Síntesis De Nanopartículas De Oro Anisotrópicas Funcionalizadas Con Ácido Fólico Y Estudio *in vitro* Del Mecanismo De Muerte Celular Por Efecto Fototérmico En Células De Cáncer De Cuello Uterino HeLa.

Jeniffer Viviana Ramírez Hernández

# Trabajo de Grado para Optar el título de Magíster en Química

Directores Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez Doctora en Ciencias Bioquímicas

Dr. Fernando Martínez Ortega Doctor En Química

Dra. Diana Blach Vargas Doctora En Química

Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias Escuela de Química Maestría en Química Bucaramanga Año 2018

# Dedicatoria

A mis padres Miguel y Martha y mi novio Leonardo

# Agradecimientos

Primero que todo a Dios quien me ha guiado en cada circunstancia de mi vida y me ha permitido tener fuerzas para superar cada dificultad que se me ha presentado.

A mis padres por el apoyo incondicional que cada día de mi vida me han ofrecido sin perder la esperanza de ver cumplidas mis metas y la culminación con éxito cada etapa de mi vida.

A mi novio, por su apoyo y cariño durante todo este tiempo

También a la profesora Stelia Méndez, profesor Fernando Martínez y Diana Blach por sus enseñanzas y guía durante el desarrollo de mi tesis.

Para finalizar a la universidad por prestarme sus instalaciones en los momentos necesarios y el apoyo financiero para la realización de este proyecto y a las demás personas que contribuyeron en el desarrollo y la culminación satisfactoria de este proceso.

# Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Marco teórico y estado del arte	
2.1 El cáncer y sus estadísticas de mortalidad	
2.1.1 Desarrollo del cáncer de cuello uterino	19
2.1.2 Tratamiento y quimioterapia en el cáncer de cérvix	
2.2 Nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer	
2.3 Nanociencia y nanotecnología	21
2.3.1 Nanopartículas.	
2.3.2 Propiedades de las nanopartículas	23
2.3.3 Métodos de síntesis de nanopartículas	24
2.3.4 Funcionalización de las nanopartículas y ácido fólico	
2.3.5 Terapias empleando nanopartículas de oro	
2.4 Mecanismos de acción de la terapia fototérmica con nanopartículas de oro	(AuNPs) 33
2.5 Apoptosis.	
2.5.1 Mecanismo de activación de la apoptosis	

	2.6	Necrosis	36
3.	Met	todología	38
	3.1	Síntesis de AuNPs anisotrópicas	38
	3	.1.1 Síntesis de AuNPs con micelas inversas (MINPs)	38
	3	.1.2 Síntesis de AuNPs en fase homogénea	39
	3	.1.3 Transferencia de fase.	40
	3	.1.4 Funcionalización de las AuNPs	40
	3	.1.5 Caracterización de los nanocompuestos	40
	3.2	Pruebas Biológicas	43
	3	.2.1 Cultivo Celular	43
	3	.2.2 Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular	44
	3	.2.3 Determinación del mecanismo de acción.	45
	3	.2.4 Análisis estadístico	47
4.	Res	ultados y discusión	48
	4.1	Síntesis de nanopartículas de oro anisotrópicas	48
	4	.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro por medio de micelas inversas (MINPs)	48
	4	.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro usando extracto de Aloe vera (AVNPs)	52
	4.2	Funcionalización de nanopartículas de oro anisotrópicas con ácido fólico	
Aı	uNPs	s@AF	57
	4.3	Respuesta térmica de las AuNPs frente a la irradiación IR	65
	4.4	Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad de las células HeLa	68

4.5 Efecto fototérmico de las nanopartículas de oro sobre la viabilidad de las células	
HeLa	71
4.6 Determinación del mecanismo de acción de las nanopartículas MINPs	76
5. Conclusiones	81
6. Recomendaciones	82
Referencias Bibliográficas	83
Apéndices	. 110

# Lista de Tablas

Tabla 1. Diferencias entre la apoptosis y la necrosis.	
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la planta de Aloe Vera.	
Tabla 3. Presencia de carbohidratos, proteínas y ADN en AVNPs en agua	
Tabla 4. Resultados del potencial Zeta obtenido por DLS de las AuNPs.	

# Lista de Figuras

<i>Figura 1. Representación de las micelas inversas de AOT26</i>
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular del ácido fólico en solución acuosa alcalina (pH=9)33
Figura 3. Espectro de UV-vis de las nanopartículas MINPs
<b>Figura 4.</b> Morfología y tamaño de las MINPs51
Figura 5. Espectro de UV-vis de las nanopartículas AVNPs53
Figura 6. El mecanismo propuesto para la formación de AuNPs sintetizados usando el extracto
de Aloe Vera
<b>Figura 7.</b> Morfología y tamaño de las AVNPs56
Figura 8. Espectro de UV-vis de las nanopartículas con y sin funcionalización
Figura 9. Espectros de fluorescencia de las nanopartículas de oro a $\lambda$ ext =364nm
solubilizadas en medio acuoso
<i>Figura 10.</i> Barrido de fluorescencia de nanopartículas de oro61
Figura 11. Espectros (FT-IR) de MINPs62
Figura 12. Espectros (FT-IR) de AVNPs63
Figura 13. Respuesta térmica de las AuNPs en solución frente al diodo de 808nm a diferentes
potencias de irradiación
Figura 14. Respuesta térmica de las AuNPs en solución frente al diodo de 638nm a diferentes
potencias de irradiación
<b>Figura 15.</b> Respuesta térmica de las AuNPs en medio EMEM, [AuNPs] = 400µM67
Figura 16. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento a 2 y 4 h con nanopartículas
MINPs

Figura 17. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento a 2 y 4 h con nanopartículas
AVNPs
Figura 18. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas
MINPs e irradiadas con los diodos de 638 y 808nm durante 5 minutos a una distancia de 2cm.
Figura 19. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas
AVNPs e irradiadas con los diodos de 638 y 808nm durante 5 minutos a una distancia de 2cm.
Figura 20. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas
MINPs e irradiadas con el diodo de 638nm durante 5 minutos a una distancia de 2 y 5cm 74
Figura 21. Evaluación de la línea HeLa posterior al tratamiento con MINPs y MINPs@AF
respecto al tiempo
Figura 22. Efecto de las MINPs sobre la liberación de citocromo C en células HeLa
Figura 23. Gel de electroforesis de las células HeLa tratadas con MINPs
Figura 24. Cambios morfológicos de las células HeLa frente al tratamiento con MINPs 79
Figura 25. Población celular según el mecanismo de acción activado por las MINPs y
MINPs@AF

# Lista de Apéndices

Apéndice A.	El espaciamiento	interplanar	del	cristal	de	oro	(Å),	intensidad y	valores
cristalográficos .	HKL del JCPDS-PL	DF 04-0784	•••••		•••••	•••••	•••••		110
Apéndice B. (	Condiciones de prep	paración del	extra	icto de 1	Aloe	e Ver	a		110

#### RESUMEN

**TÍTULO:** SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO ANISOTRÓPICAS FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO Y ESTUDIO *in vitro* DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR POR EFECTO FOTOTÉRMICO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO HeLa.

AUTOR: Jeniffer Viviana Ramírez Hernández<sup>12</sup>

**PALABRAS CLAVE:** célula HeLa, nanopartículas, terapia fototermal, micelas inversas, *Aloe Vera*, ácido fólico.

#### **DESCRIPCION:**

Las nanopartículas metálicas (NPs) están emergiendo como agentes fototérmicos prometedores para la terapia del cáncer, debido a su capacidad de generar calor cuando absorben la luz láser. Especialmente, las NPs de oro (AuNPs) son biocompatibles y fácilmente funcionalizables con moléculas que aumentan su internalización. Considerando que la eficiencia fototérmica de las AuNPs depende de sus propiedades físicas; este trabajo evaluó dos metodologías de síntesis y se determinó cómo las propiedades AuNPs mejoraron su respuesta fototérmica selectiva para células HeLa. Las AuNPs se sintetizaron en confinamiento utilizando micelas inversas (MINPs) AOT / isooctano como medio de reacción y utilizando una metodología verde en medio homogéneo con extracto de Aloe vera (AVNPs), en ambos casos se usó ácido tetraclorhídrico (HAuCl4) como precursor. Posteriormente, se realizó la funcionalización con ácido fólico (AF). Las AuNPs obtenidas se caracterizaron por UV-vis, potencial zeta, espectroscopia de fluorescencia y FT-IR. La citotoxicidad de las AuNPs y el efecto fototérmico en células HeLa se determinaron usando el método de cristal violeta. Se evaluó el efecto de la concentración de AuNPs (µg / mL), la funcionalización de las nanopartículas, la distancia de irradiación, el tiempo de tratamiento y la longitud de onda del láser. Las nanopartículas obtenidas mediante la metodología de micelas inversas y funcionalizadas con AF presentaron el mejor efecto fototérmico sobre las células HeLa, disminuyendo la viabilidad en un 22% con respecto al control. Este efecto citotóxico puede ser atribuido a la combinación de dos posibles mecanismos de muerte celular: necrosis y apoptosis tardía. Esto resultados sugieren que las MINPs pueden ser consideradas como agentes terapéuticos prometedores contra el cáncer.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Trabajo de grado.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Doctora en Ciencias Bioquímicas.

# ABSTRACT

**TITLE:** SYNTHESIS OF ANISOTROPIC GOLD NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH FOLIC ACID AND *in vitro* STUDY OF THE MECHANISM OF CELL DEATH BY PHOTOTHERMAL EFFECT IN HELA UTERINE CANCER CELLS.

AUTHOR: Jeniffer Viviana Ramírez Hernández<sup>34</sup>

**KEY WORDS:** HeLa cell, nanoparticles, photothermal therapy, reverse micelles, Aloe Vera, folic acid.

# **DESCRIPTION:**

The metallic nanoparticles (NPs) are emerging as promising photothermic agents for cancer therapy, due to their ability to generate heat when they absorb laser light. Especially, the gold NPs (AuNPs) are biocompatible and easily functionalized with molecules that increase their internalization. Considering than the photothermal efficiency of AuNPs depends on its physical properties. This work evaluated two synthesis methodologies and we determined how the AuNPs properties improved their selective photothermal response for HeLa cells. The AuNPs were synthesized in confinement using reverse micelles (RMNPs) AOT / isooctane as a reaction medium and using a green methodology in a homogeneous medium with Aloe vera extract (AVNPs), in both cases tetrachlorhydric acid (HAuCl4) was used as a precursor. Subsequently, functionalization with folic acid (FA) was performed. The AuNPs obtained were characterized by UV-vis, zeta potential, fluorescence spectroscopy and FT-IR. The cytotoxicity of AuNPs and the photothermal effect in HeLa cells were determined using crystal violet method. The effect of concentration of AuNPs (µg / mL), functionalization of nanoparticles, irradiation distance, treatment time and laser wavelength were evaluated. The nanoparticles obtained by the methodology of reverse micelles and functionalized with FA presented the best photothermal effect on HeLa cells, decreasing viability by 22% with respect to the control. This cytotoxic effect could be attributed to the combination of two possible mechanisms of cell death: necrosis and late apoptosis. These results suggest that RMNPs can be considered as promising therapeutic agents against cancer.

Bioquímicas.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Trabajo de grado.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Doctora en Ciencias

#### Introducción

El cáncer ha causado cerca de 8.8 millones de muertes a nivel mundial, lo que lo ha convertido, en la segunda enfermedad no transmisible con mayor tasa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares (Forouzanfar et al., 2016). En particular, el cáncer de cérvix se considera entre los padecimientos que más muertes genera en el mundo con alrededor de 266.000 casos por año (Ferlay et al., 2012). En Colombia, por ejemplo, el cáncer de cuello uterino es la quinta causa de muerte, afectando cerca del 8% de las mujeres en el año 2014 (Chaparro Narváez et al., 2015). Debido a la baja especificidad de las terapias convencionales utilizadas contra el cáncer de cérvix y a los efectos secundarios (Lorusso, Petrelli, Coinu, Raspagliesi, & Barni, 2014), se hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos que presenten alta eficiencia y especificidad contra las células cancerígenas, y por tanto genere el menor daño citotóxico posible a las células normales del paciente.

En los últimos años, la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de la nanotecnología en la medicina, encontrando diversas aplicaciones en la detección y la terapia contra el cáncer. En este sentido, la terapia fototérmica, basada en la implementación de nanopartículas que promueven la hipertermia celular al ser irradiadas con luz láser (Zhou et al., 2014), se muestran como una interesante y versátil alternativa de tratamiento. Actualmente, el empleo de nanopartículas y especialmente de nanopartículas metálicas en este campo, ha tenido gran auge debido a que sus propiedades difieren notablemente de las propiedades a escala macro de los materiales (Loos, 2015). Estas propiedades particulares son inherentes al tamaño, forma y naturaleza de las nanopartículas, debido a que presentan efectos cuánticos asociados a su relación superficie/volumen. Principalmente, se ha implementado el uso de

nanopartículas de oro debido a la versatilidad de su síntesis, baja toxicidad, alta biocompatibilidad y propiedades ópticas ajustables entre las que se destacan la absorción y dispersión de radiación y su facilidad para ser funcionalizadas (X. Huang & El-Sayed, 2010; Yeh, Creran, & Rotello, 2012).

La presencia de anisotropía en las nanopartículas es importante para el tratamiento de diversas enfermedades, y en especial el cáncer (Mikhailovna Egorova, Amirkhanovich Kubatiev, & Ivanovich Schvets, 2016), puesto que las nanopartículas no esféricas pueden tener uno o más plasmones entre 500-2000 nm (Tréguer-Delapierre, Majimel, Mornet, Duguet, & Ravaine, 2008), lo cual, es aprovechado para disminuir el daño en tejido normales gracias a la ventana óptica, presente en el rango de 600-1300 nm (Lyons, Patrick, & Brindle, 2013).

Si bien, el efecto fototérmico de las AuNPs sobre células de cáncer de cuello uterino ha sido ampliamente demostrado (L. E. Bertel Garay, 2015; T. Liu et al., 2014), el reto actual de los investigadores se centra en obtener nanopartículas que posean una mejor eficiencia como nanocalefactores, menor toxicidad y mayor selectividad hacia células tumorales. Por consiguiente, este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la anisotropía de las AuNPs en terapia fototérmica sobre células de cáncer de cuello uterino, el efecto de la anisotropía de las AuNPs, sintetizadas mediante dos métodos diferentes: micelas inversas (medio confinado) y mediante síntesis verde (medio homogéneo). Además, evaluar la respuesta térmica frente a la irradiación en el infrarrojo cercano (IRC) así como el efecto de la funcionalización de las AuNPs con ácido fólico en la selectividad hacia células tumorales y su influencia en la muerte térmica.

# 1. Objetivos

# 1.1 Objetivo General

Evaluar metodologías diferentes de síntesis de nanopartículas anisotrópicas y funcionalizadas con ácido fólico, para optimizar las propiedades ópticas de los nanocompuestos y su eficiencia como nanocalefactores para el tratamiento fototérmico selectivo de células cancerosas tipo HeLa.

# **1.2 Objetivos Específicos**

- Diseñar nuevas metodologías para sintetizar y funcionalizar nanopartículas de oro anisotrópicas para su uso en terapia fototérmica selectiva de células cancerosas.
- Determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas de oro funcionalizadas sobre la línea cancerígena (HeLa).
- Determinar la eficiencia fototérmica de las nanopartículas funcionalizadas con AF para inducir muerte selectiva de células cancerosas por hipertermia.
- Establecer el mecanismo de acción de las nanopartículas funcionalizadas después de la irradiación, mediante fragmentación de ADN y citometría de flujo.

#### 2. Marco teórico y estado del arte

#### 2.1 El cáncer y sus estadísticas de mortalidad

En el 2015, cerca del 70% de la tasa de mortalidad mundial se relacionó con enfermedades no transmisibles en las que se encuentra la diabetes (1.6 millones), enfermedades respiratorias (3.9 millones) y el cáncer (8.8 millones) (Forouzanfar et al., 2016). El cáncer se caracteriza por la presencia de células anormales que se desarrollan rápidamente gracias a sus capacidades para inhibir la apoptosis, diseminarse y proliferar sin control en los tejidos del cuerpo (Meza-junco, Montaño-loza, & Aguayo-gonzález, 2006).

El cáncer es una enfermedad catalogada como multifactorial debido a que posee una variedad de factores predisponentes, como son: la exposición a agentes infecciosos, una dieta desbalanceada, consumo de cigarrillo, entre otros (Deverakonda & Gupta, 2016; Forouzanfar et al., 2016). Millones de mujeres anualmente mueren por cáncer. Según Globocan 2012, y las tasas de mortalidad más representativas para esta población son causadas por el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cuello uterino y de estómago (Ferlay et al., 2012). El cáncer de cuello uterino se genera cuando ocurre la transformación neoplásica de las células escamosas del epitelio, siendo atribuido a una infección previa con algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH) principalmente los genotipos 16 y 18 (Deverakonda & Gupta, 2016; Herrera de la Muela, Álvarez de la Rosa, & de Santiago, 2009). El cáncer de cérvix se considera el cuarto cáncer más frecuente en mujeres, con indicadores de incidencia de 528.000 casos en 2012 a nivel mundial y con mayor tendencia a generarse en países subdesarrollados. (Ferlay et al., 2012). Por ejemplo, en Colombia, durante el periodo de 2007-2013 se presentaron cerca de 13.000 muertes atribuidas al cáncer cuello uterino (Pardo, de Vries, Buitrago, & Gamboa, 2017).

#### 2.1.1 Desarrollo del cáncer de cuello uterino

El VPH es el principal causante del cáncer cervical en más del 96% de mujeres con neoplasia cervical intraepitelial (Garcia, Bosch, Covisa, & Atero, 2008). Existen alrededor de 100 diferentes tipos de VPH de los cuales 58 son malignos y pueden generar cáncer (Concha R, 2007; Husain & Ramakrishnan, 2015). Los genotipos 16 y 18 poseen una integración más efectiva al genoma humano en comparación con otros tipos del virus, generando la rápida aparición de lesiones de alto grado (Crosbie, Einstein, Franceschi, & Kitchener, 2013; Husain & Ramakrishnan, 2015; Vázquez Márquez, González Aguilera, de la Cruz Chávez, Almirall Chávez, & Valdés Martínez, 2008). Las principales proteínas del VPH que facilitan la proliferación de células cervicales cancerígenas son: E6 y E7 de alto riesgo oncogénico, actuando en la degradación dos proteínas (p53 y Rb, respectivamente) que regulan el ciclo celular, facilitando la evasión de la apoptosis y la proliferación incontrolada de las células, haciéndolas susceptibles a la transformación neoplásica (X. Chen, Jiang, Shen, & Hu, 2011; Fernández, Sánchez, Raposo, & Castellanos, 2013; Lagunas-Martínez, Madrid-Marina, & Gariglio, 2010). Este tipo de células cancerígenas poseen mutaciones características como: el aumento de la quinasa dependiente de cíclina 3 (Cdk3) y la subunidad del citocromo C oxidasa facilitándoles la transición de las fase G1 a la S (Jaluria, Betenbaugh, Konstantopoulos, & Shiloach, 2007).

Adicionalmente, se sobre-expresan los receptores de folatos en HeLa y otros adenocarcinomas, promovidos por el aumento de uno de los tres genes que los codifican (hFR $\alpha$  o FOLR1) (Wibowo et al., 2013). Estos receptores son característicos de las células epiteliales polarizadas y se encuentran anclados en la membrana plasmática, permitiendo el paso de ácido fólico y sus derivados importantes en la síntesis de nucleótidos y proliferación celular (Wibowo et al., 2013; Zwicke, Mansoori, & Jeffery, 2012). El aumento de estas proteínas es aprovechado en diferentes alternativas de tratamiento, con el fin de aumentar la selectividad de un compuesto mediante su funcionalización con ácido fólico (Siwowska, Schmid, Cohrs, Schibli, & Müller, 2017; Zwicke et al., 2012).

