



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Síntesis y caracterización de
nanopartículas de Au y Ag. Evaluación
toxicológica en un modelo *in vivo*.”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta:

Q. MARIA GUADALUPE CRUZ MONTUFAR

Dirigida por:

Dr. ALFREDO RAFAEL VILCHIS NESTOR

Dra. MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ NAVARRO

Dr. RAÚL ALBERTO MORALES LUCKIE



TOLUCA, MÉXICO

2016

INDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
FUNDAMENTOS	
Justificación	XIV
Hipótesis	XV
Objetivos	XV
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	1
1.1 Nanotecnología y nanociencia	2
1.2 Tipo de nanomateriales	3
1.2.1 Clasificación por su morfología	3
1.2.2 Clasificación por su tamaño	4
1.2.3 Clasificación por su composición	4
1.3 Nanopartículas metálicas	5
1.3.1 Resonancia de Plasmón superficial (SPR)	7
1.4 Métodos de síntesis de las nanopartículas metálicas	10
1.4.1 <i>Camellia sinensis</i> (Té verde)	13
1.5 Técnicas de caracterización	15
1.5.1 Espectroscopía de absorción electrónica UV-Vis	15
1.5.2 Dispersión de luz Dinámica (DLS)	17
1.5.3 Microscopía electrónica	19
1.6 Toxicología	22
1.6.1 Definición	22
1.6.2 Tipos de intoxicación	22
1.6.3 Nanotoxicología	24
1.6.4 Dosis Letal 50	26
1.6.5 Clasificación general de los tóxicos	28
1.6.6 Hepatotoxicidad	32
1.6.7 Nefrotoxicidad	33
1.6.8 Toxicidad de las nanopartículas (Au y Ag)	34
1.7 Histopatología para la detección de metales	36
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	38
2.1 Metodología	39
2.2 Materiales y reactivos.	39
2.3 Metodología general.	40
2.3.1 Síntesis de nanopartículas metálicas.	41

2.3.1.1 Preparación de las soluciones de Au y Ag con NaBH ₄ (químico)	41
2.3.1.2 Preparación del extracto acuoso de <i>Camellia sinensis</i>	42
2.3.2.2 Preparación de las soluciones de Au y Ag con C. <i>sinensis</i> (biológico).	43
2.3.2 Caracterización de nanopartículas metálicas.	44
2.3.2.1 Espectroscopía UV-Vis	44
2.3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).	45
2.3.2.3 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).	45
2.3.3 Análisis Toxicológicos	45
2.3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda.	46
2.3.3.2 Evaluación toxicológica subaguda.	48
2.3.4. Histolocalización	49
2.3.4.1 Criostato	50
2.3.4.2 Microscopio de Epifluorescencia	51
2.3.5 Histopatología	52
2.3.5.1 Tinción.	53
CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
Artículo Enviado	56
Acuse del Artículo enviado	76
3.1 Nanopartículas de oro (AuNp)	78
3.1.1 Nanopartículas de oro reducidas con (NaBH ₄).	78
3.1.2 Nanopartículas de oro reducidas con extracto acuoso de <i>Camellia sinensis</i> .	85
3.2 Nanopartículas de plata (AgNp)	92
3.2.1 Nanopartículas de plata reducidas con (NaBH ₄).	92
3.2.2 Nanopartículas de plata reducidas con <i>Camellia sinensis</i> .	99
3.3. Toxicología	105
3.3.1 Evaluación toxicológica Aguda	105
3.3.1.1 Nanopartículas de Oro (Toxicidad aguda).	106
3.3.1.2 Nanopartículas de Plata (Toxicidad aguda).	111
3.3.2 Evaluación subaguda.	114
3.3.2.1 Nanopartículas de oro (AuNp).	114
3.3.2.1 Nanopartículas de plata (AgNp).	116
3.4 Histolocalización.	119
3.4.1 Histolocalización de nanopartículas de oro.	119
3.4.2 Histolocalización de nanopartículas de plata.	126
3.5 Histopatología.	132
3.5.1 Nanopartículas de oro.	132
3.6.2 Nanopartículas de plata.	136
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	140
BIBLIOGRAFÍA	143

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas	13
Tabla 2. Los polifenoles presentes en la <i>Camellia sinensis</i> ⁶⁷ expresado en gramos por cada 100g del extracto	14
Tabla 3. Rangos de toxicidad en estudios se relacionan con humanos	2
Tabla 4. DL ₅₀ de nanomateriales en protozoarios	27
Tabla 5. Condiciones de reacción para la síntesis por métodos químicos.	41
Tabla 6. Condiciones de reacción para la síntesis de nanopartículas (biológico).	43
Tabla 7. Dosis empleadas para la evaluación toxicológica aguda	47
Tabla 8. Dosis empleadas para la evaluación toxicológica subaguda.	48
Tabla 9. Listado de muestras a analizar en el Microscopio de Epifluorescencia e Histopatología.	52
Tabla 10. Resultados del plasmón para el sistema de AuNp con NaBH ₄ .	79
Tabla 11. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de oro AuBH.	83
Tabla 12. Resultados del plasmón para el sistema de AgNp con <i>Camellia sinensis</i>	86
Tabla 13. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de oro AuCS.	90
Tabla 14. Resultados del plasmón para el sistema de AgNp con NaBH ₄ .	93
Tabla 15. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de plata AgBH.	97
Tabla 16. Resultados del plasmón para el sistema de AuNp con <i>Camellia sinensis</i> .	100
Tabla 17. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de plata AgCs.	103
Tabla 18. Pesos relativos de la Etapa 1 y 2 para las nanopartículas de oro.	109
Tabla 19. Pesos relativos de la Etapa 1 y 2 para las nanopartículas de plata.	113
Tabla 20. Pesos relativos de órganos expuestos a nanopartículas de oro (Análisis Subagudo).	115
Tabla 21. Pesos relativos de órganos expuestos a nanopartículas de plata (Análisis Subagudo).	117

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales aplicaciones de las nanopartículas	3
Figura 2. Comparación de la estructura de la banda electrónica de un material metálico y un semiconductor	6
Figura 3. Descripción del desplazamiento de la nube electrónica de la nanopartícula por efecto del campo electromagnético	10
Figura 4. Estructura química de las principales catequinas presentes en la <i>Camellia sinensis</i>	14
Figura 5. Diagrama esquemático de los componentes más importantes de un espectrómetro de absorción electrónica UV-Vis	17
Figura 6. Interacción de la luz con la muestra para Dispersión de Luz Dinámica.	18
Figura 7. Esquema de un Microscopio Óptico Convencional (a) vs un Microscopio Electrónico de Transmisión (b)	21
Figura 8. Clasificación de las intoxicaciones	23
Figura 9. Mecanismos de toxicidad	31
Figura 10. Metodología general	40
Figura 11. Esquema para la preparación de sistemas de nanopartículas de Au y Ag con NaBH ₄ .	42
Figura 12. Esquema para la preparación de extracto de <i>Camellia sinensis</i> .	42
Figura 13. Esquema para la preparación de sistemas de nanopartículas de Au y Ag con extracto acuoso de <i>Camellia sinensis</i> .	44
Figura 14. Órganos extraídos de cada roedor durante los análisis de toxicología (muestra control).	49
Figura 15. Esquema general de la metodología de tinción Eosina- Hematoxilina.	54
Figura 16. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con NaBH ₄	80
Figura 17. Espectros de UV-Vis de todos los volúmenes AuBH	81

Figura 18. Micrografías de TEM de AuNp reducidas con NaBH ₄ . Histograma de frecuencia.	82
Figura 19. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AuNp sintetizadas con NaBH ₄ .	84
Figura 20. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con <i>C. sinensis</i> (1-4mL)	87
Figura 21. Espectros de UV-Vis de todos los volúmenes AuCs	88
Figura 22. Micrografías de TEM de AuNp reducidas con <i>C. sinensis</i> . Histograma de frecuencia	89
Figura 23. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AuNp sintetizadas con <i>Camellia sinensis</i> .	91
Figura 24. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con NaBH ₄ (1-4mL)	94
Figura 25. Espectros de UV-Vis de todos los volúmenes AgBH	95
Figura 26. Micrografías de TEM de AgNp reducidas con NaBH ₄ . Histograma de frecuencia	96
Figura 27. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AgNp sintetizadas con NaBH ₄	98
Figura 28. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con <i>C. sinensis</i> (1-4mL)	100
Figura 29. Espectros de UV-Vis de todos los volúmenes AgCs	101
Figura 30. Micrografías de TEM de AuNp reducidas con <i>C. sinensis</i> . Histograma de frecuencia	102
Figura 31. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AgNp sintetizadas con <i>Camellia sinensis</i> .	104
Figura 32. Pesos corporales de la Etapa 1 y 2 de los lotes administrados con AuNp	107
Figura 33. Fotografía de un roedor diseccionado, después de ser administrado con AuNp.	110
Figura 34. Pesos corporales de la Etapa 1 y 2 de los lotes administrados con AgNp	111

Figura 35. Pesos corporales del estudio subagudo de AuNp	114
Figura 36. Pesos corporales del estudio subagudo de AgNp	117
Figura 37. Comparativa de estómago (control vs AuBH).	118
Figura 38. Histolocalización de AuBH en hígado	121
Figura 39. Histolocalización de AuBH en riñón.	122
Figura 40. Histolocalización de AuCs en hígado	124
Figura 41. Histolocalización de AuCs en riñón.	125
Figura 42. Histolocalización de AgBH en hígado	127
Figura 43. Histolocalización de AgBH en riñón.	128
Figura 44. Histolocalización de AgCs en hígado	130
Figura 45. Histolocalización de AgCs en riñón.	131
Figura 46. Histopatología de hígado. Control (1a-b) y cortes de hígado administrado con AuBH (2a-b) y AuCs (3a-b), después del estudio subagudo.	133
Figura 47. Histopatología de riñón. Control (1a-b) y cortes de riñón administrado con AuBH (2a-b) y AuCs (3a-b), después del estudio subagudo.	135
Figura 48. Histopatología de hígado. Control (1a-b) y cortes de hígado administrado con AgBH (2a-b) y AgCs (3a-b), después del estudio subagudo.	137
Figura 49. Histopatología de riñón. Control (1a-b) y cortes de riñón administrado con AgBH (2a-b) y AgCs (3a-b), después del estudio subagudo.	139

ABREVIATURAS

Au	Oro
Ag	Plata
AuNp	Nanopartículas de oro
AgNp	Nanopartículas de plata
AuBH	Nanopartículas de oro reducidas con borohidruro de sodio
AuCS	Nanopartículas de oro reducidas con <i>Camellia sinensis</i>
AgBH	Nanopartículas de plata reducidas con borohidruro de sodio
AuCs	Nanopartículas de plata reducidas con <i>Camellia sinensis</i>
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
<i>C. sinensis</i>	<i>Camellia sinensis</i>
UV-Vis	Ultravioleta Visible
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
M	Metro
Nm	Nanómetro
0D	Cero dimensiones
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
SPR	Resonancia del plasmón superficial
A	Absorbancia
Λ	Longitud de onda
$\Gamma_{ext}(\lambda)$	Coefficiente de extinción
<i>F</i>	Número de partículas por unidad de volumen
<i>C_{abs}(λ)</i>	Coefficiente de absorción
<i>C_{sca}(λ)</i>	Coefficiente de dispersión
<i>R</i>	Radio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Ni	Níquel
Zn	Zinc
Pd	Paladio

Pb	Plomo
Pt	Platino
ZnS	Sulfuro de Zinc
CdS	Sulfuro de Cadmio
Fe	Hierro
T	Transmitancia
Cm	Centímetros
I_0	Intensidad de luz incidente
I	Intensidad de luz transmitida
\log_{10}	Logaritmo base 10
C	Concentración de la muestra
A	Coefficiente de absorción
ϵ	Absortividad molar
L	Camino del medio óptico
EELS	Espectroscopía de energía pérdida del electrón
SEM	Microscopía electrónica de barrido
R	Resolución
sen	Seno
N	Índice de refracción
A	Apertura angular
Pt	Potencialidad tóxica
DL	Dosis Letal
DL-50	Dosis letal que mata a la mitad de la población
DL-100	Dosis letal que mata a toda la población
Ag^{+1}	Ión plata
Na^{+}	Ión sodio
K^{+}	Ión potasio
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Ácido tetracloroáurico trihidratado
AgNO_3	Nitrato de plata
$\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$	Citrato de sodio
SSI	Solución salina isotónica
FAA	Formaldehido, alcohol etílico y ácido acético
GAA	Glicerol, alcohol etílico y agua
O.C.T.	Medio de inclusión para el criostato
VDA	Volumen diario de agua
IDA	Ingesta diaria de alimento

RESUMEN

En los últimos años se ha promovido la implementación de rutas de síntesis sustentables para la producción de nanomateriales, con finalidad de reducir la generación de residuos nocivos al medio ambiente, lo que ha llevado al diseño de rutas químicas, biológicas o físicas para alcanzar tal fin. Sin embargo, aún con las diversas aplicaciones biológicas o biomédicas en las que los nanomateriales se han visto inmersos, se conoce poco al respecto de su impacto negativo y toxicológico en seres vivos y su interacción celular.

Las nanopartículas metálicas presentan una amplia gama de aplicaciones, desde el punto de vista biológico, sintético y médico. Tales aplicaciones se deben a sus propiedades, que a su vez se ven influenciados tanto por su morfología, tamaño, reactividad, concentración como por las características del medio en las que se encuentran. Las posibles aplicaciones biomédicas de las nanopartículas metálicas (por ejemplo de oro o plata), demanda la evaluación de sus propiedades toxicológicas, debido a que estos sistemas de nanomateriales podrían presentar toxicidad específica, lo que conllevaría a una afectación notable para los organismos que las adquieran y/o almacenen.

Con base en lo anterior, la presente tesis tuvo el objetivo de investigar, por un lado, la comparación entre dos métodos de síntesis para la obtención de nanopartículas metálicas de oro (Au) o plata (Ag). El primer método utilizado fue una ruta química a partir del borohidruro de sodio (NaBH_4), mientras que el segundo fue una ruta biológica, utilizando extracto acuoso de *Camellia sinensis*. Tras la síntesis, se llevó al cabo un monitoreo por espectroscopía UV-Vis, con la intención de obtener información sobre sus propiedades ópticas, principalmente la posición del plasmón superficial asociado a cada sistema. La información relacionada con morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas, fue investigada por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Tras la caracterización, se realizaron los estudios toxicológicos (agudo y subagudo)

comparando de los sistemas más representativos durante la experimentación en un modelo *in vivo*; esto para evaluar si el tipo de nanopartículas, junto con el medio dispersante, presentan toxicidad específica. Finalmente se evaluaron las zonas más susceptibles a la deposición de nanopartículas (Au, Ag) en cortes histológicos de hígado y riñón, mediante el uso de Epifluorescencia e Histología animal.

ABSTRACT

In the past few years, there has been a growing interest in the implementation of sustainable synthesis for nanomaterial's production, with the objective of reducing the creation of residuals that are toxic for the environment. This has led to the design of chemical, biological and physical routes to obtain the desired results. Nonetheless, despite the variety of biological or biomedical applications in which nanomaterials have been used, little is known about their negative and toxic impact in living creatures and their cellular interaction.

From the biological, synthetical and medical point of view, metallic nanoparticles offer a large variety of applications. Such applications are due to their properties, which are influenced by their morphology, size, reactivity and concentration as well as by the environment's characteristics in which they are found. The possible biomedical applications of metallic nanoparticles, for example of gold or silver, demand the evaluation of their toxicological properties due to the fact that these nanomaterial's systems might present specific toxicity, which would lead to a severe infestation of the organism that acquires and/or hosts them.

Based on what has been previously stated, the objective of this thesis was to investigate the comparison between two synthesis methods for obtaining the metallic nanoparticles of gold (Au) or silver (Ag). The first method was a chemical path that used sodium borohydride (NaBH_4), while the second one was a biological path using *Camellia sinensis* extract, in aqueous state. After the synthesis, a spectroscopic UV-Vis monitoring was done, with the objective of obtaining information about their optical properties, mainly the superficial plasmon position associated to each system. The information obtained from the nanoparticles related to morphology and size was acquired through the use of Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). After characterization, the toxicological studies (acute and sub-acute) were carried out, comparing to the most representative systems during experimentation with an *in vivo* model; this with the purpose to

evaluate if the type of nanoparticle, plus the scattering environment, show a specific toxicity. Finally, the zones that were most susceptible to the deposition of nanoparticles (Au, Ag) were evaluated in histological sections of liver and kidney, using Epifluorescence and Animal Histology.

FUNDAMENTOS



JUSTIFICACIÓN

El reciente crecimiento y auge de la nanotecnología trae consigo la importancia de tener rutas sintéticas sustentables y amigables, con la finalidad de no generar residuos dañinos al medio ambiente; con la conciencia enfocada hacia investigaciones nobles sin ser perjudiciales, pero no conoce poco a cerca de la parte nociva de los nanomateriales metálicos y su interacción con los organismos o con el medio ambiente

Recordemos que nanopartículas metálicas presentan una amplia gama de aplicaciones; desde el punto de vista biológico o sintético, tales por sus propiedades físico-químicas; por lo que es importante evaluar su toxicológica, ya que relacionado a estas propiedades puede estar ligada alguna toxicidad específica, afectando notablemente a los organismos que las adquieren.

La presente tesis tiene por objetivo principal sintetizar, caracterizar y evaluar la toxicidad de nanopartículas metálicas, específicamente oro (Au) y plata (Ag) utilizando dos rutas de síntesis diferentes: química y biológica. Seguido de una específica caracterización. Y posteriormente la evaluación toxicológica en un modelo *in vivo*. Haciendo una comparación entre el tipo de metal y el medio en el que se encuentran inmersas.

Ⓢ HIPÓTESIS

El tamaño, la forma y el agente utilizado para estabilizar nanopartículas de Au y Ag, sintetizadas mediante procesos químicos o biológicos, determinarán sus propiedades toxicológicas evaluadas en un modelo *in vivo*.

Ⓢ OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar nanopartículas metálicas de Au y Ag mediante procesos de síntesis químicas o biológicas, para posteriormente evaluar su toxicidad aguda y subaguda en un modelo *in vivo*.

Ⓢ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar nanopartículas metálicas de Au y Ag a través de dos rutas de síntesis: química y biológica.

Caracterizar las nanopartículas obtenidas a través de Espectroscopia UV-Vis, Dispersión de Luz Dinámica y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Evaluar la toxicidad aguda y subaguda de las nanopartículas de Au y Ag, en un modelo *in vivo*.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



1.1 Nanotecnología y nanociencia

La nanotecnología es la ciencia de crear, diseñar, manipular y caracterizar materiales de tamaño nanométrico, posibilitando la construcción de máquinas en miniatura átomo por átomo, así como la aplicación de nanoestructuras, nanosistemas y nanodispositivos¹, con el afán de desarrollar nuevos y diferentes materiales que posean propiedades específicas^{2,3}. Desde su introducción por el científico Richard Feynman⁴, la nanotecnología ha crecido notablemente en las últimas décadas, debido a sus aplicaciones en Ciencia y Tecnología.

Como bien se sabe, los materiales en la escala de los nanómetros presentan características muy diferentes a los materiales en tamaño macroscópico, en otras palabras, las propiedades de las nanoestructuras presentan diferencias físico-químicas y eléctricas. Desde décadas anteriores, los nanomateriales han encontrado una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas, entre las cuales podemos mencionar medicina, biología, estudio de propiedades ópticas, magnéticas, catálisis y electrocatálisis, las cuales continúan creciendo debido a nuevas técnicas de síntesis y caracterización. Actualmente, la aplicación de los materiales nanométricos ha sido estudiada ampliamente en la industria química, en el diseño de fármacos inteligentes, radiofármacos o catálisis debido a la relación superficie-volumen⁵, entre otros. Por tal motivo, continua siendo de vital importancia el poder manejar y controlar sus características⁶ para así poder encaminarlas hacia cierto tipo de aplicaciones específicas.

Las principales aplicaciones de la nanotecnología se muestran en la **Figura 1**, de donde puede observarse que las nanopartículas han sido implementadas en productos para la industria electrónica, informática, textil, alimentaria, medicina. La nanotecnología tiene su aplicación en áreas como la calidad y seguridad alimentaria, así como en el desarrollo de nuevos alimentos y envasado



Figura 1. Principales aplicaciones de las nanopartículas ^(5,8,9).

Las propiedades propias de cada nanomaterial están fuertemente relacionadas con sus características de tamaño, forma y el ambiente que las rodea, esto va directamente relacionado con su respuesta óptica y eléctrica.

1.2 Tipo de Nanomateriales

1.2.1 Clasificación por sus dimensiones espaciales

La morfología por sus dimensiones espaciales de un nanomaterial son de suma importancia para sus posibles aplicaciones, de esta manera, para clasificar las nanopartículas se cuenta con tres grupos principales: la llanura de la partícula, su esfericidad y la relación entre su longitud y radio; las nanopartículas con una elevada relación de longitud y radio se convierten en nanotubos/nanoalambres, en el caso

contrario, cuando la relación entre dichas variables es baja se incluyen las esferas, óvalos, cubos, prismas, entre otros¹².

1.2.2 Clasificación por su tamaño

Existe una clasificación basada primordialmente en el aspecto del material y en cuántas dimensiones a la escala nanométrica presenta, por lo cual se dividen en¹²:

- Ⓢ **0D ó Cero dimensiones:** un nanomaterial cero dimensional se define como aquél en el que todas sus dimensiones lineales tienen el mismo orden de magnitud, el cual no excede los 100 nm (nanopartículas).
- Ⓢ **1D ó Unidimensionales:** Se refiere a aquellos materiales en los que se presenta una sola dimensión en la escala de los nanómetros. Estos materiales por lo general son finas capas, películas o recubrimientos superficiales; por ejemplo: nanoalambres y nanotubos.
- Ⓢ **2D ó Bidimensionales:** Como su nombre lo indica, este tipo de materiales tienen dos dimensiones en la escala nanométrica; incluyen películas delgadas firmemente unidas a un sustrato o filtros con nanoporos.
- Ⓢ **3D ó Tridimensionales:** Son aquellos materiales constituidos por unidades nanométricas, en todas sus direcciones, por lo cual pueden presentar un sin número de morfologías.

1.2.3 Clasificación por su composición

Los nanomateriales metálicos son una clase importante de materiales debido a sus singulares propiedades catalíticas⁸, ópticas⁵, magnéticas¹⁰ y eléctricas¹¹, entre otras; estas propiedades son consideradas como únicas debido; principalmente, a las diferencias que presenta la banda electrónica de un metal comparadas con la banda electrónica de un aislante⁹.

En este caso los nanomateriales se pueden clasificar en: metálicos, semiconductores, óxidos metálicos y nanocompositos¹³. Los *metálicos* presentan una amplia gama de propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas; como catalizadores, sensores específicos o fotoluminiscencia por efecto cuántico, debido a la estructura de la banda electrónica en donde ocurre una excitación y las diferencias que presenta con un semiconductor, o con un aislante.

Por otro lado, los *semiconductores* presentan propiedades (ópticas y eléctricas) en aplicaciones como biosensores para la detección oportuna de tumores. Debido a su estructura cristalina, a su banda y transiciones electrónicas, las cuales dependen de la estructura/ morfología del mismo. Por otra parte, los *óxidos metálicos* tienen aplicaciones en cosméticos (cremas solares) o combustibles debido a que algunos presentan una alta actividad catalítica; algunos son considerados como semiconductores, mientras que otros se comportan como aislantes. Por último, los *nanocompositos* se refieren a materiales que se constituyen de más de un tipo de material convencional, ya sea orgánico, inorgánico o biológico, o alguna otra mezcla de materiales con propiedades físicas y/o químicas diferentes¹³ pudiéndose aplicar por ejemplo de empaques flexibles de alimentos.

1.3 Nanopartículas metálicas

Las propiedades ópticas de los nanomateriales metálicos están relacionados directamente con la estructura de su banda electrónica (**Figura 2**), por ejemplo, el borde de la banda electrónica se ve más afectada por confinamiento cuántico que en un semiconductor o un aislante. Es decir los metales se ven menos afectados por el confinamiento espacial que los semiconductores en ese intervalo de tamaño¹⁴. Otra característica de los materiales nanométricos metálicos es el hecho de que sus propiedades ópticas son menos sensibles al efecto del tamaño y más sensibles a la forma, ya que las nanopartículas metálicas están determinadas por las propiedades colectivas de los electrones de su banda de conducción. Por otro

lado si comparamos un metal en bulto con una nanopartícula metálica podemos observar diferencias significativas en su reactividad química, estabilidad cinética y termodinámica, la interacción con el medio en el que se encuentran, cambios en la relajación electrónica y fonónica, todo esto influenciado de manera preponderante por la elevada relación superficie-volumen^{14,15}.

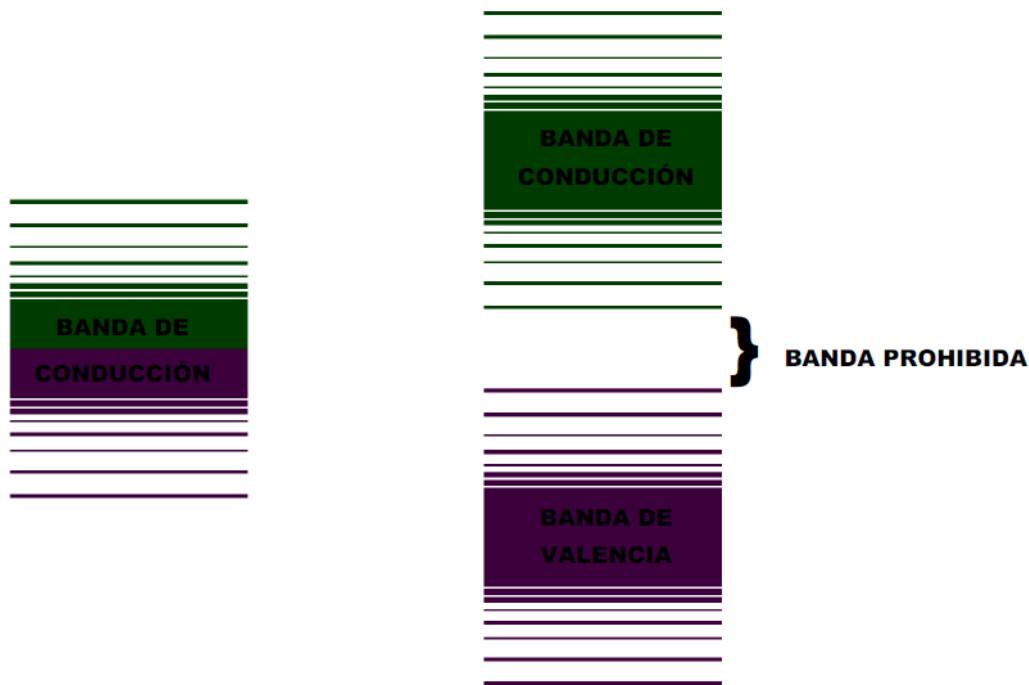


Figura 2. Comparación de la estructura de la banda electrónica de un nanomaterial metálico (izquierda) contra un nanomaterial semiconductor (derecha). El color morado representa los estados electrónicos ocupados y el verde, los estados electrónicos vacíos ¹³.

Los nanomateriales metálicos, por lo general, presentan una fuerte absorción de luz, pero una débil fotoemisión o luminiscencia, esto ocurre por un fenómeno de foto-excitación en la banda o bandas de similar energía electrónica; esto conlleva a que la fotoluminiscencia en metales sea siempre más débil en comparación con semiconductores o aislantes¹⁵. Esta propiedad de fotoluminiscencia es de suma importancia, debido a que conlleva a las aplicaciones en el área de nanomedicina como biosensores o biomarcadores, o bien para el desarrollo de biomoléculas inteligentes, sobre todo para nanopartículas de oro y plata; que al ser mezcladas

con compuestos orgánicos o enzimas, generando una focalización de células malignas. Estos beneficios se ven influenciados por el plasmón superficial característico, resultado de la unión e interacción de las inductancias entre el metal y el medio que lo rodea ¹⁶.

1.3.1 Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

La resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) o simplemente plasmon superficial, es un fenómeno causado por la oscilación coherente colectiva de los electrones de la banda de conducción como respuesta a un campo electromagnético externo ¹⁷.

En un experimento típico, en el que se analiza una muestra compuesta de nanopartículas dispersas en una matriz homogénea, la absorbancia está dada por A

$$A(\lambda) = \log_{10} \left(e^{\Gamma_{ext}(\lambda)D} \right)$$

donde, D es la longitud del camino óptico y $\Gamma_{ext}(\lambda)$ es el coeficiente de extinción, el cual es dado por la suma de la dispersión y la absorción de la onda electromagnética que atraviesa la muestra ¹³.

Existen casos en los que la interacción entre nanopartículas en un sistema es tan débil que puede ser ignorada, por lo que el coeficiente de extinción se calcula de la siguiente manera ¹⁷:

$$\Gamma_{ext}(\lambda) = f[C_{abs}(\lambda) + C_{sca}(\lambda)]$$

donde f es el número de partículas por unidad de volumen, $C_{abs}(\lambda)$ es el coeficiente de absorción y $C_{sca}(\lambda)$ coeficiente de extinción.

Cabe destacar que en el análisis de la respuesta óptica, en base a la teoría clásica electromagnética donde se considera que las nanopartículas son demasiado grandes para emplear la teoría clásica electromagnética, sin embargo son demasiado pequeñas para depender de su forma o su tamaño, por lo tanto, cada punto de la nanopartícula puede ser descrito en términos de una función dieléctrica macroscópica, tomando en cuenta para ello, la longitud de onda de la luz incidente (λ) y, en algunos casos, del radio (R) de la nanopartícula.

Es importante señalar el trabajo de Gustav Mie, quien estudió la radiación electromagnética dispersada por una esfera de radio arbitrario, homogénea, isotrópica y cuya respuesta óptica es lineal. La radiación incidente la supuso como una onda plana de longitud de onda arbitraria ¹⁸. En la teoría de Mie⁸, los vectores de los campos eléctrico y magnético están dados por la relación (R/λ). Para este caso se puede asumir que la absorción y la dispersión de la radiación electromagnética incidiendo en la nanopartícula, se encuentran en función de contribuciones multipolares de las cargas presentes ¹⁹. Si el tamaño de la partícula es menor que la longitud de onda de la radiación incidente, la nanopartícula experimenta un campo que es espacialmente constante, pero con una fase que depende del tiempo, lo que se conoce como límite quasi-estático; en este punto, se presenta un desplazamiento homogéneo de cargas en la esfera, dando lugar a una distribución de cargas en la superficie. Cuando la partícula presenta un tamaño grande, existe mayor distribución multipolar de cargas; en este caso, la partícula únicamente absorbe energía por la excitación del plasmón superficial^{16,20}.

El plasmón superficial^{16,20,21} se debe a la longitud de onda incidente, resultando una dispersión fuerte de esa longitud de onda; la frecuencia e intensidad de las bandas de absorción del plasmón las cuales ayudan a determinar las características del material. Las ondas electromagnéticas superficiales suelen propagarse en la interface de los materiales, provocando así dichas ²²⁻²⁴. El campo eléctrico de los fotones induce una polarización de los electrones de conducción con respecto a los cationes de la nanopartícula metálica, de esta manera se crea una diferencia de

carga neta en la superficie, que proporciona información sobre el grado de agregación del cúmulo, así como de la forma y el tamaño de las nanopartículas²⁵.

En el caso de la plata Ag presenta un plasmón superficial a una longitud de onda de 400 nm^{17-18,25-29}, mientras que para el Au esta 520 nm^{17-18,25-30}, sin embargo esta longitud de onda puede desplazarse hacia la derecha o izquierda del espectro electromagnético, dependiendo del tamaño, forma y medio en el que la nanopartículas se encuentren dispersas, principalmente. Si el tamaño de la partícula es comparable o más pequeño que el camino libre medio de los electrones de la banda de conducción, las colisiones coherentes de dichos electrones con la superficie de la partícula disminuye en comparación con el del mismo metal en tamaño macroscópico dando como resultado un corrimiento de la banda de plasmón superficial a longitudes de onda menores; dicho desplazamiento se conoce como “corrimiento al azul”.

Si el tamaño de la partícula es pequeña comparada con la longitud de onda de incidencia ($a \ll \lambda$), el desplazamiento es homogéneo, siempre y cuando sea esférica, resultando una distribución dipolar (**Figura 3**). Sin embargo cuando la esfera es mayor que la longitud de onda de incidencia; ocurre un desplazamiento de electrones con respecto al núcleo, ya no es homogénea, dando como resultado una distribución de carga en la superficie volviéndose multipolar¹⁷⁻¹⁸ (varias bandas).

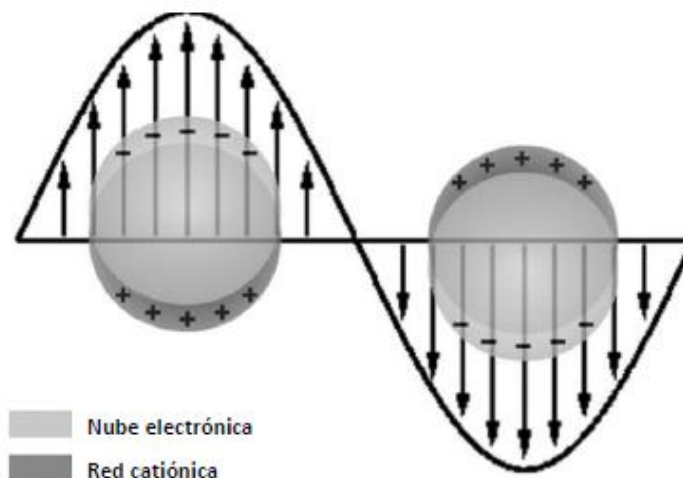


Figura 3. Descripción del desplazamiento de la nube electrónica de la nanopartícula por efecto del campo electromagnético.¹⁸

1.4 Métodos de síntesis de las nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas, en general, se puede dividir en dos grandes grupos: “top-down” y “bottom-up”. En el primer grupo, principalmente se emplean métodos de micro fabricación a partir de un material más grande. Dentro de este grupo se encuentran, por un lado, litográficas como, particularmente el empleo de un haz de electrones o luz láser; por otro lado, se destacan técnicas mecánicas como el molido seco o bien en solución, entre otras ³¹⁻³³. En el segundo grupo, la síntesis “bottom-up” aprovecha las características químicas de los materiales para generar un ensamble de átomos o moléculas del mismo y de ese modo la formación de una nanopartícula, los ejemplos más destacados son la síntesis química, deposición química de vapor, ensamblaje inducido por láser, agregación coloidal, deposición y crecimiento en película, solo por mencionar algunos ³⁴⁻³⁶.

Dada la creciente demanda de nanomateriales, diversas rutas químicas, físicas y biológicas han sido implementadas para ello. De manera muy general, los métodos químicos son los más utilizados para la síntesis de nanopartículas, ya sean

metálicas, semiconductores o aislantes, presenta dos etapas importantes, la primera es la nucleación, en donde existe una unión entre los núcleos del material de interés para después dar lugar a la segunda etapa, el crecimiento de la nanopartícula³⁷. Estas dos etapas vienen determinadas por una variable que es tiempo, ya que si el tiempo de nucleación es menor al tiempo de crecimiento, se forman nanopartículas uniformes, sin embargo, si los tiempos se invirtieran, dan como resultado la obtención de nanopartículas de formas diversas. Este tipo de metodologías de síntesis presentan algunos inconvenientes por ejemplo, la obtención de productos contaminados y, en algunas ocasiones, poca selectividad -y distribución de tamaño; aunque también presentan aspectos de versatilidad, por ejemplo, se pueden llegar a obtener materiales complejos a partir de sistemas simples³⁸.

Con respecto a los métodos físicos de síntesis, aun se tienen ciertas dificultades hoy en día, debido a su alto costo y poca versatilidad para poder obtener ciertas morfologías o tamaños específicos en los sistemas de nanopartículas. Lo más ocurrenciente es hacer uso de la metodología “up-down”, ya que muchas de las metodologías se refieren a un debastamiento del material; aunque muchas veces suelen ocurrir aglomeraciones formando precipitados, impidiendo una monodispersidad de las nanopartículas, afectando así el tamaño de la nanopartícula y por consiguiente las propiedades de la misma ³⁹. Este tipo de reacciones emplea una cantidad mínima de reactivos e incluso muchas veces solo se ocupa el disolvente puro, lo que puede llegar a ser perjudicial para el producto final, ya que muchas veces se obtienen sistemas con trazas de solventes⁴⁰.

En lo que a los métodos biológicos se refiere, algunas de las ventajas que ofrecen, con respecto a las dos rutas anteriores son, entre otras, la ausencia de reactivos químicos nocivos y causantes de contaminación en los productos finales, lo que coadyuva la creciente demanda social y científica de generar materiales con el mínimo riesgo para el medio ambiente. Entre algunas de las rutas biológicas, destacan las llamadas biosíntesis, que son métodos más económicos y amigables

con el ambiente. Para usos prácticos estos métodos biológicos se pueden clasificar en tres grupos con base en la naturaleza del agente reductor; en algunos casos se emplean organismos vivos como bacterias ⁴¹, hongos ^{42, 43} y plantas *in vivo* o biomasa ⁴⁴.

En los últimos años se ha profundizado acerca del desarrollo de nuevas rutas sintéticas para la obtención de nanomateriales, particularmente para nanomateriales metálicos, debido a sus múltiples características ^{26,27}, influenciadas, como ya se ha mencionado, por su tamaño, forma y el ambiente que las rodea⁹. La síntesis de nanopartículas metálicas mediante biosíntesis, han sido: Co, Cu, Ni, Zn, Au, Ag; aunque cabe mencionar que existen diferencias entre la fuente reductora para obtener un resultado diferente en las concentraciones finales del sistema ³⁶.

Cabe destacar que para la biosíntesis con plantas *in vivo* o biomasa, se ha encontrado que la razón por la cual se tiene una reducción metálica y un sistema estabilizado al mismo tiempo, es por la presencia tan grande de polifenoles dentro de sus componentes, las que se resaltan son las catequinas, que son un grupo de bioflavonoides con la alta capacidad redox y generación de radicales libres, lo que favorece la reducción del metal ⁴⁵. Es por eso que una de las alternativas que se maneja en este trabajo es el uso del extracto acuoso de *Camellia sinensis*³⁰.

Ahora bien, en **Tabla 1** se presenta un condensado de algunos métodos sintéticos; químicos, físicos o biológicos, para diferentes metales así como la diversificación de tamaños y morfologías, dando un panorama acerca del gran crecimiento de rutas sintéticas.

Tabla 1. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas

Tipo	Método	Estabilizante	Metal	Tamaño	Forma
Físico	Ablación láser	Tioles	Au	15nm	Esférica ⁴⁶
	Sonoquímica	/	Au-Ag/Pd	30nm	Core-Shell ⁴⁷
	Termólisis	Calor	Au	3.4-9.7nm	Esférica ⁴⁸
	Fotoquímica	Poli(vinil pirrolidona)	Ag	5-10nm	Decahedrica ⁴⁹
Químico		PMMA	Au	60-200nm	Esférica ⁵⁰
	Radiación UV	/	Cu	50nm	Ovalada ⁵¹
	Borohiduro de sodio	(p-βCD)	Au	5-6nm	Esférica ⁵²
	Ciclohexano-Agua	Hidrazina	Ag	3-5nm	Cuasi-esfera ³⁶
	Electrocatalisis	/	Au	5-6nm	Nanolaminas ⁵³
Biológico (microorganismos)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	/	Ag	100-200nm	Polihedrica ⁵⁴
	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	/	Au	10-20nm	Esférica ⁵⁵
	<i>Bacillus subtilis</i>	/	Au	10-50nm	Esférica ⁵⁶
	<i>Morganella psychrotolerans</i>	/	Ag	30-40nm	57
	<i>B. casei</i>	/	Ag, Au	10-50nm	Amorfos ⁵⁸
	<i>Nostoc muscorum</i>	/	CdS	5-20nm	59
Biológico (plantas)	<i>Lemongrass(Cymbopogon flexuosus)</i>	/	Au	120nm	Triángulos ³⁹
	<i>Aloe vera</i>	/	Ag		Esférica ²⁸
	<i>Cassia auriculata</i>	/	Au	15-25nm	Amorfos ⁶⁰
	<i>Sorghum bran</i>	/	Ag, Fe	10nm	Esférica ⁶¹
	<i>Chenopodium album</i>	/	Ag, Au	10-30nm	Ovalo ⁶²
	<i>Hibiscus Rosa Sinensis</i>	/	Au, Ag	14nm	Triángulos ⁶³
	<i>Azadirachta indica</i>	/	Au-Ag	15-20nm	Core-Shell ⁶⁴

1.4.1 *Camellia sinensis* (Té verde)

Los componentes de la *Camellia sinensis* (Té verde), son una familia de polifenoles y flavonoides (50%), que poseen una poderosa actividad antioxidante. Los taninos, son grandes cadenas moleculares de polifenoles, confiriéndole al té verde sus propiedades reductoras, junto con las catequinas que comprenden casi el 90%^{65, 66} (**Tabla 2**) generando así radicales libres auxiliares a la reducción. Las catequinas

En la **Figura 4** se encuentra la estructura de (-)-Epicatequina y (+)-Catequina (polifenoles) presentes en la *Camellia sinensis*, como se puede ver, al tener estructuralmente grupos hidroxilo, generan una gran cantidad de electrones libres capaces de realizar la reducción de los metales.

1.5 Técnicas de caracterización

La caracterización de nanopartículas se basa en la identificación y determinación del tamaño de la nanopartícula sobre sus propiedades, mecánicas, ópticas, eléctricas, entre otras. Para el caso del proyecto las propiedades ópticas son las de mayor importancia, de allí que las técnicas espectroscópicas sean las que se utilizan con mayor frecuencia¹³, debido a fenómenos de absorción, dispersión o emisión de luz. Algunas de las técnicas de análisis son: Espectroscopia UV-Vis, fotoluminiscencia, absorción del Infrarrojo, Dispersión de Luz Dinámica, Raman, entre otras. Pero para efectos del trabajo solo se utilizaron dos de estas técnicas, que fue UV-Vis y Dispersión de luz Dinámica^{25,69}.

1.5.1 Espectroscopia de absorción electrónica UV-Vis

La espectroscopia de absorción electrónica está basada en cálculo de la transmitancia T o absorbancia A de luz durante las transiciones electrónicas de una muestra, que cuando es una disolución, se ocupan celdas transparentes que permiten el paso de la luz para los análisis en el ultravioleta-visible, las cuales tienen un camino medio óptico l cm. Esta técnica analítica se denomina UV-Vis debido a que la longitud de onda de la luz requerida para transiciones electrónicas, se debe encontrar en la región UV- Visible del espectro electromagnético; dicha región se encuentra aproximadamente de los 180 a los 780 nm⁷⁰.

Este cálculo se basa en la ley de Beer, la concentración c de un analito se relaciona con la intensidad de la luz incidente I_0 y la intensidad de la luz transmitida I lo cual se representa en la siguiente ecuación:

$$A = -\log_{10}T = \log \frac{I_0}{I}$$

Esta ecuación es una representación de la ley de Beer, donde: I_0 se refiere a la radiación incidente e I es la radiación o haz emergente ⁸⁰. Asimismo, otra manera de expresar la ley de Beer es a través de la relación de las intensidades (I_0 , I), así como de la concentración de la muestra c , el camino medio óptico ℓ , el coeficiente de absorción α y la absortividad molar ε , dicha relación se muestra en la ecuación:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \ell c = \alpha c$$

La Espectroscopia UV-Vis mide la absorción de luz de una muestra (**Figura 5**), la radiación proviene de una fuente de luz, generalmente es una lámpara que puede ser de deuterio e hidrógeno, filamento de wolframio o un arco de xenón; posteriormente, se encuentra el monocromador o filtro para la selección de una longitud de onda específica, después se coloca la muestra en una celda de cuarzo y, finalmente llega la señal emitida al detector, en donde el software hace el cálculo y determina la cantidad de luz transmitida en función de la longitud de onda, resultando entonces el espectro de la absorción de la muestra⁷¹.

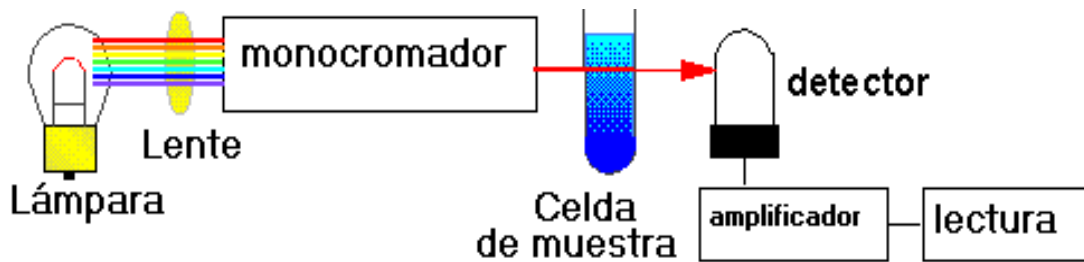


Figura 5. Diagrama esquemático de los componentes más importantes de un espectrómetro de absorción electrónica UV-Vis ⁷¹.

Esta técnica sirve para monitorear la formación de las nanopartículas metálicas, en intervalos de tiempo; la intensidad de plasmón superficial se modifica en relación al número de nanopartículas presentes en la solución respecto al tiempo, dando como resultado un pico de absorción a cierta longitud de onda ^{16,20,21}; por ejemplo en un intervalo de 520 nm a 560 nm ^{17-18,25-30} surge el plasmón de nanopartículas de Au; mientras que para Ag se encuentra entre 395 nm y 420 nm ^{17-18,25-29}. La banda de absorbancia es tan fuerte debido al acoplamiento de los electrones del material con las ondas electromagnéticas incidentes resultan en un plasmón característico para cada metal ⁷²; esta respuesta proporciona información de la composición de las nanopartículas, tamaño y concentración ⁷³.

