

Melina Arroyo Cisneros

Evaluación de un Nanosistema de Ag<sub>2</sub>S para su Potencial  
Aplicación en el Marcaje de Células Cancerosas

2022



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ingeniería**

Evaluación de un Nanosistema de Ag<sub>2</sub>S para su Potencial Aplicación  
en el Marcaje de Células Cancerosas

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el  
grado de Licenciatura en Ingeniería Biomédica

**Presenta**

Melina Arroyo Cisneros

**Dirigido por:**

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

**Co-Director:**

M en C. José Alberto Isidoro Olvera Rodríguez

Querétaro, Qro. a Agosto, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Licenciatura en Ingeniería Biomédica



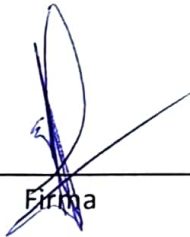
EVALUACIÓN DE UN NANOSISTEMA DE AG<sub>2</sub>S PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN EL  
MARCAJE DE CÉLULAS CANCEROSAS  
TESIS

**Presenta:**  
Melina Arroyo Cisneros

**Dirigido por:**  
Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña


SINODALES

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña



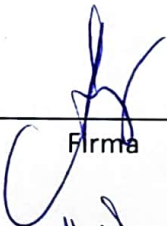
Firma

M en C. José Alberto Isidoro Olvera Rodríguez



Firma

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez



Firma

Dr. Carlos Guzmán Martínez



Firma

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Antecedentes	
1.1. Introducción.....	3
1.2. Marcaje celular en cáncer.....	3-4
2. Justificación .....	4-6
3. Fundamentación teórica	
3.1. Complejo Antígeno- Anticuerpo.....	6-8
3.2. Luminiscencia.....	8-9
3.3. Interacción célula- nanopartícula.....	10-11
4. Hipótesis.....	11
5. Objetivo general.....	11
6. Objetivos particulares.....	11
7. Metodología	
7.1. Síntesis de las nanopartículas de Ag <sub>2</sub> S.....	12-13
7.2. Caracterización de las nanopartículas de Ag <sub>2</sub> S	
7.2.1. Tamaño de partícula.....	13,14
7.3. Pruebas en células	
7.3.1. Preparación de la placa.....	14-15
7.3.2. Adherencia celular.....	15-17
7.3.3. Viabilidad celular.....	17-18
8. Resultados	
8.1. Tamaño de partícula.....	18-20
8.2. Adherencia celular .....	20-22
8.3. Viabilidad celular .....	22-24
9. Conclusiones.....	24
10. Proyección a futuro.....	25
11. Referencias.....	25-29
12. Anexos.....	29-34

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 INTRODUCCIÓN**

Actualmente, el cáncer es uno de los principales problemas de salud y la principal causa de muerte a nivel mundial, de acuerdo con la Organización Mundial de las Salud (OMS, 2022); siendo el causante de afecciones y daños a nivel multiorgánico; ya sea piel, órganos o huesos.

Uno de los factores principales de la alta tasa de mortalidad por cáncer se debe a su detección tardía de la enfermedad, según la OMS (OMS, 2022); sin embargo, está se ha visto obstaculizada por los límites de los métodos de detección actuales. Hoy en día, existen técnicas de imagen, pero solo detectan el cáncer cuando existe un cambio visible en el tejido; en tal caso, miles de células de cáncer pueden haber proliferado e inclusive haber hecho metástasis (Cárdenas Retuerto, 2010). Además, siendo incapaces de distinguir las lesiones benignas de las maligna (Pavitra et al., 2021). También, hay métodos de análisis morfológicos de tejidos o células, sin embargo, son análisis que no pueden ser aplicados de una forma eficaz e independiente para obtener diagnóstico del cáncer en una etapa temprana.

Recientemente, se han desarrollado avances nanotecnológicos que permiten una interacción única con los sistemas biológicos a nivel molecular; siendo ideales para la detección precoz y tratamiento de distintos tipos de cánceres. Principalmente, se ha optado por el desarrollo de nanosistemas específicos no invasivos capaces de detectar el cáncer en diferentes órganos y de establecer el sitio de formación del tumor (Levenson, 2007).

La detección de cáncer por medio de nanosistemas puede ser independiente del observador, ya que éstos se basan en el uso de nanopartículas, generalmente, semiconductoras, metálicas o magnéticas, como agentes de contraste para marcaje celular; y pueden ser aplicadas para obtener imágenes de tumores in vivo, determinar el perfil biomolecular de biomarcadores cancerosos y la administración dirigida de fármacos (Yezhelyev et al., 2006).

En este proyecto se plantea el desarrollo de un sistema nanoestructurado que nos va a servir como una herramienta auxiliar para la detección de células cancerosas. El cual se basa en a síntesis de nanopartículas de  $Ag_2S$  para saber si éstas posteriormente requerirán biofuncionalización o no, por medio de un inmunoensayo ELISA.

### **1.2 MARCAJE CELULAR EN CÁNCER**

El marcaje celular es un proceso en el que la célula reacciona a sustancias que se encuentran en su exterior por medio de biomarcadores que están en la superficie de la célula o dentro de ella (Cancer Institute National, n.d.). Los biomarcadores se definen como moléculas relevantes y específicas de una enfermedad, las cuales actúan como indicadores del estado actual o futuro de la misma; incluyendo proteínas, fragmentos de proteínas, moléculas de señalización, marcadores de ADN y células. Siendo éstos, también, una característica que puede medirse y evaluarse objetivamente como un indicador

de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Rakowska & Ryadnov, 2011).

Los biomarcadores son capaces de definir riesgos y pueden identificar las primeras etapas del desarrollo un tumor canceroso (Levenson, 2007); los cuales se pueden dividir en tres categorías, que incorporan: biomarcadores de diagnóstico, que ayudan en la detección precoz de una enfermedad; biomarcadores de pronóstico, que evalúan el potencial maligno de los tumores; y biomarcadores de predicción, los cuales se utilizan para la diferenciación entre varios tipos de cáncer, y así, facilitar el diseño de los planes de terapia para el paciente (Ronkainen & Okon, 2014).

Puesto que las reacciones que surgen de la interacción de biomarcadores con la célula de reconocimiento no conllevan una señal que se pueda detectar directamente, es necesario introducir marcadores o trazadores fluorescentes; dicho esto, la señal no proviene del par inmunológico sino de análogos marcados que no alteran las propiedades del antígeno o molécula para interactuar con el anticuerpo u otra molécula de reconocimiento, los cuales se excitan en el espectro visible (Arruebo et al., 2009).

Con el surgimiento de la nanotecnología, el uso de nanopartículas fluorescentes ha hecho posible la mejora en la detección de cáncer por medio de fluorescencia debido a sus altos rendimientos cuánticos, grandes coeficientes de extinción molar y máximos de emisión sintonizables (Chinen et al., 2015); con estas características se pueden diseñar nanosistemas que sirven para etiquetar anticuerpos generando una señal de fluorescencia el cual que se mide mediante microscopía o un espectrofotómetro de fluorescencia, adiciona par que sirve eso o que se hace después con esto (Jain et al., 2009).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La incidencia del cáncer en el mundo está creciendo, en el año de 2020 se registraron casi 10 millones de muertes; posicionándola como la principal causa de muerte, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2022).

De esta forma, según las cifras de la OMS de 2021, nos expone que los tipos de cáncer más comunes son: cáncer de mama (2,26 millones de casos); cáncer pulmonar (2,21 millones de casos cada año); cáncer colorrectal (1,93 millones de casos); cáncer de próstata (1,41 millones de casos); cáncer de piel (1,20 millones de casos); y cáncer gástrico (1,09 millones de casos) (Velásquez Loaiza & Toro Nader, 2022). Debido a la variación en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS calcula que los nuevos casos de cáncer sobrepasarán los 20 millones anuales en el 2030 y los 30 millones anuales en el 2040. Sin embargo, estas cifras podrían reducirse, puesto que entre el 30% y el 50% de los cánceres son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, tratamientos oportunos, vacunación y diagnósticos tempranos (Synthon, n.d.).

En México el cáncer es la tercera causa de mortalidad; ocasionando el 12% de todas las muertes, de los cuales los más comunes son: cáncer de pulmón, cáncer

de mama, cáncer de colon y cáncer de próstata (Komera, 2019); creciendo su tasa de mortalidad conforme aumenta la edad (INEGI, 2021). La detección temprana de cáncer en México tiene limitantes; una de ellas es el proceso que debe seguirse para la atención del paciente, ya que es de tres niveles; siendo atendidos por un médico general, un especialista y un subespecialista (en ese orden), dependiendo de los conocimientos que el médico tenga o de la gravedad del caso clínico del paciente; este procedimiento podría llevar hasta varios meses, ya que a veces no hay tantos médicos y existe una saturación de pacientes (Barrera et al., 2014).

Otro factor que intervienen en el proceso de detección temprana en nuestro país es la escasez de equipos médicos de detección de cánceres en Instituciones Públicas de Salud, y muchos de ellos se encuentran en un mal funcionamiento o no funcionan, ya que en el Sector de Salud público existe falta de mantenimiento a los dispositivos, falta de normas o supervisión, carencia de manuales de operación, etc. (Alcántara, 2012). Un ejemplo, es que a nivel nacional hay 689 mastógrafos en Instituciones Públicas de Salud; 6.1% corresponden a unidades móviles, según en INEGI; siendo otro de los problemas, debido a la saturación de pacientes por la insuficiencia de equipos médicos para la detección (INEGI, 2015).

Dicho lo anterior, pacientes que tienen la solvencia económica prefieren optar por atención en hospitales privados, para acelerar el proceso de diagnóstico; por ejemplo, en México, una mastografía tiene un precio entre 480 y 2100 pesos mexicanos (México, 2020); una colonoscopia para detección de cáncer de colon cuesta alrededor de 5 000 a 6 000 pesos mexicanos (OrmaMed, 2021); y el precio de una tomografía computarizada de dosis bajas para detección de cáncer pulmonar, ronda entre 2000 y 5000 pesos mexicanos (Jenner, 2022); pero en algunos casos los costos son aún más elevados, ya que entre el 5% y 10% de los resultados de los diagnósticos por pruebas convencionales; como lo son análisis biocatalíticos de fluidos corporales, pruebas de diagnóstico por imágenes (Sauter, 2017) arrojan resultados anormales, y se requiere que el paciente se haga pruebas adicionales; ya sea, aspiración con agujas finas, ultrasonidos, o biopsias para corroborar si es o no cáncer (CENETEC, 2004).

Los estudios mencionados anteriormente se realizan cuando los pacientes padecen algún síntoma, esto indica una etapa avanzada, donde ya existe la presencia de tumores con un tamaño considerable, ya que estos síntomas aparecen cuando los tumores son lo suficientemente grandes. Hasta ahora, se han estado desarrollado sistemas nanoestructurados específicos no invasivos, que en conjunto con nanopartículas semiconductoras y fluorescentes proporcionan un diagnóstico más preciso que los métodos tradicionales cáncer (Yu et al., 2006); gracias a sus propiedades luminiscentes y electrónicas únicas que permiten que sean mejores en comparación a fluorocromos o colorantes fluorescentes convencionales (Ding et al., 2021). Además, no distorsionan la fisiología celular (Pombo Barros & Goyanes Villaescusa, 2011); y son capaces de seguir una sola molécula o partícula en células y organismos vivos (Valizadeh et al., 2012), debido a que éstas están recubiertas superficialmente de

anticuerpos, péptidos y aptámeros que se dirigen específicamente a las proteínas que se encuentran en células cancerosas (Yuan et al., 2010).

Por todo lo anterior, en este trabajo se propone desarrollar un nanosistema de marcaje celular que sea capaz de satisfacer estas necesidades; y que pueda proveer un diagnóstico rápido y seguro, además de un bajo costo, para que sea accesible a el mayor sector de la población en comparación a los métodos del cuadro básico existente.

### **3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

#### **3.1 Complejo Antígeno – Anticuerpo.**

Un inmunoensayo es un método bioanalítico selectivamente alto que mide la concentración o presencia de analitos de moléculas pequeñas hasta macromoléculas en una solución mediante el uso de un anticuerpo o un antígeno como agente de reconocimiento (Ju et al., 2017). La base teórica del inmunoensayo es la inmunoreacción de un antígeno (analito) y un anticuerpo, así como su acoplamiento a nanopartículas para la producción de una señal analítica (Darwish, 2006).

Un antígeno es una macromolécula: proteína, polisacárido, ADN, etc. que induce a una respuesta inmune en un animal vertebrado, quien es capaz de generar anticuerpos específicos ante la presencia de cuerpos extraños como lo son: virus y bacterias. Los anticuerpos muestran una especificidad muy alta hacia sus antígenos correspondientes, los cuales se dividen en cinco clases: IgG, IgA, IgE, IgM e IgD (Epp et al., 2016) de acuerdo a sus estructuras y funciones biológicas, y de ellas las más utilizada para inmunoensayos es la clase IgG porque existe en el valor más alto y es más fácil su disponibilidad en comparación a las otras (Lee et al., 2021).

