



Síntesis, estudio citotóxico y aplicación de nanopartículas de paladio como sensor

Jonathan Duran Palmerín¹, Svetlana Kashina², Lériða Liss Flores Villavicencio¹,
María del Rosario Galindo González³

¹ Departamento de Biología experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, CP. 36050, México

² Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, CP. 36050, México

³ Cátedra CONACYT, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta s/n. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, CP. 36050, México mr.galindo@ugto.mx

Resumen

Recientemente la nanotecnología ha tenido muchas aplicaciones potenciales en diversos sectores incluidos los productos de consumo, la energía, agricultura y cuidados de la salud. Todas estas nuevas tendencias hacia lo nano nos abren un nuevo camino a la nanofarmacia y se convierte en una gran herramienta en el área de la salud, sin embargo para ello es importante estudiar la citotoxicidad de las nanopartículas en células. Demostrar que son compatibles con el ser humano es de alta relevancia si se les quiere incluir como alternativas en la medicina. Además se hicieron pruebas de detección electroquímica de dopamina en muestras sintéticas



Descripción del proyecto

Este proyecto plantea la posibilidad de desarrollar dispositivos de detección de un neurotransmisor como es la dopamina, se encuentra en la etapa inicial, los dispositivos de detección serán sensores amperométricos basados en nanopartículas de Pd. Se comenzó por seleccionar una ruta de síntesis sencillas y con condiciones de presión y temperatura ambiente, posteriormente con los materiales obtenidos se hicieron pruebas de citotoxicidad en líneas celulares para evaluar el efecto que pueden tener estos materiales al ser aplicados en biomedicina, esperando que no alteren el funcionamiento celular. Posterior a este estudio se prepararon tintas para la

Objetivo:

Sintetizar nanopartículas de Pd y determinar la citotoxicidad de las nanopartículas en células.

Justificación

Las NPs de Pd son materiales conductores con gran área superficial y buena actividad catalítica, y menos susceptibilidad al envenenamiento que pueden ser empleados en la biomedicina como sensores in situ de dopamina, sin embargo para lograrlo es necesario evaluar su capacidad de detección y su no toxicidad a las células.

Introducción:

Los nanomateriales (NM) se definen como materiales que contienen partículas en las que una o más dimensiones externas se encuentran en un intervalo de tamaño de 1-100 nm y que con ello se potencializa alguna de sus propiedades. [1]. Los nanomateriales tienen inmensas posibilidades estructurales para modificaciones químicas, ópticas y mecánicas para generar propiedades novedosas debido a su pequeño tamaño, gran área de superficie y capacidad para interactuar / con células / tejidos; encuentran uso en aplicaciones biomédicas tales como administración de fármacos, terapias ópticas, refuerzos de andamios y sensores

Vol. 6 (2019) 7º Encuentro de Jóvenes Investigadores



celulares. Los nanomateriales pueden imitar las propiedades de superficie de las células y los tejidos, como la topografía, la energía, etc. Esto abrirá caminos para nuevos métodos de microfabricación y nanofabricación que permiten a los científicos interactuar con los sistemas celulares y moleculares en sus escalas de tamaño nativas. [2] En la nanotecnología, la nanofarmacia se podría definir como el uso de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y heridas, así como para mejorar la salud y funcionamiento del organismo humano y de otros seres vivos. Las aplicaciones de la nanofarmacia incluirían el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos, el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos con localización o direccionamiento específico. [3]