#### 2.1.2 Tratamiento y quimioterapia en el cáncer de cérvix.

Dependiendo de la evolución del cáncer en el paciente se realizan tres tipos de tratamientos: quirúrgicos, radioterapia y quimioterapia. En la mayoría de los casos se emplean combinándose en distintas formas (Sadalla, Moreira De Andrade, Nogueira Dias Genta, & Chada Baracat, 2015). Algunos tratamientos como la cirugía, laserterapia y quimo-radiación solo se pueden realizar a pacientes con la lesión visible, sin cambios en el epitelio glandular y sin enfermedad invasiva (Fidalgo, Machancoses, González, & Cervantes, 2011). Mientras que en otros casos, por ejemplo cuando la progresión de la lesión es del 30-50 %, se extirpa la zona de lesión y se puede sacar tejido para realizar un estudio patológico (Garcia et al., 2008). En el caso de mujeres con citología HSIL (Lesión intraepitelial escamosa de alto grado) se emplea una exéresis (extirpación del órgano) (Sadalla et al., 2015), mientras que tratamientos como la quimioterapia y radioterapia emplean fármacos cuya efectividad suele variar con respecto a la etapa del cáncer y el estado del paciente, además causa efectos secundarios como alopecia, diarrea, vómitos, náuseas y efectos emocionales (Cano González, Díaz Barroso, Fernández Fernández, García García, & Gutiérrez García, 2009; Sadalla et al., 2015).

## 2.2 Nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer

Dado que los métodos de tratamiento actuales causan diversos efectos secundarios indeseables (Cano González et al., 2009; Sadalla et al., 2015), se están estudiando varias vacunas que pueden ser profilácticas (virus como partículas obtenidas a partir de L1) y terapéuticas (péptidos derivados de los oncogenes E6 y E7) que atacarían al virus VPH impidiendo la aparición del cáncer y otras infecciones que se atribuyen a este virus (Alameda González & de Lorenzo-Cáceres Ascanio, 2008). Además, se están investigado otras terapias alternativas, tales como:

*Terapia dirigida:* Esta técnica elimina el cáncer generando un llamado de la respuesta inmune del hospedero para contrarrestar el cáncer, por la unión especifica del ligando o molécula a un receptor para bloquear procesos necesarios para la supervivencia de la célula maligna o por medio de su conjugación con moléculas como una toxina, un nano compuesto o un radioisótopo (Gerber, 2008; Zwicke et al., 2012).

*Fármacos o inhibidores moleculares:* Los cuales emplean moléculas que inducen apoptosis y disminuyen la tasa de proliferación celular mediante varios mecanismos, entre los que sobresalen la sensibilización a la apoptosis inducida al incrementar la transcripción del gen DR5 (Kandasamy & Kraft, 2008) y la inhibición de traducción de proteínas (W. K. K. Wu et al., 2010).

## 2.3 Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia es la ciencia asociada con el estudio del comportamiento y la manipulación de las especies químicas que conforman estructuras nanométricas (Whitesides, 2005), que permite su posible su aplicación en diferentes campos (nanotecnología), con el fin de entender, crear y utilizar estructuras, materiales y sistemas con propiedades y funciones no convencionales (Filipponi & Sutherland, 2012). Es así como, la unión entre la biotecnología y la nanotecnología ha permitido el uso de nanopartículas, como alternativas de solución a problemas sociales como el cáncer (Loos, 2015; Zwicke et al., 2012).

#### 2.3.1 Nanopartículas.

Las nanopartículas (NPs) son partículas con dimensiones menores a 100 nm, que son objeto de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones (Filipponi & Sutherland, 2012). La morfología de las nanopartículas suele ser muy variada, además la composición y el tamaño le atribuyen cualidades específicas a cada nano material. Por ejemplo, las nanopartículas de oro de 20 nm tienen un color rojo vino mientras que las de plata son de color gris amarillento y las de platino y paladio son de color negro, estas diferencias también pueden darse para un mismo material, por ejemplo las nanopartículas de oro esféricas de ~100 nm de diámetro son de color amarillo, mientras que las de ~50 nm son verdes (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007; Horikoshi & Serpone, 2013).

En general las nanopartículas son clasificadas teniendo en cuenta dos criterios: la naturaleza química y la morfología (Buzea et al., 2007). En función a su naturaleza las nanopartículas se clasifican en: orgánicas (Fullerenos, nanotubos de carbono, lípidos, proteínas y nano cristales de celulosa (CNC<sub>5</sub>)) e inorgánicas (nanopartículas de oro, plata, platino, cobre, aluminio y nanopartículas de óxidos metálicos: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Cu<sub>2</sub>O, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) (Abhilash, 2010; Heera & Shanmugam, 2015; F. D. D. C. Rodríguez, 2012). Mientras que en función a sus dimensiones estas se pueden ser: esféricas, cilíndricas, elipsoidales, tubulares, helicoidales, arracimadas, campaniformes, dendríticas, en forma de zig-zag o en caja. Además, estas formas se subdividen en conformaciones anisotrópicas, que son aquellas que tienen uno o varios ejes asimétricos (Buzea et al., 2007; Sau & Rogach, 2010).

#### 2.3.2 Propiedades de las nanopartículas

Las propiedades de los materiales a escala macro son fijas para un mismo tipo de material; sin embargo, a escala nano, algunas propiedades varían con su tamaño y su forma (Tiede et al., 2008), por lo que el control morfológico de partículas nanométricas es muy importante cuando se quiere obtener propiedades especificas (Burrows et al., 2016; Panikkanvalappil, Theruvakkattil, Samal, & Thalappil, 2011). A continuación, se describen las principales propiedades de las nanopartículas.

**Propiedades físicas:** Entre las propiedades físicas más remarcables de las nanopartículas se encuentra el denominado fenómeno de resonancia del plasmón superficial "RPS" (*Surface Plasmon Resonance*), una propiedad óptico-electrónica característica de algunos metales a escala nanométrica como: oro, plata y semiconductores. (Stalmashonak, Seifert, & Abdolvand, 2013). Esta resonancia se produce cuando las nanopartículas tiene un tamaño menor que la longitud de onda de la luz incidente, d $<<\lambda$ , lo que genera excitaciones dipolares fuertes de los electrones libres en la superficie de la partícula (Amendola, Pilot, Frasconi, Maragò, & Iatì, 2017; Cruz et al., 2012); con la resonancia del plasmón se produce un fuerte acoplamiento de los electrones libres con la radiación incidente debido a los fotones absorbidos (Couvreur, 2016; Filipponi & Sutherland, 2012; Rao, Thomas, & Kulkarni, 2007; Rider, Ostrikov, & Furman, 2012; Stalmashonak et al., 2013; YuJuan Zhang, Huang, Zhu, Wang, & Wu, 2012). El tamaño y la forma de las nanopartículas son factores determinantes de la frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción del plasmón (Couvreur, 2016; Filipponi & Sutherland, 2012; Rao et al., 2007; Stalmashonak et al., 2013).

Especialmente en aplicaciones médicas, las formas de las nanopartículas permiten que estas puedan ser empleadas para el tratamiento de diversas enfermedades (Mikhailovna Egorova et al., 2016), dado que las nanopartículas esféricas de Au presentan un plasmón de resonancia en el rango de 500-600 nm, mientras que las no esféricas pueden tener uno o más plasmones entre 500-2000 nm (Tréguer-Delapierre et al., 2008), permitiendo la aplicación de nanopartículas anisotrópicas en sistemas biológicos, ya que la zona donde eficiencia de la transmisión de la luz a través del tejido como la Hemoglobina, desoxihemoglobina, HbO<sub>2</sub> y oxihemoglobina es baja y por ende el daño sobre los tejidos normales es minino, también conocida como ventana óptica, se encuentra entre 600-1300 nm (Lyons et al., 2013).

*Propiedades químicas:* Las nanopartículas metálicas o iónicas manifiestan propiedades químicas muy importantes. Su elevada reactividad química es consecuencia de su elevada superficie específica y del importante número de átomos en la superficie que originan una elevada energía de superficie de las nanopartículas (Pérez, Bax, & Escolano, 2005; Rao et al., 2007).

#### 2.3.3 Métodos de síntesis de nanopartículas.

Los métodos de síntesis de las nanopartículas varían según los requerimientos en su respectiva aplicación. La primera metodología de síntesis de nanopartículas controlada fue mostrada en 1992 por Heath y colaboradores (Heath, 1992). Actualmente, los métodos de síntesis se clasifican como "top-down" y "bottom-up" (J. Thomas, 2014). Los métodos top-down también conocidos como métodos de "arriba - abajo" consisten en convertir un macro material en partículas del orden de nanómetros, mientras que los métodos bottom-up o de "abajo-arriba" sintetiza las nanopartículas, ensamblando átomos y moléculas utilizando generalmente procedimientos químicos, hasta conseguir un conglomerado de moléculas del tamaño requerido (Crespi, Galstyan, & Lerman, 2008; Ferrari, 2012; Marongiu, 2010; Parak, Simmel, & Holleitner, 2010; J. Thomas, 2014; W.Siegel, Hu, & M.C.Roco, 1999).

#### Síntesis de nanopartículas de oro.

Existen diferentes técnicas de síntesis de nanopartículas de oro, por ejemplo, el método más popular para síntesis de nanopartículas fue el realizado por primera vez en 1951 por Turkevich, empleando agentes como citrato, aminoácidos, ácido ascórbico o luz UV y obtuvieron nanopartículas esféricas de aproximadamente de 20 nm (Turkevich, Stevenson, & Hillier, 1951). Mukherjee y colaboradores sintetizaron nanopartículas de oro por medio de una técnica extracelular con reducción de iones tetracloroauricos (AuCl<sub>4</sub>) utilizando el hongo Fusarium oxysporum (Mukherjee et al., 2002).

En la investigación de Schriffin y colaboradores en 2003 los autores emplearon el método de crecimiento de siembra con dodecanetiol para estabilizar las AuNPs esféricas (Waters, Mills, Johnson, & Schiffrin, 2003). Otro ejemplo, fue mostrado por Chili y Revaprasadu en 2008, quienes usaron la técnica de reducción empleando irradiación UV, PVP (poli vinil pirrolidona) como un ligando y HAuCl<sub>4</sub>, dependiendo del tiempo de irradiación se obtuvieron nanopartículas de oro hexagonal, decaedro, varilla, triangular y/o pentagonal (Chili & Revaprasadu, 2008).

Actualmente, se han diseñado algunas modificaciones como el uso de alcanotioles para estabilización de las nanopartícula de oro (Shah et al., 2014). Otros métodos de síntesis eficientes y de bajo costo han sido realizados por Britto Hurtado y colaboradores, quienes sintetizaron nanopartículas coloidales de oro de diferentes morfologías empleando ácido ascórbico y sacarosa para la reducción de ácido tetracloroaurico (HAuCl<sub>4</sub>) acuoso (Britto Hurtado et al., 2016) y por Alexander Pestov y colaboradores quienes realizaron una síntesis verde con soluciones de derivados de quitosano, metilquitosan y etilquitosan con HAuCl<sub>4</sub> para generar de manera eficiente nanopartículas de oro (Pestov, Nazirov, Privar, Modin, & Bratskaya, 2016).

Una de las metodologías *bottom-up (abajo-arriba)* más versátiles, para la síntesis de nanopartículas es el uso de micelas inversas como nanoreactores moleculares. Las micelas inversas son sistemas organizados auto-ensamblados que se obtienen cuando se disuelve una molécula de surfactante en un solvente orgánico de baja polaridad (Bayraktutan, Meral, & Onganer, 2014). En estas se pueden diferenciar claramente tres regiones: una región interna denominada *"laguna o corazón polar"*; la interfaz (grupos cabezas polares contra los iones del surfactante) y la fase orgánica externa. Uno de los surfactantes más difundidos y que forman micelas inversas es el bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) *figura 1.* Este sistema se destaca por ser no tóxico y por solubilizar en su corazón polar grandes cantidades de agua ( $W_0 = [Agua]/[Surfactante]$ ) (Calandra, Giordano, Longo, & Liveri, 2006; Herrera, Resto, Briano, & Rinaldi, 2005), sin condiciones extremas de temperatura ni presión, además, permite el control del tamaño y la forma de las partículas simplemente variando la composición y dinámica de la emulsión (Bagwe & Khilar, 2000).



*Figura 1*. Representación de las micelas inversas de AOT. A) Micela inversa constituida por AOT y agua. B) Estructura molecular del bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT). Adaptado de Tatarchuck (2011) y El Aferni (2017) (El Aferni, Guettari, & Tajouri, 2017; Tatarchuk et al., 2011).

Las micelas inversas se han empleado como nanoreactores en diferentes reacciones químicas y biológicas. En la síntesis de nanomateriales esta metodología se caracteriza por ser simple y reproducible, permite el control de la estructura, tamaño y forma de las partículas variando simplemente las condiciones del nanoreactor y /o de preparación como tipo y concentración del reductor, temperatura y velocidad de agitación. Además, las nanopartículas obtenidas a través de esta metodología pueden ser fácilmente transferidas a fase acuosa y ser funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos que facilitan su interacción con sistemas biológicos (Calandra et al., 2006; Herrera et al., 2005).

En este sentido, Herrera y colaboradores en 2005, utilizaron n-sulfito de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) como reductor de la solución de KAuCl<sub>4</sub>/AOT/isooctano para formar nanoparticulas coloidales de oro esféricas en un rango de 5 a 100 nm de diámetro (Herrera et al., 2005). Li y colaboradores en 2006, emplearon micelas inversas en tolueno con P4VP como el núcleo y el PS como la cáscara de pétalo y se mezclaron con una solución de HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O para producir nanopartículas de oro de tamaño menor a 10 nm y con dimensiones y morfología controlada (J. Li et al., 2006). Calandara y colaboradores en el 2006, emplearon el método de micelas inversas con el agente reductor (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> / tetrahidrofurano) para reducir HAuCl<sub>4</sub> / AOT / n-heptano o HAuCl<sub>4</sub> / lecitina / ciclohexano, dando como resultado final la formación de las nanopartículas de oro mono dispersas (Calandra et al., 2006). Otro ejemplo, es el estudio realizado por Spirin y colaboradores en 2008, quienes sintetizaron nanopartículas de oro de un tamaño aproximado de 5 nm empleando el sistema de Triton X 100 / agua / ciclohexano en presencia de sulfito de sodio junto con HAuCl<sub>4</sub> usando dodecanetiol como estabilizante de las nanopartículas (Spirin, Brichkin, & Razumov, 2008). Menezes y colaboradores, utilizaron micelas inversas tipo BCP (bloques de copolímero)

como nanoreactores para la síntesis de nanopartículas tipo aleación (AuAg) con un rango de 3 a 20 nm de diámetro y morfología variada (Menezes, Zielasek, Thiel, Hartwig, & Bäumer, 2013).

Los anteriores casos son métodos que emplean principalmente reactivos sintéticos, sin embargo, también existen métodos denominados verdes en los que se utilizan compuestos de origen natural para sintetizar nanopartículas de oro. (Kharissova, Dias, Kharisov, Olvera Pérez, & Jiménez Pérez, 2013; P. Singh, Kim, Zhang, & Yang, 2016). En este sentido, algunos ejemplos de sustratos para síntesis verde son el uso del extracto de las hojas de *Padina gymnospora*, una macro alga marina (M. Singh, Kalaivani, Manikandan, Sangeetha, & Kumaraguru, 2013), el extracto de flores de *Couroupita guianensis* (Geetha et al., 2013), extractos de semillas de *Abelmoschus esculentus* (Jayaseelan, Ramkumar, Rahuman, & Perumal, 2013) y extractos de cacao (Fazal et al., 2014), como reductores y estabilizantes del precursor HAuCl4. Del mismo modo, Chandran y colaboradores, sintetizaron nanopartículas de oro de formas principalmente triangulares empleando extracto de *Aloe vera* (Chandran, Chaudhary, Pasricha, Ahmad, & Sastry, 2006).

El extracto de *Aloe vera* está compuesto por azucares, además de minerales, proteínas y lípidos en menor proporción (Ahlawat & Khatkar, 2011). Entre los carbohidratos presentes en el extracto de *Aloe vera*, se encuentran los siguientes monosacáridos: manosa, glucosa, galactosa, galactosa A, fucosa, arabinosa y xilosa, donde la manosa es el azúcar más abundante seguido de la glucosa y galactosa (Ahmed & Hussain, 2013; P. Liu, Chen, & Shi, 2013; Tai-Nin Chow, Williamson, Yates, & Goux, 2005). También se ha identificado la presencia de L-ramanosa y aldopentosas en bajas concentraciones (Ahlawat & Khatkar, 2011; Hamman, 2008; Moghaddasi M & Kumar Verma, 2011; Raksha, 2014). Estos hidratos de carbono son los principales componentes de los polisacáridos, que a su vez son los principales componentes del parénquima del *Aloe vera*.

componentes totales de gel de *Aloe vera* son el manano y sus derivados como manano acetilado, glucomanano acetilado y el glucogalactomanano, además de bajas cantidades de galactano, galactogalacturano, arabinogalactano, galactoglucoarabinomanano, sustancia péptica, xilano, celulosa (Ahlawat & Khatkar, 2011; Hamman, 2008; P. Liu et al., 2013; Moghaddasi M & Kumar Verma, 2011; Raksha, 2014).

Las proteínas constituyen únicamente el 7% y se ha identificado principalmente lectina y algunas sustancias tipo lectinas, adicionalmente presentan una amplia gama de aminoácidos como alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina y valina. También se han identificado enzimas como amilasa, catalasa, lipasa, fosfoenolpiruvato, superóxido dismutasa y peroxidasa y minerales como cloro, sodio, calcio, potasio, hierro, cobre y zinc; vitaminas como A, B1, B2, B12, C, ácido fólico, colina y  $\beta$ -caroteno (Ahlawat & Khatkar, 2011; Ahmed & Hussain, 2013; Hamman, 2008; P. Liu et al., 2013; Moghaddasi M & Kumar Verma, 2011; Raksha, 2014).

# 2.3.4 Funcionalización de las nanopartículas y ácido fólico.

Para la aplicación de nanopartículas en ámbitos médicos, es importante la funcionalización, es decir, el enlazamiento covalente o no covalente de NPs con moléculas y/o biomoléculas que permiten estimar su dirección, ya que debido a que su tamaño estas partículas pueden internalizarse en una gran variedad de tejidos incluyendo los sanos (Sperling, 2008; Subbiah, Veerapandian, & Yun, 2010; Thanh & Green, 2010; Tiwari, Vig, Dennis, & Singh, 2011), por lo que la unión de biomoléculas con nanopartículas metálicas son de gran importancia por su buena

biocompatibilidad, selectividad y eficiencia en la internalización celular (Bhattacharya et al., 2007; Sperling, 2008; Z. Zhang et al., 2010) mediada por receptores.

Existen una gran variedad de ligados que son empleados en la funcionalización de nanopartículas, como por ejemplo el ácido fólico, cuya conjugación confiere a las NPs propiedades como estabilidad y mayor afinidad por células altamente proliferativas, ya que es poco absorbido en las células sanas, sin embargo, en las células cancerígenas y en especial las epiteliales, la internalización de este tipo de compuestos es mayor por la sobreexpresión de los receptores de folatos (G. Li, Li, Zhang, Zhai, & Wang, 2009; Subbiah et al., 2010; Thanh & Green, 2010).

# 2.3.5 Terapias empleando nanopartículas de oro

En esta área se resaltan dos terapias; las AuNPs direccionadas al núcleo de células cancerosas con el fin de originar un daño en el ADN y detener la citocinesis (Kang, Mackey, & El-sayed, 2010), y la terapia fototérmica mediante el uso de AuNPs que debido a sus propiedades optoelectrónicas en presencia de radiaciones electromagnéticas emiten calor (Kennedy et al., 2011). Esta propiedad denominada efecto fototérmico convierte a las nanopartículas en promisorios agentes terapéuticos en el tratamiento selectivo por hipertermia de células cancerosas (Nguyen, 2012; Oh, Yoon, & Park, 2013; Zhou et al., 2014).

La hipertermia celular, también llamada ablación fototérmica, es un tratamiento físico del cáncer que implica la muerte de células cancerosas por el aumento localizado de la temperatura. La hipertermia conduce a la muerte celular por apoptosis causada por el calentamiento de las células a una temperatura de 42-46°C o mayor. En este sentido, el desarrollo de un nanocompuesto terapéutico basado en AuNPs, que pueda ser dirigido al lugar específico y activado desde el

exterior por una fuente electromagnética apropiada (rayos láser IRC) sin afectar tejidos colindantes, ofrece incuestionables ventajas en el tratamiento del cáncer (Zhou et al., 2014).