Como se muestra en la figura 1, la estructura de IgG tiene forma de una Y, y consta de cuatro unidades polipeptídicas: dos cadenas ligeras L, compuestas por 220 aminoácidos aproximadamente con dos regiones, formada por una variable de 110 aminoácidos en el extremo amino-terminal y una constante de 10 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal (Kanmert, 2011); y dos cadenas pesadas compuestas por 440 aminoácidos, excepto dos tipos que tienen 550, formada por una variable de 110 aminoácidos en el extremo amino-terminal y una constante de 330- 440, en el extremo carboxi-terminal (Alberts et al., 2002). Los dos segmentos de doble extremo de la Y se le denominan fragmentos F<sub>ab</sub> y en cada uno de estos sitios se unen el anticuerpo con un antígeno, ya que en esa región se crea una sección activa que reconoce un área específica del antígeno; conteniendo amina (-NH<sub>3</sub>) como grupo funcional (Schroeder & Cavacini, n.d.). También, hay un segmento singular en el otro extremo de la Y llamado fragmento F<sub>c</sub> (fragmento cristalizable, el lado inferior que cristaliza durante el almacenamiento en frío), que no puede unirse al antígeno, pero es capaz de adherirse a una superficie celular, ayudando a la inmovilización de anticuerpos por medio del grupo funcional carboxilo (-COOH) que contiene (Mahato et al., 2018); y además este fragmento puede atravesar la placenta (Simister et al., 2016).

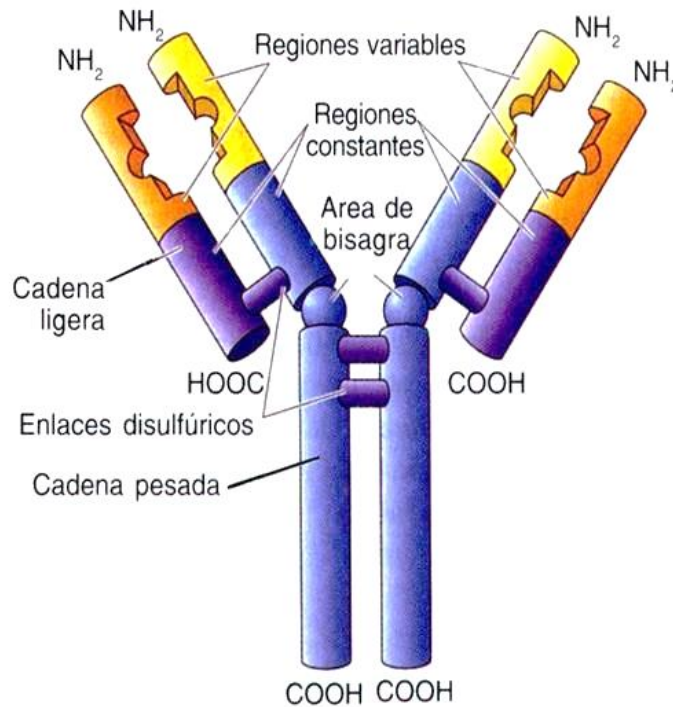


Figura 1. Estructura de un anticuerpo IgG (Peñuela, 2015).

Los anticuerpos reconocen solo una pequeña región en la superficie de una molécula grande, como un polisacárido o una proteína, esta estructura reconocida por el anticuerpo se denomina sitio antigénico o epítopo (NIH, 2001). Generalmente, cuanto mejor sea el ajuste del epítopo (en términos de geometría y carácter químico) al sitio de combinación del anticuerpo, más favorables serán las interacciones que se formarán entre ellos y mayor será la afinidad del anticuerpo por el antígeno (Aryal, 2021). Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del “brazo” del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios (Chiu et al., 2019). Cuanto mayor es la interacción de estos enlaces, más fuerte es la afinidad.

Toda la unión del anticuerpo al antígeno es reversible y sigue los principios termodinámicos básicos de cualquier interacción biomolecular reversible, como se muestra en la ecuación (1):

$$K_A = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]} \quad (1)$$

donde  $K_A$  es la constante de afinidad,  $[Ab-Ag]$  es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo, y  $[Ab]$  y  $[Ag]$  son las concentraciones molares de los sitios de unión desocupados en el anticuerpo ( $Ab$ ) o antígeno ( $Ag$ ), respectivamente (Kannan, 2015).

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende de la velocidad de difusión y la afinidad del anticuerpo por el antígeno y puede variar ampliamente. La constante de afinidad para la unión antígeno-anticuerpo puede abarcar un amplio rango, desde menos de  $10^5$ /mol hasta más de  $10^{12}$ /mol. Las constantes de afinidad pueden verse afectadas por la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el disolvente (Reverberi & Reverberi, 2007).



La avidéz es una medida más informativa acerca de la fuerza del complejo anticuerpo-antígeno, está controlado por tres factores principales: la afinidad del epítipo del anticuerpo, la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo, y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo en particular se una a un epítipo de antígeno preciso (MERCK, 2022). En cuanto a la valencia; todos los anticuerpos son multivalentes, por ejemplo: las IgG son bivalentes y las IgM son decavalentes (Mitchell et al., 2001), cuanto mayor sea la valencia de una inmunoglobulina (número de sitios de unión al antígeno), mayor será la cantidad de antígeno que puede unir. De manera similar, los antígenos pueden demostrar multivalencia porque pueden unirse a más de un anticuerpo. Las interacciones multiméricas entre un anticuerpo y un antígeno ayudan a su estabilización (Cuesta et al., 2010).

### **3.2 Luminiscencia**

Cuando las nanopartículas se irradian con luz ultravioleta, algunos electrones absorben la energía; siendo capaces de liberarse de los átomos. Por lo tanto, estos electrones se vuelven libres para moverse alrededor de la nanopartícula, creando así una transición de un estado base a un estado excitado (o banda de conducción) en la que los electrones se mueven libremente a través del material y conducen la electricidad. Cuando los electrones regresan a su estado basal (u órbita original) alrededor del átomo se emite radiación electromagnética en el rango óptico de la luz visible, ultravioleta o infrarroja por un tiempo significativamente mayor que el periodo de las ondas de luz (Obodovski, 2019), a este proceso se le conoce como luminiscencia.

Existen varios tipos de luminiscencia según su fuente de excitación: Quimioluminiscencia, las moléculas excitadas químicamente decaen al estado fundamental después de la energía producida en una reacción química; Bioluminiscencia, las moléculas son estimuladas a través de la energía liberada por reacciones en los organismos vivos (Christofi, 2005); y Fotoluminiscencia, las moléculas se excitan mediante la interacción con fotones de radiación electromagnética. Esta última, se divide en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado involucrado.

Este fenómeno comienza cuando las nanopartículas absorben luz; siendo la absorción un proceso selectivo y cuantizado según  $\Delta E = hc/\lambda$ , que cambia de estado ( $S_0 \rightarrow S_1, S_2, \dots$ ); y depende de la estructura molecular y de la concentración del analito que sea utilizado (Farrukh, n.d.). Las moléculas se encuentran en un estado basal electrónico singlete ( $S_0$ ). A medida que se presenta la absorción de radiación electromagnética, la molécula es excitada y un electrón cambia a un orbital de mayor energía (Erbe et al., 2018). Cuando este proceso no provoca un cambio de spin electrónico, continua siendo singlete ( $S_1$ ), por el contrario, si ocurre un cambio de spin, el estado electrónico será un triplete ( $T_1$ ) (Lorente, 2003), mostrada en la figura 2.

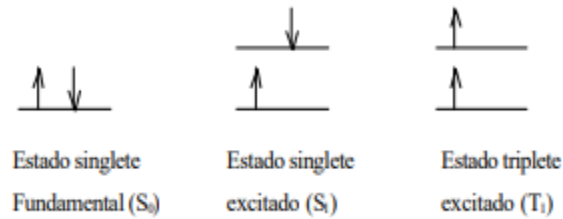


Figura 2. Proceso fotoquímico; estado basal, estado singlete excitado y estado triplete excitado (Lorente, 2003).

Las nanopartículas muestran absorción óptica en la región UV de manera que se extiende hasta el rango visible, este proceso es muy rápido de aproximadamente  $10^{-15}$  a  $10^{-14}$  s., después de ese tiempo ocurre la *desactivación del estado excitado* ( $S^* \rightarrow S_0$ ), así que la molécula elige la vía que minimice su tiempo de vida en el estado excitado (con mayor constante de velocidad); dependiendo de la estructura de la molécula y del medio donde se encuentre.

Las posibles desactivaciones de estado causan dos procesos fotofísicos: fosforescencia y fluorescencia, según la naturaleza del estado excitado (Lucila & Ramírez, n.d.), los cuales pueden ser explicados por medio del diagrama de Jablonski como se muestra en la figura 3. En este último, fluorescencia, ocurre emisión de luz espontánea en diferentes direcciones debido a la transición del singlete excitado al estado base ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) (A. Kas, 2009). La duración de este proceso cesa en cuanto se quita la fuente de excitación, representado en la figura 3.

Los factores que pueden influir en la fluorescencia son que el medio tenga bajas concentraciones de analito, que sea viscoso y que tenga una temperatura baja. Además, la longitud de onda de la fluorescencia es mayor (o igual) a la longitud de onda de absorción (Choi & Sawada, 2021).

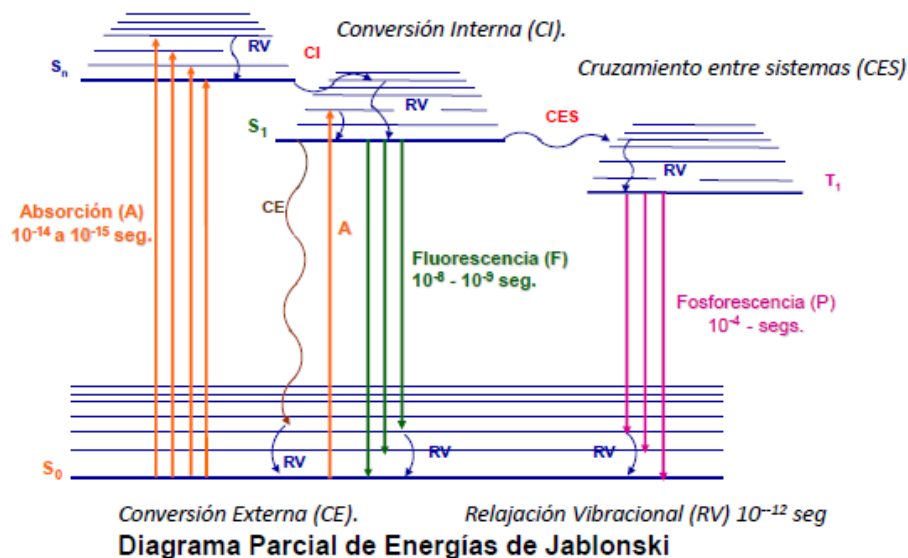


Figura 3. Diagrama Parcial de energía de Jablonski que muestra la absorción y vías de desactivación de un electrón con sus respectivos procesos y tiempos de duración (Valdés, 2018).

### 3.3 Interacción célula- nanopartícula

Cuando las células de cáncer interactúan con nanopartículas pueden ocurrir diferentes mecanismos de endocitosis que se muestran en la figura 4, los cuales dependen de las características de las propias nanopartículas. En las nanopartículas los más comunes son: endocitosis mediada por clatrina y micropinocitosis (Niaz et al., 2022). El primero de los mencionados anteriormente, es un evento de transporte vesicular que facilita la internalización y el reciclaje de receptores involucrados en una variedad de procesos, incluida la transducción de señales (receptores de proteína G y tirosina quinasa), la absorción de nutrientes y la reforma de vesículas sinápticas. Éste es responsable de la captación de nanopartículas cuando su superficie está recubierta con ciertos ligandos dirigidos. La unión de una molécula o nanopartícula a múltiples receptores de membrana también puede desencadenar el proceso de una manera específica del ligando al crear una curvatura de membrana, después de la iniciación, se forma una capa de clatrina debajo de la membrana celular, y la membrana se introduce en la célula para formar un hoyo (Behzadi et al., 2017). Su estructura y su manera de asociarse parece que ayudan a la invaginación y cierre de la vesícula. La polimerización de la clatrina forma vesículas de unos 120 nm.