1.5.2 Dispersión de luz Dinámica (DLS).

La dispersión (o difusión) de la luz dinámica es el fenómeno, mediante el cual la radiación electromagnética al chocar con pequeñas partículas de tipo coloidal o molecular, es desviada con un ángulo a una dirección de propagación, cada una de las partículas se dispersan con cierto índice de refracción (ángulo) diferente al del medio que los rodea. La medida de la luz dispersada (o difusa) da lugar a técnicas muy útiles en la determinación de la concentración de sustancias en suspensión, así como en la caracterización de la forma y del tamaño de las partículas coloidales, macromoleculares y nanométricas. Cualquier medio sólido, líquido o gaseoso es capaz de dispersar luz en mayor o menor grado; este fenómeno se conoce como efecto Tyndall, descrito por primera vez por John Tyndall en 1854, sin embargo fue

Rayleigh en 1871 fue quien propuso el primer modelo físico que interpreta de forma notable el fenómeno de dispersión en sistemas diluidos.

La dispersión de luz Rayleigh se utiliza principalmente en suspensiones muy diluidas, para determinar de manera global la concentración o el tamaño de las partículas suspendidas en la solución, dando también información de la estabilidad de las dispersiones ⁷⁴. Dispersión de luz dinámica es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios y partículas de tamaño submicrométrico. Básicamente, el equipo consta de: 1) una fuente de luz láser monocromática incide sobre la una solución muy diluida; 2) un fotómetro posicionado a cierto ángulo de detección, medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, que colecta la luz dispersada por las partículas; y 3) un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener de primer orden la intensidad de luz dispersada a cada ángulo (**Figura 6**). Los datos se obtienen por inversión numérica del modelo matemático que describe el fenómeno de dispersión de luz ⁷⁵.

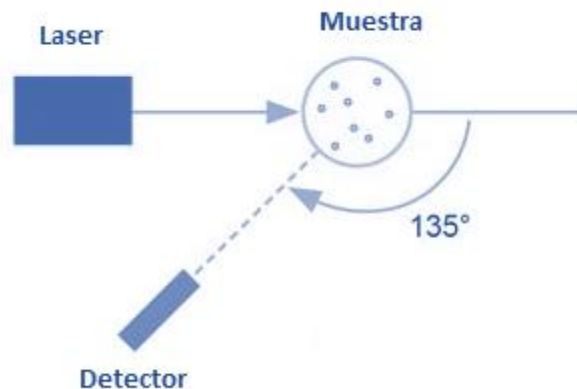


Figura 6. Interacción de la luz con la muestra para Dispersión de Luz Dinámica.

Es importante destacar que se trata de una técnica global, puesto que proporciona información valiosa de la dispersión total de los sistemas de nanopartículas ⁷⁶, proporcionando información del promedio general del tamaño en el sistema nanométrico.

1.5.3 Microscopia Electrónica

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) es una herramienta muy útil para la elucidación de nanoestructuras; dentro de la técnica se tiene una aceleración de voltaje, esto trae como consecuencia que la resolución de la imagen aumente, debido a que disminuye la longitud de onda del electrón difractado aumentando la penetración de las muestras ⁷⁷. Las mediciones de TEM permiten caracterizar los nanomateriales de una forma diferente a la espectroscopia UV-Vis o a otras técnicas basadas en propiedades ópticas ya que nos permite observar dos características fundamentales del material nanométrico como son la forma y el tamaño de manera puntual; otra característica importante que podemos observar con TEM son la rugosidad y la cristalinidad de los materiales; de manera general se determina la morfológica y estructura de las nanopartículas ⁷⁸.

Esta técnica se basa en la incidencia de haces electrónicos que bombardean el material, la longitud de onda de estos electrones es menor a la de la luz, confiriéndole así un aumento en su resolución. Los electrones se dispersan por la muestra atravesando una pequeña sección de esta, provocando así la aparición de la imagen, es la técnica más apropiada para detectar morfologías de sistemas a nivel nanométrico (**Figura 7**).

Permite extender la resolución para estudios morfológicos debido a la diferente magnitud entre la longitud de onda de la luz visible y el intervalo requerido para dimensionar los planos en cualquier estructura cristalina, la cual se encuentra entre 0.3 μm y hasta 0.15 nm⁷⁹. Entre las diversas técnicas que implica la microscopia electrónica empleadas para caracterizar los nanomateriales, tenemos la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés), Espectroscopía de Pérdida de Energía de Electrones (EELS por sus siglas en inglés), entre otras.

Conforme ha avanzado la ciencia han evolucionado las herramientas empleadas en diseño, síntesis y caracterización de materiales. La microscopia comenzó con el microscopio óptico, sin embargo este tiene una baja resolución comparada con las

dimensiones nanométricas que deseamos analizar. La resolución (r) se define cuantitativamente como la distancia mínima entre dos objetos para que éstos puedan distinguirse como objetos separados y está dada por ⁸⁰:

$$r = \frac{0.61\lambda}{n \operatorname{sen} \alpha}$$

En donde λ es la longitud de onda de la radiación utilizada, n es el índice de refracción del medio existente entre la muestra y la lente objetivo, y α es la apertura angular del objetivo; es una medida del poder de concentración de la radiación que posee el sistema de lentes, por lo que la resolución depende de la longitud de onda ya que los objetos deben ser de un tamaño similar a la longitud de onda para alterar las ondas lo suficiente como para proporcionar información. Nuestros ojos pueden distinguir imágenes con una separación de 0.3-0.6 mm y los mejores microscopios ópticos poseen una capacidad de aumento máxima de alrededor de 1000-2000 (ampliando 0.3 m 2000 veces se obtiene 0.6 mm)⁸⁰.

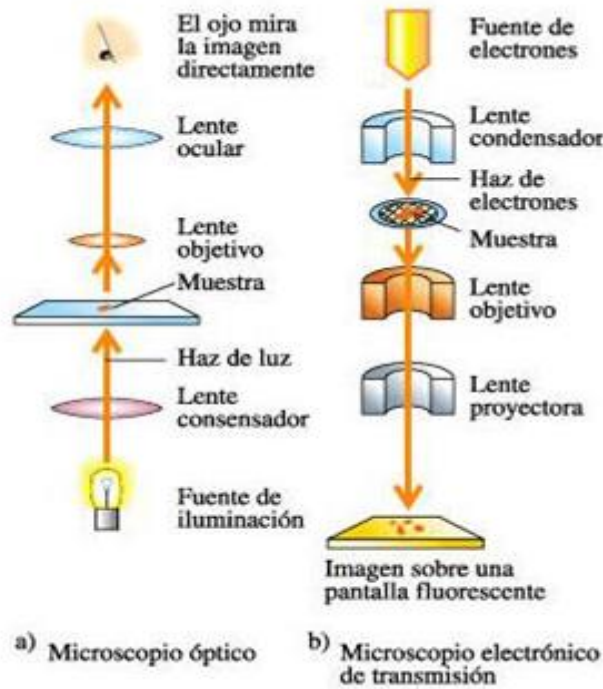


Figura 7. Esquema de un Microscopio Óptico Convencional (a) vs un Microscopio Electrónico de Transmisión (b)⁸⁰.

La **Figura 7** muestra los componentes generales de un microscopio óptico (a) y un microscopio de transmisión (b) y la manera en la que se encuentran posicionadas las muestras y las fuentes, que finalmente son las que más importan al momento de realizar la elucidación de la muestra, La imagen formada por el enfoque de los electrones usando lentes electromagnéticas difiere de manera significativa de la imagen formada por enfoque de luz usando una lente de vidrio. En primer lugar, la imagen sufre una rotación, debido al ajuste de la corriente de las lentes, además dos imágenes de un mismo objeto pero con diferentes magnificaciones, también rotan una con respecto a la otra. Esta rotación puede ser compensada, sin embargo, aun cuando se emplean las lentes compensadoras, los electrones no están confinados a viajar en un mismo plano, lo cual es diferente al comportamiento que presenta la luz. Finalmente, el ángulo formado entre la trayectoria del electrón y el eje óptico es muy pequeño ($<1^\circ$), por lo cual la longitud de la trayectoria del electrón en el campo magnético es mucho mayor que la dispersión del haz ^{79,81}.

1.6 Toxicología

1.6.1 Definición

Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad. Existen productos *exógenos* que causan este daño llamados *xenobióticos*, aunque cabe señalar que no hay compuestos *atóxicos* más bien dependen de la dosis que se administre; de todo lo anterior se puede expresar que la toxicología es la ciencia que estudia las sustancias químicas y agentes físicos que pueden producir alteraciones patológicas a los seres vivos; al mismo tiempo estudia los mecanismos de dichas alteraciones y los medios para contrarrestarlas; así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar su grado de toxicidad^{82,83}.

1.6.2 Tipos de Intoxicación

La acción de una agente tóxico sobre un organismo es básicamente la alteración fisiológica, dando como una intoxicación; esta puede ser clasificada en leve, moderada o severa; desde un punto de vista cronológico, clasificándose en agudas, crónicas o recidivantes (**Figura 8**).

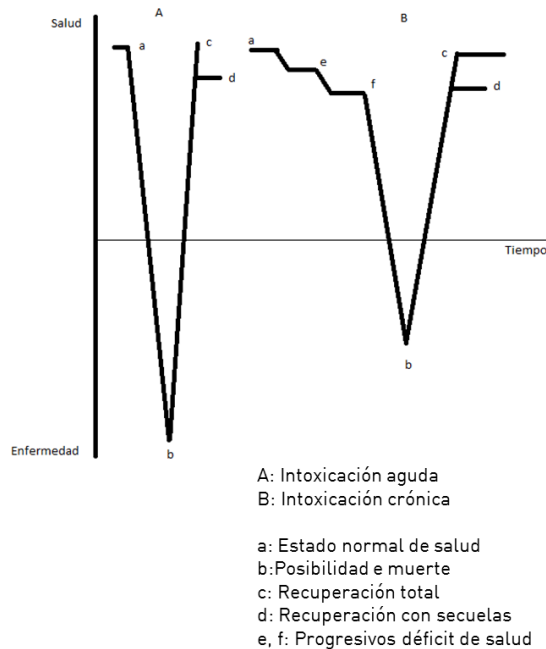


Figura 8. Clasificación de las intoxicaciones ⁽⁸³⁾

- 🕒 **Intoxicación aguda:** aparición de un cuadro patológico severo e incluso dramático tras la absorción de un *xenobiótico*, es notable la aparición de estos fenómenos antes de las 24 horas después de la administración. La evolución de la intoxicación puede llevar a la muerte del organismo o con ciertas secuelas persistentes.
- 🕒 **Intoxicación subaguda:** es de menor gravedad o aparatosidad, ya que muchas veces sigue su curso por un tiempo sin que se presente de forma aparente; es también aplicable para intoxicaciones de corta duración, produciendo su efecto nocivo en un periodo de días.
- 🕒 **Intoxicación crónica:** la absorción se produce en cantidades muy bajas para hacer efectos nocivos en un periodo de tiempo ya sea largo o corto; pero si provocando una acumulación del producto dentro del organismo sobre todo

en órganos concretos; muchas veces se mantienen latentes hasta que por cualquier causa se manifiestan.

Las intoxicaciones pueden ser provocadas por el manejo y/o consumo poniendo en riesgo la salud, algunas generalidades por las que se pudiera dar una intoxicación son:

- Ⓢ Las características físico-químicas de las sustancias
- Ⓢ Su potencialidad tóxica (pT) o toxicidad intrínseca que es todo lo contrario a las cantidades exactas para provocar un daño; es mayor cuanto menor sea la dosis precisa para producir dicho efecto nocivo
- Ⓢ La probabilidad de que sea absorbida y la frecuencia; de estos dos aspectos se determina el riesgo de que produzca un efecto tóxico

1.6.3 Nanotoxicología

Debido a la proliferación en la fabricación de nuevos y mejores nanomateriales, se busca la promoción de nanotecnologías sustentables con la finalidad de reducir y regular la generación de residuos nocivos al medio ambiente; sin embargo, se conoce poco del impacto negativo de los nanomateriales en los seres vivos⁸⁵.

Estos materiales nanométricos se han utilizado en el ámbito médico, en microelectrónica, materias textiles y/o cosméticos; para esto se deben de estudiar sus características fisicoquímicas y su toxicidad ⁸⁶ sobre todo si están en contacto directo con algún organismo. Un gran número de metales de tamaño macroscópico no son tóxicos ni llegan a ser dañinos para la salud, no obstante si el tamaño de estos se va disminuyendo estos empiezan a causar daños mayores en los organismos que los poseen ⁸⁷ o que están en contacto con ellos. Muchos estudios solo se han enfocado en la parte de citotoxicidad dejando de lado la ecotoxicidad (ecosistemas) y la toxicidad en general de los materiales. La citotoxicidad está

asociada con la exposición de la nanopartícula en sistemas controlados (*in vitro*); los efectos adversos dependen específicamente del tamaño y forma de la nanopartícula; estudios señalan que cuanto menor es el tamaño de la nanopartícula la citotoxicidad aumenta, debido al incremento de la superficie de contacto ^{88,89}.

En diversos análisis se determina la biocompatibilidad de nanopartículas metálicas: estas pueden llegar a reaccionar con los componentes biológicos al momento de unirse de manera covalente a las macromoléculas, afectando drásticamente las funciones celulares sistemáticas y por consiguiente a todo el organismo ⁹⁰.

Se ha determinado que la toxicidad de las nanopartículas depende no solo de la forma y tamaño; sino que también están asociadas con la distribución y aglomeración, de las propiedades fisicoquímicas (composición, fase cristalina y solubilidad). Los aspectos anteriores tienen un efecto de absorción desde el portal de entrada hacia los órganos blancos (*diana*); teniendo la propiedad de enlace con proteínas, y acumulación dentro del organismo; provocando una toxicidad en las células⁴¹, llegando incluso a la *necrosis* (muerte celular)⁹². Tales propiedades incluyen una reactividad elevada debido a su gran superficie de contacto y volumen, provocando una preocupante alteración a nivel celular asociada a la toxicidad del xenobiótico ⁹⁴. Uno de los temas toxicológicos más importantes de las nanopartículas es que se relacionan con reacciones oxido-reducción (redox), así como el transporte de estos materiales hacia las membranas celulares, en especial hacia la mitocondria. Estudios revelan que las nanopartículas inducen el estrés oxidativo en modelos de peces, así como una inflamación del área intestinal y granulomas epiteliales ⁸⁷.

1.6.4 Dosis Letal 50.

La **Dosis Letal (DL)** se calcula por experimentación con un grupo de animales en medios ambientales controlados administrándoles de manera deliberada algún xenobiotico para obtener valores estadísticos significativos; la DL_{50}^{84} es la dosis que mata al 50% de la población analizada. Aunque también se pudiera determinar la Dosis mínima letal, que se refiere a la dosis que mata a un miembro de la población analizada. Mientras los estudios para la determinación de una toxicidad mayor es la DL-100 que es la dosis que mata a toda la población de animales involucrados en el estudio.

Debido a que no se pueden hacer estudios con humanos, se toman a consideración datos relevantes de estudios realizados con animales, haciendo una extrapolación de *dosis-efecto*; esta relación varia en estudios con animales y con resultados con humanos, ya que en animales se tienen razas puras y con esterilidad controlada, asegurándose su perfecta salud; lo cual no se puede controlar con humanos. Existe una clasificación de las sustancias en base a su toxicidad aguda DL_{50}^{84} . En la **Tabla 3** se presentan los rangos de toxicidad en relación a las vías de administración, y como se hace la comparativa respecto a las dosis que pudieran ejercer un efecto dañino hacia un ser humano. Todas las dosis son expresadas en mg/kg peso.

Tabla 3. Rangos de toxicidad en estudios se relacionan con humanos⁽⁸²⁾

Rango de toxicidad	Denominación usual	Vía oral DL50 (rata)	Vía cutánea DL50 (ratón)	Posible dosis letal en hombre
1	Extremadamente tóxico	< 1mg/kg	<5mg/kg	1 gota, 1 grano
2	Altamente tóxico	1-50mg/kg	5-50mg/kg	1 cucharadita (4mL)
3	Moderadamente tóxico	50-500mg/kg	50-350mg/kg	30g
4	Ligeramente tóxico	0.5-5g/kg	0.35-3g/kg	250g
5	Prácticamente no tóxico	5-15g/kg	3-25g/kg	1 litro
6	Relativamente inocuo	>25g/kg	>25g/kg	>1

En la **Tabla 4** se presentan los resultados toxicológicos de nanopartículas de ZnO y CuO en protozoarios en donde se demuestra su efecto tóxico sobre los organismos demostrando que a mayor solubilidad del CuO mayor es el efecto negativo en comparación con el efecto de ZnO¹¹¹.

Tabla 4. DL₅₀ de nanomateriales en protozoarios⁽⁸²⁾

Nanomaterial	Tamaño	DL ₅₀ (mg/ml)
CeO ₂	6.5	0.012
TiO ₂	7.5	0.016
Fe ₃ O ₄	6	2.3*10 ⁻⁴
Br ₂	20	56-66
ZnO	50- 70	4.3
CuO	20	127

1.6.5 Clasificación general de los tóxicos

Las sustancias tóxicas se pueden clasificar, para facilitar su estudio:

- Ⓢ Por su naturaleza: estructura química y estado físico
- Ⓢ Usos y aplicaciones: medicamentos, productos industriales, productos domésticos, agrícolas o contaminantes en general
- Ⓢ Acción fisiopatológica: lugar de acción o efectos
- Ⓢ Mecanismos de acción: celular o subcelular
- Ⓢ Métodos de análisis y determinación

Los tóxicos tienen procesos de tránsito por el organismo capaces de originar intoxicaciones sistémicas, estos procesos son: *absorción*, *distribución*, *acumulación* y *excreción*, en los cuales la molécula tóxica experimenta procesos de biotransformación, llamada **Toxicocinética** mientras que a la acción tóxica generada se llama **Toxicodinámica**^{82.83}. Los procesos mencionados se describen a continuación:

- Ⓢ Absorción: consiste en el paso de un xenobiótico desde el exterior hacia los fluidos biológicos, para esto se debe de atravesar una serie de membranas mediante varios procesos: 1) por los poros (*filtración*), 2) por diferencia de concentraciones (*difusión*) y 3) por la ayuda de una molécula transportadora.

Para que una membrana deje pasar algún tipo de xenobiótico exige ciertas características como:

- Radio atómico o molecular pequeño
- Coeficiente de partición molar lípido/agua de forma no ionizada

- Ⓢ Distribución: una vez que el tóxico está en la sangre, esta lo distribuye por todo el cuerpo, algunos van disueltos en agua plasmática y otros van unidos a proteínas, se fijan mediante enlaces estables pero reversibles como puentes de hidrógeno, enlaces de Van der Waals o de carácter iónico. Los lípidos intra y extracelulares retienen y transmiten xenobióticos por disolución, conforme a sus enlaces no iónicos y fuerzas de Van de Waals, incluso existen tóxicos hidrosolubles que no atraviesan las membranas y quedan retenidos en el plasma o líquidos extracelulares.

El paso de xenobiótico desde la sangre hasta los tejidos se rigen por los mecanismos de absorción; la difusión a través de la membrana capilar se basa en el gradiente de concentración del xenobiótico y del tamaño de la molécula.

- Ⓢ Acumulación: la sangre distribuye los xenobióticos por todos los tejidos del organismo que, con base en las características fisicoquímicas de pueden tener mayor o menor grado de afectación; por ejemplo:
 - En tejidos sensibles a fármacos
 - En tejidos de acumulación o almacenamiento, lo que indica una retención y un atrofio de las funciones del organismo

La sangre distribuye los xenobióticos a cada uno de los órganos, aunque cada uno puede retener determinadas cantidades. Las propiedades físicas como el coeficiente de partición y las propiedades químicas como la afinidad, dan lugar a la acumulación selectiva en los diferentes órganos.

- Ⓢ Eliminación: La excreción de los xenobióticos se efectúa por medio de la orina, bilis, heces o elementos volátiles; en cantidades menores se pueden excretar mediante la leche, saliva o sudor.

Existen diferentes tipos de excreción:

- Pulmones: tóxicos gaseosos y volátiles , alcoholes o aminas
- Bilis: compuestos de alto peso molecular

- Leche: sustancias liposolubles o hidrosolubles, alcohol o nicotina
- Orina, saliva, lágrimas y sudor: sustancias hidrosolubles de bajo peso molecular, sales metálicas, ácidos
- Heces: Compuestos ingeridos pero no absorbidos o los
- Excretados por la bilis

El hecho de que una sustancia produzca efectos nocivos en los seres vivos, se deriva de la unión de una sustancia química con una biomolécula y se puede dar mediante dos tipos de procesos:

- Ⓢ Potencialmente reversibles, de carácter subletal
- Ⓢ Irreversibles, letales para la célula, que se presentan en alteraciones estructurales; aunque varios estudios aún no han podido descifrar el momento preciso en el que aparece la necrosis (muerte celular).

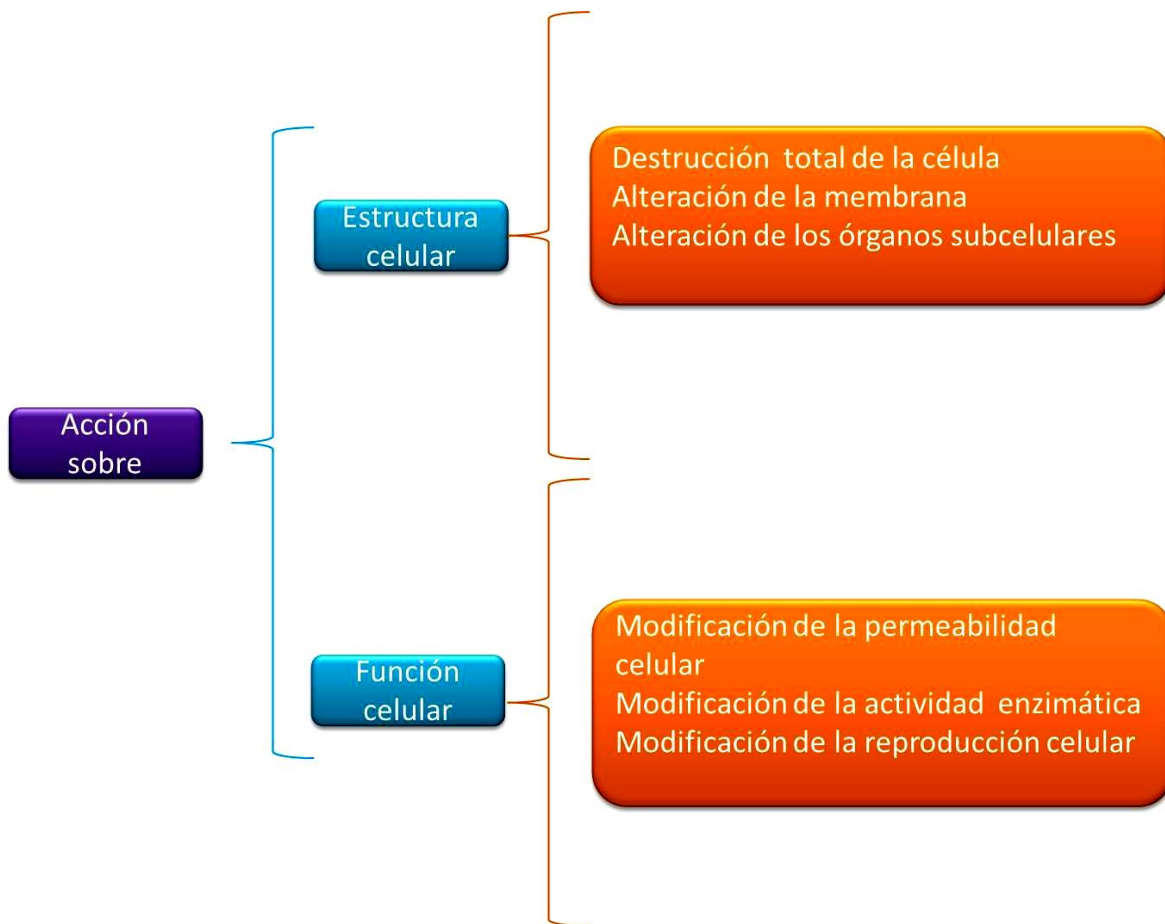


Figura 9. Mecanismos de toxicidad

Una de las condicionantes para la deposición de xenobióticos en órganos y tejidos; se debe a la selección de células o grupos de células de acuerdo a la constitución y localización de estos, siendo normalmente cerca de vasos sanguíneos. Cabe señalar que los órganos que tienen facilidad de reaccionar ante un estímulo (físico o químico) en particular y específico, a los cuales se les denomina *órganos diana*.

Los mecanismos de toxicidad (**Figura 9**) que lesionan la arquitectura celular se debe a la presencia de alteraciones de las estructuras proteínicas que pueden llegar a dar como resultado la destrucción de la célula (necrosis); la alteración puede suceder selectiva para algunos órganos subcelulares (retículo endoplásmico, mitocondrias, ribosomas). Se utilizan los términos de *necrosis* y *apoptosis*. La

primera es cuando ocurre una alteración patológica; mientras que en la segunda es un recambio celular fisiológico (eliminación de células dañadas). En la *necrosis* ocurren alteraciones en las funciones celulares; produciendo vesículas, hinchazón y estallido celular; cuyo contenido puede o no alterar a las células vecinas produciendo una inflamación general de las células.

Estudios con nanopartículas de dióxido de titanio, por ejemplo, demostraron que al interactuar con organismos vivos, estos provocan estrés oxidativo en las células; al tener tamaños nanopartículas pequeños (1-100 nm), estas afectan la histología de riñones e hígado¹⁰⁹.

Algunos estudios de citotoxicidad *in vitro* demuestran que sistemas nanométricos, como el (Fe₂O₃), pueden provocar daño oxidativo-reductor, así como la disolución de medios biológicos y parecen exhibir citotoxicidad *in vitro*, mientras que las nanopartículas metálicas con un fuerte oxidante (CeO₂, Mn₃O₄ y Co₃O₄) o reductora (Fe⁰, Fe₃O₄, Ag⁰ y Cu⁰), pueden ser citotóxicos y genotóxicos hacia dianas biológicas *in vitro*. Una de las principales fuentes de toxicidad parece ser las transferencias electrónicas y/o iónicas¹¹⁰.

1.6.6 Hepatotoxicidad

La hepatotoxicidad es definida como el daño ejercido hacia el hígado, alterando sus funciones normales. Esta afección toxica al hígado puede deberse por: *citotoxicidad* y *colástica* (detección de bilis en los canales hepáticos). La forma citotóxica tiene tres formas de presentación que son:

- ⊙ *Esteatosis*: acumulación de gotitas grasas, alterando la degeneración de triglicéridos o la síntesis de lipoproteínas encargadas de eliminar la grasa del hígado.
- ⊙ *Degeneración*: se refiere a la inflamación de hepatocito con transparencia de su contenido y la aparición de compuestos acidófilos.

- Ⓢ *Necrosis*: es la muerte celular producida por una aniquilación, arilación o uniones covalentes con las macromoléculas biológicas.

Una de las consecuencias del almacenamiento de xenobióticos en el hígado es la necrosis que provoca una disminución en sus funciones, generando un síndrome llamado *insuficiencia hepática*; las características de este síndrome son: 1) Un periodo de exposición al tóxico y aparición del daño al instante 2) Mortalidad elevada 3) Relación entre la dosis y la intensidad de las lesiones 4) Acompañado con lesiones en otros órganos, especialmente riñón.

El tamaño y superficie de las AuNp son determinantes para el destino biocinético en el organismo. La acumulación y cantidad de nanopartículas tienen relación con los tejidos, órganos o fluidos en los que pudieran alojar; en un rango de tamaño de 1.4 nm a 5 nm. Estudios realizados en ratones expuestos a nanopartículas de oro vía intraperitoneal y vía intravenosa, resultaron con la acumulación de las nanopartículas en los lisosomas de macrófagos hepáticos¹¹².

Estudios realizados en células aisladas de hígado de rata en contacto con nanopartículas de plata (AgNp) después de 6 horas de exposición, se observó una acumulación y la generación de estrés oxidativo⁹⁸.

1.6.7 Nefrotoxicidad

El riñón tiene una parte anatómica y funcional integrada: componente vascular (vena renal), el glomérulo (arterias renales) y túbulos renales (epitelios). Al ser el principal órgano excretor de sustancias tóxicas, es obvio que sufra alteraciones por ellas; algunas veces el tóxico solo potenciará y pondrá en evidencia los trastornos renales y otras veces inducirá alteraciones nefropatías y lesiones directas en el riñón.

Los mecanismos fisiopatológicos del riñón pueden ser:

- Ⓢ Lesión por contacto, de la paredes de algún segmento del órgano
- Ⓢ La dosis (concentración) a la que el producto libre y activo se encuentra en el lugar del receptor
- Ⓢ La capacidad del tóxico para atravesar barreras biológicas hasta llegar a los receptores sin sufrir destrucción o eliminación
- Ⓢ Las condiciones de sensibilidad del receptor

Estas funciones alteran y modifican la toxicidad como: acciones combinadas con otras sustancias, factores que dependen del medio ambiente, propios del individuo o referentes a la administración ^{81,82}.

1.6.8 Toxicidad de las nanopartículas (Au yAg).

Una de las aplicaciones de las nanopartículas de oro (AuNp) en el área biomédica es la obtención de imágenes celulares, diagnósticos moleculares en el área de medicina y algunos tratamientos de cáncer, dependiendo de la estructura y su biocompatibilidad⁹⁴, así como de movilizadores de biomoléculas y biosensores ^{95,96}.

Algunos estudios demuestran que la toxicidad de las nanopartículas de oro en las membranas celulares está directamente relacionada con interacciones electrostáticas con las cargas negativas de la membrana celular; en estudios de citotoxicidad (*in vitro*) se demuestra que se depende fuertemente del tamaño de las mismas para poder internarse en las células portadoras atravesando las paredes celular y alterando el funcionamiento de órganos subcelulares⁹⁶.

La deposición de las AuNp alcanza su máximo cuando se tiene tamaños aproximados a los 50 nm, con una eficiencia de transporte por el torrente sanguíneo después de los 30 minutos de ser administradas, la mayoría de las AuNp penetra de manera eficiente a las células portadoras ^{88,92}. Contrario a eso, se reportan

resultados negativos en componentes citoesqueléticos así como la reducción del crecimiento de células fibrosas en humanos ⁹⁴, aportando una controversial discusión entre si son o no tóxicas al estar en contacto con células.

En diversos estudios demuestran que células aisladas expuestas a AuNp de 1.4 nm tuvieron mayor efecto tóxico que células expuestas a AuNp (*in vitro*) con tamaños de 15 nm; con administración de forma intravenosa mostrando que las nanopartículas de 10-50 nm presentan toxicidad aparente en comparación con las de tamaños de 100-200 nm. Los efectos secundarios fueron de carácter inflamatorio y necrosis en las células portadoras; también se observó lisis celular esto por efecto de adhesión proteínica celular, provocando la muerte celular. Se reporta también alteraciones en las células adyacentes a las que presentan necrosis ^{92,94}.

Algunos estudios demuestran que las AgNp presentan efectos adversos y afectan gravemente la salud de peces zebra presentes en agua dulce, se demuestra que aun con la presencia de Ag^{+1} se inhiben las funciones de los iones Na^{+} / K^{+} ; generando efectos tipo arcoíris en los hepatocitos de este tipo de organismos aislados ⁹⁹.

Farkas et. al. reporta que tanto las AuNp como AgNp reducen significativamente ($P < 0.05$) la actividad mitocondrial en estudios citotóxicos a un tiempo de exposición de 48 horas, así como una reducción significativa ($P < 0.05$, $P < 0.001$) de la integridad de la membrana celular en concentraciones mayores a 6.35 mg/L para AgNp⁹⁴.

En otro estudio se demuestra que al utilizar AgNp para la formación de imágenes de tejido neural y celular, estas generan problemas de enfermedades neurodegenerativas debido a la generación de estrés oxidativo en las células portadoras, alterando sus funciones principales. Demostrando que a diferentes dosis (5-10 mg/mL) y tamaño producen daños a células madre y pulmonares con un tiempo de exposición de 24 horas; generando inflamación grave y formación de granulomas. ¹⁰⁰

1.7 Histopatología para detección de metales

La histopatología estudia la capacidad de muchos contaminantes para alterar diferentes células, tejidos u órganos para evaluar los efectos nocivos. La histopatología se convierte en una herramienta válida para el estudio del efecto biológico de los contaminantes en el medioambiente; es capaz de detectar y caracterizar los efectos de la exposición a sustancias tóxicas y carcinogénicas ¹⁰³. Los cambios histopatológicos integran el impacto de una variedad de factores de alteración como: factores patogénicos, compuestos tóxicos, condiciones alimenticias y ambientales desfavorables ¹⁰³. Estudios relacionados a las respuestas histopatológicas de algunos órganos como el riñón y el hígado a la toxicidad de metales pesados engloban a un amplio conjunto de sustancias que, se caracterizan por no ser degradables y tener una elevada persistencia en el medio así como susceptibles de ser incorporados por los organismos y de alojarse ^{98,103}.

Metales como el Cu o Pb pueden causar una daño tanto en tejidos animales como vegetales, esta acumulación es una ruta importante a través de la cual el aumento de los niveles de los agentes contaminantes que se pueden transferir a través de las cadenas alimenticias, causando problemas de salud ¹⁰¹. La acumulación de diferentes metales pesados como Cu en el hígado de animales depende del estado nutricional de cada organismo; así como de las concentraciones subletales del material ya que pueden causar alteraciones histopatológicas en órganos y tejidos, como hiperplasias, hipertrofias, necrosis pancreática y hepática. Los cambios histológicos e histopatológicos producidos por contaminantes, en órganos o tejidos, pueden presentarse previamente a que se produzcan efectos irreversibles en algún organismo ¹⁰⁴.

El hígado y el riñón son órganos importantes para el metabolismo, la desintoxicación, el almacenaje y la excreción del xenobióticos y sus metabolitos, y

son especialmente los más vulnerables para ser dañados por agentes externos
105.

Las alteraciones histológicas hepáticas son progresivas durante el tiempo de exposición a algunos metales como el cobre, siendo mayores las alteraciones observadas en los ejemplares contaminados con concentraciones mayores ⁹². El riñón que es un órgano esencial para el metabolismo y la eliminación de la mayor parte de los componentes tóxicos¹⁰⁶, por eso es de vital importancia la evaluación histopatológica de este órgano, para determinar un posible riesgo a la salud. La enfermedad de riñón puede ser el resultado de una lesión glomerular o tubulointerstitial debido a una o más reacciones básicas del tejido, la inflamación en el glomérulo causa un síndrome nefrítico con un aumento creciente de los glóbulos rojos ¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



2.1 Metodología

La metodología seguida tuvo el objetivo de comparar métodos de síntesis (químico y biológico) para la obtención de nanopartículas metálicas de (Au y Ag). Se divide en cuatro etapas: 1) Síntesis de las nanopartículas, 2) Caracterización estructural, 3) Evaluación toxicológica y 4) Histopatología e Histolocalización.

En la primera etapa se realizó la síntesis de nanopartículas de Au y Ag; a través de dos rutas sintéticas para cada uno de los metales, una fue con Borohidruro de sodio (NaBH_4) (como reductor químico) y para la otra es usando el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (como reductor biológico). La segunda etapa es la caracterización de las nanopartículas mediante el uso de las técnicas analíticas como Espectroscopía UV-Vis, Microscopía Electrónica de Transmisión y Dispersión de Luz. La tercera etapa es la evaluación toxicológica en un modelo *in vivo* utilizando dos análisis: 1) Agudo (una sola dosis en un periodo de 24 horas) y 2) Subagudo (dosis durante 28 días); por último se realizó la cuarta etapa que fue un estudio histológico de los órganos (hígado y riñón) dividiéndose en dos estudios: histolocalización e histopatología. Toda esta metodología fue para hacer una comparación entre la ruta sintética y el metal utilizado durante todo el estudio y saber si existe una diferencia toxicológica significativa entre cada uno de los métodos y los metales, evaluadas en un modelo murino, especificando el tamaño, la morfología y el agente estabilizante y saber cuáles son las posibles zonas de alojamiento dentro de cada uno de los órganos a analizados.

2.2 Materiales y reactivos.

Los reactivos a utilizar son: Ácido Tetracloroaúrico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Nitrato de Plata (AgNO_3), Agua deionizada, Agua destilada, Borohidruro de sodio (NaBH_4), Citrato de sodio ($\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$), *Camellia sinensis* (Té verde) de la marca Lagg's, solución Salina al 0.9% de Cloruro de Sodio (SSI), FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético), GAA (glicerol, alcohol etílico y agua), buffer de Fosfatos (0.2M), soluciones de buffer de fosfatos con sacarosa (5%, 10%, 15% y 20% de

sacarosa), etanol (30%, 40%, 50%, 70%, 85%, 100%), Xileno (100%), Xileno-Etanol (50%), parafina, eosina (colorante), hematoxilina (colorante) y como medio de inclusión para el criostato Tissue-Tek O.C.T. Compound y glicerina. Para todo el material de vidrio, antes de cada síntesis, el material debe de ser lavado perfectamente con agua corriente y posteriormente lavar con agua deionizada por duplicado.

2.3 Metodología general.



Figura 10. Metodología general

2.3.1 Síntesis de nanopartículas metálicas.

2.3.1.1 Preparación de las soluciones de Au y Ag con NaBH₄ (químico)

La primer síntesis es la del reductor químico de borohidruro de sodio (NaBH₄) [10⁻² M] y como agente estabilizante una solución de Citrato de Sodio [10⁻² M] ^{58,69}. La síntesis de nanopartículas (Au y Ag) por métodos químicos consiste en: colocar la sal de HAuCl₄•3H₂O o AgNO₃ (respectivamente) a una concentración de [10⁻² M] respectivamente. Mientras que se fueron variando los volúmenes del reductor (NaBH₄), y finalmente aforando al mismo volumen; todo esto tomando como base la siguiente **Tabla 5**.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la síntesis por métodos químicos.

	Sal [10 ⁻³ M]	Reductor (NaBH ₄)	Estabilizante Citrato de sodio	Aforo
		[10 ⁻² M]	[10 ⁻² M]	
Ag	AgNO ₃	1 mL	1 mL	10 mL
		2 mL		
		3 mL		
		4 mL		
		5 mL		
Au	HAuCl ₄	1 mL	1 mL	10 mL
		2 mL		
		3 mL		
		4 mL		
		5 mL		

En un vial de 40 mL se colocan 5 mL de la solución de la sal del metal (HAuCl₄•3H₂O o AgNO₃) (10⁻³M), los cuales se mezclan con un volumen definido de NaBH₄ y 1 mL del agente estabilizante (NaH₂ (C₃H₅O (COO)₃), respectivamente y se aforan con agua desionizada a 10 mL (**Figura 11**). Los sistemas de síntesis se monitorearon a través de sus cinéticas de crecimiento utilizando la técnica de UV-Vis, mediante la respuesta del plasmón, correspondiente para cada uno de los metales (Au y Ag); en intervalos de tiempo de 30 minutos. Una vez transcurrido su tiempo de estabilidad, o punto máximo de formación; se guarda para posteriormente ser analizada mediante TEM.

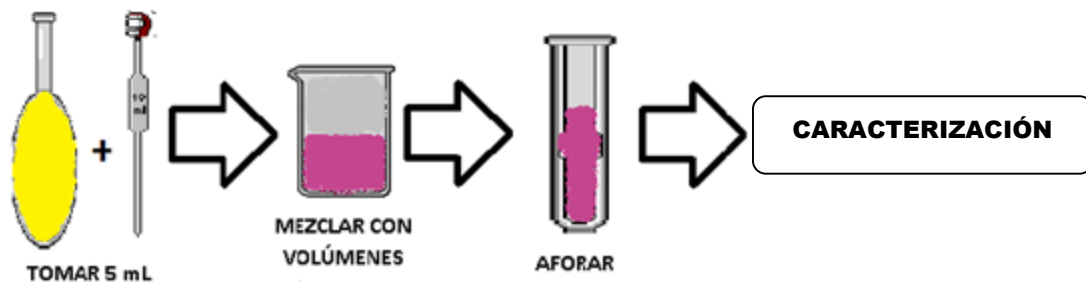


Figura 11. Esquema para la preparación de sistemas de nanopartículas de Au y Ag con NaBH_4 .

2.3.1.2 Preparación del extracto acuoso de *Camellia sinensis*

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocan 100 mL de agua desionizada con una bolsa de Té verde (*C. sinensis*)³⁰, marca Lagg's. Dicha solución se deja a punto de ebullición durante 20 minutos, posteriormente, se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra al vacío dos veces, con ayuda del matraz Kitazato y el embudo Buchner con papel Whatman No 5 (Figura 12).

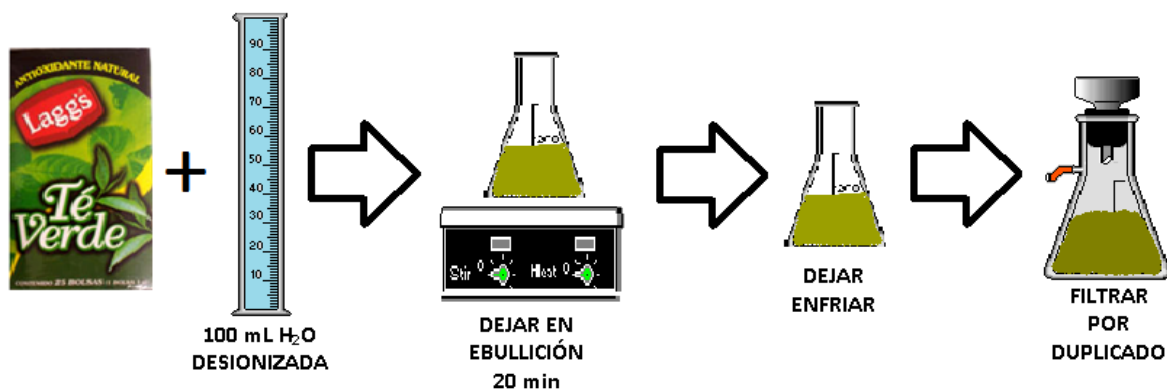


Figura 12. Esquema para la preparación de extracto de *Camellia sinensis*.

2.3.2.2 Preparación de las soluciones de Au y Ag con *C. sinensis* (biológico).

Para la segunda etapa de las síntesis, para la obtención de nanopartículas de Au y Ag; se coloca una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o AgNO_3 respectivamente, se le adiciona el extracto acuoso de *Camellia sinensis*; esto se hace con base en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la síntesis de nanopartículas (biológico).

	Sal [10^{-3}M]	<i>Camellia sinensis</i>	Aforo
Ag	AgNO_3	1 mL	10 mL
		2 mL	
		3 mL	
		4 mL	
		5 mL	
Au	HAuCl_4	1 mL	10 mL
		2 mL	
		3 mL	
		4 mL	
		5 mL	

En un vial de 40 mL se colocan 5 mL de la solución de sal del metal ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o AgNO_3) (10^{-3}M), los cuales se mezclan con un volumen definido del extracto acuoso de *Camellia sinensis* respectivamente y se aforan con agua desionizada a 10 mL (**Figura 13**). Los sistemas de síntesis se monitorearon a través de sus cinéticas de crecimiento utilizando la técnica de UV-Vis, mediante la respuesta del plasmón, correspondiente para cada uno de los metales (Au y Ag); en intervalos de tiempo de 30 minutos. Una vez transcurrido su tiempo de estabilidad, punto máximo de formación= punto máximo del plasmón superficial; se guarda para posteriormente ser analizada mediante TEM.

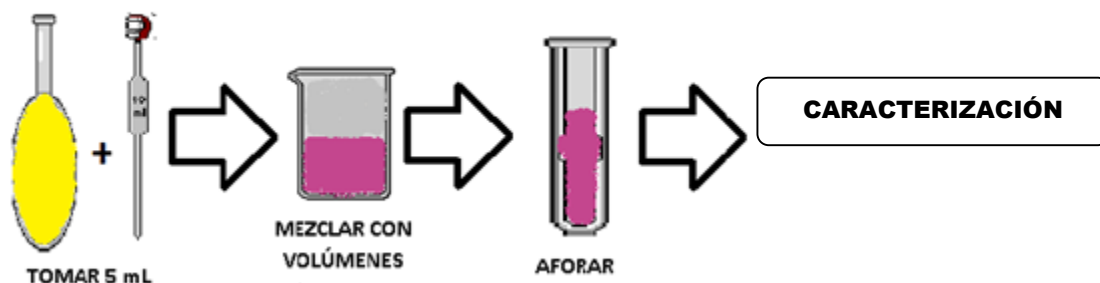


Figura 13. Esquema para la preparación de sistemas de nanopartículas de Au y Ag con extracto acuoso de *Camellia sinensis*.

Los sistemas en los que se encuentran inmersas las nanopartículas, se utilizaron tal cual se prepararon (solución acuosa); dejando que el sistema alcanzara su máximo valor de plasmón en un rango de tiempo de 24 horas para tener soluciones homogéneas y excluyendo la presencia de precipitados.

2.3.2 Caracterización de nanopartículas metálicas.

2.3.2.1 Espectroscopia UV-Vis

El análisis Espectroscopia UV-Vis se realizó en un espectrofotómetro marca Lambda 650 Perkin-Elmer con resolución de 1 nm, con un barrido desde 300 hasta 700 nm; se emplearon celdas de cuarzo; las cuales se limpian con agua desionizada entre una lectura y otra. El análisis se lleva a cabo a temperatura ambiente; se corre un blanco (agua deionizada) para posteriormente dar lectura a las soluciones de nanopartículas monometálicas de Au o Ag en función del tiempo, realizando mediciones a 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 4h y 24h.

