



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias

**“CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS EN MEDIO
FISIOLÓGICO Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN LA
VASCULATURA”**

Tesis profesional para obtener el título de:

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA Y ENERGÍAS RENOVABLES

Presenta

JOSÉ RAFAEL MOTILLA MONTES

Directora de tesis

DRA. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ CASTILLO

Co-directora de tesis

DRA. GABRIELA NAVARRO TOVAR



San Luis Potosí. S.L.P.

Julio 2019



Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de oro sintetizadas en medio fisiológico y su evaluación biológica en la vasculatura por Jose Rafael Motilla Montes se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-SinDerivadas 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Este proyecto se realizó en el LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA CELULAR de la Facultad de Ciencias Químicas y en el Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, y fue apoyado por el proyecto del Fondo de Apoyo a la Investigación **C16-PIFI-09-08.08.**

Los datos de este proyecto se encuentran bajo el resguardo del Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias Químicas y le pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

I. Resumen

En este trabajo, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) en medio fisiológico, se dilucidaron los componentes esenciales para llevar a cabo la síntesis y se optimizó el proceso. Para el seguimiento de la formación de las AuNPs se utilizó la espectroscopía UV-Vis. Una vez determinadas las condiciones óptimas para formación de AuNPs se realizaron análisis para la caracterización fisicoquímica de las partículas los cuales indicaron que las AuNPs sintetizadas son amorfas con tamaños de 22.7 ± 5.82 nm de diámetro con carga superficial de entre -28 y -26 mV. Posteriormente, con la finalidad de evaluar los efectos biológicos de las AuNPs en la vasculatura; se observó el tono vascular de anillos de aorta, que se expusieron a concentraciones crecientes de AuNPs, los cuales presentaron vasodilatación independientes de la producción de óxido nítrico (NO), sugiriendo que otros mediadores podrían estar regulando los efectos de las AuNPs. Las características y efectos mostrados por estas nanopartículas indican que podrían usarse en aplicaciones médicas, sin embargo, más estudios de biocompatibilidad son necesarios.

II. Introducción

Dentro de las síntesis de nanomateriales metálicos, uno de los procesos más versátiles dentro del enfoque bottom up para fabricación de nanomateriales es el proceso de síntesis coloidal: consiste en disolver una sal metálica (precursor) que será reducido por otra sustancia (agente reductor) y algún agente que este en el medio que delimite el tamaño de estas partículas a través de diferentes mecanismos (agente estabilizante). La distribución de tamaños, la estabilidad del coloide y la forma de las partículas en suspensión estarán dadas por las concentraciones del precursor, agente reductor y del agente estabilizante.

En la literatura se reportan métodos de síntesis de AuNPs empleando agentes reductores y/o estabilizantes de baja toxicidad, buscando disminuir la complejidad en el sistema que conlleva el uso de extractos o sistemas biológicos. Ejemplos de estas sustancias son: ácido cítrico¹, el ácido gálico², el HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico), un amortiguador de pH y que se reporta funciona como estabilizante y reductor³⁻⁷, y glucosa⁸⁻¹¹.

Las ciencias de la salud han aprovechado y han explotado los nuevos fenómenos que presentan los nanomateriales para el diseño de nuevos dispositivos médicos. Entre las propiedades que presentan las nanopartículas se tiene un incremento considerable en área superficial en comparación con su contraparte macroscópica, gracias a su tamaño sus interacciones se rigen por la mecánica cuántica derivando en nuevos fenómenos ópticos, magnéticos, entre otros.

Uno de los materiales más usados en la nanomedicina son las nanopartículas de oro (AuNPs), las cuales han cobrado importancia por su alta estabilidad física y química, a la facilidad con la que se pueden funcionalizar con moléculas orgánicas y biológicas, y a que presenta el fenómeno de plasmón de resonancia superficial el cual se aprovecha en aplicaciones como imagenología y terapia térmica^{12,13}.

El fenómeno de plasmon de resonancia superficial o SPR (por sus siglas en inglés: surface plasmon resonance)¹⁴, el cual está presente en los nanomateriales metálicos, consiste en la oscilación colectiva de electrones en la banda de conducción y que es consecuencia de su confinamiento en un material con dimensiones en la nanoescala^{18,50,22}. Debido a este fenómeno las propiedades ópticas del oro se ven modificadas: pasa de mostrar propiedades ópticas lineales a presentar propiedades no lineales¹⁵.

La determinación del plasmón de resonancia superficial se puede utilizar como indicativo de la formación de nanopartículas y de su forma o tamaño ya que solo se va a presentar en nanomateriales y la interacción de estas nanopartículas con la luz va a depender del tamaño y la morfología del material¹⁶., resultando en diversas coloraciones en las soluciones coloidales de nanopartículas hechas del mismo material.