Como lo demuestran Hirsch y colaboradores en 2003, empleando nanocapsulas de oro, inocularon la línea de cáncer de mama SK-BR-3 en ratones y al ser irradiados con un láser de longitud de onda específica, determinaron un aumento significativo en la temperatura de los ratones tratados con los nanocompuestos, causando daños tisulares irreversibles, evidenciados en la coagulación, encogimiento celular y pérdida de tinción nuclear, contrario a esto, los tejidos normales se mantuvieron casi intactos (Hirsch et al., 2003).

Así mismo, El-Sayed y colaboradores, evaluaron nanopartículas de oro conjugadas con el receptor del anticuerpo del factor de crecimiento anti-epitelial (EGFR), como agentes fototérmicos sobre dos líneas de carcinoma (HSC 313 y HOC 3 Clone 8) y una línea epitelial benigna (HaCaT). Utilizando un láser de iones de Argón, encontraron una mayor tasa de muerte de las líneas cancerígenas en comparación con las células normales del estudio (El-Sayed, Huang, & El-Sayed, 2006). Stern y colaboradores en 2007, evidenciaron la eficiencia de esta terapia implementando el tratamiento con nanocápsulas de oro en dos líneas de cáncer de próstata (PC-3 y C4-2), que luego de ser irradiadas con luz NIR, generaron una zona localizada de muerte celular (Stern et al., 2007).

Un estudio de gran importancia fue publicado por Day y colaboradores en 2011, los autores comprobaron la utilidad de la terapia fototérmica mediada por nanocápsulas de oro para contrarrestar el glioma humano maligno inoculado en ratones, empleando irradiación con una frecuencia de infrarrojo cercano establecieron que el 57% de los ratones en estudio sobrevivieron sin presencia del cáncer al culminar los 90 días de la investigación (Day et al., 2011). Liu y colaboradores en 2014, comprobaron al tratar células HeLa con nanopartículas de oro de formas esféricas conjugadas con el anticuerpo monoclonal anti-TROP2, y al ser irradiadas provocaron la

eliminación selectiva de células de cáncer de cérvix al ocasionar apoptosis y daño del ADN (T. Liu et al., 2014).

En la investigación de Khoshgard y colaboradores, sintetizaron nanopartículas esféricas alrededor de 50 nm y las conjugaron con ácido fólico, encontrando que las NPs con AF frente a rayos X disminuyen la tasa de células HeLa más que la línea únicamente expuesta a los rayos X (Khoshgard, Hashemi, Arbabi, Rasaee, & Soleimani, 2014). Prasanna y colaboradores, sintetizaron nanopartículas de oro esféricas de 30 nm que al unirse a un compuesto fluorescente se pudo corroborar que frente a la irradiación causan tienen un efecto citotóxico de casi el doble sobre la línea HeLa que las nanopartículas solas (Prasanna, Poorani, Kumar, Aruna, & Ganesan, 2014). Recientemente, en el estudio de Bertel y colaboradores, se emplearon nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico sobre la línea de HeLa, donde, nanopartículas regulares presentaron una disminución de viabilidad significativamente mayor que en presencia de irradiación (L. Bertel Garay, Méndez Sánchez, & Martínez Ortega, 2018).

El ácido fólico (AF) es comúnmente usado como ligando del receptor del folato, es un grupo altamente estable, de bajo costo, pobremente inmunizador, tiene tamaño molecular pequeño y con una afinidad muy alta por receptores folato (Devendiran et al., 2016; Z. Zhang et al., 2010). Estos receptores son característicos de las células epiteliales polarizadas y se encuentran anclados en la membrana plasmática, permitiendo el paso de ácido fólico y sus derivados, son importantes en la síntesis de nucleótidos y en la proliferación celular (Wibowo et al., 2013; Zwicke et al., 2012). La molécula de ácido fólico está constituida por tres partes una pteridina, ácido glutámico y acido para-aminobenzoico (Shane, 2008), tal como se ve en la *figura 2*.



6-metilpterina Ácido p- aminobenzoico Ácido glutámico Figura 2. Estructura molecular del ácido fólico en solución acuosa alcalina (pH=9).

# 2.4 Mecanismos de acción de la terapia fototérmica con nanopartículas de oro (AuNPs)

La terapia fototérmica con AuNPs puede activar dos vías de muerte celular: apoptosis o muerte programada y necrosis (Pattani, Shah, & Atalis, 2015). Una investigación relacionada con el efecto fototérmico y el mecanismo que promueve la muerte celular, fue realiza por Kirui y colaboradores en 2010, quienes emplearon nanopartículas hibridas de oro y óxido de hierro (HNPs) funcionalizadas con el antígeno A33 para generar un efecto fototérmico usando irradiación láser, sobre células de cáncer colorrectal (células SW1222 y HT29). Mediante la técnica de citometría de flujo los autores encontraron que con densidades de potencia muy bajas la muerte celular está relacionada con la apoptosis, mientras que la necrosis prevalece a mayores potencia del láser (100 W cm<sup>-2</sup>) (Kirui, Rey, & Batt, 2010).

Marta Pérez en 2016, sintetizó nanoprismas de oro de un tamaño de aproximadamente 150 nm de diámetro y una banda de plasmón de resonancia localizada en 1080 nm, estas nanopartículas se incubaron en células MEF (Fibroblastos embrionarios de ratón), en líneas murinas MC57G (fibrosarcoma), L929 (fibrosarcoma), B16 (Melanoma) y EL4 (Linfoma T) y en las células humanas A549 (carcinoma de pulmón), HeLa (carcinoma de cérvix), MiaPaca (carcinoma de páncreas) y K562 (leucemia mieloide crónica), las células se irradiaron con un láser de 1064 nm. Los autores comprobaron que al modificar la potencia del láser se varia el mecanismo de muerte,

un valor de 5 W/cm<sup>2</sup> promueve la apoptosis, pero cuando la intensidad fue de 30 W/cm<sup>2</sup> predominó la necrosis en las líneas celulares de estudio (Pérez Hernández, 2016).

Por otro lado, Pattani y colaboradores en 2015, demostraron un comportamiento diferente al antes mencionado, los autores desarrollaron nanotubos de oro de un tamaño aproximado de 47 nm que fueron incubados en células de tumor colorrectal humano (HCT116) y posteriormente irradiadas con un láser de 800 nm variando la potencia de irradiación (de 20 a 50 W) y el tiempo de incubación de las nanopartículas (desde 1,5 a 24 h). Los autores reportan que el cambio de la tasa de potencia no altera la presencia de cualquiera de los mecanismos de muerte celular, sin embargo, encontraron que a menor tiempo de exposición de los cultivos a la partículas nanométricas (1,5 h), predominan la necrosis sobre la apoptosis y de forma inversa ocurre en los tiempo de 6 h y 24 h (Pattani et al., 2015).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, claramente se puede apreciar que las nanopartículas de oro empleadas para el tratamiento de diferentes líneas cancerígenas, pueden estimular la muerte celular mediante dos modalidades: apoptosis y necrosis, las cuales se describen a continuación.

## 2.5 Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso mediado por una secuencia de proteínas las cuales se activan gracias a la aparición de una serie de señales de muerte tales como una lesión en el ADN, el incremento de niveles de oxidación en la célula y la carencia de señales de crecimiento como las hormonas. Durante la secuencia se puede apreciar varios cambios en la morfología celular como la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos

(Boticario Boticario & Cascales Angosto, 2011; Pazo Cid, Álvarez, Cebollero de Miguel, Agustín, & Martínez Lostao, 2013).

La apoptosis se suele asociar con el ciclo celular, especialmente a la finalización de etapa G1 para evitar que células mutadas o dañadas entren en la fase de síntesis de ADN y en la fase G2 para impedir la maduración celular y por tanto el inicio de la mitosis (Machado & Lie Concepción, 2012). También se ha relacionado a este concepto con el funcionamiento normal del cuerpo debido a que permite la eliminación de células viejas o dañadas (Navas Contino, Alfonso Arbolaez, & Guerra Rodríguez, 2009).

# 2.5.1 Mecanismo de activación de la apoptosis

La activación o inducción de apoptosis suele darse a través de dos vías: La intrínseca y la extrínseca, dependiendo de la procedencia del estímulo que genera la muerte celular programada. La vía intrínseca se genera como respuesta a varios factores producidos al interior de la célula (daños en el ADN o la activación de oncogenes) y es regulada por las proteínas proapoptóticas Bcl-2 al generar un poro en la membrana de la mitocondria, produciéndose la liberación de proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria; algunas de estas proteínas son: citocromo C, SMAC/DIABLO y el factor inductor de apoptosis (AIF). Posteriormente, el citocromo C en el citoplasma forma el apoptosoma al unirse al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1), produce la activación autocatalítica de la caspasa 9 y está activa a la caspasa 3 que desencadena las últimas etapas de la apoptosis (Machado & Lie Concepción, 2012; Rojas, Salmen, & Berrueta, 2009).

En la vía extrínseca intervienen la activación de receptores de la superficie celular, tales como el Fas que al unirse con su ligando especifico FasL, forman un complejo generando el reclutamiento de sustancias citosólicas como FADD, el cual finalmente permite la formación del complejo DISC (complejo de señales inductoras de muerte) que produce la activación de la caspasa 8 (iniciadora) que a su vez activa la caspasa 3 (efectora). Un aspecto a tener en cuenta, es que una ruta puede activar la otra vía de apoptosis, ya que la caspasa 8 (vía extrínseca) degrada la proteína BID provocando la activación de la vía intrínseca (Rojas et al., 2009).

#### 2.6 Necrosis.

La necrosis es un tipo de muerte celular no controlada, relacionada con lesiones debido a factores externos, en donde se dañan las funciones celulares y hay ruptura de la membrana plasmática permitiendo que los contenidos citoplásmicos (como factores pro-inflamatorios, moléculas de alarma, proteínas de choque térmico, histonas, y citoquinas) escapen hacia el espacio extracelular generando inflamación (Pattani et al., 2015).

La necrosis es también conocida como muerte patológica de las células, que por lo general no puede ser reparada por procesos de adaptación y resistencia; donde es producida por compuestos nocivos y por condiciones específicas como la isquemia, hipoxia o traumatismo, exposición a sustancias toxicas o la radiación ionizante (Lizarbe Iracheta, 2007).

Otra característica de este mecanismo de muerte celular, es la reacción violenta y degradadora que se produce en la célula, debido a la acción de enzimas de los tejidos lesionados y de proteínas que generan la desnaturalización y la digestión enzimática. Además, se produce la ruptura o desestabilización de la membrana que ocasiona finalmente la lisis celular, liberando todo el contenido necrótico al exterior, produciendo inflamación y daño en los tejidos aledaños (Krysko, Vanden, Herde, & Vandenabeele, 2008; Lizarbe Iracheta, 2007).

Para poder identificar los dos tipos de mecanismos de muertes celular, es importantes conocer las principales características y cambios morfológicos causados por cada uno de ellos, los cuales son descritos en la *tabla 1* (Dubin & Stoppani, 2000), ya que dependiendo del mecanismo de muerte puede variar el tiempo de tratamiento del paciente (Boticario Boticario & Cascales Angosto, 2011).

Parámetro	Apoptosis	Necrosis		
Morfología celular	Contraída	Expandida, formación de		
		microvesículas y liberación de		
		citoplasma al espacio intercelular		
Integridad de membrana	Sin modificaciones iniciales	Destrucción precoz		
plasmática				
Cromatina nuclear	Condensada; localizada en la	Desintegrada		
	vecindad de la membrana nuclear			
ADN nuclear	Daño precoz ("strand-breaks")	Daño tardío		
Fragmentación del ADN	Ordenada; fragmentos de 180-200	Desordenada; producida por		
	PB; producidos por endonucleasas	nucleasas lisosomales		
Tejidos pericelulares	Signos de fagocitosis solamente	Signos de inflamación extensos		
Mitocondrias	Sin modificaciones visibles	Hinchadas		
Membrana nuclear	Normal	Rota y deformada ("blebbing")		
Requerimiento energético	Necesario	Innecesario		
Síntesis de proteínas	Necesaria	Detenida		

Tabla 1. Diferencias entre la apoptosis y la necrosis.

Tabla basada de Dubin y Stoppani.(Dubin & Stoppani, 2000).

#### 3. Metodología

El desarrollo de esta investigación está dividido en dos partes: 1.) Síntesis y caracterización de las AuNPs anisotrópicas y 2) Evaluación de la actividad citotóxica de las AuNPs y su mecanismo de acción en la muerte celular.

# 3.1 Síntesis de AuNPs anisotrópicas

En este trabajo se emplearon dos metodologías diferentes para síntesis de nanopartículas anisotrópicas de oro. A continuación, se describen los métodos de síntesis.

# 3.1.1 Síntesis de AuNPs con micelas inversas (MINPs)

Se emplearon micelas inversas de Agua/AOT (1,4-bis-2-etilhexil sulfosuccinato de sodio) /isooctano como nanoreactores, en el medio confinado se llevará a cabo la síntesis de las nanopartículas (MINPs). Se mezclaron 4 mL de AOT/ isooctano (0.1M) y 160 $\mu$ L de HAuCl<sub>4</sub> x3H<sub>2</sub>O 0.01M en agua MilliQ con agitación constante. La solución resultante se dejó reaccionar en reposo durante 9 min hasta que la solución se tornó de una coloración morado-rojizo. Inmediatamente después, se adiciono 80  $\mu$ L de ácido fólico 1x10<sup>-3</sup>M. Cabe mencionar que esta es una nueva metodología que fue puesta a punto en el laboratorio CICAT, donde en este sistema el surfactante AOT bajo condiciones específicas, actúa como estabilizante y reductor al mismo tiempo.
#### 3.1.2 Síntesis de AuNPs en fase homogénea

Se empleó un método verde de síntesis de nanopartículas de oro empleado extracto de *Aloe vera* como medio homogéneo. Para ello se emplearon 30 g de cristales de *Aloe vera* previamente lavados en 100 mL de agua MilliQ, posteriormente se trituraron y se llevaron a ebullición (93°C) hasta reducir el volumen inicial a la mitad, se filtró con una malla de poro de aproximadamente 0.5 mm. El sobrenadante obtenido fue conservado a -20°C y empleado para la obtención de AVNPs a temperatura ambiente.

Para la síntesis de nanopartículas se emplearon 3 mL de extracto de *Aloe vera* y se agregaron 6 mL de una solución  $1 \times 10^{-3}$  M de HAuCl<sub>4</sub>x3H<sub>2</sub>O, esta solución se afora a 10 mL con agua MilliQ. La formación de la mezcla de nanopartículas anisotrópicas se dio durante un periodo de 48h. Esta metodología está basada en lo reportado en la literatura, donde, se sugiere la producción de nanopartículas anisotrópicas únicamente triangulares (Chandran et al., 2006).El extracto de Aloe para esta investigación se obtuvo de una planta perteneciente a la especie *Vera L*, según la clasificación taxonómica mostrada en la *Tabla 2* (Porter, 1967).

	Reino	Vegetal
	División	Embriophyta
AV.		Siphonogama
	Subdivisión	Angiospermae
	Clase	Monocotyledoneae
	Orden	Liliales
	Familia	Lilaceae
	Género	Aloe
	Especie	Vera L.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la planta de Aloe Vera.

Tabla basada en el libro Taxonomy of Flowering Plants de Porter (Porter, 1967).

Flor de la planta (Imagen tomada: Autor)

#### 3.1.3 Transferencia de fase.

Con el propósito de obtener un material estable en el tiempo y re-dispersable en el medio de cultivo celular EMEM, en el cual se llevaron a cabo los ensayos biológicos, fue necesario antes de la funcionalización de las MINPs y AVNPs un proceso de separación de fase. Para ello las soluciones coloidales obtenidas para cada método se centrifugaron a 10619 xg por 20 min, el producto solido obtenido (nanopartículas) fue lavado con una mezcla etanol y agua (20 µL de etanol en 1 mL de agua MilliQ) y se eliminó el sobrenadante por decantación después de una centrifugación bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

## 3.1.4 Funcionalización de las AuNPs

Considerando que el ácido fólico es una molécula "target" que puede aumentar la selectividad e internalización de los compuestos en las células HeLa, se realizó la funcionalización de los productos obtenidos después de la transferencia. Para ello se empleó 1mL de una solución 1x10<sup>-3</sup> M de ácido fólico a pH de 9 (ajustado con una solución de 0.01 M de NaOH), la solución de nanopartículas redispersadas se sónico por 10 min y posteriormente se centrifugo a 10619 xg por 20 min. El proceso de funcionalización se llevó a cabo mediante una reacción de intercambio iónico o sustitución del ligando inicial presente en las nanopartículas pre-sintetizadas (estabilizantes), causando un desplazamiento parcial del ligando protector de la superficie del nano material.

### 3.1.5 Caracterización de los nanocompuestos

Los productos obtenidos por cada una de las metodologías anteriormente mencionadas se caracterizaron fisicoquímicamente empleando las siguientes técnicas:

#### Espectroscopia de absorción (UV-Vis)

El análisis de los espectros de absorción de nanopartículas metálicas se enfoca en la banda de resonancia plasmónica. Las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo de 1 cm, se registraron utilizando un lector de microplacas Multiskan GO de Thermo Scientific con un soporte de cubeta con termostato.

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

Los diámetros aparentes (dapp) y el potencial z de la superficie de la solución acuosa se determinaron usando instrumento Zetasizer Nano ZS con dispersión dinámica de la luz de Malvern, con un láser de ion de argón que funcionaba a 488 nm. Las muestras se equilibraron luego en el instrumento DLS durante 10 min a 25°C antes de la adquisición de datos. Se sintetizaron múltiples muestras de cada metodología, y se realizaron tres mediciones de tamaño independientes para cada muestra individual en el ángulo de dispersión de 90°.

### Espectroscopia de emisión de fluorescencia en estado estacionario

Esta técnica permite confirmar la interacción entre el ligando funcionalizante y las nanopartículas, analizando los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos con un espectrofluorímetro PTI Perkin Elmer L-55, empleando un ancho de rendija de emisión de 10 nm y celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud de paso óptico. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente constante.

# Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

La frecuencia y el ensanchamiento de bandas en las regiones vibracionales de tensión de enlaces característicos, son indicativos del orden de la estructura tridimensional de las mono capas de ligandos presentes en las nanopartículas. Para ello, se utilizó una espectroscopía infrarroja de reflexión total atenuada (ATR) con transformada de Fourier (FTIR), donde las muestras fueron

secadas al aire. Los espectros se registraron usando un espectrómetro Nicolet iS50 de Themo Scientific S/N AuP1300181 y el software Omnic coadultando 200 espectros a una resolución de  $0.5 \text{ cm}^{-1}$ . Todos los experimentos se llevaron a cabo a  $25 \pm 0.5$  ° C. Los espectros fueron analizados y graficados utilizando el software OriginPro 8.

### Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

Este método permitió la visualización de las nanopartículas, confirmando el tamaño y la morfología de los nanocompuestos. Las muestras se colocaron en una rejilla de cobre Formvarcovered y se evaporaron lentamente al aire. Las micrografías se obtuvieron utilizando el microscopio electrónico de transmisión (TEM) FEI TECNAI G2 STWIN a 20-200 kV con una cámara Gatan ES100W. Las imágenes se analizaron y se midió el espaciado cristalino interplanar usando el software Gatan Digital Micrograph, los índices Miller (hkl) se asignaron usando el documento JCPDS-ICDD 04-0784.

# Respuesta térmica en solución

El monitoreo de los cambios en la temperatura o respuesta térmica de las nanopartículas en solución (medio celular) con la irradiación laser se evaluó empleando dos laser de diodos (Thorlabs) de 638 y 808 nm con tamaño de punto de 0.5 cm de diámetro, variando la potencia (200 y 600 mW). Para el monitoreo en solución, se prepararon 2 mL de nanopartículas de oro funcionalizadas y sin funcionalizar (400µM) en medio celular de cultivo Eagle Minimum Minimum Essential Medium (EMEM) suplementado con suero fetal bovino (8%) y se colocaron en el tubo vial de vidrio con dimensiones de 23 mm de ancho por 69 mm de alto. El láser se orientó transversalmente y la respuesta térmica se evaluó durante 10 min mediante una termocupla (marca Multi-thermometer) ubicada dentro de la solución mientras se irradiaba.

#### 3.2 Pruebas Biológicas

Con las nanopartículas obtenidas se les realizaron una serie de ensayos biológicos para conocer el efecto fototérmico de estas sobre la línea celular (HeLa). Para ello, se mantuvieron cultivos celulares secundarios y posteriormente se efectuaron las pruebas de determinación de la viabilidad celular y el mecanismo de acción.