2.3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las muestras se analizan en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, modelo 2010 que se encuentra en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM. Para este estudio se monta una gota de la suspensión de nanopartículas monometálicas de Au o Ag respectivamente, sobre rejillas de cobre revestidas con carbono de 100 MESH. Se dejan secar y se analizan por TEM; dicho análisis se lleva a cabo a 24 horas de haber comenzado la reacción de síntesis.

2.3.2.3 Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Este estudio global de tamaño en todo el sistema nanométrico se realizó el análisis de medidor de tamaño por dispersión dinámica de la luz, en un equipo ZETASIZER Nano-S, Malvern Instrument (Inglaterra) ubicado en el Laboratorio 213, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear del Edificio B en la Facultad de Química de la UNAM. En primera instancia se realizó una dilución de 1/20 con agua deionizada, seguido de una sonicación por 5 minutos y finalmente una filtración (filtro de 5 micras) para finalmente hacer la lectura de la solución. El análisis se realizó a las 24 horas de síntesis.

2.3.3 Análisis Toxicológicos

Para los análisis de Toxicología solo se ocuparon 4 sistemas; dos para cada metal y cada uno por su síntesis química o biológica; los cuales fueron los sistemas con mayor concentración y monodispersidad de nanopartículas Au o Ag; en un tiempo de estabilización a 24 horas.

Se llevaron a cabo los análisis toxicológicos agudo y subagudo de los sistemas nanométricos, esta parte de la investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología, en la Facultad de Química de la UAEM, se estableció como prioridad la utilización y manejo ético de animales de laboratorio en esta experimentación apegados a la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para este análisis se usaron ratones macho de la cepa CD-1DE 6 semanas de edad y un con peso corporal de 20 ± 5 gramos, los animales se mantuvieron en un cuarto cerrado bajo condiciones ambientales controladas de temperatura y humedad relativa de 22°C y $55\pm 10\%$, respectivamente y periodos de luz/obscuridad de 12 horas cada uno.

2.3.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda.

Los animales se distribuyeron en tres grupos de 3 machos cada uno; a los cuales se les administró un volumen específico con base a la **Tabla 7** del sistema de nanopartículas (químico y biológico) más los 5 grupos control que fueron: Solución Salina Isotónica (SSI), solución de oro (HAuCl_4), solución de plata (AgNO_3), borohidruro de sodio (NaBH_4) y *Camellia sinensis*; dando un total de 9 grupos con 3 miembros cada uno. La dosis se selecciona en base al peso corporal (kg) de cada macho. La vía de administración fue intraperitoneal. Esta sección de la experimentación se dio por dos etapas, en donde se fue aumentando la dosis administrada en un periodo no mayor de 24 horas.

Cada una de las etapas tuvo una duración de 14 días cada una (por separado); una vez administradas las dosis respecto al peso de cada miembro del grupo, se les observó para determinar si existía algún cambio o mortalidad en lapsos de: 1h, 2.5h y 4h; esta observación se extendió durante los 14 días posteriores, a la misma hora. Los pesos corporales se registraron desde el día cero 0 hasta el día 14. Al término de la observación se sacrificaron mediante dislocación cervical, observándose de

manera macroscópica la posible presencia de signos de toxicidad en órganos blandos. La toxicidad aguda (DL_{50})⁸⁴ que se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilo, mg/kg) se concluye más adelante.

Tabla 7. Dosis empleadas para la evaluación toxicológica aguda.

Dosis a 24 h		Etapa 1		Etapa 2		
		1 dosis	2 dosis	3 dosis	8 dosis	16 dosis
Sistema	Au NaBH ₄	1.73mg/kg	2.87mg/kg	5.749mg/kg	13.84mg/kg	27.68mg/kg
	Au <i>Camellia sinensis</i>	1.762mg/kg	3.523mg/kg	7.05mg/kg	14.096mg/kg	28.192mg/kg
	Ag NaBH ₄	0.349mg/kg	0.698mg/kg	1.397mg/kg	3.152 mg/kg	6.30mg/kg
	Ag <i>Camellia sinensis</i>	0.335mg/kg	0.670mg/kg	1.34mg/kg	2.68mg/kg	5.36mg/kg
Controles	SSI	/	/	/	/	/
	<i>Camellia sinensis</i>	/	/	/	/	/
	HAuCl ₄	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M
	NaBH ₄	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M

Paralelo a esto se registro del volumen diario de agua (VDA) e ingesta diaria de alimento (IDA) con la finalidad de observar el comportamiento alimenticio de los animales; se mantuvieron en observación por si presentaban alguna alteración de apetito o deshidratación. De igual manera se evaluó el peso total de cada miembro del grupo, y al final de la exposición se registraron los pesos relativos de órganos (hígado, riñones, corazón, bazo, pulmones y testículos) con el objetivo de evaluar posibles daños respecto a los controles. Todos los órganos obtenidos tanto de los grupos control como los administrados con los sistemas nanométricos se colocaron en frascos de polietileno transparentes con rosca que contenían solución FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético) para su perfecta conservación y posterior análisis.

2.3.3.2 Evaluación toxicológica subaguda.

Tomando como base los datos anteriores de las dosis administradas de los sistemas de nanopartículas analizados; resultaron 4 dosis: 2 para las nanopartículas de Au (1.73mg/kg y 1.762mg/kg) y 2 para las nanopartículas de Ag (0.349mg/kg y 0.335mg/kg). Cabe señalar que para la evaluación toxicológica subaguda se requieren dosis menores que con respecto al valor de dosis letal 50 ($DL_{50}/100$ y $DL_{50}/10$, respectivamente) pero con una administración continua y diaria durante 28 días. Las dosis para cada grupo se encuentran en la **Tabla 8**. Se registró de igual manera los VDA e IDA con la finalidad de observar el comportamiento alimenticio de los roedores; diariamente se registró el peso total y al finalizar el periodo de dosificación y observación; se sacrificaron y se evaluaron de manera macroscópica los órganos blandos, registrando los pesos relativos. Todos los órganos obtenidos tanto de los grupos control como los administrados con los sistemas nanométricos se colocaron en frascos de polietileno transparentes con rosca que contenían solución FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético) para su perfecta conservación y posterior análisis.

Tabla 8. Dosis empleadas para la evaluación toxicológica subaguda.

	Dosis	Diariamente
Sistema	Au NaBH ₄	1.73mg/kg
	Au <i>Camellia sinensis</i>	1.762mg/kg
	Ag NaBH ₄	0.349mg/kg
	Ag <i>Camellia sinensis</i>	0.335mg/kg
Controles	SSI	/
	<i>Camellia sinensis</i>	/
	H ₂ AuCl ₄	10 ⁻³ M
	NaBH ₄	10 ⁻² M

Los órganos analizados fueron: hígado, riñones, corazón, bazo, pulmones y testículos, para un posterior análisis de zonas de alojamiento de los metales respecto a los testigos. En la **Figura 14** se muestra la anatomía de un roedor (control) y la distribución de los órganos, ahí mismo se señala la vía de administración (intraperitoneal) que se ocupó para la administración de los sistemas nanométricos.

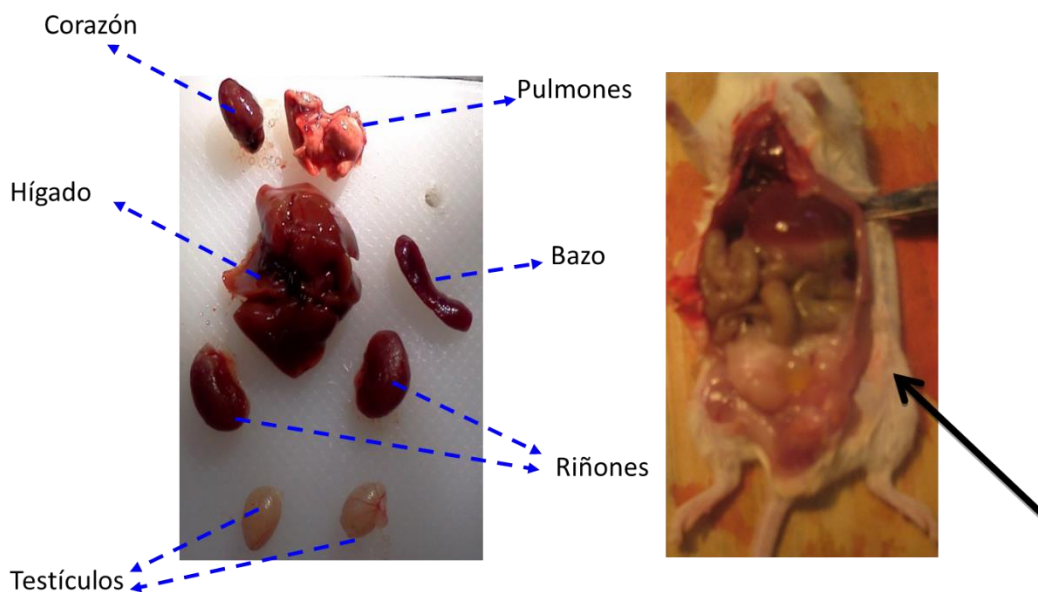


Figura 14. Órganos extraídos de cada roedor durante los análisis de toxicología (muestra control).

2.3.4. Histolocalización

Para esta parte del proyecto se seleccionaron únicamente órganos expuestos a nanopartículas de cada síntesis (química y biológica) para cada uno de los metales analizados. Resultando 4 sistemas en total para cada uno de los órganos blandos en cuestión, hígado y riñón, después de las evaluaciones toxicológicas que anteriormente se ejecutaron.

Con este análisis se observaron imágenes histológicas del hígado y riñón para determinar si existía alguna histolocalización/deposición específica de los materiales nanométricos. Utilizando las propiedades ópticas de los materiales mediante la excitación electrónica de cada uno de las nanopartículas; generando fluorescencia. La técnica nos ayuda a determinar la sección más susceptible del órgano a la deposición metal en cuestión; esto, con la ayuda de un Microscopio de Epifluorescencia que trabaja con longitudes de onda específicas y adecuadas para las excitación de las nanopartículas de Au y Ag. El desarrollo de esta metodología fue en uno laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Posgraduados (ColPos) Campus Montecillo, Texcoco. Parte de los equipos utilizados durante este procedimiento fue un Criostato digital SLEE cryostat mainz (MTC, Alemania); mientras el microscopio de Epifluorescencia fue un Microscopio de Epifluorescencia Axioskop 2 plus (Karl Zeiss, Alemania) con una lámpara de mercurio HBO 50.

Como se mencionó con anterioridad los tejidos se encontraban en una solución FAA. Se tomó un pequeño trozo del órgano a analizar (hígado y riñón) para cada uno de los sistemas nanométricos, se lavó por triplicado con agua deionizada y finalmente se colocaron en solución GAA.

Esta sección de la Histopatología se divide en 2 partes: la sección de pre-tratamiento del órgano para la obtención de los cortes (Criostato) y la parte de visualización de los cortes en el Microscopio de Epifluorescencia.

2.3.4.1 Criostato

Como paso previo a la obtención de los cortes con el Criostato, se llevó a cabo un pre-tratamiento de la muestra, la cual consistió en extraerle toda el agua posible, mediante la inmersión en soluciones de buffer de fosfatos con sacarosa (a varios cambios de soluciones) por periodos de 60 minutos; yendo de menor a mayor en la concentración de sacarosa, para que de esa manera el agua presente dentro del

órgano se fuera sustituyendo por una solución cada vez más concentrada de sacarosa (5%, 10%, 15% y 20% de sacarosa) dejándola en la solución final por 24 horas en refrigeración.

Posterior a ese pre-tratamiento se colocó un pequeño trozo del tejido en forma cúbica en un frasco pequeño de vidrio, para hacer mezclas de soluciones de 20% sacarosa con el buffer de fosfatos con el medio de montaje Tissue-Tek O.C.T. Compound** (**reactivo especial para criotomía);

- 1) 2:1 (20% sacarosa : OCT)
- 2) 1:1 (20% sacarosa : OCT)
- 3) 2:1 (OCT : 20 % sacarosa)

El tejido se mantuvo inmerso en estas soluciones 1 a 3 de concentración variable de sacarosa y OCT en periodos de 2 horas cada uno, mientras que en la última solución se dejó un periodo de 8 a 10 horas para una inclusión completa con el OCT**, cada una de las inmersiones se dio en un refrigeración. Finalmente se colocó el tejido en el Criostato para obtener los cortes/rebanadas con un grosor de 15 micras, con la ayuda de un pincel de pestaña se hizo la fijación del tejido con glicerina sobre un porta objetos para su posterior visualización.

2.3.4.2 Microscopio de Epifluorescencia

Para poder ser analizados los tejidos obtenidos después del proceso anterior (**Tabla 9**), se utilizó el Microscopio de Epifluorescencia; con filtros específicos los cuales fueron: el filtro azul a una longitud de excitación de 365 nm y emisión de 397 nm; filtro verde a una longitud de excitación de 450-490 nm y emisión de 519 nm y por último el filtro rojo con una longitud de excitación de 546 nm emisión de 590 nm. Con el uso de estos filtros se fue haciendo la observación microscópica de los tejidos de cada uno de los cortes de los órganos (hígado y riñón) administrados con

diferentes sistemas de nanopartículas, para poder elucidar cuál era la zona que se presenta fluorescencia respecto al corte control, y poder así atribuir la presencia de nanopartículas metálicas. De igual manera se tomaron muestras de los cortes y se observaron utilizando campo claro, para poder visualizar si existía alguna otra anomalía en el tejido analizado, estas tomas se hicieron sin la presencia de excitación electrónica.

Tabla 9. Listado de muestras a analizar en el Microscopio de Epifluorescencia e Histopatología.

Metal	Dosis exposición aguda	Dosis análisis subagudo
Au	Menor AuBH(11.42 mg/kg)	AuBH (1.73mg/kg)
	Mayor AuBH(22.99 mg/kg)	
	Menor AuCs (14.19 mg/kg)	AuCs (1.762mg/kg)
	Mayor AuCs (28.20 mg/kg)	
Ag	Menor AgBH (2.79 mg/kg)	AgBH (0.349mg/kg)
	Mayor AgBH (5.58 mg/kg)	
	Menor AgCs (2.68 mg/kg)	AgCs (0.335mg/kg)
	Mayor AgCs (5.36 mg/kg)	
Controles	SSI	SSI
	AgNO ₃	AgNO ₃
	HAuCl ₄	HAuCl ₄

2.3.5 Histopatología

Esta sección fue para evaluar la histología animal tanto de hígado como del riñón expuestos a la Evaluación toxicológica aguda y subaguda de las nanopartículas de Au y Ag; esto para ver si la acción de estos causó daños en las células histológicas.

El desarrollo experimental fue realizado en los laboratorios de Histología del Colegio de Posgraduados (ColPos) Campus Montecillo, Texcoco. Los equipos a

utilizar fueron: Cambiador Automático de Tejidos Fisher Tissuemation (USA), Microtomo Rotatorio American Optical Company (USA) y un Microscopio de Epifluorescencia Axioskop 2 plus (Karl Zeiss, Alemania).

Como un tratamiento previo a la obtención de los cortes histológicos, se cortaron pequeños trozos del tejido en forma cúbica (incluidos en solución FAA) y se colocaron en una rejilla de plástico, para ser ingresado en el Cambiador Automático de Tejidos; con soluciones cada vez más concentradas de alcohol etílico, empezando del 30% hasta 100% (duplicado), después con una mezcla 1:1 de alcohol etílico y xileno y finalmente xileno al 100% (triplicado); todos los cambios tuvieron una duración de 4 horas. Subsecuentemente se trasladaron a parafina líquida, con dos cambios de parafina (cada vez más pura) con un periodo de tiempo mínimo de 12 horas cada cambio. Una vez inmersos los tejidos se hace la inclusión completa de los tejidos en parafina sólida haciendo cubos 2 cm x 1 cm con el tejido animal inmerso, estos son soportados en una base de madera⁽⁷⁴⁾.

Una vez soportados fijados en madera se prosiguió a extraer los cortes por duplicado de los tejidos con un grosor de 10 micras con la ayuda de un Microtomo, estos cortes se fijan sobre un portaobjetos con la ayuda de un adhesivo de cromo, se dejan fijar por 24 horas, para su posterior tinción.

2.3.5.1 Tinción.

La tinción que se llevó a cabo fue la tradicional de eosina-hematoxilina. La cual consiste en una desparafinación con lavados de xileno al 100%, alcohol etílico al 100%, 85% y 70%; por lapsos de 10 minutos; seguido de una inmersión en el colorante hematoxilina en un periodo de 3 minutos, continuando con dos lavados con agua corriente (15 minutos cada uno) y por último una inmersión en colorante eosina al 1% por 30 segundos ^{105,106,108} (**Figura 15**). Una vez terminado este proceso se prosiguió a una deshidratación continua de alcohol etílico al 70%, 96% (por duplicado), 100% (por duplicado), xileno al 100% (por triplicado), finalizando con

resina y limpiezas para tener una apreciación mayor al microscopio. Estas preparaciones se observan en un microscopio óptico para analizar la histología (parénquima) de cada uno de los tejidos y así poder determinar un posible daño a nivel celular causado por la acción e interacción las nanopartículas de Au y Ag con el organismo.

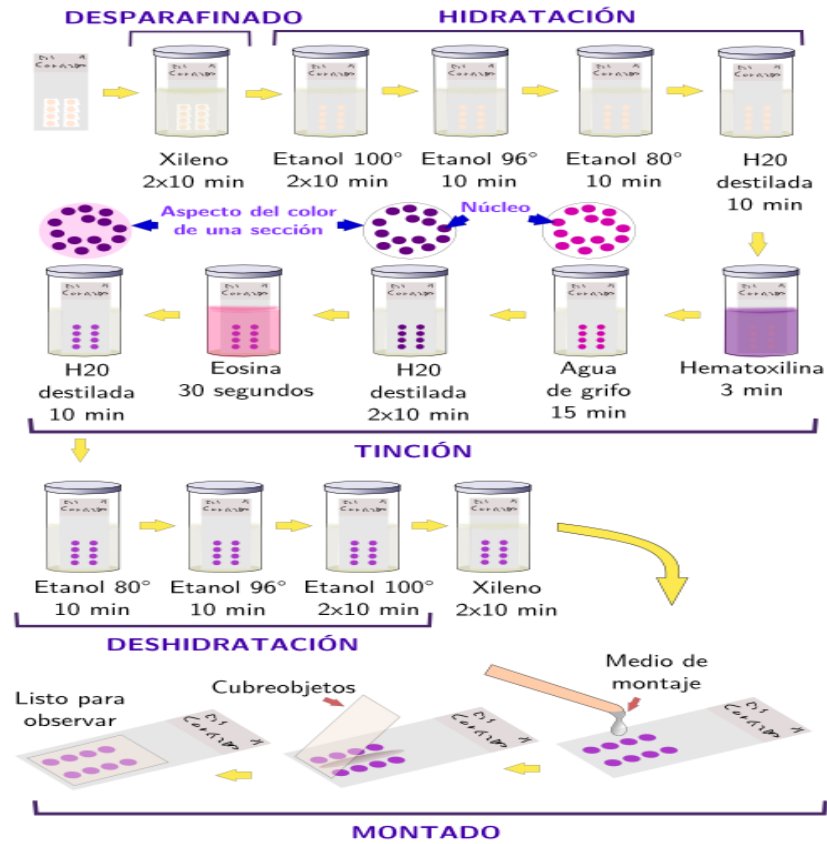


Figura 15. Esquema general de la metodología de tinción Eosina- Hematoxilina.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS
y
DISCUSIÓN



Comparative toxicity study of gold nanoparticles synthesized by chemical and biological routes

M.G. Cruz-Montufar^{a,d}, M.D. Hernández- Navarro^b, H.A. Zavaleta-Mancera^c, R.A. Morales-Luckie^a, A.R. Vilchis-Nestor^{a*}

^a Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, UAEM-UNAM. Carretera Toluca-Atlacomulco Km 14.5, San Cayetano, Piedras Blancas, Toluca, C.P. 50200, Estado de México, México. Tel: +52 (722) 276 66 10, Ext. 7712.

^b Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón y Paseo Tollocan s/n. Toluca, C.P. 50120, México.

^c Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, C.P. 56230, Estado de México.

^d Posgrado en Ciencia de Materiales, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: arvilchisn@uaemex.mx

Abstract

Gold nanoparticles are one of the most studied nanomaterials due to their widely applications in sensors, electronic devices and medicine. Their optoelectronic and catalytic properties make them very valuable for numerous and novel applications. However exposure to gold nanoparticles might produce toxicological effects with humans or microbiota and further studies are required. Synthesis of gold nanoparticles can be achieved by physical, chemical and biological process, which employs biomolecules as reduction and capping agents. The aim of the present study is to contrast the toxicological effect between gold nanoparticles (AuNp) obtained by chemical and biological method with *in-vivo* studies. Chemical synthesis was performed with NaBH₄ as reducing agent; in contrast, biosynthesis was assisted by the aqueous extract of *Camellia sinensis*. Formation of Au NPs was followed by UV-Vis spectrometry, furthermore TEM studies were performed in order to describe the size and morphology of Au NP's. Gold NPs size ranged from 7.5 - 10 nm and 20 -24 nm for chemical and biological synthesis, respectively. Comparative toxicity of chemical and biogenic nanoparticles was performed with sub-acute *in vivo* murine models.

Keywords: Gold nanoparticles, bioreduction, *Camellia sinensis*, Nanotoxicity, histolocalization.

1. Introduction

Nanotechnology is an area oriented to the control and manipulation of matter at nanoscale (10^{-9} m) for specific purposes, from a technological standpoint, electrochemical and biotechnology (Delgado *et al.* 2009). The synthesis of metal nanoparticles gained interest due to the peculiarities of their optical, (Avila *et al.* 2008, Sau 2004) magnetic (Sau *et al.* 2004), electrical (Dahl, Maddux and Hutchison 2007) and catalytic (Daniel and Astruc 2004) properties. The synthesis and stabilization of nanoscale systems are of great importance in determining the properties of nanostructured systems (Abraham *et al.* 2007). Many of these properties and possible applications (Roldan *et al.* 2005, Gould *et al.* 2008) are strongly influenced by the size and shape of the nanoparticles (Kelly *et al.* 2003).

Nanotechnology is mainly concern with synthesis of nanoparticles in variable sizes, shapes, chemical compositions and controlled size-dispersity, and their potential use for human benefits. Although chemical and physical methods may successfully produce pure, well-defined nanoparticles, these are quite expensive and potentially dangerous to the environment.

The development of new synthetic routes nanotechnology has prompted the search sustainable alternatives in order to reduce risks, and the importance of toxicological studies of noble metal nanoparticles is fundamental to extend nanoparticles applications in biomedical and biological areas. (Rutkowsky *et al.* 2007). In recent years it was promoted the use of biological compounds for the reduction of metallic ions, such as plants and microorganisms, (Bali *et al.* 2006, Dahl *et al.* 2007, Vilchis *et al.* 2008) in order to obtain metal nanoparticles, since biogenic methods are eco-friendly and low-cost. Several plants have been successfully used for efficient and rapid extracellular synthesis of AuNp (Prathap *et al.*). For example, using *Aloe vera* aqueous extract (Chandran *et al.* 2006) gold nanotriangles and silver nanoparticles can be formed; the synthesis of AuNp using *Avena sativa* has been reported by Armendariz *et al.* (Armendariz *et al.* 2004); using *Sesbania* extract AuNp can be generated (Sharma *et al.* 2007). A review of metallic nanoparticles obtained by biosynthesis employing plants biomass or extracts can be checked in publications reported by Yadav *et al.* (Mohanpuria *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2009) and Bali *et al.* (2006).

It is well-known that metal nanoparticles have a greater reactivity, which could cause an adverse event in living organisms, hence the importance of toxicological studies and the adverse effects of AuNp. Little is known about damage of metal nanoparticles towards living organism, therefore it is important to study and evaluate their toxic effect; as well as its possible storage (Brzoska *et al.* 2003, Saleki *et al.* 2007). Many studies have focused only on the cytotoxicity, ecotoxicity or toxicity in general (Robbens *et al.* 2010). Cytotoxicity is associated with exposure of the nanoparticle controlled systems (*in vitro*); adverse effects depend specifically on the size and shape of the nanoparticle; studies indicate that the smaller nanoparticles increase cytotoxicity due to the increment of the contact surface (Parkkola *et al.* 2010). It has been determined that the toxicity of metallic nanoparticles depends not only on the shape and size, but are also associated with the distribution and the

physicochemical properties (composition, crystalline phase and solubility); having the ability to bind to proteins and a possible accumulation within the organism (Lin *et al.* 2006, Sintez *et al.* 2010).

Gold nanoparticles are one of the most promising nanostructures to be applied in biomedical area for cellular imaging, molecular diagnostics and some cancer treatments depending on the structure (Huang *et al.* 2010) as well as mobile biosensors (Nguyen *et al.* 2007) due to a great biocompatibility is usually assumed. In this context, gold nanomaterials with potential applications on human health and environmental technologies force to develop studies of biocompatibility as well as sub-cellular distribution and biotransformation in environment (Shankar *et al.* 2005, Lowry *et al.* 2012)

The present work is based about synthesis and characterization of AuNp, by comparing two synthetic routes, chemical and biological, as well as the toxicological analysis, based an acute study and sub-acute for *in vivo* models. The morphology, size and crystal structure of systems were determined by transmission electron microscopy (TEM) (Baia *et al.* 2007) and the surface plasmon resonance (SRP) is characterized by UV-Vis spectroscopy (Noguez 2008). Finally, it was determinate the most susceptible zones to present accumulation of AuNP (liver and kidneys) exploiting optical properties of AuNp (fluorescence) in order to show the differences of cell structures after the critical exposure to AuNp.

2. Experimental

2.1 Materials

Tetrachloroauric acid (HAuCl_4 : 10^{-3} M), sodium borohydride (NaBH_4 : 10^{-2} M) and sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$: 10^{-3} M) solutions were prepared with de-ionized water. All reagents were of analytical quality (Sigma-Aldrich, USA).

Aqueous extract of *Camellia sinensis* was prepared boiling a conventional green tea bag (Jagg's) containing 1.5 g, in 100 mL of de-ionized water for 5 min. The infusion was cooled and vacuum filtered with a filter paper (Wahman No. 5)

2.2 Synthesis of nanoparticles.

Chemical synthesis: Different volumes (1 to 5 ml) of the aqueous solution of 10^{-2} M NaBH_4 were added to 5 ml of 10^{-3} M HAuCl_4 solution, followed by the addition of 10^{-3} M sodium citrate solution as capping agent. Details of the procedure was according to Rutkowsky *et al.* (2008).

Biological synthesis: Volumes (0.2mL to 1mL) of *Camellia sinensis* aqueous extract were added to 5 mL of 10^{-3} M HAuCl_4 solution. Then the solution was stired for 30 sec. The aqueous solutions turned from an initial yellowish color into pale violet and red, as signal of AuNp formation. Details of the present protocol can was reported by Vilchis *et al.* (2008).

2.3 Characterization

UV-Vis: spectral analysis was performed on a PerkinElmer spectrophotometer, (Lambda 650 UV-Vis) with a resolution of 1 nm. The AuNP's formation was monitored collecting the plasmon resonance absorption band of the reaction mixture every 30 min and 4 h. up to 24 h.

Transmission Electron Microscopy (TEM): TEM studies were carried out using a JEOL 2010 microscope operating at 200 kV accelerating voltage. Samples were prepared by placing a drop of the AuNP colloidal suspensions obtained by both chemical and biological procedures, on carbon-coated copper grids of 200 mesh. At least 10 representative images of each sample were recorded. Particle size distribution was obtained by counting more than ca. 300 particles for each sample. Particle size diameter was calculated with the equation $d_{avg} = \sum(n_i d_i) / \sum n_i$, where n_i is the number of particles of diameter d_i .

2.3 Acute Toxicity

For this analysis used male mice strain were CD- 1SD to 6 weeks of age and with body weight of 20 ± 5 gr, the animals were kept in a closed under ambient conditions fourth controlled temperature and relative humidity of 22°C and $55 \pm 10\%$, respectively, and periods of light / dark of 12 hours each. Animals were randomly divided in 3 groups: Group I (control), Group II – animals exposed to AuNP from chemical synthesis (AuBH- 27.68mg/Kg) and Group III – animals exposed to biogenic AuNP (AuC.s.- 28.19mg/Kg). These regulations conform to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 420 (1995).

Animals (rats) were treated via injection with AuNp intra-peritoneal administered after at least 5 d of adaptation. They were observed frequently on the day of treatment during 10 hours. Animals were weighed and described daily during 14 d. Dead animals were autopsied and examined macroscopically At the end of the experiments all animals were sacrificed and autopsied for toxicological evidences.

2.4 Sub-acute toxicity

The test substance was intraperitoneal administered daily in graduated doses to several groups of experimental animals, one dose level per group for a period of 28 days. During the period of administration the animals are observed closely, each day for signs of toxicity. Animals which die or are killed during the test are necropsied and at the conclusion of the test surviving animals are killed and necropsied. The maximum volume of liquid that can be administered at one time depends on the size of the test animal. The volume should not exceed 1ml/100g body weight, except in the case of aqueous solutions where 2ml/100g body weight may be used. These regulations conform to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 407 (1995).

2.4 Histopathology

Macroscopic examination of vital organs was performed seeking for abnormalities. Tissue from kidney and liver from all treatments (groups I, II and III) was fixed in a FAA (formaldehyde, ethanol, acetic acid) during 48 h. Samples were conventionally processed for paraffin embedding. Sections of $10\mu\text{m}$ were stained with

Haematoxylin–Eosine and observed with a light microscopy (Axiostar Plus, Carl Zeiss Germany). Histological changes of the typical structure of the tissues were characterized in the randomly selected sections. Histopathological changes were documented with an Axiocam 5 RMC (Karl Zeiss, Germany).

2.5 Histolocalization by Epifluorescence Microscopy

Tissue was fixed in FAA (3.7 % formaldehyde, 50% ethanol, 5 % acetic acid) for at least 48h. After three rinses in distilled water tissue was infiltrated in a series of increasing concentration of sucrose (5, 10, 15 and 20%) in Sorensen's phosphate buffer (0.1 M) for 1.5 h each. Then the tissue was transferred to a series of 20% sucrose solution: O.C.T embedding medium (Tissue-tec) in the proportion of 2:1, 1:1, 1:2 for 2h each and 100% O.C.T for 8 h. at 4 °C.

Sections of 15µm were obtained with a digital cryostat (SLEE cryostat MTC, Germany) at -20°C Sections were mounted on glycerin and observed in an Epifluorescence Microscope Axioskop 2 Plus (Karl Zeiss, Germany) using a excitation and emission. Images were captured with a MRc5 Axiocam (Zeiss, Germany) using a Axiovision Software.

3. Results

3.1 Synthesis and characterization of gold nanoparticles (AuNp)

It is well known that the NaBH₄ is a strong reducing agent and it has been widely used for AuNPs synthesis (Rutkowsky *et al.* 2008). In Figure 1(a) shows the UV-Vis varying the concentrations of reducer in the same conditions of synthesis, where it is clear that the higher concentration of SPR is to 3ml of reducer (NaBH₄) with a length of wavelength of 538 nm, indicating that this concentration there is an increased generation of AuNp's with greater uniformity, whereas in Figure 1(b) shows the UV-Vis spectrum of AuNp system with 3 ml of NaBH₄ at different reaction times in an interval of 30 minutes to 24 hours of reaction, where it is seen that the system reaches its stability at 24 have the highest production of nanoparticles. Figure 1(c) shows the TEM micrographs of AuNp system with 3 ml of NaBH₄, where predominant morphology is spherical with some agglomeration, the sizes are less than 50 nm; the crystal structure of this system was obtained by analyzing electron diffraction pattern (SAED) proving to be a FCC crystal structure. In Figure 1(d) shows the frequency histogram obtained by metering the TEM micrographs, with a total of 50 micrographs for this system, obtaining a size range between 7.5-10 nm, with an average of 8.2 nm.

The extract of *Camellia sinensis* is a compound capable of reducing the metal ion of gold as reported by our group previously (Vilchis *et al.* 2008). A novel method of bioreduction, helps control the size and stability of AuNp, this is due to the presence of polyphenols in the green tea plant such as gallic acid and catechins in large quantities (Zaveri 2006). In Figure 2(a) shows the UV-Vis varying the concentrations of reducer in the same synthesis conditions for each one, where it is seen that the greatest concentration presents SPR is to 0.6ml of the aqueous extract of *C. sinensis* with a wavelength of 540nm, which indicates that this generation there is a higher concentration of AuNp more homogeneous than the other systems with reduced *C. sinensis*, while in

Figure 2(b) shows the UV-Vis spectrum AuNp system (AuNp) with 0.6ml of the aqueous extract of *C. sinensis* at different reaction times in an interval of 30 minutes to 24 hours of reaction, where it is seen that the system reaches its stability at 24 have the highest production of nanoparticles. In Figure 2(c) shows the TEM micrographs of AuNp system with 0.6ml of the aqueous extract of *C. sinensis*, wherein it is noted that the morphology is predominantly spherical structures is important to note that the metal nanoparticles are embedded and stabilized by referring to extract biomass, with sizes smaller than 100 nm, the crystal structure of this system was obtained by SAED. In Figure 2(d) shows the frequency histogram obtained by measuring AuNp's in TEM micrographs.

Both routes synthesis chemical and biological of AuNp differ in aspects of size, morphology and dispersion medium in which they are present, may be the AuNp presents the great o less toxicity to evaluation of each systems, especially the atmosphere that they are, was evaluated by acute and subacute toxicity.

3.2 Toxicity results

The evaluation toxicity of AuNp for acute exposed was administered to mouse different concentrations of AuNp synthesized by two synthetic methods (chemical and biological) shown in Table 1, where the doses are expressed in mg / kg for each of the mouse different batches, doses ranged from 1 to 16 administrations over a period of 24 hours, its method of administration was intraperitoneal.

The variables measured are: body weights of the mouse, daily feed intake and daily water intake from day 0 to day 14. Importantly, there was only one death for the group treated with AuNp /NaBH₄ for the highest dose (16 doses). There is evidence that there is an acute harmful during his administration. After 14 days of observation, were sacrificed for macroscopic observation of the organs (liver, kidney, testes, heart and spleen), showing necrotic parts in the livers compared to the controls, the opposite of other organs showed no noticeable changes, indicating that AuNp have a strong affinity with the liver as this is the main blood supply and organ responsible for removing harmful substances from the blood to the body. Table 2 and table 3 shows the daily feed intake, daily water intake and relative weights of the organs, where they are compared with the control groups. The results show significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between the relative weights of organs for the treated groups with AuNp reduced by the two methods, giving evidence of the interaction of AuNp with the body, which causes increases in the relative weights of organs without even cause death.

The results are based on the exposure of AuNp in a subacute toxicity for 28 consecutive days help us to evaluated possible damage to AuNp for organism over the constant time to administration in each batch analyzed; the systems are reduced to gold with 3 ml of sodium borohydride reduced gold and 0.6mL of the aqueous extract of *Camellia sinensis*. All systems were administered at 24 hours after the reaction was initiated for nanometer system. For the administered doses are taken at the highest dose of acute toxicity (Table 1) at a dilution 1/100. We analyzed the same issues as in acute toxicity. Where the results shows in Table 4 the daily

feed intake, daily water intake and relative weights of the organs, where they are compared with the control groups. The results show significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ between the relative weights of organs for the treated groups with AuNp reduced by the two methods, giving evidence of the interaction of AuNp with the body, which causes increases in the relative weights of organs without even cause death.

For each toxicological studies didn't show significant mortality then were analyzed were more committed organs as liver and kidney, because they are the responsible of blood flow for a body detoxification and we could find specific and related areas to deposition AuNp, using the optical properties (fluorescence) to AuNp. After that we analyzed the cell structure to determinate alterations and the general histology to liver and kidney.

3.4 Histolocalization

This analysis provides the support for the toxicology of AuNp synthesized by two methods to determine the area where the nanoparticles are deposited. Is necessary to supplement the results obtained in acute and subacute toxicity, because anybody specimen died by different doses administered, but increased the relative weight of some organs such as liver and kidneys because they are the main blood supply to organs. Is important to know whether the AuNp are deposited in blood ducts and identify principal areas in different organs, in which are stored using of the optical property AuNp (fluorescence). The cuts were compared with a control to determine differences between them. Figure 3 shows different cuts of liver, which compares the control liver (1a-1c) and liver treated with gold nanoparticles reduced with NaBH_4 (2a-3c) where fluorescent zones are observed in the periphery of the central veins, arteries bile and blood ducts corresponding to the optical response of AuNp with the wavelength blue (397nm) and green (519nm) filters of Epifluorescence Microscope, where the blue filter give a better response. Importantly, the micrographs Figure 3 (2a,3a) are observed brown accumulations due to the existence internal bleeding at point causing necrotic in tissues.

Figure 4 shows the different cuts of kidneys. A comparison is made between the control kidney (1a-1c) and kidney treated the system of AuNp reduced with NaBH_4 (2a-3c), where there are areas that fluoresce more intensely than the kidney control. This difference in fluorescence is due to the presence of AuNp and its interaction with beam microscope. There is a higher intensity in the areas of epithelia

Figure 5 shows different liver slices, which compares the control liver (1a-1c) and liver treated with AuNp reduced with aqueous extract of *Camellia sinensis* (2a-3c) where fluorescent zones are observed on the periphery of central veins, arteries and blood ducts corresponding to the optical response of AuNp to the wavelength of blue (397nm) and green (519nm) filters of Epifluorescence Microscope, showing better response for blue filter. Importantly, the micrographs Figure 5 (2a, 3a) are observed brown accumulations due to the existence internal bleeding at point causing necrotic in tissues.

Figure 6 shows the different cuts of kidneys, a comparison is made between the control kidney (1a-1c) and kidney treated with AuNp reduced with aqueous extract of *Camellia sinensis* (2a-3c), where there are areas that

fluoresce more intensely than the kidney control. This difference in fluorescence is due to the presence of AuNp and its interaction with the beam of the microscope. There is a higher intensity in the areas of epithelia.

In slices of liver and kidney were in contact with AuNp systems reduced by the two methods showed degenerative changes (general necrosis) when analyzed in brightfield optical microscopy to be factors of importance, since it is considered a direct effect of AuNp exposure with organ (usually irreversible). Hepatic necrosis is a common response to toxic exposure; this response was observed in all treatments compared with control groups.

3.5 Histopathology

This technique can assess the histopathological alterations of the cells in the liver and kidney slices treated with AuNp synthesized by two methods, comparing the sections with a control to assess histologic differences. Were located specific areas of tissue associated with liver damage were presented abnormalities (Agamy 2012). The livers and kidneys of the control groups showed a normal histology. For the liver, the hepatocytes and cytoplasm are homogeneous; the central veins and epithelial cells and ducts are clearly visible. While shown for kidney epithelia, tubules and glomeruli are clearly.

For the tissues were exposed to AuNp shows an impact such exposure. The histopathological changes of liver and kidney have a harmful effect on health (Salamanca et al. 2008), Differences were found between the exposed AuNp cuts with cuts control. Liver changes affecting specific areas causing damage to health (Agamy 2012).

In Figure 7 refers to the liver slices control, showing histologies homogeneous, where the parenchyma of tissue is uniform. For liver slices exposed AuNp reduced with NaBH_4 (Figure 9) and AuNp reduced with *C. sinensis* (Figure 10), identifies changes in histology due to the ability of nanoparticles to altered liver cells, there being differences between control and treated sections, these cuts are observed liver lobes slightly fuzzy, the cytoplasm of some cells showing empty spaces, opening of cells and chromatin condensation. In some cases is fully exposed chromatin in the vicinity of the sinusoids.

Figure 11 shows cut kidney control showing homogeneous histologies in glomeruli and renal tubules. For kidney slices exposed AuNp reduced with NaBH_4 (Figure 12) and AuNp reduced with *C. sinensis* (Figure 13), identifies changes in histology caused by AuNp in renal cells, with differences between control and treated cuts; in these cuts the epithelia and glomeruli are observed slightly larger, showing voids and openings of cells as well as chromatin accumulation to glomeruli.

Conclusions

There are differences between synthetic methods for obtaining AuNp. The differences are found in the size and shape of nanoparticles obtained by reduction of Au⁺³ with NaBH₄ and the aqueous extract *Camellia sinensis*, where the biological method larger sizes than sizes obtained by chemical method. In toxicological studies not showed mortality in either analysis for acute or subacute toxicity, but here are significant differences in the relative weights of the organs. To support results of toxicological analyses was necessary to assess the most likely areas in which are deposited AuNp, was chosen liver and kidney because are the most important organs for metabolism, detoxification and excretion of toxic substances, from this were performed and analyzed sections of these organs, first determined by histolocalization of AuNp (Epifluorescence) where fluorescence and showed that the most zones to find AuNp was periphery of hepatic veins (liver) and epithelia (kidney) due to the amount blood are present. In the end we analyzed the histopathology of the organs showing histology changes in liver and kidney slices, as chromatin exposure (liver) and increased glomerulli (kidney) also alters the general parenchyma of structures cells. It is important to note that although there is not apparent mortality either synthetic routes of AuNp, if do an accumulation and alteration at the cellular level considerably.

Acknowledgment

G. Cruz-Montufar acknowledges CONACYT grant 248452 and Materials Science Postgraduate Program of UAEM. Financial support provided by UAEM project 3228/2012U. Part of this work was also supported by a PROMEP grant (FE03/2010 (103.5/09/7342). This project was supported by a grant from the National Institute on Minority Health and Health Disparities (G12MD007591) from the National Institutes of Health.

References

1. Abraham, S., Kim, I., Batt, C.A., A facile preparative method for aggregation-free gold nanoparticle using poly(styrene-*block*-cysteine (2007), *Angewandte Chemie*, 46, 5720-5723; DOI: 10.1002/anie.200701060.
2. Agamy, E., Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant (2012), *Ecotoxicity and Environmental Safety*, 72, 171-179.
3. Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J.R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., Gardea-Torresdey, J.L., Size controlled gold nanoparticles formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology (2004), *Journal of Nanoparticle Research*, 6, 377-382.
4. Avila, H., Moreno, K.J., Moggio, I. Arias, E., Castruita, G., Vazquez, R.A., Medellin, D.I., Ziolo (2008), Nanopartículas de plata y oro funcionalizadas *in situ* con el polímero conjugado fluorescente pPET3OC12-sqS. Síntesis, propiedades morfológicas, ópticas y eléctricas, *Superficies y Vacío*, 21(1), 20-25.

5. Baia, L., Simon, S., UV-Vis and TEM assessment of morphological features of silver nanoparticles from phosphate glass matrices (2007), *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 576-583.
6. Bali R., Razak, N., Lumb, A., y Harris, A. T., The synthesis of metallic nanoparticles inside live plants, *Laboratory for Sustainable Technology* (2006), School of Chemical and Biomolecular Engineering, The University of Sydney, 224-226.
7. Brzóska, M.M., MoniuszkoJakoniuk, J., Pilat Marcinkiewicz B., Sawicki B., Liver and kidney function and histology in rats exposed to Cadmium and Ethanol, *Alcohol and Alcoholism* (2003), 38(1), 2-10.
8. Chandran, S.P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M., Synthesis of gold nanotriangles and silver using *Aloe vera* plant extract (2006), *Biotechnology*, 22, 577-583.
9. Dahl, J.A., Maddux, B.L., Hutchison, J.E., Toward greener nanosynthesis (2007), *Chemical Review*, 107, 2228-2269.
10. Daniel, M.C., Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis and nanotechnology, *Chemical Review* (2004), 104, 293-346.
11. Delgado, G.C., Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales (2009), *Redalyc, Estudios Sociales*, 17(4), 186-205.
12. Gould, P., Nanoparticles probe biosystems (2008), *Materials Today*, ISSN:1369 702
13. Huang, X., El-Sayed, M., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy (2010), *Journal of Advanced Research*, University of Cairo, (1), 13-28.
14. Kelly, K.L., Coronado, E., Zhao, L.L., Schatz, C., The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment (2003), *Journal Physics and Chemical*, 107(3), 668-677.
15. Kumar V. and Yadav S. K., Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications (2009), *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84-2, 151-157.
16. Lin, W., Huang, Y., Zhou, X-D., Ma, Y., In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells (2006), *Toxicology and applied Pharmacology*, 217, 252-259.
17. Lowry, G.V., Gregory, K.V., Apte, S., Lead J.R. Transformations of Nanomaterials in the Environment (2012), *Environmental Science & Technology* 46, 6893 –6899.
18. Mohanpuria, P., Rana, N. K., Yadav, S. K., Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications (2008), *J. Nanopart. Res.* 10, 507-517.
19. Nguyen, D., Kim, D., Kim, K., Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles (2007), *Micron*, 42, 207-227.
20. Noguez, C. Propiedades ópticas de nanoparticulas metálicas (2008), *Instituto de Física, UNAM*, 1-29.
21. Parkkola, H., Vivero, L., Vega, M., Ramis, M., Querol, J., Sendra, J., Metallic nanoparticles and in vitro cytotoxicity assessment (2010), *Endor Nanotechnologies*, España, 351-377.

