicos

- Estudiar el espectro de impedancia eléctrica de cultivos de células HeLa en suspensión, en presencia y ausencia de ácido fólico.
- Estudiar el espectro de impedancia eléctrica de cultivos de células HeLa con nanopartículas de Oro (AuNPs).
- Estudiar el espectro de impedancia eléctrica de cultivos de células HeLa con nanopartículas de Au funcionalizadas con ácido fólico. (AuNPs-AF)
- Analizar la diferencia en los espectros de impedancia eléctrica medidos y presentar los resultados y conclusiones.

2.1 EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADO

Los electrodos serigrafados (Dropasen), electrodos de oro para la sonda Van der Pauw y los conectores respectivamente, fueron suministrados por el grupo de investigación CIMBIOS.

Los materiales usados en esta investigación fueron proporcionados por dos grupos de investigación de la UIS: el CINTROP y CICAT quienes nos suministraron las células y las NPs respectivamente.

Las NPs fueron sintetizadas basándonos en el trabajo de grado de Bertel [25] cuya autora se encargó de la preparación, síntesis y análisis por medio de la técnica: dispersión dinámica de la luz o DLS [63]. Las células fueron cultivadas y repicadas bajo la supervisión de la profesora Raquel Ocazonez, PhD, profesora del Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina, directora del Grupo de investigación en Enfermedades Infecciosas y Metabólicas (GINEM) y miembro del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) y manipuladas

para los ensayos aquí presentados bajo la supervisión de la profesora Stelia Carolina Mendez, PhD en bioquímica.

El equipo POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO fue prestado gracias al Centro de Materiales y Nanotecnología CMN, y al coordinador del laboratorio de electroquímica Profesor Ángel Meléndez quien dio los permisos y garantías para el correcto manejo y funcionamiento óptimo del equipo.

Después de preparar los medios que contiene las células en suspensión con cada sustancia específica, ácido fólico, AuNPs, AuNPs-AF, se usó el potencióstato/galvanostato (Autolab PGSTAT302N - High Performance) para hacer las mediciones del espectro de impedancia, en modo galvanostato y se adaptó una cubeta (**Figura 15.**) para contener cada medio y poder introducir los electrodos.

Cada prueba fue monitoreada en el transcurso del tiempo dejando intervalos para cada medida. Fue registrada en bitácora la línea de tiempo desde la preparación del medio hasta la duración de la prueba.



Figura 15. Cubetas UV/VIS, desechables [64]

2.1.1 Sondas y electrodos

2.1.1.1 Electrodo de Oro Serigrafiados

Se usaron 10 electrodos serigrafiados con geometría circular, el electrodo de trabajo (WE) y el contra electrodo (CE) son de oro, el electrodo de referencia (RE) y los contactos de conexión son de plata. Estos electrodos están diseñados para trabajar con volúmenes de muestras de 50 μ L (GOTA) o para ser sumergido.

Dimensiones: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm (Largo x Ancho x Alto).



Figura 16. Electrodo de Oro serigrafiado utilizados en la toma de datos [65].

Contactos eléctricos: Plata

La célula electroquímica consiste de: Electrodo de trabajo, contra electrodo: Oro

Electrodo de referencia: Plata

2.1.1.2 Sonda de 4 Puntas

Con base en la técnica de Van der Pauw [56, 60] para la medición de conductividad de un sólido, se diseñó una sonda de 4 puntas tipo Moron, con electrodos de oro y una geometría cuadrada de dimensiones (5x7x10 mm), se usó la técnica Van der Pauw adaptada para medir soluciones [58, 71], (ver **Figura 17**). Según la ecuación 2 (**Item 1.7.3**),

$$e^{-\pi h R_{ad,bc} \sigma} + e^{-\pi h R_{ab,cd} \sigma} = 1$$

En el caso en que $R_{ad,bc} = R_{ab,cd} = R$, la conductividad se puede expresar como:

$$\sigma = \frac{\text{Ln}2}{\pi h R}; (7),$$

$$K = \sigma R = \frac{\text{Ln}2}{\pi h}; (8),$$

Donde K se conoce como factor de forma. En este caso se aprovecha la simetría de la sonda para simplificar cálculos (ver **Item 1.7.3**).

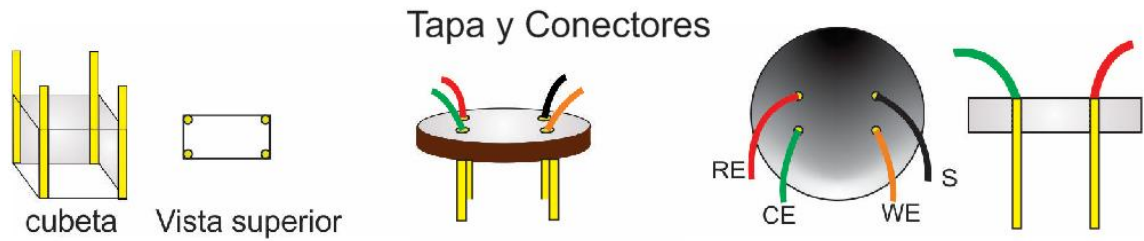


Figura 17. Sonda Van der Pauw, con geometría cuadrada

2.1.2 Potenciostato

Los espectros de impedancia eléctrica de las células HeLa fueron tomados con el potenciostato /galvanostato Autolab PGSTAT302N - High Performance [61] configurado para trabajar en modo galvanostato. Gracias a la precisión y resolución (ver **Tabla 1**) de este equipo, se pudo trabajar con valores de corriente en el orden los microamperios.



Figura 18. Autolab PGSTAT302N - High Performance [65].

Características Principales	
Conexión de los electrodos	2, 3 y 4
Rango de potencias	+/- 10 V
Tensión de conformidad	+/- 30 V
Corriente Máxima	+/- 2A
Rangos de corriente	1A to 10 nA

Exactitud de potencial	+/- 0.2%
Resolución del potencial	0.3 μ V
Precisión de la corriente	+/- 0.2 %
Resolución de corriente	0.0003% (de rango de I)
Impedancia de entrada	>1 T Ohm
Ancho de banda de potenciostato	1MHz
Interfaz del equipo	USB
Control Software	NOVA

Tabla 1. Características principales del POT/GAL.

Se utilizó el software NOVA destinado al control de todos los instrumentos de Autolab con interfaz USB.

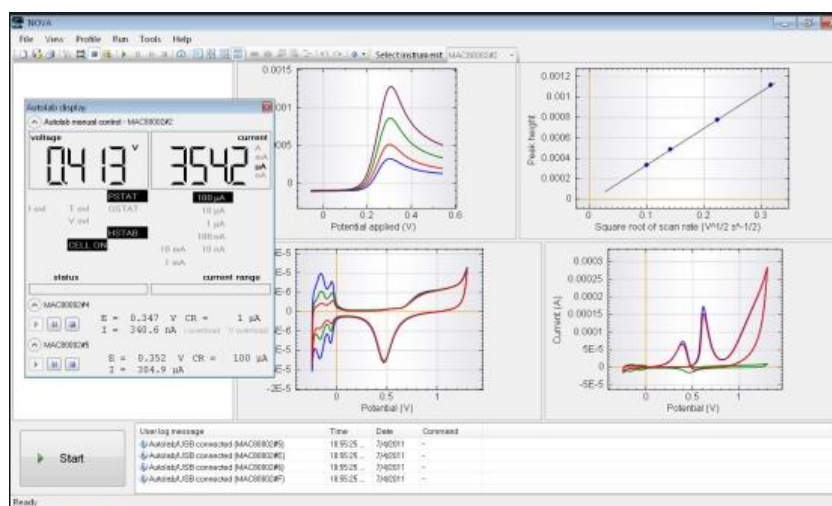


Figura 19. Interfaz gráfica software NOVA [66].

2.1.3 Nanopartículas

2.1.3.1 *Síntesis

Las AuNPs y AuNPs-AF fueron suministradas por el centro de investigación en catálisis CICAT UIS.

Las AuNPs fueron sintetizadas por un método químico usando citrato de sodio como agente reductor [42]. Se tomó una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1mM; 10mL) y se calentó hasta ebullición, con agitación magnética constante. Posteriormente se adicionó gota a gota una cantidad de citrato de sodio (38,8mM; 2mL), continuando con el calentamiento y la agitación durante 10 minutos.

El protocolo usado para sintetizar las AuNPs-AF fue desarrollado por investigadores del CICAT [67]. Los precursores de la síntesis de AuNPs-AF fueron: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01M) y Ácido Fólico (5mM). La mezcla de reacción se irradió con una lámpara UV de 254nm por 10 min con agitación magnética constante, utilizando un baño termostataado.

2.1.3.2 Características

Forma: Las AuNPs y AuNPs-AF preparadas tenían formas esféricas, lo cual fue evidenciado por microscopía electrónica de barrido o SEM.

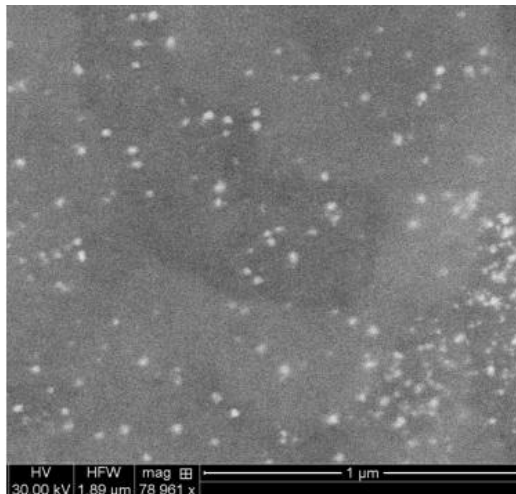


Figura 20. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) [25].

Tamaño: El diámetro de ambos tipos de NPs fue medido por la técnica dispersión dinámica de la luz o DLS, en un equipo Zetasizer Nano Malver modelo ZS90. Los valores de diámetro promedio se reportan en la tabla*.

Debe tenerse en cuenta que los valores obtenidos de diámetro de partícula corresponden a valores promedios y que ambas soluciones presentan partículas de varios tamaños, existiendo partículas con diámetros entre 20nm hasta algo más de 100nm.

Concentración: La concentración de las AuNPs y AuNPs-AF se expresa en términos de moles de Au por litros de solución y en términos de moles de NP por

litros de solución. La primera concentración es calculada asumiendo que toda la sal de oro reaccionó y formó NPs, lo cual concuerda con el hecho de que no se observara la presencia de la sal precursora ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en el espectro UV-Vis del producto de la reacción. La segunda concentración fue calculada de forma aproximada usando las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al [71]. Los datos de concentración se muestran en la tabla 2.

Solución	Diámetro [nm]	Concentración en términos de moles de Au [M]	Concentración en términos de moles de NP [M]
AuNPs	114	1×10^{-3}	$1,7 \times 10^{-8}$
AuNPs - AF	127,4	3×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-11}$

Tabla 2. Concentraciones de las NPs.

**Síntesis y datos suministrados por Ms(c) en química Linda E. Bertel Garay.*

2.2 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Metodología de la citotoxicidad

La viabilidad celular fue determinada por el método del MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol -2 il)- 2,5- difenil tetrazolio) de acuerdo a lo descrito por Mossman (1983). Con este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tretrazolio formando cristales de formazan (cloruro de tretazolio) solubles en DMSO (Dimetilsulfóxido) y que pueden ser cuantificados a 580 nm.

Las células HeLa fueron adicionadas en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) e incubadas a 37°C con atmosfera de CO₂ 5% durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente las células se trataron con diferentes concentraciones de las NPs antes descritas. Pasado el tiempo del tratamiento el sobrenadante fue descartado, se adicionaron 200 µL de MTT (500µg.mL⁻¹ en PBS) e incubaron las células durante 3 horas, después del tiempo de incubación la solución de MTT fue descartada y se adicionaron 200 µL de DMSO para solubilizar los cristales formados. La lectura de absorbancia a 580 nm fue realizada en un lector de microplaca, usando DMSO como blanco.