# 3.2.1 Cultivo Celular

Considerando que unos de los objetivos de este proyecto es generar nanocompuestos selectivos para células cancerosas que sobre expresan receptores folato, los ensayos biológicos se realizaron empleando células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa).

# Proceso de mantenimiento de las células HeLa.

La línea celular se cultivó en medio EMEM con 8% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con atmósfera de  $CO_2$  al 5% y una temperatura constante de 37° C. Los repiques se realizaron utilizando Tripsina-EDTA para soltar la monocapa celular del recipiente de cultivo. Para el almacenamiento (1 millón de células por mL) se suspendieron en medio de cultivo 50%, SFB 40% y DMSO 10% en (v /v) y se mantuvieron en la nevera durante 1h, luego en hielo seco por 2 h y posteriormente se depositaron en nitrógeno líquido (-196 ° C). Para iniciar el cultivo, se descongelaron las células a 37 °C y se depositaron en pequeñas botellas (50 mL) con medio de cultivo permitiendo la adhesión de las células a la superficie (2 a 3 h) y se reemplazó el medio, para eliminar el DMSO presente (A. M. Da Silva et al., 2014; Gil-Loyzaga, 2011; Méndez-Sánchez, 2009; M. R. Rodríguez, 2008; Unchern, 1999).

### 3.2.2 Determinación de Viabilidad y Proliferación Celular

En los ensayos biológicos se evaluaron los siguientes parámetros:

- 1. Concentración de las nanopartículas (5, 10, 25, 50 y 80 µM).
- 2. Longitud de onda del láser (638 o 808 nm).
- **3.** Distancia del láser al medio celular (2 y 5 cm).
- **4.** tiempo de tratamiento (2 y 4 h).

Para describir el efecto citotóxico y antiproliferativo de las nanopartículas en estudio sobre la línea celular HeLa, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos.

## Prueba con cristal violeta o metil violeta.

Con este ensayo se determinó el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad y proliferación celular, con base en la intensidad de la coloración de las muestras analizadas por medio de su absorción a 550 nm, dado que esta representa la cantidad las células viables, es decir, las células capaces de incorporar el colorante en sus membranas.

Para este ensayo, se empleó una placa de 96 pozos en donde se cultivaron  $1 \times 10^4$  células/pozo bajo atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C y durante 24 h para total adhesión (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Después, las células fueron tratadas con los nanocompuestos de estudio. Pasado el tiempo de tratamiento con las AuNPs, se separaron las células en dos grupos: en el primero se realizó la tinción inmediatamente (efecto de las AuNPs sobre la viabilidad) y en el segundo las células fueron irradiadas durante 5 min bajo las condiciones mencionadas y seguido de la tinción (efecto de la hipertermia sobre las células). Posteriormente, se retiró el medio de cada pozo y las células fueron lavadas con PBS (solución tampón) y fijadas a la superficie de los pozos con metanol durante diez min, luego se agregó 50  $\mu$ L de cristal violeta 0.02% en etanol al 2% a cada pozo durante cinco min. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente con PBS (3 veces) y a cada pozo se le incorporó 200  $\mu$ L de citrato de sodio 0.05M en una solución de etanol al 50%. La lectura de absorbancia se tomó a 550 nm (Feoktistova et al., 2016)

### Análisis de morfológico con tinción de Wright-Giemsa.

Para evaluar el efecto de las nanopartículas y definir los cambios morfológicos celulares, se cultivaron  $1 \times 10^5$  células / pozo en una placa de 12 pozos, procurando que la adhesión de las células se efectué sobre láminas de vidrio en el interior de cada pozo, posteriormente, las células son tratadas con las nanopartículas con las condiciones más optimas, según los resultados obtenidos en la prueba de cristal violeta, bajo atmosfera de CO2 al 5% y temperatura de 37°C. Después del tratamiento, las células fueron lavadas con una solución buffer (PBS), las láminas fueron retiradas de cada uno de los pozos y se colocaron en una superficie plana plástica, se agregó 300 µL del colorante y se dejó reaccionar durante 1 min, seguidamente, se retiró 100 µL del tinte y se adicionó un volumen de 300 µL buffer PBS. La solución de PBS-tinte sobre la lámina, fue agitada suavemente durante 3 min hasta que se formó el brillo metálico (característico de la técnica de tinción) y fijada a las células en las láminas por 5 min. Las láminas se lavaron con agua MilliQ y se secaron al aire. Las células teñidas fueron examinadas con un microscopio óptico equipado con una cámara Leica IC50W.

# 3.2.3 Determinación del mecanismo de acción.

Para determinar el tipo de mecanismo de muerte activado por el efecto fototérmico de las nanopartículas de oro en la línea celular se realizaron los siguientes ensayos:

### Fragmentación de ADN

Las nanopartículas con mejores efectos fototérmicos fueron usadas para evaluar la posible inducción de apoptosis a través de la determinación de la fragmentación de ADN. Para esta evaluación se incubaron por 24h,  $1 \times 10^6$  de células en 2 mL de medio de cultivo en cajas de Petri de 6 cm, bajo las condiciones descritas anteriormente. Una vez concluido el tratamiento, se extrajo el ADN con el kit de extracción UltraClean® Tissue & Cells. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1.0% en buffer TBE 1X a 90 V/cm y 80 mA por 45 min. El gel se tiñó con SYBR Green 3µL y se observó la imagen con el equipo fotodocumentador ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad (C. De Castro, Riveros de Murcia, Jaimes, & Téllez Alfonso, 2007; Weber, DeForce, & Apprill, 2017).

### Liberación de citocromo C

Para este ensayo se plaquearon  $1 \times 10^6$  células/ caja de Petri y se incubaron durante 24 h, luego se trataron con las nanopartículas seleccionadas y con las condiciones óptimas observadas. Después se soltaron las células por medio de raspado de la superficie de cultivo, posterior a esto se centrifugaron las células suspendidas y se lavaron con PBS manteniendo como volumen final 1mL. Se dividió el precipitado en dos porciones, una alícuota de 30 µL fue separada para cuantificación de proteínas (Bradford, 1976).

Después de extraer la alícuota anterior, la solución restante del precipitado obtenido, fue centrifugado a 4500 xg durante 15 min. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en 1mL de la solución de TRIS-HCl 85.55 mM a un pH de 7.2, EGTA 7.89 mM y sacarosa 0.146 mM junto con Triton 100X 10  $\mu$ mol/L y fue llevado a incubación por 30 min a 4 °C. Luego de la incubación la suspensión celular fue centrifugada a 10000 xg por un período de 30 min, el sobrenadante fue filtrado con una membrana de poliestireno con diámetro de poro de 200 nm y se determinó su absorbancia a 414 nm. Finalmente se calculó la concentración de citocromo C liberado usando el coeficiencite de extinsión molar  $\varepsilon$  = 100 mmol .L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Appaix et al., 2000).

### Citometría de flujo.

Para analizar las vías de la muerte celular, se cultivaron 2x10<sup>5</sup> células/pozo en placas de 12 pozos (volumen final: 0.5 mL), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h, se retiró el medio de cultivo y realizó el tratamiento bajo las mejores condiciones establecidas. Después del tratamiento, se retiró el medio de los pozos y se lavaron las células con una solución buffer fosfato (PBS) 1 mL/pozo a 37 °C. Las células fueron soltadas por raspado de la superficie de cultivo, se resuspenden en medio de cultivo y se centrifugaron a 1500 xg por 5 min, posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS (37 °C) y se resuspendieron suavemente las células con ayuda de micro pipeta.

Nuevamente, se centrifugó la solución mientras simultáneamente se prepararon la solución de Sytox Green 1  $\mu$ M. Se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución Sytox sobre el pellet celular de cada tubo eppendorf, a excepción del experimento de control, protegiendo los tubos de la luz. Al experimento de control, que no lleva solución de Sytox, se le adicionó 100  $\mu$ L de solución 5X annexin-binding buffer (37 °C). Los ensayos se incubaron durante 15 min a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, protegiendo de la luz. Después de la incubación, se agregó a cada muestra 400  $\mu$ L de solución 5X annexin-binding buffer, se mezcló los tubos suavemente y se pasaron a tubos de citometría fríos (etiquetados para cada tratamiento y réplica), Se procedió a realizar la medición de cada muestra en el citómetro de flujo midiendo la fluorescencia de emisión a 530 nm y 575 nm.

### 3.2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media  $\pm$  DS. El análisis estadístico de los datos se realizó como un análisis de varianza, seguido por el test de Tukey para la comparación de promedios. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando p<0.05.

#### 4. Resultados y discusión

# 4.1 Síntesis de nanopartículas de oro anisotrópicas

Esta investigación se centra en la evaluación del efecto del método de preparación de las NP: uno químico y otro biológico "síntesis *verde*", obteniéndose una mezcla de formas anisotrópicas. Ambas metodologías de síntesis pertenecen a la clasificación "Bottom-Up" (J. Thomas, 2014).

### 4.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro por medio de micelas inversas (MINPs)

Durante la síntesis de las (MINPs) empleando AOT /Isooctano se encontró que las nanopartículas obtenidas tienen alta estabilidad, ya que la capa de tensoactivo actúa como estabilizador estérico para inhibir la agregación de nanopartículas formadas (Zielinska-jurek, Nadolna, Zieli, & Reszczy, 2012). En la *figura 3* se muestran la variación de los espectros de absorción de las nanopartículas durante el tiempo de formación de las NP y el espectro de absorción final.



*Figura 3.* Espectro de UV-vis de las nanopartículas MINPs. A). Representación del cambio de absorción UV-vis con el tiempo durante la formación de NPs con micelas inversas de AOT/Isooctano W=22, [AOT]= 0.1M, [HauCl<sub>4</sub>]=0.01M a temperatura ambiente B). Espectro UV-vis de las nanopartículas MINPs después de la transferencia de fase.

El sistema micelar AOT/Isooctano reduce efectivamente el HAuCl<sub>4</sub> formando nanopartículas aparentemente anisotrópicas en base a la presencia de dos bandas plasmónicas de absorción, ver la *figura 3B*. En este caso se observa que el nanoreactor modula la formación de diferentes estructuras desde el inicio de la reacción, ya que inicialmente solo se observa una banda, que aparece a partir del segundo min de reacción alrededor de 536 nm y al transcurrir el tiempo aproximadamente 5 min aparece una segunda banda a 824 nm, ambas bandas permanecen en el tiempo hasta el final de la reacción. Después de la trasferencia de fase se observa que el plasmón de resonancia característico cambia en relación al obtenido en medio micelar, en este sentido cabe resaltar que el hecho de cambiar las moléculas en la superficie de las AuNPs y el medio circúndate modifica la resonancia de los electrones en la superficie de las nanopartículas, traducido en un espectro más limpio y definido en medio acuoso.

El proceso de síntesis acá empleado no es un proceso convencional, ya que no emplea un reductor tradicional para la síntesis de NPs, en este caso el surfactante AOT actúa como agente reductor mediado por el confinamiento y los electrones libres de la cabeza polar en la interfaz donde ocurre la reducción (Bagwe & Khilar, 2000; Tojo, De Dios, & Barroso, 2011; M. Wu, Chen, & Huang, 2001). Así mismo, después de la reducción la capa de surfactante actúa como estabilizador estérico para inhibir la agregación de nanopartículas formadas, gracias a las interacciones electrostáticas fuertes con el grupo polar de carga negativa del AOT (Zielinska-jurek et al., 2012).

Este proceso de reducción puede deberse a diferentes factores, como por ejemplo la acción del ion sulfosuccinato adjunto a la cabeza polar del surfactante AOT, que puede favorecer el proceso dentro de las gotas de agua. Esta reducción se puede visualizar en la siguiente reacción química (Herrera et al., 2005):

$$2Au^{3+} + 3SO_3^{2-} + 3H_2O \rightarrow 2Au^0 + 3SO_4^{-2}$$

Se ha reportado, que la concentración de iones Cl<sup>-</sup> juega un papel importante en la reducción de Au<sup>3+</sup> y puede describirse como un intercambio de ligandos, donde la cantidad Cl<sup>-</sup> afecta la formación de las distintas especies presentes del oro y cambia el valor del pH (Kettemann et al., 2016). En general, el intercambio de ligandos de los complejos Au<sup>3+</sup> es un proceso bastante lento que transcurre de minutos a horas a temperatura ambiente. El equilibrio de los iones Au<sup>3+</sup> se muestra a continuación (Kettemann et al., 2016). Además, la relación de aspecto (definida como la relación del eje largo al eje corto de nanocristales) es controlada por la cantidad de iones cloruro en la micro fase (Pileni, 2003).

$$[AuCl_{x}]^{-} + xH_{2}O \rightleftharpoons [AuCl_{4-x}(OH)_{x}]^{-} + xH^{+} + xCl^{-}$$
$$[AuCl_{4}]^{-} \rightleftharpoons [AuCl_{3}(OH)]^{-} \rightleftharpoons [AuCl_{2}(OH)_{2}]^{-} \rightleftharpoons [AuCl(OH)_{3}]^{-} \rightleftharpoons [Au(OH)_{4}]$$

En esta investigación, se emplea el ácido fólico, al igual que otros ácidos, como el ácido ascórbico, que permiten estabilizar la reacción (Malassis et al., 2016). El ácido fólico es utilizado en una baja concentración y a pH= 9, con el fin de evitar el progresivo efecto de coalescencia entre nanopartículas a través del tiempo, debido al constante intercambio de material entre micelas.

Para corroborar la morfología de las nanopartículas y su tamaño se empleó microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM). Los resultados se muestran en la *figura* 

4.



*Figura 4.* Morfología y tamaño de las MINPs. A). Distribución del tamaño por número de MINPs B). Histograma morfológico de MINPs. C). Micrografía HR-TEM de MINPs. D). Patrones de difracción de MINPs. \*N=SFD = sin forma definida.

Se puede observar la polidispersidad de tamaños y formas en la *figura 4*, las MINPs presentan una mezcla de diferentes formas poligonales como hexágonos, heptágonos, triángulos, rodillos y esferas que varían de tamaño (*figura 4B*). El tamaño promedio se muestra en el histograma *figura 4A*.

Cabe mencionar que la anisotropía en este sistema puede estar asociada a la adsorción selectiva de iones o moléculas sobre las capas de nano cristales que puede afectar su crecimiento en ciertas direcciones (Sanchez-dominguez et al., 2012). Además, cuando la tasa de reducción es baja, solo una parte de los iones se reducen antes de la formación de núcleos y la probabilidad de la colisión

efectiva entre un átomo y un núcleo disminuye, por lo que, el tamaño de las partículas resultantes se hace menos monodisperso (M. Wu et al., 2001).

En cuanto a los patrones de difracción obtenidos en las imágenes HR-TEM, ver *figura 4D*, presentan franjas de enrejado que están asociadas al crecimiento de las nanopartículas de oro que se produce principalmente en los planos (111) y (200) (Sen, Maity, & Islam, 2013). Adicionalmente, los patrones (111), (200), (220) y (222), corresponden a las reflexiones de Bragg de una estructura cúbica centrada en la cara (fcc), según los datos de espaciamiento cristalino interplanar estándar del oro metálico (JCPDS PDF 04-0784, ver *Apéndice A*) (Das, Roy, Mondal, Bera, & Mukherjee, 2013; Rajeshkumar et al., 2013). La presencia de anillos circulares que corresponden a los planos anteriores, indican la naturaleza altamente cristalina de las MINPs (Das et al., 2013; Rajeshkumar et al., 2013; Sujitha & Kannan, 2013).

# 4.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro usando extracto de Aloe vera (AVNPs)

La segunda síntesis se empleó una metodología *verde*, usando extracto de *Aloe vera*. Basada en la metodología propuesta por Chandran et al. (2006), en la cual la preparación del extracto es partir de los cristales previamente lavados de la planta y usados para la posterior obtención de nanopartículas de oro (Chandran et al., 2006).

Tal como se ha establecido en otras investigaciones, el cambio de las condiciones de preparación afecta el producto de síntesis (Chandran et al., 2006; Logaranjan, Raiza, Gopinath, Chen, & Pandian, 2016; Muralikrishna, Pattanayak, & Nayak, 2014; Tippayawat, Phromviyo, Boueroy, & Chompoosor, 2016). Motivo por el cual previamente se establecieron las condiciones de trabajo que permitieran la obtención del producto deseado: por ejemplo concentraciones de los cristales, la temperatura empleada para llegar al punto de ebullición de la solución, el tiempo de

exposición de gel a la temperatura, la cantidad de volumen reducido del extracto y el filtrado de gel obtenido como se muestra en el *apéndice B* (Chandran et al., 2006). En la *figura 5* se muestran los espectros de *UV-Vis* de las nanopartículas obtenidas por la metodología verde con el extracto de Aloe Vera (AVNPs).



*Figura 5.* Espectro de *UV-Vis* de las nanopartículas AVNPs. A). Representación de la evolución de la absorción *UV-Vis* en función del tiempo durante la síntesis de NPs con el extracto de *Aloe vera*,  $[HAuCl_4]=1x10^{-3}M$  a temperatura ambiente. B). Espectro de *UV-Vis* de las nanopartículas AVNPs después de la transferencia de fase.

En cuanto a las AVNPs, el espectro de absorción aparentemente representa la presencia de dos plasmones de absorción, ver *figura 5*. Durante la síntesis se observa la aparición de una banda inicialmente localizada a 540nm y presenta un corrimiento batocrómico en el tiempo, posicionándose en 568 nm, con un aumento de 10 veces la absorción. A partir de 12 h de reacción se desarrolla un hombro con una absorción alrededor de 700 nm.

Una vez sintetizadas las AVNPs y purificadas se analizó si en ellas se observa la presencia de algunos de los componentes del extracto de sábila para ello, se realizaron tres pruebas: identificación de proteínas mediante el método de Bradford usando una solución acuosa de 400 µM de AVNPs (Bradford, 1976), identificación de carbohidratos siguiendo el método de Dubois

bajo la misma concentración de nanopartículas (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956), y cuantificación de la concentración de ADN en las muestras usando un  $\mu$ Drop<sup>TM</sup> Plate de Thermo Scientific tomando la absorbancia a 260 nm. Se identificó la presencia de carbohidratos, proteínas y ADN en las muestras de AVNPs después de su transferencia desde el extracto a medio acuoso, en la *tabla 3* se presentan los resultados.

Tabla 3. Presencia de carbohidratos, proteínas y ADN en AVNPs en agua.

Muestra	Concentración de	Concentración de	Concentración de
	proteína (µg / mL)	carbohidratos (µg / mL)	ADN (µg/mL)
AVNPs	$17 \pm 1.3$	$19 \pm 1.7$	$14 \pm 4.6$

Para la identificación, se usó el método de Bradford y Dubois y el uso del µDrop<sup>™</sup> Plate con muestras que se habían lavado con la solución de agua y etanol.

En este sistema la formación de las NPs se atribuye a la presencia de las diferentes biomoléculas y en especial aquellas de cadenas largas como las proteínas y polisacáridos, que tienen un papel importante en la biorreducción de iones de Au (III) acuosos, dirigiendo la formación de nanopartículas anisotrópicas (Kumar & Yadav, 2009), y además pueden actuar como agentes estabilizantes y de nucleación (Sen et al., 2013). Además, la relación entre el extracto y la solución de oro permite un control sobre el tamaño de las nanopartículas (Kumar & Yadav, 2009; Muralikrishna et al., 2014).

La morfología y el tamaño de las AVNPs pueden deberse a la presencia de otros agentes reductores, como la glucosa y la galactosa, donde gracias al carboxilo libre son considerados azúcares reductores, igualmente es importante tener en cuenta que entre el 34-80% de los azúcares solubles son constituidos por el tipo reductor (Ahmed & Hussain, 2013). Además de la presencia

de enzimas oxidasas que no solo son esenciales para el mantenimiento de la planta sino también actúan como estabilizantes, reductores y promotores de la formación de los núcleos metálicos (Menon, S., & S., 2017; Raksha, 2014).

La presencia de ADN en las nanopartículas puede ser una prueba de que este ácido juega un papel durante la formación de AVNPs, ya que se ha visto que en colaboración de otros componentes del extracto, el ácido desoxirribonucleico se degrada y hay una reducción de iones metálicos junto con la generación de especies reactivas de oxígeno, tales como anión superóxido y radicales hidroxilo de una manera dependiente de la concentración de los precursores (Raksha, 2014).