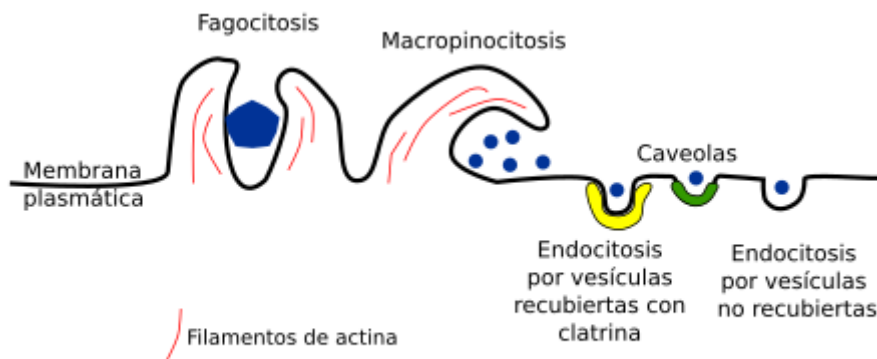


Figura 4. Procesos de endocitosis en nanopartículas (Atlas de Histología Vegetal y Animal, 2021).

Aunque no se ha determinado la asociación de tamaños de partículas definidos con mecanismos de captación específicos, la macropinocitosis procede a través de la formación de extensos volantes de membrana, que engullen nanopartículas y otras entidades de forma no específica (Miyamoto et al., 2022) formando compartimentos de 0.2 a 10  $\mu\text{m}$  de tamaño. El mecanismo de formación de los macropinosomas involucra a los mismos componentes que actúan durante la fagocitosis: los filamentos de actina y las proteínas motoras miosina, la diferencia es que no se engloba a una partícula sólida. Inicialmente se forma un anillo o semiluna de actina que puede tener varias micras de diámetro. Cuando el anillo está en proceso de formación o cuando ya está cerrado, desde su perímetro polimerizan filamentos de actina que extienden la membrana plasmática (Atlas de Histología Vegetal y Animal, 2021). El tamaño de los poros de los vasos normales está entre 6 a 12 nm, debido a esto se sugiere que las nanopartículas tengan un tamaño más grande para no dañarlos, ya que el tamaño de los vasos tumorales tienen generalmente entre 40 y 200 nm (Zein et al., 2020)

Cuando las nanopartículas penetran las células cancerosas pueden causar estrés oxidativo y los motivos pueden ser derivados debido a; efectos letales en la síntesis de ADN, daño en el ADN, daños a la morfología cromosomática y bloqueo de segregación cromosomática (Hekmat et al., 2012). Todos los procesos mencionados anteriormente se deben a la aparición de transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que los iones  $\text{Ag}^+$  ocupan el lugar de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando la liberación de éstos del retículo sarcoplasmático, siendo una concentración mayor comparada a la normal; haciendo cambio es de permeabilidad de las mitocondrias, y entre mayor sea la concentración de iones de  $\text{Ag}^+$ , hay mayor inhibición de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares. Derivado a esto, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  quedan libres y activan enzimas catabólicas como la fosfolipasa, las proteasas y las endonucleasas que aumentan la citotoxicidad. Además, la entrada y salida repetidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias provocan daños en la membrana mitocondrial provocando producción de ROS e inhibición de la síntesis de ATP, así también, se liberan apoptogénicos como Citocromo C, endonucleasa G, etc. Otro de los factores tempranos de la alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  está indicada por la formación de ampollas en la membrana plasmática lo que produce una lesión en el citoesqueleto, por lo tanto se bloquea la segregación cromosomática y la citocinesis; estas células lesionadas carecen de filamina (proteína de unión cruzada de actina adimerica), provocando pseudópodos inestables alrededor de las células e inhibiendo su propagación; y como resultado de esto, las células que estuvieron en contacto con las nanopartículas no efectuaron división celular (Asharani et al., 2009).

#### **4. HIPÓTESIS**

La incorporación de nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  a células cancerosas, permitirá su marcaje y posterior identificación por medio de fluorescencia en pruebas in vitro.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Generar un nanosistema de  $\text{Ag}_2\text{S}$  para identificar células cancerosas por medio de marcaje celular.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Sintetizar por medio de sonoquímica nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$ .
- Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas por medio de TEM, dispersión de luz dinámica (zetasizer).
- Evaluar la adherencia celular de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  con células cancerosas por medio de microscopía óptica y espectrofotometría UV-VIS.
- Determinar viabilidad celular y citotoxicidad de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  por medio del ensayo de MTT.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Síntesis de las nanopartículas de $\text{Ag}_2\text{S}$

Las nanopartículas se prepararon siguiendo la síntesis Zhang X., Gu Y. y Chen H. (Xin Zhang et al., 2014), con algunas modificaciones; primero, se prepararon las siguientes soluciones con una concentración de 5 mM:

- A) Solución A: Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- B) Solución B: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)
- C) Solución C: Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$ )
- D) Solución D: Sulfuro de Sodio ( $\text{Na}_2\text{S}$ )

Como se muestra en la figura 5, para la síntesis de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , primero se hizo una mezcla de: 50 ml de la solución A, 50 ml de la solución B y 50 ml de etanol. Dicha mezcla se colocó en un dispositivo homogeneizador sónico con un sonotrodo de diámetro de 80 mm, el cual fue programado con los siguientes parámetros: amplitud de 80%, cavitación de 100%, potencia de 38W y un snap del 1 %.

#### Síntesis de Nanopartículas de $\text{Ag}_2\text{S}$

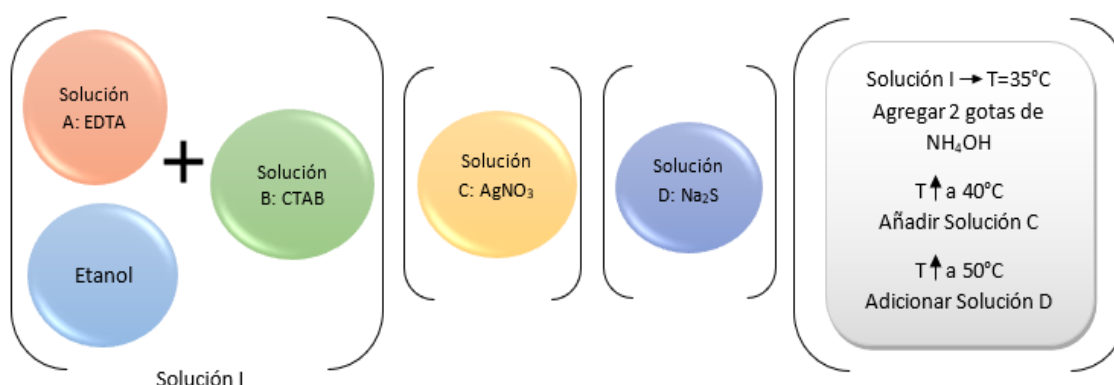


Figura 5. Esquema del proceso de síntesis de Nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$ .

Cuando la mezcla alcanzó una temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , se añadieron gotas de Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) hasta que se obtuvo un pH de 7. Una vez que la temperatura ascendió a  $40^\circ\text{C}$ , se vertieron 50 ml de la solución C, bajo un pH igual, de 7. Al momento en que la temperatura se elevó a  $50^\circ\text{C}$ , se agregó paulatinamente la solución D y se dejó seguir el proceso hasta que el homogeneizador sónico se detuviera de acuerdo con el tiempo que fue programado.

La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la purificación de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  usando el método de X. Zang, M Liu y colaboradores (Xiaoru Zhang et al., 2014), con algunas modificaciones. Como se presenta en la figura 6 para la de purificación, se colocaron 40 ml de la solución de nanopartículas obtenida en tubos falcón de 50 ml, los cuales se centrifugaron a 8000 rpm x 10 min, quedando en la pared o en la parte inferior

del tubo el precipitado de la solución, y posteriormente se decantó el líquido restante en el tubo. Una vez recuperado el precipitado, se realizó el lavado del precipitado, para esto, se agregaron 20 ml de agua destilada y 20 ml de etanol al tubo, y después, éste fue agitado por 1 min en un vórtex, nuevamente, se centrifugó a 6000 rpm x 6 min y se decantó la solución; este lavado se realizó 3 veces.

### Purificación de Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

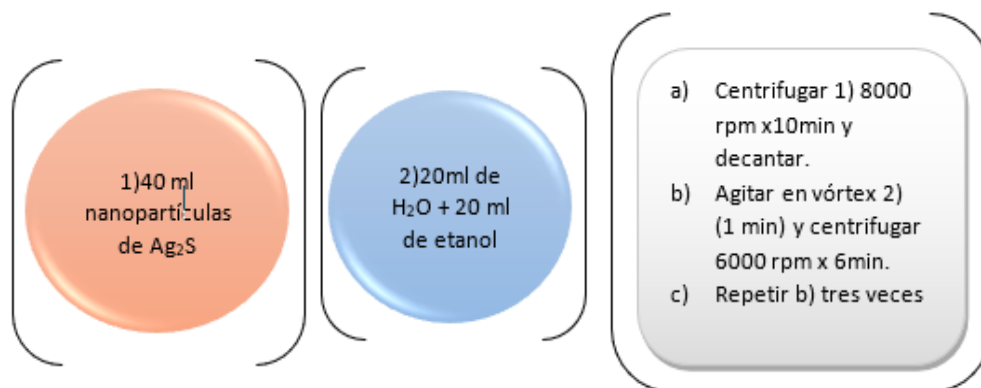


Figura 6. Esquema del método de purificación de Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S.

Después del último lavado, se realizó la dispersión de las nanopartículas como se muestra en la figura 7; para dicho proceso se añadieron 20 ml de agua destilada (si fueron utilizados para análisis de tamaño de nanopartícula) o 20 ml de PBS (si éstos se emplearon para las pruebas In vitro), la cual se hizo mediante dispersión ultrasónica, por 20 minutos. Para finalizar, las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S se guardaron a una temperatura de 4°C, en un lugar oscuro.

### Dispersión de Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

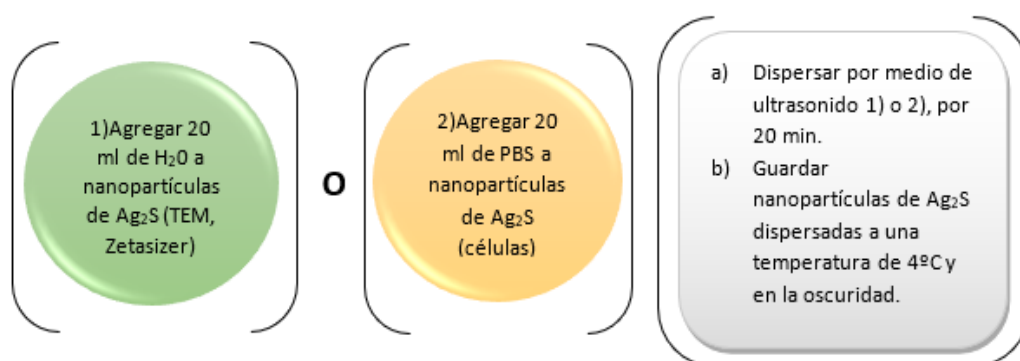


Figura 7. Esquema del método de dispersión de Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S.

## 7.2 Caracterización de los puntos cuánticos de Ag<sub>2</sub>S.

### 7.2.1 Tamaño de partícula.

Se analizaron las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S por medio de TEM para la determinación del tamaño de partícula, tomando en cuenta la siguiente tabla de la figura 8 para la preparación de las muestras.

TAMAÑO DE PARTÍCULA	CONCENTRACIÓN MÍNIMA (RECOMENDADA)	CONCENTRACIÓN MÁXIMA (RECOMENDADA)
<10 nm	0.5	Limitado por la muestra de interacción del material de la muestra, agregación, gelación, etc.
10 nm a 100 nm	0.1	Masa de 5% (asumiendo una densidad de 1g/cm <sup>3</sup> )
100 nm a 1	0.01	Masa de 1% (asumiendo una densidad de 1g/cm <sup>3</sup> )
>1	0.1	Masa de 1% (asumiendo una densidad de 1g/cm <sup>3</sup> )

Figura 8. Tabla de preparación de muestras para el análisis de tamaño de partícula.

Las muestras se prepararon de acuerdo con las condiciones marcadas en la fila de color azul, ya que debido a la colorimetría se suponía que cualitativamente las nanopartículas tenían un tamaño en el rango de 10 a 100 nm. Finalmente, se hizo uso del equipo Zetasizer para evaluar la propiedad de carga superficial de las nanopartículas a diferentes con un pH de 7 y se medirá el potencial Z (Malvern Instruments Ltd, 2013).

