



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Elaboración y caracterización
espectrofotométrica de nanopartículas de oro
para su posible uso en el tratamiento de cáncer”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

TERESA TOVAR MENDOZA.

ASESORA: Dra. Eva María Molina Trinidad. (UNAM).

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Elaboración y caracterización espectrofotométrica de nanopartículas de oro para su posible uso en el tratamiento de cáncer

Que presenta la pasante: **Teresa Tovar Mendoza**

Con número de cuenta: **085539431** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de septiembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Salvador Zambrano Martínez	
VOCAL	Dra. Eva María Molina Trinidad	
SECRETARIO	Ing. Angel Rueda Angeles	
1er. SUPLENTE	MI. Claudia Mariano Hernández	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

Agradecimientos.

A Dios porque me ha permitido cerrar este ciclo de mi vida y me ha guiado en el camino.

A mis padres Sofía Mendoza y Lauro Agapito Tovar por haberme dado la vida y aunque ya no están con nosotros supieron orientarme hacia una vida de trabajo y estudio para poder seguir adelante.

A mis hijas Araceli, Dalía e Irma que sin su amor, cariño y confianza este logro hubiera costado más trabajo.

A mis hermanas Cristina, Paula, Juana y Dolores por el tiempo que hemos convivido como familia.

A Isídoro Monroy Reyes por su apoyo incondicional pese a las adversidades.

A la Dra. Eva María Molina Trinidad por brindarme su valioso apoyo, sus consejos, su paciencia y orientación. Gracias por su dedicación, por su interés y por compartir sus conocimientos y experiencias durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por creer en mí.

A Alma Rosa Hernández Martínez por su amistad, sus sugerencias, por las llamadas de atención, los desvelos y sus palabras de aliento para seguir adelante.

A mis amigos Gerardo, Rebeca, Armando, Dafne y Victoria por los momentos en que hemos compartido experiencias y alegrías durante la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mis profesores por las enseñanzas que recibí a lo largo de mi carrera.

A los sinodales y a todas las personas que contribuyeron en la elaboración de este trabajo.

Índice.

Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Abreviaturas.....	V
1. Objetivo General.....	1
2. Objetivos Particulares.....	1
3. Justificación.....	2
4. Introducción.....	3
5. Marco teórico.....	7
5.1 Antecedentes.....	8
5.2 Propiedades físicas y químicas del oro.....	9
5.3 Transporte de fármacos.....	10
5.4 Cómo funcionan e interactúan las nanopartículas de oro en las células tumorales.....	12
5.5 Síntesis de las nanopartículas de oro.....	14
5.6 Caracterización de las nanopartículas de oro.....	15
6. Fase experimental.....	17
6.1 Síntesis de nanopartículas de oro.....	18
6.2 Caracterización de las nanopartículas de oro.....	19
6.3 Validación del método.....	19
6.3.1 <i>Curva de calibración</i>	19
6.3.2 <i>Linealidad</i>	20
6.3.3 <i>Precisión y exactitud</i>	20
6.3.4 <i>Reproducibilidad</i>	20
6.3.5 <i>Límite de detección y cuantificación</i>	20
6.4 Caracterización del conjugado Au-Lanreótido (Au-LAN).....	21
7. Resultados.....	22
7.1 Síntesis de AuNPs.....	22
7.2 Caracterización de nanopartículas Au-Citrato (AuNPs).....	22
7.3 Validación del método.....	25
7.3.1 <i>Curva de calibración</i>	25
7.3.2 <i>Linealidad</i>	26

7.3.3	<i>Precisión y Exactitud</i>	28
7.3.4	<i>Reproductibilidad</i>	31
7.3.5	<i>Cantidad mínima detectable y cantidad mínima cuantificable</i>	32
8.	Discusión.....	33
9.	Conclusiones.	35
10.	Glosario.....	37
11.	Anexos.	41
12.	Referencias.....	45

Índice de tablas.

1. Curvas de calibración para determinar linealidad.....	26
2. Análisis de la regresión lineal de la curva de calibración.....	28
3. Precisión de las nanopartículas.....	28
4. Exactitud de las nanopartículas.....	29
5. Reproducibilidad, día 1, dos analistas.....	31
6. Reproducibilidad, día 2, dos analistas.....	32
7. Datos de concentración y porcentaje recuperado para prueba de exactitud...41	
8. Resultados de la prueba de t de student.....	41
9. Resultados de la prueba de Cochran.....	42
10. Resultados obtenidos para determinar exactitud del método.....	43
11. Precisión y repetibilidad de AuNPs-citrato.....	43
12. Porcentaje de recuperación de las AuNPs-Citrato.....	44

Índice de figuras.

1. Microfotografía, tamaño de nanopartículas de oro.....	23
2. Espectro de nanopartículas de oro obtenido por detección del plasmón de resonancia.....	23
3. Comportamiento del espectro de absorción (STD oro coloidal, Au-Cit y Au-Cit diluido).....	24
4. Comportamiento del espectro de absorción (STD oro, Au-Cit y Au-LAN diluido).....	25
5. Curva de calibración de AuNPs en agua desionizada.....	27
6. Curva de calibración para corregir absorbancias.....	30

Abreviaturas.

AFM	Microscopía de fuerza atómica
Au	Oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
B	Ordenada al origen
Cit	Citrato
CV	Coeficiente de variación
CVf	Coeficiente de variación de los factores de respuesta
DE	Desviación estándar
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
GI	Grados de libertad
HAuCl ₄	Ácido cloroaúrico
HTTP	Receptores específicos de la somatostatina
K	Número de columnas
kDa	KiloDalton
LAN	Lanreótido
Lc	Límite cuantificable
M	Pendiente
mM	Milimolar (mmol /ml)
N	Concentración normal
Nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas

pH	Potencial de hidrógeno
PR	Porcentaje de recuperación
R	Coeficiente de correlación
r^2	Coeficiente de determinación lineal
S	Sumatoria
SG _n	Sumatoria del número total de éxitos en la columna <i>n</i>
SL _c	Sumatoria del número total de éxitos en la fila <i>c</i>
STD	Estándar
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Visible	Ultravioleta-visible

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA SU POSIBLE USO EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.

1. Objetivo General.

Llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de oro por el método Turkevich-Frens y su caracterización por espectrofotometría ultravioleta visible para un posible uso en el tratamiento de cáncer.

2. Objetivos Particulares.

- Reproducir la síntesis de nanopartículas de oro a través del método Turkevich-Frens para la obtención de las nanopartículas.
- Caracterizar las nanopartículas de oro mediante espectrofotometría UV-visible y microscopía electrónica de alta resolución.
- Recopilar información bibliográfica para documentar el comportamiento de las nanopartículas de oro en el organismo.
- Mediante la recopilación de información bibliográfica verificar si las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer.

3. Justificación.

La nanotecnología, hoy en día, apunta principalmente al diseño de materiales y dispositivos a nivel nanométrico. En este sentido, recientes investigaciones han contribuido de manera importante al estudio de la producción y aplicación de NPs (nanopartículas) metálicas en el campo de la biomedicina.

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Destacan especialmente sus peculiares propiedades fototérmicas, ya que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, por lo que podrían utilizarse para el diagnóstico de cáncer. Las AuNPs pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y son fácilmente funcionalizadas con una amplia gama de ligandos (péptidos, anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.).

Es por todo ello que las AuNPs despiertan un gran interés de investigación.

En los últimos años, la comunidad científica ha dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de las AuNPs en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer. En este sentido, es preciso subrayar el excepcional interés de este trabajo en la estrategia dirigida a obtener y caracterizar AuNPs con el fin de seguir aportando nuevas alternativas en la lucha contra el cáncer.