Para el análisis de la impedancia se utilizó una concentración de 3000 células/mL.

Se usó una microcubeta para contener las células en suspensión (medio-células) y adicionar cada sustancia (NPs o AF). Inmediatamente se medía su espectro con el electrodo serigrafiado o con la sonda Van der Pauw, para definir el tiempo de medida t_0 (tiempo cero).

Después de este proceso se extraía el contenido de la microcubeta y se dejaba en un vaso de precipitado agitándose cada 5 minutos para evitar la adherencia de las células a las paredes del mismo.

Después de 40 minutos y 2 horas se repetía las medidas del espectro. Finalizado esto se descartó los medios utilizados.

3. RESULTADOS

En este capítulo se presenta los resultados de las mediciones del espectro de impedancia eléctrica, los cuales se realizaron en un periodo de 3 meses en el laboratorio de electroquímica del Centro de Materiales y Nanociencias (CMN) ubicado en el Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG), usando el potenciostato /galvanostato (Autolab PGSTAT302N - High Performance), electrodos serigrafados y una sonda Van der Pauw cuadrada. El análisis cualitativo detallado de los resultados mostrados se realizara en el siguiente capítulo.

Se usaron los electrodos serigrafados y la sonda Van der Pauw con células suspendidas en medio (*Minimum Essential Media*) **MEM**. Se escogió un medio **MEM** [69] sin suero por poseer los nutrientes básicos para el mantenimiento celular, además su conductividad es menor que la del medio (Phosphate Buffered Saline) **PBS** [70] y es más económico que el medio **MEM** con suero.

Se usaran las siguientes abreviaturas durante los resultados y análisis de resultados:

MEM_CEL_VDP = Medio con células medido con la sonda Van der Pauw

MEM_CEL_ESG = Medio con células medido con electrodo serigrafado aplicándole una gota.

MEM_CEL_ESS = Medio con células medido con electrodo serigrafado sumergido.

MEM_CEL_AuNPs_FA = Medio con células con Nanopartículas de oro funcionalizadas.

MEM_CEL_AuNPs = Medio con células con Nanopartículas de oro.

MEM_CEL_tx = Medio con células en el tiempo indicado

Con base a la bibliografía [12] y los resultados de toxicidad se decidió trabajar con una concentración de 3000 células/mL para medir la impedancia eléctrica.

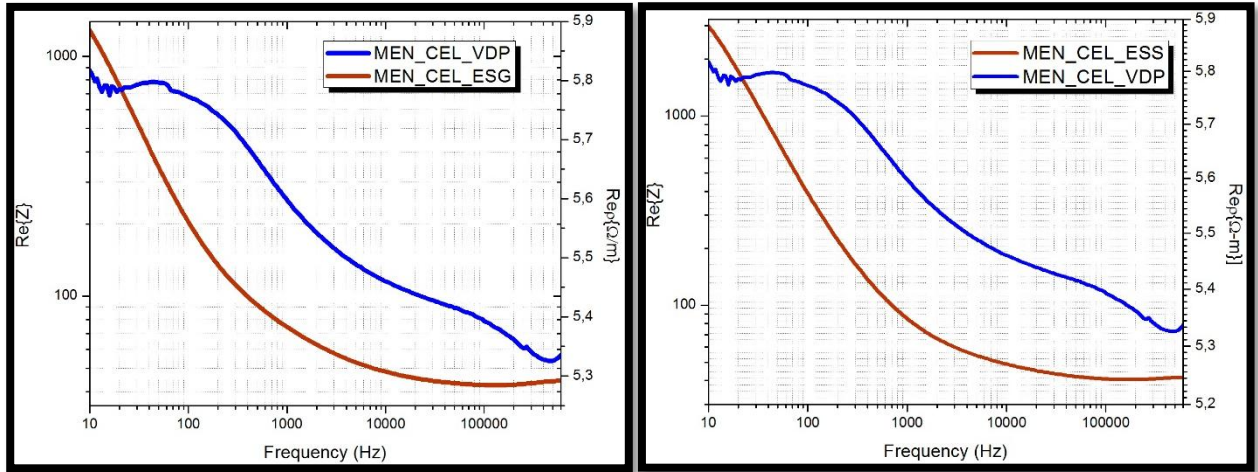


Figura 21. Espectros tomados con el electrodo serigrafiado sumergido (ESS), gota (ESG) y la sonda Van der Pauw.

Las mediciones de impedancia eléctrica realizadas con los electrodos serigrafiados se dividieron en dos experimentos: el electrodo sumergido totalmente en el medio y el electrodo serigrafiado depositando una gota sobre él, formando una capa muy delgada. Por último se usó la sonda Van der Pauw. Las medidas con cada muestra se monitorearon en intervalos de 40 minutos. El espectro trabajado está comprendido entre (10 Hz y 900 KHz). (Ver **Figura 21**). Se definió un tiempo t_0 el cual hace referencia a la preparación de la mezcla y la toma inmediata del espectro; para observar diferencias en cada medio de interés, mostrando su dinámica a través del tiempo. La figura 21 muestra las diferencias entre las técnicas de 3 puntas (electrodo) y de 4 puntas (Van der Pauw), permitiéndonos definir la técnica Van der Pauw como la más apropiada para estudiar las propiedades eléctricas de estos medios.

En las gráficas de los espectros nos referimos a tiempo cero como t_0 , pasados 40 minutos se definirá como t_1 y pasado 2 horas en la prueba se definirá como t_2 , por lo tanto dicho esto $t_0 < t_1 < t_2$.

3.1 RESULTADOS DE TOXICIDAD

3.1.1 Evaluación de la citotoxicidad en cultivos de células HeLa

Los estudios de citotoxicidad se englobaron dentro de los estudios de biocompatibilidad y viabilidad de las células con respecto a las nanopartículas de oro, nanopartículas de oro funcionalizadas y ácido fólico.

Los ensayos realizados para la evaluación de la citotoxicidad se hicieron bajo la dirección de la profesora Stelia Carolina Mendez, PhD, como fue descrito anteriormente.

3.1.2 Análisis de la citotoxicidad

Para confirmar que los resultados de impedancia obtenidos fuesen efecto de la interacción de las nanopartículas con las células o el medio, y no el resultado de efectos tóxicos sobre las células, se realizaron ensayos de citotoxicidad usando células HeLa, a través del método de MTT. Se evaluaron concentraciones que variaban desde 50 a 500 fM, en los tiempos establecidos anteriormente.

3.1.3 Análisis para 40 minutos

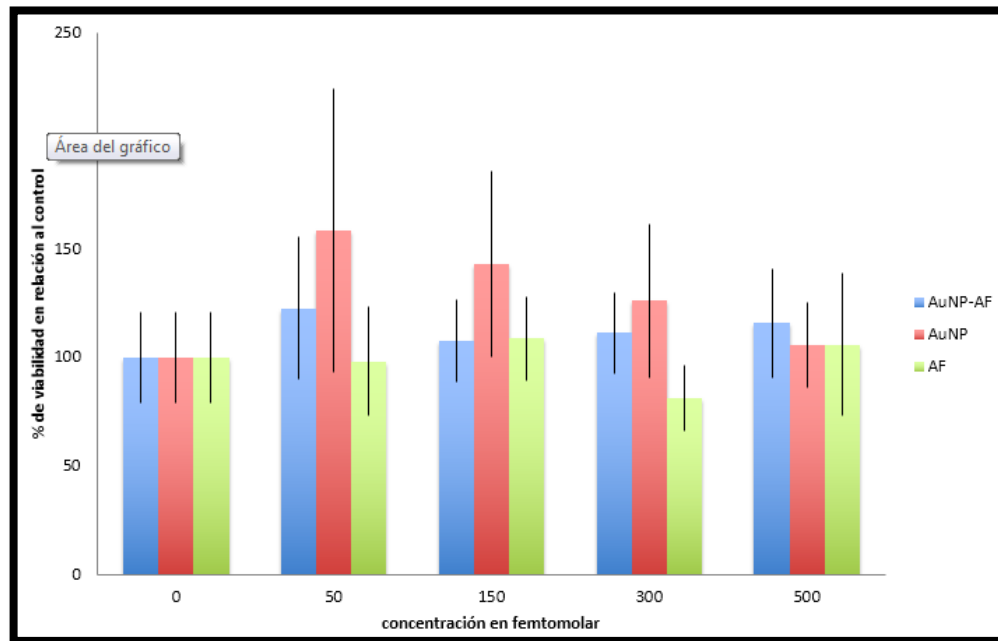


Figura 22. Citotoxicidad de nanopartículas funcionalizadas en células HeLa después de 40 minutos de incubación [Autores].

En la figura 22 se muestran diferentes concentraciones de 5 μ L, 15 μ L, 30 μ L y 50 μ L disueltos en volumen final de 3000 μ L de medio (equivalentes a 50fM, 150fM, 300fM y 500fM de nanopartículas o 0.5, 1.5, 3 y 5 μ M de oro, respectivamente), para AuNPs - AF, AuNPs y AF en los cultivos de las células HeLa.

Al analizar la viabilidad celular pasados 40 minutos de tratamientos, se observan algunas variaciones, mas cabe resaltar que ninguna presenta diferencias estadísticamente significativas. Para la concentración de 5 μ L de AuNPs se aprecia un aumento de la viabilidad en el cultivo de las células en alrededor de un 55%, mientras que las AuNPs-AF tiene un aumento de 25% y el ácido fólico no presenta ningún cambio significativo en el cultivo.

En el siguiente punto de la gráfica se usó 15 μ L de AuNPs, aunque la viabilidad es mayor que el control, (45%) este cambio no es estadísticamente significativo, mientras que el resto de sustancias no muestran un cambio significativo para las células.

Para 30 μ L de las diferentes sustancias, la viabilidad es afectada en alrededor del 25% para las AuNPs, mientras que para las AuNPs-AF la viabilidad no es afectada notoriamente. Para el AF la viabilidad disminuye levemente.

Con la concentración de 50 μ L la viabilidad de las células es menormente afectada.

Ahora analizaremos la viabilidad para 2 horas y 24 horas después y se analizara que concentración femtomolar es la más adecuada para hacer la toma del espectro de impedancia eléctrica.

3.1.4 Análisis para 2 horas

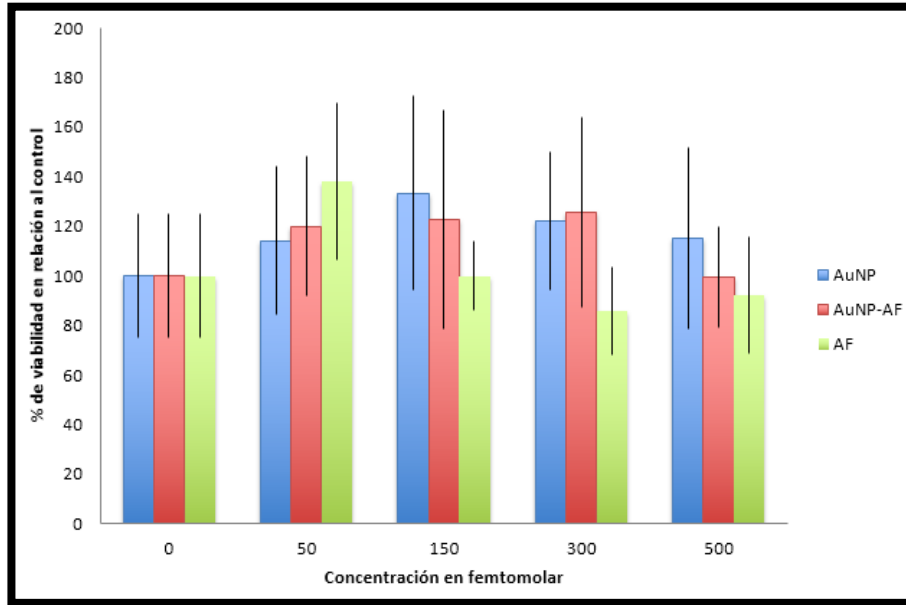


Figura 23. Citotoxicidad de NPs y AF en células HeLa después de 2 horas de incubación [Autores].