En el área biomédica, además de buscar incorporar tecnologías más novedosas y eficaces para el tratamiento y diagnóstico médico, se busca que los vehículos de entrega o el material del dispositivo que se emplee, no provoque una respuesta adversa sobre el sistema inmunológico, por ello se ha considerado el uso del oro, que tradicionalmente se considera como un material inerte y biocompatible¹⁷. A pesar de lo anterior hay un gran número de estudios que reportan diversos aspectos y abordajes toxicológicos de las AuNPs, los cuales no llegan a un consenso general sobre la seguridad en su uso.

El acelerado paso al cuál estas tecnologías se han ido desarrollando no solo se hace evidente la necesidad de un estudio a profundidad de las nanopartículas de oro en los sistemas biológicos, también refleja la urgencia de dilucidar sus efectos y mecanismos fisiológicos, las dosis a las cuales pueden emplearse, bajo qué y cuales características físico-químicas pueden utilizarse, razones por las cuales sintetizar AuNPs a partir de biorreactores o procesos fisiológicos, podría contribuir en mejorar la biocompatibilidad de las AuNPs en diversos sistemas biológicos y en consecuencia, el éxito de sus aplicaciones biomédicas¹⁸.

III. Objetivo

1. Objetivo general

Dilucidar las condiciones y componentes existentes en un medio fisiológico, que contribuyan en la formación de AuNPs biológicamente activas.

2. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de oro a partir de HAuCl_4 en medio fisiológico a pH de 7.4, modificando algunos de los componentes del medio.
2. Modificar los tiempos de reacción para obtener las AuNPs en medio fisiológico en las diferentes condiciones propuestas, evaluando la formación de estas mediante espectrofotometría UV-Vis.
3. Determinar el tamaño de partícula y carga superficial obtenidos al finalizar la reacción, mediante dispersión dinámica de luz y potencial Z, respectivamente.
4. Caracterizar morfológicamente las AuNPs obtenidas, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

5. Analizar fisiológicamente en anillos aislados de aorta de rata *Wistar*, las AuNPs sintetizadas y caracterizadas en medio fisiológico.

IV. Metodología

1. Síntesis de AuNPs

La síntesis con la cual se iniciaron experimentos consistió en adicionar ácido cloroáurico (HAuCl_4) a una solución fisiológica en un baño recirculador. Los componentes de la solución fisiológica que se empleó son NaCl, KCl, CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4 , dextrosa y HEPES y que se ajustó un pH de 7.4 ± 0.5 con NaOH 0.1 M.

Síntesis posteriores se llevaron a cabo siguiendo condiciones similares y adicionando agentes estabilizantes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), citrato de sodio y almidón. También se realizaron cambios en las concentraciones de los componentes de la solución fisiológica para evaluar el efecto de su presencia en la síntesis.

2. Caracterización fisicoquímica de AuNPs

Se monitorizó la formación de las AuNPs con el espectrómetro UV-Vis USB4000-UV-VIS de Ocean Optics y el espectrofotómetro JENWAY 7310.

Micrografías se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido FEI – Helios Nanolab 600 depositando la las AuNP's diluidas en agua sobre un sustrato de silicio policristalino. A partir de las micrografías se midió el diámetro de cien partículas y se obtuvo su valor promedio.

Para la determinación del potencial zeta y el diámetro hidrodinámico mediante dispersión Dinámica de Luz (DLS) se utilizó el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS. Las muestras se sonicaron antes y al momento de hacer las mediciones y se introdujeron los datos del medio en el cual estaban dispersas las partículas.

3. Bioensayo de anillos aislados de aorta de rata *Wistar*

Se evaluó el efecto de las AuNPs en el sistema cardiovascular mediante un sistema de anillos aislados de aorta de rata en presencia de endotelio (+E) y ausencia de este (-E). La obtención de los anillos aislados de aorta de ratas macho de la cepa *Wistar* (250-350 g) se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Las ratas *Wistar* se sacrificaron por resección de la aorta conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999¹⁹ basada en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH, Publicación No 92-3415 Bethesda, MD, EUA. 1992)²⁰. Estos procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP (CEID2014033).

Segmentos de aorta con o sin endotelio se suspendieron de un transductor isométrico Radnoti en baños de tejidos que contenían solución fisiológica a una temperatura de 37° C. Se aplicó una precarga y se mantuvieron en estabilización. Una

concentración de fenilefrina (Phe) 10 μM fue administrada para verificar la viabilidad y funcionalidad del tejido, así como control positivo de contracción. Posteriormente se procedió a la exposición de la aorta a las AuNPs administrando concentraciones crecientes de AuNPs en un rango de 0.001, a $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

Se determinó la producción de NO, cuantificada de manera indirecta a través de la formación de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3), empleando el método de Griess²¹ con alícuotas que fueron tomadas de la solución fisiológica donde se encontraban sumergidos los anillos de aorta al inicio y al final del ensayo.