Los sensores electroquímicos se basan en la interacción de un electrodo con el analito de interés, al tener selectividad, será posible observar un cambio en la corriente eléctrica, que es fácilmente medible. Estos dispositivos resultan prometedores por su bajo costo, portabilidad, sensibilidad, selectividad y facilidad para operar *in situ*. [5] Las técnicas amperométricas, principalmente la voltamperometría se emplea en el desarrollo de dispositivos de detección, generando una señal en la intensidad de corriente, al aplicar una diferencia de potencial controlado, por la interacción entre una solución y la superficie de un electrodo. Estas técnicas se emplean pues son rápidas, no destructivas y requieren una pequeña cantidad de muestra [6]. Los electrodos convencionalmente son de materiales conductores como oro, platino o carbón vítreo, cuyas superficies son modificadas para lograr mejores límites de detección y una alta selectividad. Los electrodos suelen modificarse con nanocompuestos, que incrementan el área superficial y con ello se ven favorecidas las propiedades conductoras. Las nanopartículas metálicas de metales como hierro, paladio, plata, níquel entre otros, favorecen el transporte de carga, permitiendo la conducción de electrones, por lo que resultan interesantes para polarizarse mediante la aplicación de una diferencia de potencial, estos materiales además presentan una buena estabilidad química y térmica y una gran relación área volumen, cualidades que los convierten en excelente material de soporte formando una sinergia con otros



materiales conductores del tipo metálico. [7] Las nanopartículas metálicas (NPs), son de gran interés, no solo por su área superficial sino también por sus funciones específicas y potencial de aplicaciones, que son diferentes de las de los sólidos metálicos a gran escala. Las propiedades intrínsecas de las NPs metálicas están determinadas principalmente por su tamaño y forma. Como resultado, la aplicación de metodologías de control de tamaño en la síntesis ha recibido una atención considerable en los últimos años en las áreas académicas e industrial. Cabe mencionar que las NPs de Pd muestran una alta actividad catalítica para electro oxidación en diferentes medios acuosos.

Metodología:

Primera parte: Síntesis de nanopartículas de paladio.

Por medio reducción química en medio orgánico en un matraz Erlenmeyer para la preparación de 20 mL de solución se agregan acetonitrilo y metanol teniendo una relación 1:1. Posteriormente se pesan 5 miligramos de acetato de Paladio por cada 10 mL de solución (acetonitrilo-metanol), los 10 mg de acetato de Paladio se agregan en el matraz con la solución (acetonitrilo-metanol) en su interior, se deja en agitación constante durante 3 horas. al término de estas se recolecta la solución en viales para su futuro análisis.

Segunda parte: Caracterización

Caracterización por medio de espectrofotometría de UV-visible

Todas las síntesis fueron sometidas a caracterización por UV-visible para encontrar el plasmón característico de las nanopartículas de Pd y así asegurar que se formaron.

Tercera parte: Citotoxicidad

Exposición de las células SH-SY5Y a las NPs

Las células SH-SY5Y (1×10^5 células/mL) serán expuestas a diferentes concentraciones de NPs por 24 h a 37°C/ 5% CO₂. Posteriormente, se realizó el ensayo de la actividad metabólica. Como control positivo de daño celular, se utilizan células expuestas a 250 μ M H₂O₂ durante 30 minutos.

Determinación de la actividad metabólica



La actividad metabólica se realizó por el método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2-h-tetrazolio-5-carboxanilida), el cual se basa en la reducción de la sal a cristales solubles en agua, proceso bioquímico realizado por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. La solución de XTT (Sigma) a una concentración de 0.25 mg/mL en Menadiona (Sigma) al 0.1mM, se añadirá a las células y se incubará por 90 min a 37°C en oscuridad. El sobrenadante será recuperado y se medirá la absorbencia a 490nm en un espectrofotómetro para microplacas Epoch™ BioTek. Los datos serán normalizados con las células control para determinar el porcentaje de actividad metabólica.

Cuarta parte: Desarrollo del sensor

Se realizarán voltamperométricas, para obtención del comportamiento de los compositos con la dopamina en distintos medios líquidos. Se prepararán tintas catalíticas con las Nps de Pd para la modificación de los electrodos

Se evaluará la capacidad de detección de cada electrodo mediante Técnica cronoamperométrica a muestras sintéticas, se realizarán curvas de calibración de la dopamina que se comparará con espectrofotometría UV/VIS.