4. Introducción.

Actualmente la investigación se ha enfocado a encontrar nuevos tratamientos que sean más selectivos, entre los cuales se encuentran la farmacopeptidoterapia y la radioterapia, así como la funcionalización de sistemas nanoestructurados como el uso de nanopartículas de oro (AuNPs) para la detección de células tumorales. Los tratamientos para la cura del cáncer son desde principios de siglo muy amplios. Sin embargo, tienen la desventaja de destruir tejido sano además de tener otros efectos secundarios que dependen del tipo de tratamiento que recibe la persona. Por ejemplo, algunos efectos secundarios de la quimioterapia son: náuseas, vómitos, falta de apetito, pérdida de cabello, llagas en la boca y bajos recuentos de células sanguíneas. La radioterapia, otro tipo de tratamiento para el cáncer puede ocasionar como efectos secundarios irritación en la piel y cansancio extremo.

El desarrollo de nanopartículas metálicas unidas a moléculas activas biológicamente (péptidos, proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas) por enlaces covalentes son un campo importante de la investigación aplicada al cáncer ^[1].

Las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen propiedades químicas y físicas que permiten una fácil conjugación con moléculas biológicas lo cual les da actividad terapéutica ^[2]. Las AuNPs presentan un alto potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer, así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas

terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, entre otros) ^[3].

Las nanopartículas de oro han despertado interés debido a sus propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas, que están en función de su tamaño y forma. Las disoluciones coloidales de nanopartículas de oro presentan un color rojo característico, color rojo rubí, derivado de las dimensiones de las partículas del metal ^[4]. Las nanopartículas presentan una baja toxicidad, elevada estabilidad en medios acuosos y facilidad para formar complejos estables a través de enlaces con grupos tiol a péptidos (con residuos de cisteína) que pueden ser dirigidos hacia dianas específicas, dichas propiedades hacen de estos coloides herramientas sumamente atractivas para la aplicación en biomedicina.

Si un haz de radiación electromagnética incide sobre las nanopartículas de oro se produce una oscilación colectiva de los electrones de conducción, lo que se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro visible, dando lugar a espectros con bandas de resonancia conocidas como Plasmones. La absorbancia del plasmón superficial, es una propiedad característica de superficies de un tamaño determinado. El oro presenta una absorción continua en la región UV/Vis/IR ^[4].

Para nanopartículas de oro, la absorción continua decae drásticamente, excepto en una zona concreta denominada banda de absorción del plasmón.

El comportamiento plasmónico de las nanopartículas de oro viene determinado por su funcionalización, empleando la medida de la absorbancia del plasmón para caracterizar las nanopartículas.

El color de la suspensión rojo rubí es señal de la calidad de las partículas obtenidas en cuanto forma esférica y tamaño nanométrico uniformes. Una suspensión de color púrpura es señal de que se ha producido la agregación de partículas, obteniéndose partículas de forma y tamaño variables. La uniformidad en el tamaño es esencial en la fabricación de dispositivos basados en el empleo de nanopartículas de oro que proporcionen medidas estables y reproducibles. Las nanopartículas así preparadas poseen carga superficial negativa como consecuencia de la débil unión al citrato, empleado como reductor. Debido a la carga, las partículas se repelen entre sí, manteniéndose en suspensión indefinidamente.

Las AuNPs presentan una elevadísima área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales. La funcionalización de la superficie de las AuNPs se puede realizar con diferentes biomoléculas como enzimas, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, anticuerpos, entre otros.

La obtención de nanopartículas de oro implica el empleo del grupo funcional tiol que permite la preparación de nanopartículas funcionalizadas con una gran variedad de ligandos orgánicos y biomoléculas como péptidos^[4].

Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan una baja toxicidad y unas propiedades que pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nanosistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas. El oro coloidal presenta una elevada estabilidad química y ha sido utilizado históricamente con fines médicos. Los núcleos de oro de las nanopartículas son inertes y no-tóxicos, sin embargo existen discrepancias acerca de su citotoxicidad que podrían guardar relación con los diferentes tamaños y formas de las nanopartículas de oro (AuNPs), así como con los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización, lo que otorga a las nanopartículas de oro características superficiales distintas ^[3].

5. Marco teórico.

El empleo de la materia a escala nanométrica tiene aplicaciones que impactan en todos los aspectos de nuestra vida. En las ciencias médicas, el empleo de esta tecnología ha crecido intensamente en la última década. La nanomedicina, es un término en el cual se pretenden integrar las nuevas propiedades físicas, químicas y biológicas de este tipo de materiales con posibles aplicaciones en prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

El prefijo nano viene del griego enano y significa pequeño, e indica una milmillonésima parte de algo. Un nanómetro (1nm) es 1/1,000,000,000 parte de un metro, o para tener una mejor idea, un milímetro dividido 1 millón de veces.

Por otra parte la nanociencia es el estudio de los procesos que ocurren en las estructuras de un tamaño entre 1 y 100 nanómetros, las cuales se conocen como nanoestructuras.

A escalas nanométricas, las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales difieren en muchas formas de las propiedades de los correspondientes sistemas macroscópicos.

Las nanopartículas de oro (AuNPs), tienen propiedades muy distintas a las del oro que conocemos. Pueden ser rojas, naranjas, púrpuras, o hasta verdosas,

dependiendo de su tamaño. Cambian también sus otras propiedades físicas y químicas. En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) son muy reactivas y se piensa que se pueden usar como catalizadores en reacciones químicas importantes (ejemplo: oxidación del monóxido de carbono) ^[1].

5.1 Antecedentes.

La utilización del oro con fines médicos, se remonta a la antigüedad existiendo la utilización de oro coloidal en China hace 2500 años A.C. En el siglo XVI el oro era utilizado para tratar la epilepsia y a principios del siglo XIX era el fármaco de elección para el tratamiento de la sífilis. El descubrimiento del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis.

Una de las indicaciones más importantes del oro es en el tratamiento de la artritis reumatoide, y otras enfermedades, incluyendo psoriasis y lupus eritematoso.

En el tratamiento de la artritis reumatoide se utilizaron tiolatos (tiomalato, tioglucosa) de oro que eran administrados intramuscularmente en forma de solución. Pero estos compuestos que experimentaban una rápida distribución a órganos como el riñón, hígado y bazo, no estaban exentos de causar desordenes sanguíneos así como nefro y hepatotoxicidad, por este motivo se introdujo en 1985 una segunda

generación de fármacos de oro conteniendo ligandos fosfina, que eran más lipofílicos y permanecían más tiempo en circulación, reduciéndose la nefrotoxicidad ^[3].

5.2 Propiedades físicas y químicas del oro.

El oro se halla en la naturaleza en una proporción muy baja aproximadamente el $5 \times 10^{-7}\%$ en peso en comparación con el cobre (69.17%). El oro se presenta en la naturaleza bajo formas diversas: en filones de rocas auríferas, asociado a otros metales (por ejemplo el cobre) y en forma de polvo o de gránulos redondeados o achatados conocidos como pepitas; en depósitos de arena y lechos fluviales (placeres auríferos).

Su símbolo químico es Au (del latín Aurum) y junto con la plata y el platino, pertenecen al grupo de los metales nobles, es decir, resistentes a la acción del agua y del oxígeno del aire, así como a un gran número de compuestos químicos.

Su número atómico es 79; su masa atómica es 196.967 g/mol y su densidad es 19.32 g/cm³. Es en extremo maleable (se pueden formar láminas de oro de un grosor de una diezmilésima de mm) y muy dúctil, por lo que a menudo es aleado con otros metales (cobre, níquel, plata, etc.) para incrementar su dureza; la aleación de 50% de plata y otro tanto de oro da lugar al denominado oro blanco.