22. Roldan, M.V, Frattini, A.L., Sanctis, de O.A. y Pellegrini, N. S., Nanopartículas metálicas con formas diversas (2005), *Anales AFA*, 17, 212-217pp.
23. Robbens, J., Vanparys, C., Nobels, I., Blust, R., Van Hoecke, K., Janssen, C., De Schampelaere, Roland K., Blanchard, G., Silvestre, F., Gillardin, V., Kestemont, P., Anthonissen, R., Toussaint, O., Vankoningsloo, E., Saout, C., Alfaro-Moreno, E., Hoet, P., Gonzalez, L., Dubruel, P., Troisfontaines, P., Eco-, geno- and human toxicology of bio-active nanoparticles for biomedical applications (2010), *Toxicology*, 269, 170-181.
24. Rutkowsky, S. A. y Boritz, C., Solomon S. D., Bahadory M., Jeyarajasingam A. V., Synthesis and study of silver nanoparticles (2007), *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322-325.
25. Salamanca, M.J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M.L., Del Valls, T.A., Evaluation of the toxicity of an oil spill conducted through bioassays using the fish *Solea senegalensis k* (2008), *Ciencias Marinas*, 34(3), 339-348.
26. Saleki, S., Arlidan, F.A., Nejad, A.J., Liver histopathology of fatal phosphine poisoning (2007), *Forensic Science International*, 166, 190-193pp.
27. Sau, T.K., Murphy, C.J., Room temperature, High-yield synthesis of multiple shapes of gold nanoparticles in aqueous solution (2004), *American Chemical Society*, 126, 8648-8649.
28. Shankar, S.S., Rai, A., Ahmad, A. y Sastry, M., Controlling the optical properties of Lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potential application in Infrared- Absorbing optical coatings (2005), *Chemistry Materials*, 17, 566-572.
29. Sharma, N.C., Sahi, S.V., Nath, S., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L., Pal, T., Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials (2007), *Environmental Society Technology*, 41, 5137-5142.
30. Sintés, J.R., ¿Cómo afectaran los productos nanotecnológicos a los seres vivos?, Instituto para la Salud y Protección del Consumidor (2010), Unidad de Nanobiociencias.
31. Vilchis-Nestor, A., Sánchez, V., Camacho, M.A., Gómez, R.M., Camacho, M.A., Arenas, J.A., Solventless synthesis and optical properties of Au nanoparticles using *Camellia sinensis* extract (2008), *Materials Letters*, 62, 3103-3105.
32. Zaveri, N.T., Green tea its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications (2006), *Life Sciences*, 78, 2073-2080.

Table Captions

Table 1. Doses gold nanoparticles administered.

Table 2. Relative weight for the first part of investigation (Acute toxicity)

Table 3. Relative weight for the second part of investigation (Acute toxicity)

Table 4. Relative weight of investigation (Subacute toxicity)

Figure Captions

Figure 1. Chemical method: (a) UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles formed after 24h of the reaction of different amounts of NaBH₄ (1,2,3,4 and 5 ml; curves 1-5 respectively; final volume of reaction mixtures adjusted of 10 ml using de-ionized water) with 5ml of 10⁻³M aqueous solution HAuCl₄. (b). UV-Vis spectra of gold nanoparticles measured during the reaction of 5 ml of 10⁻³M aqueous solution HAuCl₄ with 3mL of NaBH₄ (final volume of reaction mixture adjusted to 10 ml using de-ionized water) after 30 min- 24h of reaction (curves 1-6, respectively); the inset is a plot of the intensity of the surface plasmon resonance bands centered at 538 nm against the reaction time; (1, 2, 3, 4 and 5 at 30, 60, 90, 120 and 240 minutes, respectively). (c) Representative transmission electron micrograph of AuNp's formed after 24h of reaction which correspond to curves 5 y 6 in figures 1A and 1B, respectively. The inset shows the electron diffraction pattern of the gold nanoparticles from the micrograph. Rings 1,2,3,4 and 5 arise due to reflections from the (111), (200) and (311) lattice planes of FCC gold structure. (d) Histogram of size distribution of AuNp's synthesized by the experiment using 5mL of NaBH₄ as reducing agent. The average size range is from 7.5 to 10nm.

Figure 2. Biological method: (a) UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles formed after 24h of the reaction of different amounts of *Camellia sinensis* aqueous extract (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1ml; curves 1-5 respectively; final volume of reaction mixtures adjusted of 10 ml using de-ionized water) with 5ml of 10⁻³M aqueous solution HAuCl₄. (b). UV-Vis spectra of gold nanoparticles measured during the reaction of 5 ml of 10⁻³M aqueous solution HAuCl₄ with 0.6 ml of *Camellia sinensis* aqueous extract, the final volume of reaction mixture adjusted to 10mL using de-ionized water, at different times (from 30 min to 24h; curves 1-6, respectively); the inset is a plot of the intensity of the surface plasmon resonance bands centered at 540 nm against the reaction time; (curves 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to 30, 60, 90, 120 and 240 minutes, respectively). (c) Representative transmission electron micrograph of AuNp's formed after 24h of reaction (curves 5 y 6 in figures 2A and 3B, respectively). The insert shows the electron diffraction pattern of the gold nanoparticles from the micrograph. Rings 1, 2, 3 and 4 arise due to reflections from the (111), (200) and (220) lattice planes

of FCC gold structure. (d) Histogram of size distribution of AuNp's synthesized by the experiment using 0.6 ml of *Camellia sinensis* aqueous extract as reducing and stabilization agent. The average size distribution is 20 to 24nm.

Figure 3. Photographs obtained by epifluorescence microscopy. Photographs of the liver control 1 (a-c) and photographs of the liver treated with gold nanoparticles reduced with NaBH₄ (2a-3c).

Figure 4. Photographs obtained by epifluorescence microscopy. Photographs of the kidney control 1 (a-c) and photographs of the kidney treated with gold nanoparticles reduced with NaBH₄ (2a-3c).

Figure 5. Photographs obtained by epifluorescence microscopy. Photographs of the kidney control 1 (a-c) and photographs of the kidney treated with gold nanoparticles reduced with *Camellia sinensis* (2a-3c).

Figure 6. (1) Control murine liver. It is composed of hexagonal lobes with the central veins and hepatic triads. Hepatocytes are organized from the central vein and are separated by sinusoids homogeneous. Are regular and contain a core spheroidal and distribution of peripheral chromatin (photographs 1a-b, to x40 and x10, respectively). (2) Murine liver exposed to AuNp reduced with NaBH₄. In most cellular structure of liver lobules are seen slightly blurred. In cytoplasm of cells are shown some empty spaces vacuole type and openings cells (photographs 2a-b, to x40 and x10, respectively). (3) Murine liver AuNp exposed to reduced aqueous extract of *Camellia sinensis*. The structure cellular of liver are lobules seen slightly blurred. In the cytoplasm of some cells show empty spaces and openings vacuole type of cells present erythrocytes exposed breasts and cell infiltration (photographs 3a-b, to x40 and x10, respectively)

Figure 7. (1) Kidney control. The collecting ducts are lined with cuboidal epithelium with a small simple and interstitial accumulation of chromatin (photographs 1a-b, to x40 and x10, respectively). (2) Kidney exposed to AuNp reduced with NaBH₄. Some tubular epithelial cells showed edema leaving exposed chromatin (photographs 2a-b, to x40 and x10, respectively). (3) Kidney exposed to AuNp reduced with *Camellia sinensis*. Some vascular glomeruli increased in size with characteristics of edema, leaving exposed chromatin in some cases (photographs 3a-b, to x40 and x10, respectively)

Figura 1

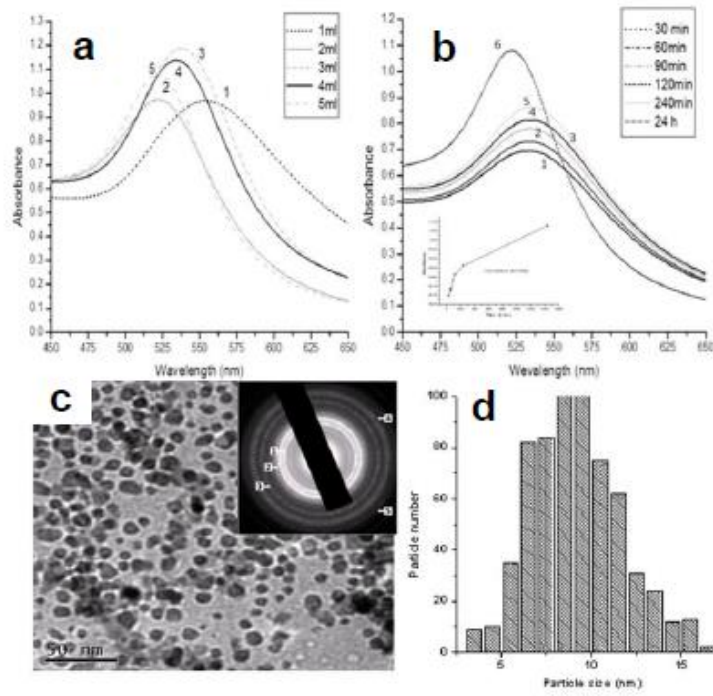


Figura 2

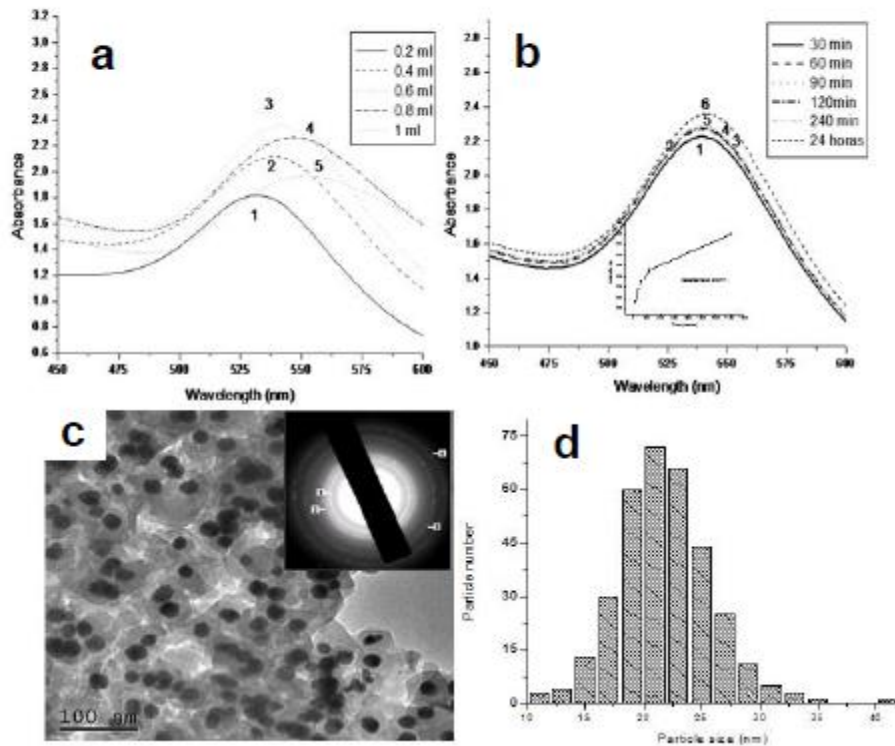


Figure 3.

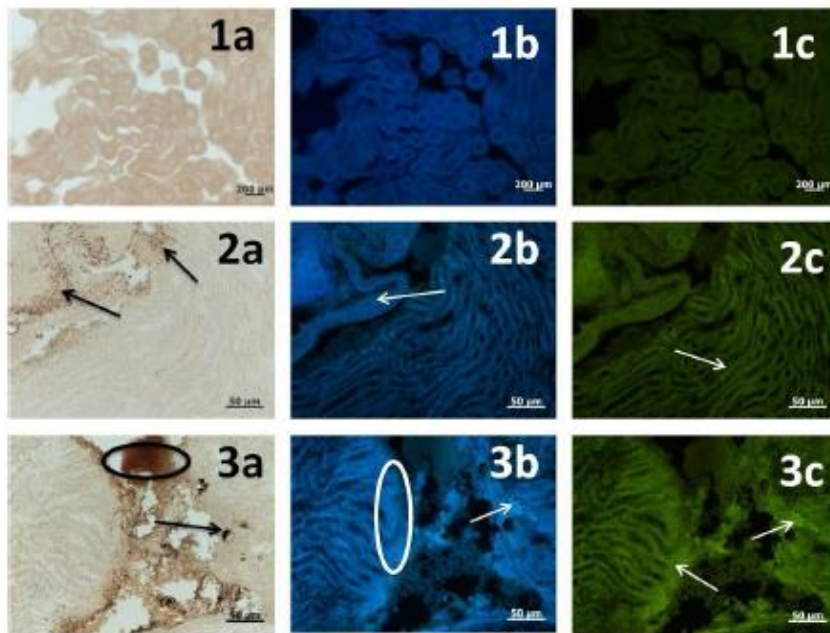


Figure 4.

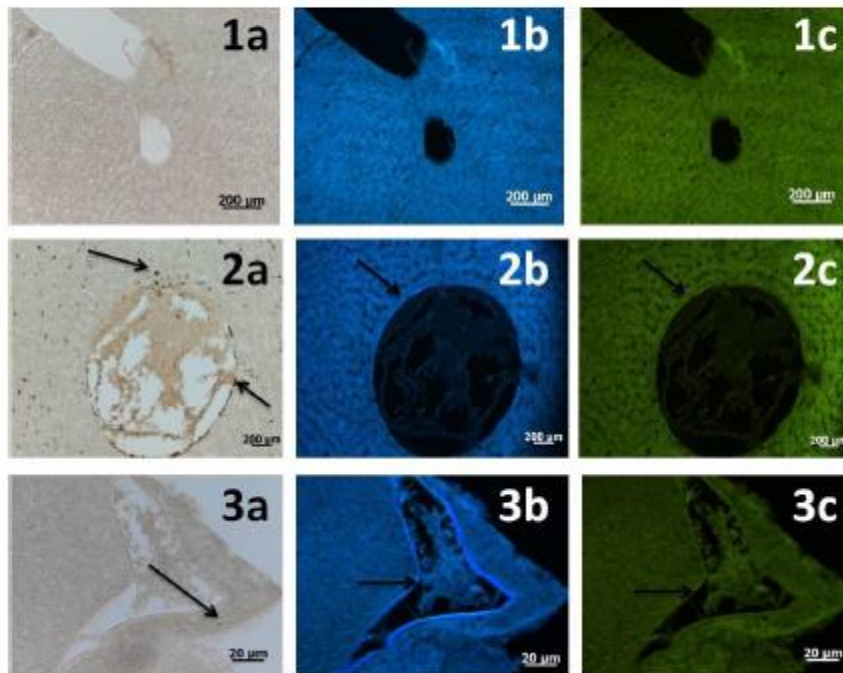


Figure 5.

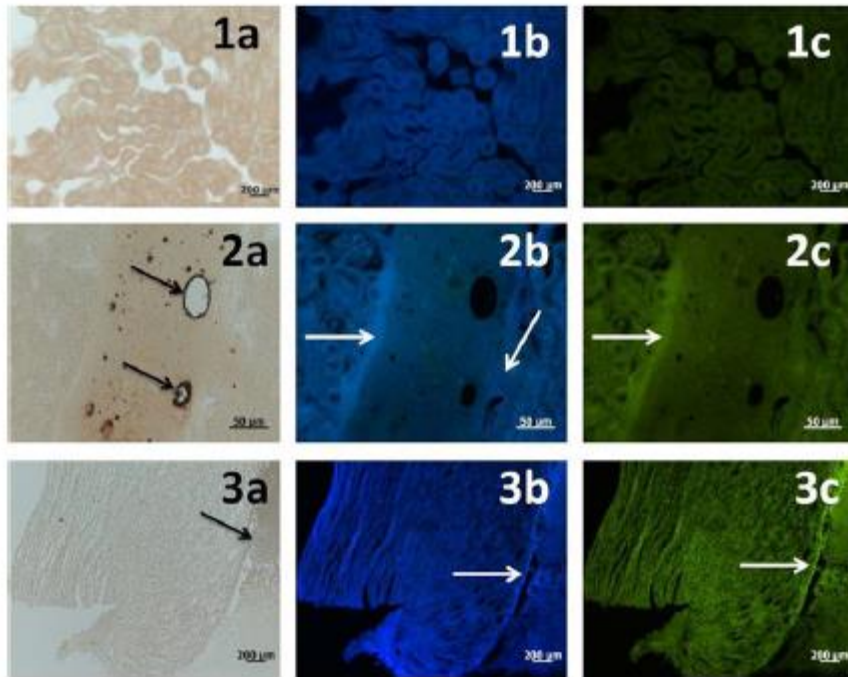


Figure 6.

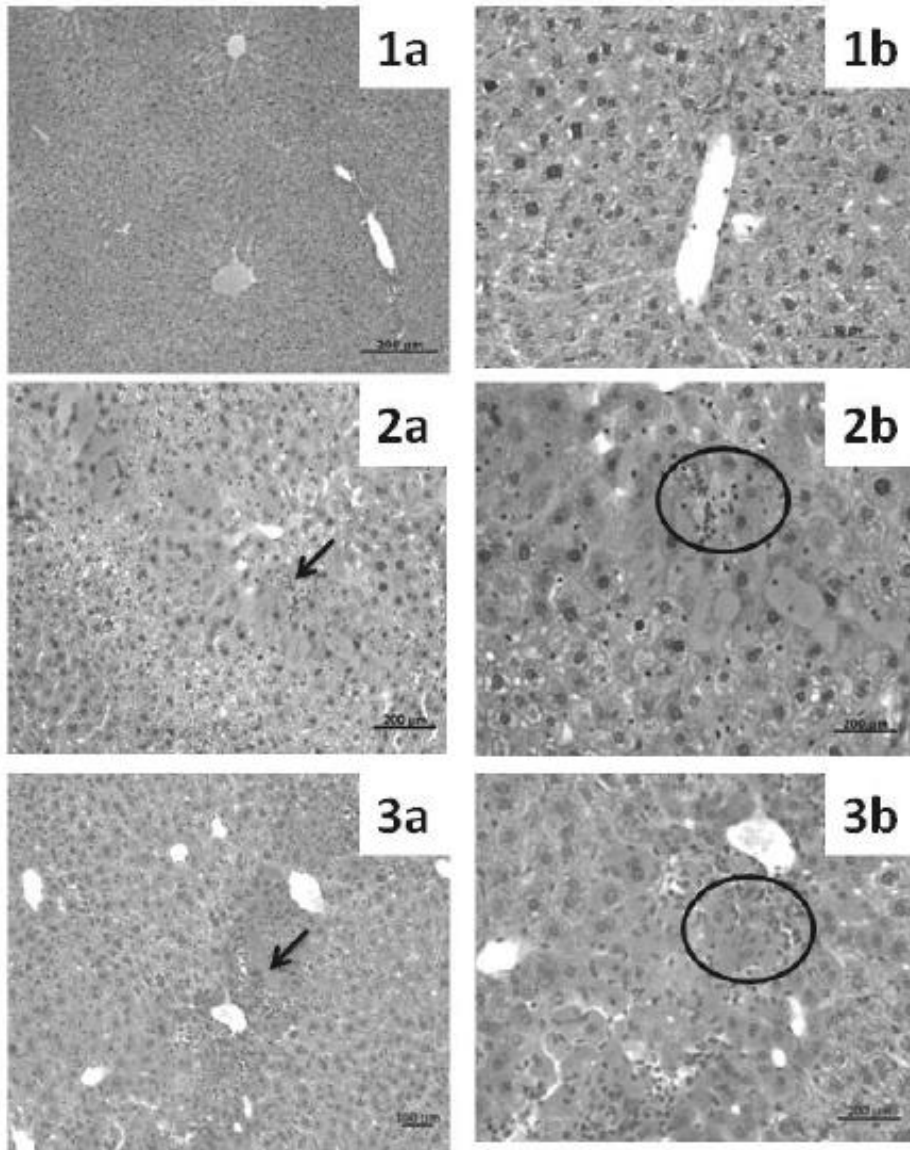


Figure 7

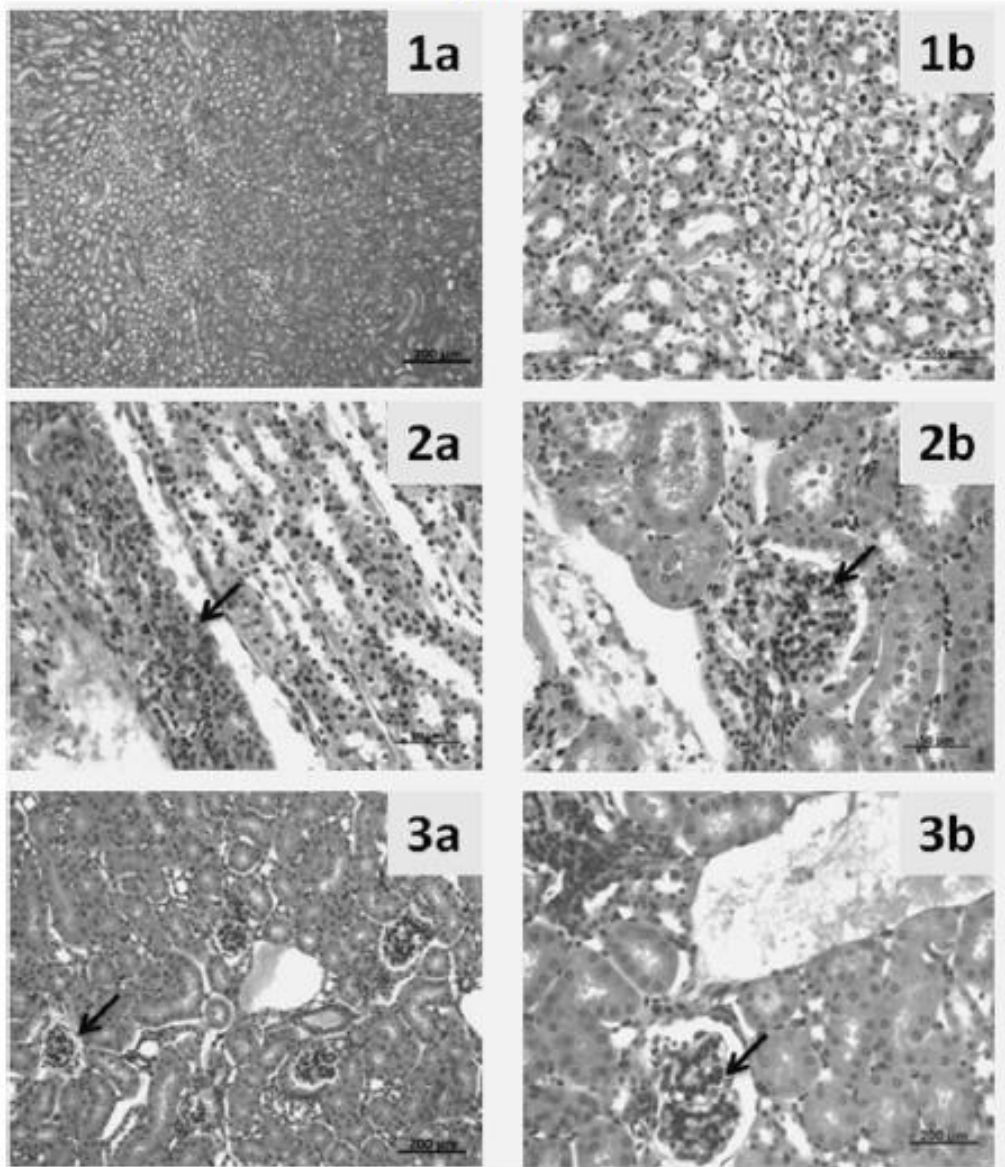


Table 1. Doses gold nanoparticles administered.

Substance	1st part of investigation		2nd part of investigation	
	Doses (mg/kg)	Mortality	Doses (mg/kg)	Mortality
Au-NaBH ₄	1.73	0/3	13.84	0/3
	2.87	0/3	27.68	1/3*
	5.74	0/3		
Au-C. sinensis	1.76	0/3	14.09	0/3
	3.52	0/3	28.19	0/3
	7.05	0/3		

* Number of animals which died/number of animals used

Table 2. Relative weight for the first part of investigation (Acute toxicity)

Treatment	DF (g)	DFI (mL)	LRW(%)	KRW (%)	TRW (%)	HRW (%)	SRW (%)
Control ^a	22.15 ± 4.59	30.75 ± 9.53	6.56 ± .305	0.77 ± 0.033	0.34 ± 0.068	0.57 ± 0.031	0.32 ± 0.053
HAuCl ₄ ^b	20.1 ± 2.87	30.75 ± 3.86	6.33 ± 0.321	0.83 ± 0.034	0.22 ± 0.145	0.62 ± 0.072	0.74 ± 0.405
NaBH ₄ ^c	21.5 ± 3.24	32.75 ± 6.13	6.27 ± 1.10	0.76 ± 0.052	0.16 ± 0.038	0.58 ± 0.054	0.29 ± 0.033
C. sinensis ^d	20.57 ± 1.4	26.5 ± .57	6.3 ± 0.1	0.84 ± 0.038	0.18 ± 0.068	0.65 ± 0.151	0.35 ± 0.029
1Au-BH ^e	20.8 ± 3.42	40.25 ± 4.5	6.3 ± 1.51	0.73 ± 0.083	0.36 ± 0.051	0.67 ± 0.072	0.36 ± 0.066
2 Au-BH ^f	20.55 ± 2.69	40.25 ± 4.5	6.3 ± 1.51	0.73 ± 0.081	0.24 ± 0.174	0.78 ± 0.314	0.65 ± 0.426
3Au-BH ^g	22.6 ± 3.54	35.25 ± 4.11	6.86 ± 0.118	0.78 ± 0.075	0.34 ± 0.064	0.58 ± 0.060	0.36 ± 0.066
1 Au-C. sinensis ^h	22.82 ± 2.97	33 ± 3.55	6.66 ± 0.451	0.81 ± 0.069	0.21 ± 0.123	0.57 ± 0.058	0.34 ± 0.029
2 Au-C. sinensis ⁱ	24.22 ± 2.86	28.75 ± 1.892	6.03 ± 0.288	0.82 ± 0.069	0.37 ± 0.072	0.57 ± 0.059	0.39 ± 0.156
3 Au-C. sinensis ^j	22.25 ± 0.581	35.5 ± 7.59	6.26 ± 0.028	0.75 ± 0.027	0.23 ± 0.156	0.55 ± 0.054	0.36 ± 0.066

Data are presented as mean ± SEM(standard error of the mean). n=3

DF: daily food, DFI: daily fluid intake, LRW: liver relative weight, KRW: kidneys relative weight, TRW: testicle relative weight HRW: heart relative weight, SRW: spleen relative weight,.

*P<0.05 , **P<0.01

Table 3. Relative weight for the second part of investigation (Acute toxicity)

Treatment	DF (g)	DFI (ml)	LRW (%)	KRW (%)	TRW (%)	HRW (%)	SRW (%)
Control	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.96 ± 0.288	0.73 ± 0.057	0.30 ± 0.056	0.57 ± 0.120	0.32 ± 0.027
HAuCl ₄	15.05 ± 2.200	21.5 ± 7.14	5.5 ± 0.655	0.61 ± 0.081	0.38 ± 0.063	0.52 ± 0.056	0.35 ± 0.035
NaBH ₄	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.83 ± 0.723	0.76 ± 0.152	0.36 ± 0.052	0.56 ± 0.058	0.34 ± 0.102
<i>C. sinensis</i>	17.47 ± 3.31	27 ± 2.161	6.13 ± 0.651	0.73 ± 0.057	0.36 ± 0.083	0.57 ± 0.049	0.37 ± 0.071
4Au-BH	15.37 ± 1.22	30.75 ± 3.31	6.20 ± 1.71	0.75 ± 0.219	0.21 ± 0.113	0.54 ± 0.227	0.34 ± 0.050
5 Au-BH	14.07 ± 2.53	22.75 ± 2.62	4.20 ± 3.66	0.51 ± 0.445	0.23 ± 0.204	0.48 ± 0.427	0.30 ± 0.011
4 Au- <i>C.sinensis</i>	12.05 ± 5.36	19.75 ± 2.06	6.16 ± 1.078	0.74 ± 0.216	0.34 ± 0.066	0.65 ± 0.196	0.29 ± 0.021
5 Au- <i>C.sinensis</i>	12.7 ± 7.15	18 ± 4.69	5.93 ± 0.461	0.76 ± 0.104	0.20 ± 0.099	0.55 ± 0.056	0.32 ± 0.076

Data are presented as mean ± SEM(standard error of the mean). n=3

DF: daily food, DFI: daily fluid intake, LRW: liver relative weight, KRW: kidneys relative weight, TRW: testicle relative weight HRW: heart relative weight, SRW: spleen relative weight,.

*P<0.05 , **P<0.01

}

Table 4. Relative weight of investigation (Subacute toxicity)

Tratamiento	Dosis (mg/kg) (1/100)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control SSI ^a	-	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.70 ± 0.245	0.73 ± 0.028	0.377 ± 0.056	0.455 ± 0.043	0.351 ± 0.213
NaBH ₄ ^b	10 ⁻² M	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.60 ± 7.90	0.70 ± 0.70	0.384 ± 0.044	0.519 ± 0.040	0.316 ± 0.050
Au-BH ^c	22.9984	30.94 ± 8.64	56 ± 10	6.00 ± 8.60	0.80 ± 1.30	0.209 ± 0.099	0.434 ± 0.057	0.334 ± 0.085
Au-C.s. ^d	28.2064	32.74 ± 1.12	47.20 ± 8.75	5.80 ± 9.99	0.70 ± 0.70	0.210 ± 0.092	0.482 ± 0.075	0.319 ± 0.048

Data are presented as mean ± SEM(standard error of the mean). n=5

DF: daily food, DFI: daily fluid intake, LRW: liver relative weight, KRW: kidneys relative weight, TRW: testicle relative weight HRW: heart relative weight, SRW: spleen relative weight,

*P<0.05

® ACUSE DEL ARTICULO ENVIADO

Journal of Nanoparticle Research
Comparative toxicity study of gold nanoparticles synthesized by chemical and biological routes
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Comparative toxicity study of gold nanoparticles synthesized by chemical and biological routes	
Article Type:	Original research	
Keywords:	Keywords: Gold nanoparticles, bioreduction, Camellia sinensis, Nanotoxicity, histolocalization.	
Corresponding Author:	ALFREDO RAFAEL VILCHIS-NESTOR, Ph.D. Centro Conjunto de Investigacion en Quimica Sustentable UAEM-UNAM TOLUCA, MEXICO MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Centro Conjunto de Investigacion en Quimica Sustentable UAEM-UNAM	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Maria Guadalupe Cruz-Montufar	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Maria Guadalupe Cruz-Montufar Maria Dolores Hernández-Navarro, PhD. Hilda Aracelí Zavaleta-Mancera, PhD Raúl Alberto Morales-Luckie, PhD ALFREDO RAFAEL VILCHIS-NESTOR, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (3688/2014/CIB) CONACYT (248452) National Institute on Minority Health and Health Disparities (G12MD007591)	Dr. ALFREDO RAFAEL VILCHIS-NESTOR B.Sc. Maria Guadalupe Cruz-Montufar Dr. ALFREDO RAFAEL VILCHIS-NESTOR
Abstract:	<p>Gold nanoparticles are one of the most studied nanomaterials due to their widely applications in sensors, electronic devices and medicine. Their optoelectronic and catalytic properties make them very valuable for numerous and novel applications. However exposure to gold nanoparticles might produce toxicological effects with humans or microbiota and further studies are required. Synthesis of gold nanoparticles can be achieved by physical, chemical and biological process, which employs biomolecules as reduction and capping agents. The aim of the present study is to contrast the toxicological effect between gold nanoparticles (AuNp) obtained by chemical and biological method with in-vivo studies. Chemical synthesis was performed with NaBH₄ as reducing agent; in contrast, biosynthesis was assisted by the aqueous extract of Camellia sinensis. Formation of Au NPs was followed by UV-Vis spectrometry, furthermore TEM studies were performed in order to describe the size and morphology of Au NPs. Gold NPs size ranged from 7.5 - 10 nm and 20 -24 nm for chemical and biological synthesis, respectively. Comparative toxicity of chemical and biogenic nanoparticles was performed with sub-acute in vivo murine models.</p>	
Suggested Reviewers:	ALFREDO P LUQUE MORALES, PhD PROFESSOR, Universidad Autonoma de Baja California	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	priscyluque@gmail.com
	CLAUDIA E GUTIERREZ WING, PhD RESEACHER , Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares claudia.gutierrez@inin.gob.mx
Additional Information:	
Question	Response
Scientific Justification (Available to Reviewers)	<p>Please find in an attached file, the manuscript "Comparative toxicity study of gold nanoparticles synthesized by chemical and biological routes" authors: M.G. Cruz-Montufar, M.D. Hernández- Navarro, H.A. Zabaleta-Mancera, R.A. Morales-Luckie and Alfredo-Rafael Vilchis-Nestor, which we submit for your consideration and possible publication in Journal of Nanoparticle Research.</p> <p>Since nanoscale materials are currently used in microelectronics, textiles, cosmetics and medical applications, is mandatory to obtain knowledge about their possible toxicological effects in living organism and the environmental impact. Thus, the aim of our present study is to compare the toxicological effects of gold nanoparticles obtained by two synthetic routes, chemical and biological, based an acute study and sub-acute for in-vivo models.</p> <p>Furthermore the results presented in this paper represent a significant advance in the preparation of gold nanoparticles using an environmentally friendly biosynthetic route. In this work, a common natural product, green tea (<i>Camellia sinensis</i>), has been employed as a reducing agent to promote formation, growth and stabilization of gold nanoparticles.</p>

3.1 Nanopartículas de Oro (AuNp).

3.1.1 Nanopartículas de oro reducidas con (NaBH₄).

Las nanopartículas de oro mediante la síntesis química, donde se hace reaccionar soluciones de ácido tetracloroáurico (10^{-3}M) con soluciones de borohidruro de sodio (NaBH₄) (10^{-2}M), variando el volumen del reductor de 1mL hasta 5mL, se monitorea mediante la Espectroscopía UV-Vis en la cual se espera una banda de plasmón a los 550 nm, aproximadamente. Las gráficas obtenidas presentan la evolución de la síntesis respecto al tiempo de reacción, que va desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción, en donde la reacción llega a su punto máximo después de haber sido iniciada la reacción.

Las soluciones presentaron una coloración característica de los sistemas nanométricos de oro (**Figura 17**), la cual refiere a la formación de dicho metal. Esta coloración aparece al momento de adicionar el reductor (NaBH₄), cambiando de amarillo claro a tonos violeta oscuro-rojo intenso; esto dependiendo del tamaño y forma que se presente después de su tiempo de nucleación.

Las **Figura 16 y 17** contienen los espectros de absorción de la muestra donde se hizo reaccionar la sal de oro (ácido tetracloroáurico) a una concentración (10^{-3}M) con varios volúmenes del reductor (NaBH₄); en este caso, se fue monitoreando el avance de la síntesis de reacción desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción. Se observa que la posición del plasmón se encuentra a una longitud de onda promedio de 534 nm ver **Tabla 10**; la bandas de absorción presentan una tendencia ascendente conforme transcurre el tiempo de reacción con un ligero desplazamiento hacia el rojo (red-shift), comportamiento que puede atribuirse a un aumento en el tamaño de las nanopartículas; al presentarse picos con cierta anchura indica una polidispersidad grande dentro del sistema el cual posteriormente se podrá corroborar con las otras dos técnicas analíticas (TEM y DLS).

La **Figura 17(g)** espectros de absorción respecto el volumen del reductor desde 1mL hasta 5mL, las lecturas se tomaron a un tiempo máximo de 24 horas a partir

de que se le adiciona el reductor a la solución, aquí se observa como los sistemas de 1mL, 2mL y 3 mL van de forma ascendente; presentando un plasmón más intenso con 3mL de NaBH₄, llegando a su punto máximo. Después ocurre un descenso en las intensidades para los sistemas a 4mL y 5mL; esto indica que el sistema a concentraciones mayores empieza a presentar algún tipo de precipitación o el sistema deja de presentar características nanométricas; presentando un desplazamiento significativo hacia el azul y un aumento considerable en el ancho de banda. Lo cual nos lleva a la conclusión que los mejores resultados son los del sistema que presenta una mayor absorbancia y menor ancho de banda es el que contiene 3mL de reductor (NaBH₄) con una longitud de onda de 538nm.

Tabla 10. Resultados del plasmón para el sistema de AuNp con NaBH₄.

Metal: Au	mL del reductor	<u>Plasmón</u>	Sistema con la respuesta más sobresaliente	Figura	Inciso
	1mL	555 nm		16	a
	2 mL	524 nm		16	b
	3 mL	538 nm	**	16	c
	4 mL	535 nm		16	d
	5 mL	522 nm		17	e
	1mL a 5 mL	538 nm		17	g

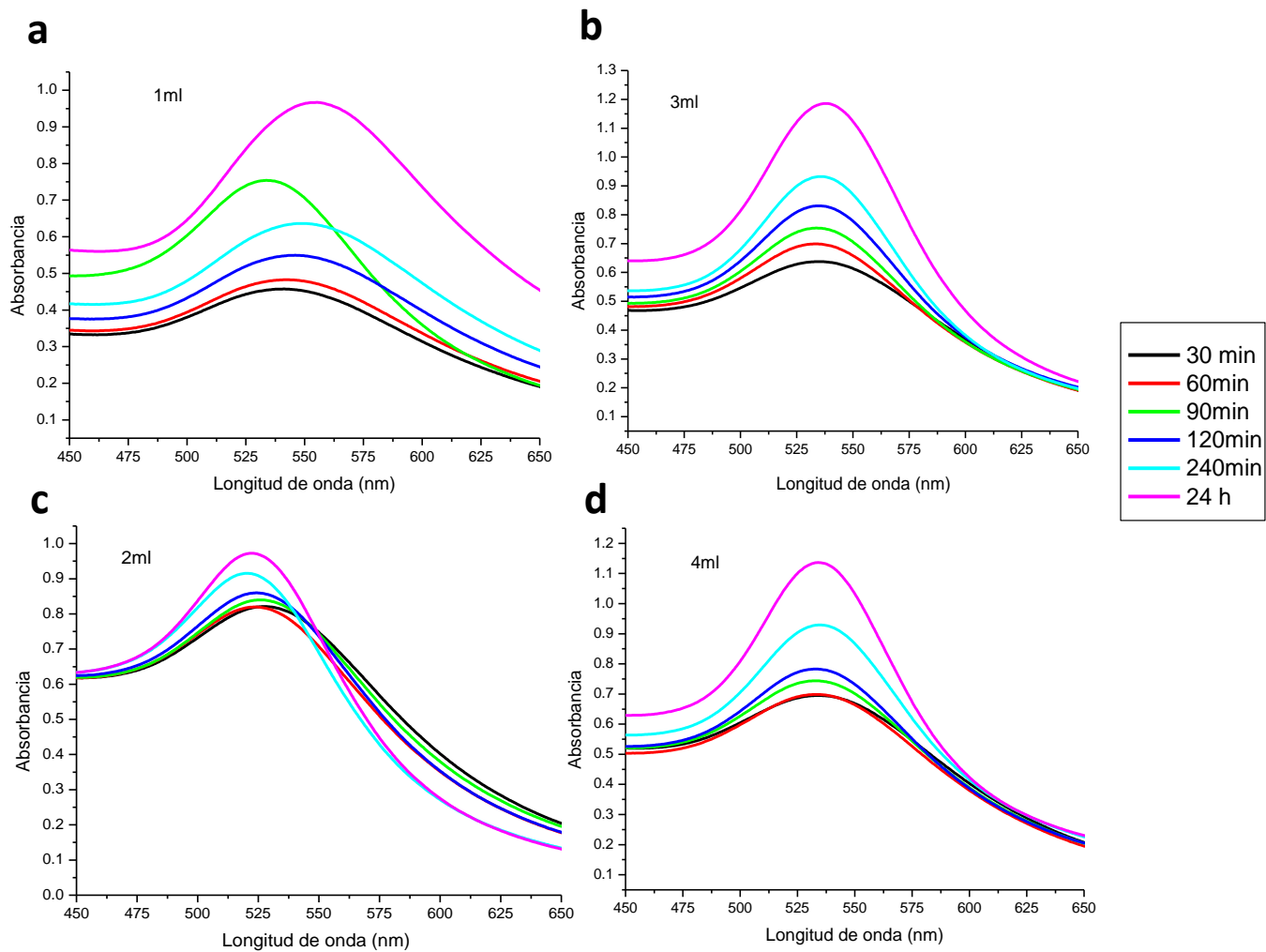


Figura 16. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con NaBH_4 y estabilizadas con Citrato de Sodio y 5ml de la solución de Ácido Tetracloroaúrico 10^{-3} M; en donde se trabajo con los volúmenes de: a) con 1mL de reductor, b) 2mL de reductor, c) 3mL de reductor, d) 4mL de reductor. Evaluando la reacción cada 30 minutos hasta 24 horas de reacción.

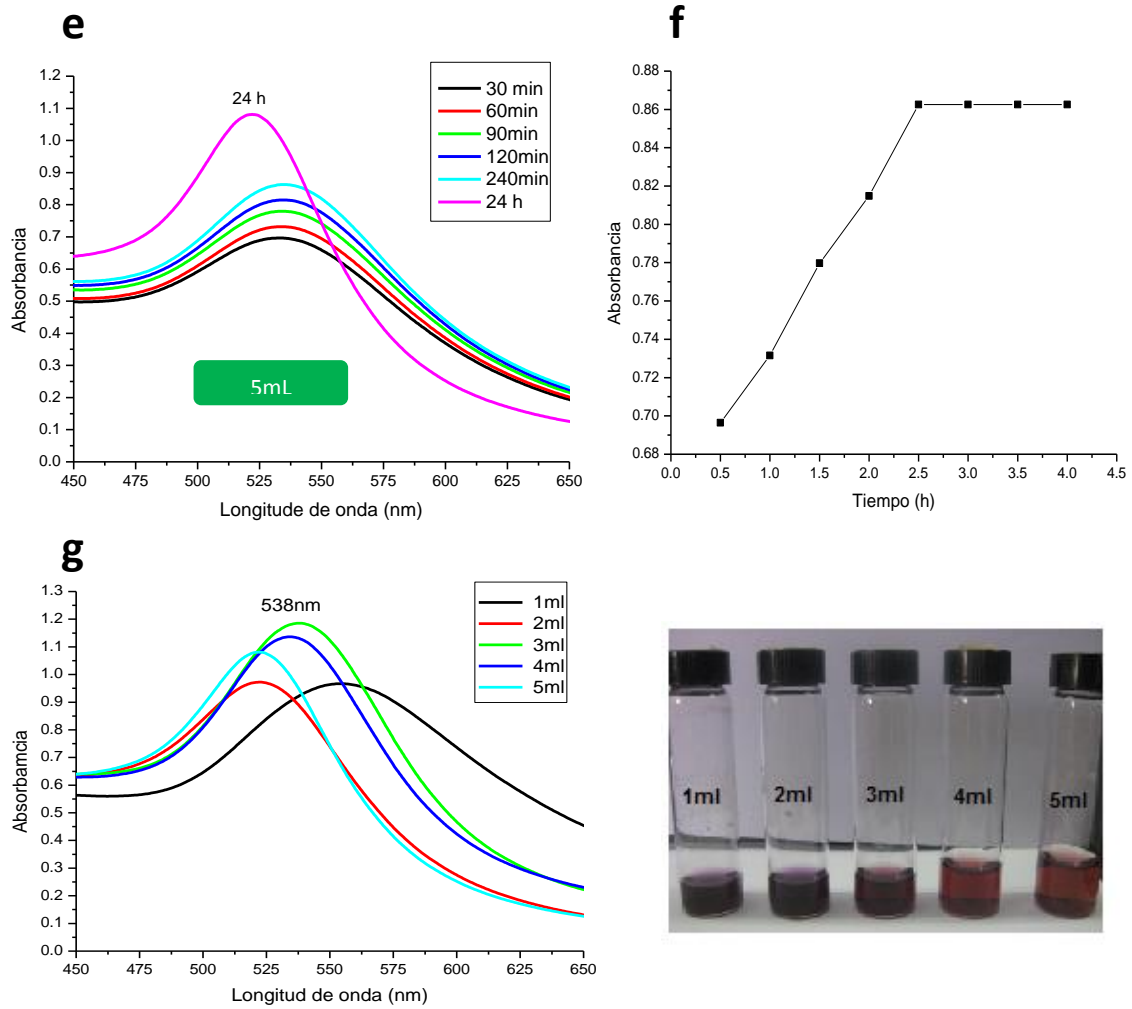


Figura 17. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con NaBH_4 , con un volumen de: a) 5mL. Condensación de los 5 volúmenes utilizados (1-5mL) a 24 horas de reacción (c), Representación del cambio de color de las soluciones de oro.

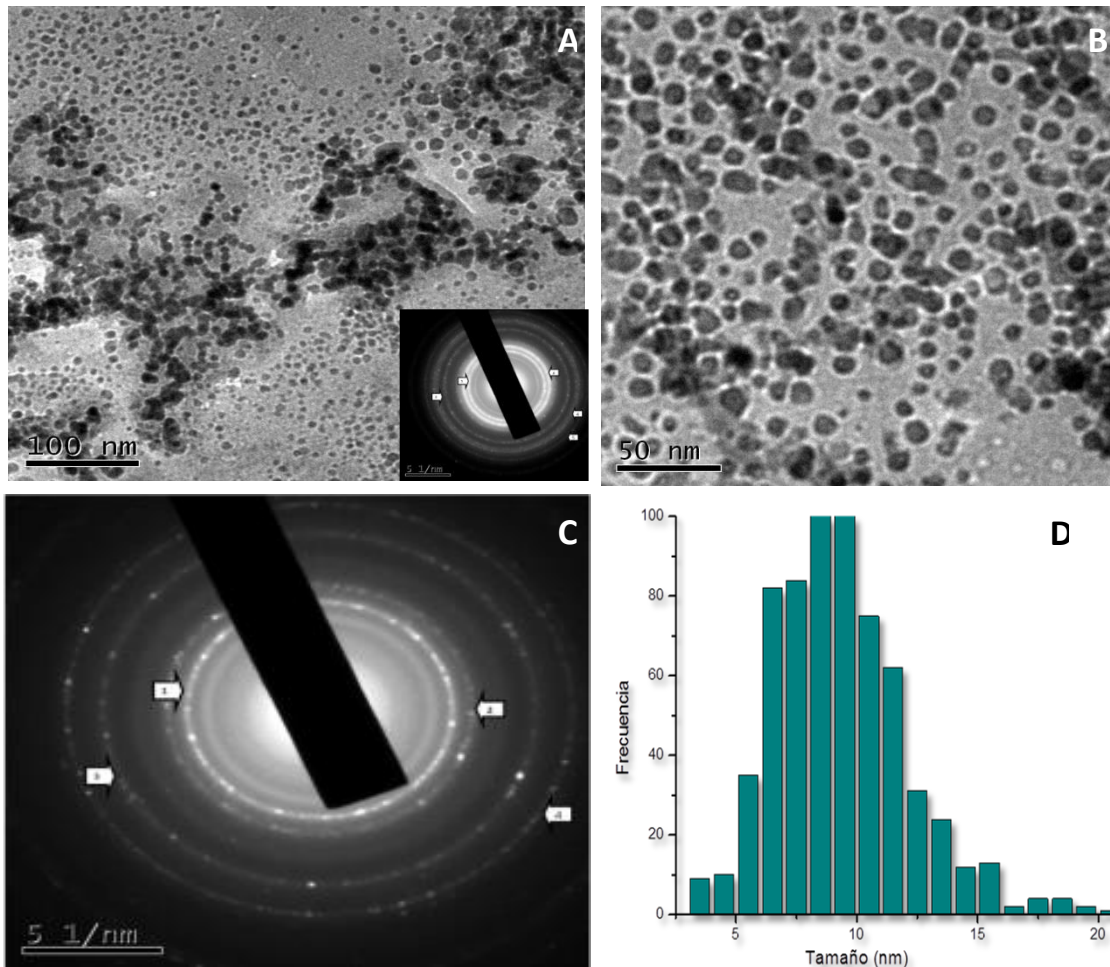


Figura 18. Micrografías MET de AuNp obtenidas mediante el sistema de 3mL de NaBH_4 y estabilizadas con Citrato de Sodio, con 5mL de Ácido Tetracloroaúrico 10^{-3} M después de 24 horas de reacción. Patrón de difracción de área selecta a diferentes acercamientos (a-c). Histograma de frecuencia del tamaño del sistema de AuNp obtenido mediante TEM.