Basándonos en los resultados del análisis de 40 minutos nos centraremos en los últimos dos puntos de la gráfica (300fM y 500fM).

Se muestra que la viabilidad de celular en este punto (300fM) es menor en 10% a 15% que la viabilidad mostrada en la citotoxicidad de 40 minutos, sin tener en cuenta el análisis del AF.

Para 50 μ L la viabilidad celular es afectada en menor escala comparada con el valor de 30 μ L. Las AuNPs afecta un poco más la viabilidad, mientras que las AuNPs - AF y el AF parece no afectar significativamente las células.

Teniendo estos datos, realizamos un análisis estadístico de varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey, test de comparación de medias, con el programa STATISTICA V8.0 para mostrar con más detalle las diferencias y los comportamientos de las NPs y AF en el cultivo de células y verificar el análisis de viabilidad que se dio.

Var 1	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
	100,82	122,6	107,57	111,42	115,87	158,53	143,03	126,08	98,237	108,81	81,41	114,62	
	Control	AuNP-AF5	AuNP-AF15	AuNP-AF30	AuNP-AF50	AuNP-5	AuNP-15	AuNP-50	AF-5	AF-15	AF-30	AF-50	
{1}	Control		0,979	1,000	1,000	0,999	0,050	0,374	0,942	1,000	1,000	0,996	1,000
{2}	AuNP-AF5	0,980		0,999	1,000	1,000	0,571	0,984	1,000	0,966	1,000	0,479	1,000
{3}	AuNP-AF15	1,000	0,999		1,000	1,000	0,105	0,591	0,993	1,000	1,000	0,945	1,000
{4}	AuNP-AF30	1,000	1,000	1,000		1,000	0,180	0,746	0,999	1,000	1,000	0,870	1,000
{5}	AuNP-AF50	0,999	1,000	1,000	1,000		0,307	0,886	1,000	0,998	1,000	0,735	1,000
{6}	AuNP-5	0,050	0,571	0,105	0,180	0,307		0,998	0,714	0,049	0,206	0,003	0,463
{7}	AuNP-15	0,374	0,984	0,591	0,746	0,886	0,998		0,997	0,349	0,744	0,040	0,933
{8}	AuNP-50	0,942	1,000	0,993	0,999	1,000	0,714	0,997		0,917	0,998	0,353	1,000
{9}	AF-5	1,000	0,966	1,000	1,000	0,998	0,049	0,349	0,917		1,000	0,999	1,000
{10}	AF-15	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,206	0,744	0,998	1,000		0,952	1,000
{11}	AF-30	0,996	0,479	0,945	0,870	0,735	0,003	0,040	0,353	0,999	0,952		0,879
{12}	AF-50	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,463	0,933	1,000	1,000	1,000	0,879	

Tabla 3. Resultados del test de TUKEY con STATISTICA. [Autores]

Se pueden apreciar los resultados en donde se puede realizar la comparación entre las muestras tomadas. Los resultados que están en rojo están por debajo del índice de 0,05 de diferencia en las muestras notables. Esto muestra que no existe una diferencia estadísticamente relevante que afecte la viabilidad.

Al analizar los efectos citotóxicos de las AuNPs - AF, AuNPs y AF, pasados 40 minutos (ver **Figura 22**) y 2 horas (ver **Figura 23**) de incubación, se observa que los compuestos no presentan cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular, en ninguna de las concentraciones testadas. Con los resultados de estos ensayos se escogió la concentración de 300 fM para continuar con los ensayos de impedancia.

Ahora compararemos estos resultados con la siguiente grafica para mostrar el comportamiento de las células a la concentración de 300fM de AuNPs, AuNPs - AF y AF.

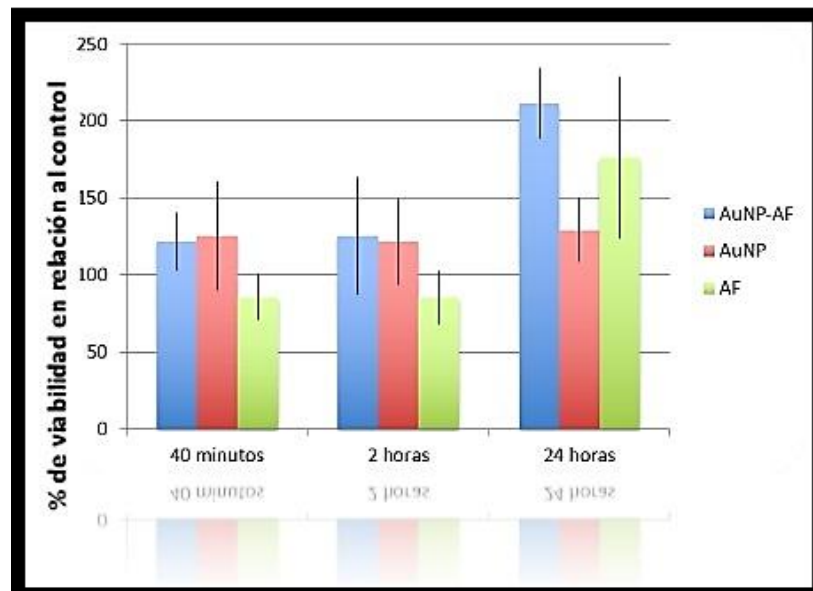


Figura 24. Citotoxicidad de 300 fM de NPs en células HeLa [Autores].

3.2 CALIBRACION DEL POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO (AUTOLAB PGSTAT302N - HIGH PERFORMANCE).

Para realizar las pruebas con el potenciostato/galvanostato, se procedió a ejecutar una serie de ensayos de calibración. Con el fin de establecer si se debía hacer un reajuste de resultados a los espectros de impedancia eléctrica de las células o por si el contrario los resultados son fiables y no necesitaban reajuste alguno.

En esta calibración se utilizó el comportamiento del espectro eléctrico de impedancia de las soluciones salinas (suero fisiológico, agua desionizada) en diferentes concentraciones.

Las características eléctricas de estas soluciones describen un comportamiento resistivo en donde su fase es muy cercana a cero. La resistividad eléctrica de la solución salina NaCl es aproximadamente resistiva hasta los 10MHz [71].

Estos valores de resistencia dependen de la concentración de la solución (Ver **Figura 25**).

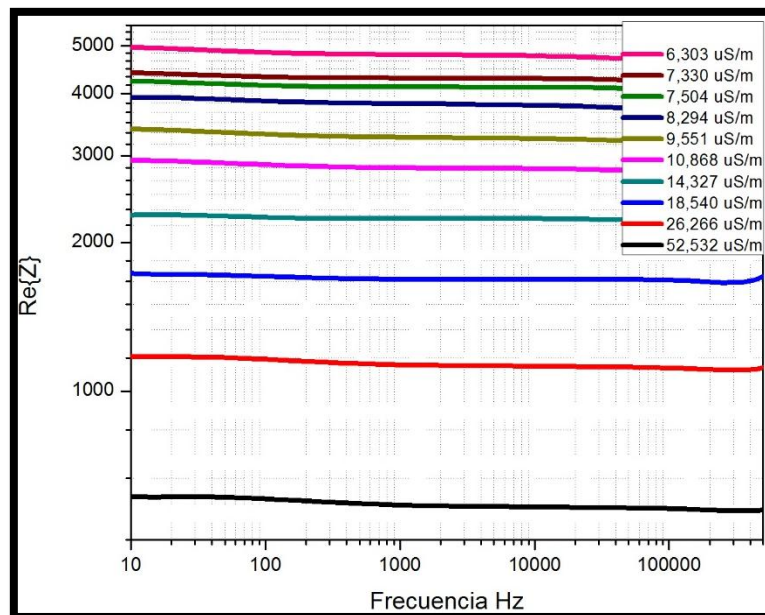


Figura 25. Parte real de la Impedancia a diferentes concentraciones de solución salina con sus valores respectivos de conductividad (recuadro) [Autores].

Se tomaron 200 puntos de la impedancia eléctrica de cada solución (10 soluciones). Cada solución corresponde a 200 puntos en frecuencia espaciados entre 10 Hz y 900KHz.

Las 10 soluciones tienen los 200 puntos en los mismos valores de frecuencia por lo cual realizamos una regresión lineal para hacer la calibración del equipo de la siguiente forma:

- Los 200 puntos de cada muestreo en frecuencia por cada una fueron los mismos valores.
- Se tomó cada valor de impedancia (200 puntos x 10 soluciones) y obtuvimos su valor de resistividad con el factor de forma.
- El factor de forma utilizado fue el siguiente:

$$\sigma = \frac{\ln 2}{\pi h R} \quad (9), \text{ (ver Item 2.1.1.2)}$$

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (10),$$

Donde σ es conductividad, ρ es la resistividad, h es la altura de la sonda utilizada y R es la resistencia que en nuestro caso es la misma impedancia ya que no es afectada por la fase de la solución.

- Se tomó el valor de impedancia, correspondiente a la frecuencia 1 de cada solución (10 valores de impedancia) y se obtuvo su respectiva resistividad. Con esto se tuvieron 10 parejas (Z , ρ). Después con los siguientes 10 impedancias de la frecuencia 2 hasta llegar a las últimas 10 impedancias de la frecuencia 200 y sus respectivas resistividades. Al final se obtuvo 200 grupos de 10 parejas de impedancia y resistividad.
- Con cada grupo de parejas se hizo una regresión lineal mediante una rutina en MATLAB y se obtuvieron 200 valores de m (pendiente) y 200 valores de b (termino independiente).
- Los resultados presentados en la regresión lineal se aplicaron a cada valor de impedancia obtenida en el espectro de impedancia eléctrica de los medios. (RegLin NM para Impedancia NM, donde $N = 1$ hasta 200 y $M = 1$ hasta 10).
- El máximo error esperado en la medida (precisión) es de $\pm 0.2\%$, dado por el equipo.

$$\rho_{NM} = m_{NM} \times Z_{NM} + b_{NM} \quad (11),$$

Después de hacer la anterior rutina se obtuvieron estos resultados:

Todos los valores de m^* y b^* fueron similares.

$$m = (3,1726 \pm 6,3000) \times 10^{-3}, \quad b=0, \quad r=0,9999$$

(*). *Estos valores son constantes y no tienen unidades.*

Esto demuestra que el dispositivo se encuentra calibrado, teniendo en cuenta que si se hace regresiones lineales con puntos de rectas paralelas (soluciones) tendremos como resultados la misma pendiente y además tiene unas pérdidas muy pequeñas atribuidas a capacitancias parasitas o efectos inductivos que se pueden presentarse en los cables de medición.

Si aplicamos los resultados de la calibración a los espectros de los medios, se obtendrán graficas exactamente iguales en forma a las gráficas obtenidas sin calibración.

3.3 MEDICIONES DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa.

Para las mediciones de impedancia eléctrica en los cultivos de células HeLa se tuvo en cuenta el tiempo de preparación de la mezcla (ingreso de las células al medio) como tiempo inicial para las medidas.

