



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CAMPUS AEROPUERTO



Síntesis y Evaluación Toxicológica de Nanopartículas de Oro en Células de Cáncer Cervicouterino

Presenta

Fátima Selene Xocoyotl López

Exp. 236071

Para obtener el título de

Ingeniero Biomédico

Directora de Tesis

Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández

Codirectora:

Dra. Daniela Edith Salado Leza



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



FACULTAD
DE INGENIERÍA



**Síntesis y Evaluación Toxicológica de Nanopartículas de Oro en Células de
Cáncer Cervicouterino**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Ingeniería Biomédica

Presenta:

Fátima Selene Xocoyoti López

Director de Tesis:

Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández

Co-director:

Dra. Daniela Edith Salado Leza

Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández

Presidente

Dra. Daniela Edith Salado Leza

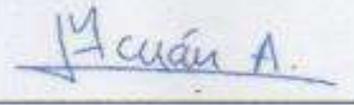
Secretario

Dr. Rufino Nava Mendoza

Vocal

E.S.R. y Físico Médico Juan Carlos Deheza Vázquez

Sinodal









Centro universitario, Querétaro, Qro.

Septiembre 2021

México

Dedicatoria.

“Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas. Sé curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos”

-Walt Disney-

A mi madre por su infinito amor incondicional, apoyo, motivación cuando más tuve dudas, comprensión, cariño y esfuerzo, quien siempre me impulso a confiar en mí.

A mi padre por todo su esfuerzo por siempre darme lo mejor, por su enorme carisma, cariño y apoyo, por ser mi ejemplo a seguir.

A mis hermanas Fer y Vale por siempre apoyarme y hacerme reír sin parar.

A mis amigos por motivarme y alegrar mi corazón y a mis maestros por todas sus enseñanzas y sabios consejos.

Y para los que ya no pudieron verme terminar este gran logro en mi vida, pero sé que siempre estuvieron ahí cuidándome desde lo más alto del manto estrellado, iluminando mi camino.

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Licenciatura en ingeniería Biomédica Campus Aeropuerto y al Laboratorio de Nanotecnología, UAQ.

Al Laboratorio de Polímeros, al Laboratorio Nacional de Ingeniería de la Materia Fuera de Equilibrio (LANIMFE) y al Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud (CIAAS) de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACyT) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A CONACYT por haber apoyado con recursos materiales a la realización de esta tesis mediante el proyecto Ciencia de Frontera 2019, número 53395 denominado Materiales Biomiméticos basados en sílice: un nuevo concepto para liberación de fármacos y herramientas de diagnóstico en contra de la tuberculosis.

A mis tutores:

A la Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández, por haber creído en mí, por todas sus enseñanzas, su infinita paciencia, sus sabios consejos, por ser una gran mujer en mi vida, por escucharme y abrirme las puertas de un nuevo mundo nanométrico y profesional, por sembrar en mí la semilla de la ciencia, pero sobre todo por ser el timón de mi barco.

A la Dra. Daniela Edith Salado Leza, por compartir conmigo sus conocimientos, su enorme pasión por la ciencia, por guiarme en este gran reto que escogí, por ser mi ejemplo de valentía, perseverancia y coraje, pero sobre todo por siempre impulsarme a sacar lo mejor de mí y ser el mapa de mi camino.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza, por contagiarme siempre de su buena actitud, por enseñarme nuevos caminos, por recordarme siempre sonreírle a la vida, por todas sus enseñanzas, cariño, apoyo y comprensión, por haberme acompañado en este largo camino de aprendizaje, así como las enormes cadenas de carbonos de los

polímeros, por facilitarme los medios necesarios para poder llegar al objetivo, pero sobre todo por ser las velas de mi barco.

Al E.S.R. y Físico-Médico Juan Carlos Deheza Vázquez, por su tiempo y disposición a compartirme sus experiencias profesionales y poder entender y complementar las necesidades de este proyecto y en un futuro sirva como base para la aplicación del mismo. Especialmente por ser el ancla al final del viaje.

A la M. en C. Ileri Segura Gutiérrez del Laboratorio de Nanotecnología, UAQ por brindarme su amistad, por ayudarme siempre en el laboratorio y hacer de este reto muy ameno el trayecto, por acompañarme en cada uno de los momentos más valiosos en la búsqueda del objetivo, así como la estrella del norte que guía, acompaña e ilumina los mares.

Al Dr. José Elías Pérez López del Instituto de Física de la UASLP, por su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Polímeros para medir potencial Z, y tamaño de partícula por DLS y TEM. Al Dr. Bernardo Yañez Soto del LANIMFE, por permitirme trabajar con las facilidades del laboratorio. Al Dr. José Gpe. Sampedro Pérez del Instituto de Física UASLP, por su apoyo con las mediciones de UV-VIS.

A la Dra. Brenda Acosta Ruelas de CIACyT de la UASLP por su apoyo con las mediciones de FTIR y por su increíble carisma que cualquiera que la conozca se contagia de su agradable actitud. A la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana de CIAAS de CIACyT en la UASLP por la donación de células HeLa (ATCC® CCL-2™) y por permitirme usar su gabinete de Bioseguridad Nivel 2 para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Juan de Dios Galindo del Laboratorio de Nanotecnología, UAQ por su apoyo con las mediciones de UV-VIS

Al Dr. José Santos Cruz de la Facultad de Química, UAQ por su apoyo con las mediciones de microraman.

Al M. en C. Fernando Morelos Medina y Jesús Valdés Hernández del Laboratorio de Nanotecnología, UAQ, por su interés y palabras de aliento para seguir adelante.

A los nuevos amigos que hice en este proyecto Laura, Daniela, Perla, Karim por hacer de mi estancia en la UASLP más amena y por brindarme su amistad.

A mis amigos de la universidad Sandy, Flor, Katy, Karla, Gabriel, Aner y Fausto por siempre apoyarme y hacer de mi vida universitaria una aventura y llena de momentos felices.

A mi familia por todo su amor, cariño y esfuerzo, pero sobre todo por su apoyo incondicional que sin duda fue mi impulso para no rendirme y culminar esta meta tan importante para mí y por todo eso les doy mis más sinceros agradecimientos.

Tabla de contenido

1	Resumen	11
2	Abstract	13
3	Introducción	14
4	Marco teórico	17
4.1	Nanotecnología.....	17
4.2	Aplicación de la nanotecnología en la medicina.....	18
4.3	Alternativas como tratamiento para cáncer.....	18
4.4	Nanopartículas de oro (NPs-Au).....	19
4.5	Poli(etilenglicol).....	20
4.6	Quercetina.....	21
4.7	Síntesis química asistida por radiación ultrasónica.....	23
5	Planteamiento del problema	24
6	Hipótesis	25
7	Objetivos	25
7.1	Objetivo general.....	25
7.2	Objetivos particulares.....	25
8	Materiales y métodos	26
8.1.1	Metodología de síntesis de las PEG-QE-NPsAu utilizando sonoquímica <i>in situ</i> (radiación ultrasónica aplicada directamente al medio de reacción).....	26
9	Técnicas de caracterización	28
9.1	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	28
9.2	Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	28
9.3	Potencial Z.....	28
9.4	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	29
9.5	Espectroscopía de UV-VIS.....	29
9.6	MicroRaman.....	30
10	Pruebas de citotoxicidad	30
10.1	Consideraciones de seguridad para el cultivo celular.....	30
10.2	Cultivo celular.....	30
10.3	Ensayo MTS.....	31
10.4	Ensayo LDH.....	32
10.5	Metodología MTS y LDH.....	33

11	Resultados.	35
11.1	Caracterización fisicoquímica	35
11.1.1	Espectroscopia UV-VIS.	35
11.1.2	Determinación del tamaño aproximado de las PEG-QE-NPsAu a través de los espectros de absorción de UV-Vis.	38
11.1.3	Espectroscopia de Infrarrojo FTIR.	39
11.1.4	Espectroscopia RAMAN	43
11.1.5	DLS.	45
11.1.6	Potencial Z	46
11.1.7	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	50
12	Resultados de evaluación toxicológica de PEG-QE-NPsAu	52
12.1	Resultados del ensayo MTS	52
12.2	Resultados del ensayo LDH.	56
13	Resumen de resultados.	57
14	Conclusión.	59
15	Referencias.	60
Anexos		64
A.		64
B.		76
C.		79
D.		81
E.		85

Lista de abreviaciones.

NP-Nanopartícula

NPs-Nanopartículas

Oro-Au

NPsAu-Nanopartículas de oro

QE- Quercetina

PEG-Poli (etilenglicol)

PEG-QE-NPsAu- poli (etilenglicol) 4000, quercetina, Nanopartículas de oro.

RU- Radiación Ultrasónica

H₂AuCl₄·3H₂O-Ácido cloroáurico

SPR- Resonancia del Plasmón Superficial

DLS-Dispersión dinámica de luz

Potencial Z- Potencial Zeta

H_d- Diámetro hidrodinámico

PDI- Índice de Polidispersidad

RAMAN- Espectroscopia MicroRaman

FTIR-Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier

TEM-Microscopía Electrónica de Transmisión

UV-Vis-Espectroscopía de UV-Vis

HeLa- Células HeLa (ATCC® CCL-2™)

MTS- Ensayo MTS

LDH- Lactato Deshidrogenasa

UV- Irradiación Ultravioleta

CaCu-Cáncer Cervicouterino

OMS-Organización Mundial de la Salud

nm-nanometros

U.S-United States

FDA-Food and Drug Administration

EPR- Efecto de Permeabilidad y Retención aumentada

NIR-Infrarrojo cercana

K-Kelvin

ATR-Técnica de Reflexión Atenuada

SDS-Dodecilsulfato Sódico

DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium

PMS-Metosulfato de Fenazina

DMSO- Dimetilsulfóxido

A_{SPR}-Absorbancia de las PEG-QE-NPsAu con la resonancia del plasmón superficial

A₄₅₀-Absorbancia en 450 nm

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1 Resumen.

La mayoría de las modalidades actualmente utilizadas para luchar contra el cáncer presentan una importante falta de especificidad dañando indistintamente células cancerosas y sanas. Para superar esta limitación, la nanomedicina resulta ser una buena alternativa para diagnosticar y tratar eficazmente neoplasias malignas localizadas o diseminadas. En este trabajo, se sintetizaron nanopartículas de oro (NPsAu) que en presencia de quercetina y poli (etilenglicol) (PEG-QE-NPsAu) mediante la química verde fue asistida con radiación ultrasónica (RU, 26 kHz), un método simple y verde en solución acuosa. La RU ha demostrado ser útil para generar nanopartículas con un notable control de tamaño y forma. Brevemente, la energía entregada por el fenómeno de cavitación acústica inducido por esta radiación induce reacciones químicas (sonoquímica), bajo condiciones suaves de temperatura y presión. Las PEG-QE-NPsAu se sintetizaron utilizando ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) como precursor metálico, quercetina (QE) como agente reductor y pro-fármaco natural anticanceroso, y poli (etilenglicol) estándar (PEG) como estabilizador. Se optimizaron las condiciones de síntesis; relaciones molares entre precursores, tiempo, y amplitud del sonotrodo. Los sistemas PEG-QE-NPsAu fueron analizados mediante varias técnicas de UV-Vis, para determinar la posición de la resonancia del plasmón superficial (SPR), Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta (Potencial Z), para evaluar el diámetro hidrodinámico (H_d) y la carga superficial, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), para analizar el tamaño y la forma del núcleo de la NP, y técnicas de espectroscopía vibracional, para analizar el recubrimiento orgánico. El resultado obtenido por UV-Vis mostró la desaparición de la señal de Au^{3+} la cual aparece a 310 nm lo cual sugiere una reducción completa del precursor (Au^{3+}) y la formación de las PEG-QE-NPsAu con un SPR localizado alrededor de 528 nm. Mientras que el análisis con DLS y Potencial Z las PEG-QE-NPsAu mostraron un H_d de 142.7 nm ($\text{Pdl} = 0.294$), una carga superficial de -14.96 mV al pH fisiológico. Con la espectroscopia MicroRaman y Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se identificaron bandas características de QE y PEG, a 528 cm^{-1} para C-O y el estiramiento del CH_2 a 2882 cm^{-1} en PEG, y aparece una nueva banda para la

interacción PEG-QE en 2980 cm^{-1} que se desplaza ligeramente y disminuye en intensidad a $2079\text{-}2971\text{ cm}^{-1}$, para el caso de PEG-QE-NPsAu, mientras que las señales en 3397 y 3266 cm^{-1} características de los estiramientos -OH para la QE, se ven drásticamente disminuidos o desaparecen, lo que sugiere una interacción Au-QE y de éstas con el PEG. Mientras que con la técnica HRTEM se observó el ensamblado de la PEG-QE-NPsAu con tamaños en un rango de 10 a 25 nm de los núcleos metálicos y una cubierta de 2.5 nm de la parte orgánica (PEG-QE). La toxicidad de las PEG-QE-NPsAu se evaluó utilizando células HeLa (ATCC® CCL-2™) cultivadas en monocapa mediante la realización de un protocolo MTS estándar y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Las células se incubaron 24 horas con las PEG-QE-NPsAu a concentraciones que variaban de 0.5 a 1000 ug/mL. Los resultados mostraron una dependencia de la dosis con una ligera disminución de la viabilidad. Se están realizando más ensayos in vitro para dilucidar el potencial terapéutico de las PEG-QE-NPsAu propuestos. Por lo tanto, se obtuvieron las QE-NPsAu pegiladas estables las cuales fueron sintetizadas y caracterizadas con éxito, en la perspectiva de generar nuevos conocimientos y proponer alternativas innovadoras basadas en nanotecnología verde para mejorar el rendimiento del tratamiento contra el cáncer.

Palabras clave: nanopartículas de oro que contienen quercetina, radiación ultrasónica, células HeLa.

2 Abstract.

Most of the currently used modalities to fight against cancer present an important lack of specificity damaging indistinctly healthy and cancer cells. To overcome this limitation, nanomedicine turns out to be a good alternative to effectively diagnose and treat localized or disseminated malignant neoplasms. In this work, gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized in presence of quercetin and poly (ethylene glycol) (PEG-QE-AuNPs) by green chemistry was assisted with ultrasonic radiation (UR, 26 kHz), a simple and green method in aqueous solution. The UR has proven useful for generating nanoparticles with remarkable size and shape control. Briefly, the energy delivered by the phenomenon of acoustic cavitation induced by this radiation induces chemical reactions (sonochemistry), under mild conditions of temperature and pressure. PEG-QE-AuNPs were synthesized using chloroauric acid ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) as a metal precursor, quercetin (QE) as a reducing agent and natural pro-drug anticancer, and standard poly (ethylene glycol) (PEG) as a stabilizer. Molar relationships between precursors, time, and amplitude of the sonotrode were optimized for the synthesis control. The PEG-QE-AuNPs systems were analyzed by various techniques of UV-Vis, to determine the position of surface plasmon resonance (SPR), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential (Potential Z), to evaluate the hydrodynamic diameter (H_d) and surface charge, Transmission Electron Microscopy (TEM), to analyze the size and shape of the NP core and vibrational spectroscopy techniques to analyze the organic coating. The result obtained by UV-Vis showed the disappearance of the precursor Au^{3+} signal which appears at 310 nm suggesting a complete reduction of the precursor (Au^{3+}) and the formation of the PEG-QE-AuNPs with an SPR located around 528 nm. While the analysis with DLS and Potential Z the PEG-QE-AuNPs showed a H_d of 142.7 nm ($\text{Pdl} = 0.294$), a surface charge of -14.96 mV at physiological pH. With MicroRaman spectroscopy and Fourier Transform Infrared Transmission Spectroscopy (FTIR) characteristic bands of QE and PEG were identified, at 528 cm^{-1} for C-O Characteristic bands of QE and PEG were identified, at 528 cm^{-1} for CO and the stretching of CH_2 at 2882 cm^{-1} in the case of PEG, a new band is observed for the PEG-QE interaction that appears at 2980 cm^{-1} , which shifts slightly and decreases in intensity at 2079-2971 cm^{-1} for the case of pegylated PEG-QE-NPsAu, while the

signals at 3397 and 3266 in cm^{-1} characteristic of the -OH stretches for QE, are drastically diminished or disappear, suggesting an Au-QE and of these with the PEG. While with the HRTEM technique, the PEG-QE-AuNPs assembly was observed with sizes in the range of 10 to 25 nm of the metallic nuclei and a 2.5 nm shell of the organic part (PEG-QE). The toxicity of PEG-QE-NPsAu was evaluated using monolayer cultured HeLa cells (ATCC® CCL-2™) by performing a standard MTS protocol and lactate dehydrogenase (LDH) release. Cells were incubated 24 hours with the PEG-QE-NPsAu at concentrations ranging from 0.5 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results showed a dose dependence with a slight decrease in viability. Further in vitro assays are underway to elucidate the therapeutic potential of the proposed PEG-QE-AuNPs. Therefore, stable pegylated QE-NPsAu were obtained, which were synthesized and characterized successfully, in the perspective of generating new knowledge and proposing innovative alternatives based on green nanotechnology to improve the performance of cancer treatment.

Keywords: quercetin-containing gold nanoparticles, ultrasonic radiation, HeLa cells

3 Introducción.

La nanotecnología desde hace algunos años ha tomado un auge muy importante en la ciencia y tecnología a nivel atómico y molecular, revolucionando no solo la

industrial, sino que también otras áreas importantes como la medicina. La nanotecnología ha formado parte de la historia del universo como en la del humano, porque implica desde el átomo más pequeño que lo conforma hasta la unidad más grande que existe.

La nanomedicina fue mencionada por primera vez por Robert A. Freitas en su libro *Nanomedicine* en 1999 y se ha seguido utilizado hasta nuestros tiempos, en el libro se menciona que se puede controlar y manipular los procesos de síntesis para el transporte de sustancias al cuerpo humano. La nanomedicina se puede definir como la ciencia que “estudia interacciones a nanoescala, utilizando dispositivos, sistemas y tecnologías que incluyen nanoestructuras capaces de interactuar a escala molecular y que se interconectan a nivel micro para interactuar en el nivel celular” (Lechuga, L., 2014, P.99).

Los desarrollos recientes en nanotecnología han introducido nanomateriales terapéuticos novedosos e inteligentes que básicamente aprovechan varios enfoques de focalización. Los nanomateriales dirigidos se unen selectivamente a las células cancerosas y previniendo el daño a células sanas. Las nanopartículas de oro (NPs-Au) son candidatos prometedores como alternativa de terapia combinada contra el cáncer debido a su biocompatibilidad, fácil síntesis y funcionalización, estabilidad físico-química y características ópticas ajustables (Mansoori, G., et al. 2010; Mehdizadeh, A., et al. 2014; Shakeri-Zadeh, A. et al. 2010).

En la última década, ha habido un avance significativo en la investigación de NPs Au, con un rápido aumento en las publicaciones relacionadas con el área de la biomedicina (Kreuter, J., 2007; Bazak, R., et al. 2014). La nanomedicina resulta ser una buena alternativa para el tratamiento de células cancerosas, aunque aún no se ha alcanzado una completa selectividad hacia a ellas, pues también las células sanas resultan dañadas, aunque en menor porcentaje que con los métodos tradicionales.

Existen diferentes tipos de síntesis para la obtención de nanopartículas metálicas y es por métodos utilizando reacciones redox, por sol-gel, microondas,

electroquímica, fotoquímica e irradiación ultravioleta (UV) que pueden llegar a ser costosos, tóxicos y producir residuos químicos que terminan en el agua, aire o suelo (Vera, G.P., et al. 2017).

Sin embargo, otra manera de obtener nanopartículas es por métodos naturales o biosíntesis, realizando química verde, un concepto dado a conocer por Anastas y Warner en 1988 con sus 12 principios de la química verde donde hablan de procesos y productos para disminuir riesgos en la salud, medio ambiente, reducción de desechos y la prevención de la contaminación, de manera que se sustituyan solventes químicos por extractos naturales o biomoléculas como agentes reductores de iones metálicos, respetando al medio ambiente, que no sean tóxicos y sean seguros, ecológicos y eco-amigables con el medio ambiente y; con la síntesis de nanopartículas (Vera, G.P., et al. 2017), por lo que no solo proporciona beneficios económicos también ambientales como opción alternativa de mejorar los métodos de síntesis de las nanopartículas, siendo este un medio sustentable.