El oro es un metal muy inactivo. No le afecta el aire, el calor, la humedad ni la mayoría de los disolventes. Sólo es soluble en agua de cloro, agua regia o una

mezcla de agua y cianuro de potasio. Tiene un punto de fusión de 1,064 °C y un punto de ebullición de 2,970 °C.

El oro ha tenido desde la antigüedad una gran importancia para el hombre y fue utilizado como patrón de valor en el segundo milenio A.C. La relativa facilidad de su obtención, su inalterabilidad y su fácil manejo lo han hecho uno de los metales más preciados. En la antigüedad, el oro se utilizó principalmente con fines ornamentales y de culto. A partir del Renacimiento, el oro adquirió el papel de reserva monetaria, y se empezó a almacenar en lingotes. A lo largo de la historia, el oro, se ha utilizado como medio de intercambio. En la actualidad, cerca del 90% de la producción mundial se destina a los fondos de reservas oficiales de los diferentes países, mientras que el 10% restante es empleado en joyería, la industria y la química. El oro también tiene aplicaciones en odontología. Los radioisótopos del oro se emplean en investigación biológica y en el tratamiento del cáncer ^[5].

5.3 Transporte de fármacos.

Actualmente la mayor desventaja de los tratamientos que implican transporte de fármacos o radioisótopos, es la inadecuada distribución de los medicamentos en el cuerpo. Los medicamentos se administran en forma intravenosa y por lo tanto se distribuyen en el torrente sanguíneo, con el consecuente efecto no deseado de que atacan todo tipo de células, incluidas las sanas. Un ejemplo son los tratamientos de quimioterapia en el tratamiento de cáncer. Los terribles efectos secundarios de estas

terapias conllevan a disminuir las dosis o a suspenderlos con el consecuente avance de la enfermedad.

En consecuencia, es objetivo prioritario la identificación de un sistema nanotransportador que permita orientar selectivamente (vectorizar) y en principio, liberar de manera eficaz la dosis adecuada del fármaco citotóxico en el tumor o células cancerígenas. Esto permitirá mejorar la eficacia y reducir la dosis de fármaco administrado, así como los efectos secundarios consecuencia de una distribución aleatoria del fármaco en el organismo.

La vectorización conlleva a la localización y el direccionamiento del fármaco a las células específicas diana, de manera que se modifica la distribución normal del mismo en el organismo. Este tipo de vehiculización puede conseguirse conjugando al fármaco o nanotransportador a una molécula capaz de reconocer específicamente y unirse a su diana terapéutica.

Las nanopartículas o sistemas nanoestructurados pueden ser utilizados para almacenar y transportar fármacos al lugar exacto donde se necesiten, siendo menores los efectos secundarios de los actuales medicamentos. Las ventajas que implica utilizar sistemas nanoestructurados radican en la funcionalización de las mismas respecto a la especificidad, la vectorización selectiva y la terapia dirigida para fines de diagnóstico y de terapia en la práctica de la biomedicina.

Estudios recientes confirman el gran potencial de las AuNPs en la elaboración de nanotransportadores de fármacos y macromoléculas terapéuticas. Las AuNPs también son útiles en la preparación de «sistemas inteligentes» que liberan la molécula terapéutica encapsulada como consecuencia de la activación de un estímulo interno (liberación mediada por un cambio de pH o liberación mediada por glutatión) o externos (liberación desencadenada por una fuente de luz láser).

5.4 Cómo funcionan e interactúan las nanopartículas de oro en las células tumorales.

Una forma de destruir un tumor cancerígeno es quemándolo, pero también el tejido sano es dañado. Investigadores de la universidad Rice en Estados Unidos de Norteamérica realizan estudios utilizando nanoesferas térmicas, las cuales son esferas de sílica recubiertas con oro.

El oro es un metal inerte que puede absorber la luz, además de ser biocompatible con el cuerpo humano. Éste puede utilizarse en esferas de aproximadamente 130 nanómetros de diámetro puesto que con este tamaño absorben radiación en el infrarrojo de tal manera que puede penetrar dentro del cuerpo sin dañarlo. Estas nanoesferas pueden ser recubiertas con anticuerpos con la finalidad de dirigirlos selectivamente a un tejido u órgano.

En estudios realizados en ratones inducidos con cáncer; se utilizaron nanoesferas con anticuerpos las cuales fueron administrados en sangre, éstas se biodistribuyeron por el sistema circulatorio y se concentraron en los tumores de los ratones. Al exponer los animales a la luz infrarroja, las nanoesferas absorbieron energía y se calentaron, quemando los tumores y dejando el tejido de alrededor intacto ^[1].

Durante varios años fue un desafío para los oncólogos encontrar un medio potencial o una herramienta simple para identificar, localizar y tratar neoplasmas en humanos en un estado inicial de desarrollo. Durante 20 años los anticuerpos monoclonales fueron de uso común para tratamiento de cáncer. Pero desventajas como la masa molecular (150 kDa) de los anticuerpos fue una limitante. En la década de los 80's, una alternativa en el marcaje de anticuerpos surge con el uso de péptidos radiomarcados (1.5 kDa) análogos de la somatostatina, como el octeótrido, lanreótido y vaporeótido, los cuales se utilizan para el tratamiento neoplásico. Estos péptidos sintéticos están siendo investigados porque estos se pueden conjugar con AuNPs y así disminuir las respuestas adversas que presentan otros tratamientos contra el cáncer.

En el caso del Lanreótido (LAN), éste es un péptido constituido de ocho aminoácidos derivado de la somatostatina el cual actúa a nivel de receptores específicos HTTP. Dicho péptido se puede conjugar con nanopartículas de oro con el fin de ejercer la funcionalización selectiva en el organismo para detección de cáncer.

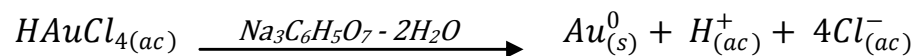
El Lanreótido es un medicamento utilizado para el tratamiento de la acromegalia y para los síntomas causados por tumores neuroendocrinos, en especial el síndrome carcinoide. Dicho medicamento es un análogo sintético de la somatostatina, una hormona inhibidora natural que bloquea la liberación de otras hormonas. Se une a los mismos receptores que la somatostatina (HTTP), con mejor afinidad para los receptores periféricos, a diferencia de la somatostatina el lanreótido tiene una vida media mucho más prolongada y sus efectos se prolongan por más tiempo. Este medicamento se puede conjugar con nanopartículas de oro con el fin de ejercer la funcionalización selectiva en el organismo para detección de cáncer.

5.5 Síntesis de las nanopartículas de oro.

En general las nanopartículas de oro se producen en un líquido por la reducción del ácido cloroaúrico (HAuCl_4). Después de disolver HAuCl_4 en agua desionizada, la solución se agita rápidamente y al mismo tiempo se le adiciona un agente reductor, en este caso el citrato de sodio. Esto hace que los iones de oro (Au^{3+}) sean reducidos a átomos de oro neutral (Au^0). A medida que estos átomos se forman, la solución se vuelve sobresaturada, y el oro poco a poco comienza a nuclear en forma de partículas nanométricas. El resto de los átomos de oro que se forman, se adhieren a las partículas existentes, y si la solución es sometida a agitación continua, las partículas serán más uniformes en tamaño.

El método iniciado por J. Turkevich en 1951 y modificado por el Sr. G. Frens en 1970, es el más simple que hay disponible. Generalmente, se utiliza para producir

nanopartículas de oro esféricas monodispersas, suspendidas en agua, de diámetros alrededor de 10-20 nm. El método involucra la reacción de pequeñas cantidades de ácido cloroáurico (HAuCl₄) en condiciones de ebullición con pequeñas cantidades de solución de citrato de sodio. El oro coloidal se forma porque los iones de citrato actúan como un agente reductor, tal como lo indica la siguiente reacción química.