En la **Figura 18-A,B** se presentan las micrografías del sistema de nanopartículas de oro obtenidas a partir del sistema de 3mL de reductor (NaBH_4) con un pasmón de 538 nm; resultado del análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)⁽²⁰⁾ la micrografías se presentan en una escala de 100 nm, 50 nm y 20 nm; aquí podemos ver la elevada polidispersidad que presenta el sistema; aunque la morfología se mantiene en casi su totalidad constante ya que la mayoría presentan formas esféricas; aunque si se llegan a apreciar algunos esferoides o poliformes. El tamaño promedio de este sistema está por debajo de los 100 nm, es importante

señalar que se observan también pequeñas aglomeraciones de estas nanopartículas con tamaños más grandes. En la **Figura 18-D** se muestra el histograma de frecuencia de tamaño, del cual obtenemos el tamaño promedio del sistema, el cual es de: $x= 9.2 \text{ nm}$ $\delta= 3.1 \text{ nm}$.

El patrón de difracción de electrones de área selecta de nanopartículas de oro (AuBH) que se presenta en la **Figura 18-C**, nos sirve para elucidar la estructura cristalina de las nanopartículas de Au, la cual con base en los datos experimentales se demuestra que la estructura es una fcc y la indexación de los anillos del plano de difracción está dada por los siguientes datos teóricos y experimentales; los cuales han sido indexados con los planos (111), (200), (220), (311) y (222) y los planos (111), (200), (311) y (400) respectivamente (**Tabla 11**).

Tabla 11. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de oro AuBH.

Anillo	Distancia τ (°Å)	Distancia R (°Å)	Hkl	2θ	Θ
1	2.355	2.357656	111	38.1836	19.0918
2	2.039	2.041441	200	44.3917	22.19585
3	1.442	1.47167	220	64.5759	32.28795
4	1.23	1.253604	311	77.5471	38.77355
5	1.1174	1.11278	222	82.7212	41.3606

Anillo	Distancia τ (°Å)	Distancia R (°Å)	hkl	2θ	Θ
1	2.355	2.313744	111	38.1836	19.0918
2	2.039	1.975894	200	44.3917	22.19585
3	1.23	1.250938	311	77.547	38.7735
4	1.0196	1.096431	400	98.1334	49.0667

Posición de medición (mm): 4.65				
Media (nm)	10.21	Pico	Diametro (nm)	% intensidad
Pdl	0.487	1	38.14	66.6
Intercepción	0.738	2	2.149	33.4
		3	0	0

Distribución de tamaño con intensidad

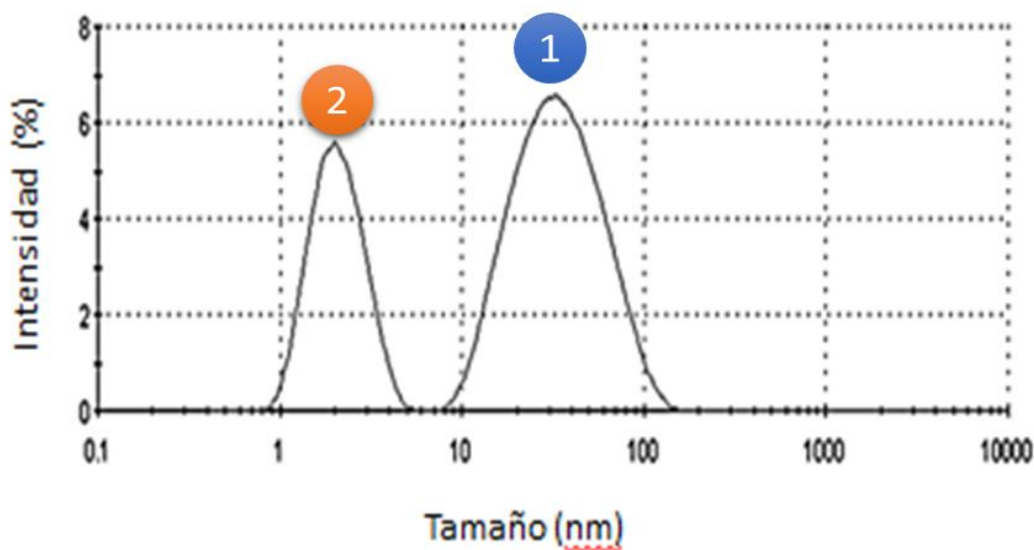


Figura 19. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AuNp sintetizadas con NaBH₄.

En la **Figura 19** se presenta el gráfico de dispersión de luz dinámica ^(63,64) en donde el tamaño promedio global de las nanopartículas de oro (AuBH) es de 10.21 nm, si esto lo complementamos con la polidispersidad del sistema de nanopartículas obtenidas por TEM, en donde obtenemos tamaños en un rango de 7.5nm a 10nm al igual que se observa en las micrografías vemos que si existe una correlación entre las dos técnicas, es importante señalar que DLS se aprecian las aglomeraciones de las nanopartículas de oro con la presencia del pico 1 que tiene una distribución de 38.14nm; dando la pauta de que las nanopartículas se encuentran empalmadas unas con otras provocando una dispersión mayor.

3.1.2 Nanopartículas de oro reducidas con extracto acuoso de *Camellia sinensis*.

Para la segunda síntesis de nanopartículas de oro en la que se hace reaccionar soluciones de ácido tetracloroáurico (10^{-3}M) con extracto acuoso de *C. sinensis*³⁰, en los cuales se fue variando el volumen del reductor desde 1mL hasta 5mL, se monitoreo mediante Espectroscopía UV-Vis, esperando la banda de plasmón a 550 nm. Los gráficos se tomaron en intervalos de tiempo de 30 minutos hasta las 24 horas de reacción; la nucleación de las nanopartículas llega a su punto máximo son las 24 horas de haber sido iniciada la reacción.

Las soluciones presentaron una coloración característica de los sistemas nanométricos de oro (**Figura 21**), la cual refiere a la formación de dicho metal. Esta coloración va surgiendo conforme avance el tiempo en relación a la adición de *Camellia sinensis*, cambiando de amarillo claro a tonos rojos intensos; esto dependiendo del tamaño y forma que se presente después de su tiempo de nucleación.

Las **Figura 20 y 21** contienen los resultados de la muestra donde se hicieron la sal de oro (ácido tetracloroáurico) a una concentración 10^{-3}M con volúmenes de de extracto acuoso de *Camellia sinensis*, se monitoreo el avance de la síntesis de reacción desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción. Se observa claramente una banda de plasmón superficial a una longitud de onda promedio de 542 nm, ver **Tabla 12**; presenta un ligero desplazamiento de la banda plasmónica superficial hacia el azul lo que nos pudiera estar indicando un tamaño uniforme (o casi esférico) de las nanopartículas, de igual forma al presentarse un el pico ancho indica una polidispersidad.

La **Figura 21(g)** se muestran los resultados del sistema de nanopartículas de oro con volúmenes de 0.2 mL a 1 mL, con un tiempo de reacción de 24 horas, se observa que a 0.2 mL y 0.4 mL el plasmón tiene una tendencia ascendente hasta una absorbancia máxima de 540 nm. El volumen de *Camellia sinensis* que presenta un plasmón más sobresaliente es a 0.6mL respecto a los demás; posteriormente, ocurre un descenso con 0.8mL y 1mL. Dando indicios de que el sistema sufre colapsos a nivel nanométrico provocando precipitación dejando a un lado las características nanométricas; lo cual resulta en una disminución intensidad. El volumen de 0.6 mL presenta un ligero desplazamiento hacia el rojo, que se refiere al aumento en el tamaño del sistema, concluyéndose que es el mejor volumen.

Tabla 12. Resultados del plasmón para el sistema de AgNp con *Camellia sinensis*..

	mL del reductor	<u>Plasmón</u>	Sistema con la respuesta mas sobresaliente	Figura	Inciso
Metal: Au	0.2 mL	532 nm		20	a
	0.4 mL	540 nm		20	b
	0.6 mL	542 nm	**	20	c
	0.8 mL	547 nm		20	d
	1 mL	551 nm		21	e
	0.2mL a 1 mL	540 nm		21	g

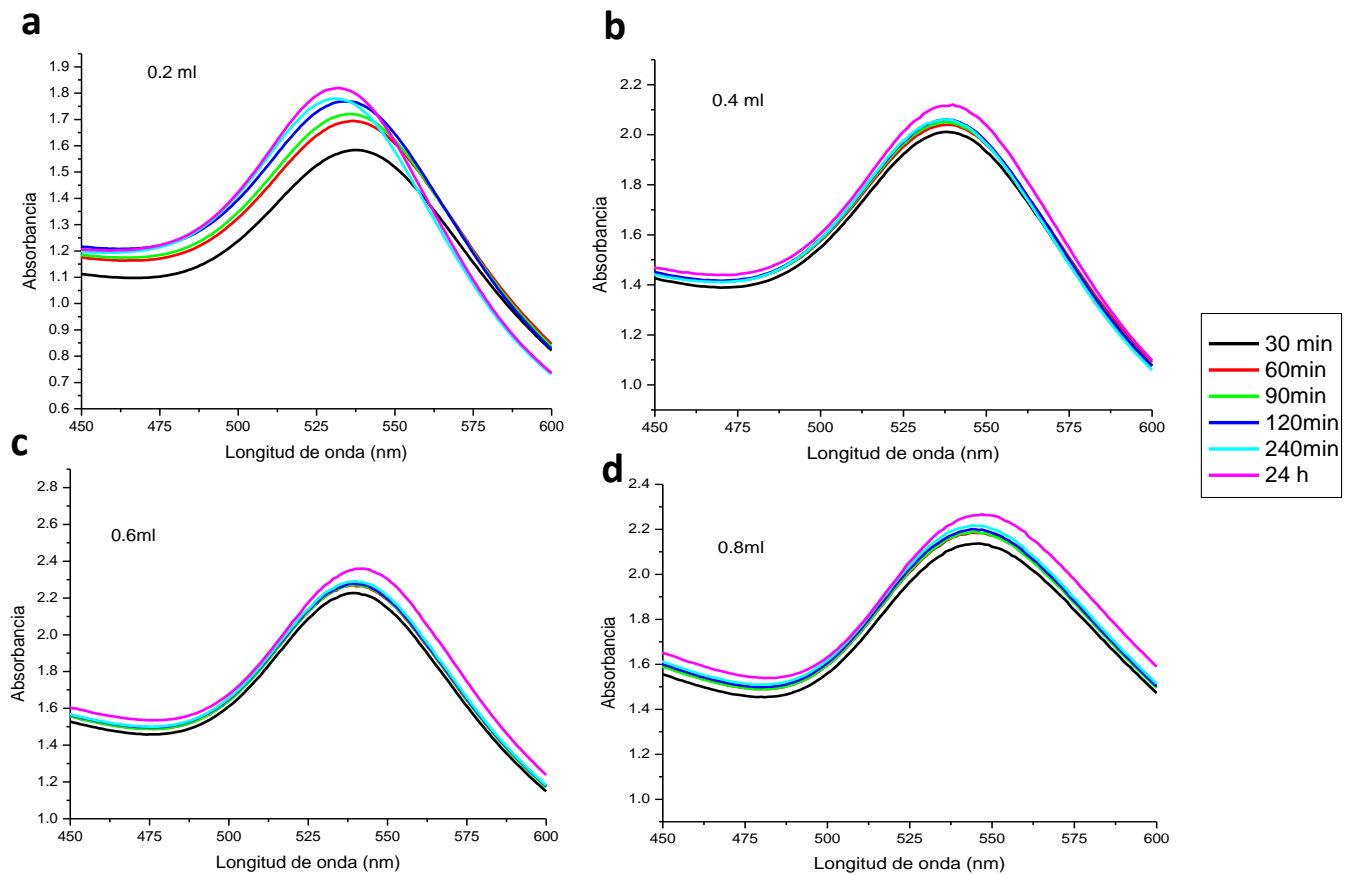


Figura 20. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con extracto acuoso de *Camellia sinensis* y 5ml de la solución de Ácido Tetracloroaúrico 10^{-3} M; en donde se trabajo con los volúmenes de: a) con 1mL de reductor, b) 2mL de reductor, c) 3mL de reductor, d) 4mL de reductor. Evaluando la reacción cada 30 minutos hasta 24 horas de reacción.

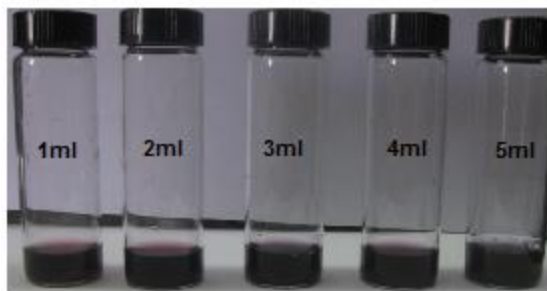
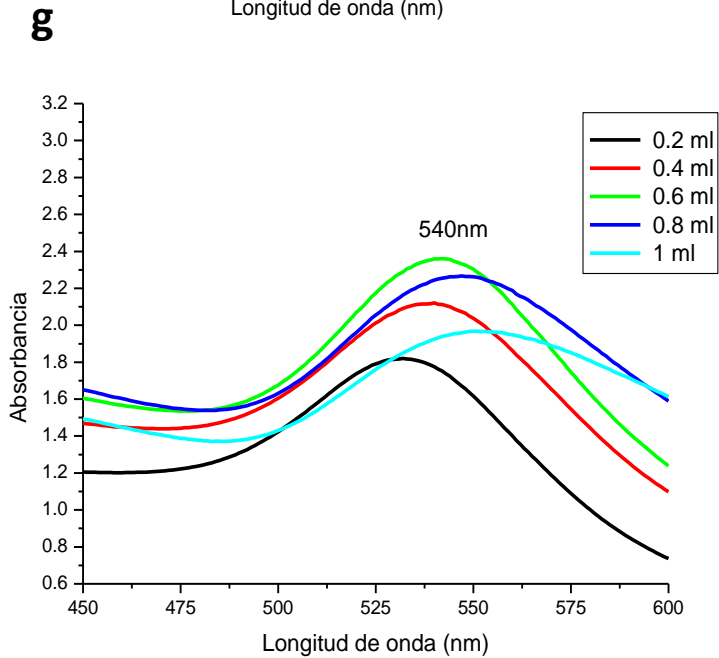
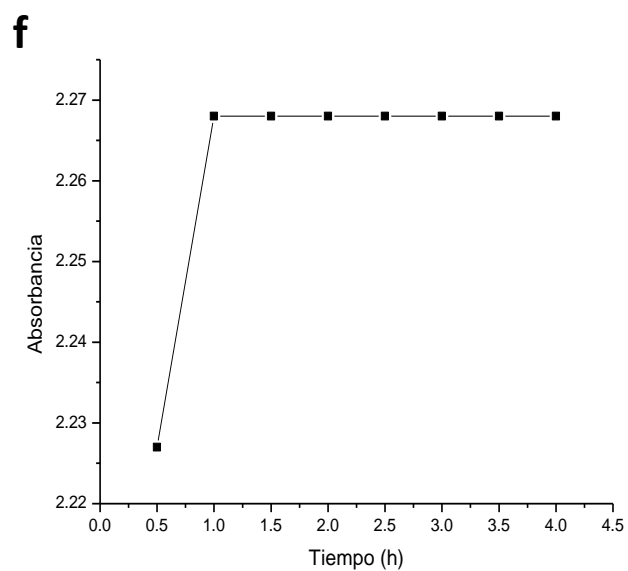
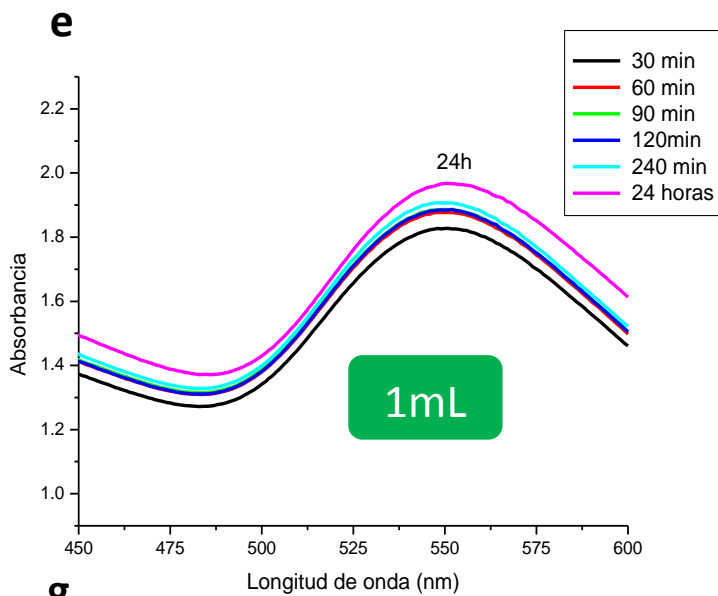


Figura 21. Espectro de UV-Vis del sistema de AuNp sintetizadas con *C. sinensis*, con un volumen de: a) 5mL. Condensación de los 5 volúmenes utilizados (1-5mL) a 24 horas de reacción (c), Representación del cambio de color de las soluciones de oro.

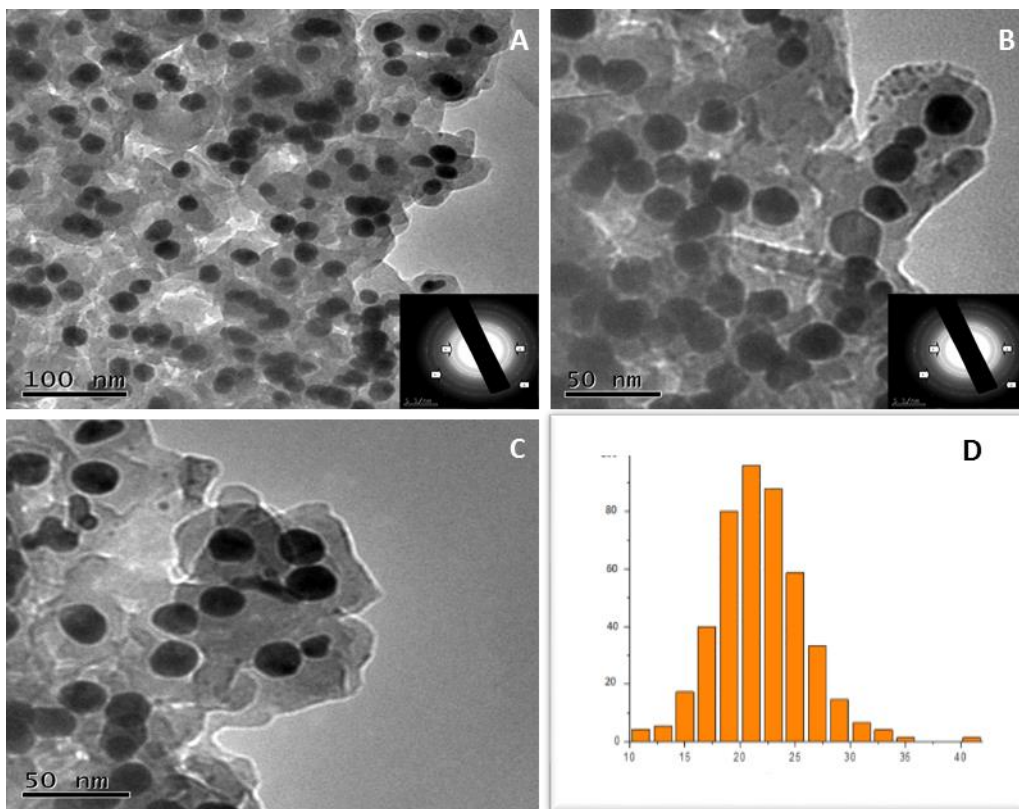


Figura 22. Micrografías MET de AuNp obtenidas mediante el sistema de 0.6mL de extracto acuoso de *Camellia sinensis*, con 5mL de Ácido Tetracloroaúrico 10^{-3} M después de 24 horas de reacción. Patrón de difracción de área selecta a diferentes acercamientos (a-c). Histograma de frecuencia del tamaño del sistema de AuNp obtenido mediante TEM.

En la **Figura 22-A,B** se presentan las micrografías del sistema de nanopartículas de oro obtenidas con 0.6mL del extracto acuoso de *C. sinensis*; resultado del análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)⁽²⁰⁾ la micrografías se presentan en una escala de 100nm y 50nm. Podemos apreciar la polidispersidad del sistema; aunque la morfología esférica se mantiene en casi su totalidad constante. Un dato importante es que se aprecia notablemente que estas se encuentran inmersas y rodeadas por la biomasa del extracto, lo cual ayuda a contener la morfología de las nanopartículas. En rango de tamaño está por debajo de los 100nm. Aunque también se observan también pequeñas aglomeraciones de estas nanopartículas con tamaños diversos. En la misma se presenta el histograma

de frecuencia de tamaño (**Figura 22-D**), del cual obtenemos el tamaño promedio del sistema, el cual es de: $x= 22 \text{ nm}$ $\delta=2.4\text{nm}$.

El patrón de difracción de área selecta de nanopartículas de oro (AuCs) se presenta en la **Figura 22**; esto nos sirve para elucidar la estructura cristalina de las nanopartículas de Au, la cual con base en los datos experimentales se demuestra que la estructura es una fcc y la indexación de los anillos del plano de difracción está dada por los siguientes datos teóricos y experimentales; los cuales han sido indexados con los planos (111), (200), (220) y (311) respectivamente (**Tabla 13**)

Tabla 13. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de oro AuCS.

Anillo	Distancia τ (°A)	Distancia R (°A)	hkl	2θ	Θ
1	2.355	2.354603	111	38.1836	19.0918
2	2.039	2.013288	200	44.3917	22.19585
3	1.442	1.429286	220	64.5759	32.28795
4	1.23	1.217137	311	77.5471	38.77355

Posición de medición (mm): 4.65				
Medía (nm)	21.55	Pico	Diametro (nm)	% intensidad
Pdl	0.315	1	31.08	94.3
Intercepción	0.82	2	1.572	5.7
		3	0	0

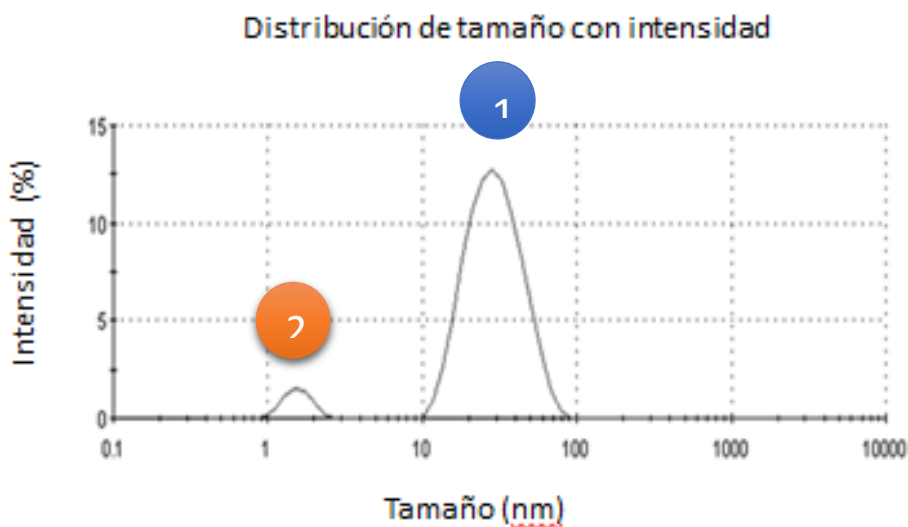


Figura 23. Gráfico de Dispersión de Luz del sistema de AuNp sintetizadas con *Camellia sinensis*.

En la **Figura 23** se presenta el gráfico de dispersión de luz dinámica ^(64,65) en donde el tamaño promedio de las nanopartículas AuCs es de 21.55nm. Con esto se complementa que la polidispersidad obtenida por TEM, en donde los tamaños oscilan entre los 20 nm a 24 nm de diámetro, mientras que con DLS tenemos una distribución de 31.08 nm, vemos la correlación entre las dos técnicas. En DLS se detectan algunas aglomeraciones debido a la presencia del pico 2 con una distribución de 1.57 nm; esto pudiera estar ocurriendo debido a la inmersión de las AuCs en la biomasa del extracto.

3.2 Nanopartículas de Plata (AgNp)

3.2.1 Nanopartículas de plata reducidas con (NaBH₄).

La síntesis química de nanopartículas de plata, en donde se reacciona soluciones de nitrato de plata (10^{-3}M) con soluciones de borohidruro de sodio (NaBH₄) (10^{-2}M), variando el volumen del reductor desde 1ml hasta 5mL, se fue monitoreando mediante Espectroscopía UV-Vis en la cual se espera una banda de plasmón superficial a los 420nm. Los gráficos obtenidos van desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción, la nucleación de las nanopartículas llega a su punto máximo son las 24 horas de haber sido iniciada la reacción.

Las soluciones presentan una coloración característica para AgNp, esta coloración va desde una solución incolora (sal de plata) hasta una escala en tonos amarillo (**Figura25**) dependiendo de las características que presente al final del tiempo de reacción.

Las **F433** **Figura 24 y 25** demuestran los resultados de las soluciones de donde reaccionó la sal de plata con diferentes volúmenes del reductor (NaBH₄), la síntesis se fue monitoreando desde los 30 minutos hasta las 24 horas de reacción, mediante un Espectrómetro Uv-Vis. Se observa claramente la posición del plasmón en una longitud de onda promedio de nm ver **Tabla 14**; las bandas características de absorción presentan una tendencia ascendente con un ligero desplazamiento hacia el rojo, indicando un posible aumento en el tamaño, también se aprecia la banda con un ancho de pico ancho, esto también es atribuible a que el tamaño es mayor que si se compara con un sistema ideal, indicando la polidispersidad dentro de la solución

La **Figura 25(g)** se presentan los espectros de absorción en relación a los volúmenes utilizados en esta síntesis que fueron de 1 mL a 5 mL, las lecturas de absorción se tomaron después de haber transcurrido 24 horas de iniciada la reacción. Ente gráfico nos muestra la diferencia tan marcada que existe entre los

primeros tres volúmenes (1mL, 2mL, 3mL) en donde su plasmón casi no se aprecia y con una anchura en los picos considerable; mientras que ocurre todo lo contrario con el plasmón de las soluciones a 4mL y 5mL en donde se aprecia una banda plasmónica definida y muy marcada a los 400 nm, en donde hasta la anchura del pico disminuyo respecto al anterior volumen; indicando que no existe tanta polidispersidad en el sistema. Con respecto a lo que se publica en la bibliografía, tenemos un ligero corrimiento hacia el rojo. Lo cual se concluye que el mejor sistema evaluado en esta sección son los que se trata la solución de plata con 5mL de NaBH₄ a un tiempo de 24 horas.

Tabla 14. Resultados del plasmón para el sistema de AgNp con NaBH₄..

	mL del reductor	<u>Plasmón</u>	Sistema con la respuesta mas sobresaliente	Figura	Inciso
Metal: Ag	1mL	433 nm		24	a
	2 mL	432 nm		24	b
	3 mL	428 nm		24	c
	4 mL	428 nm - 400nm	**	24	d
	5 mL	430 nm		25	e
	1mL a 5 mL	400 nm		25	g

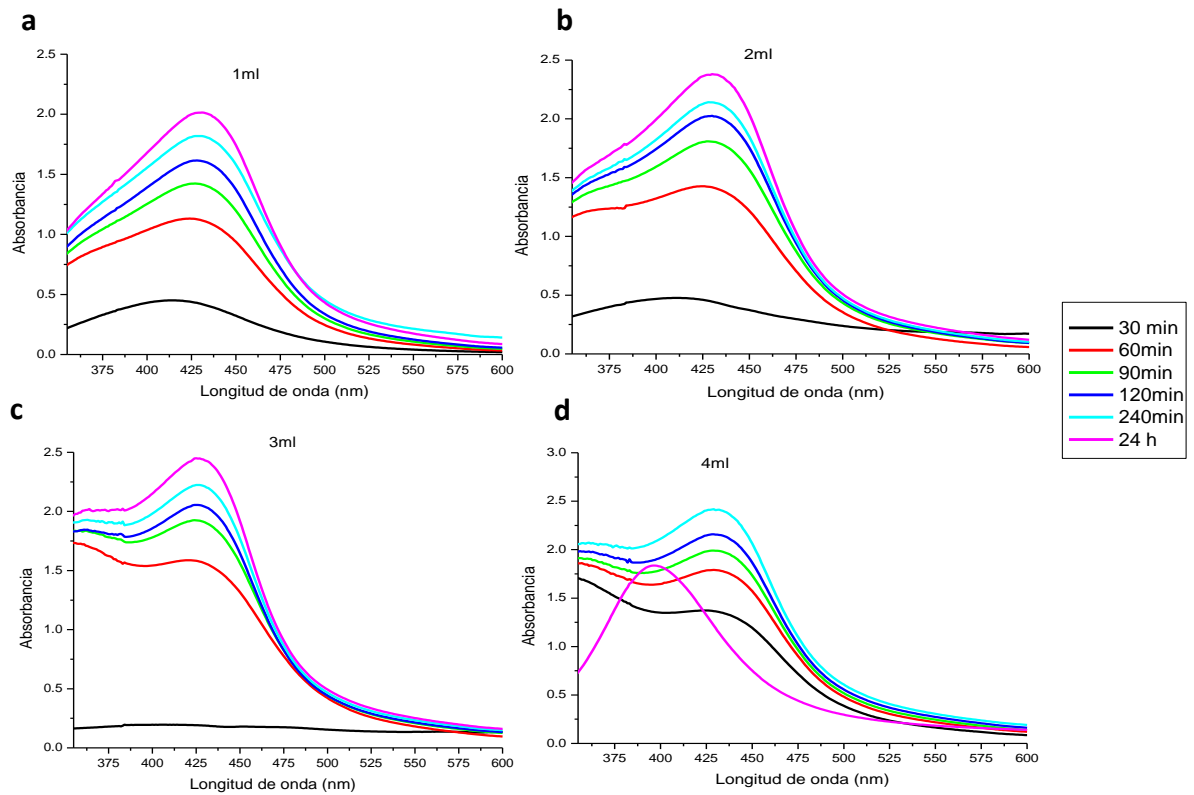


Figura 24. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con NaBH_4 y estabilizadas con Citrato de Sodio y 5ml de la solución de Ácido Tetracloroaúrico 10^{-3} M; en donde se trabajo con los volúmenes de: a) con 1mL de reductor, b) 2mL de reductor, c) 3mL de reductor, d) 4mL de reductor. Evaluando la reacción cada 30 minutos hasta 24 horas de reacción.

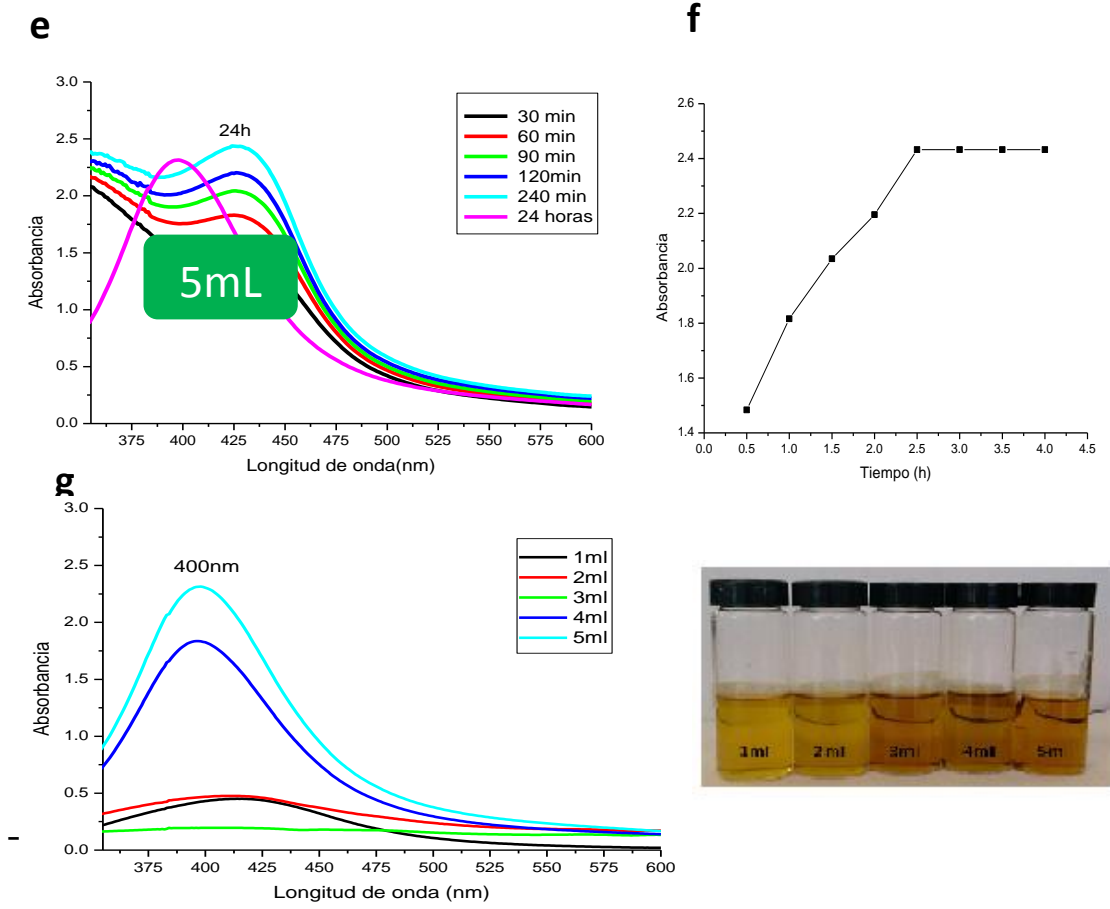


Figura 25. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con NaBH_4 , con un volumen de: a) 5mL. Condensación de los 5 volúmenes utilizados (1-5mL) a 24 horas de reacción (c), Representación del cambio de color de las soluciones de oro.

En la **Figura 26** se presentan micrografías del sistema de AgNp obtenidas a partir del sistema de 5mL de NaBH_4 ; resultado del análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)⁽²⁰⁾ la micrografías se encuentran a una escala de 50nm y 20nm ; aquí podemos ver la polidispersidad que presenta el sistema; aunque la morfología predominantemente son esféricas, el rango promedio de tamaño esta por debajo de los 50nm. Aunque también se observan también pequeñas aglomeraciones de estas nanopartículas con tamaños diversos. En la misma se presenta el histograma de frecuencia (**Figura 26-D**) de tamaño, del cual obtenemos el tamaño promedio del sistema $x= 8\text{nm}$ $\delta=0.8\text{nm}$.

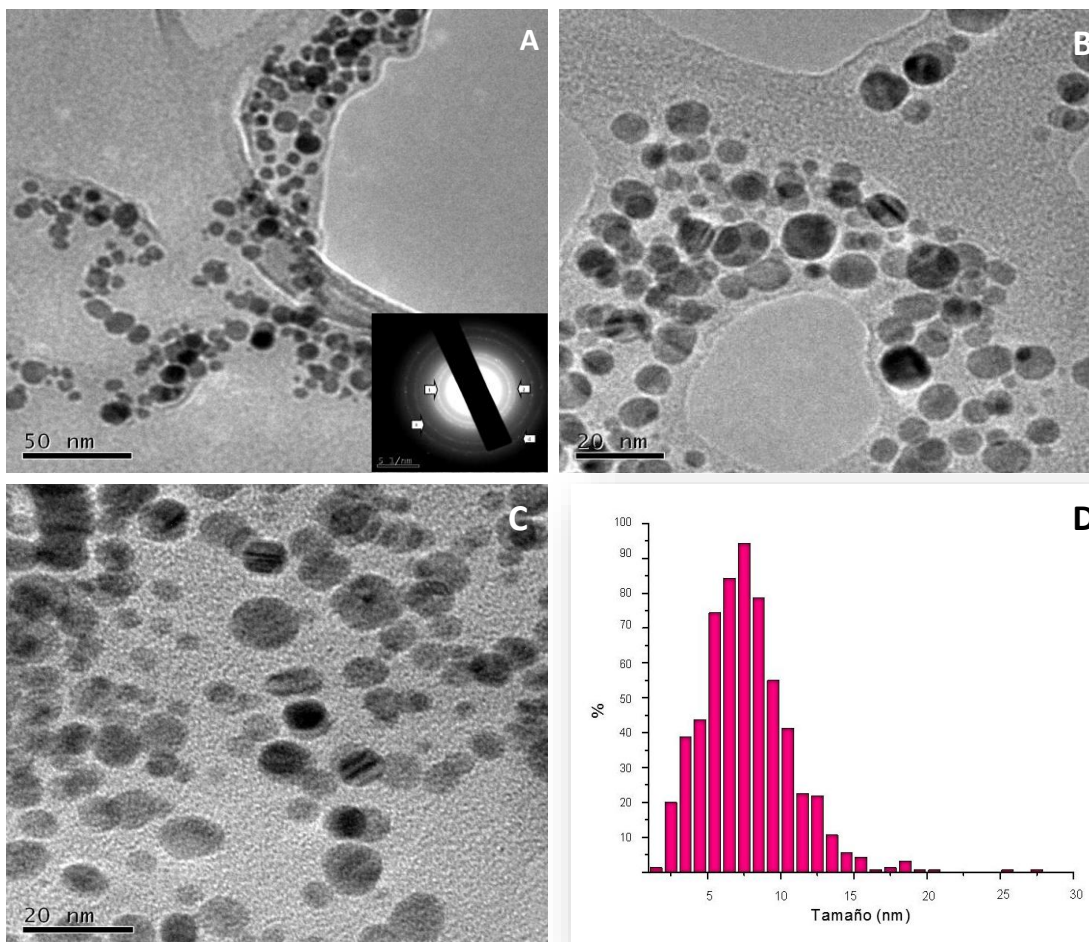


Figura 26. Micrografías MET de AgNp obtenidas mediante el sistema de 5mL de NaBH_4 y estabilizadas con Citrato de Sodio, con 5mL de Ácido Tetracloroáurico 10^{-3} M después de 24 horas de reacción. Patrón de difracción de área selecta a diferentes acercamientos (a-c). Histograma de frecuencia del tamaño del sistema de AgNp obtenido mediante TEM.

El patrón de difracción de electrones de área selecta de nanopartículas de plata (AgBH) que se presenta en la **Figura 26**, nos sirve para elucidar la estructura cristalina de las nanopartículas de Ag, la cual con base en los datos experimentales se demuestra que la estructura es una fcc y la indexación de los anillos del plano de difracción está dada por los siguientes datos teóricos y experimentales; los cuales han sido indexados con los planos (111), (200), (220) y (311) respectivamente (**Tabla 15**)

Tabla 15. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de plata AgBH.

Anillo	Distancia τ (°A)	Distancia r (°A)	hkl	2θ	θ
1	2.355	2.3546057	111	38.1836	19.0918
2	2.039	2.013336	200	44.3917	22.19585
3	1.442	1.4292237	220	64.5759	32.28795
4	1.23	1.2137324	311	77.5471	38.77355

* JCPDS 04-0783.

En la **Figura 27** se presenta el gráfico de dispersión de luz dinámica en donde el tamaño promedio global de las nanopartículas de plata (AgNp) reducidas con NaBH_4 es de 13.10nm, complementado con TEM podemos ver que no existe una diferencia significativa entre los resultados de las dos técnicas corroborándose la polidispersidad de este sistema de nanopartículas, es importante señalar que existe una cantidad menor de aglomeraciones de AgNp, pero se observan mediante la presencia del pico 1 con una distribución de 45.90 nm; pudiendo tener nanopartículas empalmadas unas con otras provocando una dispersión mayor.

Posición de medición (mm): 4.65	
Media (nm)	13.10
Pdl	0.542
Intercepción	0.782

Pico	Diametro (nm)	% intensidad
1	45.9	63.5
2	4.126	34.7
3	0	0

Distribución de tamaño con intensidad

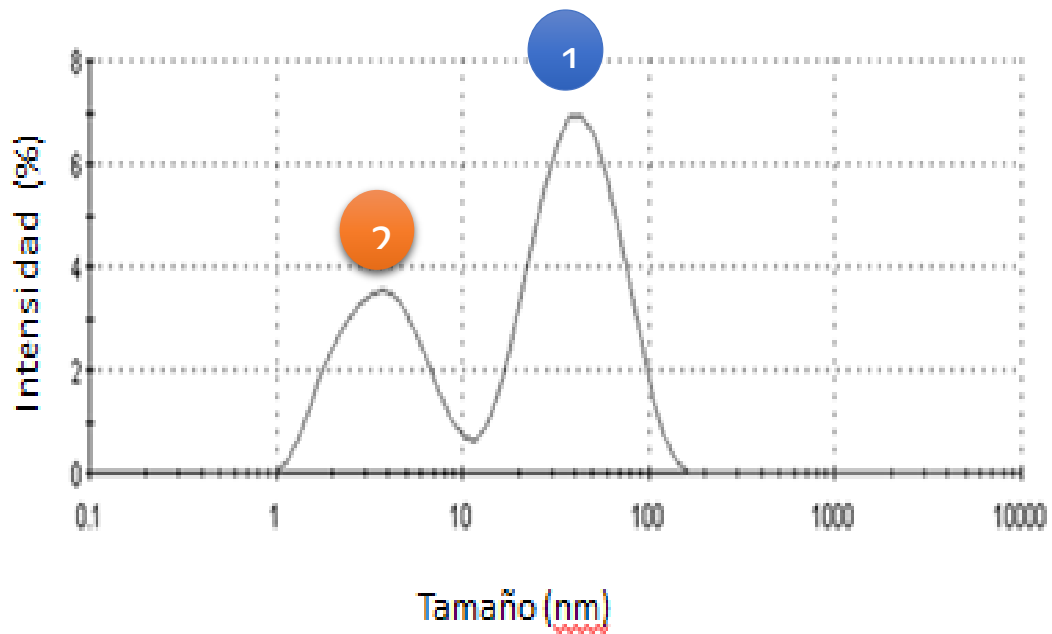


Figura 27. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AgNp sintetizadas con NaBH₄

3.2.2 Nanopartículas de plata reducidas con *Camellia sinensis*.

Para la segunda síntesis de nanopartículas de plata (AgNp) se hacen reaccionar soluciones de nitrato de plata (10^{-3}M) con extracto acuoso de *Camellia sinensis*, el volumen se fue variando desde 1mL hasta 5mL, los resultados se obtuvieron mediante Espectroscopía UV-Vis, esperando una respuesta del plasmón a 420 nm, las soluciones se fueron midiendo a diferentes tiempos de reacción que fueron desde 30 minutos hasta 24 horas. Las soluciones presentan una coloración característica, la cual nos da la pauta de que la formación gradual de AuNp; esta coloración oscila ente el color amarillo claro hasta amarillo intenso (**Figura 29**).

En las **Figura 28 y 29** se muestran los resultados de hace reaccionar sal de plata (AgNO_3) con varios volúmenes de *Camellia sinensis*. Se observa una banda plasmónica superficial a una longitud de onda promedio de 412 nm, ver **Tabla 16**; estas bandas presentan un ligero desplazamiento hacia el rojo, conforme la reacción va avanzando, este desplazamiento nos pudiera estar indicando un aumento en el tamaño de las nanopartículas, el pico ancho indica una polidispersidad grande, aunque desde aquí se puede estar presentando que estas presentan una morfología esférica dentro del sistema; el cual posteriormente se podrá corroborar con las otras dos técnicas analíticas (TEM y DLS).

La **Figura 29** se presentan los resultados del sistema de nanopartículas de plata con soluciones del extracto acuoso de *Camellia sinensis*, con volúmenes de 1mL hasta 5mL, a un tiempo de reacción de 24 horas. Aquí podemos visualizar claramente como los picos de 1mL, 2mL y 3mL van presentan una tendencia ascendente y cierta similitud; mientras que el sistema a 4mL presenta una respuesta de menor absorbancia, para que finalmente el sistema de 5mL presentara de nueva cuenta una respuesta plasmónica mayor en comparación con los demás volúmenes adicionados, la mayoría se centran a 430nm. Esto es un indicio de que el sistema a concentraciones mayores empieza a presentar características nanométricas más

homogéneas y tamaños homogéneos. A lo cual se concluye que los mejores resultados son los de 5mL del extracto acuoso de *C. sinensis*.