La molécula de QE en la nanomedicina se utiliza como agente reductor de iones metálicos en la formación de NPs, una de sus propiedades está relacionada con su propiedad antioxidante que tiene la habilidad de expulsar radicales libres y quelar iones metálicos (Bollella, P., et al. 2016).

El uso de polímeros para recubrimiento de NPs, como el PEG es usado por ser biocompatible con el organismo, además de brindarles estabilidad debido a sus cadenas poliméricas hidrófilas, que son necesarias para el transporte y/o liberación del fármaco o NP, alcanzando los tejidos tumorales por retención pasiva (Martínez, Soler G.I., et al. 2010).

La síntesis mediada por radiación ultrasónica es un método verde que favorece la reducción de la sal precursora de oro, por lo que se utilizó para la obtención de las NPsAu y se evaluó el efecto de la variación de la relación del agente reductor (QE) y el agente estabilizador (PEG), para obtener nanoestructuras de oro de tamaño y forma homogéneos.

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes en México y el mundo. En 2018, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), murieron 311 000 mujeres por el cáncer cervicouterino (CaCU). Actualmente el cáncer cervicouterino se trata principalmente con cirugía, quimioterapia, teleterapia y braquioterapia modalidades que pueden llegar a ser muy agresivas para la paciente. Estos métodos para tratamiento del cáncer presentan muchas limitaciones, como la falta de especificidad y baja eficacia en la discriminación entre células sanas y cancerosas. Es por eso que en este proyecto se propone realizar síntesis verde de NPsAu con un recubrimiento biocompatible como prueba de concepto en células cancerosas del cuello uterino.

4 Marco teórico.

4.1 Nanotecnología

La nanotecnología se define como el “desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm, para obtener una comprensión fundamental de fenómenos y materiales en dicha escala nanométrica, para crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan

nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño”. Es una ciencia multidisciplinaria con una amplia gama de aplicaciones. En particular, los nanomateriales pueden ser diseñados para el tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades como el cáncer (Mollins, R. 2008). Éste puede tener su origen en agentes externos o factores genéticos heredados, aún no se conoce con claridad el origen de la mutación de estas células (OMS, 2018), por lo que es un tema en constante estudio.

4.2 Aplicación de la nanotecnología en la medicina.

La nanomedicina es una rama de la nanotecnología que tiene como objetivo principal el desarrollo de herramientas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades, con la finalidad de estudiar las interacciones a nanoescala y puedan interaccionar a nivel celular y molecular (Lechuga, L., 2007).

La medicina convencional, basada en la dosificación directa de fármacos, falla a la hora de tratar enfermedades como el cáncer e incluso carece de opciones cuando se requiere tratar enfermedades cerebrales, donde las barreras fisiológicas representan un gran reto (Santa, C.F y López, B.L. 2013).

Es por ello que el desarrollo de NPs, obtenidas controlando las características, por medio de su síntesis y materiales, para llegar a los resultados más óptimos y así puedan transportarse por el cuerpo, hasta llegar al lugar afectado con sus propiedades físico-químicas intactas y se libere como respuesta a un cierto estímulo, es una alternativa para su transporte hacia la membrana plasmática de las células sin causar el mayor daño posible (Lechuga, L., 2014).

4.3 Alternativas como tratamiento para cáncer.

En la última década, de la comunidad científica ha enfocado sus esfuerzos en el diseño y desarrollo de nanomateriales para la lucha del cáncer. Existen numerables reportes de ciencia básica abarcando la síntesis, evaluación toxicológica y el efecto terapéutico de estos como vehículos de liberación de fármacos o como dispositivos que, en combinación con modalidades convencionales o experimentales de tratamiento, proponen una mejora significativa de selectividad.

Sin embargo, existen pocos casos de éxito en el mundo, donde nuevos nanofármacos han sido aprobados y se encuentran en ensayos clínicos avanzados en seres humanos (Lechuga, L., 2014). El uso potencial de estos materiales se basa primeramente en las propiedades intrínsecas de estos (propiedades ópticas, magnéticas, etc.) y posteriormente en su diseño innovador para hacerlas seguras y con valor agregado para la aplicación médica.

Por ejemplo, investigando ampliamente la ventaja de suministrar NPs para calentar, por medio de un campo magnético de baja intensidad, células cancerosas para dañar su integridad hasta provocar su muerte. Igualmente, es sabido que NPs metálicas se les puede aplicar radiación de luz infrarroja para inducir la destrucción de células cancerosas por hipertemia, con efectos menores en células sanas que se encuentran a su alrededor (Laura M. Lechuga, 2014).

4.4 Nanopartículas de oro (NPs-Au).

Las NPs Au son unidades nanométricas que, por sus propiedades físicas y químicas, son inertes y no tóxicas, además de que se sintetizan fácilmente (Ghosh, P., et al. 2008). El Au es un metal noble, por lo que es usado como NPs para combatir células cancerosas. Cuando las NPs son perturbadas por algún tipo de energía, se genera una resonancia conocida como plasmón superficial (SPR). La oscilación del plasmón superficial de los electrones metálicos genera una absorción y dispersión de la radiación electromagnética en resonancia de frecuencia de las NPs metálicas nobles; en este caso de las NPs Au, que genera radiación en el rango de luz visible y propiedades ópticas interesantes (Jain, P., et al. 2007).

Las NPs Au tienen una alta penetración y un revocado rechazo inmunológico por el organismo, además de tener una baja citotoxicidad (Abu-Salah, K. M., et al. 2010).

Existen proyectos como el de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), donde desarrollaron NPs Au para aumentar el repliegue de la membrana de las células cancerígenas de mama, y así dando entrada a las NPs Au y destrucción de las células cancerígenas sin dañar las sanas. Las NPs Au que obtienen son de

alrededor de 20 nm, sus estudios reportan que las NPsAu se alojan en el núcleo de la célula cancerosa para después destruirlas, (Lara, C., et al, 2018).

4.5 Poli(etilenglicol).

El Poli(etilenglicol) conocido como PEG es un poliéter ramificado con un grupo hidroxilo en cada extremo, presenta un número específico de etilenglicoles en su molécula, resistencia a proteínas y células; posee una gran velocidad de absorción, es inerte, no tóxico y no inmunogénico, es por ello que se usa como recubrimiento de materiales (Mayolo-Deloisa, K.P y Rito-Palomares, M. 2010).

También ha sido aprobado por United States (U.S) Food and Drug Administration (FDA) para consumo humano seguro; aunque el PEG no sea un polímero monodisperso.

El PEG líquido es mezclado con agua en cualquier proporción y el PEG sólido es en gran medida soluble en agua. Se sabe que el PEG es estable en ácido, base, altas temperaturas, bajo condiciones de oxidación como es en presencia de H_2O_2 , O_2 y $NaBH_4$. Sin embargo, la oxidación parcial del grupo terminal PEG $-CH_2OH$ al grupo $-COOH$ puede suceder con sistemas como $H_2O_2-Na_2WO_4$ (Ra, J., et al. 2005). Debido a su alta estabilidad y compatibilidad con el organismo humano, es ampliamente utilizado.

Las NPsAu recubiertas con PEG han sido estudiadas para suministro de fármacos antineoplásicos como doxorubicina. También se han estudiado modelos *in vitro* de cáncer de páncreas en donde evaluaron a los nanoportadores de doxorubicina y su funcionalidad, los resultados mostraron un bloqueo del crecimiento anormal de células cancerosas por el suministro del fármaco por esta vía, los investigadores encontraron que la ubicación de fármacos se encontraba en los núcleos de las células (Casale, S. 2016).

Se ha reportado que las NPsAu se preparan por medio de una reducción de sales de Au con agentes estabilizadores que ayudan a que las partículas no se agreguen (Jain, P., et al. 2007). Las NPsAu con PEG realizan liberación controlada de

fármacos al lugar del tumor, las NPs con PEG muestran un tamaño óptimo para realizar su función. (Spadavecchia, J., et al. 2016).

El uso de materiales conjugados con polímeros, como las NPs, les permite llegar a la zona tumoral por transporte pasivo (se basa en el tamaño de las NPs, aprovechando la anatomía y fisiología de la vasculatura del tumor), una prolongada circulación en el espacio intersticial de las por el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) en las células (Martínez, GI., et al, 2010), lo que mejora la selectividad a células cancerígenas, reduciendo de manera considerable los efectos secundarios que causan los tratamientos convencionales (Acharya, S. y Sahoo, S. 2010).

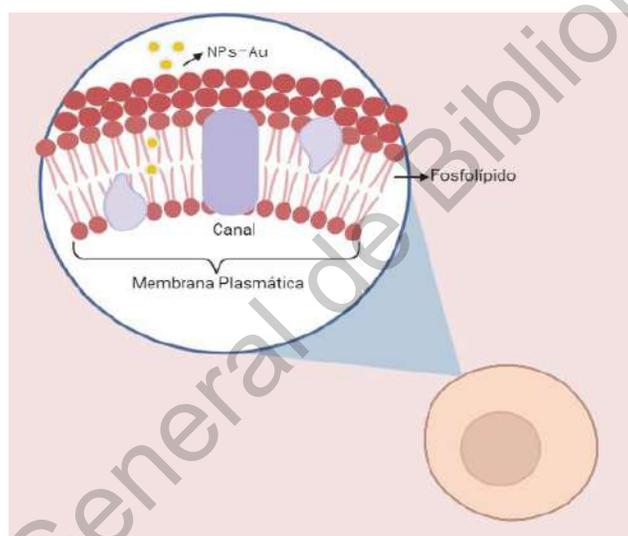


Fig 1. Representación del transporte pasivo de las NPsAu hacia la membrana plasmática de la célula.

4.6 Quercetina

La QE pertenece al grupo de los flavonoides, un grupo presente de fitoquímicos fenólicos, responsables de la coloración de las frutas, flores, frutos, verduras y cereales. Actúan como ácido, por el número y disposición de sus grupos hidroxilo fenólicos en un estado neutral y grupos carbonilo, que se unen a estructuras de anillo. Tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, por medio de la donación de un electrón a un oxidante, se debe a la reducción de sus radicales (Rice-Evans, C., 2001; Escamilla, C., et al., 2009).

Por las características que poseen los flavonoides, por ejemplo, las antocianinas que les permiten reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} para una oxidación o bien exista un proceso redox, siendo así agentes prooxidantes (Bollella, P. et al. 2016).

La QE tiene la propiedad de actuar como antiinflamatoria, antimicrobiana, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas, antioxidantes, inductora de apoptosis, modulación del ciclo celular, capacidad de inhibición del angiogénesis, antidiabético nefropático y antiulceroso (Escamilla, C., et al. 2009).

Además está compuesta por dos anillos difenilpiranos (A y B), que se unen mediante un anillo pirano C. Por lo que tiene un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde C6 pertenece al sistema benzoílo y C3 representa un heterociclo. Tanto el anillo C como el anillo A se enumeran del 2 al 8 y el B de 1' a 6' (Cheme, C. 2016; Escamilla, C., et al, 2009).

En el anillo B se encuentra la estructura catecol u O-dihidroxi (sistema cinamoilo), con sustituyente dihidroxílicos en 3' y 4' (antioxidantes). Por otro lado, la presencia de un doble enlace entre las posiciones 2 y 3, en el anillo C, además de grupos hidroxilos (OH) en las posiciones 3 y 5, y un grupo carbonilo en la posición 4 (Escamilla, C., et al, 2009).

Además, actúa como agente quelante de metales de transición y secuestradora de radicales libres que causan daño al ADN, así como la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas son las características que hacen a la QE tener mecanismos antioxidantes (Pérez, G. 2003).

Las especies reactivas del oxígeno reaccionan con biomoléculas provocando el daño celular y tisular. Existen reportes donde los flavonoides como la QE por tener sustitutos dihidroxilos en las posiciones 3' Y 4' en su anillo B se muestra más activo como antioxidante por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un carbonilo en la posición 4, la presencia de un grupo hidroxilo en 3' y 5' (Escamilla, C., et al, 2009).

Los agentes quelantes como la QE pueden formar estructuras complejas que se unen a iones metálicos tóxicos, los cuales pueden ser desechados por el cuerpo (Bollella, P., et al. 2016; Escamilla, C., et al. 2009).



Fig 2. Se encuentra en a) la estructura de un flavonoide y en b) la estructura de la QE.

Debido a su biocompatibilidad y potencialidad terapéutica, optimiza la eficiencia de los nanomateriales en distintas aplicaciones. Se usa para reducir y/o estabilizar nanopartículas, en presencia de iones de metálicos (Bollella, P., et al. 2016).

4.7 Síntesis química asistida por radiación ultrasónica.

Según los principios de la sonoquímica, cuando las ondas de ultrasonido actúan sobre un líquido se generan en él miles de pequeñas burbujas (cavitación) en el interior de las cuales se producen alteraciones de presión y temperatura. De hecho, la temperatura de los bordes de estas burbujas puede alcanzar miles de grados Kelvin (alrededor de 5000 K, 1000 atm y rapidez de calentamiento y enfriamiento del orden de 10^{10} K/s) en los llamados, puntos calientes (Suslick, K., 2000). Las pocas millonésimas de segundo que duran estas burbujas son suficientes para que se produzcan muchas reacciones químicas, y pueda existir un cambio radicalmente en la estructura química del líquido. Asistiendo las síntesis con este tipo de radiación se espera obtener NPsAu con morfologías definidas y regulares de tamaños nanométricos de alrededor de 10 nm.

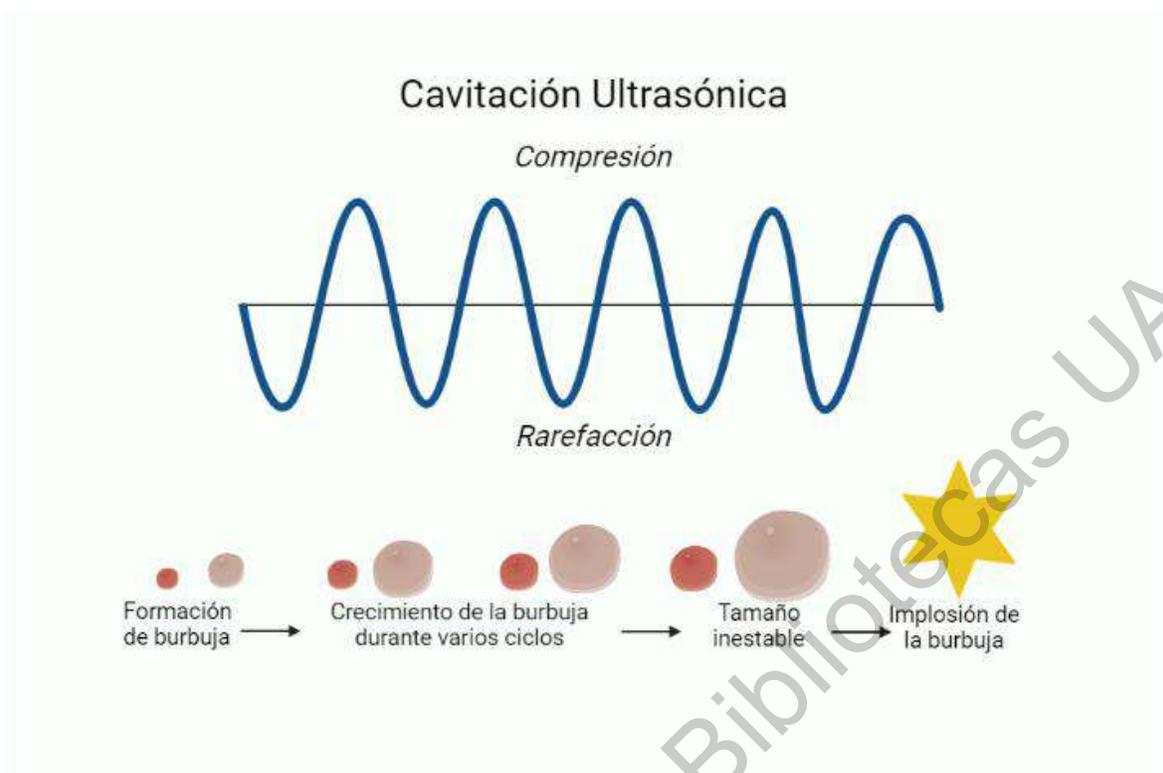


Fig 3. Representación de cavitación ultrasónica.

Una gran ventaja del uso de sonoquímica como método de síntesis es que usan menores cantidades de energía y de agentes peligrosos, de manera que se usen disolventes más amigables con el medio ambiente (no tóxicos, inertes, fáciles de reciclar y de eliminar), es económico y seguro de usar, por lo que se considera un método de química verde (Pacheco, D y Coba, E., 2006).

5 Planteamiento del problema.

Existen pocas alternativas de tratamientos que puedan terminar con el cáncer de cérvix, sin dañar al sistema inmunológico de las pacientes, ya que sólo es tratado con cirugía, radioterapia, quimioterapia, teleterapia y braquiterapia. La necesidad del desarrollo de métodos terapéuticos novedosos y selectivos hacia una enfermedad específica, hace de la nanomedicina una alternativa. Por lo que en el

presente proyecto se propone realizar la síntesis de PEG-QE-NPsAu con un recubrimiento biocompatible, mediante la asistencia de radiación ultrasónica y variación del agente reductor (QE)/estabilizador (PEG) para obtener tamaños nanométricos con morfologías promedio regulares como prueba de concepto en células cancerosas del cuello uterino y probar la citotoxicidad de las PEG-QE-NPsAu en una línea inmortal de células de cérvix cancerosas.

6 Hipótesis.

La variación de la concentración del agente reductor y/o del agente estabilizador en el proceso de síntesis de las PEG-QE-NPsAu asistido por radiación ultrasónica de alta frecuencia influirá en el tamaño, forma y estabilidad de éstas. La conformación final de las PEG-QE-NPsAu tendrá un impacto en la viabilidad celular.

7 Objetivos.

7.1 Objetivo general

Sintetizar por sonoquímica verde PEG-QE-NPsAu coloidales de tamaño y forma definidas, mediante la variación de la concentración del agente reductor y/o estabilizador. Evaluar la toxicidad de las PEG-QE-NPsAu en células de CaCu.

7.2 Objetivos particulares

- Diseño experimental y obtención de PEG-QE-NPsAu a través de síntesis asistida por ultrasonido.
- Optimización de la metodología experimental para obtener partículas en el rango de 10 nm de diámetro, de forma y tamaño homogéneo, y estables al pH fisiológico.
- Seguimiento de la formación de las PEG-QE-NPsAu a través de espectroscopia UV-Vis.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las PEG-QE-NPsAu por DLS, potencial Z, TEM, FTIR, UV-Vis y RAMAN.
- Evaluar la toxicidad de las PEG-QE-NPSAu en modelos de células cancerosas de cérvix (HeLa) por MTS y LDH.

8 Materiales y métodos.

Se utilizó el ácido cloro áurico, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, su nombre en inglés “gold (III)chloride hydrochloric acid” al 99.5% (masa molar, 393.83 g/mol) marca Sigma Aldrich, Quercetina (masa molar, 302.24 g/mol) marca Sigma Aldrich y poli-etilenglicol, y PEG-4000 marca Sigma Aldrich.

- **Preparación de solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:** Se prepararon dos soluciones de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ con agua desionizada a una concentración 1×10^{-3} molar.
- **Preparación de solución de Quercetina:** Se prepararon dos soluciones de QE a una concentración 1×10^{-3} molar. De aquí, se realizaron varias diluciones, utilizando etanol.
- **Preparación de solución de PEG-4000:** Se prepararon dos soluciones de PEG-4000 con agua desionizada a una concentración 1M.

8.1.1 Metodología de síntesis de las PEG-QE-NPsAu utilizando sonoquímica *in situ* (radiación ultrasónica aplicada directamente al medio de reacción)

En las dos síntesis realizadas por este método, se utilizó una frecuencia de la radiación ultrasónica de 26 kHz con una amplitud del 50% y un tiempo de exposición de 5 minutos, con una relación Au-PEG de 1:500 y Au-QE de 1:10.

Síntesis de PEG-QE-NPsAu RL2: En un vaso de precipitados se adiciona la cantidad adecuada de la solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y se mantiene en agitación constante. En seguida, se adicionan la solución de QE (agente reductor) y finalmente se añaden la solución de PEG-4000 (agente estabilizador), Figura 4.