5.6 Caracterización de las nanopartículas de oro.

Entre las técnicas más importantes reportadas para caracterizar AuNPs se encuentran:

- a) *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*; que brinda información acerca del tamaño y la forma de las nanopartículas al irradiar la muestra con un haz de electrones que permite obtener una imagen, producto del contraste entre los electrones absorbidos, retenidos o dispersados por la muestra, y los que no interaccionan con la muestra e impactan sobre una pantalla fluorescente.
- b) *Espectrofotometría UV-Visible*; que comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución respecto de un blanco, permite obtener información acerca de la concentración (absorbancia en el pico de

máxima absorción), tamaño (posición del pico) y homogeneidad de tamaños (ancho del pico) de la muestra si se analiza la información obtenida en conjunto con otras técnicas.

c) *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*, que proporciona imágenes topográficas detalladas de la superficie analizada mediante el barrido puntual de la misma.

6. Fase experimental.

Materiales

- Matraces volumétricos de 25 mL
- Matraces volumétricos de 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL
- Barra magnética
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL
- Agitador de vidrio
- Parrilla
- Tiras reactivas de pH
- Celdas de cuarzo

Equipos

- Espectrofotómetro UV-visible *Thermo Spectronic Helios*

Reactivos

- Ácido cloroaúrico
- Citrato trisódico
- Agua desionizada
- Péptidos LAN
- Lanreótido (β -naftil-péptido)

6.1 Síntesis de nanopartículas de oro.

La síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) se realizó siguiendo el método clásico introducido por Turkevich en 1951 y establecido más tarde por Frens, que consiste en la reducción de HAuCl_4 en medio acuoso mediante citrato. Los aniones citrato sirven no sólo como agente reductor sino que ejercen un efecto protector de las partículas generadas en la síntesis frente a la agregación.

Se pesaron 0.034 g de ácido cloroáurico (HAuCl_4) y se llevaron a un volumen de aforo de 100 ml, de esta solución se tomaron 90 ml y se pusieron a ebullición, posteriormente la solución se agitó mientras se le agregaron 5 ml de una solución de citrato trisodico 32 mM, se mantuvo en ebullición durante 15 minutos y finalmente se midió el pH el cual fue de 9.

La caracterización de las AuNPs se realizó siguiendo un método espectroscópico UV-Visible y Microscopía de transmisión electrónica (TEM) que brinda información acerca del tamaño y la forma de las nanopartículas al irradiar la muestra con un haz de electrones que permite obtener una imagen, producto del contraste entre los electrones absorbidos, retenidos o dispersados por la muestra, y los que no interaccionan con la muestra e impactan sobre una pantalla fluorescente.

Utilizando la TEM se obtuvieron microfotografías en donde se observa el tamaño de las nanopartículas, una imagen se muestra en la parte de resultados en la figura 1, en donde el tamaño de las nanopartículas es de 5 nm.

6.2 Caracterización de las nanopartículas de oro.

Se llevó a cabo un barrido de la solución, preparada previamente (síntesis) para determinar la longitud de onda óptima la cual fue de 523 nm, de acuerdo a dicha longitud de onda y al espectro de radiación electromagnética, el color absorbido es el amarillo y el complementario es el rojo-vino.

Se tomaron lecturas en un espectrofotómetro UV-visible a la longitud de onda máxima determinada en el barrido del Au-Cit (523 nm) donde se detecta el plasmón de resonancia.

6.3 Validación del método.

6.3.1 Curva de calibración.

De la solución obtenida de la síntesis de oro con citratos, se tomaron volúmenes crecientes 1 ml a 5 ml con pipetas volumétricas y se llevaron a un volumen de aforo de 25 ml con agua desionizada, de esta manera se obtuvieron distintas concentraciones (0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2 mM Au-Citrato) (Ver tabla 1).

6.3.2 *Linealidad.*

Para determinar la linealidad se realizó la curva de calibración por triplicado y se calculó el coeficiente de determinación lineal (R^2) que debe ser mayor o igual a 0.98 y el coeficiente de variación porcentual (CV) menor o igual a 5.0% de acuerdo a la FEUM (Ver tabla 2).

6.3.3 *Precisión y exactitud.*

En cuanto a precisión se realizó la curva de calibración por triplicado y se calculó el porcentaje de recobro, desviación estándar y coeficiente de variación. (Ver tabla 3 y 4).

En cuanto a exactitud se realizó la curva de calibración por triplicado y se calculó el porcentaje de recobro, desviación estándar y coeficiente de variación. (Ver tabla 3 y 4).

6.3.4 *Reproducibilidad.*

Para reproducibilidad se realizó la curva de calibración por duplicado por dos analistas y días diferentes utilizando el mismo equipo y se calculó el coeficiente de variación que deberá ser menor o igual a 5.0 %.

6.3.5 *Límite de detección y cuantificación.*

Para el límite mínimo de detección de la curva de calibración, se tomó el sistema de menor concentración, se diluyó varias veces y se tomó la lectura en un

espectrofotómetro UV-visible. Se interpoló y determinó el límite mínimo de detección teórico, para comparar con el valor experimental.

6.4 Caracterización del conjugado Au-Lanreótido (Au-LAN).

Para el conjugado con citrato:

Se tomaron 5 ml de la solución de nanopartículas de oro y se agregaron 3 ml del péptido lanreótido y finalmente se llevaron a un volumen de 20 ml con agua desionizada y libre de pirógenos, estéril. Posteriormente, se puso en agitación constante durante 30 min. Se ajustó a un pH=9 con una solución de carbonato de potasio 0.1 N. Para evaluar la estabilidad del conjugado, se tomó la lectura en un espectrofotómetro UV-visible diariamente a una longitud de onda de 533 nm.

Para evaluar la estabilidad se tomaron lecturas en un espectrofotómetro UV-visible diariamente y se compararon con las del Au-Cit. Se observó que el espectro de absorción y el plasmón de resonancia es el característico del conjugado (533 nm) y de las nanopartículas de oro (523 nm).

7. Resultados.

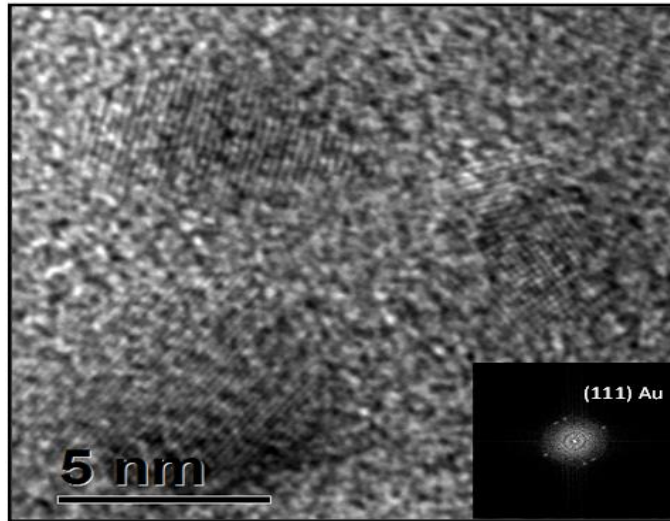
Los resultados obtenidos en este trabajo se muestran a continuación.

7.1 Síntesis de AuNPs.

Se obtuvieron nanopartículas de oro en base a la técnica reportada en la fase experimental.

7.2 Caracterización de nanopartículas Au-Citrato (AuNPs).

A partir de la síntesis mencionada en el apartado 6.1 se obtuvo la siguiente microfotografía por microscopía electrónica de alta resolución (Figura 1). Se puede observar que el tamaño de las nanopartículas, obtenidas por el principio de reducción de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ con citrato sódico tribásico, es de 5 nm (AuNPs).



Microfotografía.