El electrodo serigrafiado, ya sea inmerso en el medio (ESS) o depositando una gota sobre el (ESG), muestra en sus espectros una interacción con el medio, pero las medidas con estos electrodos no brindan la información que se está buscando, dado que las células no se adhieren a los electrodos de oro y la técnica que usa los electrodos serigrafiados es de 3 puntas. Se estaría censando cerca de la superficie y allí no hay interacción con las células por lo que se confirma lo dicho anteriormente. (Ver **Figura 25 y 26**). Las siguientes graficas muestran el espectro tomado con el electrodo serigrafiado, en sus dos experimentos ESS y ESG.

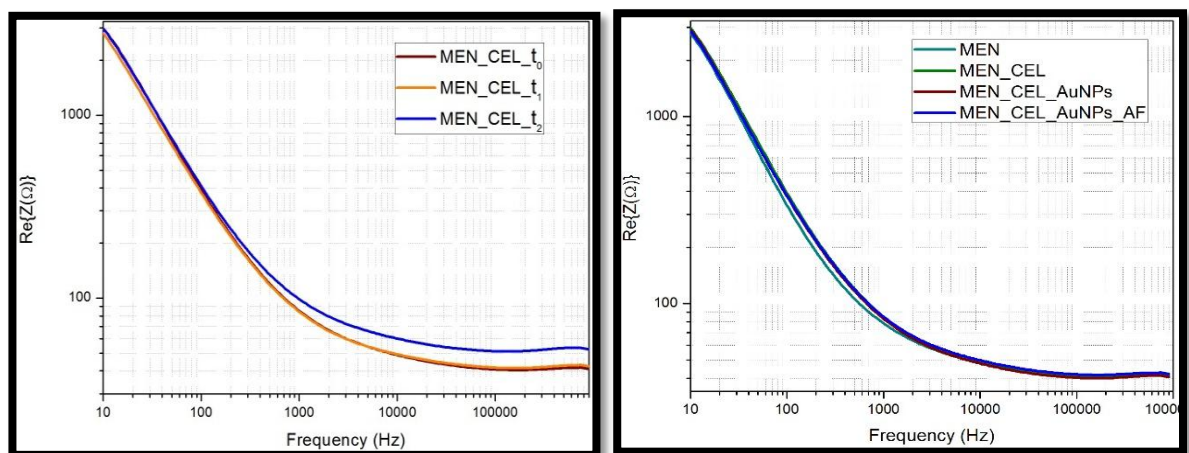


Figura 26. Espectro obtenido con el electrodo serigrafiados sumergido. Tiempo cero minutos (t_0), tiempo después de 40 minutos (t_1) y tiempo después de 2 horas (t_2) [Autores].

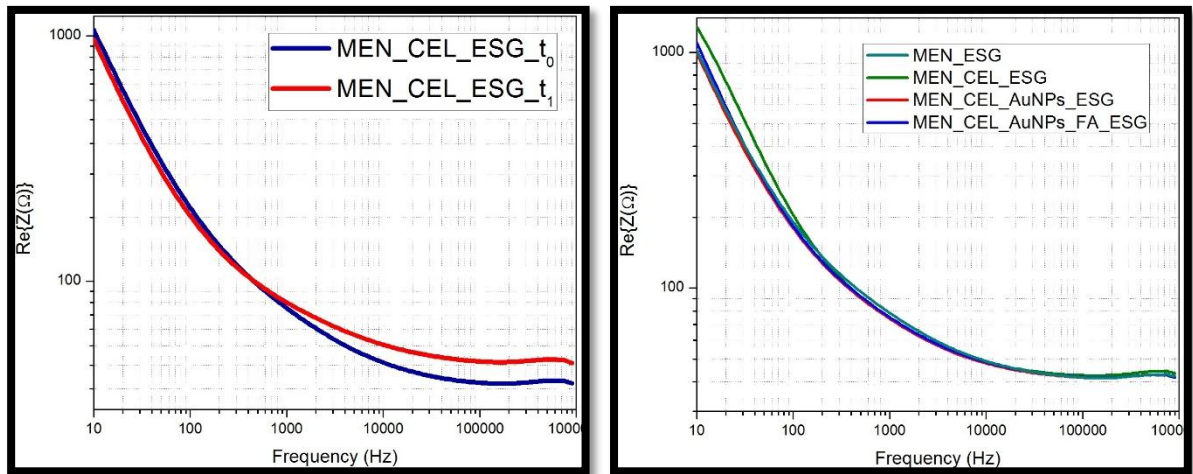


Figura 27. Espectro obtenido con el electrodo serigrafiados aplicando una gota [Autores].

La sonda Van der Pauw con factor de forma calculable es una buena alternativa para su utilización en situaciones prácticas [71]. No requiere soluciones de calibración y disminuye los efectos relacionados con la interfaz electrodo-electrolito. Por estas características los espectros obtenidos con esta técnica en comparación con el electrodo serigrafiado, nos brinda información importante, diferenciando el medio cuando tiene células y al medio cuando no las tiene. (Ver **Figura 28**).

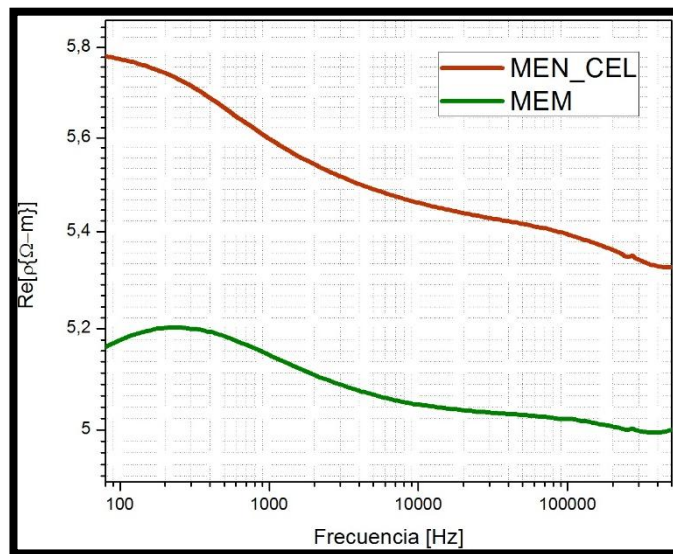


Figura 28. Espectro obtenido con la sonda Van der Pauw [Autores].

3.4 MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON AuNPs.

Basándonos en lo mencionado anteriormente nos centramos en los resultados obtenidos con la sonda Van Der Pauw. Estos espectros nos permiten ver la dinámica de las AuNPs en presencia de las células HeLa, estos son los resultados:

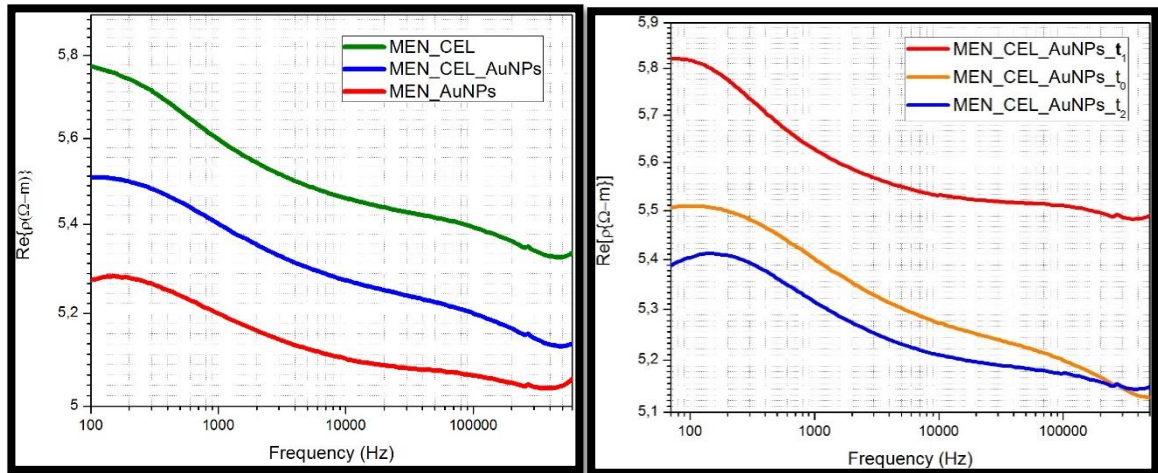


Figura 29. Espectro del medio celular con AuNPs y su dinámica en el tiempo [Autores].

Se puede observar (ver **Figura 29**) los espectros en diferentes estadios del medio y las células. Variación en su conductividad, cambios que son atribuibles al comportamiento eléctrico que puede inducir las AuNPs en presencia de las células, dinámica que observa a través del tiempo. En el capítulo siguiente se realizará un análisis del porqué de estas conductas y que características se sugiere a estas dispersiones.

3.5 MEDICIÓN DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON ÁCIDO FÓLICO.

Bajo las mismas condiciones de los experimentos anteriores se adiciona al medio celular el AF en una concentración de 300 fM, el cual muestra como resultado los siguientes espectros (ver **Figura 29**). Su dinámica en el tiempo y la diferencia cuando se tiene solo AF y cuando está en presencia de las células.

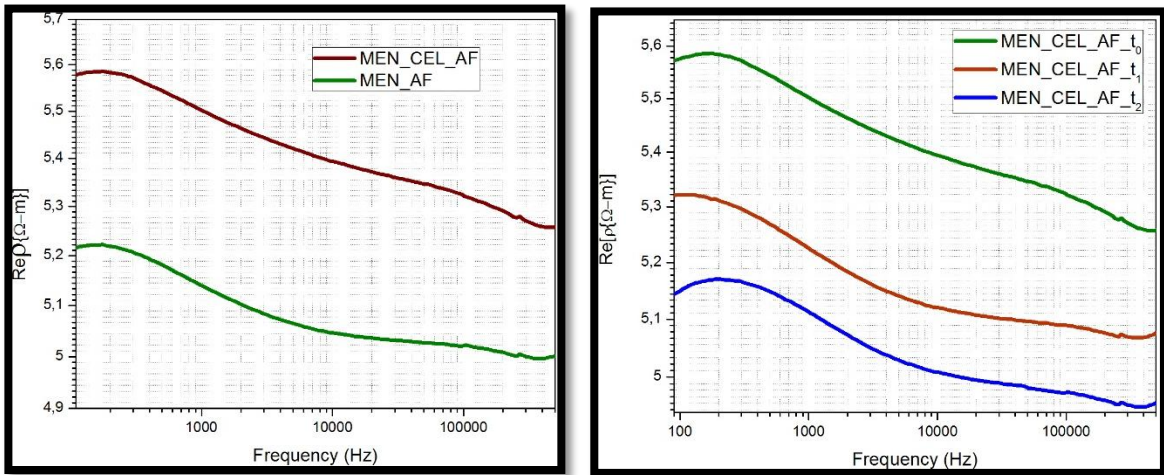


Figura 30. Espectro del medio celular con AF y su dinámica en el tiempo [Autores].

El ácido fólico es parte fundamental para la viabilidad de las células. Los espectros de la Figura 30 resaltan el comportamiento del AF. En este estudio se tiene en cuenta todas sus características para su análisis, sin embargo no hace parte de la hipótesis central de esta investigación que está enfocada principalmente al efecto de las NPs sobre las células.

3.6 MEDICION DE IMPEDANCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS HeLa CON AuNPs-AF

Los siguientes espectros corresponden a los resultados obtenidos en la medición de impedancia hechas con las células y las AuNPs - AF, observando su dinámica en el tiempo y su diferencia cuando hay o no presencia de células HeLa. Los datos fueron calibrados y acotados para evitar el ruido de frecuencias altas, generado por la limitación del módulo del potenciostato.