Para obtener las imágenes se utilizó un microscopio JEOL 2100 a 200 kV. La muestra se dispersó ultrasónicamente en etanol y se fijó en una rejilla de carbono-cobre. Las microscopias obtenidas se analizaron por medio del software Imagej, para poder determinar el tamaño de las partículas, posteriormente se hizo el tratamiento estadístico por medio de la elaboración de un histograma para ver la dispersión del tamaño de la muestra obtenida; y finalmente, estimar la eficiencia del proceso utilizado.

### 7.3 Pruebas en células

Los procedimientos realizados de las pruebas In vitro se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la supervisión de la Dra. Adriana Jehny Rodríguez Méndez.

Para estas pruebas se utilizaron 2 placas celulares de 96 pozos cada una; los reactivos que se usaron fueron: medio de cultivo DMEM, suero bovino (10%), gentamicina (1%) y PBS. Para la evaluación de adherencia y viabilidad celular de las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S se sembraron fibroblastos humanos (HT29) hasta que se alcanzara una densidad deseada (mínimo de 15x10<sup>4</sup>), los cuales fueron analizados con diferentes concentraciones de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S y diferentes tiempos de incubación.

#### 7.3.1 Preparación de la placa.

El día del experimento, se determinó la densidad celular. Para este procedimiento, se centrifugó la suspensión celular a 2000 rpm durante 8 minutos y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio nuevo. Posteriormente, se realizó el coteo por método directo (cámara de Neubauer, por triplicado) y fue calculada con la fórmula 2:

$$\frac{\# \text{ de células vivas}}{\# \text{ de campos}} \times 10\,000 = \text{células vivas/ml} \quad (2)$$

Se procedió a calcular el volumen necesario de stock de células, que se requirió para que se obtuviera una densidad de 15x10<sup>4</sup> para el subcultivo celular en dos

placas de 96 pozos (ocupando un volumen de 0.5 ml c/u), para cada uno de los tratamientos; por medio de la ecuación 3:

$$\frac{15 \times 10^4 \times 0.5 \text{ ml}}{\text{Concentración STOCK} \times 10^4} = \text{_____ ml de STOCK} \quad (3)$$

### Preparación de los tratamientos usados en las placas celulares.

Se prepararon las soluciones de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S (usadas como tratamientos para las placas) dispersadas en PBS a partir de un Stock de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con una concentración de 125 μM. El volumen de cada una de las soluciones fue de aproximadamente 3 ml por placa, y sus concentraciones fueron: 100, 50, 25 y 10 μM; como se muestra en la figura 9.

### Soluciones de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

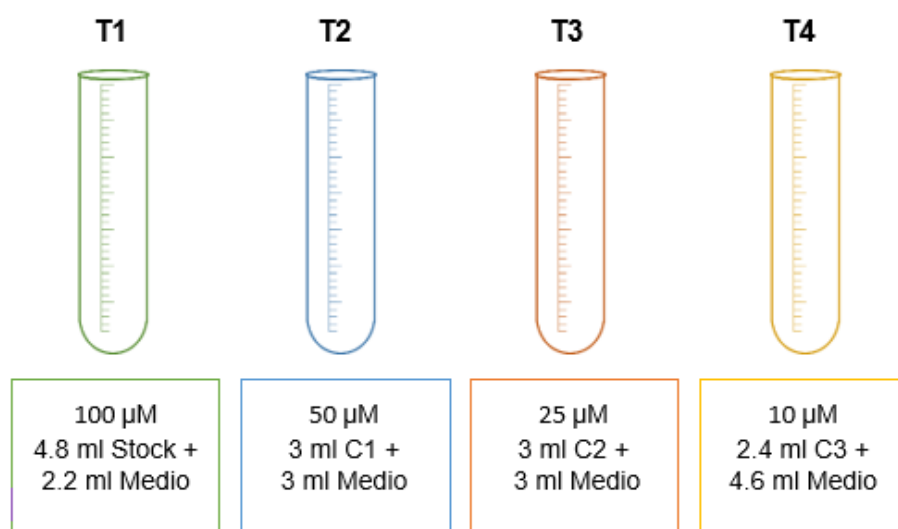


Figura 9. Soluciones de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con concentraciones de 100, 50, 25 y 10 μM.

Se realizaron los cálculos para determinar el volumen de tratamiento para cada uno de los pozos, mencionados a continuación:

- Tratamiento 1: 100 μl de medio de cultivo y 100 μl de la solución de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a 100 μM
- Tratamiento 2: 100 μl de medio de cultivo y 100 μl de la solución de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a 50 μM
- Tratamiento 3: 100 μl de medio de cultivo y 100 μl de la solución de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a 25 μM
- Tratamiento 4: 100 μl de medio de cultivo y 100 μl de la solución de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a 10 μM
- Blanco: 200 μl de medio de cultivo
- Control positivo (Células + H<sub>2</sub>O): 100 μl de medio de cultivo y 100 μl de H<sub>2</sub>O
- Control negativo (Células + PBS): 100 μl de medio de cultivo y 100 μl y 100 μl de PBS



Los tratamientos 1, 2, 3 y 4 se realizaron por triplicado; mientras que los blancos, los controles negativos y los controles positivos, por duplicado. Los cuales se distribuyeron en las placas como se muestra en la figura 11 y figura 12. Los tiempos determinados en los que se realizó la incubación de las placas fueron: 30 min (1), 1h (2), 2h (3), 4h (4) y 24h (5); a 37°C y con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>. Mostradas en la figura 11 y 12.

### Tabla de simbología en las placas celulares








Color	Contenido	Número	Tiempo de incubación
	Células + medio de cultivo + nanopartículas (100 µM)	1	30 min
	Células + medio de cultivo + nanopartículas (50 µM)	2	1 h
	Células + medio de cultivo + nanopartículas (25 µM)	3	2 h
	Células + medio de cultivo + nanopartículas (10 µM)	4	3 h
	Control positivo: Células + medio de cultivo + PBS	5	24 h
	Control negativo: Células + medio de cultivo + H <sub>2</sub> O		
	Blanco: Células + medio de cultivo.		

Figura 10. Tabla de la simbología utilizada en las placas celulares, así como el contenido que se encontraba en cada uno de los pozos con sus respectivos tiempos de incubación.

### Placa celular 1

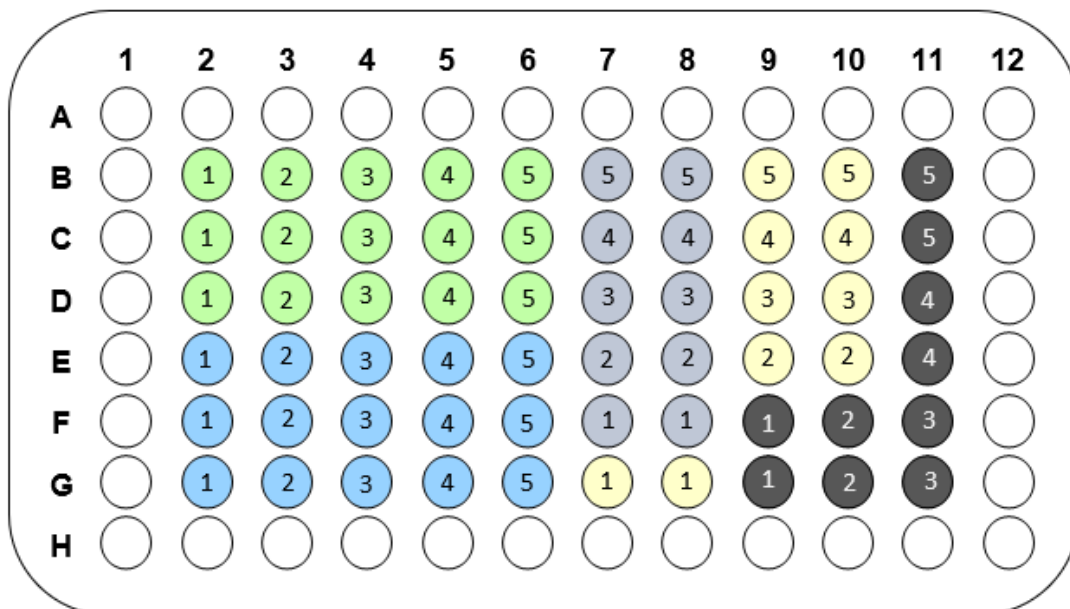


Figura 11. Esquema de la primera placa de células con las concentraciones 1 y 2.

## Placa celular 2

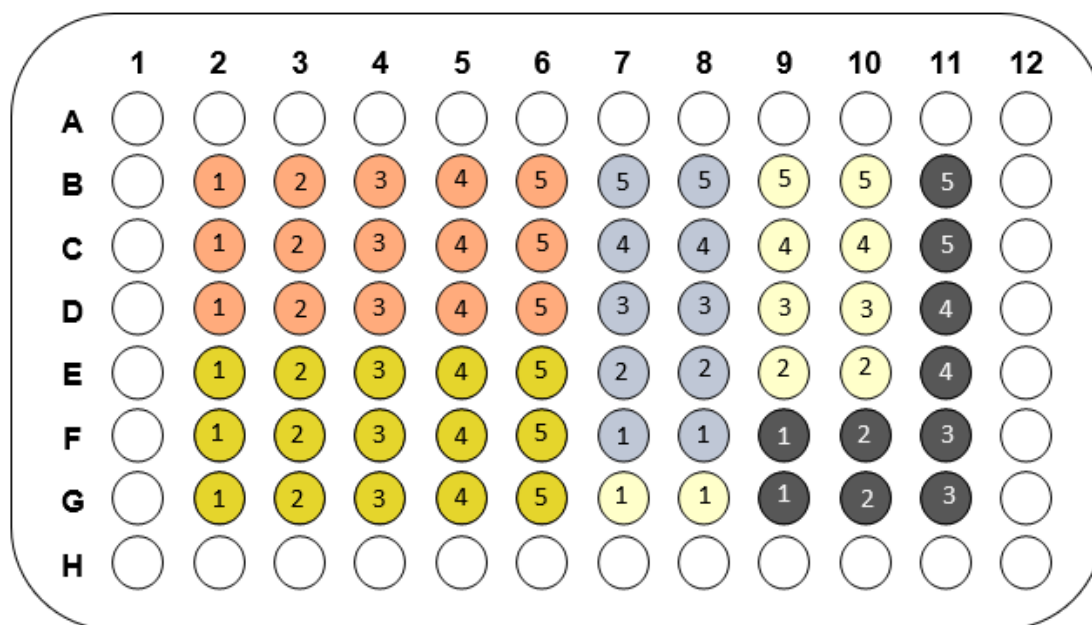


Figura 12. Esquema de la primera placa de células con las concentraciones 3 y 4.

### 7.3.2 Adherencia Celular.

1. Primero se resuspendió el medio de cultivo de los pozos; dependiendo del tiempo de incubación y se recuperó el sobrenadante de cada uno de los pozos en tubos Eppendorf (rotulados con las mismas acotaciones).
2. Se recuperaron las partículas agregando 100µl de medio nuevo.
3. Se evaluaron los pozos con el microscopio para observar el comportamiento de las células con las nanopartículas y determinar si hubo adherencia celular.
4. Y finalmente, las placas se analizaron por medio de un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 310 nm.

### Adherencia Celular

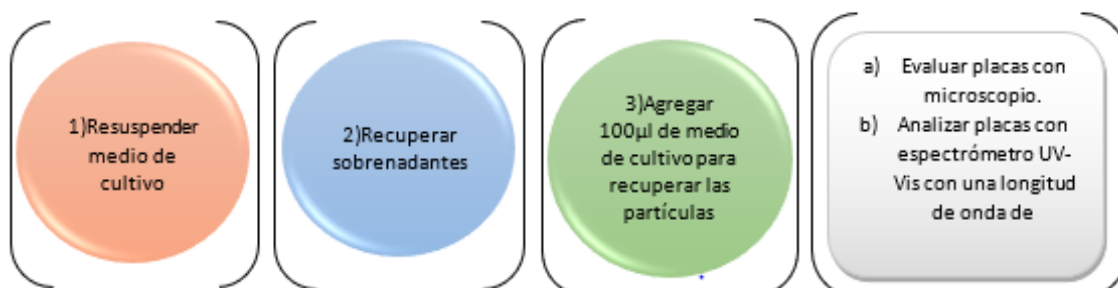


Figura 13. Esquema del método de adhesión celular de las dos placas celulares

### 7.3.3 Viabilidad Celular.

Se realizó un ensayo para determinar la viabilidad celular por reducción de compuesto MTT. Primero se Atemporó el medio de cultivo suplementario, solución MTT y solvente MTT (DMSO). Se utilizó el método de Selcen Çelick

Uzumer con algunas modificaciones(Uzuner, 2018), el procedimiento seguido se presenta a continuación:

1. Pasado el tiempo determinado (después las 4 h y 24 horas de tratamiento), el medio de cultivo fue aspirado con una micropipeta.
2. Se agregaron 90 µL de medio de cultivo suplementario a cada pozo, y después, 10 µL de solución MTT.  
Se dejó incubar por 1 h a 37°C con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>.
3. Se formó un precipitado color morado, el cual es la formación de los cristales de formazán, cuando esto sucedió;
4. Se retiró la solución de los pozos y se agregaron 100 µL de solvente MTT (DMSO).
5. Finalmente, se quitó la solución de cada pozo, y se midió la absorbancia en el lector de microplacas ELISA a las longitudes de onda de 595 nm y 655 nm.