Figura 1. Tamaño de las nanopartículas de oro (5 nm) obtenida por microscopía electrónica de alta resolución.

La siguiente gráfica representa el espectro obtenido de la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) por espectrofotometría UV-visible (Figura 2). Se puede observar que se tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 523 nm.

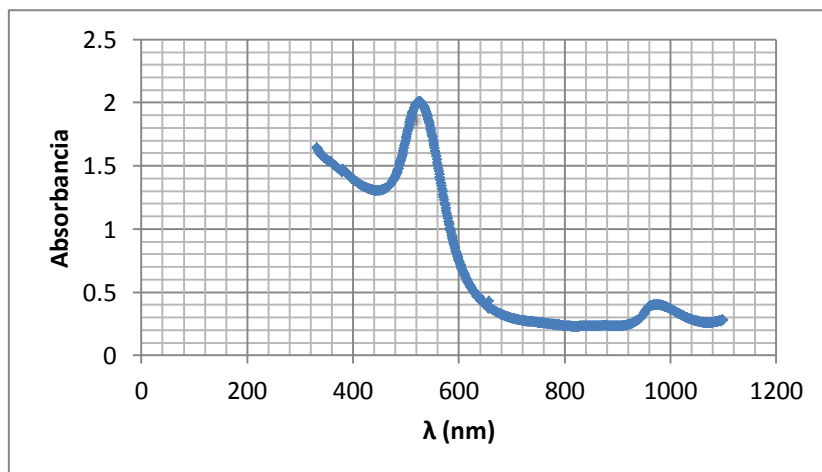


Figura 2. Espectro de las nanopartículas de oro obtenido a partir de la detección del plasmón de resonancia de AuNPs. Obteniendo como longitud de onda óptima 523 nm.

En las siguientes gráficas se observa el comportamiento espectrofotométrico en la región UV-Visible de las nanopartículas de oro obtenidas en base a la síntesis de Turkevich-Frens con modificación Kimling para Au-Cit, Au-Cit diluido, comparado con el estándar químico de oro coloidal a diferentes concentraciones y del Au-LAN (oro-lanrétido) conjugado. (Reportado en el artículo Molina-Trinidad y cols., 2011).

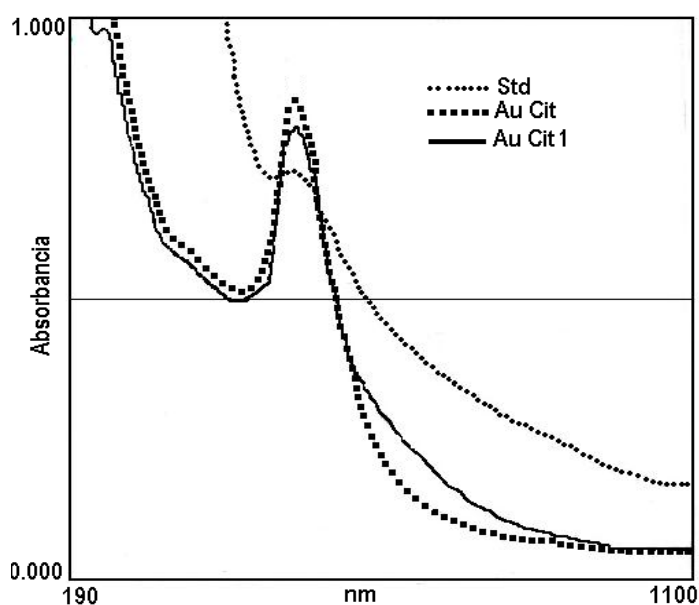


Figura 3. Comportamiento de los espectros de absorción del STD de oro coloidal (Sigma Aldrich), síntesis de Au-Cit y Au Cit diluido 1:10 donde el plasmón de resonancia se detecta a una longitud de onda de 523 nm. (Molina-Trinidad y cols., 2011).

En la figura anterior se observa que la solución de Au-Cit alcanza una mayor absorbancia en comparación al estándar de referencia, de igual manera la absorbancia de la solución de Au-Cit diluido es mayor que la del estándar; ambas absorbancias se alcanzan a una longitud de onda de 523 nm.

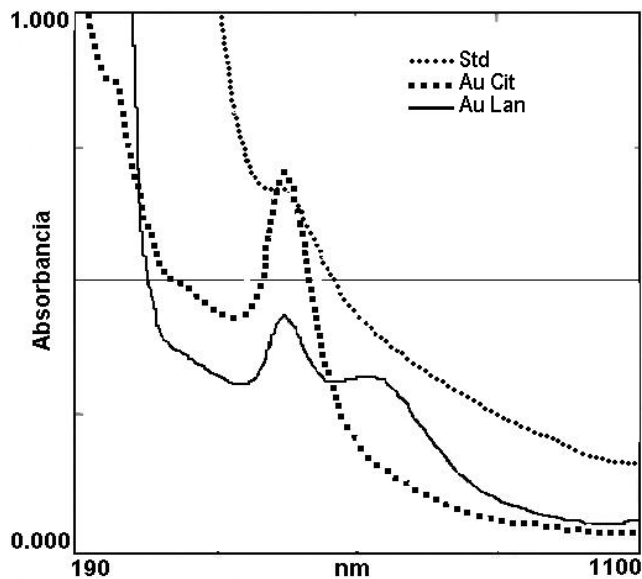


Figura 4. Comportamiento de los espectros de absorción del STD de oro (diluido 1:10) (523nm), Au-cit (523nm) y Au-LAN (533 nm). (Molina-Trinidad y cols., 2011).

En la figura 4 se observa que la solución de Au-Cit tiene una absorbancia aproximadamente igual a la del estándar de referencia ($\lambda=523$ nm) en tanto la solución de Au-LAN tiene una absorbancia menor ($\lambda=533$ nm).

Los resultados anteriores forman parte de las pruebas de caracterización de las nanopartículas de oro.

7.3 Validación del método

7.3.1 Curva de calibración.

La curva de calibración utilizada se muestra en la figura 5 y en la tabla 1.

7.3.2 Linealidad.

Para determinar la linealidad de las nanopartículas de oro en base a la validación del método se preparó una curva de calibración, la cual se realizó por triplicado con cada una de las concentraciones. (Tabla 1 y figura 5).

En la siguiente tabla se muestran los datos de la curva realizada por triplicado, indicando los datos de concentración AuNPs (mM) y absorbancia.

Tabla 1. Curvas de calibración para determinar linealidad.

Concentración Au-Cit (mM)	Absorbancia
0.04	0.086
0.08	0.159
0.12	0.239
0.16	0.346
0.2	0.405
0.04	0.086
0.08	0.161
0.12	0.239
0.16	0.35
0.2	0.405
0.04	0.086
0.08	0.161
0.12	0.24
0.16	0.349
0.2	0.405

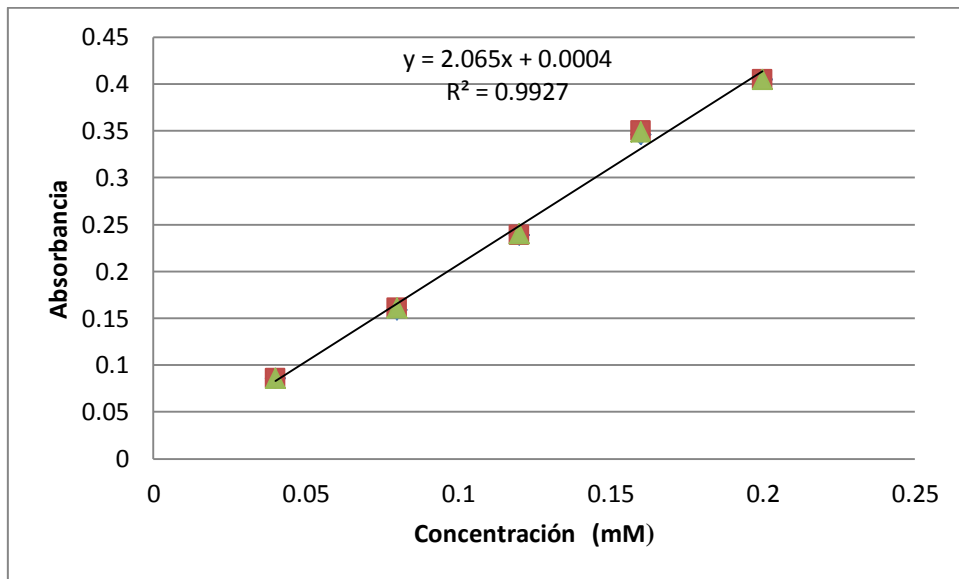


Figura 5. Curva de calibración de AuNPs en agua desionizada.