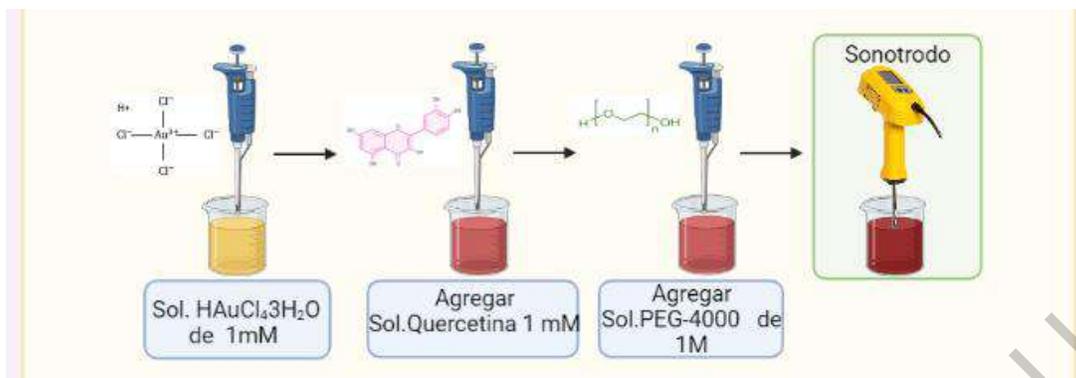


Figura 4. Procedimiento de síntesis de RL2.

Síntesis de PEG-QE-NPsAu RL3: A diferencia con la síntesis anterior, en este caso, se formó primeramente una mezcla constituida de las soluciones de QE y de PEG-4000 y se mantuvo bajo agitación constante. Posteriormente, a esta mezcla de las soluciones de QE y PEG-4000, se adicionó la cantidad adecuada de la solución del HAuCl₄ 3H₂O, para mezclarlo con el sonotrodo, para la síntesis con baño ultrasónico se realizó el mismo procedimiento, pero sacando solución cada 5 y 20 minutos, Figura 5.

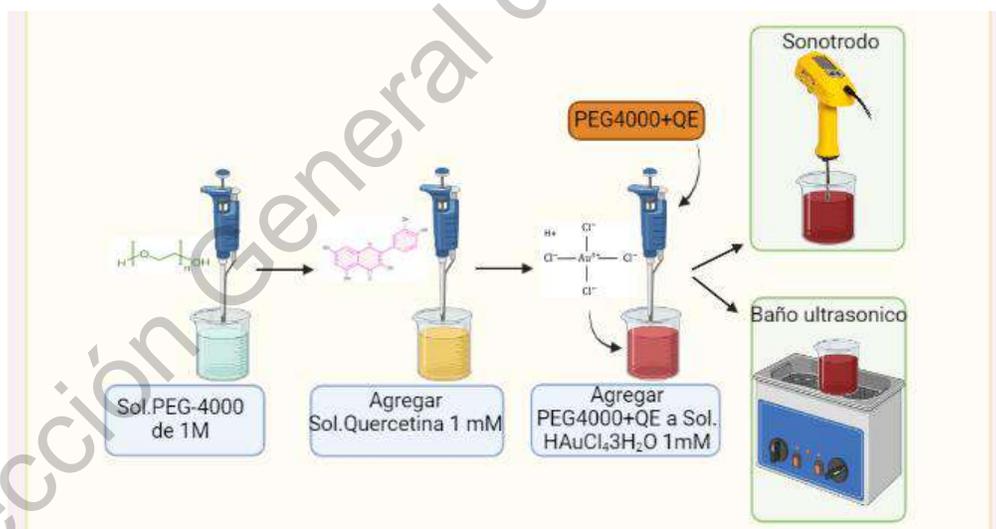


Figura 5. Procedimiento de síntesis de RL3.

9 Técnicas de caracterización.

9.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las imágenes de los materiales (PEG-QE-NPsAu) obtenidas por TEM, se registraron con un microscopio JEOL JEM 2000FX FASTEM que funciona a 200 kV con una iluminación muy baja para evitar la destrucción de material bajo el haz de electrones. Los materiales en seco y en polvo se dispersaron por ultrasonido en acetona a temperatura ambiente y luego se colocaron en los tamices recubiertas con carbono. Con esta técnica es posible caracterizar las nanoestructuras en cuanto a tamaño, morfología, características estructurales.

9.2 Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

La presencia de los grupos funcionales hidroxilos –OH y carboxílicos –COOH en la superficie de las PEG-QE-NPsAu, debido a la QE y PEG-4000, se analizaron por medio de la respuesta vibracional de sus enlaces moleculares, a través de los análisis por espectroscopía de infrarrojo. Los espectros de vibración de IR de las muestras secas y dispersadas en KBr, se midieron en un espectrofotómetro Bruker Vector 33, en el rango de 600 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , por la técnica de reflexión atenuada (ATR).

9.3 Potencial Z.

Mediante esta técnica, las PEG-QE-NPsAu fueron analizadas para obtener su carga superficial, y punto isoeléctrico o carga cero. Este análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agua desionizada como medio dispersante. De cada solución (RL2 y RL3) se varió el pH añadiendo NaOH y HCl para ajustar a 3, 5, 7, 9 y 11. Posteriormente, las disoluciones se colocaron en celdas DTS1070 las cuales se colocaron en el equipo para las mediciones. Las mediciones se realizaron por triplicado en un Delsa™ Nano C, Particle Analyzer de la marca BECKMAN COULTER. Por Convención, el valor del potencial zeta por debajo de -25 mV y por encima de 25 mV se considera estable (Hunter, R.J., 1981; Lyklema, J., 1991). La concentración y el tipo de iones, así como el pH de la solución, afectan fuertemente el potencial zeta.

9.4 Dispersión dinámica de luz (DLS).

Para determinar el tamaño hidrodinámico de las PEG-QE-NPsAu se utilizó con el aparato Delsa Nano C (Particle Analyzer) de la marca BECKMAN COULTER. La dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés dynamic light scattering) se usa para caracterizar el tamaño de partícula en suspensión en un líquido, en el rango submicrométrico.

Durante la medición, la suspensión se expone a un haz de luz atenuada de acuerdo con la muestra. Se ha visto que las partículas en un medio fluido experimentan un movimiento browniano aleatorio y esto hace que la dirección e intensidad del haz se disperse para convertir los datos en medidas de tamaño y distribución de tamaños a partir del coeficiente de difusión traslacional, se utilizó la relación de Stokes Einstein, este no solo depende del tamaño del núcleo de las PEG-QE-NPsAu, sino también de la estructura de su superficie, concentración y iones del medio de suspensión de las NPs.

El Pdl es un parámetro de la amplitud de tamaño de la nanopartícula a partir de un análisis acumulativo, mostrando valores entre 0 y 1, los cuáles muestran que tan monodispersa o polidispersa es la muestra, si presenta gran variedad de tamaños o no.

9.5 Espectroscopía de UV-VIS.

El análisis por ultravioleta-visible (UV-VIS) es una espectroscopía de emisión de fotones. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas, en este caso se utilizó para observar el SPR de las PEG-QE-NPsAu en coloide y las bandas características del Au y QE disueltas en agua desionizada (controles previa síntesis). Los espectros se registraron en el rango de 200–700 nm a temperatura ambiente, utilizando un espectrómetro Agilent Technologies.

9.6 MicroRaman.

Esta técnica ayuda a complementar la información obtenida mediante la espectroscopía de infrarrojo, ya que proporciona información química y estructural de las moléculas presentes en la superficie del material a partir de los modos vibracionales detectados al hacerle incidir un haz de luz a la muestra. Se empleó un haz de luz verde de 532 nm, con un nivel de potencia del láser de 7 mW, un tiempo de exposición de 10 segundos y 3 exposiciones para cada muestra y observar la superficie de las PEG-QE-NPsAu, su constitución y la fijación de las QE-NPsAu al PEG. El equipo que se utilizó fue un microespectrómetro Raman modelo DRX II Termoscientific.

10 Pruebas de citotoxicidad

10.1 Consideraciones de seguridad para el cultivo celular.

La manipulación celular se llevó a cabo en un Gabinete Nivel 2 de Bioseguridad vistiendo bata, guantes, cofia y cubre-bocas. El instrumental y material se esterilizó por autoclave. Las superficies de trabajo se desinfectaron con etanol al 70% y luz UV. El material de vidrio y plástico utilizado durante el cultivo, fue inactivado con hipoclorito de sodio, lavado con dodecilsulfato sódico (SDS), secado y esterilizado para, de ser requerido, su reúso.

El material en contacto con PEG-QE-NPsAu se lavó con agua regia (HCl:HNO₃ 3:1) al finalizar los ensayos biológicos. Los medios en presencia de PEG-QE-NPsAu en suspensión fueron confinados para su recolección.

10.2 Cultivo celular

Brevemente, un criovial con aproximadamente 1×10^6 células se descongeló siguiendo protocolos estándar y las células se cultivaron en frascos T25 con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal (10%) y antibióticos (1%), a una temperatura de 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂. El cultivo se monitoreó y cada tercer día se cambió el medio hasta llegar a una confluencia de aproximadamente 80%. Alcanzada la confluencia, las células se recuperaron con tripsina, molécula que rompe los enlaces peptídicos de las

proteínas entre las células y el fondo tratado del frasco de cultivo. Posteriormente se centrifugaron por 7 minutos a 1600 rpm, se suspendieron en 1 mL de medio completo, contaron con azul de tripano en una cámara Neubauer, y se sembraron para los ensayos de toxicidad y subcultivo.

Para los ensayos MTS y LDH, se prepararon placas de 96-pozos con 10,000 células por pozo a partir de un esquema experimental definido.

10.3 Ensayo MTS

El ensayo MTS es un ensayo colorimétrico de proliferación celular no radiactiva, para determinar el número de células viables, es decir, metabólicamente activas. El MTS es un ensayo de “un solo paso” y consiste en la reducción de la sal tetrazolio 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), y acoplamiento de electrones a través del metosulfato de fenazina (PMS). El MTS es bio-reducido mediante enzimas deshidrogenasas por células viables en formazán, el cual es soluble en medios de cultivo. Este producto se mide de su pico máximo de absorbancia cerca de 490 nm, siendo proporcional a número de células vivas en cultivo, y a 620 nm como control de referencia para observar que la absorbancia sea mínima.

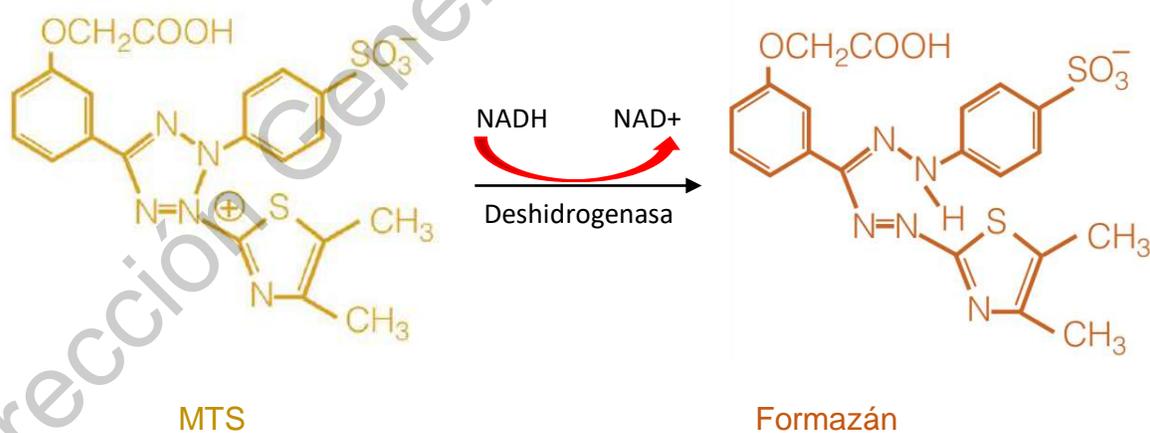


Figura 6. Estructuras de la sal de tetrazolio MTS y su producto formazán.

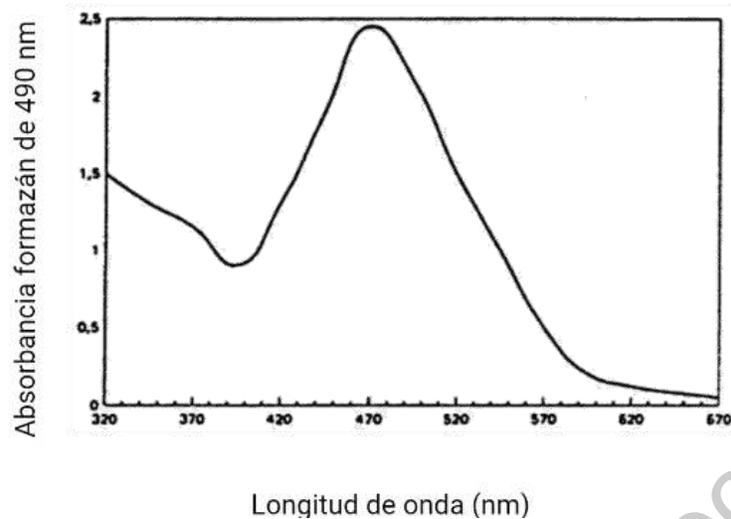


Figura 7. Espectros de absorción de la solución formazán a 490 nm, usando el ensayo CellTiter 96® AQueous Assay.

10.4 Ensayo LDH

El ensayo LDH es un método para conocer el daño a la membrana plasmática por medio de la liberación de LDH, enzima citosólica estable la cual se libera tras la lisis celular. Cuando las células están en contacto con agentes tóxicos como un control positivo de Triton X, se daña la membrana plasmática de las células y expulsan la enzima LDH del interior hacia el al medio de cultivo celular (fluido extracelular). Se mide la absorbancia de las muestras (liberación de LDH) a 490 o 492 nm (según los filtros del lector), usando como referencia una longitud superior a 600nm.

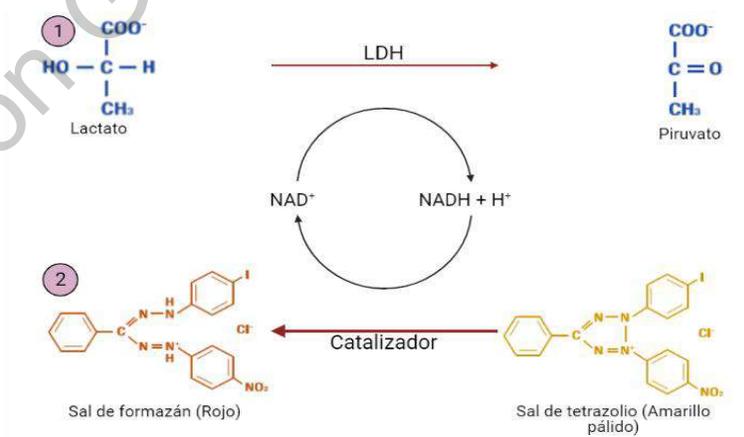


Figura 8. Ensayo de liberación de LDH. Primero, LDH reduce NAD⁺ a NADH⁺ / H⁺ oxidando el lactato a piruvato. Segundo, en la reacción enzimática se transfieren 2 hidrógenos de NADH⁺ / H⁺ a una sal amarilla de tetrazolio por medio de un catalizador.

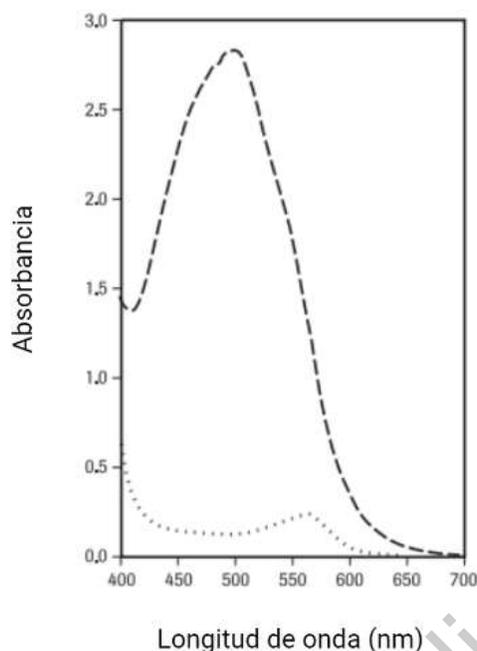


Figura 9. Espectros de absorción de la solución Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH). A la mezcla de reacción de Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) se le agregó a RPMI 1640 con 1% de BSA y los espectros de absorción se midieron en ausencia (.....) y presencia (---) de LDH.

10.5 Metodología MTS y LDH

Se sembraron células HeLa (ATCC® CCL-2™) humanas inmortalizadas de CaCu (10000 por pozo) en monocapa en placas de 96 pozos y se incuban durante toda la noche a 37° C, CO₂ al 5%, en medio de cultivo DMEM enriquecido, con suero bovino fetal al 10%, (biowest®, The Serum Specialist). Después de dejarlas en la incubadora se observaron las células para comprobar su adhesión en el fondo de los pozos. Una vez desinfectado y acomodado el material a utilizar se prepararon las diferentes concentraciones de PEG-QE-NPsAu y se retiró el medio de cultivo DMEM de las células.

Posteriormente se agregan las diferentes concentraciones de PEG-QE-NPsAu preparadas con anterioridad, partiendo de un stock de 1000 µg/ml y de ahí disoluciones de 0.5, 5, 50, 250 y 500 µg/ml con DMEM, además de controles positivos de células viables sin tratarlas, células con dimetilsulfóxido (DMSO), células con Triton 1X y medio de cultivo (DMEM) sin células por triplicados cada

control y células, como se observa en la Figura 10, para incubarlas por 24 horas a 37° C, con humidificación de CO₂ al 5%.

Después de las 24 horas se observaron las morfologías de las células y se recolectó todo el medio de cultivo (DMEM mezclado con las PEG-QE-NPsAu) para realizar el ensayo LDH o bien se puede desechar en cloro en caso de no realizarse LDH.

Los triplicados obtenidos de cada muestra se lavaron con un tampón de fosfatos (PBS 1X) y se agregó la sal de tetrazolio, MTS (CellTiter 96® Aqueous, Promega™), para conocer las células viables metabólicamente activas que producen formazán. En este proceso se dejaron incubar durante 4 horas para cuantificar los resultados a 450 nm y 620 nm, usando esta última longitud de onda como control de referencia.

El sobrenadante recuperado de cada pozo del ensayo MTS se colocó en otra placa y se preparó Cytotoxicity Detection kit^{PLUS} (LDH) Roche con una relación 1:40 del catalizador (NAD⁺) y el buffer (Lisis), se mezclaron ambas soluciones para cada pozo. Las muestras de las líneas de la placa de la A-F se incubaron durante 30 minutos junto con los triplicados del control Triton X, de muerte DMSO, de células viables sin tratamiento y de medio de cultivo como el blanco (DMEM), se cuantificaron los valores a 450 y 620 nm.

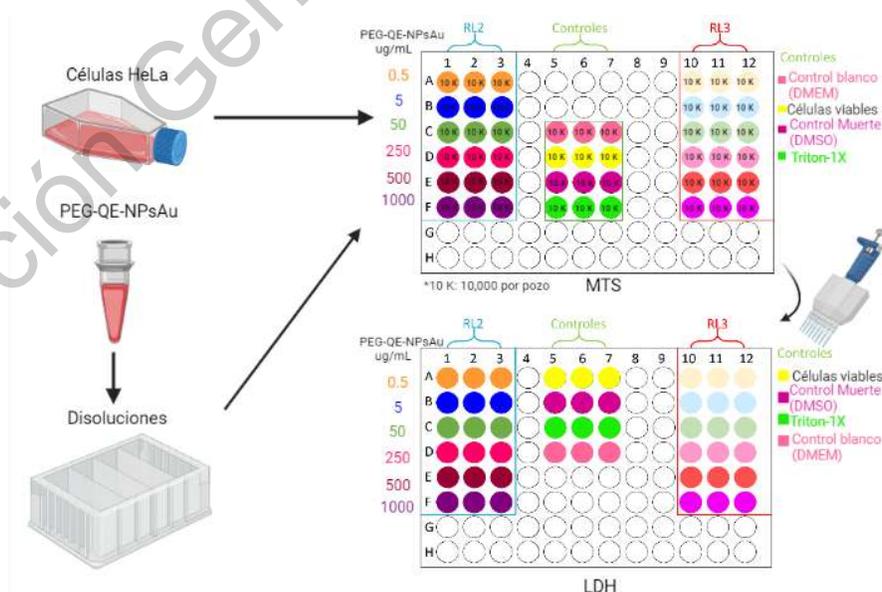


Figura 10. Procedimiento experimental para los ensayos MTS y LDH.