### Viabilidad celular

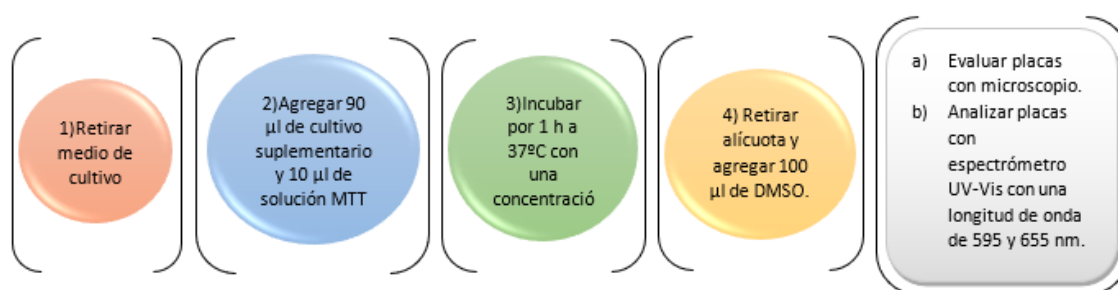


Figura 14. Esquema del método de viabilidad celular de las dos placas celulares

Una vez que se obtuvieron las lecturas de absorbancia se procedió a calcular la viabilidad celular con la fórmula (4)

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (mL)}} \quad (4)$$

Después se calculó el promedio y la desviación estándar para la identificación del nivel de citotoxicidad de acuerdo la ISO 10993, que se determina con base en el porcentaje de viabilidad celular a partir de la siguiente clasificación: 100-75%, No citotóxico; 74-50%, ligeramente citotóxico; 49-25% Moderadamente citotóxico; 24-0%, extremadamente citotóxico.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Tamaño de partícula

La figura 15 muestra las imágenes obtenidas por medio de TEM, a simple vista se puede observar que las nanopartículas son homogéneas, sin embargo, se formaron aglomeraciones de partículas en algunas zonas. La micrografía adquirida es de una muestra de 160 nanopartículas, de las cuales se midieron los diámetros del eje más grande en cada una ellas.

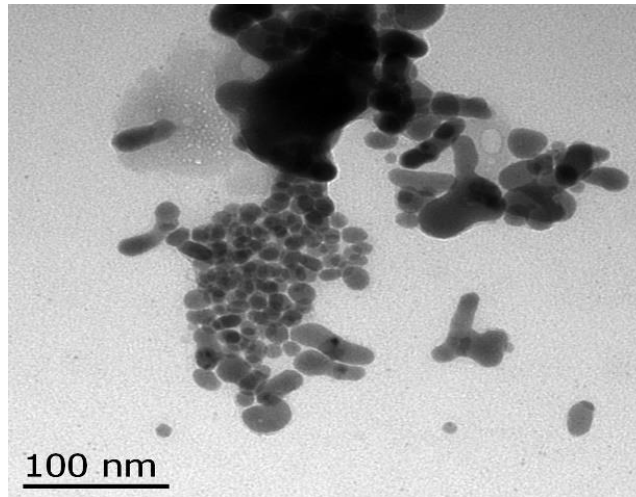


Figura 15. Micrografía la muestra de 160 nanopartículas de  $Ag_2S$

Los resultados se procesaron en el software OriginLab. Para el análisis de datos se adquirió un histograma que se muestra en la figura 3, donde se obtuvo la distribución del tamaño de las nanopartículas, que oscilan entre 6 a 34 nm, lo cual indica que existe mucha variación en el rango del tamaño de las partículas.

A continuación, en la figura 16 se muestra la distribución del histograma que se obtuvo mediante los centros de cada barra, en el cual se deduce que la tendencia central del tamaño de las partículas se concentra en el rango de tamaño de 10 a 16 nm, lo cual significa un 53.1% de probabilidad de que en el proceso las partículas estén en este rango, con un tamaño promedio de 13.93 nm y una desviación estándar de 5.11 nm.

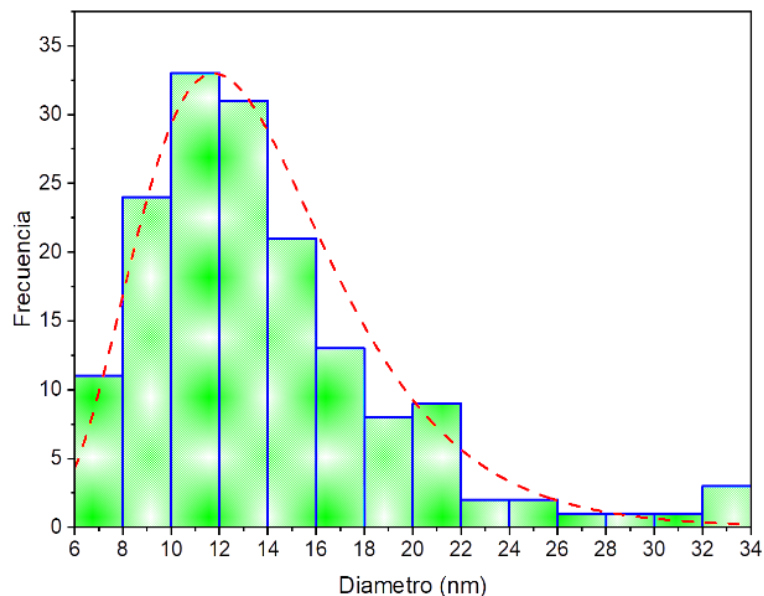


Figura 16. Histograma de la variación del tamaño de partícula.

Posteriormente, los datos fueron analizados en un gráfico de cajas, para distinguir la dispersión y relación de los datos, en la figura 17 se muestra la gráfica con barras de distribución para estimar mejor la dispersión de los datos. Como se puede notar, la tendencia de los datos se encuentra entre el primer y

segundo cuartil; en el tercero y el cuarto cuartil la dispersión de los valores es mayor, además de que 7 datos son atípicos, lo cual puede sugerir que el proceso no es suficientemente controlable.

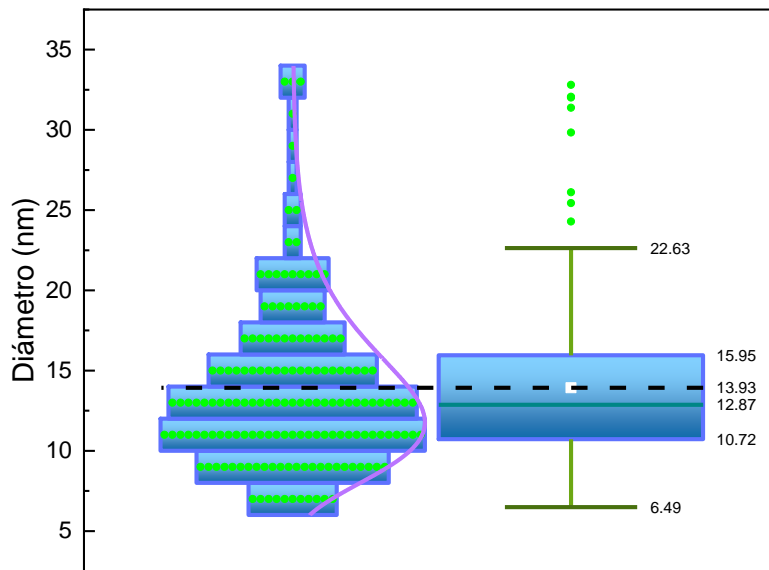


Figura 17. Diagrama de cajas y bigotes.

## 8.2 Adherencia celular

En la figura 18 se muestran las células obtenidas del sembrado celular con una densidad celular de  $51 \times 10^5$  células/ml, de dicha placa celular se tomaron 0.156862 ml para la preparación del stock de las células que se requirieron para cada pozo celular resultando un total de 480 000 células, o sea, 4 000 células por pozo; y podría representarse en la figura 19, ya que corresponde a un blanco con un tiempo de 4 h de incubación de la placa que se utilizó.



Figura 18. Células del cultivo celular con una densidad de  $51 \times 10^5$  células/ml

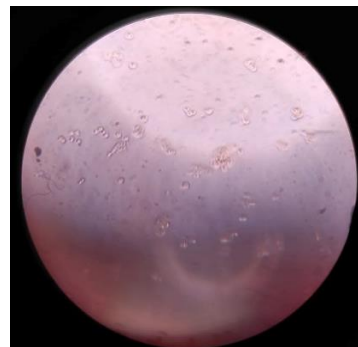
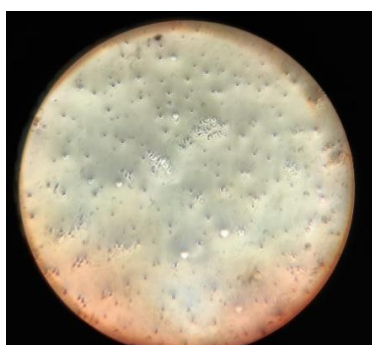


Figura 19. Blanco de células con 4 h de incubación.

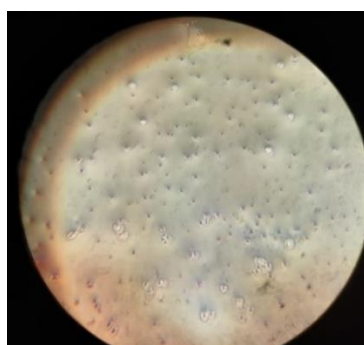
Para las pruebas de adherencia celular en las figuras 20, 21, 22, 23 se muestran imágenes obtenidas por medio de un microscopio óptico, donde se representa la interacción que existe en las células HT29 y las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a las 4 horas de incubación; a simple vista se puede apreciar que no existe adherencia celular, sino penetración de las nanopartículas hacia el interior de las células, ya que en las nanopartículas no existe alguna molécula de reconocimiento que

pueda generar una respuesta inmune con la membrana celular al momento de su interacción.

En la figura 20 se representan las células que fueron tratadas con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a una concentración de 100, en donde se puede observar a simple que la mayoría de las nanopartículas no se encuentran en contacto con las células; las que sí están interaccionando se encuentran en el interior de las células, y también se puede distinguir que, en algunas zonas existe aglomeración de células vivas. Las células HT29 que se trataron con nanopartículas con una concentración de 50 μM (figura 21), se puede observar que el comportamiento de las células es muy parecido en comparación a las células con nanopartículas con concentración de 100 μM, de igual manera existe un exceso de nanopartículas que no se encuentran interactuando con las células y se ve como las nanopartículas también penetraron las células.

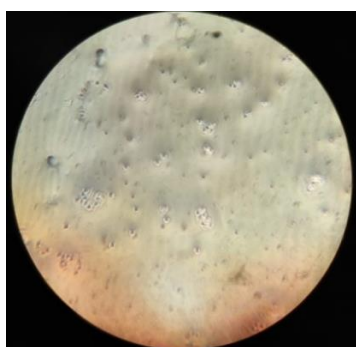


*Figura 20. Células con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con una concentración de 100 μM.*

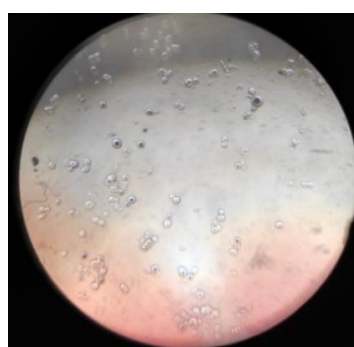


*Figura 21. Células con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con una concentración de 50 μM.*

Asimismo, en las células de la figura 22, pertenecientes a las que fueron tratadas con nanopartículas de una concentración de 25 μM, se observa que sí hay menor cantidad de nanopartículas; y de igual manera, las nanopartículas que interiorizaron las células tienen un comportamiento igual a las dos concentraciones anteriores. Por el contrario, se puede percibir en la figura 23 que casi todas las nanopartículas penetraron las células, de hecho, el tamaño de algunas células incrementó considerablemente con respecto a su tamaño original, debido a que varias nanopartículas entraron en una misma célula. Así como, también se distingue que hay más células vivas, debido a la baja concentración de nanopartículas.