Condiciones para hacer prueba electroquímica técnica de volumetría cíclica (VC)

El desarrollo de la tinta de Pd, se realiza el depósito de las tintas dejándola secar a temperatura ambiente

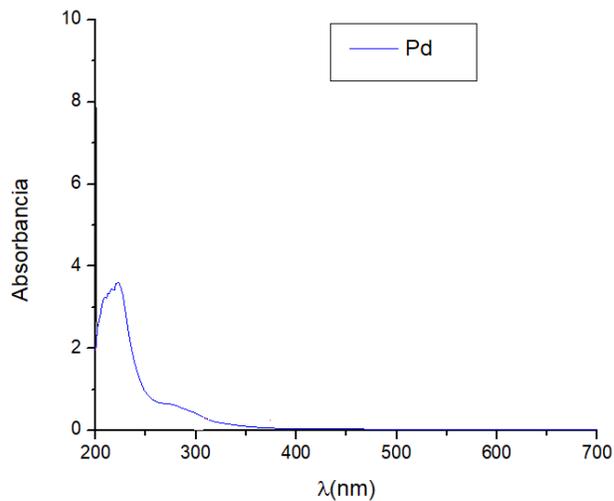
Se utilizará la técnica de voltamperometría cíclica con una velocidad de barrido 50 mV/s, y ventana de potencial de -0.5 a 1.5 V, usando como medio electrolítico una solución buffer de fosfatos. Se utilizará una celda electroquímica convencional de tres electrodos donde se realizaron las mediciones con 10 adiciones de dopamina



10mM, cada adición es de 500 μ L. Esta técnica con las mismas condiciones se realizará para cada una de las tintas.

Resultados:

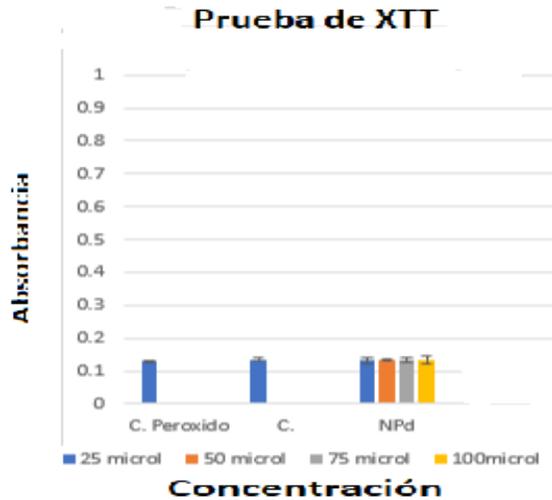
Caracterización de nanopartículas de Pd



Grafica 1

La grafica 1 muestra el espectro de absorción UV-Visible de las suspensiones de nanopartículas de paladio, los cuales no presentan una banda de resonancia del plasmón de superficie (SPR) definida en el intervalo de 300 a 900 nm, sugiriendo la presencia de partículas de paladio en tamaños nanométricos.

Actividad metabólica

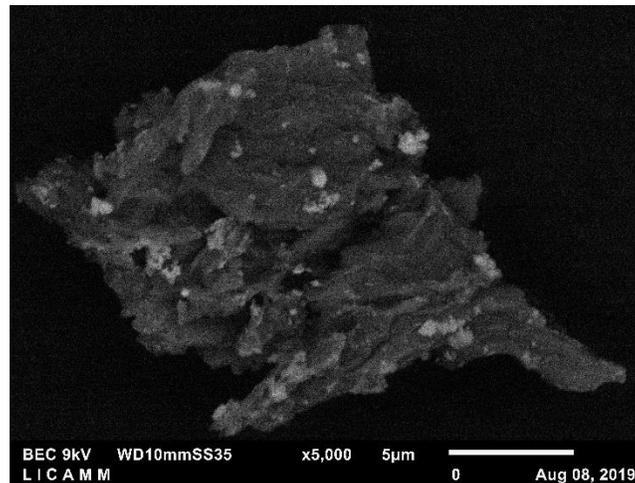


Grafica 2

En la gráfica 2 se ilustra las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 microlitros de una concentración preparada de nanopartículas de Pd. El control positivo (C. peróxido) de peróxido de hidrogeno y otro control al cual no se le adiciono nada (C.), en interacción con las células neuronales.