Los cambios en la tensión se monitorearon en tiempo real mediante el software Poliview y se analizaron con el software Graph Pad 6.0 mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post hoc Tukey's HSD (honestly significant difference). Los resultados fueron considerados de significancia estadística cuando $p < 0.05$.

V. Resultados y discusión

1. Influencia de la incorporación de agentes estabilizantes a la solución fisiológica

Este trabajo inició replicando las condiciones fisiológicas que dieron paso a la síntesis de nanopartículas en medio fisiológico producto de observaciones previas y de gran relevancia, llevadas a cabo bajo la dirección de la Dra. María del Carmen González C en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias Químicas.

Durante los primeros experimentos, al inicio de la síntesis, se mostró un cambio en la coloración de la solución de un color amarillo a un rosa, lo cual apuntó a la formación de nanopartículas seguido de una pérdida en su coloración y la formación de un precipitado al cabo de unos minutos. Mediante espectroscopía UV-Vis se corroboró la síntesis de AuNP's con la presencia de un pico de absorción en los 557 nm, sin embargo, esta intensidad decaía con el tiempo, que junto a la formación del precipitado se puede inferir que estas partículas tenían una baja estabilidad coloidal.

Se realizaron experimentos en donde se modificaron componentes de la solución fisiológica con la finalidad de mejorar la estabilidad de las partículas, lo cual se llevó a cabo incorporando citrato de sodio, almidón, CTAB y síntesis en condiciones semifisiológicas donde no se incluyó dextrosa y se añadió citrato de sodio. Lo anterior no condujo a una modificación significativa en los picos de absorción en los espectros e incluso en la mayoría de los casos se vio disminuida.

Posteriormente se buscó identificar cuáles de los componentes de la solución fisiológica era el responsable de síntesis de las nanopartículas, para ello se realizaron varios experimentos descartando componentes del medio fisiológico. Los cambios en la concentración de HEPES mostraron mayor efecto, al modificarse la intensidad y/o la longitud de onda con respecto a la síntesis original.

A partir de estos resultados se optó por evaluar un amplio rango de concentraciones cercanas a la concentración original y se monitorearon a través de UV-Vis con la finalidad

de ver cuál de estas mantenía una absorción constante durante 24 h y que por ende sería la síntesis con partículas más estables. De estas soluciones se determinó en un rango de concentraciones de HEPES donde las AuNPs sintetizadas eran más estables ya que su absorción no decaía con el tiempo y lograban mantener su coloración, lo que era un indicativo de una mejoría en la estabilidad coloidal.

Se evaluó el efecto que tendría sobre la estabilidad remover las sales en un rango de concentraciones de HEPES. Las AuNPs sintetizadas en ausencia de sales mostraron una mejoría significativa: la coloración de las soluciones se mantenía, los colores eran claros y sus espectros de absorción donde los picos eran más definidos. Lo anterior era indicio de que las AuNPs sintetizadas eran estables.

Ya que se infería que las AuNPs sintetizadas en ausencia de sales eran estables se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. Las micrografías mostraron nanopartículas amorfas y polidispersas con un diámetro promedio 22.7 ± 5.82 nm.

Los resultados arrojados por el análisis de potencial zeta mostraron que las AuNPs poseen una buena estabilidad coloidal durante su análisis con potencial zeta, cercano a los 30 mV²². Mediante un análisis con DLS se determinó que las AuNPs, eran polidispersas, a excepción de la muestra de HEPES 20 mM que presentó una adecuada polidispersión.

2. Efectos biológicos duales de las AuNPs sobre anillos aislados de aorta de rata

Se evaluó la acción de las AuNPs provenientes de una síntesis solo con HEPES a una temperatura de 37 °C y 24 horas de tiempo de síntesis.

Se observó que las AuNPs en presencia de endotelio vascular, presentan un efecto dual de contracción y relajación, mientras que si se remueve el endotelio existe un efecto relajante, sugiriendo que las AuNPs ejercen su acción sobre el músculo.

Con la finalidad de proponer un posible mecanismo activado por las AuNPs se determinaron los niveles de NO. Los resultados mostraron que no hay cambios significativos, lo que se puede sugerir que la acción de las AuNPs es independiente a este mediador, al menos en la ventana de tiempo en la que se realizaron esos abordajes experimentales.

Un posible mecanismo por el cual las AuNPs podrían estar ejerciendo sus efectos vasodilatadores es a través de la generación de derivados del ácido araquidónico (AA), como las prostaglandinas^{23,24}.