*Figura 22. Células con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con una concentración de 25 μM.*



*Figura 23. Células con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S con una concentración de 10 μM.*



En la figura 24 se muestran cuantitativamente los resultados de adherencia celular, se puede deducir de igual forma al análisis anterior, que no existe adherencia celular entre las células de cáncer y las nanopartículas de  $Ag_2S$ . En este análisis se dejó como unidad de medida la concentración de las nanopartículas que quedaron en la placa celular, sin embargo, los valores resultaron mayor a los esperados respecto a cada una de las concentraciones, excepto en la concentración 1 (C1) de los tiempos de incubación de 30, 60 y 240 min; en la concentración 2 (C2), en el tiempo de 120. Esto se debe que las nanopartículas permanecen en la placa celular, algunas se encuentran penetrando las células y otras se quedan adheridas a la placa.

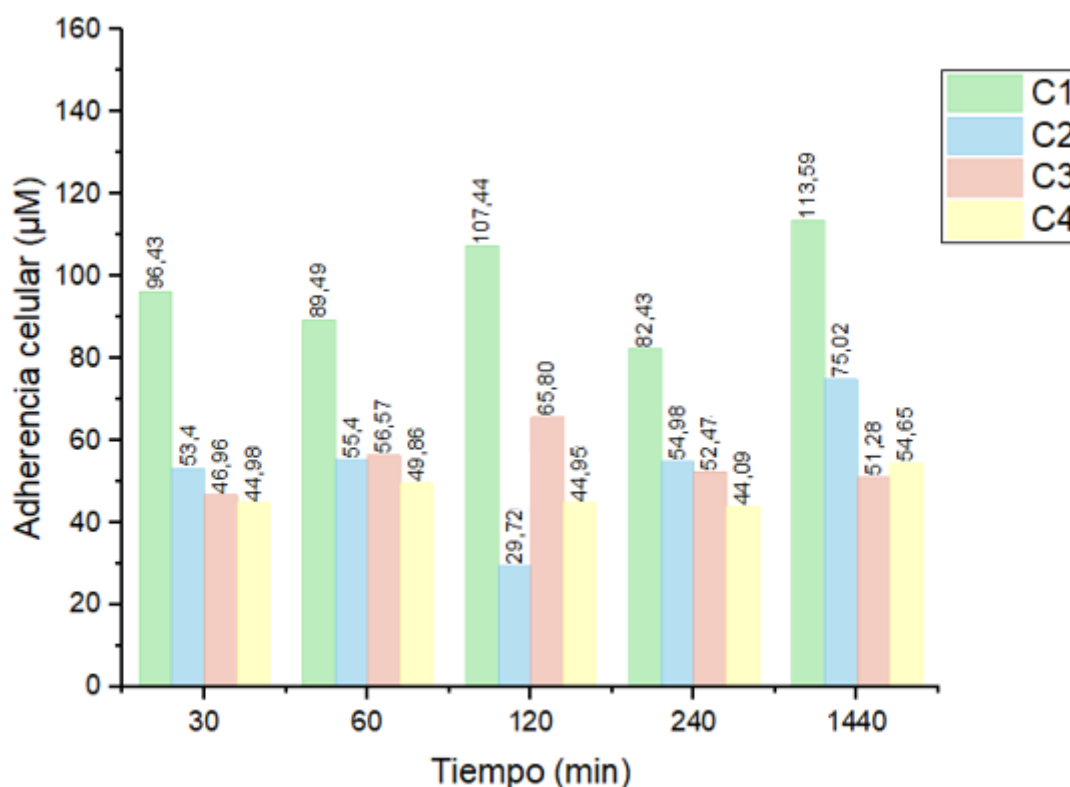


Figura 24. Adherencia celular de células HT29 tratadas con nanopartículas de  $Ag_2S$  a 10, 25, 50 y 100  $\mu M$  después de 30, 60, 120, 240 y 1440 min.

### 8.3 Viabilidad

La viabilidad celular y la toxicidad de las nanopartículas de  $Ag_2S$  en una línea celular HT29, se evaluó mediante un ensayo MTT después de 30, 60, 120, 240 y 1440 min de incubación. Para comparar la actividad citotóxica se realizó en análisis con diferentes dosis de nanopartículas de  $Ag_2S$  con concentraciones de 100, 50, 25 y 10  $\mu M$  (Figura 25).

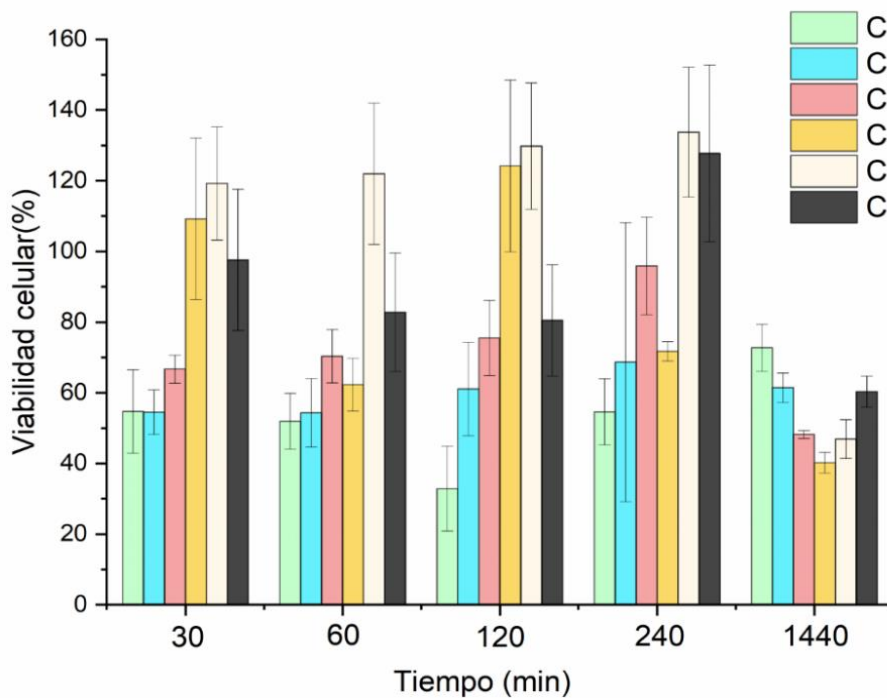


Figura 25. Viabilidad de células HT29 tratadas con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S a 10, 25, 50 y 100 µM después de 30, 60, 120, 240 y 1440 min de incubación determinado por ensayo MTT.

Las células HT29 exhibieron un aumento de citotoxicidad significativa a los 30 minutos de incubación respecto al control positivo, excepto en las células tratadas con nanopartículas con una concentración de 10 µM, ya que en éstas se obtuvo una viabilidad mayor a 100% debido a la concentración baja de nanopartículas, por ende, menos células estuvieron en contacto con las nanopartículas. Por otro lado, las células cancerosas a 1 h de incubación se encontraron con una viabilidad por debajo de un 70%, las células mostraron un comportamiento parecido en comparación a las células incubadas a 30 min en las primeras 3 concentraciones (100, 50 y 25 µM); siendo que en las células tratadas con nanopartículas con concentración de 10 µM el porcentaje de viabilidad disminuyó un 50% aproximadamente, en este tiempo las células comienzan a adaptarse a las nanopartículas y se inhibe la división celular.

A las 2 h de incubación, las células HT29 con tratamientos de 25 y 50 µM se mantienen con un porcentaje de viabilidad similar a los dos tiempos mencionados anteriormente, de tal manera que ambas tienen un crecimiento alrededor de 5%, lo cual podría corresponder a que las células siguen en el proceso de adaptación del biomaterial con que fueron tratadas. En las células tratadas con concentración de 100 µM se obtuvo un cambio relevante, debido a que el porcentaje de viabilidad decreció casi a la mitad en comparación a las células con 1 h de incubación, consecuencia de la alta concentración de nanopartículas, de modo que se genera estrés oxidativo en ellas. En cambio, en las células con tratamiento de 10 µM, se puede apreciar que las células pudieron adaptarse al



material por la baja concentración de nanopartículas, por ende, ocurrió el proceso de proliferación.

En las células con 4 h de incubación existe un aumento de porcentaje de viabilidad y podría deberse a adaptación de las células con las nanopartículas que fueron expuestas, en donde: las células con concentración de 100  $\mu\text{M}$  actuaron con un comportamiento similar a las células incubadas por 30 y 60 min; en la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , las células proliferaron en comparación a todos los tiempos de incubación anteriores; las células con 25  $\mu\text{M}$  de concentración se desarrollaron hasta alcanzar casi un 100% de viabilidad celular. Sin embargo, en las células con un tratamiento de 10  $\mu\text{M}$  existe un crecimiento notorio en la citotoxicidad en vista de que las nanopartículas penetran de nuevo las células HT29, provocando apoptosis celular.

Con lo observado, en el comportamiento de las células con las condiciones experimentales dadas, a las 24 h de incubación los cambios en el porcentaje de la viabilidad resultaron más notables en cuanto al comportamiento de éstas comparadas a los demás tiempos de incubación, puesto que, en todas las concentraciones el porcentaje de viabilidad celular se encontró por debajo de un 80%. Estas alteraciones pueden deberse al estrés oxidativo que ocurre en las células, que puede ser causado por: efectos letales en la síntesis de ADN, daño en el ADN, daños a la morfología cromosómica y bloqueo de segregación cromosómica. Esto nos puede sugerir que el principal motivo de lo antes mencionado es derivado por los iones de  $\text{Ag}^+$  que se tienen en las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , ya que éstos forman micronúcleos y son marcadores de daño cromosómico. Así que, como resultado de este ensayo, podría deducirse que las células que estuvieron en contacto con las nanopartículas no efectuaron división celular.

## **9. CONCLUSIONES**

La síntesis de nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  por medio de sonoquímica fue eficaz y práctica en cuanto al tiempo con el que se llevó a cabo en cada de las muestras, fue de aproximadamente 15 min, sin embargo, la síntesis tiene que ser optimizada para obtener un rango menor en la variación del tamaño de las nanopartículas.

No existe adherencia celular entre las células HT29 y las nanopartículas  $\text{Ag}_2\text{S}$ , las nanopartículas penetran las células y las destruyen, entonces se tendrían que biofuncionalizar las nanopartículas para tener una respuesta inmune antígeno-anticuerpo con potencial para usarse como agente de diagnóstico. Las nanopartículas sin biofuncionalización, así como se realizó en este proyecto, podrían ser sugeridas, más bien, como una alternativa de tratamiento contra el cáncer.

De acuerdo con la prueba de viabilidad de MTT, la citotoxicidad varía demasiado en cada uno de los tiempos, se puede considerar que se encuentran en un rango de ser ligera o moderadamente citotóxica según la ISO 10993.

## 10. PROYECCIONES A FUTURO

- Biofuncionalizar las nanopartículas para que exista adherencia celular y pueda diagnosticar la enfermedad, así como, realizar nuevamente la caracterización y pruebas que se realizaron en este proyecto, pero con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S.
- Realizar pruebas Invivo, ya que se optimicen los resultados, así como, hacer pruebas clínicas.
- Desarrollar un sistema de procesamiento de datos para que sea algo tangible y que el diagnóstico sea más preciso, por medio de señales e imágenes obtenidas a través de Fluorometría.