Tabla 16. Resultados del plasmón para el sistema de AuNp con *Camellia sinensis*.

Metal: Ag	mL del reductor	Plasmón	Sistema con la respuesta mas sobresaliente	Figura	Inciso
	1mL	433 nm		28	a
	2 mL	434 nm		28	b
	3 mL	426 nm		28	c
	4 mL	428 nm		28	d
	5 mL	430 nm		29	e
	1mL a 5 mL	430	**	29	g

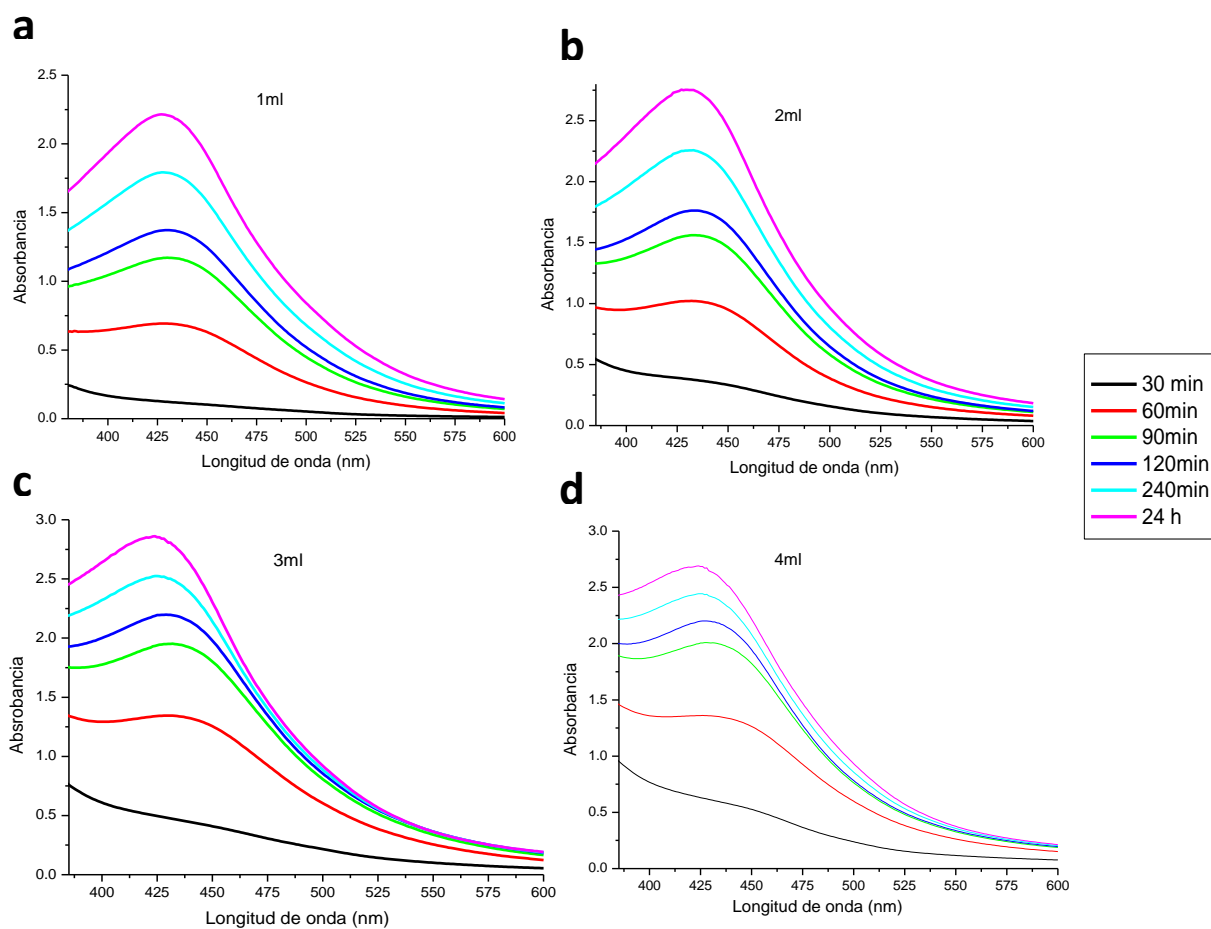


Figura 28. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con extracto acuoso de *Camellia sinensis* y 5ml de la solución de Ácido Tetracloroaurico 10^{-3} M; en donde se trabajo con los volúmenes de: a) con 1mL de reductor, b) 2mL de reductor, c) 3mL de reductor, d) 4mL de reductor. Evaluando la reacción cada 30 minutos hasta 24 horas de reacción.

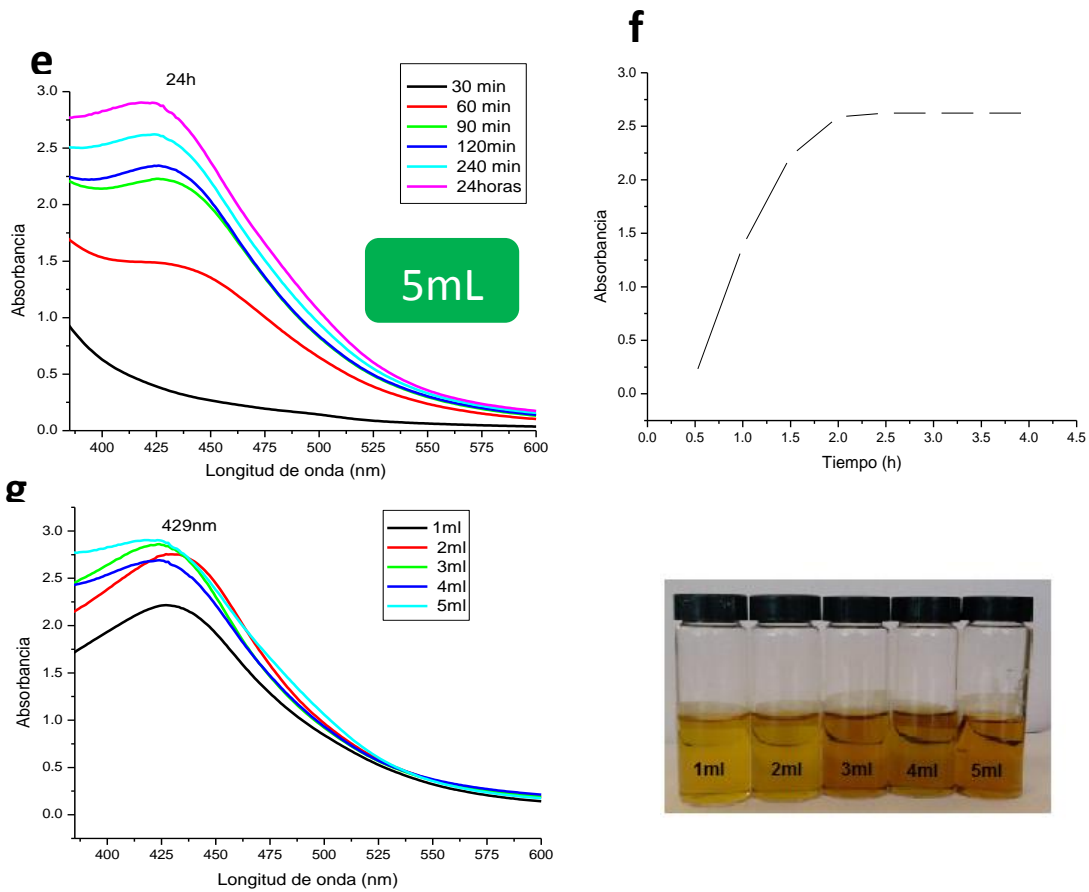


Figura 29. Espectro de UV-Vis del sistema de AgNp sintetizadas con *C. sinensis*, con un volumen de: a) 5mL. Condensación de los 5 volúmenes utilizados (1-5mL) a 24 horas de reacción (c), Representación del cambio de color de las soluciones de plata.

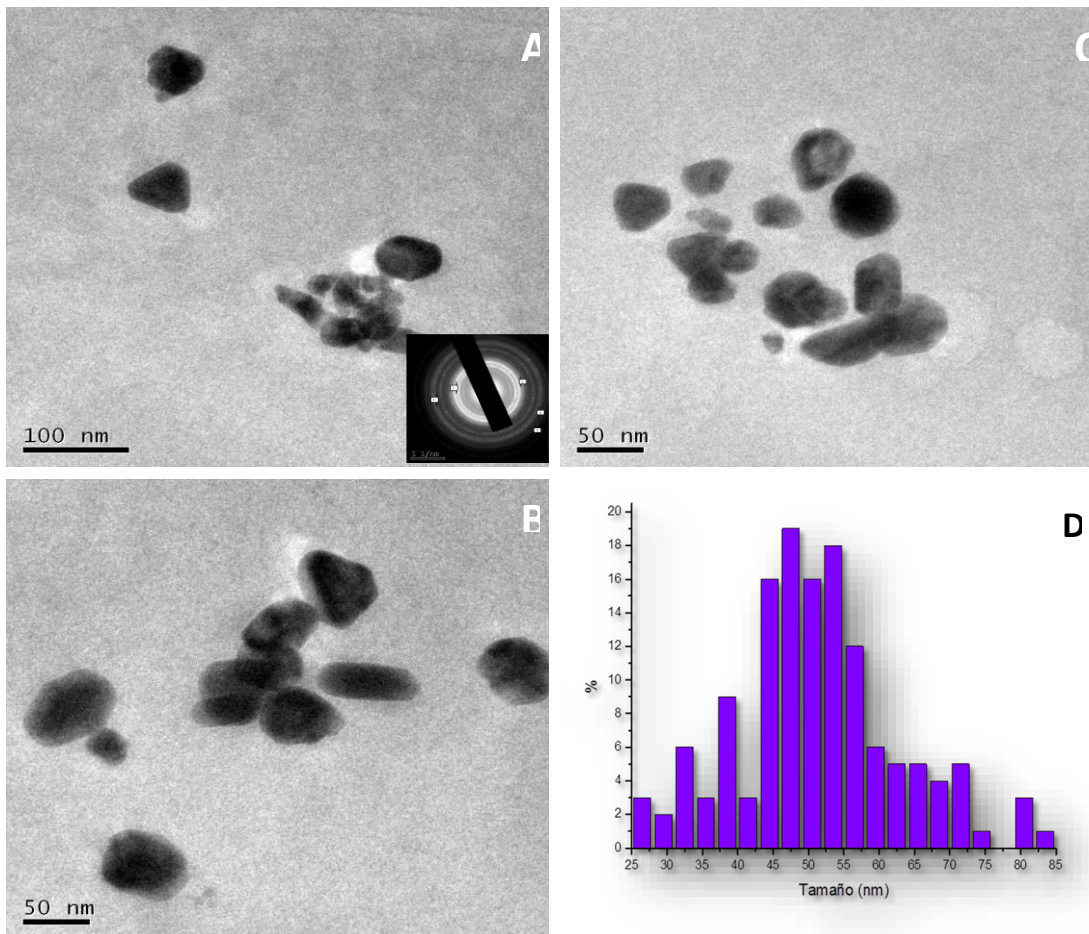


Figura 30. Micrografías MET de AgNp obtenidas mediante el sistema de 5mL de extracto acuoso de *Camellia sinensis*, con 5mL de Nitrato de Plata 10^{-3} M después de 24 horas de reacción. Patrón de difracción de área selecta a diferentes acercamientos (a-c). Histograma de frecuencia del tamaño del sistema de AgNp obtenido mediante TEM.

La **Figura 30** son micrografías del sistema de AgNp obtenidas a partir del sistema de 5mL del extracto acuoso de *C. sinensis*; resultado del análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)⁽²⁰⁾ la micrografías se presentan en una escala de 100nm y 50nm; aquí podemos ver la polidispersidad que presenta el sistema; aunque la morfología pudiera mantenerse en esféricas; aunque también se surgen morfologías como en su mayoría se tienen formas esféricas, así como morfologías de triángulos o icosaedros. En algunas de las secciones de las micrografías se aprecia ligeramente la biomasa que cubre y co-ayuda a la estabilidad de las morfologías y tamaños que en este caso están por debajo de los 60nm. También existen pequeñas aglomeraciones con tamaños diversos, afectando a la

polidispersidad del sistema. En la **Figura 30-D** se presenta el histograma de frecuencia de tamaño, del cual obtenemos el tamaño promedio del sistema, el cual es de: $x= 48$ nm y $\delta=1.2$ nm.

El patrón de difracción de área selecta de nanopartículas de plata (AgCs) se presenta en la **Figura 30**; esto nos sirve para elucidar la estructura cristalina de las nanopartículas de Au, la cual con base en los datos experimentales se demuestra que la estructura es una fcc y la indexación de los anillos del plano de difracción está dada por los siguientes datos teóricos y experimentales; los cuales han sido indexados con los planos (111), (200), (220), (311) y (222) respectivamente (**Tabla 17**).

Tabla 17. Datos teóricos y experimentales cristalográficos de plata AgCs.

Anillo	Distancia τ (°A)	Distancia r (°A)	hkl	2θ	θ
1	2.355	2.3576565	111	38.1836	19.0918
2	2.039	2.0414413	200	44.3917	22.19585
3	1.442	1.4716703	220	64.5759	32.28795
4	1.23	1.2536041	311	77.5471	38.77355
5	1.1174	1.1127803	222	82.7212	41.3606

En la **Figura 31** se presenta el gráfico de dispersión de luz dinámica en donde el tamaño promedio global de AgCs es de 60.57nm, mientras que en el TEM se tiene tamaños promedios de 48nm se ve claramente la correlación que hay entre las dos técnicas analíticas. Las pequeñas aglomeración o morfologías diferentes que se apreciaron en las micrografías, aquí se encuentran definidas por el pico 1 con una distribución de 95.11nm en donde este valor es bastante alto, pero acertado puesto que al no ser todas esféricas presentan un mayor ángulo de dispersión aumentando de manera global el resultado.

Posición de medición (mm): 4.65	
Media (nm)	60.57
Pdl	0.306
Intercepción	0.887

Pico	Diametro (nm)	% intensidad
1	95.11	96.8
2	9.336	3.2
3	0	0

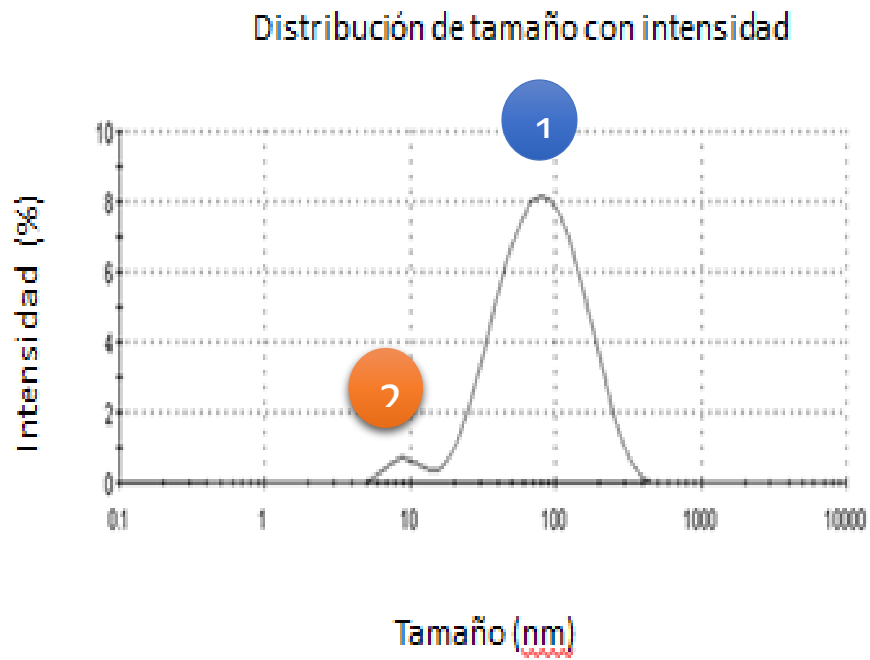


Figura 31. Gráfico de dispersión de Luz del sistema de AgNp sintetizadas con *Camellia sinensis*.

3.3. Toxicología

3.3.1 Evaluación toxicológica Aguda

Los resultados obtenidos se dividieron en dos etapas, en las que se les dosifico diferentes concentraciones que fueron desde una administración hasta 16 dosis en un lapso no mayor a 24 horas. Cada una de estas etapas tuvo su tiempo de observación de 14 días de manera separada.

Las concentraciones de los sistemas se fueron variando en base al metal (Au o Ag) y a la síntesis de las mismas, esto, con el fin de evaluar si existía una correlación entre la toxicidad ejercida por el metal y el medio en que se encuentran inmersas hacia el organismo administrado; esta concentraciones se muestran en la **Tabla 7** de la sección de metodología, en donde se pueden apreciar las dosis administradas durante cada una de las 2 etapas.

Tabla 7. Dosis empleadas para la Evaluación toxicológica aguda.

Dosis a 24 h		Etapa 1		Etapa 2		
		1 dosis	2 dosis	3 dosis	8 dosis	16 dosis
Sistema	Au NaBH ₄	1.73mg/kg	2.87mg/kg	5.749mg/kg	13.84mg/kg	27.68mg/kg
	Au <i>Camellia sinensis</i>	1.762mg/kg	3.523mg/kg	7.05mg/kg	14.096mg/kg	28.192mg/kg
	Ag NaBH ₄	0.349mg/kg	0.698mg/kg	1.397mg/kg	3.152 mg/kg	6.30mg/kg
	Ag <i>Camellia sinensis</i>	0.335mg/kg	0.670mg/kg	1.34mg/kg	2.68mg/kg	5.36mg/kg
Controles	SSI	/	/	/	/	/
	<i>Camellia sinensis</i>	/	/	/	/	/
	HAuCl ₄	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M
	NaBH ₄	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M

Algo importante es mencionar que los sistemas utilizados en todos los estudios toxicológicos; fueron administrados directamente de cómo se obtiene la solución después de cada una de las síntesis; no se les modifico ni altero de ninguna manera; simplemente se dejó que los sistemas (soluciones) se estabilizaran en un tiempo máximo de 24 horas, para poder tener sistemas estándar, y no existiera una incertidumbre entre cada uno de los resultados.

Las variables que se analizaron en cada uno de los grupos de 3 roedores fueron: los pesos corporales (diariamente), la ingesta diaria de alimento (IDA) y el volumen diario de agua (VDA) desde el día 1 hasta el día 14; para cada una de las dos etapas realizadas del estudio.

3.3.1.1 Nanopartículas de Oro (Toxicidad aguda).

La evolución de los pesos corporales de los diferentes lotes de murinos durante el análisis de toxicidad aguda para la Etapa 1 se muestra en la **Figura 32(a)** y para la Etapa 2 en la **Figura 32(b)**, el periodo de tiempo fue desde 1 hasta 14 días; para los sistemas de AuNp sintetizadas con NaBH₄ y *C. sinensis*, con el fin de verificar si existía una relación entre el método de síntesis con la toxicidad durante su administración; podemos apreciar un aumento gradual de los pesos corporales de los roedores (día con día); no se presentó ninguna disminución de peso; por lo tanto tampoco de inhibición del apetito; a excepción del lote 5AuBH (**Figura 32(b)**) en donde se tuvo es deceso de un miembro del grupo así como la disminución progresiva de pesos corporales durante los 14 días de experimentación.

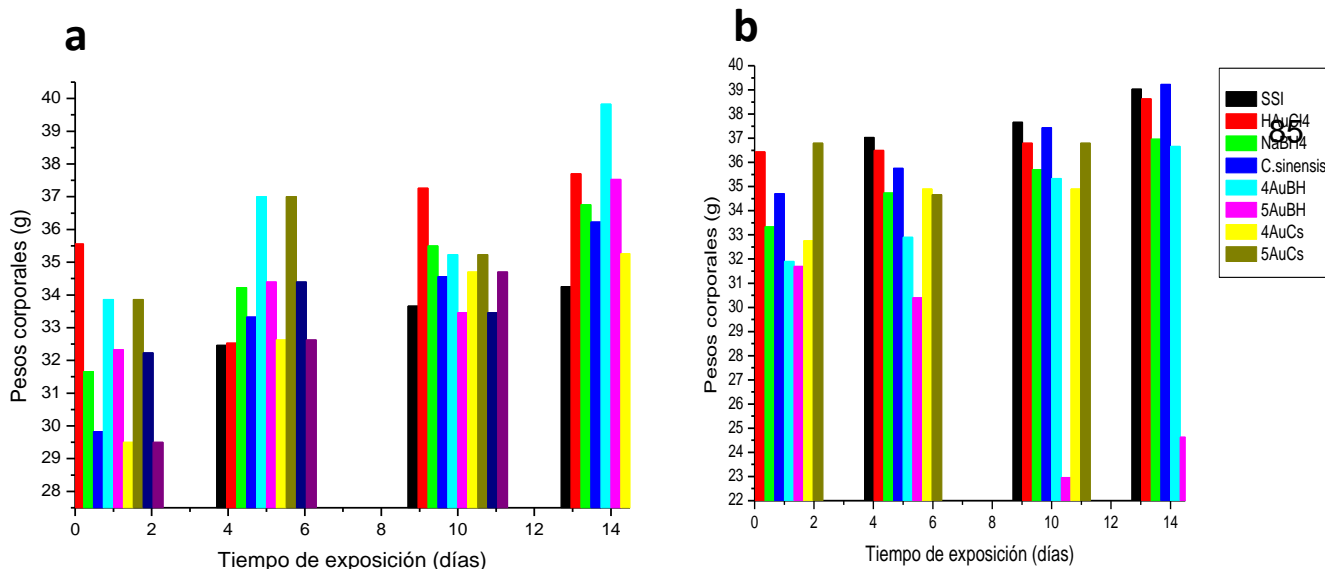


Figura 32. Pesos corporales de los lotes: a) Etapa 1 y b) Etapa 2 de la exposición aguda. 1AuBH y 1AuCs: 1 administración de nanopartículas de oro, 2AuBH y 2AuCs: 2 administraciones de nanopartículas de oro, 3AuBH y 3AuCs: 3 administraciones de nanopartículas de oro, 4AuBH y 4AuCs: 8 administraciones de nanopartículas de oro, 5AuBH y 5AuCs: 16 administraciones de nanopartículas de oro.
* P < 0.05

En la **Figura 32** que muestra los pesos corporales de la evaluación toxicológica aguda de AuNp; ahí mismo se muestran sus grupos control, mediante un análisis estadístico de la distribución de probabilidad T de Student con un intervalo de confianza $P < 0.05$ lo podemos ver que para la **Figura 32(a)(b)** existen diferencias significativas menores a 0.05 pudiendo indicar cierta influencia de las AuNp en el organismo a dosis mayores del sistema nanométrico, afectando algunos pesos corporales, causando una disminución de este después de su administración y durante su periodos de observación a los diferentes lotes.

En la **Tabla 18** se encuentran condensados todos los datos de los pesos relativos de los órganos (hígado, riñones, testículos, corazón y bazo) de los lotes dosificados con AuNp por las dos rutas sintéticas para las dos etapas de dosificación; así como también se encuentran datos de la ingesta diaria de alimento (IDA) y el volumen diario de agua (VDA).

Tanto en la etapa 1 como en la etapa 2 no presentan pruebas suficientes y convincentes de la existencia de una toxicidad aguda mortal durante su administración después de 14 días de observación, los órganos no presentaron cambios notables a nivel macroscópico, pero sí en sus pesos relativos. En las **Tabla 18** se muestra las diferentes dosis y sistemas de nanopartículas comparadas con los lotes testigo; de esta manera se evaluó la existencia de alguna diferencia notoria de alguno de los parámetros a analizar; los resultados muestran diferencias significativas de $P < 0.05$ y $P < 0.01$ entre los pesos relativos de los órganos para los lotes tratados con las mayores dosis de AuNp, como lo fueron 3AuBH en hígados y testículos; así como para 2AuCs y 3 AuCs en testículos y riñones respectivamente, dando indicios de la interacción de las AuNp con el organismo, lo que provoca aumentos en los pesos relativos de los órganos sin llegar a provocar la muerte.

Tabla 18. Pesos relativos de la Etapa 1 y 2 para las nanopartículas de oro.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control ^a	-	22.15 ± 4.59	30.75 ± 9.53	6.56 ± .305	0.77 ± 0.033	0.34 ± 0.068	0.57 ± 0.031	0.32 ± 0.053
HAuCl ₄ ^b	10 ⁻³ M	20.1 ± 2.87	30.75 ± 3.86	6.33 ± 0.321	0.83 ± 0.034	0.22 ± 0.145	0.62 ± 0.072	0.74 ± 0.405
NaBH ₄ ^c	10 ⁻² M	21.5 ± 3.24	32.75 ± 6.13	6.27 ± 1.10	0.76 ± 0.052	0.16 ± 0.038	0.58 ± 0.054	0.29 ± 0.033
<i>C. sinensis</i> ^d	-	20.57 ± 1.4	26.5 ± .57	6.3 ± 0.1	0.84 ± 0.038	0.18 ± 0.068	0.65 ± 0.151	0.35 ± 0.029
1Au-BH ^e	1.4374	20.8 ± 3.42	40.25 ± 4.5	6.3 ± 1.51	0.73 ± 0.083	0.36 ± 0.051	0.67 ± 0.072	0.36 ± 0.066
2 Au-BH ^f	2.8749	20.55 ± 2.69	40.25 ± 4.5	6.3 ± 1.51	0.73 ± 0.081	0.24 ± 0.174	0.78 ± 0.314	0.65 ± 0.426
3Au-BH ^g	5.7499	22.6 ± 3.54	35.25 ± 4.11	6.86 ± 0.118	0.78 ± 0.075	0.34 ± 0.064	0.58 ± 0.060	0.36 ± 0.066
1 Au-C. <i>sinensis</i> ^h	1.7629	22.82 ± 2.97	33 ± 3.55	6.66 ± 0.451	0.81 ± 0.069	0.21 ± 0.123	0.57 ± 0.058	0.34 ± 0.029
2 Au-C. <i>sinensis</i> ⁱ	3.525	24.22 ± 2.86	28.75 ± 1.892	6.03 ± 0.288	0.82 ± 0.069	0.37 ± 0.072	0.57 ± 0.059	0.39 ± 0.156
3 Au-C. <i>sinensis</i> ^j	7.051	22.25 ± 0.581	35.5 ± 7.59	6.26 ± 0.028	0.75 ± 0.027	0.23 ± 0.156	0.55 ± 0.054	0.36 ± 0.066

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	IDA (g)	VDA (ml)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control SSI	-	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.96 ± 0.288	0.73 ± 0.057	0.30 ± 0.056	0.57 ± 0.120	0.32 ± 0.027
HAuCl ₄	10 ⁻³ M	15.05 ± 2.200	21.5 ± 7.14	5.5 ± 0.655	0.61 ± 0.081	0.38 ± 0.063	0.52 ± 0.056	0.35 ± 0.035
NaBH ₄	10 ⁻² M	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.83 ± 0.723	0.76 ± 0.152	0.36 ± 0.052	0.56 ± 0.058	0.34 ± 0.102
<i>C. sinensis</i>	-	17.47 ± 3.31	27 ± 2.161	6.13 ± 0.651	0.73 ± 0.057	0.36 ± 0.083	0.57 ± 0.049	0.37 ± 0.071
4Au-BH	11.4992	15.37 ± 1.22	30.75 ± 3.31	6.20 ± 1.71	0.75 ± 0.219	0.21 ± 0.113	0.54 ± 0.227	0.34 ± 0.050
5 Au-BH	22.9984	14.07 ± 2.53	22.75 ± 2.62	4.20 ± 3.66	0.51 ± 0.445	0.23 ± 0.204	0.48 ± 0.427	0.30 ± 0.011
4 Au- C. <i>sinensis</i>	14.1032	12.05 ± 5.36	19.75 ± 2.06	6.16 ± 1.078	0.74 ± 0.216	0.34 ± 0.066	0.65 ± 0.196	0.29 ± 0.021
5 Au- C. <i>sinensis</i>	28.2064	12.7 ± 7.15	18 ± 4.69	5.93 ± 0.461	0.76 ± 0.104	0.20 ± 0.099	0.55 ± 0.056	0.32 ± 0.076

Datos expresados en Media ± Desviación estándar. n=3

Au-BH: nanopartículas de oro reducidas con Borohidruro de sodio

Au-C.*sinensis*: nanopartículas de oro reducidas con *Camellia sinensis*

IDA: ingesta diaria de alimento en gramos, VDA: volumen diario de agua en mililitros, PRH: peso relativo de hígado, PRR: peso relativo de riñones, PRT: peso relativo de testículos, PRC: peso relativo de corazón, PRB: peso relativo de bazo

*P<0.05, **P<0.01

Esto lo podemos apreciar más adelante con los análisis a los órganos a más detalle que se realizó en la siguiente parte del estudio; lo que si se observó fue una especie de aglomeración en los fluidos internos corporales del organismo provocadas por la interacción de las AuNp con el organismo (**Figura 33**)



Figura 33. Fotografía de un roedor diseccionado, después de ser administrado con AuNp.

Estos posibles daños se podrán comprobar más adelante durante los cortes histológicos de los órganos seleccionados para verificar si las AuNp se almacenaron en alguno de los órganos en cuestión, así como el posible daño causado por las interacciones de estos nanomateriales con el organismo, favorecidos con el pH y las fuerzas de Van der Waals.

Como conclusión se asume que no existe un daño severo hacia los murinos expuestos a un estudio toxicológico agudo, ya que solamente se tuvo una muerte en uno de los sistemas de AuBH, sin embargo si se obtienen resultados de las diferencias significativas en los pesos relativos de los órganos expuestos comparados con los órganos de los murinos testigos, lo que nos pudiera dar la información de que existe una alteración interna por la interacción con las AuNp

3.3.1.2 Nanopartículas de Plata (Toxicidad aguda).

Los resultados condensados de la evolución de los pesos corporales de los diferentes grupos de roedores durante el análisis de exposición aguda de AgNp, en la cual para la Etapa 1 (**Figura 34(a)**) y para la Etapa 2 (**Figura 34(b)**), en un intervalo de tiempo de 14 días; para los sistemas de AgNp sintetizadas con NaBH₄ como con *C. sinensis*. En donde podemos observar que existe una tendencia de aumento gradual de los pesos corporales de los roedores en la Etapa 1; mientras que en la Etapa 2 si se observan descensos en los pesos corporales de algunos miembros de los grupos administrados con AgNp, por lo que se podría presumir que al estar en contacto con el nanomaterial, este provoca una inhibición del apetito repercutiendo en los pesos corporales sobre todo en los primeros días del análisis. En la **Figura 34** se observan los pesos corporales de los murinos expuestos a una exposición aguda (24 horas) de AgNp, así como la comparación con los controles; en base a un análisis estadístico de la distribución de probabilidad T de Student con un intervalo de confianza $P < 0.05$ lo podemos ver que para la **Figura 34 (a)(b)** en la cual si existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los pesos corporales de los lotes control y los lotes administrados con AgNp durante los 14 días de observación; aunque no se tuvo ningún deceso, en esta evaluación.

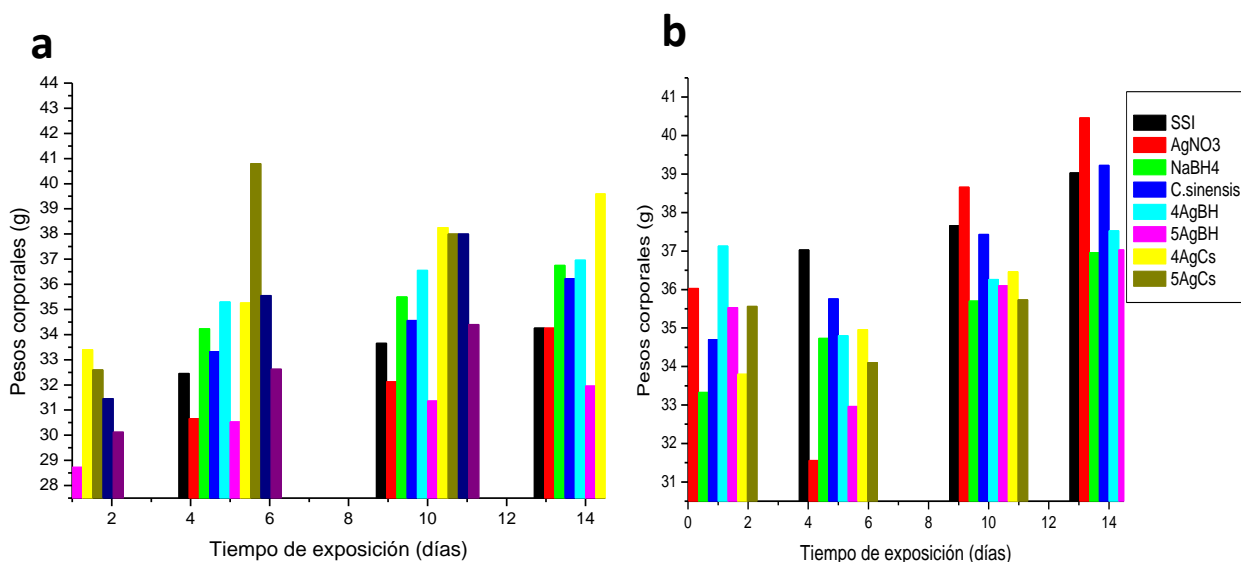


Figura 34. Pesos corporales de los lotes para la a) Etapa 1 y b) Etapa 2 de la exposición aguda.

*1AgBH y 1AgCs: 1 administración de nanopartículas de plata * 2AgBH y 2AgCs: 2 administraciones de nanopartículas de plata * 3AgBH y 3AgCs: 3 administraciones de nanopartículas de plata * 4AgBH y 4AgCs: 8 administraciones de nanopartículas de plata *5AgBH y 5AgCs: 16 administraciones de nanopartículas de plata.

* $P < 0.05$

En la **Tabla 19** se encuentran condensados todos los datos de los pesos relativos de los órganos (hígado, riñones, testículos, corazón y bazo) de los lotes dosificados con AgNp por las dos rutas sintéticas para las dos etapas de dosificación; así como también se encuentran datos de la ingesta diaria de alimento (IDA) y el volumen diario de agua (VDA).

Tanto en la etapa 1 y etapa 2 no muestran pruebas suficientes de que existe una toxicidad aguda causante de la muerte de alguno de los roedores durante su administración después de 14 días de observación, los órganos no presentaron cambios notables a nivel macroscópico pero si en sus pesos relativos comparado. En la **Tabla 19** se muestra la ingesta diaria de alimento, la ingesta diaria de agua y pesos relativos de los órganos, en donde se comparan con los lotes testigo. Los resultados muestran diferencias significativas de $P < 0.05$ y $P < 0.01$ entre los pesos relativos de los órganos para los lotes tratados con AgNp reducidas por los dos métodos, dando indicios de la interacción de las AgNp con el organismo afectando de cierta manera a los órganos internos, lo que provoca aumentos en los pesos relativos pero sin llegar a provocar la muerte de ningún miembro de los lotes.

Este estudio permite evaluar el potencial toxicológico de las nanopartículas metálicas (Au o Ag), para obtener información de la toxicidad acumulada a una exposición prolongada a bajas dosis ⁽⁷²⁻⁷³⁾ en un lapso no mayor de 24 horas y de esta manera poder evaluar la tolerancia fisiológica y metabólica del organismo a la interacción de este con las nanopartículas. Para estos estudios se pusieron en contacto durante 28 días los lotes de murinos con las nanopartículas, para observar signos tóxicos. Las dosis fueron administradas de forma intraperitoneal, y se mantuvieron en observación durante 28 días para determinar sintomatología de cada uno de ellos.

Tabla 19. Pesos relativos de la Etapa 1 y 2 para las nanopartículas de plata.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control	-	22.15 ± 4.59	30.75 ± 9.53	6.56 ± .305	0.77 ± 0.033	0.34 ± 0.068	0.57 ± 0.031	0.32 ± 0.053
AgNO ₃	10 ⁻³ M	20.25 ± 3.21	30.75 ± 3.8	6.46 ± 0.709	0.78 ± 0.027	0.24 ± 0.081	0.59 ± 0.101	0.29 ± 0.016
NaBH ₄	10 ⁻² M	21.5 ± 3.24	32.75 ± 6.13	6.27 ± 1.10	0.76 ± 0.052	0.16 ± 0.038	0.58 ± 0.054	0.29 ± 0.033
<i>C. sinensis</i>	-	20.57 ± 1.4	26.5 ± .57	6.3 ± 0.1	0.84 ± 0.038	0.18 ± 0.068	0.65 ± 0.151	0.35 ± 0.029
1Ag-BH	0.3492	24.9 ± 2.35	34.5 ± 4.04	5.73 ± .208	0.77 ± 0.042	0.36 ± 0.051	0.67 ± 0.072	0.36 ± 0.094
2 Ag-BH	0.6985	20.55 ± 2.11	31.25 ± 5.61	6.96 ± 4.41	0.82 ± 0.147	0.24 ± 0.174	0.78 ± 0.314	0.65 ± 0.426
3Ag-BH	1.397	9.15 ± 1.85	13.55 ± 1.42	6.6 ± 0.1	0.74 ± 0.101	0.34 ± 0.064	0.58 ± 0.060	0.40 ± 0.082
1 Ag-C. <i>sinensis</i>	0.335	23.22 ± 2.63	31 ± 4.63	6.27 ± 0.305	0.81 ± .092	0.21 ± 0.104	0.57 ± 0.061	0.36 ± 0.014
2 Ag-C. <i>sinensis</i>	0.67	21.77 ± 2.05	34.75 ± 5.25	7.23 ± 0.451	0.82 ± 0.076	0.37 ± 0.065	0.65 ± 0.051	0.52 ± 0.099
3 Ag-C. <i>sinensis</i>	1.34	22.8 ± 1.82	29.5 ± 4.04	6.6 ± 0.92	0.81 ± 0.092	0.20 ± 0.106	0.65 ± 0.111	0.47 ± 0.132

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control SSI	-	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.96 ± 0.288	0.73 ± 0.057	0.30 ± 0.056	0.57 ± 0.120	0.32 ± 0.027
AgNO ₃	10 ⁻³ M	19.35 ± 2.28	28.75 ± 3.21	5.96 ± 0.378	0.73 ± 0.057	0.33 ± 0.066	0.61 ± 0.068	0.34 ± 0.058
NaBH ₄	10 ⁻² M	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.83 ± 0.723	0.76 ± 0.152	0.36 ± 0.052	0.56 ± 0.058	0.34 ± 0.102
<i>C. sinensis</i>	-	17.47 ± 3.31	27 ± 2.161	6.13 ± 0.651	0.73 ± 0.057	0.36 ± 0.083	0.57 ± 0.049	0.37 ± 0.071
4AgBH	2.7936	12.8 ± 3.21	20.5 ± 3.69	5.66 ± 0.208	0.80 ± 0.100	0.26 ± 0.21	0.56 ± 0.028	0.29 ± 0.020
5 Ag-BH	5.5872	12.1 ± 3.96	19 ± 2.94	5.86 ± 0.305	0.80 ± 0.100	0.41 ± 0.075	0.62 ± 0.027	0.32 ± 0.076
4 Ag- C. <i>sinensis</i>	2.68	13.32 ± 4.23	23.25 ± 7.08	6.7 ± 0.871	0.76 ± 0.115	0.31 ± 0.117	0.55 ± 0.021	0.48 ± 0.194
5 Ag- C. <i>sinensis</i>	5.36	13.07 ± 3.46	20.5 ± 3.69	6.13 ± 0.321	0.76 ± 0.057	0.24 ± 0.168	0.53 ± 0.062	0.46 ± 0.147

Datos expresados en Media ± Desviación estándar. *n*=3

Ag-BH: nanopartículas de plata reducidas con Borohidruro de sodio

Ag-C.*sinensis*: nanopartículas de plata reducidas con *Camellia sinensis*

IDA: ingesta diaria de alimento en gramos, VDA: volumen diario de agua en mililitros, PRH: peso relativo de hígado,

PRR: peso relativo de riñones, PRT: peso relativo de testículos, PRC: peso relativo de corazón, PRB: peso relativo de bazo

P*<0.05. *P*<0.01

3.3.2 Evaluación subaguda

3.3.2.1 Nanopartículas de Oro (AuNp).

Los resultados se basan en la exposición de las AuNp de manera subaguda durante 28 días ininterrumpidos, a la misma hora y en las mismas condiciones ambientales así como las mismas condiciones de síntesis para cada uno de los sistemas de AuNp, las cuales son: para oro reducido con Borohidruro de Sodio con 3mL (AuBH) y oro reducido con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* con 0.6mL (AuCs). Las dosis que se administraron se basan en la **Tabla 8 (en la metodología)** de cada sistema, en una dilución **1/100** para cada una de las dosis. Se analizaron las variables de los lotes como: los pesos corporales, la ingesta diaria de alimento (IDA) y el volumen diario de agua (VDA) desde el día 1 hasta el día 28.

La **Figura 35** se muestra la evolución de los pesos corporales de los grupos durante del análisis subagudo para las AuNp, en un intervalo de tiempo de 1 a 28 días. Podemos observar que existe una tendencia de aumento de los pesos corporales, a excepción del lote NaBH₄ (control) ya que en los primeros días presentó una disminución drástica de su peso corporal, aunque hay que enfatizar que esto viro conforme transcurrió el tiempo de observación.

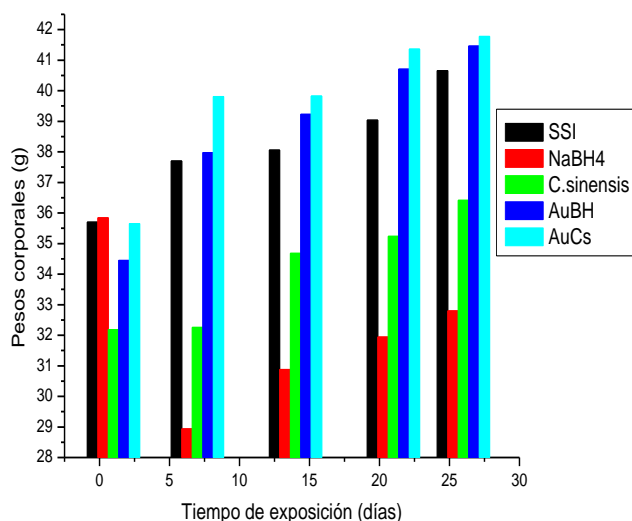


Figura 35. Pesos corporales del estudio subagudo.

AuBH nanopartículas de oro reducidas con NaBH₄, AuCs nanopartículas de oro reducidas con *Camellia sinensis*.

* P < 0.05 **P<0.01

En la **Figura 35** se tienen los controles: SSI, NaBH₄ y *C. sinensis*; como los grupos administrados; con base a un análisis estadístico con la distribución de probabilidad T de Student con intervalos de confianza P<0.05 y P<0.01 podemos ver que existen algunas variaciones y diferencias significativas en los pesos corporales entre si, para algunos integrantes de un mismo lote administrado así como disminuciones de pesos en los días 1 hasta 28; este gráfico nos indica que pese a que las dosis tuvieron un tiempo y concentración de administración mayor no se obtuvo ningún deceso; pero si están causando alguna reacción adversa provocando cierta inhibición de apetito.

Tabla 20. Pesos relativos de órganos expuestos a nanopartículas de oro (Análisis Subagudo).

Tratamiento	Dosis (mg/kg) (1/100)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control SSI ^a	-	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.70 ± 0.245	(*a-d) 0.73 ± 0.028	0.377 ± 0.056	0.455 ± 0.043	0.351 ± 0.213
NaBH ₄ ^b	10 ⁻² M	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.60 ± 7.90	(*b-d) 0.70 ± 0.70	0.384 ± 0.044	(*b-d) 0.519 ± 0.040	0.316 ± 0.050
Au-BH ^c	22.9984	30.94 ± 8.64	56 ± 10	6.00 ± 8.60	(*a-c) 0.80 ± 1.30	0.209 ± 0.099	0.434 ± 0.057	0.334 ± 0.085
Au-C.s. ^d	28.2064	32.74 ± 1.12	47.20 ± 8.75	5.80 ± 9.99	0.70 ± 0.70	0.210 ± 0.092	0.482 ± 0.075	0.319 ± 0.048

Datos expresados en Media ± Desviación estándar n=5

Au-BH: nanopartículas de oro reducidas con Borohidruro de sodio

Au-C.*sinensis*: nanopartículas de oro reducidas con *Camellia sinensis*

IDA: ingesta diaria de alimento en gramos, VDA: volumen diario de agua en mililitros, PRH: peso relativo de hígado, PRR: peso relativo de riñones, PRT: peso relativo de testículos, PRC: peso relativo de corazón, PRB: peso relativo de bazo

*P<0.05. **P<0.01

Al igual que en los estudios agudos, al término de la observación (28 días) se sacrificaron y diseccionaron a los roedores y se analizó estadísticamente la ingesta diaria de alimento, la ingesta diaria de agua y pesos relativos de los órganos (hígado, riñones, testículos, corazón y bazo) comparándolos con los órganos testigo, resultados estan condensados en la **Tabla 20**. Se muestran diferencias significativas de P<0.05 y P<0.01 entre los pesos relativos de los órganos para los lotes tratados con AuNp reducidas por los dos métodos, proporcionando la

información de cierta interacción de las AuNp con el organismo, lo que provocó aumentos en los pesos relativos de los órganos aunque sin llegar a la muerte.

3.3.2.1 Nanopartículas de Plata (AgNp).

Los resultados se basan en la exposición de las AgNp de manera subaguda durante 28 días, a la misma hora con las mismas condiciones ambientales así como las mismas condiciones de síntesis para cada uno de los sistemas de AgNp, las cuales son: para plata reducida con Borohidruro de Sodio con 5mL (AgBH) y plata reducida con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* con 5mL (AgCs). De igual manera las dosis que se administraron se basan en la **Tabla 8 (en la metodología)** de cada sistema, en una dilución **1/100** Se analizaron las variables de cada uno de los lotes como: los pesos corporales de los murinos, la ingesta diaria de alimento (IDA) y el volumen diario de agua (VDA) desde el día 1 hasta el día 28.