En general, los mecanismos de biosorción se basan en las interacciones físico-químicas entre los iones  $Au^{3+}$  y los grupos funcionales presentes en la superficie del extracto, como grupos carboxilato, hidroxilo, amina y fosforilo presentes en los componentes del gel. En anteriores investigaciones se ha propuesto una posible reacción de reducción, indicando que la reducción de oro está acompañada por la oxidación de grupos hidroxilo a carbonilo presentes tal como se muestra a continuación (L. Castro, Blázquez, González, Muñoz, & Ballester, 2010):

AuCl<sub>4</sub> +3R–OH Au<sup>0</sup> +3R O + 
$$3H^+$$
 +4Cl

Otros grupos presentes en el extracto como los aldehídos, aportados por azúcares como la glucosa también se ha visto que son capaces de reducir el Au<sup>3+</sup> a Au<sup>0</sup>. Este resultado puede darse por la participación predominante del grupo carbonilo en la reducción de iones Au<sup>3+</sup>. A continuación, se muestra en la *figura 6*, un ejemplo de la formación de la nanopartículas con el extracto (Foo, Periasamy, Kiew, Kumar, & Malek, 2017).



*Figura 6.* El mecanismo propuesto para la formación de AuNPs sintetizados usando el extracto de *Aloe vera.* Imagen modificada (Foo et al., 2017).

También el (HR-TEM) de AVNPs mostró una mezcla de diferentes formas poligonales similar a las MINPs, la morfología y tamaño para AVNPs se muestran en los histogramas de la *figura 7*.



*Figura* 7. Morfología y tamaño de las AVNPs. A). Distribución del tamaño por número de AVNPs B). Histograma morfológico de AVNPs. C). Micrografía HR-TEM de AVNPs. D). Patrones de difracción de AVNPs. \*N=SFD = sin forma definida.

En la *figura* 7, se puede ver que el rango de variación de tamaños de las nanopartículas es menor para las AVNPs que para MINPS. Adicionalmente, la morfología predominante para ambas nanopartículas es la hexagonal, sin embargo, en las AVNPs la proporción de nanopartículas sin formas definidas es menor que en las MINPs. Esto puede deberse a que el largo periodo de tiempo de la síntesis permite el crecimiento de los núcleos cuando el extracto y la solución de oro se mantienen en contacto (L. Castro et al., 2010). A pesar de que no se dio la formación de triángulos como lo postula Chandran et al. (2006) en su investigación (Chandran et al., 2006), en otras experiencias se ha visto que una metodología verde puede generar mezclas morfológicas con predominancia de triángulos, pentágonos y hexágonos (Krpetić, Scarì, Caneva, Speranza, & Porta, 2009; Muralikrishna et al., 2014).

Con relación a los patrones de difracción de AVNPs de la *figura 7D*, también se presentan enrejados asociados al crecimiento de las nanopartículas en los mismos planos que en MINPs. Adicionalmente, los patrones (111), (200) y (220) también hace referencia a una estructura (fcc). La presencia de un anillo circular está asociada a los ligeros cambios de tamaños y morfología que las AVNPs tienen con respecto a las MINPs, pero estas también corresponden a la naturaleza altamente cristalina del oro (Das et al., 2013; Rajeshkumar et al., 2013; Sen et al., 2013; Sujitha & Kannan, 2013).

#### 4.2 Funcionalización de nanopartículas de oro anisotrópicas con ácido fólico AuNPs@AF.

Teniendo en cuenta que la funcionalización de las nanopartículas se realizó con una solución acuosa de ácido fólico (AF) (a pH= 9, tanto para MINPs y AVNPs), en la *figura 8* se presentan los espectros de absorción *UV-Vis* de los componentes independientes (ácido fólico y nanopartículas) y de las nanopartículas funcionalizadas.



*Figura 8.* Espectro de UV-Vis de las nanopartículas con y sin funcionalización. A). Espectro de *UV-Vis* de MINPs y MINPs@AF. B). Espectro de *UV-Vis* de AVNPs y AVNPs@AF. [Au]=  $400\mu$ M, [AF] = $1x10^{-3}$ M a pH =9 a temperatura ambiente.

En la *figura 8*, se observa un cambio en el espectro de absorción del ácido fólico libre en su forma alcalina (Thomas et al., 2002), con respecto al AF unido a la NPs. Se ve claramente como el doblete a 250 y 300 nm se convierte en una única banda a 280 nm, el cual es característico en la forma acida del ligando. Así mismo, se puede apreciar un ligero desplazamiento en el plasmón característico de las MINPs y AVNPs, además de una disminución en la absorbancia en comparación con el respectivo espectro de la nanopartículas sin funcionalizar. Estos resultados sugieren una posible interacción entre el ácido fólico y la superficie de las nanopartículas de oro (Rathinaraj, Lee, Park, & Kang, 2015).

El cambio del potencial Z es otro indicio de la interacción del ácido fólico con la superficie de las nanopartículas (Wang et al., 2014), además permite ver que tan estables son las nanopartículas en una suspensión y la carga en la superficie (Sandoval Yoval, Montellano Palacios, Piña Soberanis, & Sánchez Guzmán, 2000). Los cambios del potencial Z de las nanopartículas MINPs y AVNPs son presentados en la *tabla 4*.

Muestra	Índice de polidispersidad (IPd)	Potencial Zeta (mV)
MINPs	$0.566 \pm 0.0467$	$-43.6 \pm 2.58$
MINPs@AF	$0.612 \pm 0.0516$	-39.1 ± 7.19
AVNPs	$0.351 \pm 0.0091$	$-22.2 \pm 2.82$
AVNPs@AF	$0.354 \pm 0.0828$	-37.8 ± 3.32

 Tabla 4. Resultados del potencial Zeta obtenido por DLS de las AuNPs.

Tal como se muestra en la *tabla 4* para las MINPs la estabilidad no se ve afectada por la funcionalización, quizás la disminución del potencial Zeta está relacionada con la sustitución de las moléculas de AOT después de los lavados, por las moléculas de ácido fólico, ya que se ha reportado que las nanopartículas de oro en presencia de surfactantes presentan mejor estabilidad con un aumento en el potencial Zeta (Bac, Kim, & Kim, 2011).

Por otro lado, para las AVNPs la funcionalización sí muestra un aumento en la estabilización de las nanopartículas, ya que se considera que una partícula es estable en una suspensión cuando esta posee un potencial Zeta por fuera del rango entre -30mV a +30mV (Bac et al., 2011; Lata, Jaiswal, Naik, & Sharma, 2015). Este aumento en el potencial Zeta de las AVNPs@AF, puede atribuirse a que después de los lavados disminuye presencia de carbohidrato, proteínas, pequeñas cantidades de ADN entre otros compuestos provenientes del extracto de *Aloe vera*, ya que la presencia de diversas especies catiónicas y aniónicas, pueden generar una competencia que afecta la carga de la nanopartícula y por ende su estabilidad, principalmente los de tipo divalentes (Salgin, Salgin, & Bahadir, 2012). Por ello, el cambio de potencia Zeta por la funcionalización con ácido fólico, puede deberse probablemente a que la interacción con esta molécula permite que aumente la presencia de iones OH- y HCOO- que afectan positivamente el potencial.

Con el propósito de corroborar la interacción entre el ácido fólico y las nanopartículas se realizó un análisis de espectroscopia de fluorescencia, se utilizó como longitud de onda de excitación 364 nm. Los resultados son presentados en la *figura 9*.



*Figura 9.* Espectros de fluorescencia de las nanopartículas de oro con  $\lambda$  ext =364nm solubilizadas en medio acuoso. [Au]= 400µM, [AF] =5x10<sup>-5</sup>M a pH =9, a temperatura ambiente. A). AuNPs sintetizadas en micelas inversas de AOT/Isooctano B). AuNPs sintetizadas empleando extracto de *Aloe vera*.

En la *figura 9*, se puede ver un cambio de la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas solas en comparación con las funcionalizadas, sugiriendo que hay una interacción entre el ligando (ácido fólico) y las partículas metálicas. Las MINPs presentan su máxima intensidad de fluorescencia a una longitud de excitación de 364nm (*figura 10A*), mientras que la AVNPs no poseen fluorescencia en un rango de 274-374 nm (*figura 10B*), lo que implica que únicamente en las MINPs se genera la excitación coherente del plasmón superficial, así como los electrones tipo d bajo una  $\lambda$  ext =364 nm (Abdelhalim & Mady, 2011). La fotoluminiscencia de nanopartículas de tamaños entre 20 y 35 nm es un efecto que se ha visto previamente en otras investigaciones (Abdelhalim & Mady, 2011; J. Chen, Jin, Fahruddin, & Zhao, 2013).



*Figura 10.* Barrido de fluorescencia de nanopartículas de oro. A) Espectro de fluorescencia de AVNP a diferentes longitudes de onda de excitación. B). Espectro de fluorescencia de MINP a diferentes longitudes de onda de excitación.

La energía de fluorescencia proporcionada por las MINPs es transmitida al compuesto formado entre el ácido fólico y la nanopartículas, dado que los electrones excitados pueden dirigirse al LUMO del complejo directamente, lo que implica una interacción más fuerte y una disminución de la fluorescencia (quenching) (X. Li & Chen, 2016). Caso contrario sucede con las AVNPs, quienes no tienen una excitación que favorezca un aumento energético en el complejo y el área efectiva de la superficie de contacto es pequeña, debido la presencia de biomoléculas en la superficie metálica, por consiguiente, se produce un aumento en la fluorescencia (J. Chen et al., 2013; X. Li & Chen, 2016). Además de los indicios que se pudieron ver con las técnicas de espectroscopia de absorción (*UV-Vis*), DLS y espectroscopia de fluorescencia, también se analiza la interacción del ácido fólico con las AuNPs empleando espectroscopia FT-IR. Los resultados obtenidos se presentan en la *figura 11 y 12*.



*Figura 11.* Espectros (FT-IR) de MINPs. A). Ácido fólico (AF). B). Nanopartículas de oro sintetizadas en micelas inversas (MINPs). C). MINPs funcionalizadas con ácido fólico (MINPs @ AF).



*Figura 12.* Espectros (FT-IR) de AVNPs. A). Ácido fólico (AF). B). Nanopartículas de oro sintetizadas con el extracto de *Aloe vera* (AVNPs). C). AVNPs funcionalizadas con ácido fólico (AVNPs @ AF).

La *figura 11* muestra varios cambios de las bandas de absorción que entre 3400 y 3600 cm<sup>-1</sup> atribuidos a enlaces de estiramiento O-H y N-H pertenecientes a las moléculas de ácido fólico y algunos residuos del AOT (Elia et al., 2014; Hammud, Ahmed, Latif, Neama, & Rahman, 2010; Jeevanandam, Chan, & Danquah, 2017).

La presencia de trazas de surfactante en las MINPs sin y con funcionalización se corrobora gracias a las bandas de alta intensidad en un rango de 2958-2860 cm<sup>-1</sup> que corresponden a los estiramiento de vibración de enlaces C-H y C-C y la banda alrededor de 1730 cm<sup>-1</sup> que es un indicativo de carbonilo, las cuales son señales características del AOT junto con las bandas de 1215 y 1028 cm<sup>-1</sup> referentes a los sulfatos (Devendiran et al., 2016; Elia et al., 2014; Khosravian

et al., 2016). Sin embargo, dichas señales se ven parcialmente disminuidas en los espectros de MINPs@AF, lo cual está relacionado con la eliminación de estos restos de surfactantes facilitando la interacción de la nanopartícula con el ácido fólico.

Otras bandas características del ácido fólico son las que se encuentran en el rango de 1460 a  $1412 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a las deformaciones asimétricas de enlaces –CH<sub>2</sub> y la desaparición de las bandas de 1215 y 1028 cm<sup>-1</sup> referentes a los sulfatos que provienen del AOT (Devendiran et al., 2016; Elia et al., 2014), y los picos de absorción a 2900-2700 cm<sup>-1</sup> corresponden a los modos de vibración de estiramiento C-H en las cadenas de hidrocarburos, que disminuyen su intensidad debido a la interacción de la nanopartícula con el ácido fólico (L. Castro et al., 2010; J. Huang et al., 2007) son también indicativos de una interacción de las MINPs y el ácido fólico.

En el caso de los espectros de AVNPs, mostrados en la *figura 12*, se observan diferentes señales asociadas probablemente a moléculas que recubren y estabilizan las nanopartículas de oro (L. Castro et al., 2010). Por ejemplo, la señal en 1109 cm<sup>-1</sup> pertenecientes a los grupos -C-O en los polisacáridos en el extracto (J. Huang et al., 2007). Un pico entre 1726- 1745 cm<sup>-1</sup> característico de las vibraciones de estiramiento del grupo funcional carbonilo y la señal de amplia absorbancia entre 3000- 3500 cm<sup>-1</sup> se atribuye a los modos de vibración de estiramiento O-H en el grupo funcional hidroxilo y a las vibraciones de estiramiento N-H, grupos presentantes tanto en el ácido fólico como en los componentes del extracto de *Aloe vera*. La señal entre 1080-1040 cm<sup>-1</sup> puede relacionarse con las vibraciones S=O y N-C de estiramiento relacionadas con grupos amino libres o restos de cisteína en las proteínas como lectinas y algunos aminoácidos presentes como la metionina (L. Castro et al., 2010; Melo et al., 2004).

El espectro (FT-IR) del ácido fólico, tiene la presencia de diferentes bandas como el pico de alta intensidad que aparece cerca a los 1690 cm<sup>-1</sup> perteneciente al enlace tipo amida que es

característico del ácido fólico al unirse el ácido para-amino benzoico con el glutámico (G. Li et al., 2009). También las señales entre 1655-1550 cm<sup>-1</sup> que representan enlaces C-NH<sub>2</sub> y C-N de una amina primaria y secundaria respectivamente, la banda 910-665 cm<sup>-1</sup> que correspondiente a los enlaces tipo N-H presentes en las aminas primarias, y el pico entre a 1513-1481 cm<sup>-1</sup> correspondiente las vibraciones de los enlaces C=N tipo tijera, se relacionan con el segmento pterinico y enlaces C=C conjugados pertenecientes al benceno, las cuales están presentes y con alta intensidad tanto en el ácido fólico como en las nanopartículas con el ligando (Honary, Gharaei-fathabad, & Paji, 2012; Jeevanandam et al., 2017; G. Li et al., 2009; Tsai et al., 2008).

Algunos cambios en las señales obtenidas en los espectros de las nanopartículas de oro en comparación con los FT-IR del AF como la aparición, disminución y /o desplazamiento de las bandas anteriormente mencionadas, en los espectros de MINPs@AF y AVNPs@AF, son también indicativos de una interacción de las AuNPs y el ácido fólico.

### 4.3 Respuesta térmica de las AuNPs frente a la irradiación IR

Se evaluó los cambios térmicos en una solución de AuNPs bajo irradiación con un láser I.R. cada minuto. Las *figuras 13 y 14*, muestran el aumento de temperatura observado para las soluciones de 400  $\mu$ M de MINPs y AVNPs en medio EMEM, variando la potencia de irradiación de los diodos laser de 808 nm y 638 nm, respectivamente.



*Figura 13.* Respuesta térmica de las AuNPs en solución EMEM con un láser de 808nm para diferentes potencias de irradiación. A). Para las NPs obtenidas en micelas inversas. B). Para las NPs obtenidas empleando *Aloe vera*.



*Figura 14.* Respuesta térmica de las AuNPs en solución EMEM con un láser de 638nm para diferentes potencias de irradiación. A). Para las NPs obtenidas en micelas inversas. B). Para las NPs obtenidas empleando *Aloe vera*.

La hipertermia puede ser un aliado que mejore tanto la quimioterapia como la radioterapia según (Hainfeld et al., 2015). En las *figuras 13 y 14*, muestran que para ambos diodos, las nanopartículas actúan como calentadores plasmónicos, y el aumento de la temperatura que estas producen se ve fuertemente influenciado por el incremento de la potencia del láser, tal como se ha visto en otras experiencias, donde la respuesta de calentamiento está estrechamente relacionada con la intensidad de irradiación usada (Lucas, Moiseeva, Zhang, Gobin, & Harnett, 2013).

Para los resultados de calentamiento observados para ambos tipos de nanopartículas, el aumento de la temperatura es directamente dependiente del incremento de la potencia del láser, acorde con otras investigaciones (Lucas et al., 2013; N. N. Nedyalkov et al., 2012). Donde la carga de migración en la superficie de la partícula provoca un campo eléctrico cambiante para inducir una calefacción de forma dependiente de la intensidad del láser (N. N. Nedyalkov et al., 2012). Además, esto no implica ningún efecto sobre las propiedades de las nanopartículas, ya que como se ha visto, el aumento de la potencia del láser no afecta las posiciones de la banda de absorción (N. Nedyalkov et al., 2017). Por ello para mejorar su efecto sobre la línea celular se seleccionó la potencia laser que garantice el mayor aumento térmico.

En la *figura 15*, se muestra los cambios de temperatura observados con la potencia de 600 mW, y para cada diodo hay una relación de intensidad de irradiación de 19.09 W/cm<sup>2</sup> (808 nm) y 1.56 W/cm<sup>2</sup> (638nm), y se compara el aumento de temperatura para cada tipo de nanopartículas obtenidas con cada uno de los diodos laser.



*Figura 15.* Respuesta térmica de las AuNPs en medio EMEM, [AuNPs] = 400  $\mu$ M. A). Empleando un diodo de 808 nm y 600 mW. B). Empleando un diodo de 638nm y 600 mW.

En la *figura 15*, se muestra que el incremento de temperatura es menor cuando se expone las nanopartículas a la irradiación laser de 808 nm que la de 638 nm, esto se debe a que el calentamiento basado en la absorción de plasmón de resonancia depende en gran medida de la longitud de onda del láser como se ha mostrado en la literatura (Honda, Saito, Smith, Fujita, & Kawata, 2011), con la respuesta obtenida, se pudo comprobar que efectivamente las nanopartículas podían ser empleadas para generar hipertermia, bajo estas condiciones, al aumentar la temperatura en las soluciones de AuNPs en comparación al solo medio de cultivo.

### 4.4 Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad de las células HeLa.

A partir de la observación del efecto de las nanopartículas con y sin funcionalizar, sobre un cultivo secundario de la línea de cáncer de cuello uterino HeLa, se pudo corroborar el nivel de citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas en un rango de concentraciones entre 5 - 80  $\mu$ M, para dos tiempos de tratamiento (2 y 4h). El efecto citotóxico inducido por las nanopartículas MINPs y AVNPs, con y sin funcionalización sobre la viabilidad celular se muestran en las *figuras 16 y 17*.



*Figura 16.* Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento a 2 y 4 h con nanopartículas MINPs. A) MINPs sin funcionalizar. B) MINPs funcionalizadas (MINPs@AF). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05, \*\* p<0.01. \*\*\* p<0.001.



*Figura 17*. Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento a 2 y 4 h con nanopartículas AVNPs. A) AVNPs sin funcionalizar. B) AVNPs funcionalizadas (AVNPs@AF). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001.

Los ensayos de citotóxidad permitieron corroborar que las nanopartículas de oro presentan baja toxicidad (*figuras 16 y 17*), probablemente debido a la biocompatibilidad del oro, previamente reportada en la literatura (Abkenar & Naderi, 2016; Kabb, Carmean, & Sumerlin, 2015). Este comportamiento fue similar tanto para las MINPs como las AVNPs para dos y cuatro h de tratamiento.

Las nanopartículas se evaluaron en un rango de concentración de 5 a 80  $\mu$ M. En este intervalo de concentración, las células no exhibieron una respuesta de tipo dosis dependiente y el aumento de la concentración de las nanopartículas no generó un aumento de citotoxicidad en las células HeLa. Por el contrario, se evidencian bajos efectos citotóxicos. De forma estadísticamente significativa, para la concentración de 5 $\mu$ M de MINPs a cuatro horas de tratamiento (*figura 16A*) se indujo la disminución de la viabilidad de cerca del 13 % de las células HeLa; mientras que para las MINPs@AF en una concentración de 10 $\mu$ M a dos horas de tratamiento se observó un ligero incremento de 15% de las células viables con respecto al control. En el caso de las células HeLa

observó un aumento estadísticamente significativo en la viabilidad de 19 y 16% para las concentraciones de 10  $\mu$ M y 25  $\mu$ M respectivamente, y con AVNPs@AF, el porcentaje de células viables creció un 22% en la concentración de 5  $\mu$ M, con respecto al control. Lo anterior evidencio que el efecto citotóxico no tiene una dependencia directa con el aumento en la dosis de las nanopartículas de oro empleada en el tratamiento de células HeLa, lo que implicó un efecto toxico aleatorio de las NPs sobre la viabilidad celular, que es coherente con los resultados presentados en otras investigaciones (Drescher, Traub, Buechner, Jakubowski, & Kneipp, 2017; Hau et al., 2016).