11 Resultados.

11.1 Caracterización fisicoquímica

11.1.1 Espectroscopia UV-VIS.

En la Figura 11 se presentan los espectros de absorción de UV-Vis de las cuatro soluciones utilizadas en este estudio ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, QE, PEG-QE y Au-PEG).

En la Figura 11 (a) se muestra el espectro de la solución del $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. En él, se observaron dos bandas, una de alta intensidad localizada por debajo de 250 nm y otra de menor intensidad centrada en aproximadamente 296 nm. La primera se asigna a las especies de Au^{3+} y la segunda a la transferencia de carga metal-ligante.

El espectro de la solución de la QE se presenta en la Figura 11 (b). Se observaron dos bandas centradas en aproximadamente 255 y 386 nm, característicos de la QE. La primera se puede asociar con la absorción al sistema cinamoilo del anillo B (Figura 1), y el segundo con absorción del sistema benzoílo del anillo A (Figura 1) (Catauro, M., et al, 2015). Además, se observan otras bandas relacionados con la existencia de agregados no correspondientes a la QE.

En el espectro de la solución PEG-QE de la Figura 11. (c), se observan las dos bandas características de la QE, pero con menor intensidad y ligeramente desplazadas en comparación con el espectro de la solución de QE. En el espectro de la QE-PEG esas dos bandas se presentan en 260 y 380 nm. Estos cambios, muy probablemente indiquen que ocurre una interacción entre la QE y el PEG.

En la Figura 11 (d) se exhibe el espectro de la mezcla de las soluciones de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y PEG-4000, en donde se presentan las dos bandas características de la solución $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, aunque con mayor intensidad y ligeramente desplazadas a la derecha. Se puede ver claramente que la banda en 296 nm para la solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se desplaza a 307 nm para la Au-PEG. Estos cambios probablemente indiquen que se presenta una interacción entre el PEG y el Au^{3+} .

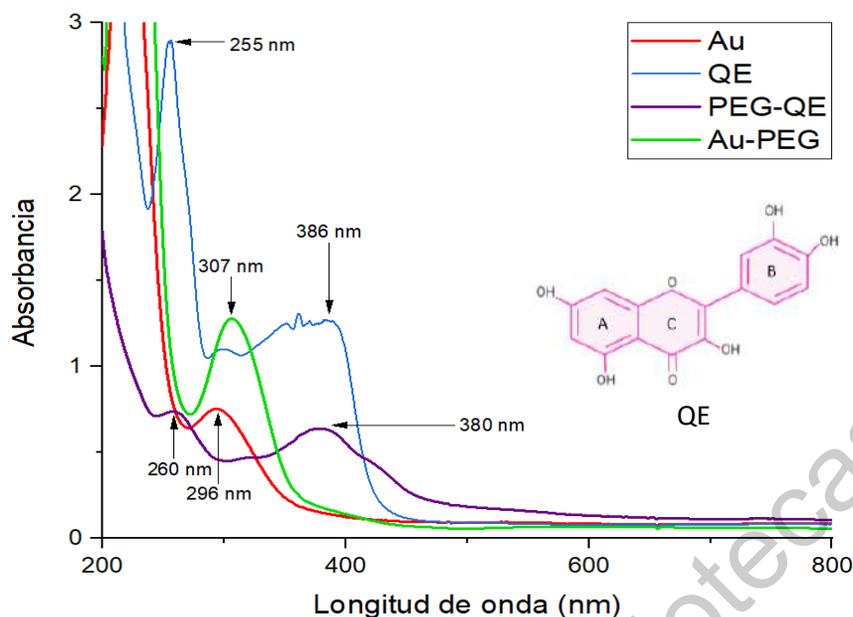


Figura 11. Espectroscopia UV-Vis de los controles (a) $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, (b) QE, (c) PEG-QE, (d) Au-PEG.

En la Figura 12 (a) se presenta el espectro del coloide de oro pos-síntesis, obtenido mediante la reducción de la solución del $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ con QE (a una concentración de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$) y con la posterior adición del agente protector PEG-4000, preparado con sonoquímica (coloide RL2). La aparición del SPR, centrado en aproximadamente 532 nm, indica la formación de las PEG-QE-NPsAu. Además, se puede observar una banda centrada alrededor de 255 nm, que se asigna a la unión de la QE con el núcleo de Au.

En la Figura 12 (b) se exhibe el espectro del coloide de Au, preparado mediante la reducción de la solución del $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ con la solución compuesta de QE más el agente protector PEG-4000, preparado con sonoquímica (coloide RL3). En este espectro, se observan también esas mismas dos bandas, una centrada alrededor de 258 nm (como resultado de la unión de la QE con el Au) y la otra centrada en aproximadamente 528 nm (como resultado del plasmón de las PEG-QE-NPsAu). Este resultado indica muy probablemente, que la adición de la solución compuesta de la QE y PEG-4000, genera PEG-QE-NPsAu de menor tamaño en comparación con adicionar primero la solución de la QE seguida por la solución de PEG-4000.

La Figura 12 (c) muestra el espectro del coloide de oro, obtenido mediante las condiciones empleadas para el coloide RL3, pero en lugar de sonoquímica se utilizó baño ultrasónico durante 5 minutos (coloide L 5 minutos). Se obtuvieron las dos bandas características, una centrada alrededor de 277 nm (interacción QE-Au) y la otra centrada en aproximadamente 543 nm (SPR de las PEG-QE-NPsAu).

Por otro lado, el espectro del coloide de oro preparado mediante las condiciones empleadas para el coloide L 5 minutos, pero con 20 minutos en el baño ultrasónico (coloide L 20 minutos), exhibe esas mismas dos bandas centradas en aproximadamente 287 nm (unión QE-Au) y en 545 nm (SPR de las PEG-QE-NPsAu).

Podemos afirmar que, los coloides preparados mediante baño ultrasónico, promueve la formación de las PEG-QE-NPsAu con mayor tamaño en comparación con la sonoquímica.

Podemos concluir que, la aplicación de la radiación ultrasónica de alta frecuencia (sonoquímica) directamente al medio de reacción de formación de los coloides de Au, ocasiona un alto grado de reducción de las especies de Au^{3+} y promueve la formación de las PEG-QE-NPsAu con menor tamaño.

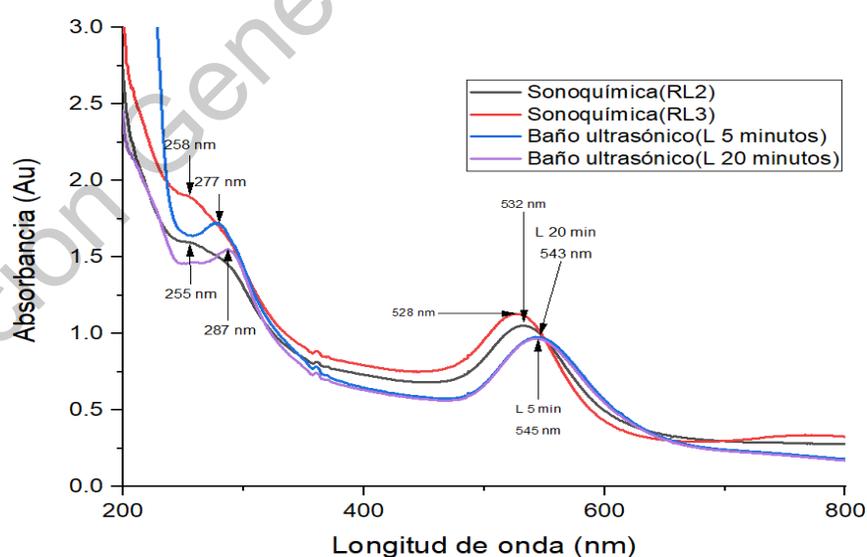


Fig 12. Espectroscopia UV-Vis de la (a) solución RL2 (sonoquímica), (b) solución RL3 (sonoquímica), (c) solución RL3 (baño ultrasónico 5 minutos) y (d) solución RL3 (baño ultrasónico 20 minutos).

11.1.2 Determinación del tamaño aproximado de las PEG-QE-NPsAu a través de los espectros de absorción de UV-Vis.

El método de Haiss y colaboradores se aplicó para estimar el tamaño de las PEG-QE-NPsAu, es un método que considera las bandas de absorbancia de los plasmones superficiales de las PEG-QE-NPsAu en el rango de 5 a 100 nm (Haiss, W., et al, 2007).

Considera la relación de absorbancia de las PEG-QE-NPsAu con la resonancia del plasmón superficial (A_{SPR}) y la absorbancia en 450 nm (A_{450}) en función del diámetro de la partícula.

	SPR (nm)	ASPR	A450 (nm)	ASPR/A450 nm	Tamaño (nm)
RL2	532	1.04944822	0.68271	1.537180091	11
RL3	528	1.12925	0.7535	1.49867286	10
L 5 minutos	545	0.97785	0.58574	1.669426708	16
L 20 minutos	543	0.96484154	0.57204	1.686667958	17

Tabla I. Tamaño de PEG-QE-NPsAu por el método de Haiss y colaboradores.

El método proporcionó valores con tamaños de PEG-QE-NPsAu de 11 a 10 nm cuando estas fueron preparadas con sonoquímica *in situ* y valores de 16 a 17 nm cuando las PEG-QE-NPsAu fueron preparadas con baño ultrasónico (agua como medio para transmitir las ondas de radiación ultrasónica). En ambos métodos se usó el PEG-4000 como estabilizador y recubridor de las NPsAu y la QE como agente reductor.

Por lo que, podemos concluir que la aplicación de la sonoquímica genera PEG-QE-NPsAu con menor tamaño y con un tamaño apropiado para los fines de este estudio.

11.1.3 Espectroscopía de Infrarrojo FTIR

Los espectros de infrarrojo de las muestras de PEG-4000 y QE, se presentan en la Figura 13.

La Figura 13 (a) exhibe el espectro del PEG-OH ($M_w = 4000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), en él se observan: las bandas de las vibraciones de estiramiento de enlace del grupo C-H en 2879 cm^{-1} ; y las bandas de vibración de flexión para el grupo C-H de 1412 a 1340 cm^{-1} . El grupo C-O y C-O-H con modo de vibración de estiramiento se observan en 1279 a 1059 cm^{-1} . En 947 y 840 cm^{-1} se aprecia la vibración del grupo C-C con modo de vibración esqueleto. En 528 cm^{-1} C=O con modo flexión de vibración.

En la Figura 13 (b) se observa el espectro de la QE ($M_w = 302.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), con modos de vibración de estiramiento de los grupos O-H de 3662 a 3266 cm^{-1} . La vibración correspondiente al grupo C=O se encuentra de 1664 a 1606 cm^{-1} y se le atribuye a un estiramiento asimétrico. De 1560 a 1448 cm^{-1} se encuentran las vibraciones del grupo C=C. El grupo con mayor frecuencia es C-O de 1259 a 1013 cm^{-1} en modo vibracional de estiramiento.

La Figura 13 (c) muestra el espectro del control PEG (4000)-QE, donde se aprecian bandas vibracionales de estiramiento O-H en 3672 a 3645 cm^{-1} , grupos funcionales C-H con estiramiento en 2980 y 2884 cm^{-1} , así como bandas vibracionales de estiramiento de los grupos C=O en 1649 cm^{-1} , de 1465 - 1339 cm^{-1} C-H con modo de vibración de flexión, así como de 1279 - 1059 cm^{-1} (C-O y C-O-H) con bandas vibracionales de estiramiento; el grupo C-C de 957 a 840 cm^{-1} como modo vibracional esqueleto y en 528 cm^{-1} el grupo C=O con bandas vibracionales de flexión. Estos resultados indican que muy probablemente ha ocurrido un recubrimiento de las moléculas de QE con el PEG-4000, es decir, una interacción entre los grupos funcionales de la QE con los grupos funcionales del PEG.

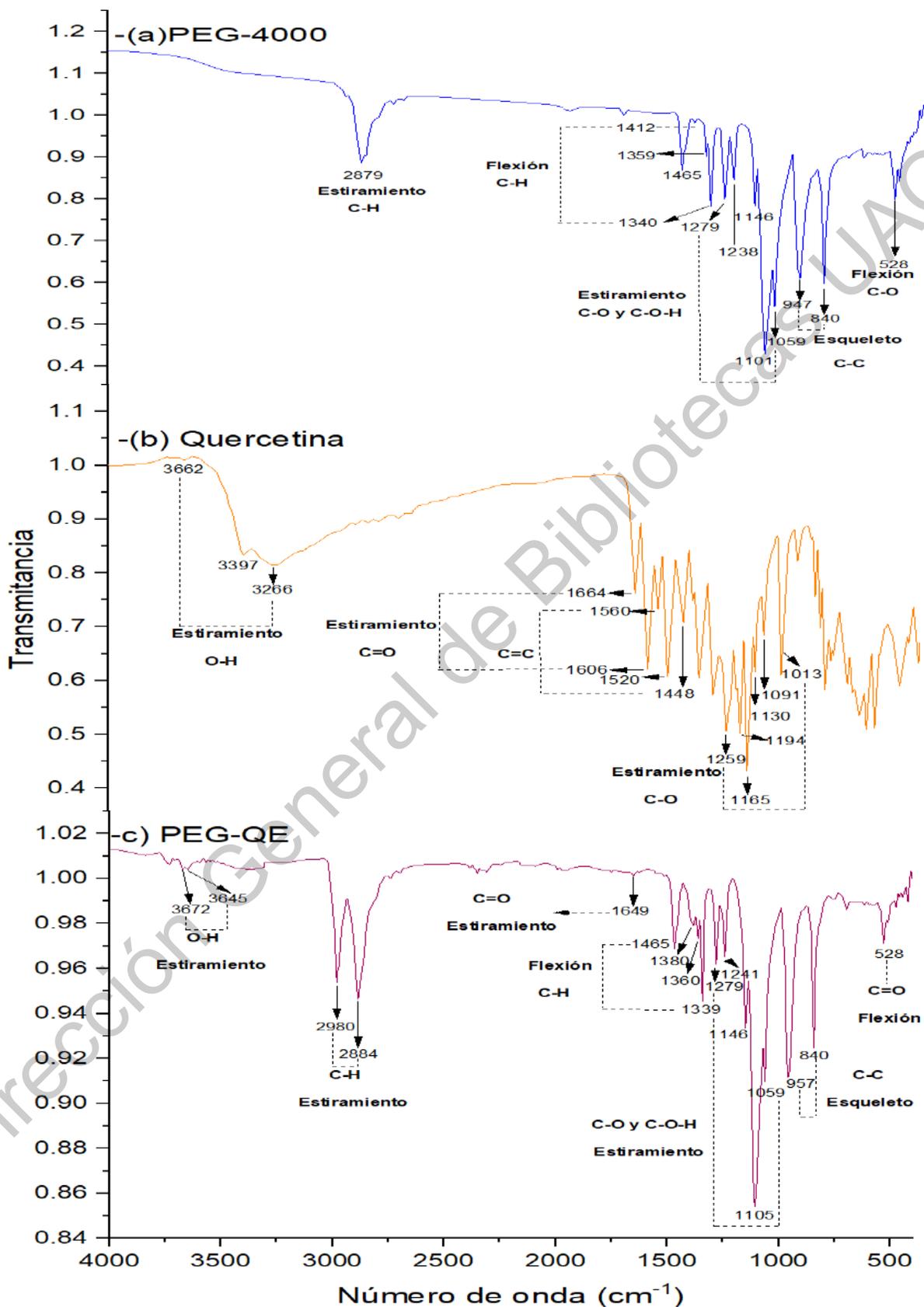


Figura 13. Muestra los espectros FTIR de (a) PEG 4000-OH, (b) QE, (c) control PEG-QE.

En la Figura 14 se presentan los espectros de infrarrojo de los coloides de PEG-4000-QE y de los coloides RL2 y RL3.

La Figura 14 (a) muestra el espectro de la solución coloidal de PEG-QE-NPsAu (coloide RL2), con estiramientos en los grupos hidroxilo O-H en 3362 cm^{-1} correspondiente a la QE con un desplazamiento a la derecha. En el rango de 2979 a 2882 cm^{-1} son pertenecientes al PEG, el grupo C-H de 1465 a 1340 cm^{-1} y de 1279 - 1060 cm^{-1} se encuentra las bandas vibracionales de estiramiento del grupo C-O y C-O-H son características del PEG. Al igual que la banda esqueleto de C-C en 947 y 840 cm^{-1} como los grupos C-O en 528 cm^{-1} con banda vibracional de flexión, un desplazamiento de las bandas de QE y PEG que es el que pertenecen al PEG con un ligero desplazamiento a la derecha.

Lo anterior indica la existencia de una PEGilación del núcleo de Au a través de una interacción directa Au-QE y recubrimiento de PEG.

El espectro de la solución coloidal de PEG-QE-NPsAu (coloide RL3) se exhibe en la Figura 14 (b), con estiramiento en los grupos O-H en 3372 y de 2978 a 2882 cm^{-1} los cuales estos últimos son característicos del PEG y el grupo C-H de 1466 - 1340 cm^{-1} con modo de vibración de flexión y de 1279 a 1060 cm^{-1} los grupos C-O y C-O-H con estiramiento. También, se encuentran grupos con vibración de esqueleto del grupo C-C en 957 - 8396 cm^{-1} y el grupo C-O en 528 cm^{-1} , todas estas bandas son pertenecientes al PEG. Las bandas características de QE y PEG se desplazaron a 528 cm^{-1} para CO y para estiramiento de CH a 2882 cm^{-1} , sugiriendo una interacción Au-QE y recubrimiento de PEG. (PEGilación del núcleo).

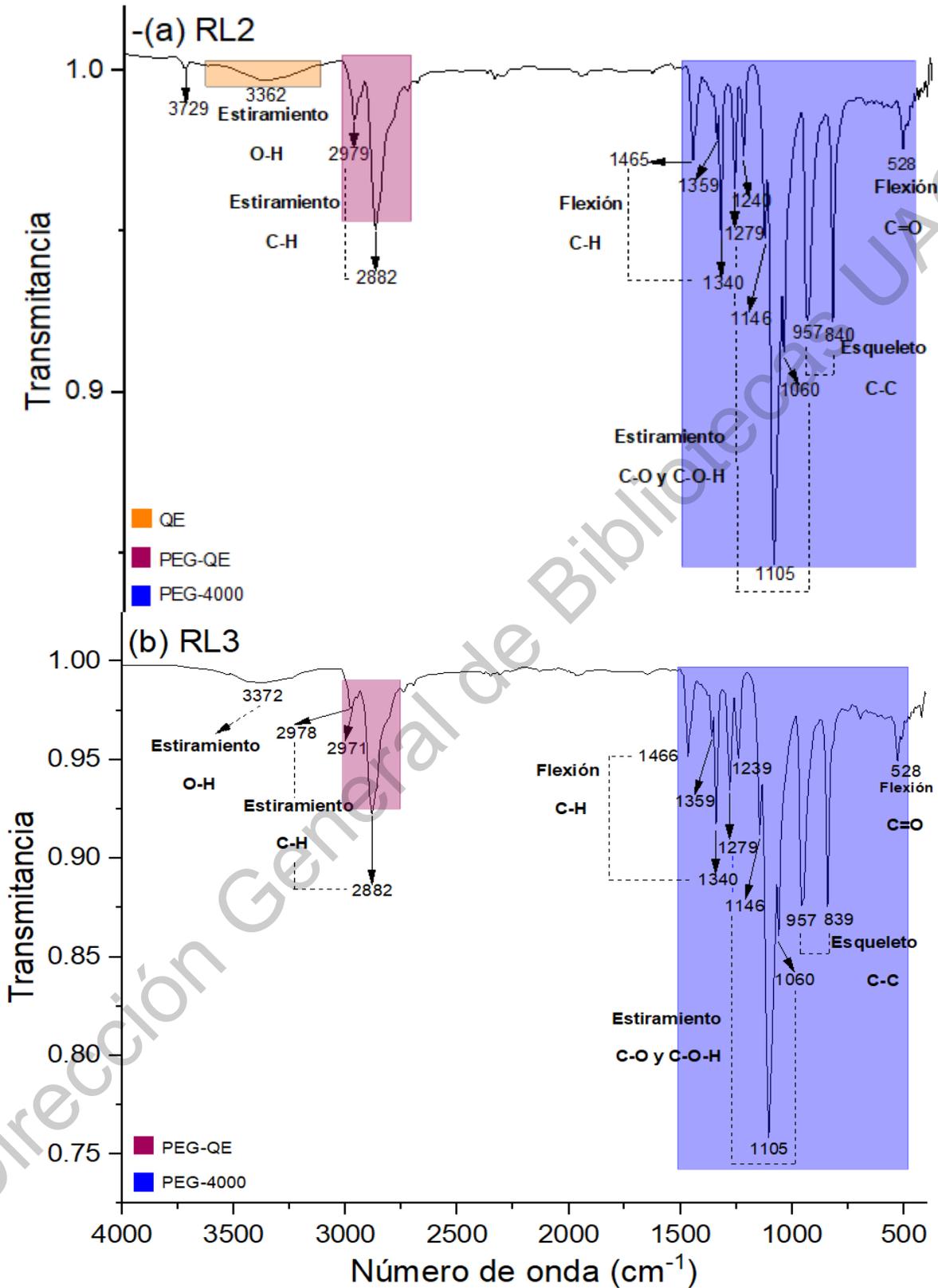


Figura 14. Muestra los espectros de la (a) solución RL2 (sonoquímica) y la (b) solución RL3 (sonoquímica).