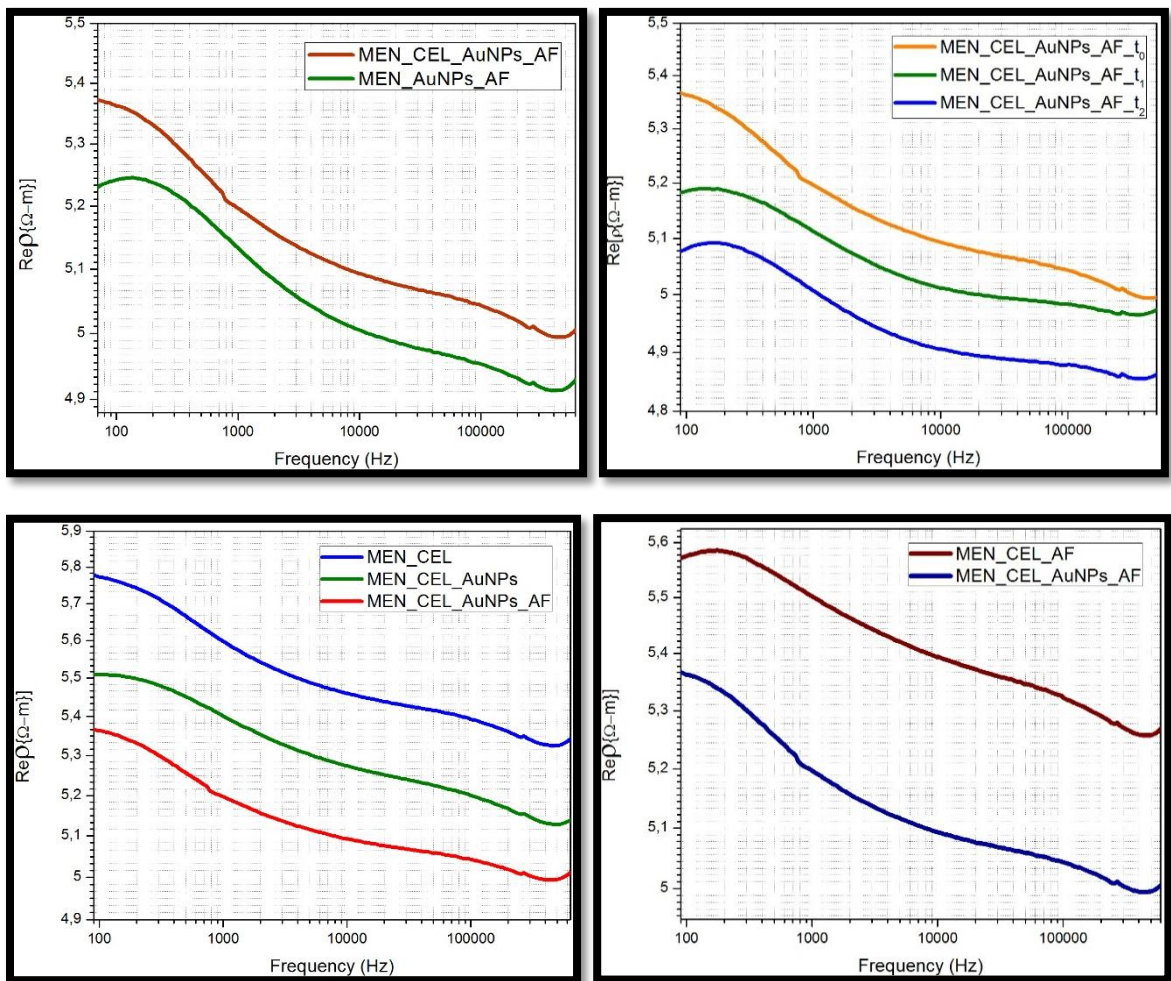


Figura 31. Espectro del medio celular con AuNPs-AF y su dinámica en el tiempo [Autores].

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la discusión de resultados se presenta un análisis cualitativo el cual nos permite describir los fenómenos que están ocurriendo en cada medio y respaldar la hipótesis central de esta investigación que postula que el espectro de impedancia eléctrica de células HeLa difiere significativamente si NPs de oro agregadas al cultivo celular se encuentran en el medio de cultivo a cuando éstas ingresan, o se adhieren, a las células. Para una mejor argumentación de los resultados se responde a lo siguiente: ¿Qué diferencias se observan en cada medio? y ¿cómo varían en el tiempo?

Luego dividimos el razonamiento en tres casos. El primer grupo está comprendido por: medio MEM, células HeLa y células con AuNPs y AuNPs - AF; en el segundo grupo se analiza MEN-AF y células con AF, por último en el tercer grupo se tiene, células con AF y células con AuNPs - AF.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente se procede a hacer el análisis del primer caso. Primero en un tiempo t_0 , los espectros que se obtienen con el electrodo serigrafiado sugieren una interacción con el medio. Las medidas con estos electrodos no brindan la información que se está buscando, dado que las células no se adhieren a los electrodos de oro y la técnica que usa los electrodos serigrafiados es de 3 puntas. Se estaría censando cerca de la superficie y allí no hay interacción con las células. Estos resultados serían ideales si se quiere monitorear cambios en medios de cultivos celulares que afecten su composición en el transcurso del tiempo. Para los tres casos planteados los espectros son iguales y no describen diferencia entre ellos.

La respuesta de una muestra biológica a la acción del campo eléctrico dependerá de las características de sus estructuras y dipolos. En las diferentes regiones del tejido biológico se han identificado tres factores de relajación o dispersión relacionados con la respuesta del tejido a la corriente y la frecuencia ver (**Ítem 1.9**), en la (**Figura 14.**) se muestra las frecuencias de dispersión para el tejido biológico en función de la frecuencia.

Las medidas con la sonda Van der Pauw, mostraron dispersiones que hacen alusión a la respuesta de una muestra biológica. En comparación con los resultados que mostro el electrodo serigrafiado, se concluye que la técnica más apropiada para monitorear estos medios celulares es la técnica de Van der Pauw.

Al observar el espectro del medio MEM y compararlos con las medidas hechas en el medio MEM con células, se evidencia que el espectro de las células tiene mayor resistividad. Como la membrana celular tiene un comportamiento capacitivo a bajas frecuencias y se comporta como cortocircuito a altas frecuencias, la célula se puede representar eléctricamente mediante un circuito de resistencias y capacitancias [64], de aquí se toma la justificación de este cambio resistividad.

Al añadir las AuNPs al medio celular, se observa un aumento en la conductividad disminuyendo evidentemente la resistividad en todo el espectro, fenómeno que se esperaría ya que lo que se está haciendo es ingresar más iones al medio y estos interactuaran con las células.

Las AuNPs - AF ofrecen la posibilidad de ingresar al medio intracelular de forma específica, unidas a receptores en la membrana celular (receptores de folato). Los espectros que se obtuvieron con la sonda Van der Pauw de la AuNPs-AF en el medio celular describe una disminución en su resistividad y una caída más rápida hacia altas frecuencias, efecto atribuible al ingreso o adhesión de la NPs, sugiriendo un cambio de conductividad en el interior de la célula. Respaldao lo que se esperaba encontrar para esta premisa. (Ver **Figura 32**).

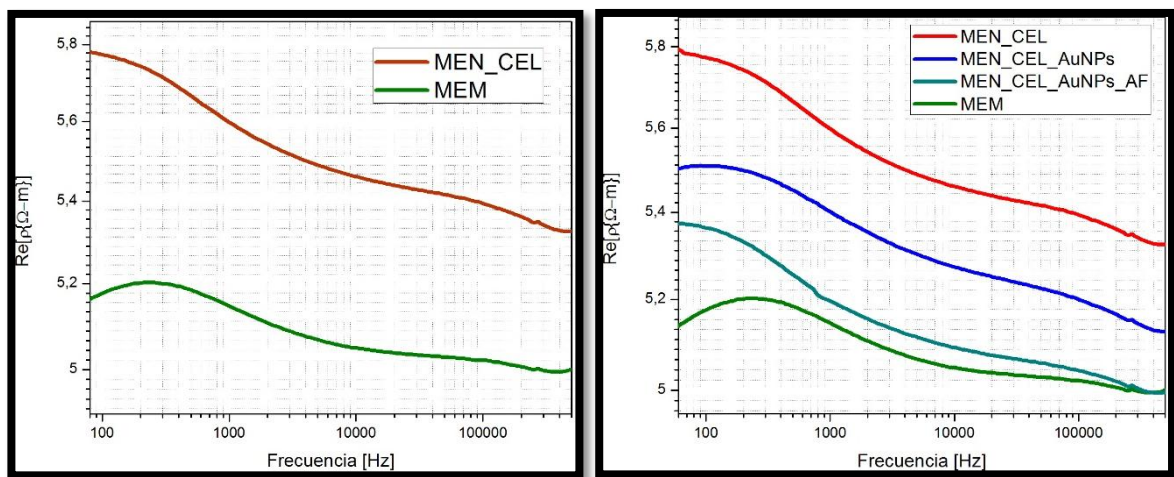


Figura 32. Comparación de los espectros medio MEM, células y nanopartículas [Autores].

Dando respuesta a la pregunta **¿Cómo varía en el tiempo?**; Nos centramos en la dinámica que describe las células, el medio MEM, AuNPs y AuNPs - AF a través del tiempo. Cada medida se realizó en intervalos de 40 minutos con un error de 3 minutos entre cada prueba, lo que nos permitió ver las diferencias en cada intervalo.

El medio en si es una preparación de sales, aminoácidos y glucosa las cuales mantienen sus propiedades eléctricas en el transcurso del tiempo sin mostrar cambios significativos en su espectros, lo mismo sucede al monitorear las células

en el transcurso del tiempo si su concentración no cambia, sus espectros de impedancia se mantienen sin presentar cambios relevantes en su conductividad.

La dinámica de las AuNPs y AuNPs-AF, sí muestran cambios, sus espectros varían en cada intervalo de medida.

El espectro de las AuNPs en t_1 describe un aumento en su resistividad, pero en el tiempo t_2 se precipita por debajo de la primera medida (t_0), (ver **Figura 33(a)**) mostrando un comportamiento para el cual no tenemos una explicación biológica ni física. Con esta conducta solo se puede asegurar que se dan cambios en su conductividad en el transcurso del tiempo y evidenciar que existen diferencias marcadas entre células con AuNPs y células con AuNPs-AF. Para verificar lo dicho se muestran los siguientes espectros: (ver **Figura 33**).

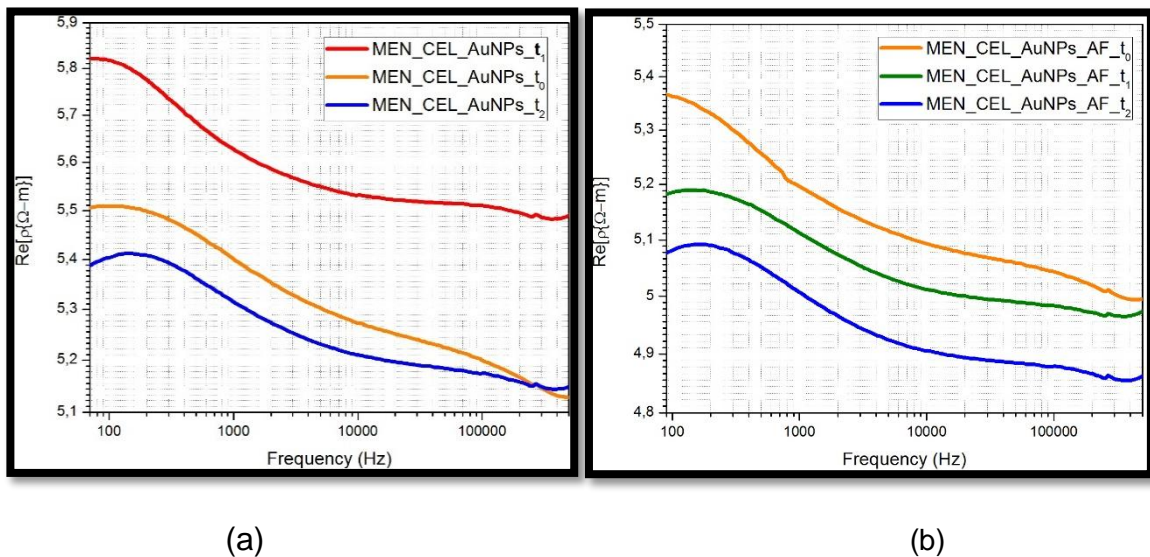


Figura 33. Espectro del medio celular con AuNPS y AuNPs-AF [Autores].