La **Figura 36** muestra la evolución de los pesos corporales de los diferentes lotes de roedores durante del análisis subagudo, en un intervalo de tiempo de 1 hasta 28 días; para los sistemas de nanopartículas AgBH y AgCs. En donde se aprecia una tendencia de aumento en todos los pesos corporales, y al igual que los resultados anteriores, el lote administrado con NaBH_4 presento una disminución del peso corporal en los primeros días de observación, aunque después el peso corporal de este lote aumento, aunque no con la misma tendencia que los demás lotes control. En la **Figura 36** se muestran los pesos corporales de todos los lotes que fueron dosificados intraperitonealmente con AgNp, se tienen los lotes control: SSI, NaBH_4 y *C. sinensis* y mediante el uso de un análisis estadístico con la distribución de probabilidad T de Student con intervalos de confianza $P < 0.05$ y $P < 0.01$ podemos ver que existen variaciones y diferencias significativas de los pesos corporales así como disminuciones de los pesos corporales de estos desde los días 1 hasta 28 días de observación de cada uno de los lotes, este gráfico nos indica que pese a que las dosis tuvieron un tiempo y concentración de administración mayor no se

obtuvo ningún deceso; pero si están causando alguna reacción adversa provocando cierta inhibición de apetito.

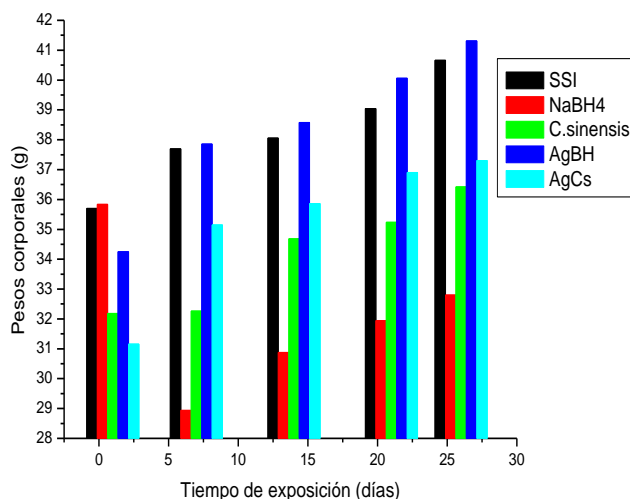


Figura 36. Pesos corporales del estudio subagudo. AgBH nanopartículas de plata reducidas con NaBH₄, AgCs nanopartículas de plata reducidas con *Camellia sinensis*.

* P < 0.05 **P<0.01

Tabla 17. Pesos relativos de órganos expuestos a nanopartículas de plata (Análisis Subagudo).

Tratamiento	Dosis (mg/kg) (1/100)	IDA (g)	VDA (mL)	PRH (%)	PRR (%)	PRT (%)	PRC (%)	PRB (%)
Control SSI	-	20.95 ± 2.66	22 ± 4.08	5.70 ± 0.245	0.73 ± 0.028	0.377 ± 0.056	0.455 ± 0.043	0.351 ± 0.213
NaBH₄	10 ⁻² M	16.95 ± 2.13	28.75 ± 3.21	5.60 ± 7.901	0.70 ± 0.70	0.384 ± 0.044	0.519 ± 0.040	0.316 ± 0.050
Ag-BH	6.3	32.76 ± 5.29	46.2 ± 12.45	5.91 ± 9.001	0.70 ± 1.1	0.41 ± 0.09	0.41 ± 0.07	0.34 ± 0.03
Ag-C.s	5.36	32.2 ± 1.86	44.4 ± 9.76	5.92 ± 6.745	0.8 ± 0.7	0.31 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.32 ± 0.04

Datos expresados en Media ± Desviación estándar n=5

Ag-BH: nanopartículas de plata reducidas con Borohidruro de sodio

Ag-C.*sinensis*: nanopartículas de plata reducidas con *Camellia sinensis*

IDA: ingesta diaria de alimento en gramos, VDA: volumen diario de agua en mililitros, PRH: peso relativo de hígado, PRR: peso relativo de riñones, PRT: peso relativo de testículos, PRC: peso relativo de corazón, PRB: peso relativo de bazo

*P<0.05. **P<0.01

De la misma manera que en los estudios anteriores se analizaron los mismos aspectos durante el tiempo de observación; en donde los resultados se presentan en la **Tabla 21** como son la ingesta diaria de alimento, la ingesta diaria de agua y pesos relativos de los órganos comparados con los lotes testigo. Los resultados muestran diferencias significativas de entre $P < 0.05$ y $P < 0.01$ entre los pesos relativos de los órganos para los lotes tratados AgNp reducidas por los dos métodos, dando indicios de la interacción de las AgNp con el organismo, lo que provoca aumentos en los pesos relativos de los órganos sin llegar a provocar la muerte.

Al no presentarse ninguna muerte en ninguno de los dos análisis tanto en el agudo como en el subagudo, no se puede llegar a concluir con una dosis máxima permisible, ni mucho menos con una DL_{50} , ya que no se presentaron descensos significativos durante las evaluaciones. Más sin embargo si se obtienen resultados interesantes de los factores adversos en los organismos causados por la interacción con las AuNp y AgNP como: cierta inhibición del apetito, presencia de daños macroscópicos en los órganos; diferencias significativas en pesos relativos de los órganos (hígado, riñones, testículos, corazón y bazo).

Uno de los hallazgos más importantes es el aumento significativo a nivel macroscópico en el estómago, como se muestra en la **Figura 37** causado por las nanopartículas de oro sintetizado con BH₄.



Figura 37. Comparativa de estómago (control vs AuBH).

Es importante enfatizar que estos daños son causados por los metales utilizados en tamaño nanométrico (Au y Ag), mas no por la ruta de síntesis; ya que ni el medio químico (NaBH₄) ni el medio biológico (*Camellia sinensis*) están causando diferencias entre sí ni afectando lo organismos vivos utilizados durante el análisis.

3.4 Histolocalización.

Al no presentarse mortandad alguna durante los análisis toxicológicos antes mencionados, es necesario saber si estos nanomateriales presentaron efectos adversos o cierto grado de alojamiento o deposición en algunos órganos (hígado y riñón) por su afinidad biológica o por ser más susceptibles ya que presentan una irrigación sanguínea importante y al ser los órganos principales de la desintoxicación, pudieran estar comprometidos al momento de estar en contacto con las nanopartículas metálicas. Es por esto que es importante analizar los cortes histológicos para determinar las posibles zonas de alojamiento de las AuNp y AgNp es estos dos órganos analizados.

3.4.1 Histolocalización de nanopartículas de oro.

Este análisis sirve de soporte para la parte de toxicológica de las AuNp sintetizadas por los dos métodos para determinar la posible zona en la que se depositaron las nanopartículas durante los estudios toxicológicos previos, en donde se les administraron de manera gradual concentraciones conocidas de estos nanomateriales. Es importante conocer si las nanopartículas de oro AuNp se depositaron en conductos sanguíneos y principales zonas del órgano en las que se almacenaron; estos resultados se dan gracias a las propiedades ópticas de las AuNp (fluorescencia)^(19,31,60) que nos permitirán visualizar las zonas mediante la excitación electrónica provocando fluorescencia de las AuNp mediante el uso de un

Microscopio de Epifluorescencia. Se realizaron los cortes de órganos administrados con AuNp mediante la metodología de criotomía, se hizo una comparación con órganos testigo/control para determinar diferencias entre los cortes.

En la **Figura 38** se observan diversos cortes del hígado en los que se compara el hígado control (1a-1c) y el hígado tratado con nanopartículas de oro reducidas con NaBH_4 (2a-3c) AuBH, podemos apreciar zonas fluorescentes en las periferias de las venas centrales, arterias biliares y conductos sanguíneos que corresponden a la respuesta óptica de AuNp con la longitud de onda de los filtros azul (397nm) y verde (519nm) del Microscopio de Epifluorescencia; donde el filtro azul proporcionó una mejor respuesta que el verde, debido a una correlación entre el nanomaterial y la longitud de onda del filtro. Es importante resaltar que en las micrografías 2a y 3a que se tomaron sin la interacción de los filtros del equipo, son micrografías de campo claro en las que se observan acumulaciones color marrón debidas a la existencia de hemorragias internas al grado de causar cierto grado de necrosidad en los tejidos y alteraciones celulares.

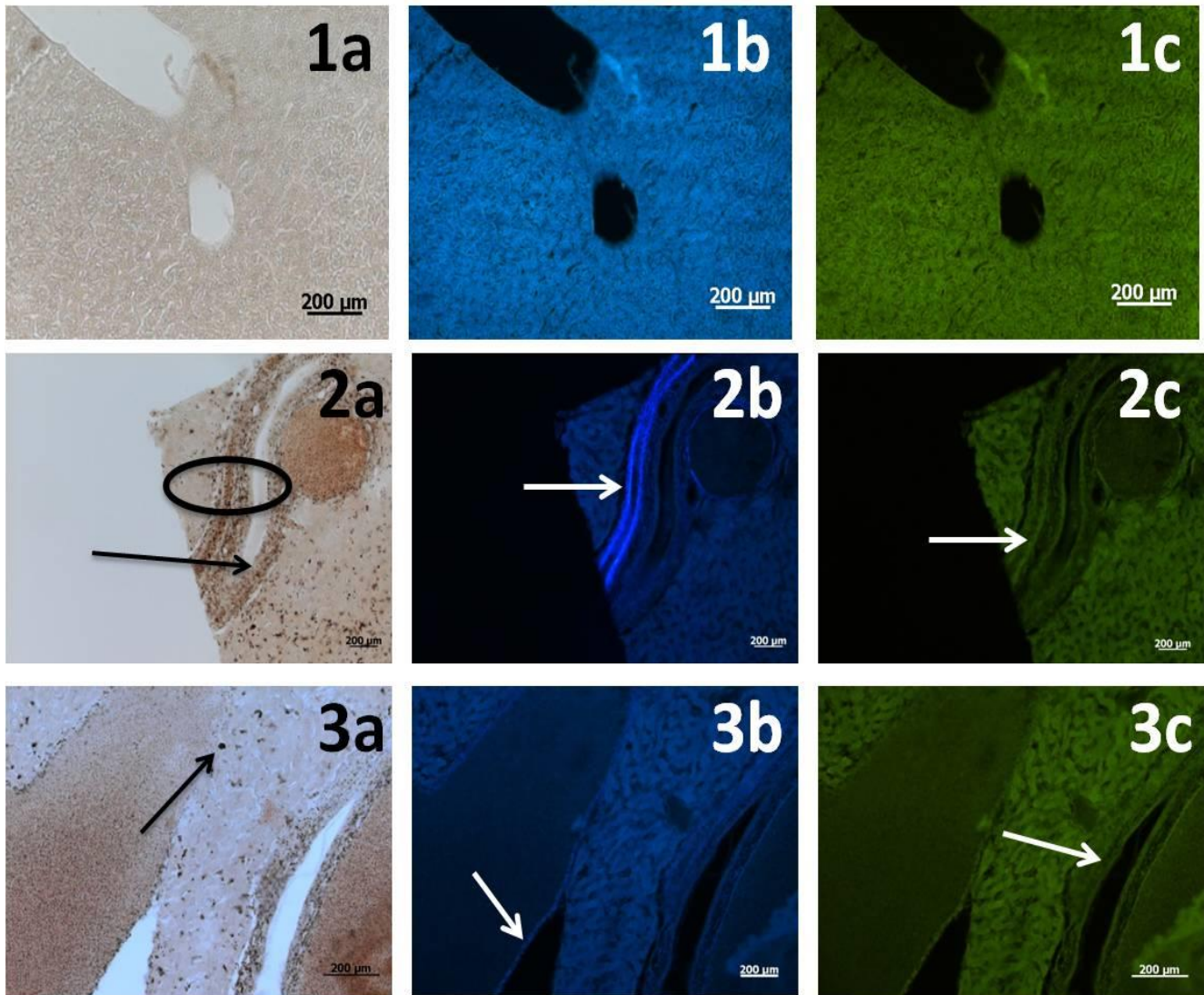


Figura 38. Fotografías de histolocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del hígado control 1(a-c) y fotografías del hígado tratado con AuNp reducidas con NaBH₄ 2 y 3(a-c).

En la **Figura 39** se observan los diversos cortes de riñones. Se hace una comparación entre el riñón control (1a-1c) y el riñón tratado con nanopartículas de oro reducidas con NaBH_4 (2a-3c) AuBH , donde se observan zonas que fluorescen con mayor intensidad que los cortes comparados con el riñón control. Esta diferencia de fluorescencia se debe a la presencia de AuNp y su interacción con el haz de electrones del microscopio, generando una fluorescencia más intensa; así también se observa una mayor intensidad en las zonas de los epitelios.

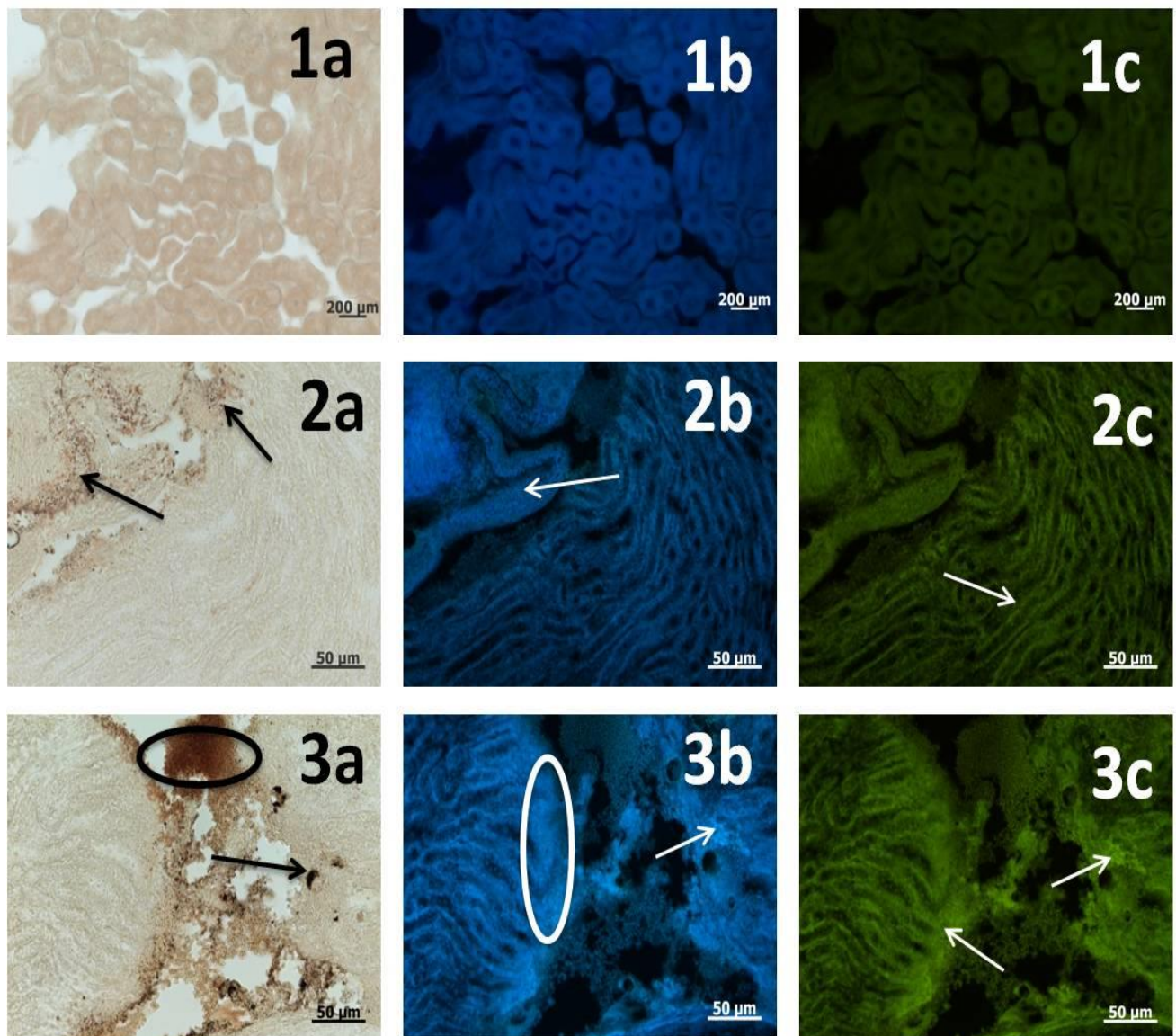


Figura 39. Fotografías de histolocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del riñón control 1(a-c) y fotografías riñón tratado con AuNp reducidas con NaBH_4 2 y 3 (a-c).

En la **Figura 40** se observan diversos cortes de hígado, en la que se compara el hígado control (1a-1c) y el hígado tratado con AuNp reducidas con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (2a-3c) (AuCs) donde se observan zonas fluorescentes en las periferias de las venas centrales, arterias biliares y conductos sanguíneos que corresponden a la respuesta óptica de AuNp a la longitud de onda de los filtros azul (397nm) y verde (519nm) del Microscopio de Epifluorescencia; observándose una mejor respuesta para el filtro azul. En las micrografías 2a y 3a realizadas a campo claro se aprecian acumulaciones color marrón consecuencia de hemorragias internas, y alteraciones en los órganos debidos a la gran cantidad de sangre que contienen, propiciando la generación de tejidos necrosadas.

En la **Figura 41** se observa los diversos cortes de riñones; se hace una comparación entre el riñón control (1a-1c) y el riñón tratado con nanopartículas de oro reducidas con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (2a-3c) (AuCs), donde se observan zonas que fluorescen con mayor intensidad que el riñón control. Esta diferencia de fluorescencia se debe a la presencia de AuNp y su interacción con microscopio, se aprecia una mayor intensidad en las zonas de los epitelios.

En los cortes de hígado y riñón que fueron expuestos a sistemas de AuNp reducidas por los dos métodos se observan alteraciones degenerativas (necrosis general) cuando se analizan los tejidos en campo claro siendo factores de importancia y con cierta relevancia para relacionarlos con los resultados toxicológicos, ya que se considera un efecto directo y nocivo hacia el organismo por la exposición de las AuNp con él órgano (generalmente irreversibles). De igual manera podemos ver que existe una deposición de las AuNp principalmente en venas y arterias de los órganos analizados.

La necrosis hepática es una respuesta común de una contaminación tóxica, esta respuesta se observa en todos los tratamientos comparados con los grupos control, con una incidencia del 95%.

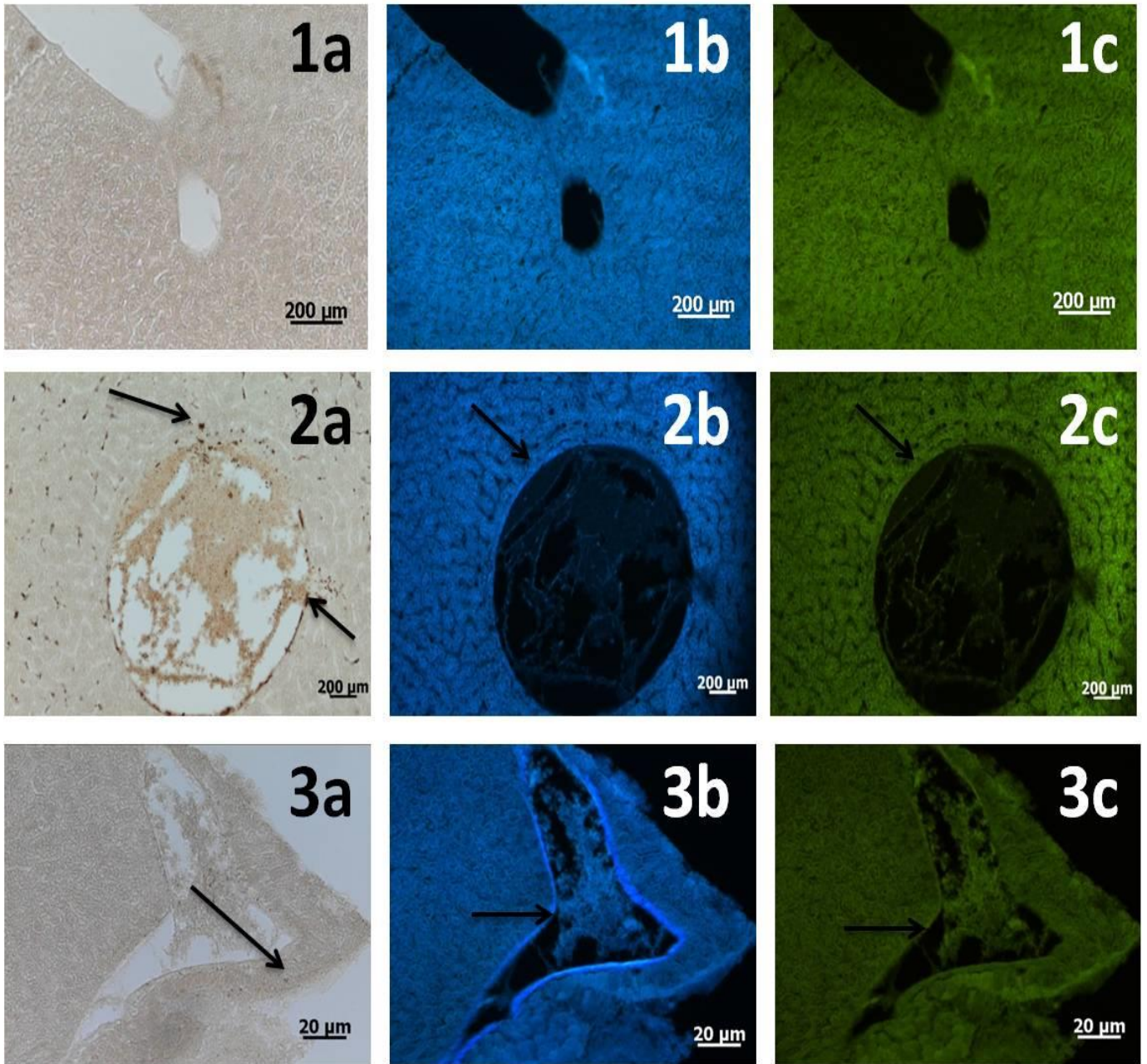


Figura 40. Fotografías de histocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del hígado control 1(a-c) y fotografías del hígado tratado con AuNp reducidas con *Camellia sinensis* 2 y 3 (a-c).

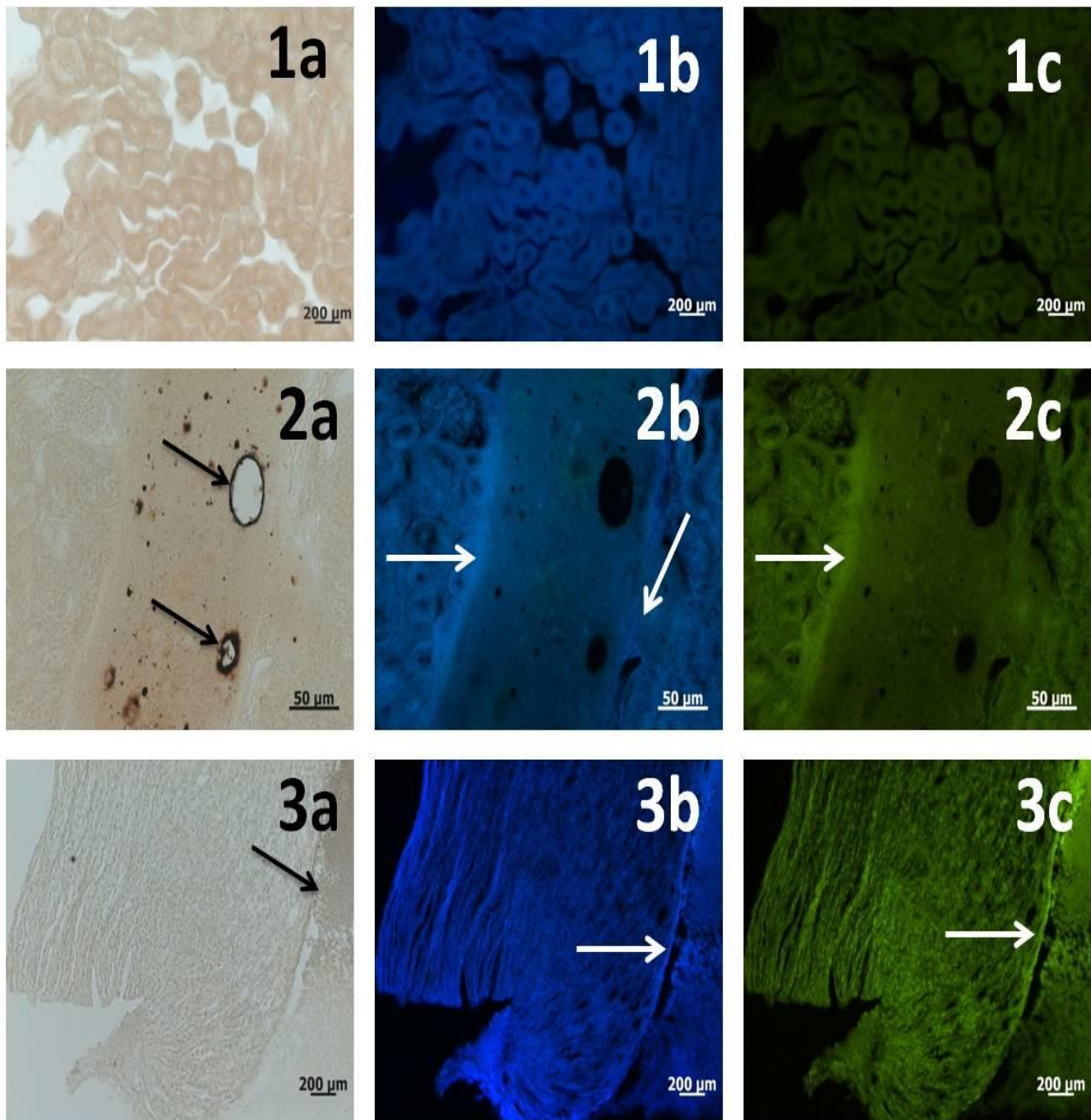


Figura 41. Fotografías de histolocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del riñón control 1(a-c) y fotografías riñón tratado con AuNp reducidas con *Camellia sinensis* 2 v3 (a-c).

3.4.2 Histolocalización de nanopartículas de plata.

De la misma manera; estos análisis sirven de soporte para la parte de toxicológica de las AgNp sintetizadas por los dos métodos para determinar la posible zona en la que se depositaron las nanopartículas durante los estudios toxicológicos previos, en donde se les administraron de manera gradual concentraciones conocidas de estos nanomateriales. Es importante conocer si las AgNp se depositan en los conductos sanguíneos ⁽⁴²⁾ y determinar las principales zonas en los diferentes órganos en las que se almacenan; esto gracias a las propiedades ópticas de las AgNp (fluorescencia)¹⁷⁻¹⁹ que nos permitirán visualizar las zonas mediante la excitación electrónica provocando exista una fluorescencia específica para las AgNp mediante el uso de un Microscopio de Epifluorescencia. Para los cortes de órganos dosificados con AgNp mediante la misma metodología anterior que fue la criotomía, todos los cortes se compararon contra un corte testigo/control para determinar diferencias.

En la **Figura 42** se observan diversos cortes del hígado, en la que se compara el hígado control (1a-1c) y el hígado tratado con AgNp reducidas con NaBH₄ (2a-3c) AgBH donde podemos observar zonas fluorescentes en las periferias de las venas centrales, arterias biliares y conductos sanguíneos que corresponden a la respuesta óptica de AgNp con la longitud de onda de los filtros azul (397nm) y verde (519nm) del Microscopio de Epifluorescencia; donde el filtro azul proporcionó una mejor respuesta que el verde, debido a una correlación entre el nanomaterial y la longitud de onda del filtro. Es importante resaltar que en las micrografías 2a y

3a que se tomaron sin la interacción de los filtros del equipo, son micrografías de campo claro en las que se observan acumulaciones color marrón debidas a la existencia de hemorragias internas al grado de causar cierto grado de necrosis en los tejidos y alteraciones celulares.

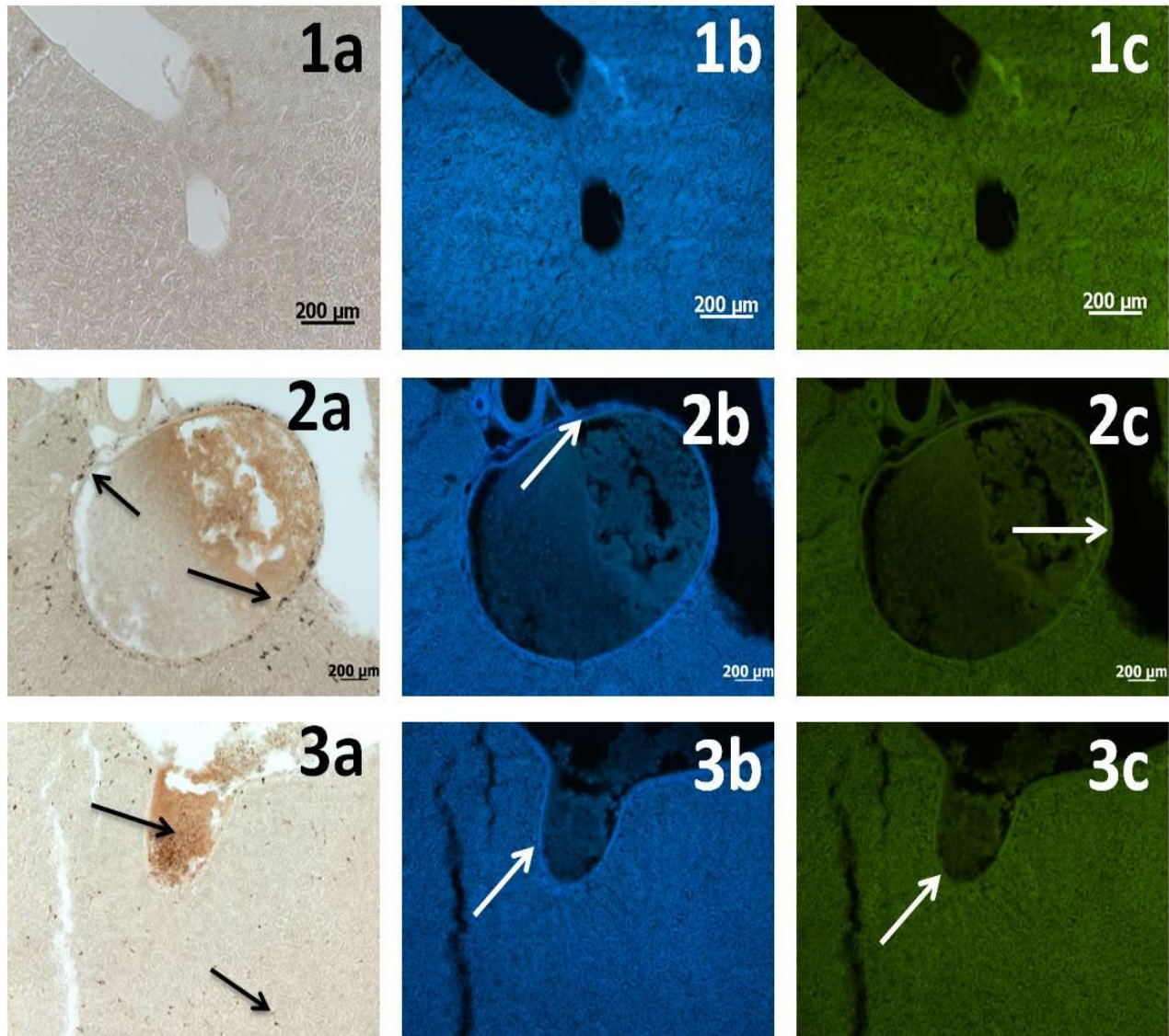


Figura 42. Fotografías de histolocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del hígado control 1(a-c) y fotografías del hígado tratado con AgNp reducidas con NaBH₄ 2 y 3(a-c).

En la **Figura 43** se observan los diversos cortes de riñones. Se hace una comparación entre el riñón control (1a-1c) y el riñón tratado con AgNp reducidas con NaBH₄ (2a-3c) (AgBH), donde se observan zonas que fluorescen con mayor intensidad que el riñón control. Esta diferencia de fluorescencia se debe a la presencia de AgNp y su interacción con el haz del microscopio. Se observa una mayor intensidad en las zonas de los epitelios.

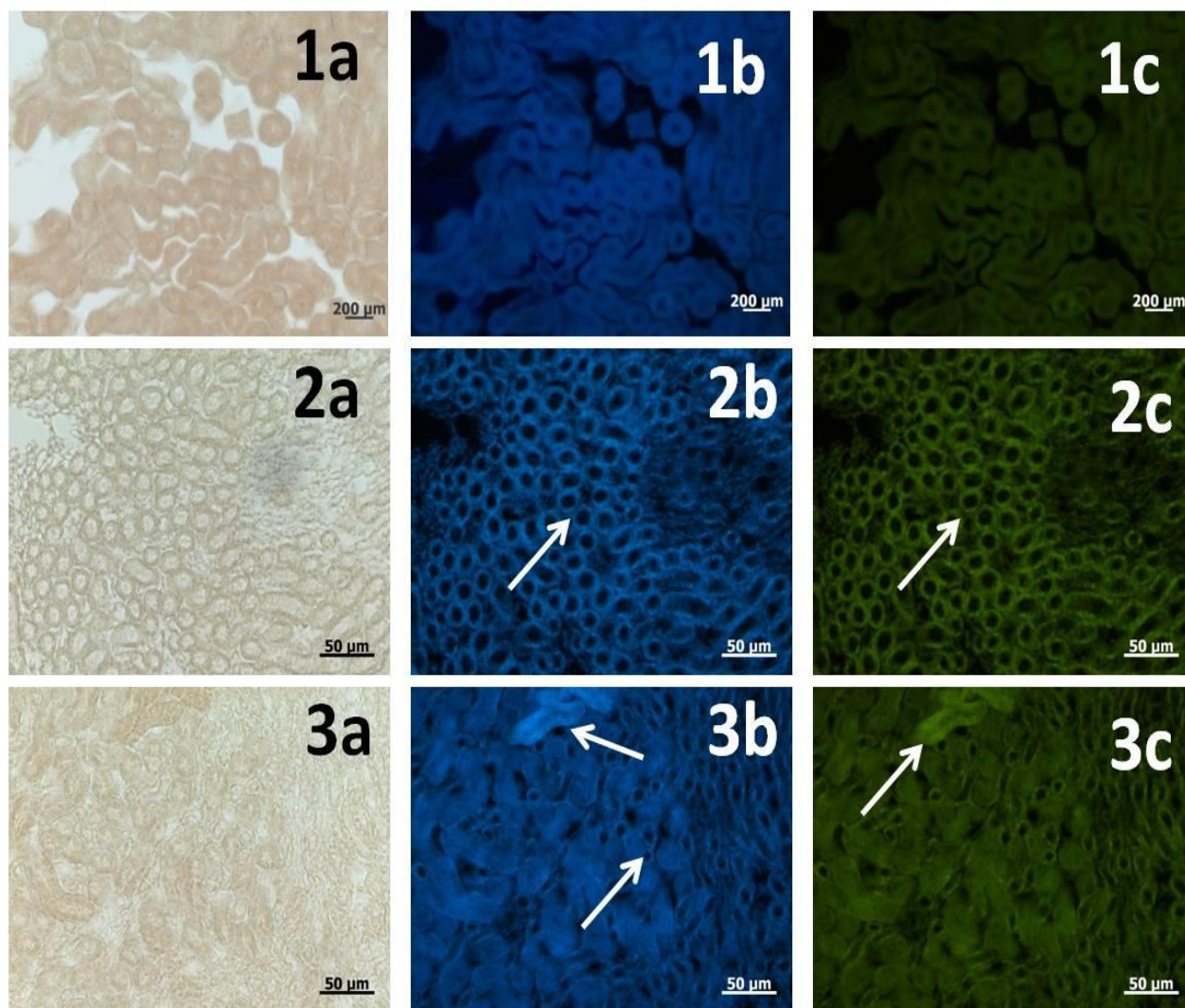


Figura 43. Fotografías de histocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del riñón control 1(a-c) y fotografías riñón tratado con AgNp reducidas con NaBH₄ 2 y 3 (a-c).

En la **Figura 44** se observan diversos cortes de hígado, en la que se compara el hígado control (1a-1c) y el hígado tratado con AgNp reducidas con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (2a-3c) (AgCs) donde se observan zonas fluorescentes en las periferias de las venas centrales, arterias biliares y conductos sanguíneos que corresponden a la respuesta óptica de AgNp a la longitud de onda de los filtros azul (397nm) y verde (519nm) del Microscopio de Epifluorescencia; observándose una mejor respuesta para el filtro azul. Es importante resaltar que en las micrografías 2a y 3a se observan acumulaciones color marrón debidas a la existencia de hemorragias internas, al grado de causar necrosidad en los tejidos.

En la **Figura 45** se observa los diversos cortes de riñones; se hace una comparación entre el riñón control (1a-1c) y el riñón tratado con AgNp reducidas con el extracto acuoso de *Camellia sinensis* (2a-3c) (AgCs), donde se observan zonas que fluorescen con mayor intensidad que el riñón control. Esta diferencia de fluorescencia se debe a la presencia de AgNp y su interacción con microscopio. Se observa una mayor intensidad en las zonas de los epitelios.

En los cortes de hígado y riñón que fueron expuestos a sistemas de AgNp reducidas por los dos métodos se observan alteraciones degenerativas (necrosis general) cuando se analizan los tejidos en campo claro siendo factores de importancia y con cierta relevancia para relacionarlos con los resultados toxicológicos, ya que se considera un efecto directo y nocivo hacia el organismo por la exposición de las AgNp con él órgano (generalmente irreversibles). De igual manera podemos ver que existe una deposición de las AgNp principalmente en venas y arterias de los órganos analizados.

La necrosis hepática es una respuesta común de una contaminación tóxica, esta respuesta se observa en todos los tratamientos comparados con los grupos control, con una incidencia del 95%.

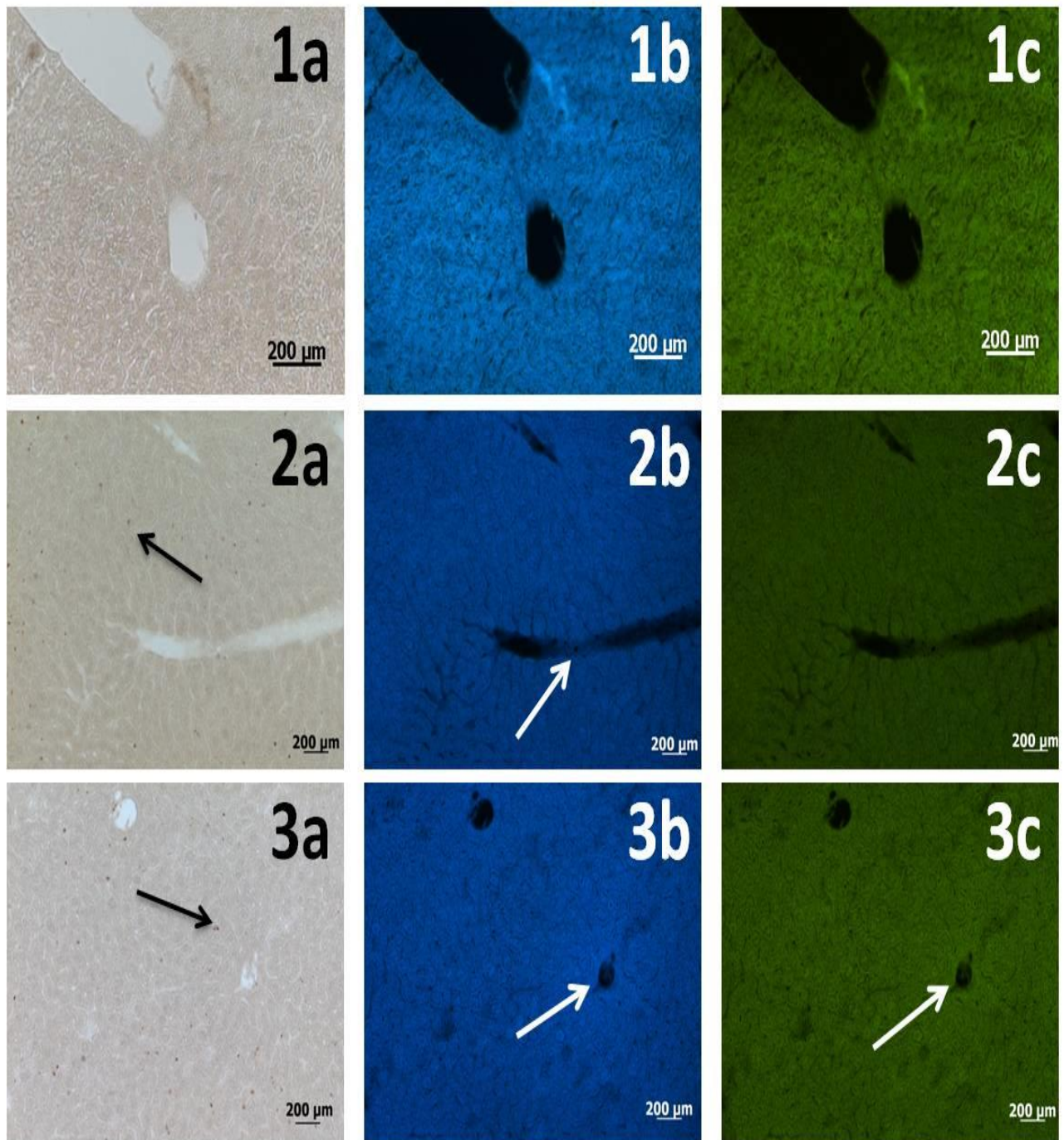


Figura 44. Fotografías de histlocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del hígado control 1(a-c) y fotografías del hígado tratado con AgNp reducidas con *Camellia sinensis* 2 y 3 (a-c).

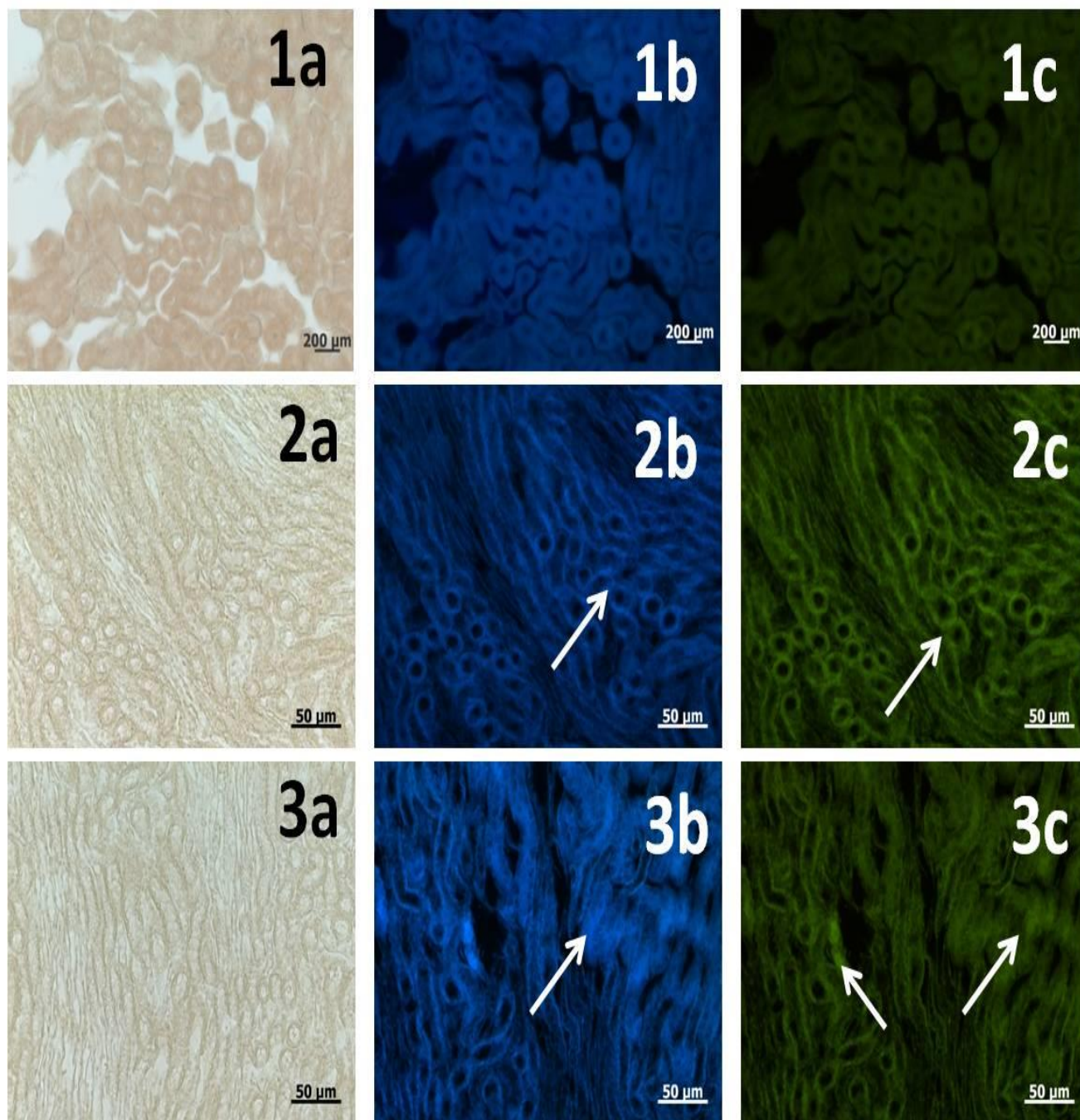


Figura 45. Fotografías de histolocalización obtenidas mediante el Microscopio de Epifluorescencia. Fotografías del riñón control 1(a-c) y fotografías riñón tratado con AgNp reducidas con *Camellia sinensis* 2 y 3 (a-c).