VI. Conclusiones

En este trabajo, se logró la síntesis de AuNPs en un medio similar a las condiciones fisiológicas de evaluación de nanopartículas. Se evaluó la variación de varios parámetros, como incorporación de agentes estabilizantes, variación en concentraciones de HEPES y la presencia de sales. Se determinó que las condiciones más adecuadas para obtener AuNPs estables a pH 7.4 con HEPES en ausencia de sales. Las caracterizaciones de las AuNPs demostraron que las partículas son amorfas y poseen 22.7 ± 5.82 nm de diámetro, con carga

superficial de entre -28 y -26 mV. Estas AuNPs demostraron tener un efecto vasodilatador si interaccionan directamente con el músculo liso de anillos aislados de aorta de rata, al lograr un mayor control sobre la composición superficial de la nanopartícula, a través de una síntesis más sencilla^{25,26}. Las acciones inducidas por las AuNPs sugieren que el mecanismo de acción es independiente de NO, por lo que otros mediadores o combinaciones de ellos podrían estar regulando los efectos de las NPs sobre el tono vascular, uno de los potenciales candidatos a estudiar serían las prostaglandinas, específicamente la PGI₂, y sus posibles vías de señalización involucradas.

VII. Bibliografía

1. Newman, J. D. S. & Blanchard, G. J. Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents. *Langmuir* **22**, 5882–5887 (2006).
2. Reyes-Macías, J. F. *et al.* Preparation and bactericide activity of gallic acid stabilized gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **12**, 2741–2746 (2010).
3. Habib, A., Tabata, M. & Wu, Y. G. Formation of gold nanoparticles by Good's Buffers. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **78**, 262–269 (2005).
4. Saverot, S. *et al.* Facile, tunable, and SERS-enhanced HEPES gold nanostars. *RSC Advances* **6**, 29669–29673 (2016).
5. Li, H. *et al.* HEPES-involved hydrothermal synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their biological application. *RSC Advances* **5**, 5059–5067 (2015).
6. Chen, R. *et al.* Fabrication of gold nanoparticles with different morphologies in HEPES buffer. *Rare Metals* **29**, 180–186 (2010).
7. Xie, J., Lee, J. Y. & Wang, D. I. C. Seedless, surfactantless, high-yield synthesis of branched gold nanocrystals in HEPES buffer solution. *Chemistry of Materials* **19**, 2823–2830 (2007).
8. Jung, J., Raghavendra, G. M., Kim, D. & Seo, J. One-step synthesis of starch-silver nanoparticle solution and its application to antibacterial paper coating. *International Journal of Biological Macromolecules* **107**, 2285–2290 (2018).
9. Engelbrekt, C. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles with starch–glucose and application in bioelectrochemistry. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 7839 (2009).
10. Raveendran, P., Fu, J. & Wallen, S. L. A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. *Green Chem.* **8**, 34–38 (2006).
11. Raveendran, P., Fu, J. & Wallen, S. L. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 13940–13941 (2003).
12. Fabrizio, E. Di *et al.* Surface plasmon resonance in gold nanoparticles : a review. (2017).
13. Amendola, V. & Meneghetti, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. 3805–3821 (2009) doi:10.1039/b900654k.

14. Philip, R., Chantharasupawong, P., Qian, H., Jin, R. & Thomas, J. Evolution of nonlinear optical properties: From gold atomic clusters to plasmonic nanocrystals. *Nano Letters* **12**, 4661–4667 (2012).
15. Boyd, R. W. Nonlinear optics. **4**, 64–75 (2016).
16. Hu, M. *et al.* Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* **35**, 1084 (2006).
17. Jo, M.-R. *et al.* Toxicity and Biokinetics of Colloidal Gold Nanoparticles. *Nanomaterials* (2015) doi:10.3390/nano5020835.
18. Kitching, M., Ramani, M. & Marsili, E. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: Mechanism and scale up. *Microbial Biotechnology* **8**, 904–917 (2015).
19. Ochoa, L. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo* 1–58 (1999).
20. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2010). doi:10.2307/1525495.
21. Miranda, K. M., Espey, M. G. & Wink, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **5**, 62–71 (2001).
22. Gabor, F. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica* **79**, 701–702 (2011).
23. Prostaglandin | chemical compound | Britannica.com. <https://www.britannica.com/science/prostaglandin>.
24. Pocock, Gillian., Richards, C. D. & Madero García, S. *Fisiología humana : la base de la medicina*. (Masson, 2005).
25. Karthick, V. *et al.* Effect of biologically synthesized gold nanoparticles on alloxan-induced diabetic rats-An in vivo approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **122**, 505–511 (2014).
26. Du, L., Jiang, H., Liu, X. & Wang, E. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Escherichia coli* DH5 α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications* **9**, 1165–1170 (2007).