Evaluación del sensor

Imagen SEM

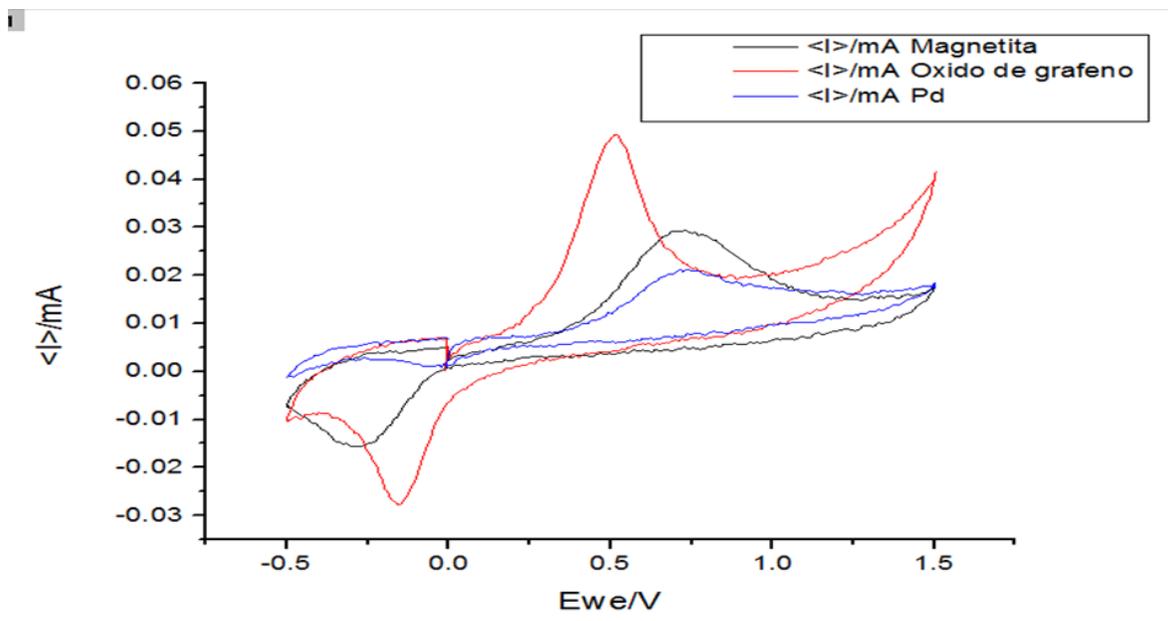


Micrografía SEM de NPs de Pd sobre sustrato conductor para la prueba de censado



Se desarrolló un sensor formado de nanopartículas de Pd sobre un electrodo convencional de carbón vítreo, en la imagen SEM se puede observar los puntos mas claros corresponden a la presencia de las NPs de Pd sobre el sustrato.

Técnica de volumetría cíclica (CV) de las tintas de nanocompositos Pd-magnetita, Pd-Oxido de grafeno y Pd.



La grafica 3 muestra los resultados obtenidos con las condiciones: 1 mililitro de la solución de Dopamina, buffer de fosfatos, electrodo de carbón vítreo, 50 mV, ventana de -0.5 -1.5. Podemos observar las señales características a la oxidación y reducción de la dopamina sobre la superficie de los diferentes electrodos, evaluados a las mismas condiciones.

Discusión de resultados:

Para la caracterización los datos arrojados por el espectrofotómetro nos brindan información positiva sobre la obtención de nanopartículas de Pd por medio de síntesis en medio orgánico, representando de esta manera una reducción en costos comparado a otras técnicas. Se tiene en cuenta que la caracterización por este método no nos brinda una información completa sobre forma y tamaño exacto de las nanopartículas, para posteriores análisis se utilizara TEM (Microscopio electrónico de transmisión) para completar los datos.