11.1.4 Espectroscopia RAMAN

En la Tabla II, se indican las señales que aparecen en el espectro obtenido por la espectroscopia RAMAN y sus modos vibracionales correspondientes a cada señal. La asignación de los valores de las señales obtenidas y los modos vibracionales se realizó mediante la comparación de los espectros de IR obtenidos y bibliografía reportada en la literatura (Srinivasan, S., et al., 2016; Numata, Y. y Tanaka, H., 2010).

Realizando el análisis, en la Figuras 15 (a) y (b), podemos observar dos señales en 851 y 876 cm^{-1} que corresponden a vibraciones C-C y C-O que se atribuyen a una interacción PEG-QE, ya que para los compuestos puros normalmente aparecería en 840 cm^{-1} para PEG y 863 cm^{-1} para la QE. Mientras que en el rango de 11471 a 1449 cm^{-1} aparecen señales relacionadas con vibraciones CH_2 y que en este caso se atribuyen al PEG de manera específica. Las vibraciones en 1044, 1247 y 1625 cm^{-1} , esta última siendo de la QE, las 4 corresponden a las vibraciones C-O en la superficie, esto explicaría porque la PEG-QE-NPAu tiene una carga negativa en su superficie.

Continuado con el análisis las señales que aparecen aproximadamente en 2885 y 2932 cm^{-1} corresponden también a vibraciones C-H características del PEG. Por lo que podemos resumir que en el caso de ambas muestras RL2 y RL3 sintetizadas, se encuentran recubiertas por una capa orgánica en la que, de acuerdo a los resultados obtenidos por esta técnica, sugiere que es el PEG el que se encuentra en la capa más externa. No encontramos señales correspondientes a interacciones Au-QE o Au-PEG por esta técnica, estas deberían aparecer en números de onda entre los 200 y 500 cm^{-1} .

Lo que sugiere que la cubierta orgánica se encuentra distribuida de manera uniforme y homogénea y cubriendo bien a la NPAu. También podemos decir que el método de síntesis influye ligeramente en el ensamblado de la NP, como también se verá en los resultados obtenidos por TEM, pues se observan ligeros corrimientos de las señales según el método, ver Figura 15 (a) y (b).

Espectroscopia RAMAN		
Rango (cm ⁻¹)	Banda Asignada	Molécula
2932-2889	C-H	PEG
1625	C=C, C=O	QE
1475-1451	CH ₂	PEG
1285,1136,1103,1082,878,851	C-O	PEG
1247, 1044	C-C	PEG

Tabla II. Tabla de modos vibracionales de espectroscopia RAMAN.

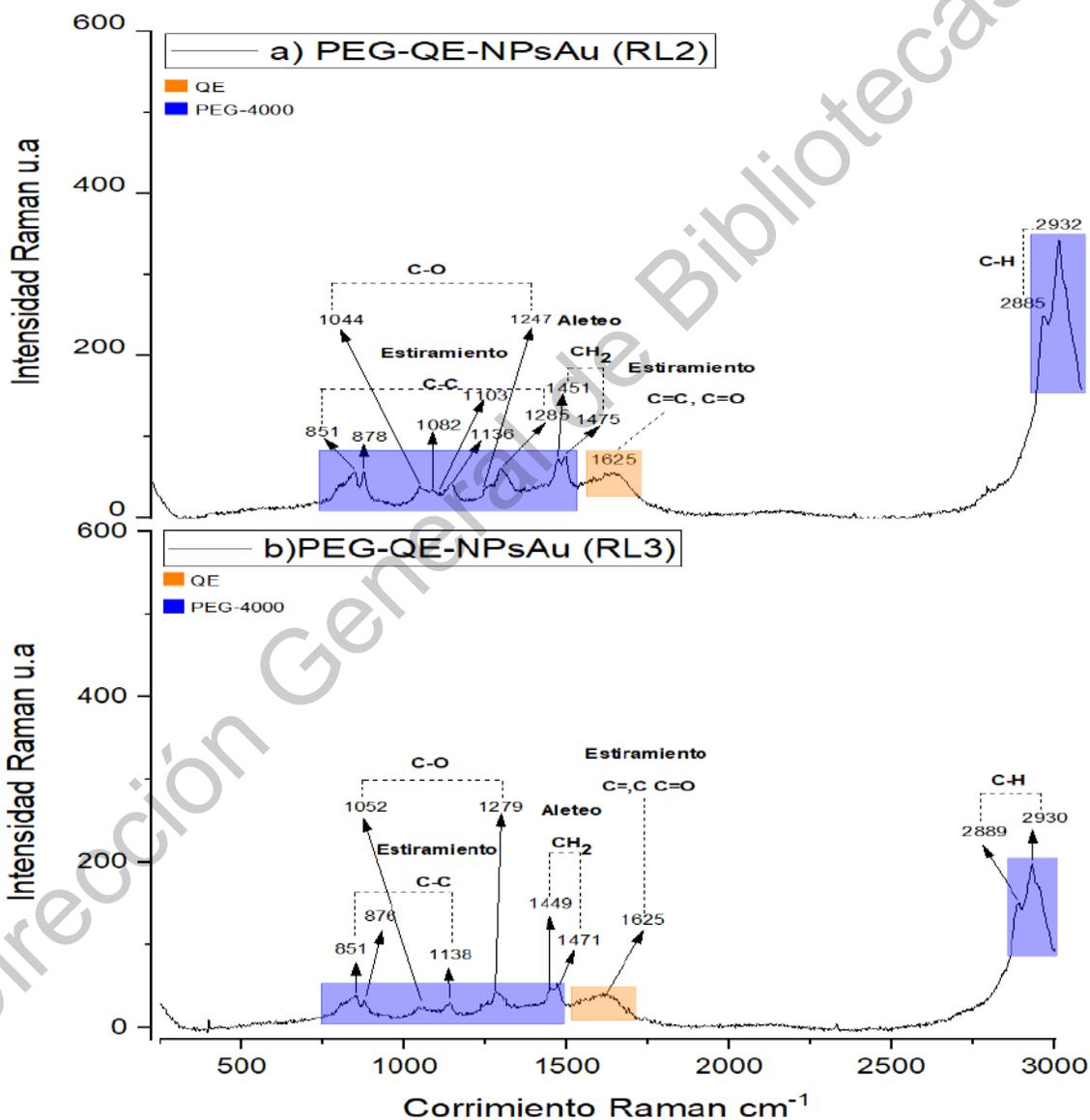


Figura 15. Espectroscopía RAMAN de las PEG-QE-NPsAu (a)RL2 y (b) RL3.

11.1.5 DLS

En la Tabla III se observan los resultados de los diámetros obtenidos de las NPs-Au recubiertas con PEG 4000, en intervalos que oscilan entre los 115.3 a 195.6 nm, siendo las de menor tamaño las realizadas con sonoquímica *in situ* (RL3) y esto se debe a que las largas cadenas poliméricas hidrófilas del PEG puedan estar estabilizando el sistema durante su síntesis, favoreciendo la repulsión estérica entre las PEG-QE-NPsAu, disminuyendo su agregación.

PEG-QE-NPsAu	Estabilidad Coloidal	Índice de Polidispersidad (Pdl)	Diámetro Hidrodinámico (nm)
L 5 minutos	Débil	0.264	115.3
L 20 minutos	Débil	0.265	152.9
RL2	Medio	0.317	195.6
RL3	Bueno	0.294	142.7

Tabla III. Tamaño e índice de polidispersidad de las PEG-QE-NPsAu con sonotrodo *in situ* y con baño ultrasónico.

De acuerdo con el Pdl las muestras presentan una dispersidad con valores de 0.264 a 0.317, este último siendo el más alto, indicando agregados de formas irregulares de partículas que puedan estar agregándose a las PEG-QE-NPsAu de menor tamaño. Las demás soluciones muestran valores de Pdl bajos (0.264, 0.265 y 0.294), indicando una mejor distribución homogénea de las PEG-QE-NPsAu. El tamaño hidrodinámico oscila entre 115 y 200 nm, siendo un tamaño bastante grande cuando es comparado más adelante con las micrografías obtenidas por TEM, que se observan para las icosaédricas de un rango de 18 y 25 nm y las tipo varillas en un rango de 100 nm de largo.

11.1.6 Potencial Z

El Potencial Z es una medida de la magnitud de las interacciones electrostáticas entre superficies cargadas promovido por el movimiento relativo entre el sólido y el líquido en la cual se forma una interface, ya que algunos grupos funcionales del sólido se disocian por efecto del pH o del medio acuoso difundándose en el líquido, mientras la partícula sólida cargada se fija al electrodo, generando un plano de corte entre ambas capas (interface) y con ello un potencial eléctrico entre las dos superficies. Estas características se encuentran en las soluciones coloidales, por lo cual el potencial generado nos ayuda a conocer el valor de la carga superficial de un sistema, que varía de acuerdo a su composición y el medio en el que se encuentra.

En la tabla IV y V se muestran los resultados de potencial Z que se tomaron de las soluciones RL2 y RL3, la primera muestra se tomó a los 35 días de almacenamiento y la segunda toma fue a los 4 meses de almacenamiento.

pH	Primera Toma (RL2)	Segunda Toma (RL2)
3	-4.81 mV	-7.14 mV
4	NA*	-6.07 mV
5	-2.57 mV	-7.42 mV
6	NA*	-0.96 mV
7	42.75 mV	-2.37 mV
8	NA*	-2.19 mV
9	-23.22 mV	-5.21 mV
10	NA*	-3.57 mV
11	-25.14 mV	-10.41 mV

*NA: No aplica, en la primera toma no se midió el potencial Z a los valores de pH identificados.

Tabla IV. Potencial Z de las PEG-QE-NPsAu de la solución RL2 (sonoquímica), primera y segunda toma.

pH	Primera Toma (RL3)	Segunda Toma (RL3)
3	-14.96 mV	-3.46 mV
4	NA*	-2.36 mV
5	-19.34 mV	-10.15 mV
6	NA*	-12.47 mV
7	-18.93 mV	-2.50 mV
8	NA*	-2.30 mV
9	-10.36 mV	-5.46 mV
10	NA*	-2.93 mV
11	-9.61 mV	-2.97 mV
*NA: No aplica, en la primera toma no se midió el potencial Z a los valores de pH identificados.		

Tabla V. Potencial Z de las PEG-QE-NPsAu de la solución RL3 (sonoquímica), primera y segunda toma.

La estabilidad de las PEG-QE-NPs-Au fue determinada por el tamaño y la carga superficial (Potencial Z). La solución RL2 a un pH inicial de 3 tuvo un tamaño promedio por DLS de 195nm y carga de -4.81 mV de acuerdo al valor obtenido con la técnica de potencial Z. Para el caso de la muestra RL3 al pH inicial de 3 tuvo un tamaño de 142 nm (DLS) y una carga de -14.96 mV (potencial Z), ambas soluciones se mantuvieron en refrigeración a 8°C durante 4 meses, disminuyendo su carga superficial en RL2 a -7.14 mV y en RL3 a -3.46 mV. Este resultado puede ser por la agregación de las PEG-QE-NPsAu entre sí, lo que sugiere un incremento de su tamaño y como consecuencia, la disminución de la carga superficial, provocando una repulsión de las cargas de las PEG-QE-NPsAu y con ello su agregación. Otro factor que también pueda estar influenciando la disminución de la carga negativa superficial por efecto de los aglomerados es la disminución de la concentración de los grupos terminales hidróxilo que tiene el PEG, el cual tiende a causar la neutralidad en la carga superficial de las PEG-QE-NPsAu.

En general en ambas soluciones se obtuvo una carga superficial negativa que conforme al tiempo de almacenaje su potencial disminuyo haciéndose menos negativo, suponemos por la formación de aglomeraciones (notable a simple vista

como un precipitado) y por ende se perdió también dispersión. Sin embargo, en los primeros días de almacenaje mostraban un alto potencial Z negativo, lo que indicaba que poseían una alta estabilidad en la solución (no se observaba precipitados).

Los valores del potencial Z de ambas soluciones RL2 y RL3 sugieren una buena estabilidad de los coloides en la primera medición por los valores negativos que obtuvieron y que está en acorde con la convención establecida en las Ref. 30 y 31, pero después de 4 meses su carga negativa disminuyó significativamente. De acuerdo a lo reportado (Bollella, P., et al., 2016; Tasca, F., et al. 2020), es probable que la carga que mantiene la NP puede estar relacionada con las moléculas de la QE, porque al variar el pH de 3 a 7 que es por encima del punto isoeléctrico de la QE, algunas moléculas de QE queden cargadas negativamente y se conserven absorbidas en la superficie de las PEG-QE-NPsAu o bien en su medio y es por ello que no se pueda observar un punto isoeléctrico en las PEG-QE-30NPsAu.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización físico-química de las PEG-QE-NPsAu obtenidas, se puede concluir que las PEG-QE-NPsAu, se encuentran formando un ensamble en donde el centro de la NP está constituida por átomos de Au formando cristales con diferentes morfologías y tamaños, principalmente icosaédricas según los resultados obtenidos por TEM, con tamaños entre 18 y 25 nm y algunas morfologías tipo triangular y varilla con tamaños alrededor de 100 nm de largo.

Estas NPs están cubiertas con una capa orgánica también observada por SEM de alrededor de 25 nm que, de acuerdo a los resultados obtenidos por FTIR y RAMAN, el PEG es el que principalmente se encuentra en la superficie. La estabilidad de las PEG-QE-NPsAu, se determinó con la técnica DLS y el potencial-z en donde los valores obtenidos para éstas indican una alta estabilidad coloidal, ya que los potenciales obtenidos son negativos y menores a los 25 mV y el diámetro hidrodinámico se encuentra en un rango de 142.7 nm (las más estable RL3), lo cual indica que la PEG-QE-NPAu se encuentra rodeada por multicapas de iones alrededor de ella, haciéndola estable en la solución debido a las fuerzas repulsivas que existen entre las PEG-QE-NPsAu. Cabe mencionar que el tiempo en el que se

mantuvieron estables fue de meses. Mediante la caracterización por UV de las PEG-QE-NPsAu, se obtuvo el SPR a una longitud de onda que oscila de 528 a 543 nm y utilizando el método de Haiss se obtiene un tamaño promedio de 10 a 17 nm, dependiendo del método de síntesis. Para el caso de RL3 se obtuvo un tamaño promedio de 10 nm y una resonancia del plasmón superficial a 528 nm.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

11.1.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Tanto el tamaño como la morfología de los coloides de PEG-QE-NPsAu se estudiaron por (TEM). Tal y como se muestra en la Figura 16.

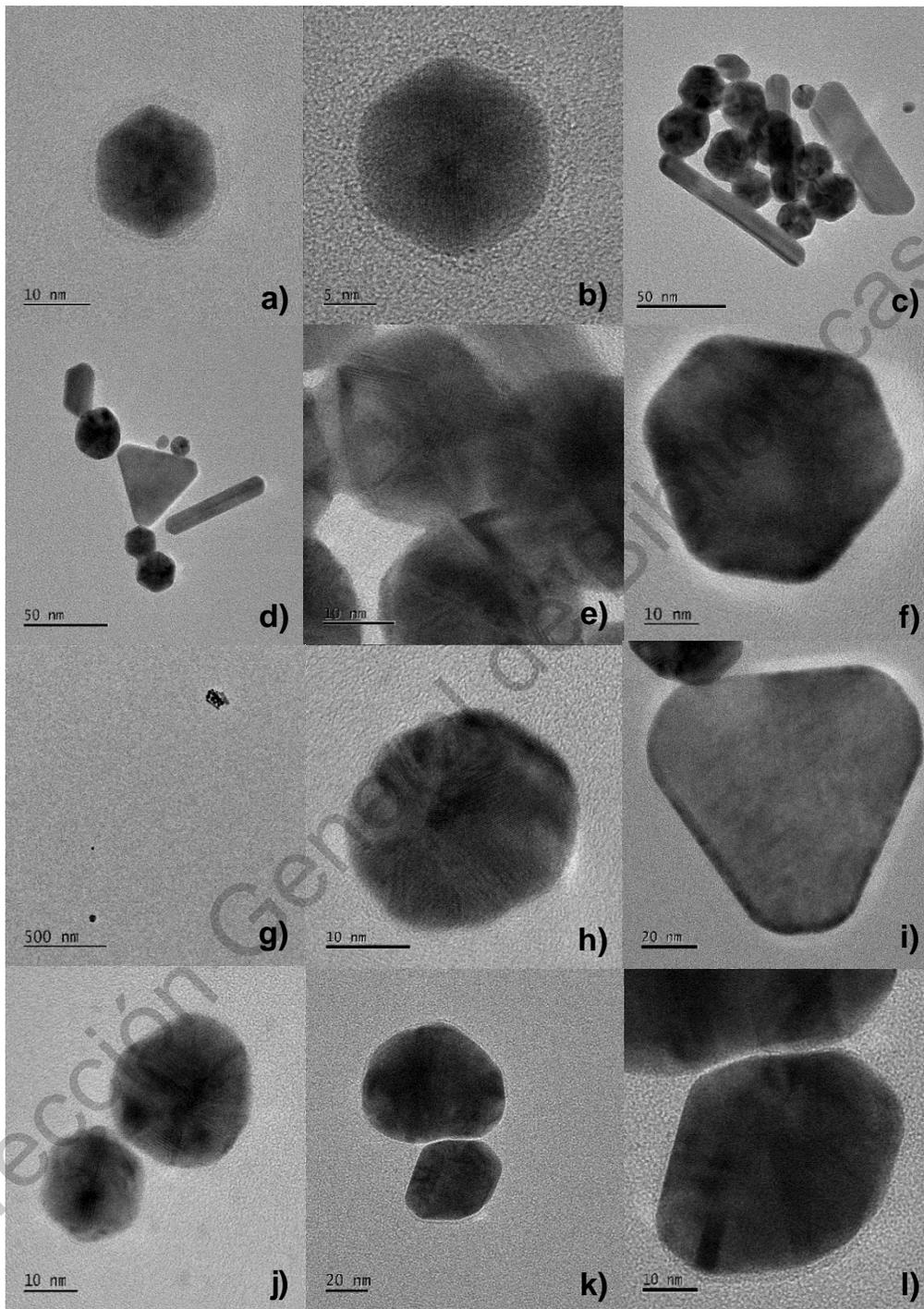


Figura 16. Representan los TEM de a)-g) RL3 y de h)-l) RL2.

Las mediciones de TEM mostraron los diferentes tamaños y formas (diferencia de homogeneidad) de las PEG-QE-NPsAu.