## 11. REFERENCIAS

- A. Kas, J. (2009). *Introduction: Fluorescence Microscopy* . <https://home.uni-leipzig.de/pwm/web/?page=fluorescence&section=introduction>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *B Cells and Antibodies - Molecular Biology of the Cell*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
- Alcántara, M. A. (2012). *LA CALIDAD DE LA ATENCIÓN DE SALUD EN MÉXICO A TRAVÉS DE SUS INSTITUCIONES: Vol. 1ER VOLUME*.
- Arruebo, M., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2009). Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/439389>
- Aryal, S. (2021, May 13). *Introduction to Antigen-Antibody Reactions*. <https://microbenotes.com/introduction-to-antigen-antibody-reactions/>
- Asharani, P. V, Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). *Anti-proliferative activity of silver nanoparticles*. 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
- Atlas de Histología Vegetal y Animal. (2021). *La célula. 5. Tráfico vesicular*. <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/5-endocitosis-c.php>
- Barrera, H. A., Ochoa, E., Salinas, M. C., Muñoz, L. E., & Gómez, D. (2014). *ESTADO DEL ARTE DE LA MEDICINA*.
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>
- Blood, P. (2015). Quantum confinement. *Quantum Confined Laser Devices*, 110–132. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199644513.003.0008>
- Braun, A. (2018). In situ photoelectron spectroscopy. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 264–279. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13291-3>
- Cancer Institute National. (n.d.). *Señalización celular*. Retrieved March 19, 2022, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/senalizacion-celular>
- Cárdenas Retuerdo, A. (2010). Calculo de la Matriz de Dosis alrededor de una Fuente de IR 192 para Braquiterapia utilizando el Formalismo TG – 43. *Unmsm*, 192.
- CENETEC. (2004). *Guía Tecnológica No. 11. Mastógrafo. Secretaria de Salud*, 1–40.
- Chemistry 310. (2021, June 7). *Semiconductors- Band Gaps, Colors, Conductivity and Doping - Chemistry LibreTexts*. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic\\_Chemistry/Book%3A\\_Introduction\\_to\\_Inorganic\\_Chemistry\\_\(Wikibook\)/10%3A\\_Electronic\\_Properties\\_of\\_Materials\\_-\\_Superconductors\\_and\\_Semiconductors/10.05%3A\\_Semiconductors-](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Inorganic_Chemistry/Book%3A_Introduction_to_Inorganic_Chemistry_(Wikibook)/10%3A_Electronic_Properties_of_Materials_-_Superconductors_and_Semiconductors/10.05%3A_Semiconductors-)

- \_Band\_Gaps\_Colors\_Conductivity\_and\_Doping
- Chinen, A. B., Guan, C. M., Ferrer, J. R., Barnaby, S. N., Merkel, T. J., & Mirkin, C. A. (2015). Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews*, 115(19), 10530–10574. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00321>
  - Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
  - Choi, Y.-J., & Sawada, K. (2021). Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Molecular Analysis of Microbial Cells. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00095-9>
  - Christofi, N. (2005). Bioassays - Microbial Tests. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 265–271. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00044-3>
  - Cuesta, Á. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., & Álvarez-Vallina, L. (2010). Multivalent antibodies: When design surpasses evolution. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.007>
  - Dalal, M. (n.d.). *Schrodinger Wave Equation for a Particle in a Three Dimensional Box*.
  - Darwish, I. A. (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. In *International journal of Blomedical science*.
  - Ding, C., Huang, Y., Shen, Z., & Chen, X. (2021). Synthesis and Bioapplications of Ag<sub>2</sub>S Quantum Dots with Near-Infrared Fluorescence. *Advanced Materials*, 33(32), 1–29. <https://doi.org/10.1002/adma.202007768>
  - Epp, A., Sullivan, K. C., Herr, A. B., & Strait, R. T. (2016). Immunoglobulin Glycosylation Effects in Allergy and Immunity. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(11). <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0658-x>
  - Erbe, A., Nayak, S., Chen, Y. H., Niu, F., Pander, M., Tecklenburg, S., & Toparli, C. (2018). How to probe structure, kinetics, and dynamics at complex interfaces in situ and operando by optical spectroscopy. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 199–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14061-2>
  - Farrukh, M. A. (n.d.). *ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY Edited by Muhammad Akhyar Farrukh*.
  - Fernández, G. (n.d.). *Partícula en una caja unidimensional*. 2012. Retrieved June 30, 2022, from <https://www.quimicafisica.com/particula-en-una-caja-unidimensional.html>
  - Hekmat, A., Saboury, A. A., & Divsalar, A. (2012). *The Effects of Silver Nanoparticles and Doxorubicin Combination on DNA Structure and Its Antiproliferative Effect Against T47D and MCF7 Cell Lines*. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1451>
  - INEGI. (2015). “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA SALUD” DATOS ECONÓMICOS NACIONALES. <http://www.dof.gob.mx/index.php?year=2013&month=12&day=12>
  - INEGI. (2021, February 4). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER*. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
  - Jain, A., Blum, C., & Subramaniam, V. (2009). Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. *Advances in Biomedical Engineering*, 147–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53075-2.00004-6>
  - Jenner. (2022). *Tomografía*. <https://www.jenner.com.mx/tomografia/>

- Jiménez, L. A., & Cárdenas, A. F. (n.d.). *Particula en Una Caja en 3D*. Retrieved June 30, 2022, from <https://es.scribd.com/doc/144305263/Particula-en-Una-Caja-en-3D-Degeneracion>
- Ju, H., Lai, G., & Yan, F. (2017). Introduction. *Immunoensing for Detection of Protein Biomarkers*, 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101999-3.00001-3>
- Kanmert, D. (2011). *Structure and Interactions of Human IgG-Fc* (Issue 1361).
- Kannan, I. (2015). *IMMUNOLOGY*. <https://books.google.com.mx/books?id=Y6ecDwAAQBAJ&pg=PA426&lpg=PA426&dq=where+KA+is+the+affinity+constant,+%5BAb-Ag%5D+is+the+molar+concentration+of+the+antibody-antigen+complex,+and+%5BAb%5D+and+%5BAb%5D+are+the+molar+concentrations+of+unoccupied+binding>
- Kocherzhenko, A. A., Lee, D., Forsuelo, M. A., & Whaley, K. B. (2015). Coherent and incoherent contributions to charge separation in multichromophore systems. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(14), 7590–7603. <https://doi.org/10.1021/jp5127859>
- Komera, S. (2019). *Cáncer en México: cifras, tipos de padecimientos y cómo evitarlos*. <https://blogs.unitec.mx/salud-2/tiposcancer>
- Lee, N., Jeong Id, S., & Park, M.-J. (2021). *Comparison of three serological chemiluminescence immunoassays for SARS-CoV-2, and clinical significance of antibody index with disease severity*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253889>
- Levenson, V. V. (2007). Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(6), 847–856. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.01.017>
- Lorente, C. (20033). *Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa*. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas Departamento De Química. <https://1library.co/document/dzxl5gwz-fotofisica-propiedades-fotosensibilizadoras-pterinas-solucion-acuosa.html>
- Lucila, M., & Ramírez, M. (n.d.). *Light Emission Organic*.
- Mahato, K., Kumar, S., Srivastava, A., Maurya, P. K., Singh, R., & Chandra, P. (2018). Electrochemical immunosensors: Fundamentals and applications in clinical diagnostics. In *Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00014-1>
- Malvern Instruments Ltd. (2013). *Zetasizer nano User Manual*.
- MERCK. (2022). *An Introduction to Antibodies: Antibody-Antigen Interaction*. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/elisa/antibody-antigen-interaction>
- México, M. (2020). *¿Qué es, cuánto cuesta y cuándo se debe hacer una mastografía?* <https://mujermexico.com/salud/que-es-cuanto-cuesta-cuando-hacer-una-mastografia/>
- Mitchell, A. J., Edwards, M. R., & Collins, A. M. (2001). Valency or wählency: Is the epitope diversity of the B-cell response regulated or chemically determined? *Immunology and Cell Biology*, 79(5), 507–511. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2001.01021.x>
- Miyamoto, T., Toyooka, K., Chuah, J.-A., Odahara, M., Higuchi-Takeuchi, M., Goto, Y., Motoda, Y., Kigawa, T., Kodama, Y., & Numata, K. (2022). A Synthetic Multidomain Peptide That Drives a Macropinocytosis-Like Mechanism for Cytosolic Transport of Exogenous Proteins into Plants. *JACS Au*, 2(1), 223–233. <https://doi.org/10.1021/JACSAU.1C00504>
- Niaz, S., Forbes, B., & Raimi-Abraham, B. T. (2022). Exploiting Endocytosis for Non-Spherical Nanoparticle Cellular Uptake. *Nanomanufacturing*, 2(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nanomanufacturing2010001>

- NIH. (2001). *The interaction of the antibody molecule with specific antigen*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>
- Obodovskiy, I. (2019). Luminescence. *Radiation*, 207–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63979-0.00012-4>
- OMS. (2022, February 2). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OrmaMed. (2021). *¿Cuál es el costo de una colonoscopia y por qué varía? - Orma Med*. <https://ormasurgery.com/costo-de-una-colonoscopia/>
- *Particle in a 3-Dimensional box*. (2019). 4, 1–5.
- Pavitra, E., Dariya, B., Srivani, G., Kang, S. M., Alam, A., Sudhir, P. R., Kamal, M. A., Raju, G. S. R., Han, Y. K., Lakkakula, B. V. K. S., Nagaraju, G. P., & Huh, Y. S. (2021). Engineered nanoparticles for imaging and drug delivery in colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 69, 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.017>
- Peñuela, M. (2015). *Respuesta inmune*. <https://med.se-todo.com/biolog/12204/index.html>
- Pombo Barros, V., & Goyanes Villaescusa, V. (2011). *Puntos cuánticos: Nueva aportación de la nanotecnología en investigación y medicina - Buscar con Google*. <https://www.google.com/search?q=Puntos+cuánticos%3A+Nueva+aportación+de+la+nanotecnología+en+investigación+y+medicina&oq=Puntos+cuánticos%3A+Nueva+aportación+de+la+nanotecnología+en+investigación+y+medicina&aqs=chrome..69i57j69i59j69i60.1100j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Rakowska, P. D., & Ryadnov, M. G. (2011). Nano-enabled biomarker discovery and detection. *Biomarkers in Medicine*, 5(3), 387–396. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.26>
- Reverberi, R., & Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4), 227–240. <https://doi.org/10.2450/2007.0047-07>
- Ronkainen, N. J., & Okon, S. L. (2014). Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers. *Materials*, 7(6), 4669–4709. <https://doi.org/10.3390/ma7064669>
- Sauter, E. R. (2017). Reliable Biomarkers to Identify New and Recurrent Cancer. *European Journal of Breast Health*, 13(4), 162–167. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2017.3635>
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (n.d.). *Structure and Function of Immunoglobulins*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Simister, N. E., Story, C. M., Chen, H. L., & Hunt, J. S. (2016). An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *European Journal of Immunology*, 26(7), 1527–1531. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260718>
- Stiff-Roberts, A. D. (2011). Quantum-Dot Infrared Photodetectors. In *Comprehensive Semiconductor Science and Technology* (Vols. 1–6). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-44-453153-7.00036-5>
- Synthon. (n.d.). *El Cáncer en México y el Mundo*. Retrieved November 7, 2021, from <https://www.synthon.com/mx/nuestro-negocio/oncologia/el-cancer-en-mexico-y-el-mundo>
- Underwood, D. F., Kippeny, T., & Rosenthal, S. J. (2001). Ultrafast carrier dynamics in CdSe nanocrystals determined by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(2), 436–443. <https://doi.org/10.1021/jp003088b>
- Uzuner, S. Ç. (2018). *Development of a Direct Trypan Blue Exclusion Method to Detect Cell Viability of Adherent Cells into ELISA Plates*. 14(1), 99–104. <https://doi.org/10.18466/cbayarfb.372192>

- Valizadeh, A., Mikaeili, H., Samiei, M., Farkhani, S. M., Zarghami, N., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2012). Quantum dots: Synthesis, bioapplications, and toxicity. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 7, Issue 1, pp. 1–14). SpringerOpen. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-480>
- Velásquez Loaiza, M., & Toro Nader, M. (2022, February 4). *Cáncer: ¿Cuáles son los tipos más comunes y los más mortales?* <https://cnnespanol.cnn.com/2022/02/04/cancer-tipos-comunes-mortales-como-saber-orix/>
- World Health Organization. (2022, February 3). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wu, S., Cheng, L., & Wang, Q. (2017). Excitonic effects and related properties in semiconductor nanostructures: Roles of size and dimensionality. *Materials Research Express*, 4(8). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa81da>
- Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., & O'Regan, R. M. (2006). Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7(8), 657–667. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70793-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70793-8)
- Yu, W. W., Chang, E., Drezek, R., & Colvin, V. L. (2006). Water-soluble quantum dots for biomedical applications. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 348, Issue 3, pp. 781–786). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.160>
- Yuan, H., Li, J., Bao, G., & Zhang, S. (2010). Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Physical Review Letters*, 105(13), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.138101>
- Zein, R., Sharrouf, W., & Selting, K. (2020). *Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting. 2020*.
- Zhang, Xiaoru, Liu, M., Liu, H., & Zhang, S. (2014). Low-toxic Ag<sub>2</sub>S quantum dots for photoelectrochemical detection glucose and cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 56, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.033>
- Zhang, Xin, Gu, Y., & Chen, H. (2014). Synthesis of biocompatible near infrared fluorescence Ag<sub>2</sub>S quantum dot and its application in bioimaging. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(3). <https://doi.org/10.1142/S1793545813500594>

## 12. ANEXOS

### 12.1 ANEXO 1. Confinamiento cuántico

En los sistemas atómicos y moleculares la transferencia de energía entre moléculas puede ocurrir a través del acoplamiento de rotaciones, vibraciones o excitación electrónica. Dentro de una molécula, la energía entre el primer estado excitado y el estado fundamental depende de la acumulación de orbitales atómicos para formar bandas moleculares, siendo la banda de valencia ocupada más alta (HOMO) del estado fundamental y el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) siendo el primer estado salido, la diferencia de la magnitud entre HOMO y LUMO se denomina banda prohibida (Braun, 2018). Los estados que se encuentran en o por debajo de HOMO están en la banda de valencia y los estados que se encuentran en o por encima de LUMO están en la banda de conducción, como se muestra en la figura 26.