Para el análisis de las AuNPs-AF nos centramos en la hipótesis que postula que Las AuNPs-AF ingresan al medio celular por endocitosis, gracias a la sobre-expresión de receptores de folato que presentan las células HeLa. Al estudiar los espectros que se obtienen en esta medida podemos notar comportamientos de su dinámica a través del tiempo. Lo más notable es la disminución gradual de su resistividad para cada intervalo de tiempo, otra característica en la que enfocamos nuestra atención se acota en el intervalo de (100KHz a 900KHz), se observa que cada dispersión presenta menor resistividad en comparación con AF y AuNPs (ver **Figura 35**) sugiriendo un aumento en la conductividad, atribuible al ingreso de las AuNPs-AF al medio intracelular, ya que a estas frecuencias las capacitancia que presenta la membrana celular tiende a comportarse como un cortocircuito, permitiendo que la corriente circule tanto por el medio intracelular como por el medio extracelular, proporcionando información interna de la célula.

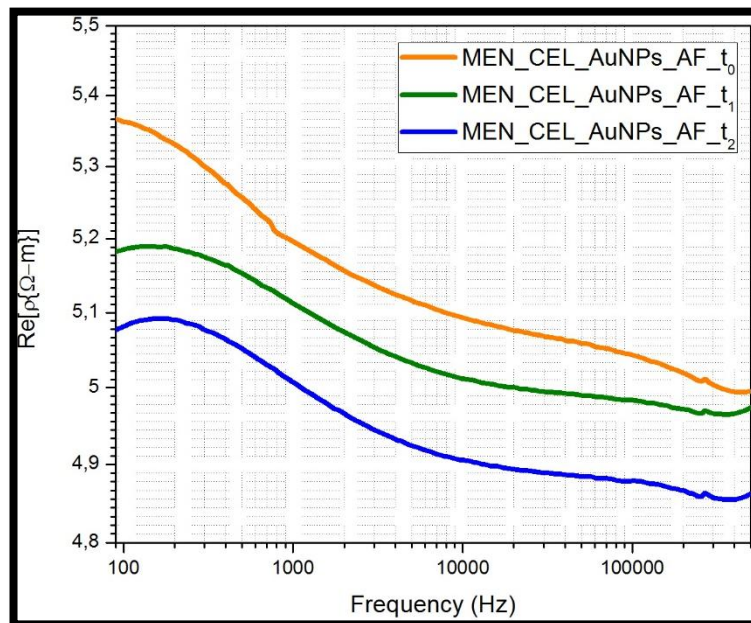


Figura 34. Dinámica del AF con las células [Autores].

En el segundo grupo nuestro interés es analizar la dinámica del AF y sus efectos en las medidas eléctricas. El AF es un precursor para la viabilidad celular, y las células HeLa presentan gran afinidad por este. Puesto que el AF es absorbido por las células, en cada intervalo de medición la resistividad disminuyó. El comportamiento de estos espectros se detalla como sigue: En el tiempo t_0 el efecto del AF no es notorio, el espectro es muy cercano al del medio con células; este resultado se esperaba porque en t_0 la medida se toma inmediatamente después de adicionarse el AF al medio celular, pero después de 40 minutos que se realiza la segunda medida la resistividad ha disminuido y llega a ser muy cercana al espectro

presentado por AuNPs-AF en t_0 , y sigue disminuyendo lo que nos sugiere que las células con AF varía en forma similar a las células con AuNPs-AF (ver **Figura 35**).

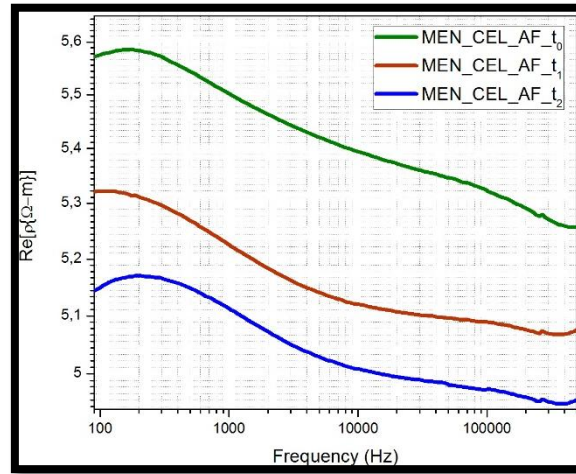


Figura 35. Dinámica del AF con las células [Autores].

Con base en el análisis anterior podemos observar que el efecto producido por las AuNPs-AF no es exclusivamente debido al AF sino a las NPs que acentúan este efecto en el espectro, aunque varíen similarmente el comportamiento de las AuNPs-AF, sugiere un ingreso al medio intracelular mostrando que para altas frecuencias el espectro describe menor conductividad después de aproximadamente 2 horas. (Ver **Figura 36**).

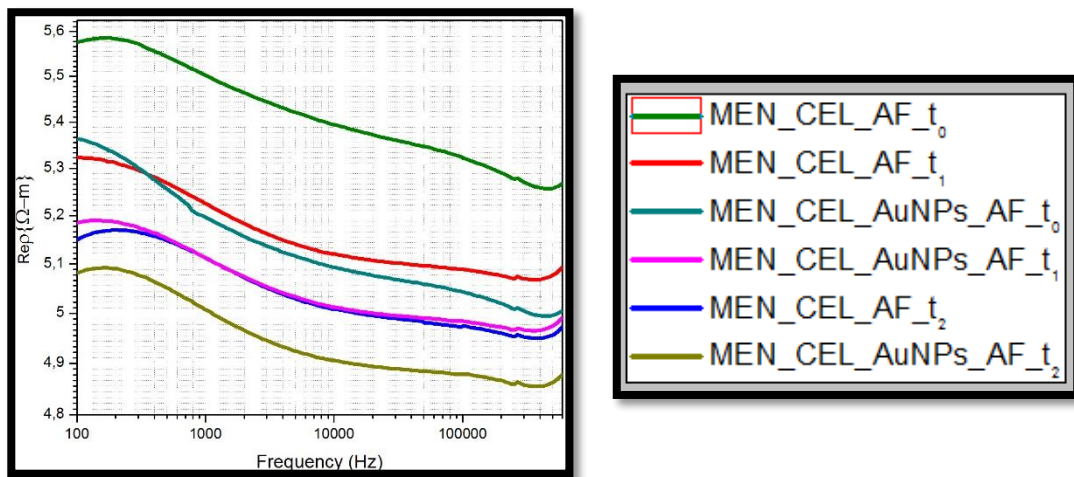


Figura 36. Comparación de la dinámica del AF y AuNPs-AF [Autores].

5. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

- Teniendo en cuenta lo discutido en los resultados se concluye, que los electrodos serigrafiados muestran una interacción con el medio, un efecto de interfaz (electrodo-electrolito) y no con el contenido celular, por lo que no brinda la información que se estaba buscando.
- Con base en el resultado presentado por el electrodo serigrafiado y teniendo en cuenta que la técnica de cuatro puntos disminuye el efecto de interfaz y permite medir formas arbitrarias con espesor uniforme, podemos concluir que el método más apropiado para medir impedancia eléctrica en medios con células en suspensión es la técnica Van der Pauw.
- Las pruebas de toxicidad nos permite concluir que los resultados obtenidos son efecto de la interacción de las nanopartículas con las células o el medio y no son producto de efectos tóxicos sobre las células
- Los diferentes espectros obtenidos de la interacción de las células Hela con las NPs presentaron cambios en la conductividad, donde a frecuencias altas se presenta menos resistividad atribuible al efecto de las AuNPs-FA en el medio intracelular. Esto gracias a la sobre-expresión de los receptores de folato en las células y que facilitaron el ingreso de estas NPs.
- Para trabajar con el electrodo serigrafiado en cultivos celulares se recomienda hacer crecer el medio celular directamente sobre el electrodo, así se garantiza la medición del espectro del cultivo celular, gracias a la cercanía de las células con la interfaz del electrodo.
- Esta investigación trabajó con nanopartículas esféricas. Para trabajos futuros se recomienda trabajar con diferentes geometrías para establecer cual presenta mejor comportamiento y efectos de impedancia eléctrica, al ser adicionadas a cultivos celulares.
- Se recomienda trabajar con otros tipos de nanopartículas metálicas teniendo en cuenta su grado de toxicidad.

REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Plan Nacional para el control de cáncer en Colombia 2012-2020. Página web [URL:\ http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?conID=1061&catID=1](http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?conID=1061&catID=1), última visita marzo 21 de 2013.
- [2]. Organización Mundial de la Salud, Press Releases “Nueva iniciativa multisectorial buscará prevenir casos nuevos y muertes por cáncer cervicouterino y de mama en las Américas”, 2013, Washington DC, EE.UU.
- [3]. Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E., Anuario Estadístico 2010, Volumen 8, Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá, DC, COLOMBIA 2012.
- [4]. MIRANDA D, BARRERO J, ECHEVERRI J. “Estudio para la detección temprana de cáncer de cuello uterino”, 1ªEdición. Universidad Industrial de Santander. Sic editorial Ltd., 2007.
- [5]. CORZO S, "Detección temprana de cáncer de cuello uterino por medio de espectroscopia de impedancia eléctrica, fase ii", Trabajo de pregrado en Física, 2010. Universidad Industrial de Santander.
- [6]. CIENCIA Y SALUD"NANOTECNOLOGIA APLICADA A LA MEDICINA "Dra. María A. Annunziato septiembre 2010.
- [7]. NCYT Amazings, Noticias de la Ciencia y la Tecnología Divulgando la Ciencia por internet desde 1997, “Nanopartículas para matar por calor a ciertas células cancerosas”, Centro Médico Baptista de Wake Forest, Winston-Salem, Carolina del Norte; Centro de Nanotecnología y Materiales Moleculares de la Universidad de Wake Forest, 2012, EE.UU.
- [8]. VILLAFUERTE L, Nanotecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de

México. Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas, C. P. 11340, Distrito Federal, México.

[9]. BATHIA S, Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease, Nature Biotechnology, MIT, Massachusett, EE.UU, 2012.

[10]. ALVAREZ M, LEMUS T, LÓPEZ G, "Nanotecnología y cáncer: aplicación al tratamiento de tumores cerebrales" Arch Neurocién (Mex) Vol. 17, No. 2: 102-109; 2012 ©INNN, 2012.

[11]. BORM P. J. A., ROBBINS D., HAUBOLD S. et al. "The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC". Part. Fiber Toxicol., 3:11, 2006.

[12]. CASTILLO J, Diseño y preparación de Nanocompuestos Funcionalizados con ácido fólico y sus aplicaciones biomédicas. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, 2012.

[13]. RAMOS, M-Y C. CASTILLO "Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas", ideas CONCYTEG, 2011.

[14]. FARIÑAS-CORONADO, Wilfredo et al. Estudio del factor de disipación dieléctrica como herramienta diagnóstica. La Habana, Cuba: Centro de Bioingeniería ISPJAE, 2002. P.249-255.