En esta figura se puede observar que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la solución de AuNPs, puesto que a mayor concentración mayor es la absorbancia.

En la tabla 2 se indican los valores de los parámetros de linealidad, así como los valores estadísticos correspondientes a la curva de calibración de la solución de AuNPs.

Tabla 2. Análisis de la regresión lineal de la curva de calibración.

Parámetro de linealidad	Valor
Coeficiente de correlación (R)	0.9964
Coeficiente de determinación lineal (R^2)	0.9927
Ecuación de regresión	$Y = 2.065x + 0.0004$
Pendiente (m)	2.065
Intercepción (b)	0.0004
Desviación estándar (DE)	0.0804
Coeficiente de variación (% CV)	3.8861

7.3.3 Precisión y Exactitud.

En cuanto a precisión se realizó la curva de calibración por triplicado y se calculó el porcentaje de recobro, desviación estándar y coeficiente de variación a las siguientes concentraciones. Ver tabla 3 y 4.

Tabla 3. Precisión de las nanopartículas

Concentración Au-Cit (AuNPs) (mM)	Absorbancia			Promedio	DE	%CV
	Y1	Y2	Y3			
X						
0.02	0.153	0.128	0.147	0.1427	0.0131	9.1800
0.04	0.263	0.266	0.266	0.265	0.0017	0.6415
0.08	0.384	0.38	0.382	0.383	0.002	0.5221
0.12	0.495	0.505	0.492	0.4973	0.0068	1.3673
0.16	0.596	0.614	0.617	0.609	0.0114	1.8719

Tabla 4. Exactitud de las nanopartículas (n=3)

Concentración Au-Cit (mM)	Absorbancia	Concentración Au-Cit Corregida (mM)	Porcentaje de recobro (%)
0.04	0.086	0.0417	104
0.08	0.159	0.0771	96
0.12	0.239	0.1159	97
0.16	0.346	0.1678	105
0.2	0.405	0.1964	98
0.04	0.086	0.0417	104
0.08	0.161	0.0781	98
0.12	0.239	0.1159	97
0.16	0.35	0.1697	106
0.2	0.405	0.1964	98
0.04	0.086	0.0417	104
0.08	0.161	0.0781	98
0.12	0.24	0.1164	97
0.16	0.349	0.1692	106
0.2	0.405	0.1964	98

Promedio	100.4
DE	3.83
% CV	3.81

En cuanto a exactitud se realizó la curva de calibración por triplicado y se calculó el porcentaje de recobro, desviación estándar y coeficiente de variación a las siguientes concentraciones.

En la tabla anterior se observan las diferentes concentraciones de la solución de Au-Citrato (AuNPs), así como la absorbancia correspondiente a cada una de las concentraciones.

Además se indica la concentración de Au-Citrato corregida y el porcentaje de recobro para cada una de las concentraciones.

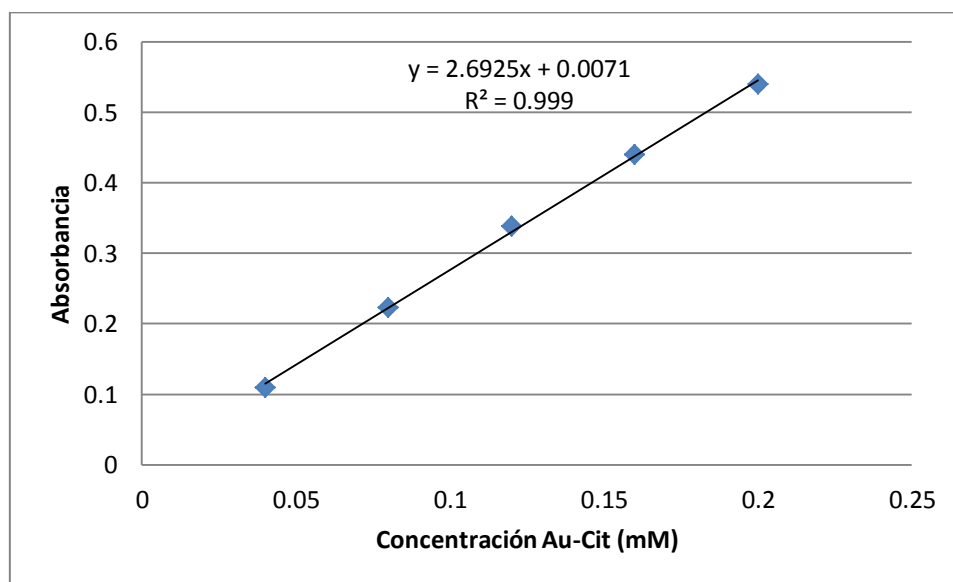


Figura 6. Curva de calibración para corregir las absorbancias obtenidas para determinar la exactitud del método.

En la figura 6 se observa una proporcionalidad directa entre la concentración de la solución Au-Citrato y la absorbancia, ya que, a mayor concentración existe una mayor absorbancia. Esto se demuestra con un coeficiente de determinación de 0.999.

7.3.4 Reproducibilidad.

Para reproducibilidad se realizó la curva de calibración por duplicado por dos analistas y días diferentes utilizando el mismo equipo y se calculó el coeficiente de variación que en base a la especificación debe ser menor o igual a 5.0. Ver tabla 5 y 6. Sólo se reportan los resultados puesto que el objetivo principal es la caracterización de las nanopartículas de oro.

Tabla 5. Reproducibilidad, día 1, dos analistas.

	Concentración Au-Cit (mM)	Absorbancia	Concentración Corregida Au-Cit (mM)	% recobro	Media	DE	% CV
Analista 1	0.04	0.156	0.0380	95.0957	99.5694	3.0760	3.0894
	0.08	0.337	0.0813	101.6746			
	0.12	0.513	0.1234	102.8708			
	0.16	0.653	0.1569	98.0861			
	0.2	0.834	0.2002	100.1196			
Analista 2	0.04	0.152	0.0386	96.4041	99.6708	2.2406	2.2480
	0.08	0.331	0.0809	101.1356			
	0.12	0.507	0.1225	102.1213			
	0.16	0.656	0.1578	98.6220			
	0.2	0.835	0.2001	100.0710			

Tabla 6. Reproducibilidad, día 2, dos analistas.

	Concentración Au-Cit (mM)	Absorbancia	Concentración Corregida Au-Cit (mM)	Porcentaje de recobro (%)	Media	DE	% CV
Analista 1	0.04	0.137	0.0367	91.7145	99.0683	4.8060	4.8511
	0.08	0.311	0.0801	100.1373			
	0.12	0.495	0.1260	105.0245			
	0.16	0.632	0.1602	100.1373			
	0.2	0.778	0.1967	98.3279			
Analista 2	0.04	0.135	0.0360	90.0174	98.7894	5.6732	5.7427
	0.08	0.312	0.0800	99.9503			
	0.12	0.5	0.1266	105.5376			
	0.16	0.639	0.1612	100.7263			
	0.2	0.777	0.1954	97.7154			

7.3.5 Cantidad mínima detectable y cantidad mínima cuantificable.

En base al procedimiento mencionado en la metodología el valor de absorbancia mínima cuantificable es de $A=0.2087$ a una concentración de 0.05 mM obtenida a partir de una solución de concentración de 0.2 mM del nanofármaco, a la cual se le realizaron diferentes diluciones.