En el lote RL3 mostró en su mayoría Figura 16. c)-h) poliformas con tamaño promedio de 10 nm, en las micrografías de la Figura 13. a)-b-e-f-h) se pueden observar formas icosaédricas, en el caso de la micrografía de la Figura 16. b) la PEG-QE-NPAu tiene un tamaño de 18.75 nm y un recubrimiento orgánico con un espesor de 2.5 nm, mientras que en la micrografía de la Figura 16. d) se observa una triangular y de varilla y Figura 16. c-d-g) se observan las tipo varillas, mientras que en la Figura 16. k-l) se observan aglomerados de PEG-QE-NPsAu con morfología poliforma. De acuerdo a los resultados de DLS, en este lote se obtuvo una polidispersidad de 0.294, indicándonos la existencia de aglomerados de formas irregulares que se corroboran con estas micrografías Figura 16. c). En el núcleo se pueden observar que su naturaleza es nanocristalina Figura 16. e).

Para RL2 se pueden observar PEG-QE-NPsAu con poliformas Figura 16. h- a la -l) con tamaños entre los 18 y 25 nm, también se pueden observar algunos Figura 16. l) triángulos de aproximadamente 50 nm, al igual que en RL3 también poseen un núcleo nanocristalino y una polidispersidad de acuerdo a DLS de 0.317, que coincide con las imágenes de TEM obtenidos.

Los núcleos metálicos de oro de las nanopartículas muestran una capa o superficie que los rodea con la parte orgánica de PEG y QE adheridas a él, de acuerdo al diseño que se buscaba principalmente y en ambos lotes se obtuvo estos resultados, por lo que podemos decir que hay un recubrimiento orgánico en la superficie de la NP.

12 Resultados de evaluación toxicológica de PEG-QE-NPsAu

Con la finalidad de conocer la evaluar la toxicidad de las muestras de PEG-QE-NPsAu, se utilizaron células HeLa (ATCC® CCL-2TM) humanas inmortalizadas de CaCu en monocapa y ensayos MTS y LDH.

Se presentan los resultados obtenidos en las Figuras 14 y 15, mostrando la viabilidad celular en términos de la reducción del MTS/PMS (Figura 17) y en términos de la liberación de LDH (Figura 19), en función de la concentración (m/V) de las PEG-QE-NPsAu en células HeLa.

12.1 Resultados del ensayo MTS

Para poder utilizar concentraciones [m/V] en los rangos estandarizados por la comunidad científica (Sadlage, P.S., et al. 2021)., se optó por centrifugar los coloides, secarlo, pesarlo y resuspenderlo en medio de cultivo enriquecido a una concentración inicial de 1mh/mL. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de 0.5, 5, 50, 250, 500 y 1000 ug/mL, 24 horas, para realizar el ensayo colorimétrico MTS.

Primeramente, la Figura 17 muestra los controles descritos que permitieron normalizar y validar el ensayo MTS. La barra amarilla corresponde al control de células HeLa; sin tratamiento, es decir no expuestas a las PEG-QE-NPsAu. A este control se le dio la ponderación del 100% de viabilidad (capacidad máxima de las células a reducir la sal de tetrazolio), y a partir de éste se normalizaron las absorbancias y porcentajes de las demás muestras. Además, se usaron controles de muerte por DMSO y Triton X, caracterizados por ser sustancias que a las condiciones del trabajo experimental, son tóxicas para las células y reducen de manera significativa la actividad metabólica de las células. Estos controles de muerte permitieron validar el ensayo al causar una disminución en la actividad metabólica en un 74.69% con DMSO y un 76.23% con Triton X, respectivamente.

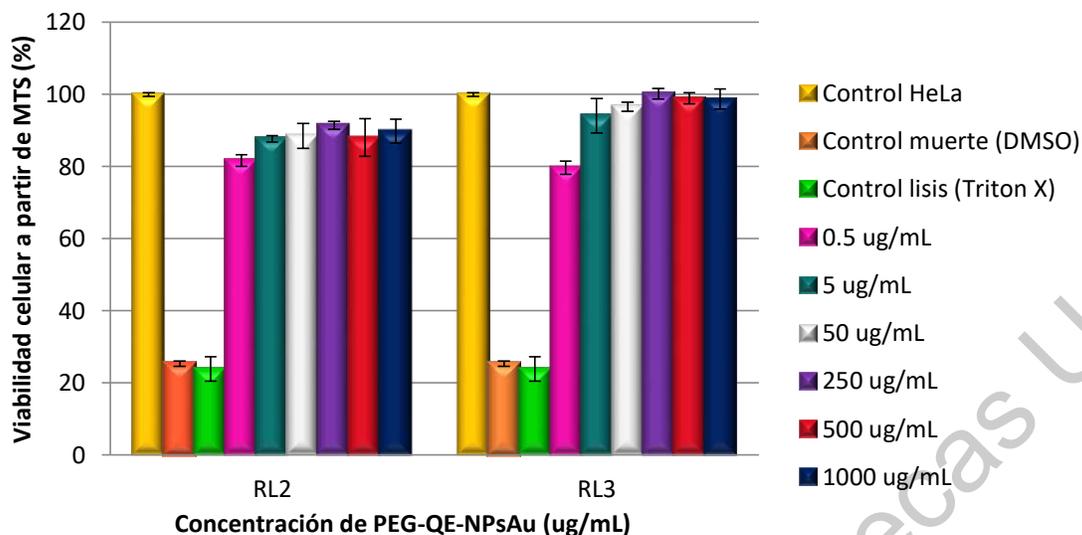


Figura 17. Viabilidad de células HeLa, en términos de la reducción de MTS, después 24 h de exposición a diferentes concentraciones de las muestras RL2 y RL3 de PEG-QE-NPsAu, sintetizadas por sonoquímica in situ a 26 kHz. Los resultados representan la media de triplicados técnicos y la desviación estándar. Se agregaron controles de células sin tratamiento, de muerte por DMSO y control lisis usando Triton X.

Por otro lado, a diferentes concentraciones de PEG-QE-NPsAu, en RL2 disminuye la viabilidad en un 10% de manera estándar, por lo que puede considerarse hasta este punto como no tóxica, pero depende del modelo y las condiciones con las que se trabajaron. Por ejemplo, el tipo de síntesis de los nanomateriales que se utilizan para las pruebas de toxicidad. El método de síntesis de las PEG-QE-NPsAu es simple, porque se usa directamente la QE como agente reductor sin usar otros agentes, por lo que se obtuvieron diferentes morfologías (NPsAu poliformes, icosaédricas, varillas y triangulares, varía entre los 10-25 nm). La barra morada muestra la menor disminución de viabilidad a una concentración de 250 ug/mL del 8.59%, lo que nos indica que no hay toxicidad significativa a una concentración alta en las células.

Con la muestra RL3 se observó una ligera disminución a concentraciones bajas a un 80% de manera estándar, como por ejemplo la barra magenta (0.5 ug/mL) que decayó a un 79.67%. Esto puede explicarse porque mientras más diluida este la muestra, mejor dispersión entre las PEG-QE-NPsAu y por lo tanto mayor área de

contacto y mejor interacción con las células. De manera que las células pudieron encontrar mecanismos de internalización, que agregados de PEG-QE-NPsAu pueden estar impidiendo la interacción con las células como se observa en la Figura 16. (c). En el caso de 5 ug/mL su barra de error es más grande (± 4.75) y, abarcando las demás, eso significa que no habrá diferencia significativa de 5 a 1000 ug/mL, lo que indica que no causa algún efecto citotóxico.

Recientemente en células de cáncer de mama (MCF-7) para ver actividad cancerosa que pueda existir con el AU, PEG y QE, Sadalage, P. et al. usaron controles MCF-7 sin tratar, de QE sola, PEG-NPsAu y PEG-NPsAu con diferente concentración de QE, donde observaron una disminución en su viabilidad celular a partir de ensayos MTT (análogo al MTS), respecto a sus PEG-NPsAu con QE a altas concentraciones de 800 ug/mL, disminuyó aproximadamente a un 40%, mientras que con sus PEG-NPsAu no mostraron una pérdida de la actividad significativa, al igual que con sus pruebas con QE y esto se puede deber a que la QE es un agente no soluble en medios de cultivo, por lo tanto se pierde en una fase que no es la adecuada para que se solubilice y; a su vez interactúe directamente con las células y no produzca toxicidad (Sadalage, P.S., et al. 2021). Mientras que, en nuestra síntesis la QE se agrega directamente con el PEG, para la reducción de las sales de Au y así la formación de las NPs.

Como ya se había mencionado anteriormente, las condiciones de síntesis de los nanomateriales, pueden influir en su toxicidad, como el caso de la investigación de Sadalage, P. et al., en su proceso de síntesis que lleva más agentes reductores, y por lo tanto más pasos intermitentes como la variación de pH, tiempo, agentes reductores y temperaturas, por lo que obtenían NPsAu esféricas y ovaladas de 5-15 nm (TEM) (Sadalage, P.S., et al. 2021) y por lo tanto diferentes comportamientos con las células. Donde sí disminuyó su viabilidad celular a 800 ug/mL, mientras que con las PEG-QE-NPsAu se mantuvieron los valores y no decayeron.

En el sistema de células MCF-7 de Sadalage, P. et al. observaron que la actividad anticancerígena de sus PEG-NPsAu con QE, alteraron la morfología de las células MCF-7, teniendo formas irregulares y algunas otras se rompían. Mientras que con

células HeLa, no se observaron cambios en la morfología de su membrana, incluso después de haber sido expuestas con las PEG-QE-NPsAu (RL2 y RL3) a las diferentes concentraciones, con las condiciones de síntesis y ensayo no presentaron toxicidad, ver Figura 18 (a)-(c).

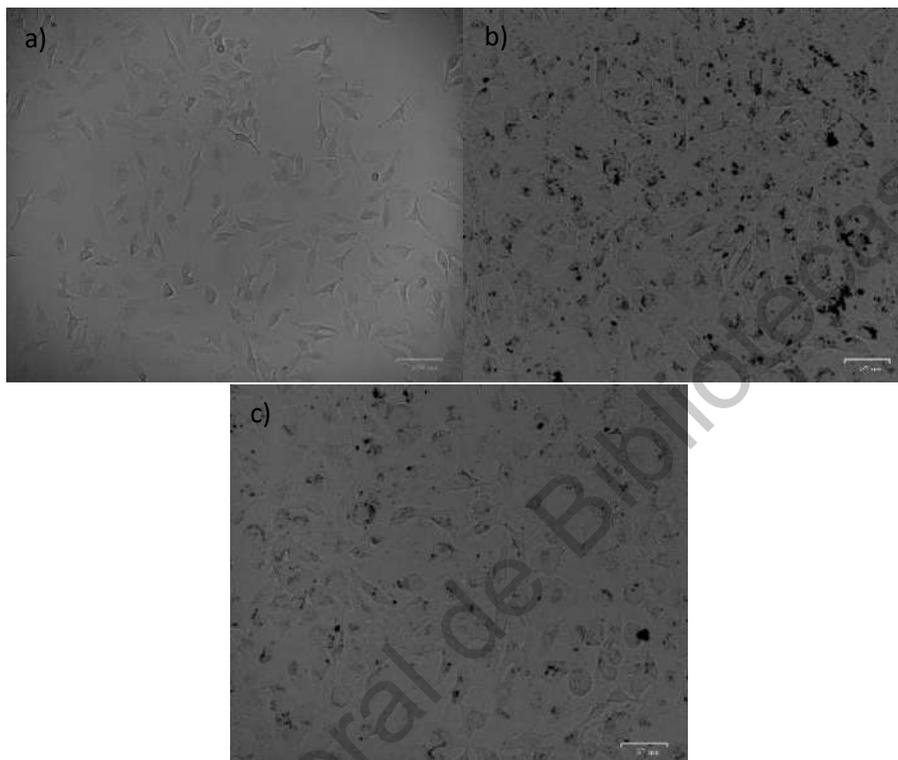


Figura 18. Micrografías ópticas de (a) células HeLa sin tratamiento, (b) células HeLa con las PEG-QE-NPsAu (RL2) con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y (c) células HeLa con las PEG-QE-NPsAu (RL3) con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de 24 horas de incubación, lavadas con PBS.

12.2 Resultados del ensayo LDH

El ensayo LDH permite la detección rápida y sensible de la liberación de LDH hacia el fluido extracelular (medio de cultivo) para evaluar el daño causado a la membrana plasmática y conocer el nivel de muerte celular y citotoxicidad de los cultivos.

En el ensayo LDH los controles, son para observar la liberación de LDH, en la Figura 19 están los controles HeLa tratadas con Triton X, que se le asignó un porcentaje del 100% del daño causado por la liberación de LDH, además de un control HeLa sin tratar, por lo que las células liberaron un 19.88% al normalizarlas con el Triton X, ese 19.88% es de la liberación del estado basal, el control DMSO (daña las células) es otro control de muerte que aumenta la liberación de LDH por ser una sustancia tóxica.

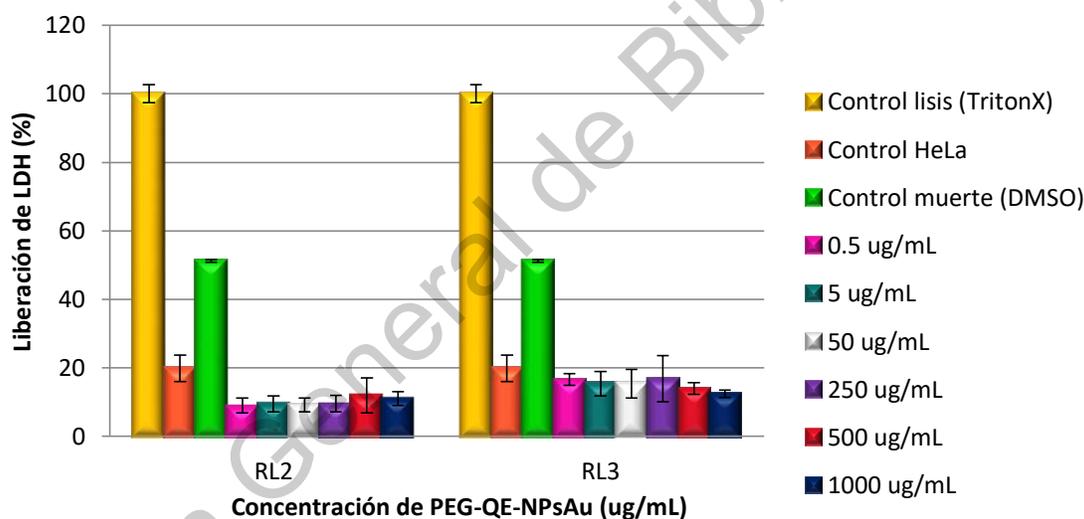


Figura 19. Viabilidad de células HeLa, en términos de la reducción de LDH, después 24 h de exposición a diferentes concentraciones de las muestras RL2 y RL3 de PEG-QE-NPsAu, sintetizadas por sonoquímica *in situ* a 26 kHz. Los resultados representan la media de triplicados técnicos y la desviación estándar. Se agregaron controles de células sin tratamiento, de muerte por DMSO y control lisis usando Triton X.

Al tratar las células HeLa con las PEG-QE-NPsAu, en los resultados se observó una menor liberación de LDH en presencia de las PEG-QE-NPsAu, por lo que en los resultados no se tuvieron cambios significativos. En RL2 la liberación de LDH fue mínima del 11% aproximadamente a concentraciones altas, por ejemplo, del 11.98 % a 500 ug/mL de concentración de PEG-QE-NPsAu.

Aunque con RL3 se libera más LDH, se observa que los rangos de valores de las barras están por debajo de la liberación natural de las células HeLa sin tratar, como con la barra azul con un valor de 12.42%. Con esta técnica podemos decir que a diferencia de MTS, donde se observó una tendencia en RL2 y RL3, en LDH no la hay, porque no se conoce algún otro factor que pueda estar causando daño a la membrana celular, hacen falta más estudios para conocer ampliamente este punto.

13 Resumen de resultados.

- Se obtuvieron coloides de PEG-QE-NPsAu poliformes, con el método asistido por radiación ultrasónica in situ que emplea una frecuencia de 26 kHz y una amplitud del 50%, utilizando QE como agente reductor y PEG 400 como agente estabilizador.
- El resultado obtenido por UV-Vis mostró la desaparición de la señal de Au³⁺ la cual aparece a 310 nm lo cual sugirió una reducción completa del precursor (Au³⁺) y la formación de las PEG-QE-NPsAu con un SPR localizado alrededor de 528 nm.
- En el caso de TEM, se observó que las NPs se encuentran en un rango de tamaños entre los 10 y 25 nm (TEM). Los núcleos metálicos de oro de las NPs muestran una capa o superficie que los rodea con la parte orgánica de PEG y QE con un espesor de 2.5 nm.
- Los análisis con DLS y Potencial Z indicaron que los coloides de PEG-QE-NPsAu mostraron un H_d de 142.7 nm (Pdl = 0.294) y una carga superficial de -14.96 mV al pH fisiológico.
- Con Raman y FTIR se identificaron las bandas características de QE y PEG, a 528 cm⁻¹ para CO y el estiramiento del CH₂ a 2882 cm⁻¹ en PEG, y aparece una nueva banda para la interacción PEG-QE en 2980 cm⁻¹ que se desplaza

ligeramente y disminuye en intensidad a 2079-2971 cm^{-1} , mientras que las señales en 3397 y 3266 cm^{-1} características de las elongaciones o estiramiento -OH para la quercetina, se ven drásticamente disminuidos o desaparecen, lo que sugiere una interacción Au-QE y PEG.

- Por lo tanto, los coloides de QE-NPsAu pegiladas estables que contienen QE fueron sintetizadas y caracterizadas con éxito, en la perspectiva de generar nuevos conocimientos y proponer alternativas innovadoras basadas en nanotecnología verde para mejorar el rendimiento del tratamiento contra el cáncer.
- En MTS, una ligera disminución de la viabilidad celular ocurre con PEG-QE-NPsAu a diferentes concentraciones en HeLa, disminuye la actividad metabólica al 80%, de manera similar para todas las demás muestras evaluadas. Por lo tanto, las PEG-QE-NPsAu no se consideran tóxicas. Los resultados de LDH también indicaron que no hubo daño en la membrana celular a las diferentes concentraciones de PEG-QE-NPsAu utilizadas, esto es, al 12% y 16%, para RL2 y RL3, respectivamente. Sin embargo, se necesitan más pruebas de toxicidad de controles de QE, PEG y $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, individualmente y de técnicas de microscopía avanzadas para determinar si de manera individual el QE-NPAu o el PEG-NPAu pueden causar algún daño a la membrana celular cuando no actúan de manera conjunta.

14 Conclusión.

La variación de la concentración del agente reductor y/o del agente estabilizador en el proceso de síntesis de las PEG-QE-NPsAu asistido por radiación ultrasónica de alta frecuencia manifestó tener una influencia directa en el tamaño, forma y estabilidad de éstas. Como así se confirmó, cuando se comparó con los resultados obtenidos por UV y método de Haiss y DLS para el caso de baño ultrasónico, en donde las PEG-QE-NPsAu obtenidas fueron de mayor tamaño.

Los coloides PEG-QE-NPsAu obtenidas por radiación ultrasónica de alta frecuencia no mostraron toxicidad de acuerdo con los ensayos por MTS y LDH.

Por lo tanto, las QE-NPsAu pegiladas estables fueron sintetizadas y caracterizadas con éxito, en la perspectiva de generar nuevos conocimientos y proponer alternativas innovadoras basadas en nanotecnología verde para mejorar el rendimiento del tratamiento contra el cáncer.

15 Referencias.

1. Jain, S., & Mehata, M. S. (2017). Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. *Scientific Reports*, P. 1-11.
2. Spadavecchia, J., Movia, D., Moore, C., Manus Maguire, C., Moustauoui, H., Casale, S., ... Prina-Mello, A. (2016). Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine*, P. 791-811
3. Mechuga, L. (2014). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología. 9a edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. P. 98-112
4. Mollins, R. (2008). Oportunidades y amenazas de la nanotecnología para la salud, los alimentos, la agricultura y el ambiente. *COMUN//CA*, Año 4, Segunda etapa. P.39-43
5. Guzman Duxtan, Aldo & Cuyubamba, Arroyo. (2014). Síntesis y caracterización estructural de nanocobre vía microondas-ultrasonido, estabilizado con oligómeros tipo tereftalato de Bis-2-Hidroxieltilo (BHET). Universidad Nacional de San Marcos. *Rev.Per.Quím.Ing. Quím.* Vol.16 N°.1, 2013.P.39-42.
6. Abu-Salah, K. M., Ansari, A. A., & Alrokayan, S. A. (2010). DNA-Based Applications in Nanobiotechnology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, P. 1-5.
7. Destrée, C., & B.Nagy, J. (2006). Mechanism of formation of inorganic and organic nanoparticles from microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, P. 353-361.
8. ChenCurrent address: Key Lab. of Ra, J., Spear, S. K., Huddleston, J. G., & Rogers, R. D. (2005). Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, P. 64-72.
9. Calvo García, S. (2013). Cultivo de células en 3D. La nueva dimensión de los cultivos celulares. Universidad de Salamanca. P. 215-224.