En las *figuras 16 y 17*, se evidencia el efecto que tiene la funcionalización del ácido fólico sobre los dos tipos de nanopartículas, ya que, para los dos tiempos de tratamiento, se observa que la toxicidad de las NPs funcionalizadas es menor que las NPs sin funcionalizar.

La variación de los efectos citotóxicos al funcionalizar las nanopartículas, puede relacionarse con la agregación de las nanopartículas no funcionalizadas en la solución del medio de cultivo, ya que las NPs se pueden sedimentar rápidamente y posteriormente adherirse a la superficie de las células. Una vez, las nanopartículas están adheridas podrían estimular mecanismos de captación en las células y facilitar su posterior absorción (D. Huang, Zhou, Liu, & Gao, 2015; Lesniak et al., 2012).

Por ello, la citotoxicidad de las nanopartículas no funcionalizadas en las células podría estar asociada con la internalización de las NPs, que puede darse por macropinocitosis, al generarse formación de conglomerados de gran tamaño (> 200 nm) (D. Huang et al., 2015). Este proceso implica la integración de una gran cantidad de macropinosomas conformados por las NPs, vía endocítica regulada por la actina mas no por receptores asociados, está estrechamente relacionado con un fruncimiento significativo de la membrana plasmática a través de la superficie celular

(Canton & Battaglia, 2012). Bajo estas condiciones, estas nanopartículas de oro internalizadas no se pueden digerir y causar daño a las células, debido a la alta estabilidad del oro en condiciones fisiológicas (D. Huang et al., 2015).

Por el contrario, las NPs que aumentan su capacidad de dispersión gracias a la funcionalización con el ácido fólico, son internalizados en las células HeLa a través de endocitosis mediada por el receptores folato y son atrapadas en los endosomas. Estos endosomas luego se fusionan con los lisosomas para su procesamiento antes de ser transportados a la periferia de la célula para su excreción, por lo que su toxicidad disminuye como se ha visto en diferentes investigaciones (D. Huang et al., 2015; Joshi et al., 2012; Z. Zhang et al., 2010).

También, se observó una dependencia de la toxicidad de las NPs con respecto al tiempo de exposición del tratamiento, de manera que el efecto citotóxico de las nanopartículas se incrementó levemente con el tiempo, sin embargo, estos cambios no ocurren de forma dependiente de la concentración de la nanopartículas, acorde a lo mostrado en otros estudios (Vijayakumar & Ganesan, 2013; Woźniak et al., 2017; Yinan Zhang, Xu, Li, Yu, & Chen, 2012).

# 4.5 Efecto fototérmico de las nanopartículas de oro sobre la viabilidad de las células HeLa.

Usando el mismo rango de concentraciones en la determinación del efecto citotóxico de las NPs, se determinó el efecto fototérmico de las nanopartículas sintetizadas con y sin funcionalización sobre la línea HeLa, durante 4 horas, ya que esto maximiza el efecto de las AuNPs. Para generar el efecto fototérmico, se empleó una potencia incidente de 600 mW y se comparó el efecto según las longitudes de onda de los diodos laser (638 y 808 nm) y una distancia del diodo al cultivo celular de 2 cm y 5 min de irradiación como se muestran en las *figuras 18 y* 



*Figura 18.* Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas MINPs e irradiadas con los diodos de 638 y 808 nm durante 5 min a una distancia de 2 cm. A) MINPs sin funcionalizar. B) MINPs funcionalizadas (MINPs@AF). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001.



*Figura 19.* Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas AVNPs e irradiadas con los láseres de 638 y 808 nm durante 5 min a una distancia de 2cm. A) AVNPs sin funcionalizar. B) AVNPs funcionalizadas (AVNPs@AF). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

De acuerdo con los resultados de viabilidad celular observados, el efecto fototérmico de las nanopartículas no es dosis dependiente, de manera similar a los datos obtenidos en relación a la citotoxicidad, ver *figuras 18 y 19*. Además, se puede ver claramente que el mejor efecto

fototérmico fue significativo para una concentración de 5 μM, tanto para las MINPs@AF como las AVNPs@AF al ser irradiadas con una potencia de 600 mW. Sin embargo, para cada tipo de nanopartículas el efecto fototérmico fue dependiente del tipo de longitud de onda del láser empleado, por ejemplo, las AVNPs@AF frente a la irradiación con el láser de 808 nm y una concentración de 5 μM provocaron una disminución de la viabilidad cerca de un 15% con respecto al control, mientras que las MINPs@AF bajo la misma concentración y con el diodo de 638 nm generaron un descenso de aproximadamente el 22% de las células viables, luego, el efecto fototérmico fue aproximadamente un 10% mejor en las nanopartículas de MINPs que en las AVNPs.

Claramente el efecto fototérmico se hace directamente dependiente de la funcionalización de ambas nanopartículas, donde el efecto es mayor con las MINPS debido a que la anisotropía y una mejor interacción con el AF, como se corroboró con la caracterización fisicoquímica, facilitando en este caso la endocitosis mediada por los receptores folatos de forma efectiva y por ende su internalización en las células, de esta manera, las nanopartículas mantienen sus propiedades ópticas, lo que permite que se genere un aumento de la temperatura frente a la irradiación y así aumente su potencial citotóxico frente a las células HeLa, de manera similar como se ha observado en otros estudios (Abadeer & Murphy, 2016; Ali et al., 2017; L. Bertel Garay et al., 2018).

En relación con las longitudes de onda de los dos diodos, en las *figuras 17 y 18* se ve que el efecto fototérmico es mayor al irradiar con el diodo de 638 nm, lo que es congruente con el hecho de que los máximos de las bandas plasmónicas tanto de las MINPs como las AVNPs son más cercanas a la longitud de onda del láser, por lo que la generación de un calentamiento es más eficiente (Honda et al., 2011).

Sin embargo, en las AVNPs se muestra su mejor efecto cuando se irradia con el diodo de 808nm, esto puede atribuirse a la presencia de diferentes moléculas sobre la superficie de las nanopartículas, y son constituyentes del extracto de *Aloe vera* (como carbohidratos, proteínas, minerales, oligosacáridos y vitaminas), que como se ha evidenció previamente poseen una leve absorción cercana a los 600 nm, por lo cual, la absorción relativa de las nanopartículas de oro puede reducirse y por ende el aumento de temperatura sea menor para el diodo de 638 nm (Honda et al., 2011).

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se selecciona como mejores variables el uso de MINPs y el diodo de 638 nm, pues son condiciones en donde se observaron los mejores resultados del efecto fototérmico sobre las células HeLa. La *figura 20* muestra el efecto de las MINPs con y sin funcionalización bajo la irradiación de 638 nm, 4 h de tratamiento y con dos diferentes distancias desde el diodo hasta la superficie de cultivo (2 y 5 cm).



*Figura 20.* Viabilidad de las células HeLa después del tratamiento 4 h con nanopartículas MINPs e irradiadas con el diodo de 638 nm durante 5 min a una distancia de 2 y 5cm. A) MINPs sin funcionalizar. B) MINPs funcionalizadas (MINPs@AF). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.
Como se ve en la *figura 20*, la distancia de irradiación desde el diodo hasta la zona de cultivo es también un factor determinante en el efecto fototérmico generado por las nanopartículas irradiadas, esto se puede atribuir a que al aumentar la distancia, también incrementa el diámetro del punto de irradiación del láser lo que genera una disminución de la intensidad de irradiación sobre cada pozo, dado que se maneja una potencia constante, esto afecta la eficiencia térmica de las nanopartículas para generar muerte celular, como se ha visto en otras investigaciones, el aumento de intensidad mejora el efecto fototérmico (Ali et al., 2017; N. N. Nedyalkov et al., 2012; Solon, Aronson, & Gould, 1961). Por ello, se determina con el fin de mejorar la eficiencia del efecto fototérmico, la distancia óptima de irradiación es de 2 cm.

Teniendo en cuenta las mejores condiciones establecidas anteriormente, se evaluó la capacidad de recuperación de las células en un rango de tiempo, con el fin de determinar la duración del efecto fototérmico sobre la línea celular desde el momento en que se realiza la irradiación, la cual se representa en la *figura 21*.



*Figura 21.* Evaluación de la línea HeLa posterior al tratamiento con MINPs y MINPs@AF respecto al tiempo. El tratamiento se realizó empleando una concentración de 5  $\mu$ M de MINPs y MINPs@AF durante 4 h e irradiadas a una distancia láser de 2 cm con el diodo de 638 nm. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001.

En la *figura 21*, se puede apreciar que hasta las 12 h después de la irradiación de las células tratadas previamente con MINPs y MINps@AF, el efecto fototérmico se sigue presentando en el sistema, ocasionando una disminución de aproximadamente 17% de la viabilidad de las células tratadas con MINPs@AF con respecto al control, sin embargo, a las 24 h la línea celular tratada no presenta ningún cambio estadísticamente significativo lo que implica que dese este punto las células comienzan a retomar su ritmo normal de crecimiento.

La recuperación de la velocidad de crecimiento de las células a partir de las 24 h después de la aplicación de la terapia fototérmica puede estar relacionada por la capacidad de digestión del oro en el interior celular, ya que los endosomas residuales, productos de las posibles vías de internalización de las NPs, durante este tiempo, pueden fusionarse con los lisosomas para así procesar las nanopartículas de oro y estimular la exocitosis de las MINPs y así mismo su excreción a la periferia celular (Chithrani, Stewart, Allen, & Jaffray, 2009; Z. Zhang et al., 2010).

# 4.6 Determinación del mecanismo de acción de las nanopartículas MINPs

Existen diferentes modalidades de muerte celular, entre los más comunes se encuentran la apoptosis y necrosis (Sun, Jia, Jiang, & Zhai, 2018). Para determinar qué tipo de mecanismo de muerte inducen las nanopartículas sobre las células HeLa, se comprobó la liberación del citocromo C durante el tratamiento fototérmico usando las MINPs, cuyos resultados se encuentran en la *figura 22*.



*Figura 22.* Efecto de las MINPs sobre la liberación de citocromo C en células HeLa. La liberación de citocromo c se midió a 414 nm después de 4 h de tratamiento y 2h de tiempo de recuperación después de la exposición al diodo laser de 638nm ubicado una distancia de 2cm, utilizando una solución de 5  $\mu$ M de MINPs. Los resultados se expresan como nmol de citocromo C liberado en comparación con el control. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a lo siguiente: \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001.

En la figura anterior, se muestra que la concentración de citocromo C liberado al citoplasma es cerca de 28% menor en las células tratadas con las nanopartículas sin funcionalizar en comparación con el control. Sin embargo, cuando las nanopartícula están funcionalizadas con el ácido fólico, se presenta un aumento de 70% en la concentración de citocromo C liberado al citoplasma, lo cual puede deberse a la presencia de la muerte programada (Doss, Debajyoti, & Debottam, 2013), o también puede ser un indicio de necrosis. En el caso de que se genere un bloqueo de la activación de caspasas en un proceso apoptótico, se puede desviar la muerte celular programada a una necrótica, ya que la alteración del potencial transmembrana mitocondrial, no es un factor determinante en la activación del mecanismo que impulsa el citocromo c al citosol (Bossy-Wetzel, Newmeyer, & Green, 1998; Y. Z. Li, Li, Pinto, & Pardee, 1999).Teniendo en cuenta los anteriores indicios, se complementó el ensayo de liberación de citocromo C con otras

bp

8000 6000

técnicas, como una electroforesis horizontal con el fin de confirmar la posible fragmentación de ADN relacionada con la muerte celular programada, los resultados se muestran en la *figura 23*.

B

D

С

Μ



En la *figura 23*, no se observa una secuencia de bandas correspondiente a fragmentación de ADN provocado por el tratamiento e irradiación de las NPs, por lo que esta técnica no permitió confirmar que el tipo de mecanismo de muerte celular activado por las nanopartículas, obtenidas con la síntesis de micelas inversas, es una posible apoptosis (Alfaro Moreno, García Cuéllar, & Dueñas González, 2000).

Además, se realizó una tinción con el colorante Wright-Giemsa con el fin de identificar los cambios morfológicos como otro indicio de confirmación de la clase de mecanismo de muerte inducido por las MINPs, estas variaciones se pueden apreciar en la *figura 24*.



*Figura 24.* Cambios morfológicos de las células HeLa frente al tratamiento con MINPs. A) Células control sin irradiación. B) Células control con irradiación. C) Células tratadas con MINPs. D) Células tratadas con MINPs@AF. Las células HeLa fueron tratadas con las nanopartículas con y sin funcionalizar durante 4 h e irradiadas con el diodo laser de 638 nm ubicado a una distancia de 2 cm y 2 h de recuperación después de la irradiación.

Algunos cambios morfológicos que se pueden apreciar para las células en presencia de MINPs y MINPs@AF e irradiadas con el diodo de 638 nm a una distancia de 2 cm (*figura 24*). En las células HeLa control (*figura 24 A y B*), los núcleos tienen una coloración azul muy leve con 1 a 3 cuerpos tipo nucléolo y algunas vesículas, además de poseer una membrana larga, poligonal y semi fusiformes. En cambio, las células que fueron tratadas e irradiadas, presentan una serie de alteraciones como células con forma oval, contracción celular, aglomeración e incluso las células tienen vacuolación variable e irregularidad de la membrana de la superficie con algunos núcleos no redondeados, esto principalmente en las células con MINPs@AF. Esos cambios son un indicio de que probablemente predomine como modalidad de muerte celular la necrosis y en segundo plano se da una apoptosis tardía debido a la baja cariocinosis en las células tratadas y la escasa formación de cuerpos irregulares en la membrana (Al-Bagdadi et al., 2016; D.-L. Li et al., 2014).

Finalmente, se empleó el ensayo de citometría de flujo para identificar daños en las membranas celulares y corroborar el tipo de mecanismo de muerte celular generado por las nanopartículas en presencia de la irradiación, estos resultados se muestran en la *figura 25*.



*Figura 25.* Población celular según el mecanismo de acción activado por las MINPs y MINPs@AF. A) Células tratadas con MINPs B) Células tratadas con MINPs@AF. Las células HeLa fueron tratadas con las nanopartículas con y sin funcionalizar durante 4 h e irradiadas con el diodo laser de 638 nm ubicado a una distancia de 2 cm y 2 h de recuperación después de la irradiación.

En la *figura 25* se evidencia una tasa de células no viables identificadas con el colorante Sytox Green de 26,5% para las células con MINPs y con 27,8% para MINPs@AF, después de la irradiación de las NPs internalizadas en las células HeLa, confirmando la perdida de la integridad de la membrana plasmática de las células, lo que constituye una posible mezcla entre células necróticas y de apoptosis tardía, indicando que la apoptosis no es la principal causa de muerte celular (Gaforio, Serrano, Ortega, Algarra, & Alvarez De Cienfuegos, 2002; Joshi et al., 2012). Por lo tanto, los resultados de la citometría de flujo de las células HeLa en presencia de MINPs y MINPs@AF son una confirmación de lo que se había visto en el análisis morfológico de esta línea celular después de la irradiación.

## **5.** Conclusiones

- Para las dos metodologías de síntesis de nanopartículas de oro utilizadas en la investigación, se obtuvo satisfactoriamente una mezcla de formas anisotrópicas, así como su funcionalización con el ácido fólico de manera sencilla y eficiente.
- La interacción entre el ligando y las nanopartículas se evidenció por medio de las técnicas espectroscópicas UV-Vis, FT-IR y fluorescencia y la determinación del potencial Zeta, dado a los diferentes cambios observados en las señales resultantes de las nanopartículas no funcionalizadas en comparación con la funcionalizadas.
- El efecto citotóxico de los dos grupos de nanopartículas fue inferior al 15% sobre la viabilidad de las células HeLa, adicionalmente la funcionalización disminuyó la toxicidad de las nanopartículas.
- Las nanopartículas MINPs mostraron un mayor efecto fototérmico, facilitando la absorción de la luz láser con una longitud de onda de 638nm, y disminuyendo la viabilidad de las células HeLa.
- Las nanopartículas de MINPs con y sin funcionalización generan muerte celular posiblemente por medio de una combinación de dos mecanismos de acción: la necrosis y la apoptosis tardía.
- Las nanopartículas de MINPs funcionalizadas con el ácido fólico fueron las que presentaron el mayor efecto fototérmico sobre las células HeLa para una concentración de 5 μM con 4 h de tratamiento e irradiadas con el diodo laser de 638nm durante 5 min localizado a una distancia 2 cm con la zona de cultivo.

### **6.** Recomendaciones

- Comparar el efecto fototérmico *in vitro* obtenido, sobre células normales de cuello uterino, para así corroborar que la funcionalización con el ácido fólico es un factor clave en la selectividad de la terapia fototérmica.
- Evaluar durante la síntesis con *Aloe vera*, variables como el pH y la temperatura y su efecto sobre la forma y tamaño final de las nanopartículas obtenidas, pudiendo ser determinantes a la hora de su funcionamiento en la terapia fototérmica debido a que el *Aloe vera* está compuesto por proteínas y carbohidratos que se verían afectados por dichas variables y que podrían ser importantes en la formación más óptima de los compuestos.
- Complementar los ensayos para la determinación del mecanismo de muerte celular con ensayos como la identificación de caspasas 3 y 7 o realizar el ensayo de citometría de flujo con Annexina-V con el fin especificar la modalidad de muerte que activan las nanopartículas de oro.