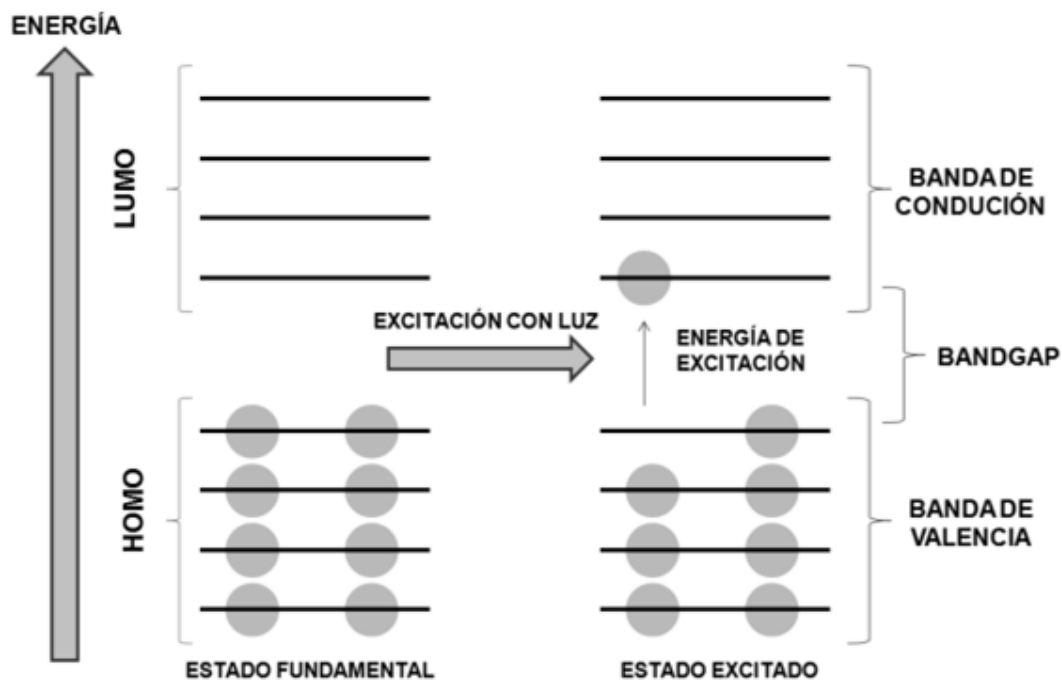


Figura 26. Estados de energía de las nanopartículas.

Un semiconductor puede ser excitado cuando se absorbe un fotón con energía igual o mayor que la banda prohibida, el electrón promovido deja una vacante en la banda de valencia, llamada hueco y se comporta como una partícula cargada positivamente, ya que su movimiento es en la dirección opuesta al movimiento de los electrones (Chemistry 310, 2021). El proceso opuesto a la excitación, consta en la creación de un par electrón hueco, unidos por medio de la fuerza de Coulomb, y se les conoce como excitones (Kocherzhenko et al., 2015); cuando un electrón de la banda de conducción desciende para recombinarse con un hueco en la banda de valencia, se aniquilan y se libera energía (Underwood et al., 2001). Existe una distancia de separación entre las distribuciones de probabilidad de electrones y huecos en un excitón, la cual es denominada como radio de Bohr del excitón (Wu et al., 2017).

Cuando existe una reducción del tamaño en una partícula de un semiconductor, se modifica su estructura electrónica al limitar la distribución espacial de las funciones de onda de excitón, electrón o incluso hueco, donde los electrones confinados pasan a ocupar otros niveles de energía diferentes, llamados niveles discretos, produciendo una cuantización de los niveles de energía, de los estados de densidad electrónica y de la carga (Blood, 2015). En general, estos niveles de energía del estado ligado dependen de la masa de electrones dentro y fuera de la nanopartícula, el potencial de confinamiento y el tamaño de la nanopartícula (Stiff-Roberts, 2011).

### 12.2 Anexo 2. Partícula en una caja en 3 dimensiones.

Para la comprensión del comportamiento de las nanopartículas de tamaño pequeño sometidas a un confinamiento cuántico, es necesario introducir el concepto de la naturaleza dual como partícula y como onda. La aplicación de

esta ecuación con las condiciones de contorno establecidas por el modelo de una partícula confinada en una caja, explicado a continuación.

Consideremos una partícula de masa  $m$  que se mueve a lo largo del eje  $x$ ,  $y$  y  $z$  sometida a un potencial nulo en la región situada entre las coordenadas  $(a, 0, 0)$ ,  $(0, b, 0)$  y  $(0, 0, c)$ . Fuera de esta zona el potencial es infinito. La partícula no puede acceder a la zona de potencial infinito por lo que su movimiento queda limitado a la región de las dimensiones, como se muestra en la figura 27.

$$V(x, y, z) = \begin{cases} \infty & \text{si } 0 > x > a, & 0 > y > b, & 0 > z > c & (5) \\ 0 & \text{si } 0 \leq x \leq a, & 0 \leq y \leq b, & 0 \leq z \leq c & (6) \end{cases}$$

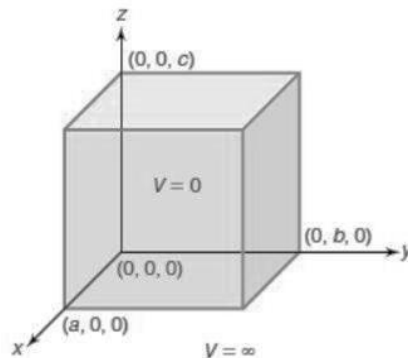


Figura 27. Representación de una partícula en una caja de 3 dimensiones (Jiménez & Cárdenas, n.d.).

Se van a considerar soluciones separables debido a las 3 dimensiones en donde

$$\psi(x, y, z) = X(x)Y(y)Z(z) \quad (7)$$

Planteamos la ecuación de Schrödinger:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} \right) + V(x, y, z) \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad (8)$$

### 3.3.1 Resolución de la ecuación de la partícula fuera de la caja

En las regiones fuera de la caja  $V(x, y, z) = \infty$ . La ecuación de Schrödinger tomará la siguiente forma:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} \right) + \infty \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad (9)$$

La ecuación (9), también puede expresarse como

$$\left( \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} \right) = \frac{2m}{\hbar^2} (\infty - E) \psi(x, y, z) \quad (10)$$

Simplificando la ecuación (7) y despejando  $\psi(x)$ , tenemos



$$\psi(x) = \frac{1}{\infty} \left( \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} \right) \quad (11)$$

Por tanto, en estas regiones la función de onda es nula, lo cual implica una densidad de probabilidad nula y la partícula no puede encontrarse en estas regiones de la caja. Una partícula no puede encontrarse en regiones donde la energía potencial sea infinita (Fernández, n.d.).

### 3.3.2 Resolución de la Ecuación de Schrödinger dentro de la caja

En las regiones I y III  $V(x)=0$ . La ecuación de Schrödinger tomará la siguiente forma (*Particle in a 3-Dimensional Box*, 2019):

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \left( \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} \right) + 0 \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad (12)$$

Despejando la derivada de mayor grado y pasando todo al primer miembro de la ecuación.

$$\frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} + \frac{2mE}{\hbar^2} \psi(x, y, z) = 0 \quad (13)$$

Para resolver la ecuación (13), definiremos

$$k = \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} \quad (14)$$

Entonces, la ecuación (13) puede ser escrita de la siguiente forma

$$\frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi(x, y, z)}{\partial z^2} + k^2 \psi(x, y, z) = 0 \quad (15)$$

Cuyas soluciones generales de las derivadas parciales de la ecuación (15) son

$$\psi(x) = A_x \sin(kx) + B_x \cos(kx) \quad (16)$$

$$\psi(y) = A_y \sin(ky) + B_y \cos(ky) \quad (17)$$

$$\psi(z) = A_z \sin(kz) + B_z \cos(kz) \quad (18)$$

Ahora es cuando se imponen condiciones, donde  $x=0$ ,  $y=0$ ,  $z=0$ ; entonces

$$\psi_x(0) = B_x = 0 \quad (19)$$

$$\psi_y(0) = B_y = 0 \quad (20)$$

$$\psi_z(0) = B_z = 0 \quad (21)$$

Así que, las soluciones dan como resultado

$$\psi(x) = A_x \sin(kx) = 0 \quad (22)$$

$$\psi(y) = A_y \sin(ky) = 0 \quad (23)$$

$$\psi(z) = A_z \sin(kz) = 0 \quad (24)$$

Lo que nos dice que  $A \neq 0$ , de lo contrario,  $\psi(x, y, z)$  sería cero por todas las partes y la partícula desaparecería. La condición de que  $\sin(ka) = 0$ ,  $\sin(kb) = 0$ ,  $\sin(kc) = 0$  implica que

$$ka = n\pi, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (25)$$

$$kb = n\pi, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (26)$$

$$kc = n\pi, \quad n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (27)$$

Excluimos la posibilidad de  $n = 0$ , ya que eso nos daría, una vez más,  $\psi(x, y, z) = 0$ , y de igual manera los valores negativos de  $n$  porque simplemente reproducirán el mismo conjunto de soluciones. Además, eliminamos  $k$  entre la ecuación (11) y las ecuaciones (25), (26) y (27); obteniendo

$$E_n = \frac{\hbar^2 k_n^2}{2m} = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2m} \left( \frac{n_x^2}{a_x^2} + \frac{n_y^2}{b_y^2} + \frac{n_z^2}{c_z^2} \right) \quad (28)$$

$$\text{con } n_x, n_y, n_z = 0, 1, 2, 3, \dots$$

Tenemos que  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ , entonces la ecuación (28) también puede ser definida como

$$E_n = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2m} \left( \frac{n_x^2}{a_x^2} + \frac{n_y^2}{b_y^2} + \frac{n_z^2}{c_z^2} \right) = \frac{h^2}{8m^2} \left( \frac{n_x^2}{a_x^2} + \frac{n_y^2}{b_y^2} + \frac{n_z^2}{c_z^2} \right) \quad (29)$$

$$\text{con } n_x, n_y, n_z = 0, 1, 2, 3, \dots$$

Las funciones propias de partículas en una caja están dadas por la ecuación (16), (17) y (18) con  $B_x = 0$  y  $k = \frac{n_x \pi}{a}$ ,  $B_y = 0$  y  $k = \frac{n_y \pi}{b}$ ,  $B_z = 0$  y  $k = \frac{n_z \pi}{c}$  las cuales se sustituyen en la ecuación (7) para encontrar la función de onda

$$\psi(x, y, z) = A_x \sin\left(\frac{n_x \pi x}{a}\right) A_y \sin\left(\frac{n_y \pi y}{b}\right) A_z \sin\left(\frac{n_z \pi z}{c}\right), \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (30)$$

Obtendremos el valor de  $A_x, A_y, A_z$  normalizando la función de onda de la ecuación (30), lo que consiste en igualar a 1 la probabilidad de encontrar la partícula en todo el espacio

$$\int_0^a [\psi(x)]^2 dx = 1 \quad (31)$$

$$\int_0^a [\psi(y)]^2 dy = 1 \quad (32)$$

$$\int_0^a [\psi(z)]^2 dz = 1 \quad (33)$$

La integración recorre el dominio de la partícula,  $0 \leq x \leq a$ ,  $0 \leq y \leq b$ ,  $0 \leq z \leq c$ . Sustituyendo la ecuación (30) en la ecuación (31), (32) y (34)

$$\int_0^a A_x^2 \sin^2 \frac{n_x \pi x}{a} dx = A_x^2 \frac{a}{n\pi} \int_0^a \sin^2 \theta d\theta = A_x^2 \frac{a}{2} = 1 \quad (34)$$

Hicimos la sustitución  $\theta = \frac{n\pi x}{a}$  y usamos el hecho de que el valor promedio de  $\sin 2\theta$  sobre un número entero de medias longitudes de onda es igual a  $\frac{1}{2}$ . A partir de la ec. (34), podemos identificar la constante de normalización  $A_x = \sqrt{\frac{2}{a}}$ , para todos los valores de  $n$ . Finalmente podemos escribir las funciones propias normalizadas, donde  $A_x = A_y = A_z$ :

$$A_x = \sqrt{\frac{2}{a}}, \quad A_y = \sqrt{\frac{2}{b}}, \quad A_z = \sqrt{\frac{2}{c}} \quad (35)$$

Sustituyendo las soluciones de  $A_x, A_y, A_z$ , mostradas en (34), en la ecuación (30); siendo la función de onda (Dalal, n.d.)

$$\psi(x, y, z) = \sqrt{\frac{8}{abc}} \sin \frac{n_x \pi x}{a} \sin \frac{n_y \pi y}{b} \sin \frac{n_z \pi z}{c}, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (36)$$