[14]. COLE K, COLE R, "Dispersion and absorción in dielectrics", Journal Chemical Physics. Vol. 9, 1941.

[15]. SCHWAN HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. In: Lawrence JH, Tobias CA. (eds) Advances in biological and medical Physics New York: Academic Press. 1957.

[16]. GABRIEL_96. GABRIEL C, GABRIEL S, CORTHOUT E. "The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey". UK: Phys. Med. Biol. Vol 41, pp 2231-3349, 1996.

[17]. BROWN, B.H et al. Relation between tissue structure and imposed electrical current flow in cervical neoplasia. UK: Lancet, 2000. p. 892–895.

[18]. BROWN B.H et al. 'Modelling the electrical properties of normal and premalignant cervical tissue' Electron.UK: Electronics Letters, 2000. v.36 n.19 p.1-2.

[19]. ROBLES A, CHÁVEZ F, "Medición de impedancia eléctrica en tejido cervicouterino In-Vitro". Trabajo de grado (Ing. Electrónico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico-Mecánicas. Bioingeniería. Bucaramanga, 2005.

[20]. ACERO J, DELGADO A, Implementación de un bioimpedanciometro para la medición de espectro de impedancia eléctrica en tejido humano. Trabajo de grado (Ingeniería Electrónica). Universidad Industrial de Santander. Bioingeniería. Bucaramanga, 2006.

[21]. GARCÍA C, VARGAS J. Diseño y montaje e un sistema de adquisición de Señales de voltaje para la medida de espectro de impedancia eléctrica en tejido humano. Bucaramanga, 2005, p. Trabajo de grado (Ing. Electrónico). Universidad Industrial de Santander.

[22]. MIRANDA D, CORZO S, GONZALEZ C. Cervical cáncer detection by electrical impedance in a Colombian setting. XV Int. Conf. on Electrical Bio-Impedance & XIV Conf. on Electrical Impedance Tomography IOP Publishing. Journal of Physics: Conference Series 434 (2013) 012056.

[23]. GLOBOCAM, Link página web última visita 16 de marzo 2013, [URL:\ URL:\http://www.cancer.gov.co/documentos/Incidencia/Tabla%20II-%20Estimaciones%20Mujeres.pdf](http://www.cancer.gov.co/documentos/Incidencia/Tabla%20II-%20Estimaciones%20Mujeres.pdf). Última visita abril 2 de 2013.

[24]. Martin-Palma R., Lakhtakia A. Nanotechnology, a crash course. 2010, SPIE; pág 1-3. USA.

[25]. BERTEL L, "Fotoactivación con infrarrojo cercano de nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico", Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias, Bucaramanga, 2012.

[26]. COOPER G, HAUSMAN R, "La célula", Universidad de Boston, Editorial Marban.

[27]. DORF R, "The Electrical Engineering Handbook Series, Biomedical Engineering Fundamentals", Capítulo 19, 19.1 Membrane. Taylor & Francis Group, 2006.

[28]. <http://biolucena.wikispaces.com/Membrana+plasm%C3%A1tica>. Última visita abril 5 de 2013.

[29]. <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/biologia/curtis/libro/index.htm>. Última visita abril 5 de 2013.

[30]. <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/3-transporte.php>. Última visita abril 15 de 2013.

[31]. http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/1bachillerato/organizacion_sv/contenidos5.htm. Última visita mayo 6 de 2013

[32]. <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/5-endocitosis.php>. Última visita mayo 21 de 2013.

[33]. Mayor, S., Pagano, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. 2007, Nature reviews in molecular and cell biology. 8:603-612.

[34].ISSN 0025-7680 487EDITORIAL MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66: 487-488Las células HeLa como prototipo del cultivo celular inmortalizado.

[35]. Link página web última visita 16 de marzo 2013, [URL:\http://www.neoteo.com/HeLa-las-primeras-celulas-humanas-inmortales-15154](http://www.neoteo.com/HeLa-las-primeras-celulas-humanas-inmortales-15154)

Última visita junio 11 de 2013.

[36]. HENNE W., DOORNEWEERD D., LEE J., LOW P., SAVRAN C. Analytical Chemistry, 2006; 78: 4880-4884.

[37]. LEAMON C., REDDY J. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004; 56: 1127-1141.

[38]. TAKEUCHI N. *Nanociencia y nanotecnología*. 2009, Dewey; pág 13-17. México.

[39]. QIU X., TANG L., DONG C., REN J. *Chinese Chemical Letters*, 2010; 21: 1227-1230.

[40]. Barber y Freestone 1990, Stockman 2011_ Barber, D.J., Freestone, I.C. (1990): An investigation of the origin of the colour of the *Lycurgus cup* by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry* 32, 33-45.

[41]. GÓMEZ L, *Nanopartículas para la conservación del patrimonio*, Instituto de Geociencias (CSIC-UCM), Dpto. de Geomateriales. C/Jose Antonio Nováis 2, 28040 Madrid, 2011.

[42]. MCFARLAND, Adam; [et al.]. *Color My Nanoworld*. En: *Journal of Chemical Education*. 2004, Vol. 81, p. 544A-544B.

[43]. HUANG, Wei-Chieh; CHEN, Yu-Chie. *Photochemical synthesis of polygonal gold nanoparticles*. En: *J. Nanopart Res.* 2008, Vol. 10, p. 697-702.

[44]. 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.

[45]. VORA A., RIGA A., DOLLIMORE D., ALEXANDER K. *Termochimica Acta*, 2002; 392: 209-220.

[46]. Kamen B (1997). "Folate and antifolate pharmacology". *Seminars in oncology* 24 (5 Suppl 18): S18-30-S18-39. PMID 9420019. Fenech M, Aitken C, Rinaldi J (1998). "Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults". *Carcinogenesis*: 1163-71. PMID 9683174. URL://: <http://www.zonadiet.com/nutricion/folico.htm#ixzz2QNsvigxl>. Última visita junio 21 de 2013.

[47]. GRIMNES S. MARTINSEN. G, Bioimpedance and bioelectricity basics, second edition. Academic Press: Great Britain, 2008.

[48]. AHUALLI S, "Propiedades Electrocinéticas de suspensiones coloidales concentradas", Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Grupo de Física de Interfases y sistemas coloidales, Granada, España, 2008.

[49]. RICA R, "Electrocinética de suspensiones concentradas de nanopartículas esféricas", Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Grupo de Física de Nanopartículas y sistemas coloidales, Granada, España, 2011.

[50]. ASAMI K., et. al., Dielectric Approach to Suspensions of Ellipsoidal Particles Covered with a Shell in Particular Reference to Biological Cells. Jpn. J. Appl. Phys. 19 (1980) 359-365.

[51]. LOOYENGA H, Dielectric constants of heterogeneous mixtures. Physica 31 (1965) 401-406.

[52]. BORDI F., et. al., Dielectric spectroscopy of erythrocyte cell suspensions. A comparison between Looyenga and Maxwell-Wagner-Hanai effective medium theory formulations. J. Non-Cryst. Solids 305 (2002) 278-284.

[53]. SALAZAR, Yolocuautili. Caracterización de tejidos cardiacos mediante métodos mínimamente invasivos y no invasivos basados en espectroscopia de impedancia eléctrica. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Ingeniería Electrónica. p. 40-41.

[54]. OLGUIN R, ROJAS J, DIAZ M, SALAZAR Y, "Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica", Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica, Vol XXX, Num 2, Diciembre de 2009, pp 98 - 108.

[55]. Measurment instrumentation, and sensor handbook CRCnetbase 1999.cap.43, p. 9

[56]. Van Der Pauw L.J. (1958) A Method Of Measuring The Resistivity And Hall Coefficient On Lamellae Of Arbitrary Shape. Philips Technical Review. Vol 20; p. 220-224.

[57]. Moron Z, Rucki Z, Szczepanik Z. et al. (1997) Possibilities of employing a calculable four-electrode conductance cell to substitute the secondary standards of electrolytic conductivity. IEEE: Transactions on Instrumentation and Measurement. Vol. 46, No 3; p. 1269.

[58]. Moron Z, et al. (2003) Investigations of Van der Pauw method applied for measuring electrical conductivity of electrolyte solutions, Measurement of electrolytic conductivity. Elsevier Science Ltd. Measurement 33; p. 281-290.

[59]. Szczepanik Z, Rucki Z, Moron Z, et al. (1996) Application of finite element Analysis Method for Modeling of Electric Field Distribution in Conductance Cells. Institute of Electrical Metrology, Technology Conference, Brussels, Belgium 127-131.

[60]. OLGUÍN R*, ROJAS J*, **DÍAZ M, SALAZAR Y*, "Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica", *Departamento de Ingeniería Eléctrica-Electrónica, Instituto Tecnológico de Durango. **Lab. De Biotecnología de la División de Estudios de Postgrado, Instituto Tecnológico de Durango, Vol. XXX, Núm. 2 Diciembre 2009 pág. 98 – 108, REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA, 2009.

[61]. GABRIEL1 etal_96. GABRIEL C, GABRIEL S, CORTHOUT E. "The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey". UK: Phys. Med. Biol. Vol 41, pp 2231-3349, 1996.

[62]. IVORRA_05_ IVORRA A. "Contributions to the measurement of electrical impedance for living tissue ischemia injury monitoring". Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de ingeniería electrónica. Barcelona. Febrero, 2005.

[63]. Técnica DLS, <http://www.horiba.com/uk/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/>. Última visita Abril 30 de 2013.

[64]. https://es.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=612-2505, VWR we enable science. Última visita Agosto 14 de 2013

[65]. Autolab <http://www.ecochemie.nl/Products/> Última visita Septiembre 4 de 2013.

[66]. NOVA <http://www.ecochemie.nl/Products/Echem/Software/Nova.html> Última visita Septiembre 4 de 2013.

[67]. Photochemical Synthesis of the Bioconjugate Folic Acid-Gold nanoparticles anexo.

[68]. HAISS, W; [et al.]. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. En: Anal. Chem. 2007, Vol. 79, p. 4215-4221

[69]. MEM, Medio Earle http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bulamem.html. Última visita mayo 17 de 2013.

[70]. PBS, RAMOS G, MARTINEZ CURSO DE CULTIVOS CELULARES Universidad Autónoma de Madrid Junio 2008.

[71]. JAIMES S, VALENCIA J, Diseño de un medidor de conductividad eléctrica de soluciones salinas, haciendo uso de una celda de conductancia calculabe, para la calibración de una sonda tetrapolar utilizada en la medición de impedancia eléctrica en tejido humano. Proyecto de Pregrado. Ingeniería Electrónica, Facultad de Fisico - Mecánicas, CIMBIOS. Universidad Industrial de Santander, 2006.

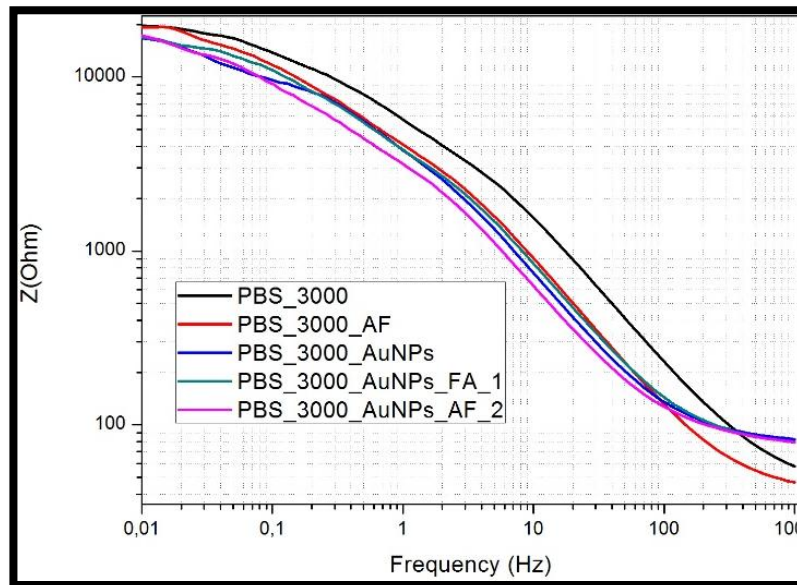
[72]. TURA A, SBRIGNADELLO S, BARISON S, CONTI S, PACINI G, Impedance spectroscopy of solutions at physiological glucose concentrations, ELSEIVER, Biophysical Chemistry 129 (2007) 235–241.