#### **Referencias Bibliográficas**

- Abadeer, N. S., & Murphy, C. J. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 4691–4716. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232
- Abdelhalim, M., & Mady, M. (2011). The effects of gold nanoparticles size and concentration on viscosity, flow activation energy, dielectric and optical properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(61), 13121–13127. https://doi.org/10.5897/AJB11.538
- Abhilash, M. (2010). Potential applications of nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *1*(1), 1–12.
- Abkenar, A. K., & Naderi, M. (2016). Chemical synthesis of gold nanoparticles with different morphology from a secondary source. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13(12), 2173–2184. https://doi.org/10.1007/s13738-016-0935-6
- Ahlawat, K. S., & Khatkar, B. S. (2011). Processing, food applications and safety of aloe vera products: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 525–533. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0229-z
- Ahmed, M., & Hussain, F. (2013). Chemical Composition and Biochemical Activity of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) Leaves. *Ijcbs*, *3*(April 2011), 29–33.
- Al-Bagdadi, F., Young, M. J., Geaghan, J. P., Yao, S., Barona, H. M., Martinez-Ceballos, E., & Yoshimura, M. (2016). Observation on the ultrastructure morphology of HeLa cells treated with ethanol: Statistical analysis. *Ultrastructural Pathology*, 40(6), 324–332. https://doi.org/10.1080/01913123.2016.1233160
- Alameda González, C., & de Lorenzo-Cáceres Ascanio, A. (2008). Vacuna contra el

papilomavirus humano: actitud ante una consulta sobre una novedad terapéutica. *Atención Primaria*, 40(4), 205–208. https://doi.org/10.1157/13118064

- Alfaro Moreno, E., García Cuéllar, C., & Dueñas González, A. (2000). Aplicaciones Y Limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*, 46(4), 275–280.
- Ali, M. R. K., Rahman, M. A., Wu, Y., Han, T., Peng, X., Mackey, M. A., ... El-Sayed, M. A. (2017). Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(15), E3110–E3118. https://doi.org/10.1073/pnas.1619302114
- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics Condensed Matter*, 29(20), 1–48. https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3
- Appaix, F., Minatchy, M., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., & Saks, V. a. (2000).
  Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1457*(3), 175–181.
- Bac, L. H., Kim, J. S., & Kim, J. C. (2011). Size, optical and stability properties of gold nanoparticles synthesized by electrical explosion of wire in different aqueous media. *Reviews on Advanced Materials Science*, 28(2), 117–121.
- Bagwe, R. P., & Khilar, K. C. (2000). Effects of Intermicellar Exchange Rate on the Formation of Silver Nanoparticles in Reverse Microemulsions of AOT. *Langmuir*, 16(13), 905–910.
- Bayraktutan, T., Meral, K., & Onganer, Y. (2014). Photophysical properties of pyronin dyes in reverse micelles of AOT. *Journal of Luminescence*, 145, 925–929. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.09.015

- Bertel Garay, L. E. (2015). Estudio In Vitro Del Efecto Térmico Generado Por La Interacción De Nanopartículas De Oro Funcionalizadas Con pterinas En Células Tipo HeLa Con Radiación IR. Trabajo de Investigación de Maestría en Química de la Universidad Industrial De Santander.
- Bertel Garay, L., Méndez Sánchez, S. C., & Martínez Ortega, F. (2018). Use in vitro of Gold Nanoparticles Functionalized with Folic Acid as a Photothermal Agent on Treatment of HeLa Cells. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(1), 1–10.
- Bhattacharya, R., Patra, C. R., Earl, A., Wang, S., Katarya, A., Lu, L., ... Mukherjee, P. (2007).
  Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 3*(3), 224–238. https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.07.001
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal*, 17(1), 37–49. https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.37
- Boticario Boticario, C., & Cascales Angosto, M. (2011). *Innovaciones en cáncer*. (C. Boticario
  Boticario & M. Cascales Angosto, Eds.) (Primera Ed). Madrid, España.: Universidad
  Nacional Educación a Distancia.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248– 254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Britto Hurtado, R., Cortez-Valadez, M., Ramírez-Rodríguez, L. P., Larios-Rodriguez, E., Alvarez,

R. A. B., Rocha-Rocha, O., ... Flores-Acosta, M. (2016). Instant synthesis of gold nanoparticles at room temperature and SERS applications. *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics, 380*(34), 2658–2663. https://doi.org/10.1016/j.physleta.2016.05.052

- Burrows, N. D., Vartanian, A. M., Abadeer, N. S., Grzincic, E. M., Jacob, L. M., Lin, W., ... Murphy, C. J. (2016). Anisotropic Nanoparticles and Anisotropic Surface Chemistry. *Journal* of Physical Chemistry Letters, 7(4), 632–641. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5b02205
- Buzea, C., Pacheco, I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles:sources and toxicity. *Bointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Calandra, P., Giordano, C., Longo, A., & Liveri, V. T. (2006). Physicochemical investigation of surfactant-coated gold nanoparticles synthesized in the confined space of dry reversed micelles. *Materials Chemistry and Physics* 98, 98(2–3), 494–499. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.09.068
- Cano González, M. A., Díaz Barroso, Á., Fernández Fernández, E., García García, C., & Gutiérrez García, E. (2009). *Quimioterapia. Guia Para Pacientes*. (SESPA, Unidad de Atención al Cáncer., & . Subdirección de Gestión Clínica y Sanitarios., Dirección de Servicios Calidad., Eds.) (Primera). Asturias, España.: Servicio de Salud del Principado de Asturias.
- Canton, I., & Battaglia, G. (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2718–2739. https://doi.org/10.1039/c2cs15260f
- Castro, L., Blázquez, M. L., González, F., Muñoz, J. A., & Ballester, A. (2010). Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using sugar beet pulp. *Chemical Engineering Journal*, 164(1), 92–97. https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.034

Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of Gold

Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Vera Plant Extract. *Biotechnology Progress*, 22, 577–583.

- Chaparro Narváez, P. E., Cotes Cantillo, K. P., Vargas Sandoval, G. A., Díaz Jiménez, D. P., Cardenas Cardenas, L. M., Escobar Díaz, F. A., ... Vallejo Rodriguez, E. D. (2015). *Carga de enfermedad por enfermedades crónicas no transmisibles y discapacidad en Colombia*. (C. L. Delgado Murillo & K. J. Torres Castillo, Eds.) (Quinta Edi). Bogotá Colombia: Imprenta Nacional de Colombia. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1618.1523
- Chen, J., Jin, Y., Fahruddin, N., & Zhao, J. X. (2013). Development of gold nanoparticle-enhanced fluorescent nanocomposites. *Langmuir*, 29(5), 1584–1591. https://doi.org/10.1021/la3036049
- Chen, X., Jiang, J., Shen, H., & Hu, Z. (2011). Genetic susceptibility of cervical cancer. *Journal of Biomedical Research*, 25(3), 155–164. https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60020-1
- Chili, M. M., & Revaprasadu, N. (2008). Synthesis of anisotropic gold nanoparticles in a water-soluble polymer. *Materials Letters*, 62, 3896–3899.
   https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.05.022
- Chithrani, B. D., Stewart, J., Allen, C., & Jaffray, D. A. (2009). Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5(2), 118–127. https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.008
- Concha R, M. (2007). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. Revista Chilena de Infectología, 24(3), 209–214.
- Couvreur, P. (2016). Nanosciences and Nanotechnology. Nanosciences and Nanotechnology: Evolution or Revolution? https://doi.org/10.1007/978-3-319-19360-1

Crespi, V., Galstyan, A., & Lerman, K. (2008). Top - Down vs Bottom - up Methodologies in

Multi – Agent System Design. Auton Robot, 24, 1–32.

- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, *382*(9895), 889–899. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012).
   Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67–78. https://doi.org/0718-8706
- Da Silva, A. M., Xavier Peixoto, G. C., Brilhante Bezerra, J. A., De Souza Castelo, T., Araújo Santos, E. A., & Rodrigues Silva, A. (2014). Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos ( Pecari tajacu ). *Ciência Rural, Santa Maria.*, 44(8), 1494–1499.
- Das, S., Roy, P., Mondal, S., Bera, T., & Mukherjee, A. (2013). One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.061
- Day, E. S., Thompson, P. A., Zhang, L., Lewinski, N. A., Ahmed, N., Drezek, R. A., ... West, J. L. (2011). Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model. *Journal of Neuro-Oncology*, *104*(1), 55–63. https://doi.org/10.1007/s11060-010-0470-8
- De Castro, C., Riveros de Murcia, T., Jaimes, G., & Téllez Alfonso, A. N. (2007). Inducción de apoptosis por el principio activo citotóxico de Espeletia killipii Cuatr. sobre líneas celulares humanas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4), 497–500. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400004

- Devendiran, R. M., Chinnaiyan, S. kumar, Yadav, N. K., Moorthy, G. K., Ramanathan, G., Singaravelu, S., ... Perumal, P. T. (2016). Green synthesis of folic acid-conjugated gold nanoparticles with pectin as reducing/stabilizing agent for cancer theranostics. *RSC Advances.*, 6(35), 29757–29768. https://doi.org/10.1039/C6RA01698G
- Deverakonda, A., & Gupta, N. (2016). Diagnosis and treatment of cervical cancer: a review. *Journal of Nursing and Health Sciences*, 2(3), 1–11.
- Doss, C. G. P., Debajyoti, C., & Debottam, S. (2013). Disruption of Mitochondrial Complexes in Cancer Stem Cells Through Nano-based Drug Delivery: A Promising Mitochondrial Medicine. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67(3), 1075–1079. https://doi.org/10.1007/s12013-013-9607-7
- Drescher, D., Traub, H., Buechner, T., Jakubowski, N., & Kneipp, J. (2017). Properties of in situgenerated gold nanoparticles in the cellular context. *Nanoscale*, *7*, 1–10. https://doi.org/10.1039/C7NR04620K
- Dubin, M., & Stoppani, A. O. M. (2000). Medicina mitocondrial Muerte celular y / o apoptosis. *Medicina (Buenos Aires)*, 60, 375–386.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2006). Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters*, 239(1), 129–135. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.035
- El Aferni, A., Guettari, M., & Tajouri, T. (2017). Determination of the Water / AOT / Isooctane Reverse Micelles Size Parameters from Their Refractive Index. *Journal of Solution Chemistry*, *1*, 1–14. https://doi.org/10.1007/s10953-016-0563-x

- Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z., & Zeiri, Y. (2014). Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 4007–4021. https://doi.org/10.2147/IJN.S57343
- Fazal, S., Jayasree, A., Sasidharan, S., Koyakutty, M., Nair, S. V, & Menon, D. (2014). Green Synthesis of Anisotropic Gold Nanoparticles for Photothermal Therapy of Cancer. ACS Applied Materials & Interfaces, 6(11), 8080–8089.
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379
- Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), 1–179.
- Fernández, B. C., Sánchez, a. R., Raposo, C. G., & Castellanos, P. C. (2013). Cáncer de cérvix y endometrio. *Medicine (Spain)*, 11(27), 1649–1658. https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70519-5
- Ferrari, M. (2012). Nanotechnology for Biology and Medicine. (G. A. Silva & V. Parpura, Eds.) (First Edit). New York, United States: Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-31296-5
- Fidalgo, J. A. P., Machancoses, A. H., González, V. M., & Cervantes, A. (2011). Treatment of cervical cancer: The importance of a multidisciplinary team approach. *Clinical and Translational Oncology*, 13(7), 431–433. https://doi.org/10.1007/s12094-011-0678-x
- Filipponi, L., & Sutherland, D. (2012). *Nanotechnologies: Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities* (First Edit). Luxembourg, European Union: European Commission

Directorate-General for Research and Innovation Industrial technologies (NMP) programme. https://doi.org/:10.2777/76945

- Foo, Y., Periasamy, V., Kiew, L., Kumar, G., & Malek, S. (2017). Curcuma mangga-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles: Characterization, Stability, Cytotoxicity, and Blood Compatibility. *Nanomaterials*, 7(123), 1–14. https://doi.org/10.3390/nano7060123
- Forouzanfar, M. H., Afshin, A., Alexander, L. T., Biryukov, S., Brauer, M., Cercy, K., ... Zhu, J. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1659–1724. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8
- Gaforio, J. J., Serrano, M. J., Ortega, E., Algarra, I., & Alvarez De Cienfuegos, G. (2002). Use of SYTOX green dye in the flow cytometric analysis of bacterial phagocytosis. *Cytometry*, 48(2), 93–96. https://doi.org/10.1002/cyto.10107
- Garcia, E., Bosch, J. M., Covisa, A., & Atero, D. (2008). Guía clínica de la patología cervical. Valencia, España: Fundación Instituto Valenciano de Oncología.
- Geetha, R., Ashokkumar, T., Tamilselvan, S., Govindaraju, K., Sadiq, M., & Singaravelu, G. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity. *Cancer Nanotechnology*, 4(4–5), 91–98. https://doi.org/10.1007/s12645-013-0040-9
- Gerber, D. E. (2008). Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *American Academy of Family Physicians*, 77(3), 311–319.
- Gil-Loyzaga, P. E. (2011). Cultivo de Células animales y humanas. Aplicaciones en nadicina regenerativa. (M. González, Ed.) (Primera Ed). Madrid, España.: Vision Libros.

Hainfeld, J. F., Lin, L., Slatkin, D. N., Dilmanian, F. A., Vadas, T. M., & Smilowitz, H. M. (2015).

Gold Nanoparticle Hyperthermia Reduces Radiotherapy Dose. *Nanomedicine.*, *10*(8), 1609–1617. https://doi.org/10.1080/10810730902873927.Testing

- Hamman, J. H. (2008). Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules*, *13*(8), 1599–1616. https://doi.org/10.3390/molecules13081599
- Hammud, K. K., Ahmed, A. G., Latif, A., Neama, R. R., & Rahman, M. Z. A. (2010). Spectroscopic study of a typical polyaromatic hydrocarbon (naphthalene) and a biological  $\pi$  acceptor (Folic acid) complex. *Diyala Journal For Pure Science*, 6(1), 71–78.
- Hau, H., Khanal, D., Rogers, L., Suchowerska, N., Kumar, R., Sridhar, S., ... Chrzanowski, W. (2016). Dose enhancement and cytotoxicity of gold nanoparticles in colon cancer cells when irradiated with kilo- and mega-voltage radiation. *Bioengineering & Translational Medicine*, *1*(1), 94–102. https://doi.org/10.1002/btm2.10007
- Heath, J. R. (1992). A Liquid-Solution-Phase Synthesis of Crystalline Silicon. *SCIENCE*, 258(November), 1131–1133.
- Heera, P., & Shanmugam, S. (2015). Nanoparticle Characterization and Application: An Overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(8), 379–386.
- Herrera, A. P., Resto, O., Briano, J. G., & Rinaldi, C. (2005). Synthesis and agglomeration of gold nanoparticles in reverse micelles. *Nanotechnology*, 16(7), S618–S625. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/7/040
- Herrera de la Muela, M., Álvarez de la Rosa, M., & de Santiago, J. (2009). Cáncer invasor del cuello uterino. In J. M. Bajo Arenas, J. M. Lailla Vicens, & J. Xercavins Montosa (Eds.), *Fundamentos de Ginecología (SEGO)*. (Primera., pp. 381–389). Madrid, España.: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.).

- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. a, Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., ... West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* of America, 100(23), 13549–13554. https://doi.org/10.1073/pnas.2232479100
- Honary, S., Gharaei-fathabad, E., & Paji, Z. K. (2012). A Novel Biological Synthesis of Gold Nanoparticle by Enterobacteriaceae Family. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research December*, 11(November), 887–891.
- Honda, M., Saito, Y., Smith, N. I., Fujita, K., & Kawata, S. (2011). Nanoscale heating of laser irradiated single gold nanoparticles in liquid. *Optics Express*, 19(13), 12375–12383. https://doi.org/10.1364/OE.19.012375
- Horikoshi, S., & Serpone, N. (2013). Introduction to Nanoparticles. In S. Horikoshi & N. Serpone (Eds.), *Microwaves in Nanoparticle Synthesis* (First Edit, pp. 1–24). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Huang, D., Zhou, H., Liu, H., & Gao, J. (2015). The cytotoxicity of gold nanoparticles is dispersity-dependent. *Dalton Transactions*, 44(41), 1–5. https://doi.org/10.1039/C5DT02118A
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf. *Nanotechnology*, *18*(10), 1–12. https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002

Husain, R. S. A., & Ramakrishnan, V. (2015). Global Variation of Human Papillomavirus

Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of Global Health*, *81*(5), 675–683. https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.08.026

- Jaluria, P., Betenbaugh, M., Konstantopoulos, K., & Shiloach, J. (2007). Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog. *BMC Biotechnology*, 7(71), 1–11. https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-71
- Jayaseelan, C., Ramkumar, R., Rahuman, A. A., & Perumal, P. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of Abelmoschus esculentus and its antifungal activity. *Industrial Crops and Products*, 45, 423–429. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.019
- Jeevanandam, J., Chan, Y. S., & Danquah, M. K. (2017). Biosynthesis and characterization of MgO nanoparticles from plant extracts via induced molecular nucleation. *New J. Chem.*, 41(7), 2800–2814. https://doi.org/10.1039/C6NJ03176E
- Joshi, P., Chakraborti, S., Ramirez-Vick, J. E., Ansari, Z. A., Shanker, V., Chakrabarti, P., & Singh, S. P. (2012). The anticancer activity of chloroquine-gold nanoparticles against MCF-7 breast cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 195–200. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.039
- Kabb, C. P., Carmean, R. N., & Sumerlin, B. S. (2015). Probing the surface-localized hyperthermia of gold nanoparticles in a microwave field using polymeric thermometers. *Chem. Sci.*, 00, 1–8. https://doi.org/10.1039/C5SC01535A
- Kandasamy, K., & Kraft, A. S. (2008). Proteasome inhibitor PS-341 (VELCADE) induces stabilization of the TRAIL receptor DR5 mRNA through the 3'-untranslated region. *Molecular Cancer Therapeutics.*, 7(5), 1091–1100. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2368.Proteasome

- Kang, B., Mackey, M. a, & El-sayed, M. a. (2010). Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis, 1517–1519.
- Kennedy, L. C., Bickford, L. R., Lewinski, N. A., Coughlin, A. J., Hu, Y., Day, E. S., ... Drezek,
  R. A. (2011). A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*, 7(2), 169–183. https://doi.org/10.1002/smll.201000134
- Kettemann, F., Birnbaum, A., Witte, S., Wuithschick, M., Pinna, N., Kraehnert, R., ... Polte, J. (2016). Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation. *Chemistry of Materials*, 28(11), 4072–4081. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01796
- Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Olvera Pérez, B., & Jiménez Pérez, V. M. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240–248. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003
- Khoshgard, K., Hashemi, B., Arbabi, A., Rasaee, M. J., & Soleimani, M. (2014). Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cancer cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques. *Physics in Medicine and Biology*, 59(9), 2249–2263. https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/9/2249
- Khosravian, P., Ardestani, M. shafiee, Khoobi, M., Dorkoosh, seyed naser O. F. abedin, Javar, hamid akbari, & Amanlou, M. (2016). Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid / methionine for active targeted delivery of docetaxel. *OncoTargets and Therapy*, 9, 7315–7330. https://doi.org/10.2147/OTT.S113815
- Kirui, D. K., Rey, D. A., & Batt, C. A. (2010). Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. *Nanotechnology*, 21, 1–11. https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/10/105105

- Krpetić, Ž., Scarì, G., Caneva, E., Speranza, G., & Porta, F. (2009). Gold nanoparticles prepared using cape aloe active components. *Langmuir*, 25(13), 7217–7221. https://doi.org/10.1021/la9009674
- Krysko, D. V, Vanden, T., Herde, K. D., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis :
  Detection , discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44, 205–221. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001
- Kumar, V., & Yadav, S. K. (2009). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(2), 151–157. https://doi.org/10.1002/jctb.2023
- Lagunas-Martínez, A., Madrid-Marina, V., & Gariglio, P. (2010). Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* -*Reviews on Cancer*, 1805(1), 6–16. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.005
- Lata, K., Jaiswal, A. K., Naik, L., & Sharma, R. (2015). Gold Nanoparticles : Preparation, Characterization and Its Stability in Buffer Gold Nanoparticles : Preparation, Characterization and Its Stability in Buffer. *Journal of Nanotechnology and Its Applications*, *17*(1), 1–10.
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. A., & Åberg, C.
  (2012). Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its E ff ect on Nanoparticle Uptake
  E ffi ciency. *Journal of the American Chemical Society*, *135*, 1438–1444.
- Li, D.-L., Wei, L., Wen, X.-M., Song, H., Li, Q., Lv, J.-W., ... Zhang, J.-W. (2014). The Effects of X-Ray Irradiation on the Proliferation and Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Ultrastructural Pathology*, 38(3), 211–216. https://doi.org/10.3109/01913123.2013.861569

Li, G., Li, D., Zhang, L., Zhai, J., & Wang, E. (2009). One-Step Synthesis of Folic Acid Protected

Gold Nanoparticles and Their Receptor-Mediated Intracellular Uptake. *Chemistry - A European Journal*, *15*, 9868–9873. https://doi.org/10.1002/chem.200900914

- Li, J., Shi, L., An, Y., Li, Y., Chen, X., & Dong, H. (2006). Reverse micelles of star-block copolymer as nanoreactors for preparation of gold nanoparticles. *Polymer*, 47(26), 8480– 8487. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.09.071
- Li, X., & Chen, L. (2016). Fluorescence probe based on an amino-functionalized fluorescent magnetic nanocomposite for detection of folic acid in serum. ACS Applied Materials and Interfaces, 8(46), 31832–31840. https://doi.org/10.1021/acsami.6b10163
- Li, Y. Z., Li, C. J., Pinto, a V, & Pardee, a B. (1999). Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 5(4), 232–239.
- Liu, P., Chen, D., & Shi, J. (2013). Chemical constituents, biological activity and agricultural cultivation of Aloe vera. Asian Journal of Chemistry, 25(12), 6477–6485. https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.14418
- Liu, T., Tian, J., Chen, Z., Liang, Y., Liu, J., Liu, S., ... Yang, X. (2014). Anti-TROP2 conjugated hollow gold nanospheres as a novel nanostructure for targeted photothermal destruction of cervical cancer cells. *Nanotechnology*, 25(345103), 1–11. https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/34/345103
- Lizarbe Iracheta, M. A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 101*(2), 1–33.
- Logaranjan, K., Raiza, A. J., Gopinath, S. C. B., Chen, Y., & Pandian, K. (2016). Shape- and Size-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract and Their Antimicrobial Activity. *Nanoscale Research Letters*, *11*(520), 1–9.

https://doi.org/10.1186/s11671-016-1725-x

- Loos, M. (2015). Nanoscience and Nanotechnology 1. In S. Ebnesajjad (Ed.), *Carbon Nanotube Reinforced Composites* (Edition 1, pp. 1–36). The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK: William Andrew. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1
- Lorusso, D., Petrelli, F., Coinu, A., Raspagliesi, F., & Barni, S. (2014). A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, *133*(1), 117–123. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.01.042
- Lucas, T. M., Moiseeva, E. V., Zhang, G., Gobin, A. M., & Harnett, C. K. (2013). Thermal properties of infrared absorbent gold nanoparticle coatings for MEMS applications. *Sensors* and Actuators, A: Physical, 198, 81–86. https://doi.org/10.1016/j.sna.2013.04.033
- Lyons, S. K., Patrick, P. S., & Brindle, K. M. (2013). Imaging mouse cancer models in vivo using reporter transgenes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(8), 685–699. https://doi.org/10.1101/pdb.top069864
- Machado, J. P., & Lie Concepción, A. E. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. Rev. Cienc. Méd. La Habana, 18(2), 1–16.
- Malassis, L., Dreyfus, R., Murphy, R. J., Hough, L. A., Donnio, B., & Murray, C. B. (2016). One-step green synthesis of gold and silver nanoparticles with ascorbic acid and their versatile surface post-functionalization. *RSC Adv.*, 6(39), 33092–33100. https://doi.org/10.1039/C6RA00194G
- Marongiu, D. (2010). Scuola di dottorato in Nanostrutture e Nanotecnologie Top-down and bottom-up approach to self-assemble multifunctional porous lms. Università Degli Studi Di

Milano-Bicocca.