10. GHOSH, P., HAN, G., DE, M., KIM, C., & ROTELLO, V. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, P. 1307-1314.
11. Henderson, B., Bernstein, L. & Ross, R. (2000). *Oncología básica fisiopatología, evaluación y tratamiento*. Ediciones científicas, LA PRENSA MEDICA MEXICANA. P.15-34.
12. Jaramillo, J (1991). *El cáncer, Fundamentos de oncología Tomo 2*. Costa Rica. P. 911-916.
13. Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*, P. 18-28.
14. Santa, C. F., & López Osorio, B. L. (2013). Materiales Poliméricos en la nanomedicina: Transporte y liberación controlada de fármacos. *Grupo Ciencia de los Materiales. Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 37. P.1-9.
15. Mansoori, G. A., Brandenburg, K. S., & Shakeri-Zadeh, A. (2010). A Comparative Study of Two Folate-Conjugated Gold Nanoparticles for Cancer Nanotechnology Applications. *Cancers*, P. 1911-1919.
16. Mehdizadeh, A., Pandesh, S., Shakeri-Zadeh, A., Kamrava, S. K., Habib-Agahi, M., Farhadi, M., ... Fedutik, Y. (2013). The effects of folate-conjugated gold nanorods in combination with plasmonic photothermal therapy on mouth epidermal carcinoma cells. *Lasers in Medical Science*, P. 939-947.
17. Shakeri-Zadeh, Ali & Mansoori, G Ali & Hashemian, Reza & Eshghi, Hossein & Sazgarnia, Ameneh & Montazerabadi, Alireza. (2010). Cancerous cells targeting and destruction using folate conjugated gold nanoparticles. *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* P. 6-10.
18. Shakeri-Zadeh, A., Shiran, M.-B., Khoei, S., Sharifi, A. M., Ghaznavi, H., & Khoei, S. (2014). A new magnetic nanocapsule containing 5-fluorouracil: In vivo drug release, anti-tumor, and pro-apoptotic effects on CT26 cells allograft model. *Journal of Biomaterials Applications*, P.1-5.
19. Shakeri-Zadeh, A., Kamrava, S. K., Farhadi, M., Hajikarimi, Z., Maleki, S., & Ahmadi, A. (2013). A scientific paradigm for targeted nanophotothermolysis;

- the potential for nanosurgery of cancer. *Lasers in Medical Science*. Pag.847-855.
20. KREUTER, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, P. 1-8.
 21. Bazak, R., Hourri, M., El Achy, S., Kamel, S., & Refaat, T. (2014). Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, P. 769-771.
 22. Suslick, K. S. (2000). Sonochemistry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. P. 1-6.
 23. Lara, C., Jiménez, J., Matsumura, P., Batina, N. y Gallegos, E. (2018). Científicos desarrollan mecanismos para destruir células de cáncer de mama. *Revista Semanario de la UAM, órgano Informativo de la Universidad Autónoma Metropolitana*. Vol. XXIV, Núm.21 P. 4-5.
 24. S. Bonvalot, C. Le Pechoux, T. De Baere, G. Kantor, X. Buy, E. Stoeckle, P. Terrier, P. Sargos, J. M. Coindre, N. Lassau, et al., *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 908–917.
 25. F. Lux, V. L. Tran, E. Thomas, S. Dufort, F. Rossetti, M. Martini, C. Truillet, T. Doussineau, G. Bort, F. Denat, et al., *Br. J. Radiol.* 2019, 92, 1-19.
 26. C. Verry, L. Sancey, S. Dufort, G. Le Duc, C. Mendoza, F. Lux, S. Grand, J. Arnaud, J. Louis Quesada, J. Villa, et al., *BMJ Open*
 27. S. K. Libutti, G. F. Paciotti, A. A. Byrnes, H. R. Alexander, W. E. Gannon, M. Walker, G. D. Seidel, N. Yuldasheva, L. Tamarkin, *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 6139–6149.
 28. Bollella, P., Schulz, C., Favero, G., Mazzei, F., Ludwig, R., Gorton, L. y Antiochia, R. (2016). Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor. *Electroanalysis*, P.5.
 29. Tasca, F., & Antiochia, R. (2020). Biocide Activity of Green Quercetin-Mediated Synthesized Silver Nanoparticles. *Nanomaterials*, MDPI. P.6.

30. Hunter, R. J. [Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications](#). Academic Press. (1981).
31. Lyklema, J. [Fundamentals of Interface and Colloid Science](#). (1991).
32. Numata, Y. y Tanaka, H., (2010). Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. ELSEVIER. Nihon University, Koriyama, P. 753.
33. Srinivasan, S., Bhardwa, V., Nagasetti, A., Fernandez, A. y J. McGoron, A. (2016). Multifunctional Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Detectable Silver Nanoparticles for Combined Photodynamic Therapy and pH-Triggered Chemotherapy. AMERICAN SCIENTIFIC PUBLISHERS. Journal of Biomedical Nanotechnology. Vol 12, 2202-2219, 2016. P.2212.
34. Sadalage, P.S., Patil, R.V., Havaladar, D.V. *et al.* (2021). Optimally biosynthesized, PEGylated gold nanoparticles functionalized with quercetin and camptothecin enhance potential anti-inflammatory, anti-cancer and anti-angiogenic activities. *J Nanobiotechnol.*
35. Cheme, C.V. (2016). Separación de una mezcla de quercetina y morfina en sus componentes individuales. Universidad Técnica de Machala. P.10.
36. Mayolo-Deloisa, K.P y Rito-Palomare, M. (2010). Proteínas PEGiladas: producción, purificación y aplicaciones. Rev. Mex. Ing. Quím vol.9 no.1 México.

Anexos

A.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

Versión: 1.0 es

fecha de emisión: 20.01.2017

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificador del producto

Identificación de la sustancia	Quercetina
Número de artículo	1210
Número de registro (REACH)	Esta información no está disponible.
Número CE	204-187-1
Número CAS	117-39-5

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados: producto químico de laboratorio

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Carl Roth GmbH + Co KG
Schoemperlenstr. 3-5
D-76185 Karlsruhe
Alemania

Teléfono: +49 (0) 721 - 56 06 0

Fax: +49 (0) 721 - 56 06 149

e-mail: sicherheit@carlroth.de

Sitio web: www.carlroth.de

Persona competente responsable de la ficha de datos de seguridad : Department Health, Safety and Environment

e-mail (persona competente) : sicherheit@carlroth.de

1.4 Teléfono de emergencia

Servicios de información para casos de emergencia

Poison Centre Munich: +49/(0)89 19240

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación según el Reglamento (CE) no 1272/2008 (CLP)

Clasificación según SGA			
Sección	Clase de peligro	Clase y categoría de peligro	Indicación de peligro
3.10	toxicidad aguda (oral)	(Acute Tox. 3)	H301

Observaciones

Véase el texto completo de las frases H y EUH en la SECCIÓN 16.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

2.2 Elementos de la etiqueta

Etiquetado según el Reglamento (CE) no 1272/2008 (CLP)

Palabra de advertencia Peligro

Pictogramas



Indicaciones de peligro

H301 Tóxico en caso de ingestión.

Consejos de prudencia

Consejos de prudencia - prevención

P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.

Consejos de prudencia - respuesta

P301+P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

Etiquetado de los envases cuyo contenido no excede de 125 ml

Palabra de advertencia: Peligro

Símbolo(s)



H301 Tóxico en caso de ingestión.

P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.

P301+P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

2.3 Otros peligros

No hay información adicional.

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Nombre de la sustancia	Sophoretin
Número CE	204-187-1
Número CAS	117-39-5
Fórmula molecular	$C_{16}H_{10}O_7$
Masa molar	302,2 g/mol

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

4.1 Descripción de los primeros auxilios



Notas generales

Quitar las prendas contaminadas.

En caso de inhalación

Proporcionar aire fresco. Si aparece malestar o en caso de duda consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Aclararse la piel con agua/ducharse. Si aparece malestar o en caso de duda consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Si aparece malestar o en caso de duda consultar a un médico.

En caso de ingestión

Lavar la boca inmediatamente y beber agua en abundancia. Llamar al médico inmediatamente.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Náuseas, Vómitos, Espasmos, Diarrea

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

ninguno

SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios

5.1 Medios de extinción

Medios de extinción apropiados

Coordinar las medidas de extinción con los alrededores
agua pulverizada, espuma, polvo extinguidor seco, dióxido de carbono (CO₂)

Medios de extinción no apropiados

chorro de agua

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Combustible.

Productos de combustión peligrosos

En caso de incendio pueden formarse: monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂)

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Luchar contra el incendio desde una distancia razonable, tomando las precauciones habituales.
Llevar un aparato de respiración autónomo.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Para el personal que no forma parte de los servicios de emergencia

No respirar el polvo. Evítese el contacto con los ojos y la piel.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

Manteniendo el producto alejado de los desagües y de las aguas superficiales y subterráneas.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Consejos sobre la manera de contener un vertido

Cierre de desagües.

Indicaciones adecuadas sobre la manera de limpiar un vertido

Recoger mecánicamente. Control del polvo.

Otras indicaciones relativas a los vertidos y las fugas

Colocar en recipientes apropiadas para su eliminación.

Referencia a otras secciones

Productos de combustión peligrosos: véase sección 5. Equipo de protección personal: véase sección 8. Materiales incompatibles: véase sección 10. Consideraciones relativas a la eliminación: véase sección 13.

SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento

7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evitar la producción de polvo. Evítese la exposición.

• Medidas de prevención de incendios, así como las destinadas a impedir la formación de partículas en suspensión y polvo

Eliminación de depósitos de polvo.

Recomendaciones sobre medidas generales de higiene en el trabajo

No comer ni beber durante su utilización. Después de trabajar con el producto lavar inmediatamente bien la piel.

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Consérvese el recipiente bien cerrado y en lugar fresco. Durante mucho tiempo a la luz puede causar descomposición.

Sustancias o mezclas incompatibles

Observe el almacenamiento compatible de productos químicos.

Atención a otras indicaciones

Guardar bajo llave.

• Requisitos de ventilación

Utilización de ventilación local y general.

• Diseño específico de locales o depósitos de almacenamiento

Temperatura de almacenaje recomendada: 4 °C.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

7.3 Usos específicos finales

No existen informaciones.

SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual

8.1 Parámetros de control

Valores límites nacionales

Valores límites de exposición profesional (límites de exposición en el lugar de trabajo)

País	Nombre del agente	Anotación	Identificador	VLA-ED [mg/m ³]	VLA-EC [mg/m ³]	Fuente
ES	partículas no especificadas de otra forma	i	VLA	10		INSHT
ES	partículas no especificadas de otra forma	r	VLA	3		INSHT

Anotación

i Fracción inhalable

r Fracción respirable

VLA-EC Valor límite ambiental-exposición de corta duración (nivel de exposición de corta duración): valor límite a partir del cual no debe producirse ninguna exposición y que hace referencia a un periodo de 15 minutos, salvo que se disponga lo contrario

VLA-ED Valor límite ambiental-exposición diaria (límite de exposición de larga duración): tiempo medido o calculado en relación con un periodo de referencia de una media ponderada en el tiempo de ocho horas

8.2 Controles de exposición

Medidas de protección individual (equipo de protección personal)



Protección de los ojos/la cara

Utilizar gafas de protección con con protección a los costados.

Protección de la piel

• protección de las manos

Úsese guantes adecuados. Adecuado es un guante de protección química probado según la norma EN 374. Para usos especiales se recomienda verificar con el proveedor de los guantes de protección, sobre la resistencia de éstos contra los productos químicos arriba mencionados.

• tipo de material

NBR (Goma de nitrilo)

• espesor del material

>0,11 mm

• tiempo de penetración del material con el que están fabricados los guantes

>480 minutos (permeación: nivel 6)

• otras medidas de protección

Hacer periodos de recuperación para la regeneración de la piel. Están recomendados los protectores de piel preventivos (cremas de protección/pomadas).

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

Protección respiratoria

Protección respiratoria es necesaria para: Formación de polvo. Filtro de partículas (EN 143), P1 (filtra al menos 99,95 % de las partículas atmosféricas, código de color: blanco).

Controles de exposición medioambiental

Manteniendo el producto alejado de los desagües y de las aguas superficiales y subterráneas.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

Aspecto

Estado físico	sólido (polvo)
Color	amarillo
Olor	inodoro
Umbral olfativo	No existen datos disponibles

Otros parámetros físicos y químicos

pH (valor)	Esta información no está disponible.
Punto de fusión/punto de congelación	310 - 320 °C
Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	Esta información no está disponible.
Punto de inflamación	Esta información no está disponible.
Tasa de evaporación	no existen datos disponibles
Inflamabilidad (sólido, gas)	Esta información no está disponible

Límites de explosividad

• límite inferior de explosividad (LIE)	esta información no está disponible
• límite superior de explosividad (LSE)	esta información no está disponible
Límites de explosividad de nubes de polvo	estas informaciones no están disponibles

Presión de vapor	Esta información no está disponible.
------------------	--------------------------------------

Densidad	Esta información no está disponible.
----------	--------------------------------------

Densidad de vapor	Esta información no está disponible.
-------------------	--------------------------------------

Densidad relativa	Las informaciones sobre esta propiedad no están disponibles.
-------------------	--

Solubilidad(es)

Hidrosolubilidad	prácticamente insoluble
------------------	-------------------------

Coeficiente de reparto

n-octanol/agua (log KOW)	Esta información no está disponible.
--------------------------	--------------------------------------

Temperatura de auto-inflamación	Las informaciones sobre esta propiedad no están disponibles.
---------------------------------	--

Temperatura de descomposición	no existen datos disponibles
-------------------------------	------------------------------

Viscosidad	no relevantes (materia sólida)
------------	--------------------------------

Propiedades explosivas	No se clasificará como explosiva
------------------------	----------------------------------

Propiedades comburentes	ninguno
-------------------------	---------

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

9.2 Otros datos

No hay información adicional.

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

10.1 Reactividad

Capacidad de polvo explosivo.

10.2 Estabilidad química

El material es estable bajo condiciones ambientales normales y en condiciones previsibles de temperatura y presión durante su almacenamiento y manipulación.

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas

Reacciones fuertes con: Muy comburente

10.4 Condiciones que deben evitarse

Luz directa. Conservar alejado del calor.

10.5 Materiales incompatibles

No hay información adicional.

10.6 Productos de descomposición peligrosos

Productos de combustión peligrosos: véase sección 5.

SECCIÓN 11: Información toxicológica

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda

Vía de exposición	Parámetro	Valor	Especie	Fuente
oral	LD50	161 mg/kg	rata	TOXNET

Corrosión o irritación cutánea

No se clasificará como corrosivo/irritante para la piel.

Lesiones oculares graves o irritación ocular

No se clasificará como causante de lesiones oculares graves o como irritante ocular.

Sensibilización respiratoria o cutánea

No se clasificará como sensibilizante respiratoria o sensibilizante cutánea.

Resumen de la evaluación de las propiedades CMR

No se clasificará como mutágeno en células germinales, carcinógeno ni tóxico para la reproducción

• Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única

No se clasifica como tóxico específico en determinados órganos (exposición única).

• Toxicidad específica en determinados órganos - exposición repetida

No se clasifica como tóxico específico en determinados órganos (exposición repetida).

Peligro por aspiración

No se clasifica como peligroso en caso de aspiración.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

Síntomas relacionados con las características físicas, químicas y toxicológicas

• **En caso de ingestión**

náuseas, vómitos, Espasmos, diarrea

• **En caso de contacto con los ojos**

no se dispone de datos

• **En caso de inhalación**

Después de inhalar polvo pueden irritarse las vías respiratorias

• **En caso de contacto con la piel**

Contacto frecuente y continuo con la piel puede causar irritaciones de piel, riesgo de penetración cutánea

Otros datos

No se han realizado pruebas completas de esta sustancia

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1 Toxicidad

según 1272/2008/CE: No se clasificará como peligroso para el medio ambiente acuático.

12.2 Procesos de degradación

Demanda Teórica de Oxígeno: 1,482 mg/mg
Dióxido de Carbono Teórico: 2,184 mg/mg

12.3 Potencial de bioacumulación

No se dispone de datos.

12.4 Movilidad en el suelo

No se dispone de datos.

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

No se dispone de datos.

12.6 Otros efectos adversos

No se dispone de datos.

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos. Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional.

Información pertinente para el tratamiento de las aguas residuales

No tirar los residuos por el desagüe.

Tratamiento de residuos de recipientes/embalajes

Es un residuo peligroso; solamente pueden usarse envases que han sido aprobado (p.ej. conforme a ADR).

13.2 Disposiciones sobre prevención de residuos

La coordinación de los números de clave de los residuos/marcas de residuos según CER hay que efectuarla específicamente de ramo y proceso.

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

13.3 Observaciones

Los residuos se deben clasificar en las categorías aceptadas por los centros locales o nacionales de tratamiento de residuos. Por favor considerar las disposiciones nacionales o regionales pertinentes.

SECCIÓN 14: Información relativa al transporte

14.1	Número ONU	2811
14.2	Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas	SÓLIDO TÓXICO, ORGÁNICO, N.E.P.
	Componentes peligrosos	Quercetina
14.3	Clase(s) de peligro para el transporte	
	Clase	6.1 (materias tóxicas)
14.4	Grupo de embalaje	III (materia que presenta un grado menor de peligrosidad)
14.5	Peligros para el medio ambiente	ninguno (no peligroso para el medio ambiente conforme al reglamento para el transporte de mercancías peligrosas)
14.6	Precauciones particulares para los usuarios	
	Las disposiciones concernientes a las mercancías peligrosas (ADR) se deben cumplir dentro de las instalaciones.	
14.7	Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio MARPOL y del Código IBC	
	El transporte a granel de la mercancía no está previsto.	
14.8	Información para cada uno de los Reglamentos tipo de las Naciones Unidas	
	• Transporte de mercancías peligrosas por carretera, por ferrocarril o por vía navegable (ADR/RID/ADN)	
	Número ONU	2811
	Designación oficial	SÓLIDO TÓXICO, ORGÁNICO, N.E.P.
	Menciones en la carta de porte	UN2811, SÓLIDO TÓXICO, ORGÁNICO, N.E.P., (Quercetina), 6.1, III, (E)
	Clase	6.1
	Código de clasificación	T2
	Grupo de embalaje	III
	Etiqueta(s) de peligro	6.1
	Disposiciones especiales (DS)	274, 614, 802(ADN)
	Cantidades exepuadas (EQ)	E1
	Cantidades limitadas (LQ)	5 kg
	Categoría di transporte (CT)	2
	Código de restricciones en túneles (CRT)	E
	Número de identificación de peligro	60

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

• Código marítimo internacional de mercancías peligrosas (IMDG)

Número ONU	2811
Designación oficial	TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S.
Designaciones indicadas en la declaración del expedidor (shipper's declaration)	UN2811, SÓLIDO TÓXICO, ORGÁNICO, N.E.P., (Quercetina), 6.1, III
Clase	6.1
Grupo de embalaje	III
Etiqueta(s) de peligro	6.1



Disposiciones especiales (DS)	223, 274
Cantidades exemptuadas (EQ)	E1
Cantidades limitadas (LQ)	5 kg
EmS	F-A, S-A
Categoría de estiba (stowage category)	A

• Organización de Aviación Civil Internacional (OACI-IATA/DGR)

Número ONU	2811
Designación oficial	Sólido tóxico, orgánico, n.e.p.
Designaciones indicadas en la declaración del expedidor (shipper's declaration)	UN2811, Sólido tóxico, orgánico, n.e.p., (Quercetina), 6.1, III
Clase	6.1
Grupo de embalaje	III
	6.1



Disposiciones especiales (DS)	A3, A5, 274
Cantidades exemptuadas (EQ)	E1
Cantidades limitadas (LQ)	10 kg

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

SECCIÓN 15: Información reglamentaria

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla

Disposiciones pertinentes de la Unión Europea (UE)

- **Reglamento 649/2012/UE relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos (PIC)**

No incluido en la lista.