[73]. DE MENEZES V, ROCHA A, ZANELLA I, MOTA R, FAZZIO A, FAGAN S, Electronic transport properties of ascorbic acid and nicotinamide adsorbed on single-walled carbon nanotubes, ELSEIVER, Chemical Physics Letters 506 (2011) 233–238.

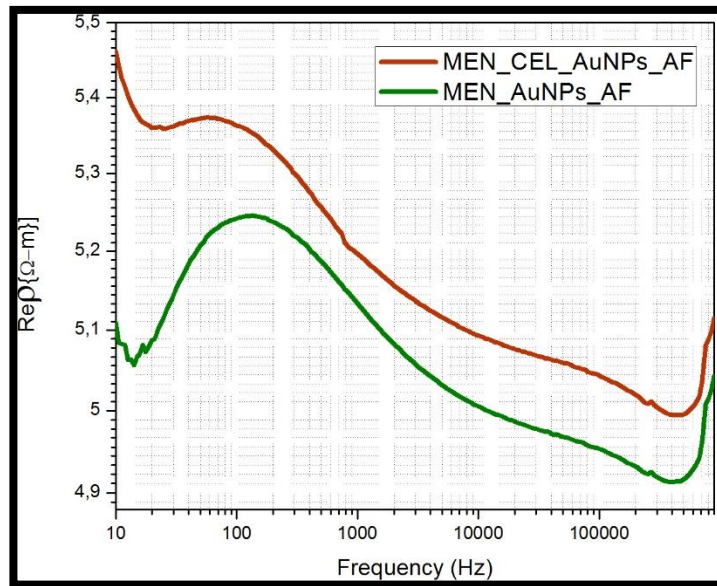
ANEXOS

ANEXO A: MEDIDAS A BAJAS FRECUENCIAS

Se hicieron medidas a bajas frecuencias en un rango de (0.01 Hz hasta 1 kHz) para observar el efecto de interfaz en los electrodos serigrafiados. Los espectros que se obtuvieron son típicos de un efecto de interfaz, electrodo-electrolito.



Luego se midió el espectro con la sonda Van der Pauw y las dispersiones expuestas son típicas de los espectros de materiales biológicos. Adicionalmente estos espectros a bajas frecuencias muestran unas crestas atribuibles a efectos inductivos y capacitivos por los materiales de la sonda, pero al comparar lo que se muestra en estas frecuencias con lo obtenido con el electrodo serigrafiado se concluye que ese efecto eléctrico es atribuible a los componentes del medio MEN (glucosa, aminoácidos) [72, 73].



Se propone un modelo circuital se simule los efectos de estos componentes y muestre un espectro que tiene efectos inductivos a bajas frecuencias.

AMINOÁCIDOS	mg/L
L-alanina	8,90
L-arginina.HCL	126,00
L-asparagina	15,00
L-ácido aspártico	13,30
L-cistina	31,29
L-ácido glutámico	14,70
L-glutamina	292,00
glicina	7,50
L-histidina.HCl.H2O	42,00
L-iso-leucina	52,00
L-leucina	52,00
L-lisina.HCl	72,00
L-metionina	15,00
L-fenilalanina	32,00
L-prolina	11,50
L-serina	10,50

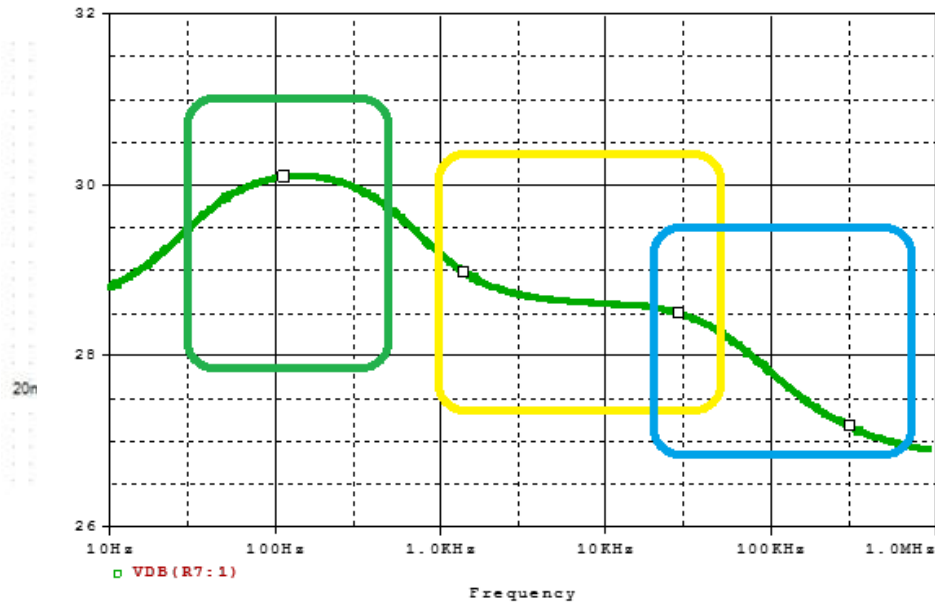
VITAMINAS	mg/L
antotenoato de cálcio	1,00
cloruro de colina	1,00
ácido fólico	1,00
inositol	2,00
nicotinamida	1,00
piridoxal.HCL	1,00
riboflavina	0,10
tiamina.HCL	1,00
OTROS COMPONENTES	mg/L
glucosa	1.000,00
rojo de fenol	10,00

Tabla Anexo. Algunos componentes del medio MEM

ANEXO B: MODELO CIRCUITAL

Modelo circuital no optimizado propuesto, los cuadros señalan a que parte del espectro hace efecto cada circuito encerrado, el cuadro verde representa el medio MEN y sus componente a bajas frecuencias el efecto que produce la glucosa los aminoacidos y las vitaminas que con tine el medio MEN, el cuadro amarillo y el celeste representan la dispersion que muestran las celulas.

Espectros tomados con las sonda Van Der Pauw



Modelo circuital aproximado del espectro celular

ANEXO C: BITACORA

12 de agosto de 2013			
Protocolo para toma de datos			
Muestra	Fecha	Hora	Estado
MEM + Células	12/08/2013	10:58	Preparación
MEM + Células	12/08/2013	10:59	Prueba
MEM + Células	12/08/2013	11:06	Final prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	11:09	Preparación
MEM + Células + FA	12/08/2013	11:10	Prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	11:18	Final prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	11:20	Preparación
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	11:21	Prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	11:29	Final prueba

MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	11:30	Preparación
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	11:32	Prueba
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	11:39	Final prueba
MEM + Células	12/08/2013	11:43	Prueba P2
MEM + Células	12/08/2013	11:49	Final prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	11:51	Prueba P2
MEM + Células + FA	12/08/2013	11:58	Final prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	12:02	Prueba P2
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	12:08	Final prueba
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	12:11	Prueba P2
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	12:18	Final prueba
MEM + Células	12/08/2013	14:00	Prueba P3
MEM + Células	12/08/2013	14:07	Final prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	14:08	Prueba P3
MEM + Células + FA	12/08/2013	14:15	Final prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	14:22	Prueba P3
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	14:29	Final prueba
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	14:32	Prueba P3
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	14:39	Final prueba
MEM + Células	12/08/2013	16:33	Prueba redonda
MEM + Células	12/08/2013	16:40	Final prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	16:47	Prueba redonda
MEM + Células + FA	12/08/2013	16:53	Final prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	16:57	Prueba redonda
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	17:04	Final prueba
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	17:06	Prueba redonda
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	17:14	Final prueba
MEM + Células	12/08/2013	17:27	Prueba redonda p2
MEM + Células	12/08/2013	17:34	Final prueba
MEM + Células + FA	12/08/2013	17:51	Prueba redonda p2
MEM + Células + FA	12/08/2013	17:58	Final prueba
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	18:00	Prueba redonda p2
MEM + Células + AuNPs	12/08/2013	18:07	Final prueba



MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	18:10	Prueba redonda p2
MEM + Células + AuNPs - FA	12/08/2013	18:16	Final prueba

Tabla 2. Bitácora de la toma de pruebas en el laboratorio.

ANEXO D: RUTINA EN MATLAB PARA CALIBRACION DE LOS DATOS

```
clear all
```

```
clc
```

```
%-----pasamos los vectores a una matriz-----
```

```
R(:,1)=xlsread('D:\conduct\ult\100.xlsx','D2:D201');
R(:,2)=xlsread('D:\conduct\ult\200.xlsx','D2:D201');
R(:,3)=xlsread('D:\conduct\ult\300.xlsx','D2:D201');
R(:,4)=xlsread('D:\conduct\ult\400.xlsx','D2:D201');
R(:,5)=xlsread('D:\conduct\ult\500.xlsx','D2:D201');
R(:,6)=xlsread('D:\conduct\ult\600.xlsx','D2:D201');
R(:,7)=xlsread('D:\conduct\ult\700.xlsx','D2:D201');
R(:,8)=xlsread('D:\conduct\ult\800.xlsx','D2:D201');
R(:,9)=xlsread('D:\conduct\ult\900.xlsx','D2:D201');
R(:,10)=xlsread('D:\conduct\ult\1000.xlsx','D2:D201');
```

```
%-----
```

```
Co=log(2)/(pi*0.007*R);
```

```
Ro=1./Co;
```

```
%x=R(:,1);
```

```
%y=Ro(:,1);
```

```
for b=1:200
```

```
P(b,:)=polyfit(R(b,:),Ro(b,:),1);
```

```
end
```

```
%-----pasamos los vectores de las graficas por la matriz-----%
```

```
G(:,1)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + AuNPs - FA p2.xlsx','D2:D201');
G(:,2)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + AuNPs - FA.xlsx','D2:D201');
G(:,3)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + AuNPs p2.xlsx','D2:D201');
G(:,4)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + AuNPs.xlsx','D2:D201');
G(:,5)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs - FA p2.xlsx','D2:D201');
G(:,6)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs - FA p3.xlsx','D2:D201');
G(:,7)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs - FA.xlsx','D2:D201');
G(:,8)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs p2.xlsx','D2:D201');
G(:,9)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs p3.xlsx','D2:D201');
G(:,10)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + AuNPs.xlsx','D2:D201');
G(:,11)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + FA p2.xlsx','D2:D201');
G(:,12)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + FA p3.xlsx','D2:D201');
G(:,13)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas + FA.xlsx','D2:D201');
G(:,14)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas p3.xlsx','D2:D201');
G(:,15)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas.xlsx','D2:D201');
G(:,16)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + FA p2.xlsx','D2:D201');
G(:,17)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + FA.xlsx','D2:D201');
```

```
G(:,18)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM p2.xlsx','D2:D201');
G(:,19)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM.xlsx','D2:D201');
G(:,20)=xlsread('D:\conduct\cuadradas\MEM + Celulas p2.xlsx','D2:D201');

for n=1:200
Y(n,:)=P(n,1).*G(n,:)+P(n,2);
end
```