En la determinación de la actividad metabólica celular por el método de XTT se tuvo en la placa de cultivo de 96 pozos por pozo una cantidad de 100 microlitros de células con una concentración de 16000 células/ml a los cuales se agregaron diferentes concentraciones de nanopartículas de Pd. Para la preparación de las concentraciones se utilizó un stock de 1 mg de nanopartículas de paladio/1 ml de agua destilada. Del stock preparado previo se utilizó 200 microlitros/ 800 microlitros de medio DMEM. Se puede ilustrar una actividad similar al control lo que nos indica que las células no mueren a la exposición a las nanopartículas. Los resultados preliminares muestran baja toxicidad en la célula esto nos abre paso para su utilización en la liberación de fármacos.

En la Técnica de volumetría cíclica podemos observar que los tres materiales evaluados son sensibles a la detección de dopamina, sin embargo, los compositos de óxido de grafeno-Pd, dan una respuesta más clara en intensidad de corriente, por lo que pueden ser más ampliamente estudiados en dispositivos de detección, esto debido a la gran área superficial y conductividad, que aporta el óxido de grafeno, aunado a la actividad catalítica del Pd.

Conclusiones

La síntesis de reducción química en medio orgánico, resultó ser un buen método para la obtención de NPs de Pd, formando dichas nanopartículas a un tamaño de aproximadamente 50 nm de diámetro con una forma esférica. Se han realizado pruebas en líneas celulares observando que las nanopartículas obtenidas dañan a nivel crítico las células en concentraciones altas y a concentraciones bajas el daño es tolerable hasta las pruebas realizadas. En las pruebas de detección se han elaborados dispositivos sencillos de detección de muestras sintéticas de dopamina, donde las nanopartículas de Pd han demostrado ser buenos amplificadores de señal para la detección, lo cual resulta prometedor para su posible uso en biomedicina.

Agradecimientos: al proyecto de investigación CIIC 118/ 2019 Nanocompositos metálicos sobre soportes de Carbono para detección y remoción de fármacos,



apoyado dentro de la convocatoria institucional de Investigación Científica CIIC 2019 de la Universidad de Guanajuato

LICAMM-UG "Laboratorio de Investigación y Caracterización de Minerales y Materiales" por el apoyo en la realización de los análisis SEM

Bibliografía:

Henriqueta Louro, Ana Bettencourt , Lídia M. Gonçalves António J. Almeida Maria João Silva. (2015). *Aplicaciones de Nanotecnología para Ingeniería de Tejidos*. En *Aplicaciones de Nanotecnología para Ingeniería de Tejidos* (págs. 263-287). Elsevier.

Narinder Singh, Anjali Joshi, Gaurav Verma. (2016). *Ingeniería de Nanobiomateriales*. En A. J. Narinder Singh, *Nanomateriales de ingeniería para biomedicina Avances y peligros*. Elsevier.

Leopoldo, V.-R. (2005). *Nanotecnología Farmacéutica*. Obtenido de <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf>

Bansi Dhar Malhotra, Md. Azahar Ali. (2018). *Nanomaterials for Biosensors*. En M. A. Bansi Dhar Malhotra, *Nanomaterials for Biosensors*. Elsevier.

Henriqueta Louro, Ana Bettencourt , Lídia M. Gonçalves António J. Almeida Maria João Silva. (2015). *Aplicaciones de Nanotecnología para Ingeniería de Tejidos*. En *Aplicaciones de Nanotecnología para Ingeniería de Tejidos* (págs. 263-287). Elsevier.

Juan C. Vidal, Laura Bonel, Alba Ezquerro, Susana Hernández, Juan R. Bertolín,

Carlota Cubel, Juan R. Castillo. (s.f.). *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier .

Narinder Singh, Anjali Joshi, Gaurav Verma. (2016). *Ingeniería de Nanobiomateriales*. En A. J. Narinder Singh, *Nanomateriales de ingeniería para biomedicina Avances y peligros*. Elsevier.