- **Reglamento 1005/2009/CE sobre las sustancias que agotan la capa de ozono (SAO)**

No incluido en la lista.

- **Reglamento 850/2004/CE sobre contaminantes orgánicos persistentes (POP)**

No incluido en la lista.

- **Lista de sustancias sujetas a autorización (REACH, Anexo XIV)**

no incluido en la lista

Directiva 2011/65/UE sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos (RoHS) - Anexo II

no incluido en la lista

Reglamento 166/2006/CE relativo al establecimiento de un registro europeo de emisiones y transferencias de contaminantes (PRTR)

no incluido en la lista

Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas

no incluido en la lista

Catálogos nacionales

La sustancia es enumerada en los siguientes inventarios nacionales:

- EINECS/ELINCS/NLP (Europa)

15.2 Evaluación de la seguridad química

No se ha realizado una evaluación de la seguridad química de esta sustancia.

SECCIÓN 16: Otra información

Abreviaturas y los acrónimos

Abrev.	Descripciones de las abreviaturas utilizadas
ADN	Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par voies de navigation intérieures (Acuerdo Europeo sobre Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Vías Navegables Interiores)
ADR	Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (Acuerdo europeo relativo al transporte internacional de mercancías peligrosas por carretera)
CAS	Chemical Abstracts Service (número identificador único carente de significado químico)
CLP	Reglamento (CE) no 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado (Classification, Labelling and Packaging) de sustancias y mezclas
CMR	Carcinógeno, Mutágeno o tóxico para la Reproducción
DGR	Dangerous Goods Regulations (reglamento para el transporte de mercancías peligrosas, véase IATA/DGR)
EINECS	European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances (catálogo europeo de sustancias químicas comercializadas)
ELINCS	European List of Notified Chemical Substances (lista europea de sustancias químicas notificadas)

ficha de datos de seguridad

conforme al Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH) modificado por 2015/830/UE



Quercetina with analytical records

número de artículo: 1210

Abrev.	Descripciones de las abreviaturas utilizadas
EmS	Emergency Schedule (programa de emergencias)
IATA	Asociación Internacional de Transporte Aéreo
IATA/DGR	Dangerous Goods Regulations (DGR) for the air transport (IATA) (Reglamento para el transporte de mercancías peligrosas por aire)
IMDG	International Maritime Dangerous Goods Code (código marítimo internacional de mercancías peligrosas)
INSHT	Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos, INSHT
MARPOL	el convenio internacional para prevenir la contaminación por los buques (abr. de "Marine Pollutant")
mPmB	muy persistente y muy bioacumulable
NLP	No-Longer Polymer (ex-polímero)
OACI	Organisation de l'Aviation Civile Internationale
PBT	Persistente, Bioacumulable y Tóxico
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos)
RID	Règlement concernant le transport International ferroviaire des marchandises Dangereuses (Reglamento referente al transporte internacional por ferrocarril de mercancías peligrosas)
SGA	"Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de sustancias químicas" elaborado por Naciones Unidas
VLA	valor límite ambiental
VLA-EC	valor límite ambiental-exposición de corta duración
VLA-ED	valor límite ambiental-exposición diaria

Principales referencias bibliográficas y fuentes de datos

- Reglamento (CE) no 1907/2006 (REACH), modificado por 2015/830/UE
- Reglamento (CE) no 1272/2008 (CLP, UE SGA)

Frases pertinentes (código y texto completo como se expone en el capítulo 2 y 3)

Código	Texto
H301	tóxico en caso de ingestión

Cláusula de exención de responsabilidad

La información en ésta hoja de datos de seguridad corresponden al leal saber de nuestros conocimiento el día de impresión. Las informaciones deben de ser puntos de apoyo para un manejo seguro de productos mencionados en esta hoja de seguridad para el almacenamiento, elaboración, transporte y eliminación. Las indicaciones no se pueden traspasar a otros productos. Mientras el producto sea mezclado o elaborado con otros materiales, las indicaciones de esta hoja de seguridad no se pueden traspasar así al agente nuevo.

B.

Descripción	
Número de catálogo	101582
Sinónimos	Gold(III)chloride hydrochloric acid, Gold trichloride hydrochloride
Descripción	Tetrachloroauric(III) acid trihydrate 99.5%

Información del producto	
Número de CAS	16961-25-4
Número CE	240-948-4
Fórmula Hill	AuCl ₄ H * 3 H ₂ O
Fórmula química	AuCl ₄ H * 3 H ₂ O
Molar Mass	393.83 g/mol
Código HS	2843 30 00

Aplicaciones	
Aplicación	Tetrachloroauric(III) acid trihydrate 99.5% for analysis EMSURE®. CAS 16961-25-4, EC 240-948-4, chemical formula AuCl ₄ H * 3 H ₂ O.

Información fisicoquímica	
Densidad	3.9 g/cm ³ (20 °C)
Punto de fusión	30 °C
Solubilidad	150 g/l

Información de seguridad según el GHS	
Pictogramas de peligro	
Declaraciones de peligro	<p>H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.</p> <p>H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.</p>
Consejos de precaución	<p>P280: Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.</p> <p>P301 + P330 + P331: EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.</p> <p>P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.</p> <p>P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.</p> <p>P308 + P310: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.</p>
Palabra de señalización	Peligro
RTECS	MD5428000
Clase de almacenamiento	8B Materiales corrosivos peligrosos, no combustibles
WGK	WGK 2 contamina el agua
Eliminación	<p>27</p> <p>Los residuos que contengan metales valiosos deberían reciclarse; categoría H.</p>

Información de seguridad	
Símbolos de riesgo y peligrosidad	 Corrosive
Categorías de peligro	corrosivo, sensibilizante
Frase R	R 34-43 Provoca quemaduras. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
Frase S	S 26-36/37/39-45 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Información de almacenamiento y transporte	
Almacenamiento	Temperatura de almacenamiento: sin limitaciones.

Información de transporte	
Declaración (vía férrea y carretera) ADR, RID	UN 3260 , 8, II
Declaración (transporte aéreo) IATA-DGR	UN 3260 , 8, II
Declaración (transporte marítimo) Código IMDG	UN 3260 , 8, II, Segregation Group: 1 (Acids)

Especificaciones	
Identity (Raman-spectrum)	conforms
Assay (AuCl₄H, calculated of Au)	99 - 100 %

C.

Hoja de especificación

Nombre del producto	Poly(ethylene glycol) BioUltra, 4.000
Referencia del producto	95904
Marca de producto	SIGMA
Número de CAS	25322-68-3
Peso molecular	

ENSAYO

ESPECIFICACIÓN

APPEARANCE (COLOR)	Colorless or White
APPEARANCE (FORM)	Powder or Crystals or Flakes
GEL-PERMEATION CHROM.	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS
MELTING POINT	58 - 61 C
WATER	≤ 1.0 %
SULFATED ASH	≤ 0.2 %
REM. ON PHYSICAL DATA	MOLECULAR MASS (CALCULATED FROM HYDROXYL VALUE): 3500 - 4500
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE
VISCOSITY (ROTATION)	114 - 142 mPas
VISCOSITY (CONDITIONS)	50 % IN H ₂ O, 20 C
HYDROXYL VALUE	25 - 32 mg KOH/g
TRACES PEROXIDE (AS H ₂ O ₂)	≤ 10 mg/kg
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS
ALUMINIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
BARIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
BISMUTH (ICP)	≤ 5 mg/kg
CALCIUM (ICP)	≤ 10 mg/kg
CADMIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
COBALT (ICP)	≤ 5 mg/kg
CHROMIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
COPPER (ICP)	≤ 5 mg/kg
IRON (ICP)	≤ 5 mg/kg
POTASSIUM (ICP)	≤ 200 mg/kg
LITHIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg

MAGNESIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
MANGANESE (ICP)	≤ 5 mg/kg
MOLYBDENUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
SODIUM (ICP)	≤ 200 mg/kg
NICKEL (ICP)	≤ 5 mg/kg
LEAD (ICP)	≤ 5 mg/kg
STRONTIUM (ICP)	≤ 5 mg/kg
ZINC (ICP)	≤ 5 mg/kg
ARSENIC TRACES (MHS-AAS)	≤ 0.1 mg/kg
TOTAL SULFUR AS SO4 (ICP)	≤ 50 mg/kg
CHLORIDE (CL)	≤ 50 mg/kg
SOLUBILITY (METHOD)	1.500 G IN 30 ML H2O
APPEARANCE (SOLUTION)	CLEAR COLORLESS
PH (SOLUTION)	5.5 - 7.0
RESIDUE (FILTER TEST)	NO RESIDUE
UV - ABS. AT 260 NM	≤ 0.10
UV - ABS. AT 280 NM	≤ 0.04
RECOMMENDED RETEST PERIOD	42 MONTHS

D.



3. Protocol

Materials to Be Supplied by the User

(Solution compositions are provided in Section 5.)

- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)
- phenazine methosulfate (PMS; e.g., Sigma Cat.# P9625)

Section 3.A describes the preparation of MTS Solution from powder.

If you have purchased the CellTiter 96[®] AQ_{aqueous} Assay, proceed directly to Section 3.B.

3.A. Preparation of MTS Solution from CellTiter 96[®] AQ_{aqueous} MTS

Reagent Powder

The following protocol is recommended for the preparation of 21ml of MTS Solution (sufficient for ten 96-well plates).

1. Select a light-protected container or wrap a container with foil.
2. Add 21ml of DPBS to the container.
3. Weigh out 42mg of MTS Reagent Powder and add to DPBS.
4. Mix at moderate speed on a magnetic stir plate for 15 minutes or until the MTS is completely dissolved.
5. Measure the pH of the MTS Solution. The optimum pH is between pH 6.0-6.5. If the solution is above pH 6.5, adjust to pH 6.5 with 1N HCL.
6. Filter-sterilize the MTS Solution through a 0.2µm filter into a sterile, light-protected container.
7. Store the MTS Solution at -20°C protected from light.

3.B. General Protocol for Use of CellTiter 96[®] AQ_{aqueous} Assay Reagents

The following recommendations are for the preparation of reagents sufficient for one 96-well plate containing cells cultured in a 100µl volume.

1. Thaw the MTS Solution and the PMS Solution. It should take approximately 90 minutes at room temperature or 10 minutes in a 37°C water bath to completely thaw the 20ml size of MTS Solution.

Note: For convenience, the first time the product is thawed, the entire contents of the 1ml tube of PMS Solution can be transferred to the 20ml bottle of MTS Solution. This mixture should be stored at -20°C between uses. If storing PMS and MTS Solutions at 4°C, do not combine these solutions until immediately before addition to the assay plate.

2. Remove 2.0ml of MTS Solution from the amber reagent bottle using aseptic technique and transfer to a test tube.
3. Add 100µl of PMS Solution to the 2.0ml of MTS Solution immediately before addition to the culture plate containing cells.

3.B. General Protocol for Use of CellTiter 96[®] AQueous Assay Reagents (continued)

4. Gently swirl the tube to ensure complete mixing of the combined MTS/PMS solution.
5. Pipet 20 μ l of the combined MTS/PMS solution into each well of the 96 well assay plate containing 100 μ l of cells in culture medium.

Note: We recommend repeating pipettes, electronic digital pipettes or multichannel pipettes for addition of the combined MTS/PMS solution to wells of the 96-well plate. It may be convenient to dilute the combined MTS/PMS solution into a sufficient volume of culture medium to allow for the extra nonrecoverable volume required when using reagent reservoirs and multichannel pipettes.

6. Incubate the plate for 1-4 hours at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere.

Note: To measure the amount of soluble formazan produced by cellular reduction of the MTS, proceed immediately to Step 7. Alternatively, to measure the absorbance at a later time, add 25 μ l of 10% SDS to each well to stop the reaction. Store SDS-treated plates protected from light in a humidified chamber at room temperature for up to 18 hours. Proceed to Step 7.

7. Record the absorbance at 490nm using an ELISA plate reader.

Note: The recommended concentrations of MTS Solution and PMS Solution have been optimized for a wide variety of cell lines cultured in 96 well plates containing 100 μ l of medium per well. If different volumes of medium are used, adjust the volume of the combined MTS/PMS solution to maintain a ratio of 20 μ l combined MTS/PMS solution per 100 μ l culture medium. This results in final concentrations in the assay of 333 μ g/ml MTS and 25 μ M PMS. If sensitivity in your assay (adequate 490nm absorbance readings) is not a limiting factor, 20 μ l of the combined MTS/PMS solution may be adequate for use with volumes as large as 200 μ l/well, but this will reduce the MTS and PMS to suboptimal concentrations. At suboptimal concentrations of MTS and at high cell numbers (50,000-200,000 K562 cells/well), we have observed that the absorbance at 490nm is not linear with cell number.

3.C. Example of a Protocol for Bioassay of IL-6 Using B9 Cells and the CellTiter 96[®] AQueous Assay

1. Maintain stock cultures of B9 cells in RPMI 1640 medium containing 5% FBS, 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME), and supplemented with 5ng/ml human recombinant IL-6. Subculture the stock cultures of cells to 2 \times 10⁴ cells/ml and refeed with human recombinant IL-6 every 3 days or when a density of 2 \times 10⁵ cells/ml is reached.

Note: B9 cells used for bioassay should be from stock cultures 2 days after the last subculture (feeding with IL-6).

2. Add 50 μ l/well of IL-6 samples or standards to be measured, diluted in RPMI 1640 medium containing 5% FBS and 50 μ M 2-ME. Start the titration of the IL-6 standard at 2ng/ml in column 12 and perform serial twofold dilutions across the plate to column 2 (to 2pg/ml). Use column 1 for the negative control: RPMI 1640 medium (and supplements) without IL-6. Equilibrate the plate at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere while harvesting the cells for assay.
3. Wash the B9 cells twice in RPMI 1640 containing 5% FBS and 50 μ M 2-ME by centrifugation at 300 \times g for 5 minutes.
4. Determine cell number and viability (by trypan blue exclusion), and suspend the cells to a final concentration of 1 \times 10⁵ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS and 50 μ M 2-ME.
5. Dispense 50 μ l of the cell suspension (5,000 cells) into all wells of the plate prepared in Step 2. The total volume in each well should be 100 μ l.
6. Incubate the plate for 48–72 hours at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere.
7. Add 20 μ l per well of MTS/PMS solution (see Section 3.A).
8. Incubate the plate for 1–4 hours at 37°C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. To measure the amount of soluble formazan produced by cellular reduction of the MTS, proceed immediately to Step 9.
Note: To measure the absorbance at a later time, add 25 μ l of 10% SDS to each well to stop the reaction. Store SDS-treated plates protected from light in a humidified chamber at room temperature for up to 18 hours. Proceed to Step 9.
9. Record the absorbance at 490nm using an ELISA plate reader.
10. Plot the corrected absorbance at 490nm (Y axis) versus concentration of growth factor (X axis), and determine the ED₅₀ value by determining the X-axis value corresponding to one-half the difference between the maximum (plateau) and minimum (no growth factor control) absorbance values. ED₅₀ = the concentration of growth factor necessary to give one-half the maximal response. In the example shown in Figure 3, the ED₅₀ = 1.5pg/ml of IL-6.

5. Composition of Buffers and Solutions

DPBS

0.2g KCl
8.0g NaCl
0.2g KH_2PO_4
1.15g Na_2HPO_4
100mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
133mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Add room temperature, deionized water to the KCl, NaCl, KH_2PO_4 and Na_2HPO_4 to a 1 liter final volume. Adjust pH to 7.35 using 1N HCl or 1N NaOH. Add the $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; mix thoroughly; then add the $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and mix thoroughly.

Phenazine methosulfate (PMS)

0.92mg/ml PMS in DPBS

Filter-sterilize through a 0.2 μm filter into a sterile, light-protected container. Store at -20°C .

6. Related Products

Viability and Cytotoxicity Assay

Product	Size	Cat.#
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200
	5 × 10ml	G9201
(live/dead cell protease activity determination)	2 × 50ml	G9202
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260
	5 × 10ml	G9261
(dead cell protease activity determination)	2 × 50ml	G9262
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270
	5 × 10ml	G9271
(live/dead cell protease activity determination)	2 × 50ml	G9272

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road • Madison, WI 53711-5399 USA
Toll Free in USA 800-356-9526 • Phone 608-274-4330 • Fax 608-277-2516 • www.promega.com
Printed in USA. Part# TB169
Revised 12/12 Page 11

E.

5. Supplementary Information

5.1 Conventions

Text Conventions To make information consistent and memorable, the following text conventions are used in this Instruction Manual:

Text Convention	Usage
Numbered instructions labeled ①, ② etc.	Steps in a procedure that must be performed in the order listed.
Asterisk *	Denotes a product available from Roche Diagnostics.

Symbols

In this Instruction Manual, the following symbols are used to highlight important information:

Symbol	Description
	Information Note: Additional information about the current topic or procedure.
	Important Note: Information critical to the success of the procedure or use of the product.

5.2 Changes to previous version

Editorial Changes

5.3 Ordering Information

	Detection mode/ Product	Pack Size	Cat. No.
Plasma membrane damage	Colorimetric assay		
	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	1 kit (2000 tests)	11 644 793 001
Metabolic activity	ELISA		
	Cellular DNA Fragmentation ELISA	1 kit (500 tests)	11 585 045 001
	Colorimetric assay		
	Cell Proliferation Reagent, WST-1	25 ml (2500 tests)	11 644 807 001
	Cell Proliferation Kit I (MTT)	1 kit (2500 tests)	11 465 007 001
Cell Proliferation Kit II (XTT)	1 kit (2500 tests)	11 465 015 001	

sigma-aldrich.com

Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)

 Version 07

21

	Detection mode/ Product	Pack Size	Cat. No.	
DNA Synthesis	Colorimetric ELISA			
	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	1 kit (1000 tests)	11 647 229 001	
	BrdU Labeling and Detection Kit III (POD)	1 kit (1000 tests)	11 444 611 001	
	Chemiluminescence ELISA			
	Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	1 kit (1000 tests)	11 669 915 001	
	Fluorescence microscopy, or flow cytometry			
	BrdU Labeling and Detection Kit I (Fluorescein)	1 kit (100 tests)	11 296 736 001	
	<i>In Situ</i> Cell Proliferation Kit, FLUOS	1 kit (1000 tests)	11 810 740 001	
	Light microscopy			
	BrdU Labeling and Detection Kit II (AP)	1 kit (100 tests)	11 299 964 001	
Apoptosis-specific physiological change	Gel Electrophoresis			
	Apoptotic DNA-Ladder Kit	20 tests	11 835 246 001	
	<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red (also usable for FACS)	1 kit (50 tests)	12 156 792 001	
	DNA fragmentation	<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein (also usable for FACS)	1 kit (50 tests)	11 684 795 001
		<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, AP	1 kit (50 tests)	11 684 809 001
		<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD	1 kit (50 tests)	11 684 817 001
	Single reagents for TUNEL and supporting reagents			
	TUNEL AP	70 tests (3.5 ml)	11 772 457 001	
	TUNEL POD	70 tests (3.5 ml)	11 772 465 001	
	TUNEL Enzyme	2× 50 µl	11 767 305 001	
TUNEL Label	3× 550 µl	11 767 291 001		
TUNEL Dilution Buffer	20 ml	11 966 006 001		
ELISA				
Cell Death Detection ELISA	1 kit	11 544 675 001		
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	1 kit (96 tests)	11 774 425 001		
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} , 10×	1 kit	11 920 685 001		
Cellular DNA Fragmentation ELISA	1 kit (500 tests)	11 585 045 001		
Cell membrane alterations	Microscopy or FACS			
	Annexin-V-FLUOS	250 tests	11 828 681 001	
	Annexin-V-FLUOS Staining Kit	50 tests	11 858 777 001	
		250 tests	11 988 549 001	

	Detection mode/ Product	Pack Size	Cat. No.
Enzymatic activity	Western Blot, FIENA		
	Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase	100 µl	11 835 238 001
	Homogenous Caspases Assay, fluorometric	100 tests	03 005 372 001
		1000 tests	12 236 869 001
	M30 CytoDEATH (formalin grade)	50 tests	12 140 322 001
250 tests		12 140 349 001	
Trademarks	All brands or product names are trademarks of their respective holders.		
Regulatory Disclaimer	For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.		
Disclaimer of License	For patent license limitations for individual products please refer to: List of biochemical reagent products		

Dirección General de Bibliotecas UAQ