Tanto para los cortes de hígado y de riñón que fueron expuestos a sistemas de AuNp y AgNp reducidos mediante el uso de dos metodologías diferentes se observan alteraciones degenerativas (necrosis en general) al ser analizadas por microscopia óptica de campo claro se presentan secciones color marrón siendo factores de importancia, ya que se consideran un efecto nocivo directo de la exposición tanto de las AuNp como AgNp con el órgano a analizado (generalmente irreversibles). La necrosis hepática y renal es una respuesta común de la exposición tóxica, esta respuesta se observa en todos los tratamientos comparados con los grupos control.

3.5 Histopatología.

3.5.1 Nanopartículas de oro.

Con esta técnica se pudieron evaluar las alteraciones histopatológicas de las células en los cortes de hígado y riñón tratados con AuNp sintetizados por los dos métodos, estos se compraron con cortes histológicos de lotes control, para evaluar diferencias histopatológicas. Se localizaron las áreas específicas de los tejidos relacionados con el daño hepático y renal en las que se presentaron anomalías ⁽⁶⁷⁾ de los cortes anteriores; mientras que los hígados y riñones de los grupos control presentaron una histología normal. Para el hígado los hepatocitos y citoplasmas son homogéneos; las venas centrales, así como células epiteliales y ductos biliares son claramente visibles. Mientras que para los riñones se muestran los epitelios, túbulos y glomérulos con claridad sin alteraciones en los parénquimas de cada uno de los lotes control.

En la **Figura 46** presenta los cortes de los órganos que fueron expuestos a las AuNp se muestra un impacto nocivo e irreversible a dicha exposición. Los cambios histopatológicos de hígado y riñón presentan un efecto adverso para la salud ⁽³³⁾, ya que se encontraron diferencias entre los cortes expuestos a AuNp comparados con los cortes control. Las alteraciones hepáticas afectan áreas específicas generando daños a la salud ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

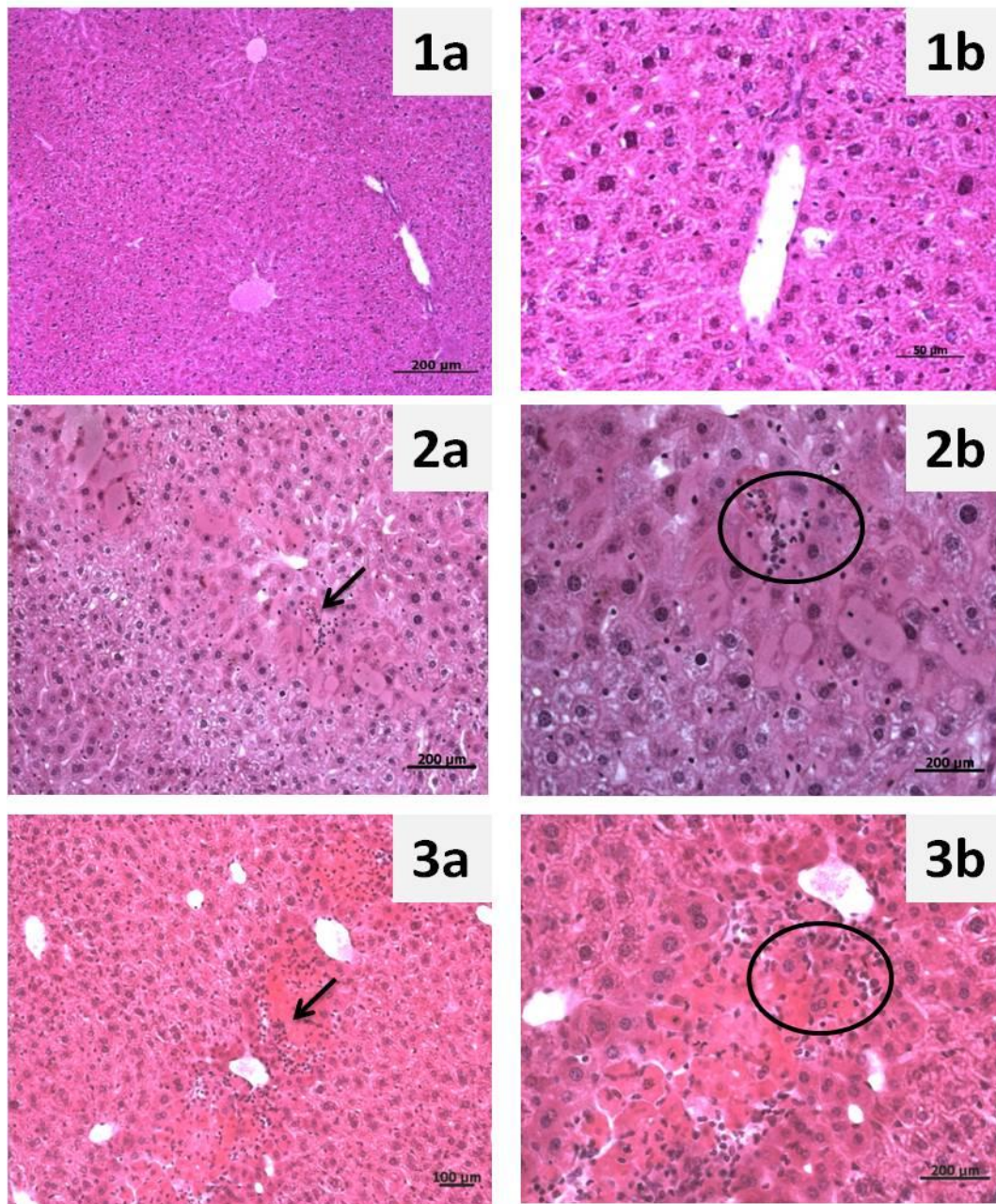


Figura 46. Histopatología de hígado. Control (1a-b) y cortes de hígado administrado con AuBH (2a-b) y AuCs (3a-b), después del estudio subagudo.

En la **Figura 46 (1a;1b)** se presenta los cortes de hígado control donde se muestran histologías hepáticas homogéneas donde el parénquima de todo el tejido es uniforme; se encuentra una estructura estándar en todo el corte, no se observa una alteración celular en ningún punto de las micrografías (1a, 1b) está compuesto por lóbulos hexagonales con las venas centrales y tríadas hepáticas. Los hepatocitos se organizan desde la vena central y están separados por sinusoides homogéneos, son regulares y contienen un núcleo esferoidal y distribución adecuada de la cromatina.

Para los cortes de hígado expuestos a AuNp reducidas con NaBH₄ (**Figura 46 (2a;2b)**) y AuNp reducidas con *C. sinensis* (**Figura 46 (3a;3b)**) se identifican cambios evidentes y circunstanciales en su histología general, ya que en todo el corte se aprecian alteraciones celulares hepáticas, como aperturas de estas, exposición de la cromatina. En estos cortes los lóbulos hepáticos se observan ligeramente borrosos, el citoplasma de algunas células muestra espacios vacíos tipo vacuola y aperturas de las células, así como condensación de la cromatina; o incluso alteración en la estructura histológica general del parénquima del corte. Incluso en algunos casos se encuentra totalmente expuesta la cromatina en las proximidades de las sinusoides; pudiendo llegar a ser bastante perjudicial para la célula.

En la **Figura 47 (1a;1b)** se prestan a los cortes de riñón control, donde se muestran histologías homogéneas en los glomérulos y túbulos renales; los túbulos colectores están revestidos con epitelio cúbico simple y con una pequeña acumulación intersticial de cromatinas definida y sin alteraciones.

Para los cortes de riñón expuestos con AuNp reducidas con NaBH₄ (**Figura 47 (2a;2b)**) y reducidas con *C. sinensis* (**Figura 46 (3a;3b)**), se identifican cambios en su histología afectando considerablemente a las células renales, teniendo diferencias significativas e importantes entre los cortes control y los tratados con las dosis de

AuNp en estos cortes los epitelios y glomérulos se observan ligeramente más grandes y muestran espacios vacíos y aperturas celulares, así como una acumulación, desorden y exposición de la cromatina; así como la presencia de alteraciones de las membranas celulares, hasta llegar incluso a la apertura de las mismas, todo esto provocado por la interacción constante de las AuNp con el órgano durante las administraciones subagudas realizadas durante el experimento.

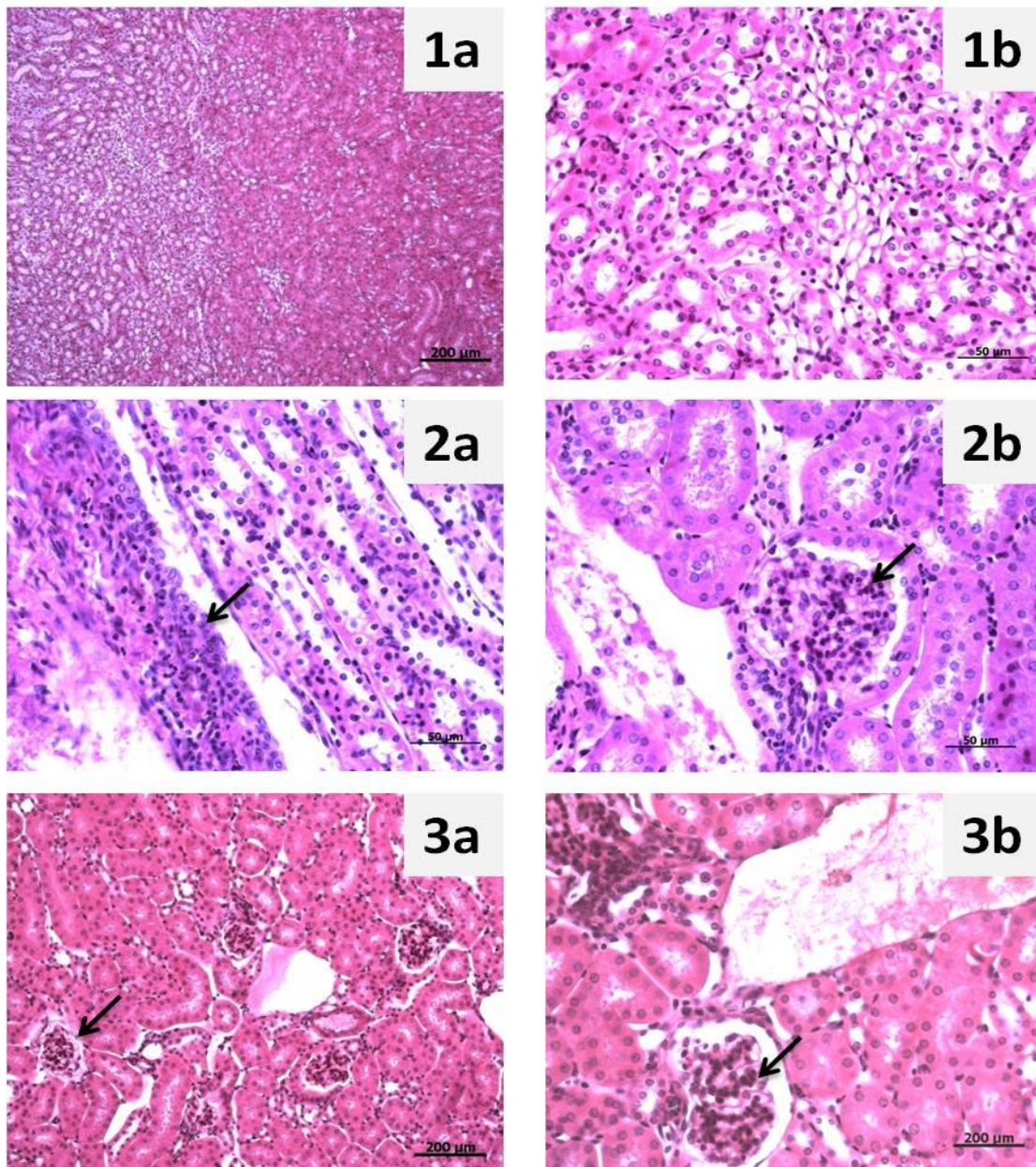


Figura 47. Histopatología de riñón. Control (1a-b) y cortes de riñón administrado con AuBH (2a-b) y AuCs (3a-b), después del estudio subagudo.

3.6.2 Nanopartículas de Plata.

Al igual que para los sistemas de nanopartículas de oro, se realizaron los cortes de hígado y riñón tratados con AgNp sintetizadas por los dos métodos, comparándose con los cortes de los lotes control, para evaluar diferencias histológicas significativas. Se localizaron las áreas específicas de los tejidos relacionados con el daño hepático y renal que se presentaron anomalías ⁽⁶⁷⁾. Todos los cortes de hígados y riñones de los grupos control presentaron una histología normal. En relación al hígado, los hepatocitos y citoplasmas son homogéneos; las venas centrales (CV), así como células epiteliales y ductos biliares son claramente visibles. Mientras que para los riñones se muestran los epitelios, túbulos y glomérulos con claridad sin alteraciones en los parénquimas de cada unos de los lotes control.

En la **Figura 48** podemos observar los cortes de los órganos que fueron expuestos a las AgNp y se muestra un impacto nocivo e irreversible a la exposición de los nanomateriales en un organismo vivo. Los cambios histopatológicos de hígado y riñón presentan un efecto irremediable para la salud ⁽³³⁾ en comparación con los cortes control, en donde algunas de las alteraciones hepáticas afectan áreas específicas y por consiguiente funciones vitales del órgano, generando daños a la salud ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

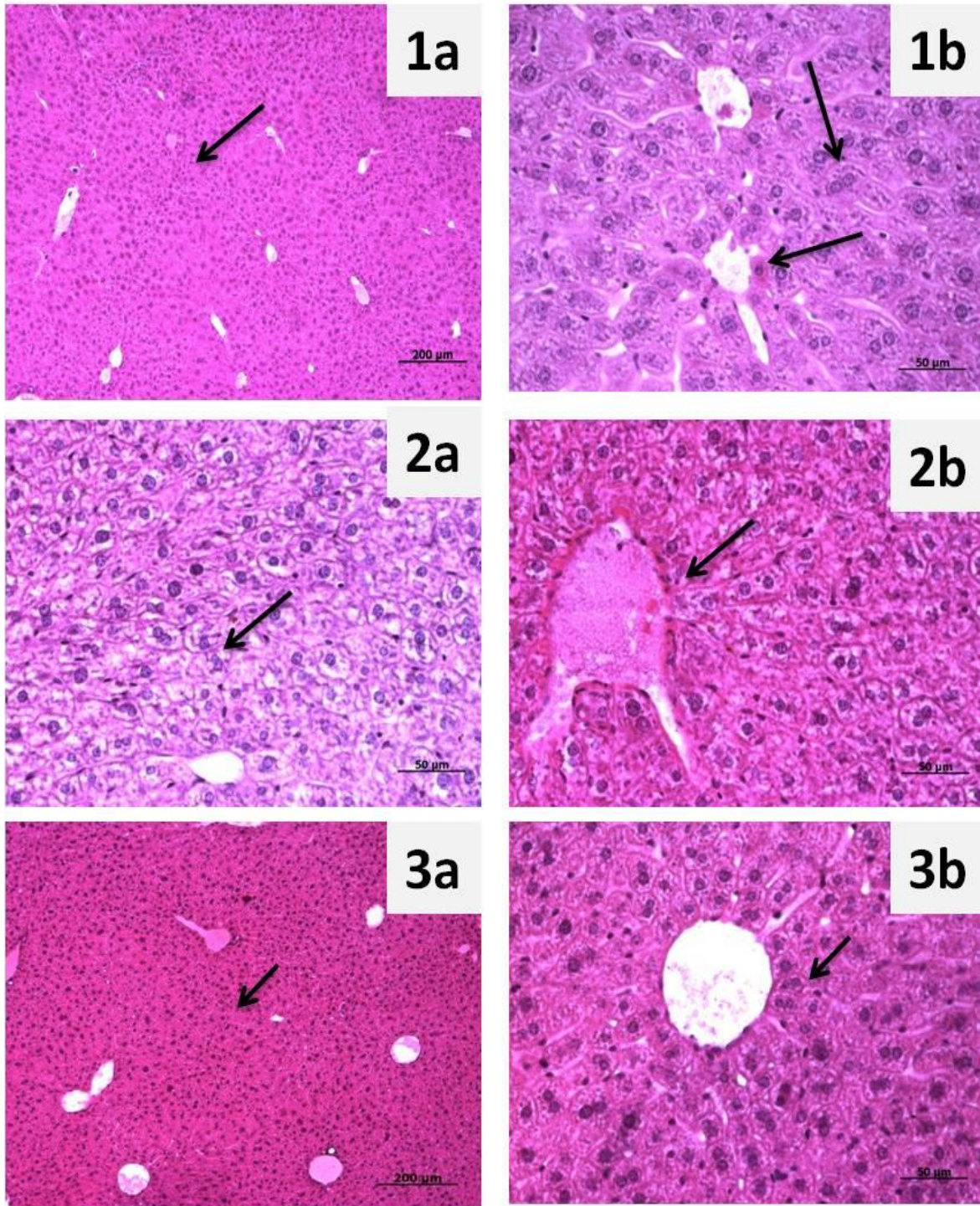


Figura 48. Histopatología de hígado. Control (1a-b) y cortes de hígado administrado con AgBH (2a-b) y AgCs (3a-b), después del estudio subagudo.

En la **Figura 48 (1a;1b)** se presenta los cortes de hígado control donde se muestran histologías hepáticas homogéneas donde el parénquima de todo el tejido es uniforme; se encuentra una estructura estándar en todo el corte, no se observa una alteración celular en ningún punto de las micrografías (1a, 1b) está compuesto por lóbulos hexagonales con las venas centrales y tríadas hepáticas. Los hepatocitos se organizan desde la vena central y están separados por sinusoides homogéneos, son regulares y contienen un núcleo esferoidal y distribución adecuada de la cromatina.

Para los cortes de hígado expuestos a AgNp reducidas con NaBH₄ (**Figura 48 (2a;2b)**) y reducidas con *C. sinensis* (**Figura 48 (3a;3b)**) se identifican cambios evidentes y circunstanciales en su histología general, ya que en todo el corte se aprecian alteraciones celulares hepáticas, como aperturas de estas, exposición de la cromatina. En estos cortes los lóbulos hepáticos se observan ligeramente borrosos, el citoplasma de algunas células muestra espacios vacíos tipo vacuola y aperturas de las células, así como condensación de la cromatina; o incluso alteración en la estructura histológica general del parénquima del corte. Incluso en algunos casos se encuentra totalmente expuesta la cromatina en las proximidades de las sinusoides; pudiendo llegar a ser bastante perjudicial para la célula.

En la **Figura 49 (1a;1b)** se presentan a los cortes de riñón control, donde se muestran histologías homogéneas en los glomérulos y túbulos renales; los túbulos colectores están revestidos con epitelio cúbico simple y con una pequeña acumulación intersticial de cromatinas definida y sin alteraciones.

Para los cortes de riñón expuestos con AgNp reducidas con NaBH₄ (**Figura 49 (2a;2b)**) y reducidas con *C. sinensis* (**Figura 49 (3a;3b)**), se identifican cambios en su histología afectando considerablemente a las células renales, teniendo diferencias significativas e importantes entre los cortes control y los tratados con las dosis de AuNp en estos cortes los epitelios y glomérulos se observan ligeramente más grandes y muestran espacios vacíos y aperturas celulares, así

como una acumulación, desorden y exposición de la cromatina; así como la presencia de alteraciones de las membranas celulares, hasta llegar incluso a la apertura de las mismas, todo esto provocado por la interacción constante de las AuNp con el órgano durante las administraciones subagudas realizadas durante el experimento.

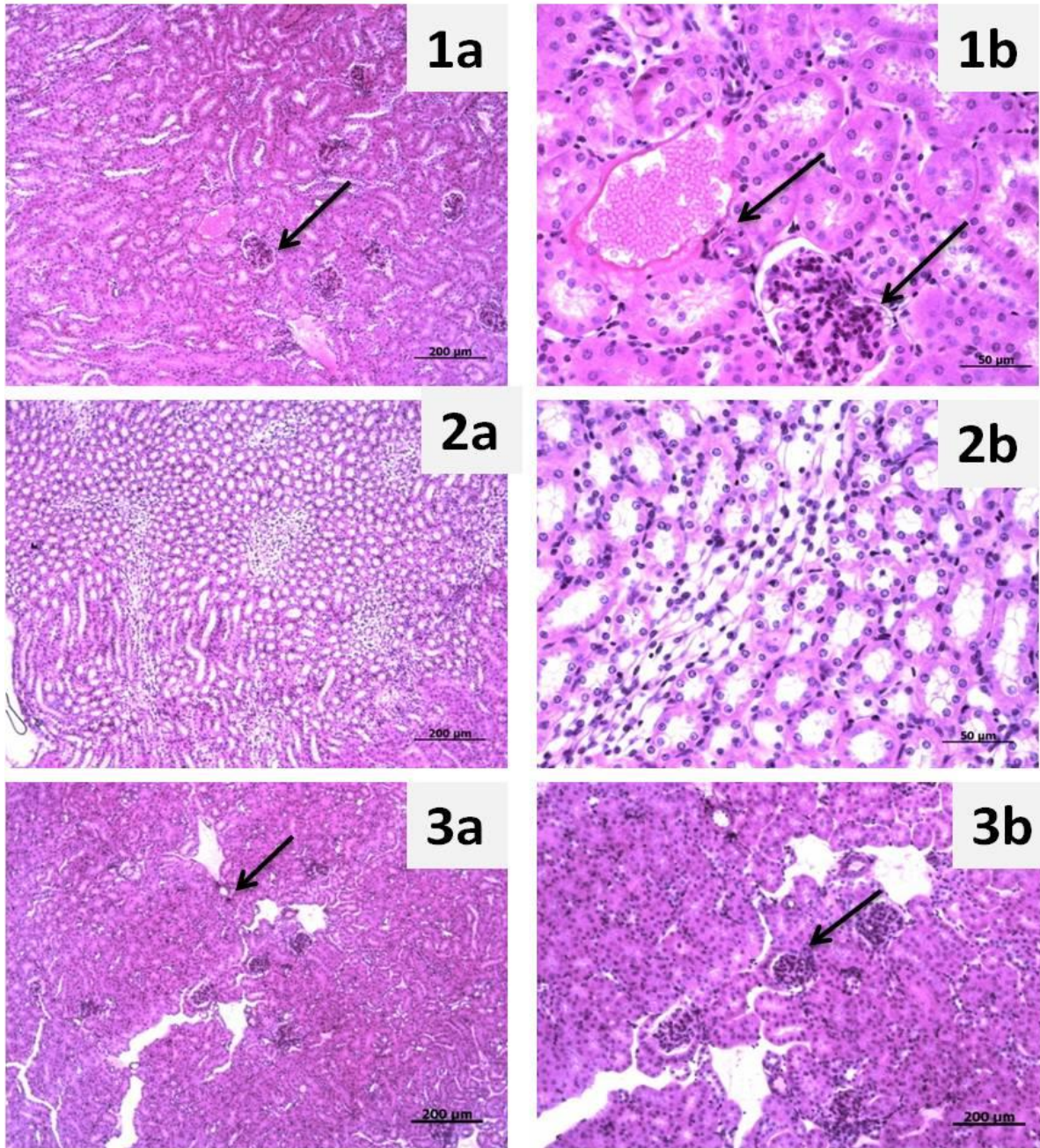


Figura 49. Histopatología de riñón. Control (1a-b) y cortes de riñón administrado con AgBH (2a-b) y AgCs (3a-b), después del estudio subagudo.

CONCLUSIONES



- ∞ Las nanopartículas de Au mediante el uso de 3 mL de NaBH₄ (AuBH), tienen un tamaño entre 7.5 - 10 nm, con un plasmón a 540 nm. Mientras que las nanopartículas de Au con 0.6 mL de extracto acuoso de *Camellia sinensis* (AuCs), tienen un tamaño de 20 - 24nm; con un plasmón a 542 nm. Las nanopartículas de Au obtenidas tienen forma esférica.

- ∞ Las nanopartículas de Ag mediante el uso de 5 mL de NaBH₄ (AgBH), tienen un tamaño de 7.5 -12 nm, con un plasmón a 400nm. Mientras que las nanopartículas de Ag con 5 mL de extracto acuoso de *Camellia sinensis* (AgCs), tienen un tamaño de 47 - 55 nm, con un plasmón a 427nm. Las nanopartículas de Ag obtenidas son de forma esférica.

- ∞ Los estudios toxicológicos no presentaron mortalidad en ninguno de los dos análisis, esto incluye la evaluación toxicológica aguda y subaguda, para los grupos de roedores administrados vía intraperitoneal tanto a nanopartículas de Au y Ag; por cada una de las dos rutas sintéticas: química y biológica.

- ∞ Se presentaron diversos factores adversos en los roedores causados por la interacción con las AuNp y AgNP tales como: cierta inhibición del apetito, daños macroscópicos en los órganos (estómago); así como diferencias significativas de los pesos relativos de los órganos (hígado, riñones, testículos, corazón y bazo).

- ∞ Los órganos más afectados fueron el hígado y riñón, los cuales presentaron diferencias en sus pesos relativos.

- ∞ Aunque no se llega a expresar una dosis letal como tal, el presente trabajo si proporciona información de que, aun a dosis muy pequeñas, estos nanomateriales están causando un daño a nivel celular en modelos *in vivo*; pero sin llegar a la muerte.

- ∞ Se pudo observar la acumulación de las nanopartículas de Au y Ag mediante el uso del Microscopio de Epifluorescencia, en las periferias de las venas hepáticas y en los epitelios (riñón) gracias a sus propiedades ópticas.
- ∞ En las fotografías de campo claro presentan alteraciones degenerativas (necrosis), considerándose un efecto nocivo e irreparable, directamente relacionado a la exposición de las AuNp / AgNp con el órgano generalmente irreversibles.
- ∞ En la histología celular los órganos mostraron indicios de la afección irreversible en la estructura celular, tales como exposición de la cromatina (hígado) y aumento de los glomérulos (riñón). En los varios cortes se observan fragmentaciones en los parénquimas celulares.
- ∞ Se concluye que las nanopartículas de Au presentan daños relevantes, puesto que se acumulan en la periferia de venas y arterias de hígado y riñón. Así como la alteración histológica celular drástica.
- ∞ Durante todo el trabajo se presentan evidencias suficientes en las que se puede concluir que la toxicidad de las nanopartículas no está directamente relacionada por: la ruta sintética, tamaño, ni morfología. Más bien depende de las características químicas del metal (Au y Ag); resultando más dañino en los estudios toxicológicos e histológicos, los roedores que fueron administrados a de nanopartículas de Oro (AuNp).

BIBLIOGRAFÍA



1. Charles Poole P., Frank Owens J., (2003) **Introduction to Nanotechnology**. Ed. Wiley Interscience, USA, 9.
2. Salata VO., (2004) **Applications of nanoparticles in biology and medicine**. J. Nanobiotech. 1-6.
3. Solomon S D, Bahadory M., Jeyarajasingam A V, Rutkowsky S A y Boritz C.,(2007) **Synthesis and Study of Silver Nanoparticles**. J. Chem. Education **84** 322-325.
4. Xia Y, Yang P, Sun Y, Wu Y, Mayers B, Gates B, Yin Y, Kim F, and Yan H 2003 Adv. Mater. **15** 353.
5. El-Sayed M A 2004 *Int. Rev. Phys. Chem.* **19** 409.
6. Santos-Hernández D, González-^{*}ía B. et. al, 2002 *Electroanalysis*, **14** 18.
7. Edelstein A S, Cammarata R C, **Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications**. Bristol: Inst Phys.
8. Marie-Christine D and Astruc D 2004 *Chem. Rev.* **104** 293.
9. Cheang J C, (2005) **Ley de Moore: Nanotecnología y nanociencias: Síntesis y modificación de nanopartículas mediante la implantación de iones**. Rev. Digital Universitaria (<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num7/art65/int65.htm>), **6** 1-8.
10. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst L V, and Muller R N, (2008) *Chem. Rev.* **108** 2064
11. Zhang L, and Shi G, (2011) *J. Phys. Chem. C* **115** 17206.
12. Buzea C, Blandino-Pacheco I I, and Robie K (2007) *Biointerphases* **2** 17.
13. Jin Zhong Zhang, **Optical Properties and Spectroscopy of Nanomaterials**. Ed. World Scientific, USA, 383.
14. López-López M y Meléndez-Lira M A, (1997) *Avance y Perspectiva* **16** 243.
15. Park J, Estrada A, Sharp K, Sang K, Schwartz J A, Smith D K, (2008) *Opt. Express*. **16** 1590.
16. Hutter E , Fendler J H, (2004) **Exploitation of localized surface plasmon resonance**. Adv. Materials. **16** 1685-1706.
17. Noguez C 2007 *J. Phys. Chem. C*. **111** 3806.
18. Cecilia Noguez, **Propiedades ópticas de nanopartículas**, Red de Nanociencia y nanotecnología
19. Kreibig U, Vollmerr M, (1995) **Optical Properties of metal clusters**. Series in Materials Science, Vol. 25, Berlín, 532.
20. Liz-Marzán L M, (2006) **Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles**. *Langmuir*. **41** 22-32.
21. Xia Y, and Halas N J, (2005) **Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures**. *MRS Bulletin*. **30** 338-348.
22. Ávila H, Moreno KJ, Arias E, Castrutia G, Vázquez R A, Medellín D I, Ziolo R F, (2008) **Nanopartículas de plata y oro funcionalizadas *in situ* con el polímero conjugado fluorescente pPET3OC12-sqS**. *Síntesis, propiedades morfológicas, ópticas y eléctricas*, Sup. y V. **21** 20-25.
23. Razak N, Lumb A, and Harris A T, (2006) **The synthesis of metallic nanoparticles inside live plants, Bali R., Laboratory for Sustainable Technology**. School of Chem. and Biomol. Engineering. University of Sydney. 224-226.
24. Zilli D, Bozzano P, Goyanes S N, Tubiolo G H, and Cukierman AL, (2003) **Síntesis de nanotubos de carbono mediante un proceso de deposición química en fase vapor**. *Jornadas Sam, CONAMET*. 10-13.
25. Roldan M V, Frattini A L, Sanctis de O A, and Pellegrini N S, (2005) **Nanopartículas metálicas con formas diversas**. *Anales AFA*. **17** 212-217.

26. Lu Y, Mei Y, Schrunner M, Ballauff M, Möller M, and Breu J, (2007) **In Situ Formation of Ag Nanoparticles in Spherical Polyacrylic Acid Brushes by UV Irradiation.** *J. Phys. Chem.* **111** 7676-7681.
27. Lu Y, Mei Y, Walker R, Ballauff M, and Drechsler M, (2006) **'Nano-tree'—type spherical polymer brush particles as templates for metallic nanoparticles.** *Polymer.* **47** 4985-4995.
28. Chandran S P, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, and Sastry M, (2006) **Synthesis of Gold nanotriangles and Silver nanoparticles using Aloe vera plant extract,** *Biotech. Prog.* **22** 577-583.
29. Raffi M,(2007) **Synthesis and characterization of metal nanoparticles.** High. Edu. Commision Pakistan. Pakistan Research Repository. 97.
30. Vilchis-Nestor A, Sánchez V, Camacho M A, Gómez R M, Camacho M A, Arenas J A, (2008) **Solventless synthesis and optical properties of Au nanoparticles using Camellia sinensis extract.** *Mater. Lett.* **62** 3103-3105.
31. Sasikumar R, and Arunachalam R M, (2009) *Mater. Lett.* **63** 2426.
32. Salari M, Mousavikhoie S M, Marashi P, and Rezaee M, (2009) *J. of Alloys and Compounds* **469** 386.
33. Deng W J, Xia W, Li C, and Tang Y, (2009). *J. Mater. Process. Technol.* **209** 4521.
34. Sneh O, Clark-Phelps R B, Londergan A R, Winkler J, and Seidel T E, (2002) *Thin Solid Films* **402** 248.
35. Wang Y Y, Car K F, and Yao X, (2009). *J. Solid State Chem.* **182** 3383.
36. Wang X, and Chen Y, (2008) **A new two-phase system for the preparation of nearly monodisperse silver nanoparticles.** *Mater. Lett.* **62** 4366-4368.
37. Murray C B, Kaagan C R, and Bawendi M G, (2000). *Ann. Rev. Mater. Sci.* **30** 545.
38. Yu W , Kan S, Chen H, Lui B, and Zou G, (2008) **Synthesis and Mechanims or particle and flower- shaped ZnSe nanocrystals: Green chemical approaches toward green nanoproducts.** *J. Phys. Chem.* **112** 567-7571.
39. Shankar S S, Rai A, Ahmad A, and Sastry M, (2005) **Controlling the optical properties of Lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potencial application in Infrared- Absorbing optical coatings.** *Chem. Mater.* **17** 566-572.
40. Krutyakov Y A, Kudrinskiy A A, Olenin A Y, Lisichkin G V,(2008) **Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects.** *Russian Chem. Rev.* **77** 233-257.
41. Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian-Kumar S R, and Gurunathan S, (2009) *Biores. Tech.* **100** 5356.
42. Sastry M, Ahmad A, Khan I, and Kumar R, (2003) *Current Science* **85** 162.
43. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal Senapati S, Sainkar R S, Khan M I, Ramani R, Parischa R, Ajayakumar P V, Alam M, Sastry M, and Kumar R, (2001) *Angew. Chem. Int.* **40** 3585.
44. Kumar-Ganesh V, Gokavarapu-Dinesh S, Rajeswari A, Dhas-Stalin T, Karthick V, Kapadia Z, Shrestha T, Barathy I A, Roy A, and Sinha S, (2011) *Coll. And Surf. B.* **87** 159.
45. Mi F, and Peng Y, (2010) **Novel technology for the preparation of slef-assembled catechin/gelatin nanoaprticles and their characterization.** *J. Agricultural and Food Chemistry.* **58** 6728-6734.
46. Ponce L, Fernández-Guasti M, Jimenéz E, Haro-Poniatowski E, (1994) **Obtención de capas delgadas por ablación láser.** *Revista Mexicana de Física.* **40** 798-804.
47. Zhu J, Wang Y, Huang W, Lu Y, (2004) **Resonance light scattering characters of core-shell structure of Au-Ag nanoparticles.** *Phys. Lett.* **323**, 455-459.
48. Yamamoto M , Kashiwagi Y, Nakamoto M , (2009) **Size-controlled synthesis of gold nanoparticles by thermolysis of a Golg(I)-Sulfide complex in the presence of alkylamines.** *Z. Naturforsch.* **64b** 1305 –1311.

49. Zheng X, Zhao X, et al, (2009) **Photochemical formation of silver nanodecahedra: Structural selection by the excitation wavelength**. *Langmuir*. **25** 3802-3807.
50. Ozkaraoglu E, Suzer S, (2009) **UV Induced in-situ Synthesis of Gold Nanoparticles within PMMA Films**. 5th Nanoscience and Nanotechnology Conference. TURKEY
51. Palza H, Pilleux M, Pennaroli J, (2007) **Produccion de nanoparticulas de cobre**. IDIEM Universidad de Chile.
52. Male K B, Li J, Bun C C, Ng S-C, and Luong J, (2008) **Synthesis and Stability of Fluorescent Gold Nanoparticles by Sodium Borohydride in the Presence of Mono-6-deoxy-6-pyridinium- β -cyclodextrin Chloride**, *J. Phys. Chem. C*. **112** 443-451.
53. Abdelrahman A , Mohammad A, Okajima T, and Ohsaka T, (2006) **Fabrication and Electrochemical Application of Three-Dimensional Gold Nanoparticles: Self-Assembly**. *J. Phys. Chem.* **110** 2798-2803.
54. Husseiny M I, El-Aziz A B, Badr Y, Mahmoud M A, (2007) **Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa***, *Spectrochimica Acta Part A*. **67** 1003–1006.
55. He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N, (2007) **Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata***, *Mater. Lett.* **61** 3984–3987.
56. Beveridge T J and Murray R G E 1980 *J. Bacterial*. **141** 876.
57. Ramanathan R, O’Mullane P A, Parikh Y R, Smooker M P, Bhargava K S, and Basal V 2011 *Langmuir* **27** 714.
58. Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian-Kumar-Ram S B, Kottaisamy M, Barath-Manikanth S, Kartikeyan B, and Gurunathan S 2010 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **77** 257.
59. Moskvina M I, Brekhovskikh A A, Nikandrov V V 2003 *Microbiology* **72** 246.
60. Kumar G V, Gokavarapu-Dinesh S, Rajeswari A, Dhas-Stalin T, Karthida V, Kapadia Z, Shrestha T, Barathy I A, Roy A, and Sinha S 2011 *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **87** 159.
61. Njagi E C, Huang H, Stafford L, Genuino H, Galindo H, Collins J, Hoag G E, and Suib S, (2011) **Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous *Sorghum Bran* Extracts**. *Langmuir*. **27** 264–271.
62. Dwivedi A D, Gopal K, (2010) **Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract**, *Colloids*
63. Philip D, (2009) **Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus Rosa Sinensis***, *Physica E*. 1-23.
64. Shankar S S, Rai A, Ahmad A, and Sastry M, (2004) **Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth**, *J. Colloid and Interface Science*. **275** 496–502.
65. Coyle C H, Philips B J, Morrisroe S N, Chancellor M B, Yoshimura N, (2008) **Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells**. *Life Sciences*. **83** 12-18.
66. Rababah T M, Hettiarachchy N S, and y Horax R, (2004) **Total phenolics and antioxidant activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Ginger, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts, Vitamin , and *ter*-Butylhydroquinone**. *J. Agricultural and Food Chem*. **52** 5183-5186.
67. Zaveri N T, (2006) **Green tea its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications**. *Life Sciences*. **78** 2073-2080.
68. An B-J, Kwak J-H, Son J-H, Park J-M, Lee J-Y, Jo C, Byun M-W, (2004) **Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols**. *Food Chem*. **88** 549-555.
69. Al-qadi S, and Remiñán-López C, (2009) **Nanopartículas metálicas: oro**. Universidad de Santiago de Compostela. (www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/994/1028).

70. Skoog, Holler, Nieman, (2001) **Principios de Análisis Instrumental**, 5a ed., Ed. Mc Graw Hill, España. 323pp.
71. Moskvina M I, Brekhovskikh A A, Nikandrov V V 2003 *Microbiology* **72** 246.
72. Njagi C E, Huang H, Stafford L, Genuino H, Galindo M H, Collins J B, Hoag E G, and Suib L S 2010 *Langmuir* **27** 264.
73. Astruc D, Marie C D, (2204) **Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis and nanotechnology**. *Chem. Rev.* **104** 293-346.
74. Clementi L A, (2008) **Estimación de distribución de tamaños de partícula por técnicas de dispersión de luz. Utilización de algoritmos genéticos para resolver el problema inverso**. Encuentro de jóvenes investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales. 16-17.
75. Rodriguez J L, (2010) **Técnicas Instrumentales en Farmacia: Métodos ópticos sin absorción de luz**. Universidad de Salamanca.
76. Yu W W, Kan S, Chen H, Lui B, and Zou G, (2008) **Synthesis and Mechanims or particle and flower- shaped ZnSe nanocrystals: green chemical approaches toward green nanoproducts**, *J. Phys Chem.* **112** 7567-7571.
77. Mi F-L y Peng Y-P, (2010) **Novel technology for the preparation of slef-assembled catechin/gelatin nanoaprticles and their characterization**. *J. Agricultural and Food Chemistry.* **58** 6728-6734.
78. Yu W W, Kan S, Chen H, Lui B y Zou G, (2009) **Synthesis and Mechanims or particle and flower- shaped CuSe nanocrystals**. *J. Phys. Chem.* **113** 9787-9801.
79. Bandon D and Kaplan W D, (2003) **Microstructural Characterization of Materials**. Ed. John Wiley and Sons. Inc. USA. **178**.
80. Mathews, Van Holde, Ahern, (2002) **Bioquímica**. Ed. Pearson Addison Wesley, España (3ª edición) 24.
81. Jorge G A, Martínez J D, Bullón M C, Sousa D, Navarro C U, (2009) **Electrochemical synthesis of Rhadium nanoparticles and their characterization by Transmission Electron Microscopy (TEM)**. *Portugalie Electrochimia Acta.* **27(3)** 279-287.
82. Repetto M, (1997) **Toxicología Fundamental**. Ediciones Diaz de Santos.
83. OIT, (2001) **Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo**. España,
84. Yepes-Martinez P N, (2004) **Análisis del procedimiento para la determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal Media)**. *Revista Ciencias. Publicaciones científicas.*
85. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J, (2005) **Nanotoxicology : An emerging discipline evolving from studies of ultrafina particles**. *Review Environmental Health Perspectives.* **113 (7)** 823-840.
86. Parkkola H, Vivero L, Vega M, Ramis M, Querol J, Sendra, J, (2010) **Metallic nanoparticles amd im vitro cytoxicity assessment**. *Endor Nanotech.* España 351-377.
87. Medina C, Santos-Martínez M J, Radomski A, Corrigan O I, Radomski M W, (2007) **Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance**. *British Journal of Pharmacology.* **150** 552-558.
88. Connor E E, Mwamuka J, Gole A, Murohy C J, Wyatt M D, (2005) **Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity**. *Nano Small Micro Journal.* **3** 325-327.
89. Lin W, Huang Y, Zhou X-D, Ma Y, (2006) **In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells**. *Toxicology and applied Pharmacology.* **217** 252-259.
90. Chen Y-S, Hung Y-C, Liao I, Huang S, (2009) **Assessment of the In Vivo toxicity of gold nanoparticles**. *Nanoscale Res. Letter.* **4** 858-864.

91. Dobson J, (2007) **Toxicological aspects and applications of nanoparticles in paediatric respiratory disease.** Paediatric Respiratory Reviews. **8** 62-66.
92. Schrand A M, Rahman M F, Hussain S M, Schlager J J, Smith D A, Syed A F, (2010) **Metal-based nanoparticles and their toxicity assement.** Nanomedicine and nanobiotechnology. **2** 544-568.
93. Goodman C M, McCusker C D, Yilmaz T, Rotello V M, (2004) **Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains.** Bioconjugate Chem. **15** 897-900.
94. Farkas J, Christian P, Urrea G J A, Roos N, Hassllöv M, Tollefsen K E y Thomas K V, (2010) **Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.** Aquatic Toxicology. **96** 44-52.
95. Mishra A K, Mohanty B, (2008) **Acute tocity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus*(Bloch).** Environmental Toxicology and Pharacology. **26** 136-141.
96. Huang X, El-Sayed M, (2010) **Gold nanoparticles:Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy.** J. of Adv. Research. University of Cairo. **1** 13-28.
97. Nguyen D, Kim D, Kim K, (2007) **Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles.** Micron. **42** 207-227.
98. Jain J, Arora S, Rajwade J M, Omray P, Khandelwal S, Paknikar K M, (2009) **Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel romulation for topical use.** Molecular Pharmaceutics. **6(5)** 1388-1401.
99. Salamanca M J, Jiménez-Tenorio N, González de Canales M L, Del Valls T A, (2008) **Evaluation of the toxicity of an oil spill conducted through bioassays using the fish *Solea senegalensis*.** Ciencias Marinas. **34(3)** 339-348.
100. Bigazzi P E, (1999) **Metals and kidney autoimmunity.** Environmental Health Perspectives. **107** 753-765.
101. Ortiz J B, González de Canales M L, (1999) **Histopathology alterations produced by sublethal concentrations of copper** Ciencias Marinas. **25(1)** 119-143.
102. Poleksic V, Lenhardt M, Jaric I, Djordjevic D, Gacic Z, Cvijanovic G, Raskovic B, (1978) **Liver, gills and skin histopathology and heavy metal content of the danube sterlet (*Acipenser ruthenus* linnaeud.** Enviromental toxicity and chemistry. **29(3)** 515-521.
103. Mishra A K, Mothanty B, (2008) **Acute toxicity impacts of hesavalent chromiumon behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch).** Enviromental toxicity and pharmacology. **26** 13-141.
104. Brzóska M M, Moniuszko-Jakoniuk J, Pilat-Marcinkiewicz B and Sawicki B, (2003) **Liver and kidney function and histology in rats exposed to Cadmium and ethanol.** Alcohol & Alcoholism. **38** 2-10.
105. Ravindra P, Bhiwgade D A, Kulkarni S, Rataboli P V and Dhume C Y, (2010) **Cisplatin indiced histological changes in renal tissue of rat.** J. of Cell and Animal Biology. **4** 108-111.
106. Agamy E, (2012) **Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant.** Ecotoxicity and Enviromental Safety. **72** 171-179.
107. Saleki S, Arladan F A, Nejad A J, (2007) **Liver histopathology of fatal phosphine poisoning.** Forensic Science International. **166** 190-193.
108. García A, Espinosa R., Delgado L, Casals E, Gonzalez E, Puntos V, Barata C, Font X, Sánchez A, (2011) **Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide anda iron oxide nanoparticles using standardized tests.** Desalination.**269** 136-141.

109. Zhang R, Niu Y, Li Y, Zhao C, Song B, Li Y, Zhou Y, (2010) **Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice.** Environmental Toxicity and Pharmacology. **30** 52-60.

110. Auffan M, Rose J, Wiesner M, Borrero J-Y, (2009) **Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their cellular toxicity in vitro.** Environmental Pollution. **157** 1127-1133.

111. Mortimer M, Kasemets K, Kahru A, (2010) **Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Thetrahymena thermophila*.** Toxicology. **269** 182-189.

112. Hrin S, Semmler, Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka W, Schäffler M, Takenaka S, Möller W, Schmid G, Simon U, Kreyling W, (2011) **Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration,** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **77** 407-416.