La cantidad mínima detectable es de $A=0.0522$ de una solución cuya concentración fue de 0.0063 mM.

8. Discusión.

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método espectrofotométrico (Fig. 1, 2, 3 y 4), indican que no existen interferencias en la determinación de nanopartículas de oro obtenidas por la síntesis de Turkevich-Frens las cuales tienen una máxima absorbancia a una longitud de onda de 523 nm. A dicha longitud de onda se identifica el plasmón de resonancia en las nanopartículas de oro en tanto que para el conjugado Au-LAN se logra identificar a la longitud de 533 nm; esto ocurre porque la formación del conjugado nos permite visualizar el desplazamiento del plasmón de resonancia, lo que indica la formación del conjugado.

La curva de calibración resultó ser lineal en el intervalo analizado; el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación cumplen con los criterios de aceptación, lo cual indica buena linealidad (%CV = 3.8861). Al aplicar la prueba de linealidad, se obtuvo que los factores de respuesta son semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente, por esto se puede tomar el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf) como expresión de linealidad, que es menor del 5 % por lo que cumple con los parámetros establecidos, de acuerdo a la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos). Además, el valor S_b desviación estándar relativa = 1.6574 % fue menor del 2 %, lo que demuestra la adecuada linealidad. Al aplicar la prueba de proporcionalidad se obtiene que el error sistemático del método es pequeño, sus límites de confianza incluyen el cero. En la prueba de significación estadística de la varianza del intercepto, se obtuvo una t calculada (0.4769) menor

que la t tabulada 0.741 por lo que se cumple la condición de proporcionalidad. Ver anexo.

En el intervalo seleccionado para el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobro están dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102 %) y el valor del coeficiente de variación, fue menor que el 5 %. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud mediante la prueba de Cochran se obtuvo que G calculada fue menor que la G tabulada para una probabilidad de 0.05, $k=3$ y $n=3$; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes, lo cual indica que la concentración no influye en la variabilidad de estos. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, se obtuvo una t calculada (0.4304) menor que el valor de la t tabulada 0.741, lo que confirma la buena exactitud del método pues el recobro promedio no difiere significativamente del 100 %.

En el estudio de la reproducibilidad realizado a 3 niveles de concentración, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzaron coeficientes de variación adecuados en todos los niveles de concentración, lo que demuestra la buena precisión del método ya que cumple con el límite establecido de $CV < 5\%$.

En base a lo anteriormente reportado podemos decir que se cumplieron los criterios de validación del método.

9. Conclusiones.

Con el desarrollo de este proyecto se lograron obtener nanopartículas de oro-citrato utilizando la síntesis descrita por Turkevich-Frens, dichas nanopartículas cuentan con un tamaño de 5 nm, dato obtenido por microscopía electrónica de alta resolución.

Las nanopartículas de Au-Citrato tienen una absorbancia máxima a una longitud de onda de 523 nm, longitud en la cual se presenta su plasmón de resonancia. Y la longitud de onda óptima para detectar el conjugado Au-LAN fue de 533 nm.

Una de las tareas básicas que forman parte del desarrollo de nuevos productos farmacéuticos es la confiabilidad de los métodos analíticos utilizados para cuantificar los nuevos fármacos en desarrollo, por esta razón creo que este método espectrofotométrico es útil para cuantificar las nanopartículas de oro y el conjugado Au-LAN (Oro-Lanreótido).

En cuanto a los resultados obtenidos correspondientes al conjugado Au-LAN puedo decir que aún no existe reporte alguno sobre la caracterización específica de dicho péptido ni de la validación del método, y esta es la primera vez que se reportan estos estudios.

Por otra parte respecto a la formación del QFB en su área laboral es importante contar con el conocimiento y la aplicación de la metodología analítica, por tal razón creo que el desarrollo de este método es muy útil para los fines a los cuales fue

diseñado, es decir, para la caracterización de las nanopartículas como tema principal. Y para la elaboración de este proyecto y complementario al reportar los primeros datos correspondientes a la validación del método analítico ya reportado en una publicación internacional.

Cabe decir que se realizaron dichos estudios como parte complementaria a la fase inicial del estudio que corresponde a la síntesis y caracterización de las AuNPs.

Finalmente en base a la información bibliográfica recopilada, puedo decir que las nanopartículas de oro pueden ser útiles en cuanto al transporte de fármacos dirigidos a células cancerígenas.

10. Glosario.

Agente reductor: especie química encargada de reducir a una sustancia ya que dona electrones, al hacer esta donación dicha sustancia se oxida, por lo que se puede decir que el agente reductor es la sustancia que se oxida.

Barrido espectral: es la variación de la longitud de onda para determinar la longitud de onda máxima (donde el analito absorbe más luz).

Cantidad mínima cuantificable: concentración más baja de un compuesto que puede ser cuantificado, con un grado de confianza previamente establecido. La respuesta dada por este valor de concentración debe cumplir con los criterios de exactitud y de precisión.

Cantidad mínima detectable: concentración más baja del compuesto en estudio, que es posible detectar con certeza, es decir, que se puede diferenciar de la respuesta dada por el blanco, cuando se desarrolla el procedimiento analítico completo con el blanco; por debajo de esta concentración es imposible la detección. No necesariamente es cuantificable.

Curva de calibración: es una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utiliza para determinar la cantidad de dicha sustancia presente en una muestra incógnita.

Espectro de absorción: es la fracción de la radiación electromagnética incidente que un material absorbe dentro de un rango de frecuencias.

Espectrofotómetro: instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra.

Exactitud: parámetro que determina la capacidad del método para obtener resultados lo más próximo posibles al valor aceptado como verdadero.

Linealidad: parámetro que tiene por objetivo determinar la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta instrumental.

Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina.

Plasmón de resonancia: fenómeno vibratorio típico de los plasmas que ocurre cuando un gas está fuertemente ionizado, en estado plasma, y los portadores de carga libre pueden interaccionar fácilmente con la radiación electromagnética de baja frecuencia oscilando en resonancia con ésta.

Precisión: parámetro utilizado para determinar la dispersión de la medida alrededor del valor central, midiendo la concordancia entre ensayos individuales aplicados a muestras separadas e idénticas.

Radioisótopo: isótopo radiactivo ya que tiene un núcleo atómico inestable y emite energía y partículas cuando cambia de esta forma a una más estable.

Radioterapia: forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa).

Reproducibilidad: es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian. Donde (1) Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifique la condición que cambia. (2) Las condiciones que cambian pueden incluir: principio de medición, método de medición, observador, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso, tiempo. (3) La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. (4) Se entiende que los resultados usualmente son resultados corregidos.

t-student: es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Aparece de manera natural al realizar la prueba t de Student para la

determinación de las diferencias entre dos medias muestrales y para la construcción del intervalo de confianza para la diferencia entre las medias de dos poblaciones cuando se desconoce la desviación típica de una población y ésta debe ser estimada a partir de los datos de una muestra.

Validación del método analítico: procedimiento para establecer por medio de estudios laboratoriales una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

11. Anexos.

Tabla 7. Datos de concentración y porcentaje recuperado para la prueba de exactitud realizada por triplicado.