- Melo, F. R., Benevides, N. M. B., Pereira, M. G., Holanda, M. L., Mendes, F. N. P., Oliveira, S. R. M., ... Silva, L. M. C. M. (2004). Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga Vidalia obtusiloba C . Agardh. *Revista Brasil Bot.*, 27, 263–269. https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200006
- Méndez-Sánchez, S. C. (2009). Efeitos Do Composto Mesoiônico Mi-D E Da Imida Cíclica S2.
  2 Sobre Mecanismos Relacionados À Indução De Morte Celular Por Via Mitocondrial.
  Universidade Federal Do Paraná.
- Menezes, W. G., Zielasek, V., Thiel, K., Hartwig, A., & Bäumer, M. (2013). Effects of particle size, composition, and support on catalytic activity of AuAg nanoparticles prepared in reverse block copolymer micelles as nanoreactors. *Journal of Catalysis*, 299, 222–231. https://doi.org/10.1016/j.jcat.2012.12.006
- Menon, S., S., R., & S., V. K. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, 0, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.08.002
- Meza-junco, J., Montaño-loza, A., & Aguayo-gonzález, Á. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 58(1), 56–70.
- Mikhailovna Egorova, E., Amirkhanovich Kubatiev, A., & Ivanovich Schvets, V. (2016). Biological Effects of Metal Nanoparticles.
- Moghaddasi M, S., & Kumar Verma, S. (2011). Aloe vera their chemicals composition and applications: A review. *Int J Biol Med*, 2(1), 466–471.
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2002). Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus Fusarium oxysporum.

*Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *3*(5), 461–463. https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020503)3:5<461::AID-CBIC461&gt;3.0.CO;2-X

- Muralikrishna, T., Pattanayak, M., & Nayak, P. L. (2014). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using (ALOE VERA) Aqueous Extract. World Journal of Nano Science & Technology, 3(2), 45–51. https://doi.org/10.5829/idosi.wjnst.2014.3.2.111
- Navas Contino, M., Alfonso Arbolaez, L. E., & Guerra Rodríguez, I. (2009). Apoptosis: Muerte Celular Programada. Aspectos Generales Y Su Relación Con Las Enfermedades Cardiovasculares. APOPTOSIS: MUERTE CELULAR PROGRAMADA. ASPECTOS GENERALES Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARESCorSalud, 1(2), 1–9.
- Nedyalkov, N., Koleva, M., Stankova, N., Nikov, R., Terakawa, M., Nakajima, Y., ... Iordanova, R. (2017). Laser-assisted fabrication of gold nanoparticle-composed structures embedded in borosilicate glass. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8, 2454–2463. https://doi.org/10.3762/bjnano.8.244
- Nedyalkov, N. N., Atanasov, P. A., Toshkova, R. A., Gardeva, E. G., Yossifova, L. S., Alexandrov, M. T., & Karashanova, D. (2012). Laser heating of gold nanoparticles: photothermal cancer cell therapy. *Proceedings of SPIE*, 8427(84272P), 1–7. https://doi.org/10.1117/12.921776
- Nguyen, K. T. (2012). Photothermal Therapy and Nanomaterials. *J*, *02*(04), 1–2. https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000e112
- Oh, J., Yoon, H., & Park, J. H. (2013). Nanoparticle platforms for combined photothermal and photodynamic therapy. *Biomedical Engineering Letters*, 3, 67–73. https://doi.org/10.1007/s13534-013-0097-8

- Panikkanvalappil, R., Theruvakkattil, S., Samal, K., & Thalappil, P. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews*, 2, 1–62. https://doi.org/10.3402/nano.v2i0.5883
- Parak, W. J., Simmel, F. C., & Holleitner, A. W. (2010). Top-Down Versus Bottom-Up. In G. Schmid (Ed.), *Nanotechnology. Volume 1: Principles and Fundamentals*. (First Edit, pp. 1– 2664). Wiley-VCH. https://doi.org/10.1002/9783527628155.nanotech073
- Pardo, C., de Vries, E., Buitrago, L., & Gamboa, O. (2017). Atlas de mortalidad por cancer en Colombia (Cuarta edi, pp. 1–124). Bogotá Colombia: Instituto Nacional de Cancerología.
- Pattani, V. P., Shah, J., & Atalis, A. (2015). Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(20), 11. https://doi.org/10.1007/s11051-014-2822-3
- Pazo Cid, R. A., Álvarez, A., Cebollero de Miguel, A., Agustín, M. ., & Martínez Lostao, L. (2013). Apoptosis, cáncer & Co. *Revista Internacional de Grupos de Investigación Oncológica.*, 1(1), 23–28.
- Pérez Hernández, M. (2016). Estudio del mecanismo molecular de apoptosis y de la seguridad de la terapia fototérmica aplicada al tratamiento del cáncer utilizando nanoprismas de oro funcionalizados. Universidad Zaragoza.
- Pérez, J., Bax, L., & Escolano, C. (2005). *Roadmap Report on Nanoparticles* (Edition 1). Barcelona, España: Willems & van den Wildenberg (W&W).
- Pestov, A., Nazirov, A., Privar, Y., Modin, E., & Bratskaya, S. (2016). Role of Au(III) coordination by polymer in "green" synthesis of gold nanoparticles using chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 457–464. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.102

- Pileni, M.-P. (2003). The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. *Nature*, 2(March), 145–150.
- Porter, C. L. (1967). Taxonomy of Flowering Plants.
- Prasanna, S. W., Poorani, G., Kumar, M. S., Aruna, P., & Ganesan, S. (2014). Photodynamic efficacy of Rosebengal-gold nanoparticle complex on Vero and HeLa cell lines. *Materials Express*, 4(5), 359–366. https://doi.org/10.1166/mex.2014.1173
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Kannan, C., & Annadurai, G. (2013). Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using Turbinaria conoides and its characterization. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 44. https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-44
- Raksha, B. (2014). Bioactive Compounds and Medicinal Properties of Aloe Vera L.: An Update. Journal of Plant Sciences (Science Publishing Group), 2(3), 102–107. https://doi.org/10.11648/j.jps.20140203.11
- Rao, C. N. R., Thomas, P. J., & Kulkarni, G. U. (2007). Nanocrystals: Synthesis, Properties and Applications. (R. Hull, J. R. M. Osgood, J. Parisi, & H.Warlimont, Eds.), Computing in Science & Engineering (First edit, Vol. 3). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1109/MCISE.2001.963423
- Rathinaraj, P., Lee, K., Park, S.-Y., & Kang, I.-K. (2015). Targeted images of KB cells using folate-conjugated gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 10(5), 1–10. https://doi.org/10.1186/s11671-014-0725-y
- Rider, A. E., Ostrikov, K., & Furman, S. A. (2012). Plasmas meet plasmonics: Everything old is new again. *European Physical Journal D*, 66(226), 1–19. https://doi.org/10.1140/epjd/e2012-30273-3

Rodríguez, F. D. D. C. (2012). Introducción a los nanomateriales. Lecturas de ingería 20. UNAM.

- Rodríguez, M. R. (2008). Virus del PaPiloma Humano. (Junta de Andalucía. Consejería de Salud,Ed.), Andalucia mayo 2008 (Edition 1). Andalucia, España: OBEMEDIA S.C.
- Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: I . Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de La Extensión Portuguesa ULA*, 4(3), 92–106.
- Sadalla, J. C., Moreira De Andrade, J., Nogueira Dias Genta, M. L., & Chada Baracat, E. (2015). Cervical cancer : what 's new? *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, *61*(6), 536–542.
- Salgin, S., Salgin, U., & Bahadir, S. (2012). Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: The effects of ion types and ionic strengths. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(12), 12404–12414.
- Sanchez-dominguez, M., Aubery, C., Solans, C., Investigación, D., Avanzados, M., Cimav, S. C., & Monterrey, U. (2012). New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media. In A. Hashim (Ed.), *Smart Nanoparticles Technology* (Primera ed, pp. 195–220). Rijeka, Croatia: InTech.
- Sandoval Yoval, L., Montellano Palacios, L., Piña Soberanis, M., & Sánchez Guzmán, L. O. (2000). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. Ciencia y conciencia compromiso nacional con el medio ambiente: memorias técnicas. México D.F, México.
- Sau, T. K., & Rogach, A. L. (2010). Nonspherical noble metal nanoparticles: Colloid-chemical synthesis and morphology control. *Advanced Materials*, 22(16), 1781–1804. https://doi.org/10.1002/adma.200901271

Sen, I. K., Maity, K., & Islam, S. S. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using a glucan

of an edible mushroom and study of catalytic activity. *Carbohydrate Polymers*, *91*(2), 518–528. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.058

- Shah, M., Badwaik, V., Kherde, Y., Waghwani, H. K., Modi, T., Aguilar, Z. P., ... Dakshinamurthy, R. (2014). Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications Monic. *Frontiers in Bioscience*, 19(June), 1320–1344.
- Shane, B. (2008). Folate and vitamin B 12 metabolism : Overview and interaction with riboflavin , vitamin B 6 , and polymorphisms. *Nutrition*, 29(2 (Supplement)), S5-15. https://doi.org/10.1177/15648265080292S103
- Singh, M., Kalaivani, R., Manikandan, S., Sangeetha, N., & Kumaraguru, A. K. (2013). Facile green synthesis of variable metallic gold nanoparticle using Padina gymnospora, a brown marine macroalga. *Applied Nanoscience*, 3(2), 145–151. https://doi.org/10.1007/s13204-012-0115-7
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 2(6), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006
- Siwowska, K., Schmid, R., Cohrs, S., Schibli, R., & Müller, C. (2017). Folate Receptor-Positive Gynecological Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceuticals*, 10(72), 1–17. https://doi.org/10.3390/ph10030072
- Solon, L. R., Aronson, R., & Gould, G. (1961). Physiological Implications of Laser Beams: The very high radiation flux densities of optical masers point to important biomedical applications. *Science*, *134*(3489), 1506–1508. https://doi.org/10.1126/science.134.3489.1506

Sperling, R. A. (2008). Surface Modification and Functionalization of Colloidal Nanoparticles.

Wiesbaden-Marburg-Lahn.Philipps-UniversitätMarburg.https://doi.org/10.1021/cm801894w

- Spirin, M. G., Brichkin, S. B., & Razumov, V. F. (2008). Studies on absorption spectra of uniform gold nanoparticles prepared in Triton X-100 reverse micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology* A: Chemistry, 196(2–3), 174–179. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.12.014
- Stalmashonak, A., Seifert, G., & Abdolvand, A. (2013). Ultra-Short Pulsed Laser Engineered Metal-Glass Nanocomposites. (E. Babaev, M. Bremer, X. Calmet, F. Di Lodovico, M. Hoogerland, E. Le Ru, ... A. Whitaker, Eds.) (Primera Ed). Barleben, Alemania: Editorial Board. https://doi.org/10.1007/978-3-319-00437-2
- Stern, J. M., Stanfield, J., Lotan, Y., Park, S., Hsieh, J.-T., & Cadeddu, J. a. (2007). Efficacy of Laser-Activated Gold Nanoshells in Ablating Prostate Cancer Cells in Vitro. *Journal of Endourology*, 21(8), 939–943. https://doi.org/10.1089/end.2007.0437
- Subbiah, R., Veerapandian, M., & Yun, K. S. (2010). Nanoparticles : Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Current Medicinal Chemistry*, 17(October), 4559–4577. https://doi.org/10.2174/092986710794183024
- Sujitha, M. V., & Kannan, S. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.042
- Sun, H., Jia, J., Jiang, C., & Zhai, S. (2018). Gold nanoparticle-induced cell death and potential applications in nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(754), 1–20. https://doi.org/10.3390/ijms19030754

- Tai-Nin Chow, J., Williamson, D. A., Yates, K. M., & Goux, W. J. (2005). Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydrate Research*, 340(6), 1131–1142. https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.02.016
- Tatarchuk, V. V., Sergievskaya, A. P., Bulavchenko, A. I., Zaikovsky, V. I., Druzhinina, I. A., Korda, T. M., ... Alexeyev, A. V. (2011). Di-(2-ethylhexyl) dithiophosphoric acid surface protected gold nanoparticles: Micellar synthesis, stabilization, isolation, and properties. *Gold Bulletin*, 44(4), 207–215. https://doi.org/10.1007/s13404-011-0031-8
- Thanh, N. T. K., & Green, L. A. W. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3), 213–230. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.05.003
- Thomas, A. H., Suárez, G., Cabrerizo, F. M., García Einschlag, F. S., Martino, R., Baiocchi, C., ... Capparelli, A. L. (2002). Photochemical behavior of folic acid in alkaline aqueous solutions and evolution of its photoproducts. *Helvetica Chimica Acta*, 85(8), 2300–2315. https://doi.org/10.1002/1522-2675(200208)85:8<2300::AID-HLCA2300>3.0.CO;2-B
- Thomas, J. (2014). One-pot synthesis and characterisation of alkyl functionalised silicon nanoparticles, using an inverse micelle based method. University of East Anglia.
- Tiede, K., Boxall, A. B., Tear, S. P., Lewis, J., David, H., & Hassellov, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives* and Contaminants, 25(7), 795–821. https://doi.org/10.1080/02652030802007553
- Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., & Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4(e2589), 1–15. https://doi.org/10.7717/peerj.2589
- Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. a., & Singh, S. R. (2011). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, *1*(1), 31–63.

https://doi.org/10.3390/nano1010031

- Tojo, C., De Dios, M., & Barroso, F. (2011). Surfactant Effects on Microemulsion-Based Nanoparticle Synthesis. *Materials*, *4*, 55–72. https://doi.org/10.3390/ma4010055
- Tréguer-Delapierre, M., Majimel, J., Mornet, S., Duguet, E., & Ravaine, S. (2008). Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Gold Bulletin*, 41(2), 195–207. https://doi.org/10.1007/BF03216597
- Tsai, S. W., Liaw, J. W., Hsu, F. Y., Chen, Y. Y., Lyu, M. J., & Yeh, M. H. (2008). Surfacemodified gold nanoparticles with folic acid as optical probes for cellular imaging. *Sensors*, 8(10), 6660–6673. https://doi.org/10.3390/s8106660
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A Study Of The Nucleation And Growth Processes In The Synthesis Of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55– 75.
- Unchern, S. (1999). Basic techniques in animal cell culture. Drug Delivery, August(19-20), 1-30.
- Vázquez Márquez, A., González Aguilera, J., de la Cruz Chávez, F., Almirall Chávez, A. M., & Valdés Martínez, R. (2008). Factores de riesgo del cáncer de cérvix uterino Risk factors of cervicouterine cancer. *Rev Cubana Obstet Ginecol*, 34(2), 1–15.
- Vijayakumar, S., & Ganesan, S. (2013). Size-dependent in vitro cytotoxicity assay of gold nanoparticles. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95(2), 277–287. https://doi.org/10.1080/02772248.2013.770858
- W.Siegel, R., Hu, E., & M.C.Roco. (1999). Nanostructure Science and Technology: R. and D. Status and Trends in Nanoparticules, Nanostructured Materials, and Nanodevices. (R. W. Siegel, E. Hu, D. Cox, H. Goronkin, L. Jelinski, C. C. Koch, ... D. Shaw, Eds.) (Primera Ed). Baltimore, Maryland: Springer-Science+Business Media, B.V. https://doi.org/10.1007/978-

94-015-9185-0

- Wang, A., Ng, H. P., Xu, Y., Li, Y., Zheng, Y., Yu, J., ... Fu, L. (2014). Gold Nanoparticles : Synthesis , Stability Test , and Application for the Rice Growth. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1–6.
- Waters, C. A., Mills, A. J., Johnson, K. A., & Schiffrin, D. J. (2003). Purification of dodecanethiol derivatised gold nanoparticles. *The Royal Society of Chemistry*, 1, 540–541.
- Weber, L., DeForce, E., & Apprill, A. (2017). Optimization of DNA extraction for advancing coral microbiota investigations. *Microbiome*, 5(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0229-y
- Whitesides, G. M. (2005). Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 1(2), 172–179. https://doi.org/10.1002/smll.200400130
- Wibowo, A. S., Singh, M., Reeder, K. M., Carter, J. J., Kovach, A. R., Meng, W., ... Dann, C. E. (2013). Structures of human folate receptors reveal biological traf fi cking states and diversity in folate and antifolate recognition. *PNAS*, *110*(38), 4–12. https://doi.org/10.1073/pnas.1308827110
- Woźniak, A., Malankowska, A., Nowaczyk, G., Grześkowiak, B. F., Tuśnio, K., Słomski, R., ... Jurga, S. (2017). Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(6), 1–11. https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y
- Wu, M., Chen, D., & Huang, T. (2001). Preparation of Au / Pt Bimetallic Nanoparticles in Waterin-Oil Microemulsions. *Chemistry of Materials*, (16), 599–606.
- Wu, W. K. K., Cho, C. H., Lee, C. W., Wu, K., Fan, D., Yu, J., & Yiu Sung, J. J. (2010). Proteasome inhibition: A new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Letters*,

293(1), 15–22. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.12.002

- Yeh, Y.-C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880. https://doi.org/10.1039/c1nr11188d
- Zhang, Y., Huang, R., Zhu, X., Wang, L., & Wu, C. (2012). Synthesis , properties , and optical applications of noble metal nanoparticle-biomolecule conjugates. *Chinese Science Bulletin.*, 57(2–3), 238–246. https://doi.org/10.1007/s11434-011-4747-x
- Zhang, Y., Xu, D., Li, W., Yu, J., & Chen, Y. (2012). Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEp-2 and Canine MDCK Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1–8. https://doi.org/10.1155/2012/375496
- Zhang, Z., Jia, J., Lai, Y., Ma, Y., Weng, J., & Sun, L. (2010). Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(15), 5528–5534. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.045
- Zhou, F., Xing, D., Ou, Z., Wu, B., Resasco, D. E., & Chen, W. R. (2014). Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2), 1–7. https://doi.org/10.1117/1.3078803
- Zielinska-jurek, A., Nadolna, J., Zieli, A., & Reszczy, J. (2012). Nanoparticles Preparation Using Microemulsion Systems. In R. Najjar (Ed.), *Microemulsions – An Introduction to Properties* and Applications (Primera ed, pp. 229–250). Polonia: InTech. https://doi.org/10.5772/2300
- Zwicke, G. L., Mansoori, G. A., & Jeffery, C. J. (2012). Targeting of Cancer Nanotherapeutics. *Nano Reviews*, *3*(18496), 1–11.

# Apéndices

Apéndice A. El espaciamiento interplanar del cristal de oro (Å), intensidad y valores

cristalográficos HKL del JCPDS-PDF 04-0784

Simetría		Cubica
D-espaciamiento	Intensidad	(HKL)
(Å)		
2.3550	100	(111)
2.0390	52	(200)
1.4420	32	(220)
1.1774	12	(222)

Apéndice B. Condiciones de preparación del extracto de Aloe Vera

Condición	Medida
Temperatura de ebullición	93°C
Tiempo de ebullición del extracto	2 h
Cantidad de cristales	30 gramos
Cantidad de agua desionizada	100 mL al aforo.
Poro de filtrado	0.5 mm
Reducción del extracto en ebullición	50%
Temperatura de filtrado	Ambiente