Concentración (Mm)	Eventos		
	1	2	3
	Porcentaje %		
0.04	104.27	104.27	104.27
0.08	96.39	97.6	97.6
0.12	96.59	96.59	96.99
0.16	104.87	106.09	105.78
0.2	98.21	98.21	98.21
Media	100.066	100.552	100.57
S	4.1771	4.3125	4.1243
%CV	4.1743	4.2888	4.1010
Varianza	17.4481	18.5974	17.0102

Tabla 8. Resultados de la prueba de t de student para determinar la linealidad del método.

	Prueba t	
t tabulada	0.741	0.741
t calculada	0.4304	0.4304
	var igual	var dif

Tabla 9. Datos obtenidos a partir del análisis estadístico utilizando la prueba de Cochran

PRUEBA DE Q DE COCHRAN							
$X^2_{\alpha} = (K - 1) [K SGn^2 - (S Gn)^2] / KSLc - S Lc^2$							
K	K-1	SGn ²	(SGn) ²	S Lc	S Lc ²	KSGn ²	KSLc
5	4	1299150.901	6495668	3149	1993729	6495755	15743
$X^2_{\alpha} =$		347					
		-1977985					
		-0.00017533					
K SGn ²		6495755					
(S Gn) ²		6495668					
K -1		4					
KSLc		15743					
S Lc ²		1993729					

Tabla 10. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método.

	Porcentaje de recuperación (PR)							
Concentración (mM)	P.R.1	P.R.2	P.R.3	P.R.4	P.R.5	P.R.6	DE	CV (%)
40	101.34	101.34	104.85	104.85	104.85	103.44	1.92	1.85
80	103.1	105.15	104.44	105.44	105.15	104.05	1.73	1.66
120	103.1	103.68	103.49	103.49	103.1	103.37	0.26	0.25
160	99.14	99.29	99.58	99.58	99.43	99.4	0.19	0.19
200	100.28	98.64	98.41	98.41	98.53	98.85	0.8	0.81
(PRP) (%)	101.82±0.98							
CV (%)	1							

Tabla 11. Precisión y repetibilidad de AuNPs-Citrato.

	Porcentaje de recuperación (PR)							
Concentración (mM)	PR1	PR2	PR3	PR4	PR 5	PRP (%)	DE (%)	CV (%)
0.04	105.9	97.1	95.3	97.9	97.1	98.66	4.1	4.2
0.08	98.7	99.6	100.1	97.1	100.1	99.11	1.26	1.27
0.12	101.1	102.2	102.8	97.8	102.6	101.3	2	1.98
0.16	100.1	103.1	102.6	98.2	99.6	100.92	2.04	2
0.2	98.6	101.9	103.4	94.8	97.6	99.26	3.4	3.42

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de las AuNPs-Citrato

EXPERIMENTALES A										
Concen tración (mM)	PR1 (%)	PR2 (%)	PR3 (%)	PR4 (%)	PR5 (%)	PRP (%)	DE	CV (%)	Lc	Lc ²
40	101.34	101.34	104.85	104.85	104.85	103.446	1.9225	1.8585	557.23	310505
80	103.1	105.15	104.44	105.44	105.15	104.656	0.9448	0.9028	603.28	363947
120	103.1	103.68	103.49	103.49	103.1	103.372	0.2601	0.2516	636.86	405591
160	99.14	99.29	99.58	99.58	99.43	99.404	0.1906	0.1917	657.02	431675
200	100.28	98.64	98.41	98.41	98.53	98.854	0.8029	0.8122	694.27	482011
SGn	506.96	508.1	510.77	511.77	511.06	509.732			3148.66	1993729
	257008	258166	260886	261909	261182				S Lc	S Lc ²
SGn ²	1299151									
	2549									
(SGn) ²	6495667.8									
gl=K(tratamientos) -1= 5-1= 4										

12. Referencias.

[1] Takeuchi N. (2009) Nanociencia y Nanotecnología: algunas aplicaciones de la nanociencia y nanotecnología en la medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Anestesia en México 21 (3): 231-233.

[2] Maldonado ERE, Sánchez ME y Galván IJ (2010) Análisis de la incorporación de nanopartículas de oro marcadas con protoporfirina IX en células cancerosas. X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia 1-6.

[3] Al-Qadi S. y Remuñán López C. (2009) Nanopartículas metálicas: oro. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXVIII: Nanotecnología farmacéutica. 223- 248.

[4] Carralero S. V. (2008) Preparación de biosensores enzimáticos e inmunosensores basados en electrodos modificados con nanopartículas de oro. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/8820/1/T30862.pdf> Fecha de revisión: 20 marzo 2013.

[5]http://www.tusolucionefectiva.com/index.php?option=com_content&view=article&id=35&Itemid=55 Fecha de revisión: 13 mayo de 2013.

- [6] Pescador JA. (2008) Nanopartículas Bimetálicas de Au-Ag: Síntesis, Caracterización y su Aplicación para el Transporte Térmico, *Protocolo de tesis para obtener el grado de maestría en ciencias. Ing. CICATA-IPN* 1-24.
- [7] Thomas TP, Ye JY, Chang YC, Kotlyar A, Cao Z, Majoros IJ, Norris TB, Baker JR. (2008) Investigation of tumor cell targeting of a dendrimer nanoparticle using a double-clad optical fiber probe. *J Biomed Opt.* 13:014024.
- [8] Suresh K, Jittiwat J, Manikandan J, Ong CN, Yu L E, Ong W Y. (2010) Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats; *Biomaterials.* 31, 2034-2042.
- [9] Gu YJ, Cheng J, Lin CC, Lam Y W, Cheng S H, Wong WT. (2009) Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 196-204.
- [10] Florio T, Thellung S, Corsaro A, et. al. (2003) Characterization of the intracellular mechanisms mediating somatostatin and lanreotide inhibition of DNA synthesis and growth hormone release from dispersed human GH-secreting pituitary adenoma cells *in vitro*, *Clinical Endocrinology.* (59): 115-128.
- [11] Cedrés JM. (2006) Estudio farmacocinético de análogos de la somatostatina, *Tesis Doctoral*, Universidad de Barcelona 24-28.

[12] Rens-Domiano S, Reisine T. (1992) "Biochemical and functional properties of somatostatin receptors". *Journal neurochem.* (58): 1987-1996.

[13] Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. (2006) Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal Physical Chemistry B.* (110): 15700-15707.

[14] Hassan Azzazy ME, Mai MH Mansour. (2009) In vitro diagnostic prospects of nanoparticles, *Clinica Chimica Acta 403.* 1-8.

[15] James Baker R, Brent B. Ward and Thommey Thomas P. (2009) Nanotechnology in Clinical and Translational Research, *Clinical and Translational Science.* 123-135.

[16] Prabakaran M, Jamison J Grailer, Srikanth Pilla, Douglas A Steeber, Shaoqin Gong. (2009) Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor- targeted drug delivery; *Biomaterials 30* 6065-6075.

[17] Molina Trinidad EM, Arteaga de Murphy C, Jung-Cook H, Murphy-Stack E, Pedraza-López M, Morales-Márquez JL, Vertiz Serrano G. (2010) Therapeutic

¹⁸⁸Relanreotide: Determination of Radiopharmacokinetics Parameters in rats. *Journal Pharmacy and Pharmacology*. 62:1-6.

[18] Molina Trinidad EM, Ochoa Arredondo L, Mendoza Oaxaca E, Huerta Valencia V, Escobar Chavez JJ, Hoyo Vadillo C. (2011) Development and Validation of a Method Spectrophotometric for Quantify GNPs and GNPs-Lanreotide In vitro. *Journal Pharmacy and Pharmacology*. 3(6): 608-612.

[19] United States Pharmacopeial Convention, USP 29. (2006) Validation of compendial methods. 29 ed. Rockville, Mack Printing.

[20] Daniel MC, Astruc D, (2004) Gold Nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev*, 104(1): 293-346.