



Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas

**“Evaluación de la Internalización de
nanopartículas de CsPbBr₃ base hexano en células
exfoliadas de la mucosa oral”**

TESIS

Para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Luis Daniel Juárez Villalobos

Directora de Tesis:

Dra. Ana Lilia González Yebra

Co-directoras de Tesis:

Dra. Tzarara López Luke

Dra. María del Pilar González Muñoz

GUANAJUATO, GTO.

NOVIEMBRE 2023

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Irapuato, Gto. 9 de Noviembre del 2023

Dra. Claudia Leticia Mendoza Macías

COORDINADORA DE LA LICENCIATURA EN QFB

PRESENTE

Me permito a informar a usted que se ha revisado el manuscrito del proyecto de tesis de licenciatura titulado **“Evaluación de la internalización de nanopartículas de CsPbBr₃ base hexano en células exfoliadas de la mucosa oral”**, que presenta el **alumno Luis Daniel Juárez Villalobos**, con el número de estudiante **281292**.

Una vez que se han revisado las observaciones respecto al trabajo y se han completado las correcciones señaladas, consideramos que se reúnen los requisitos para que el estudiante sustente el **examen de grado** correspondiente, para lo cual **se otorga el voto aprobatorio**.

Atentamente

Dra. Silvia Gutiérrez Granados

Dra. Andrea Ceja Fernández

Dr. Luis Felipe Padilla Vaca

Dr. Gustavo Cruz Jiménez

Agradecimientos

A la **División de Ciencias de la Salud** de la **Universidad de Guanajuato** por proporcionar las instalaciones y el material para realizar el proyecto.

Al **Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales** de la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** por proporcionar las nanopartículas utilizadas durante el proyecto. Así mismo, la **Dra. Tzarara López Luke** y a **Jeimmy Brigiette Aguilar Saldivar** quienes sintetizaron y caracterizaron las nanopartículas utilizadas.

A la **Dra. Ana Lilia González Yebra** por abrirme las puertas a su laboratorio y por su orientación en el desarrollo del proyecto y la escritura de la tesis.

A la **Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo** de la Universidad de Guanajuato por proporcionarme los conocimientos básicos para la realización del proyecto y ser mi casa durante aproximadamente 5 años.

A todas las personas que me apoyaron durante la realización del proyecto, **Juan Eduardo Muñoz Gómez** quien fue mi compañero del laboratorio, a **Luz María Corona Venegas** por animarme a seguir con el proyecto, a **Axel Reyes Zabala** por proporcionarme buenos consejos con respecto a la estructura de la tesis, a todos mis amigos de la universidad así como a mis compañeros del CIACYT.

Finalmente a mi papá **Ángel Edgardo Juárez Aguilar** por sus consejos, a mi hermana **Samantha Karina Juárez Villalobos** por su apoyo y especialmente a mi mamá **Elisa Villalobos Pérez** quien fue la persona que más me acompañó durante el proceso de la escritura y que no solo es mi trabajo sino también el de ella.

Contenido

ABREVIATURAS	1
INDICE DE FIGURAS	2
Abreviaturas de Unidades Métricas	3
Resumen	4
1.MARCO TEÓRICO	5
1.1. Nanopartículas y generalidades.....	5
1.2. Clasificación de nanopartículas	5
1.3. Nanopartículas en las ciencias biomédicas.....	7
1.4. Puntos cuánticos (quantum dots, QDs).....	8
1.5. QDs en biología y ciencias biomédicas.....	9
1.6. Perovskitas de CsPbBr ₃	11
1.6.1. Estructura de las Nps de CsPbBr ₃	11
1.6.2. Métodos de síntesis.....	12
1.6.3. Mejoramiento de la estabilidad en medios acuosos	14
1.6.4. Aplicaciones biológicas de las Nps de CsPbBr ₃	15
1.7. Células exfoliadas de la mucosa oral.....	15
1.7.1. Tejidos de la cavidad oral	15
1.7.2. Uso de las células exfoliadas de la mucosa oral.....	16
2.ANTECEDENTES.....	16
2.1. Caracterización de Nps	18
3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4.JUSTIFICACIÓN.....	20
5.HIPÓTESIS.....	20
6.OBJETIVOS.....	20
6.1. General.....	21
6.2. Específicos	21
7.METODOLOGÍA	21
7.1. Listado de materiales, equipo y reactivos	21
7.1.1. Materiales.....	21
7.1.2. Equipo	21
7.1.3. Reactivos.....	22
7.1.3.1. Nanopartículas.....	22

7.2.	Transporte de Nps	22
7.3.	Procedimiento experimental	23
7.3.1.	Exfoliación celular.....	23
7.3.2.	Exposición preliminar de Nps	23
7.3.3.	Variación de tiempo y temperatura	24
7.3.4.	Protocolos de lavados	24
7.3.5.	Protocolo con uso de BSA.....	25
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8.2.	Exposición preliminar.....	26
8.3.	Variación de tiempo y temperatura de incubación.....	29
8.4.	Protocolos de lavados	31
8.5.	Protocolo con uso de BSA.....	34
9.	CONCLUSIÓN.....	40
10.	REFERENCIAS	41
ANEXO 1.	Bases de UV-VIS.....	59
	Elementos del espectrofotómetro UV-VIS	60
ANEXO 2.	Fundamentos de la microscopía de fluorescencia	61
	Fundamentos de la fluorescencia.....	62

ABREVIATURAS

ARMS-PCR = Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction

BSA = Bovine Serum Albumin

DAPI = 4,6-diamidino-2-fenilindol

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic Acid

FDA = Food and Drug Administration

FHLs = Focal Hepatic Lesions

FRET = Förster Resonance Energy Transfer

HCCs = Hepatocellulars Carcinomas

HPV = Human Papilomavirus

ISO = International Organization for Standarization

JAK2 = Janus Kinase 2

LTL= Linde Type L

MIR = Magnetic Resonance Imaging

NHS = N-Hydroxi Succinimide

Np= Nanopartícula

Nps = Nanopartículas

Nps Au = Nanopartículas de oro

OPA = Octylamine-Modified Polyacrylic Acid

PL= Photoluminescence

PLQY=Photoluminescence Quantum Yield

QD = Quantum Dot

QDs = Quantum dots (puntos cuánticos)

SERS = Surface-enhanced Raman spectroscopy

SPIO = Supeparamagnetic Iron Oxide

UV = Ultravioleta

UV-VIS = Ultravioleta-visible

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de la estructura cúbica de las Nps de CsPbBr ₃	12
Figura 2	Esquema de métodos de síntesis de Nps de CsPbBr ₃ por inyección en caliente y por re-precipitación a temperatura ambiente	13
Figura 3	Espectro UV-VIS de la caracterización de Nps de CsPbBr ₃ base hexano ..	18
Figura 4	Espectro de fotoluminiscencia de las Nps de CsPbBr ₃ base hexano	19
Figura 5	Vial de nanopartículas de CsPbBr ₃ base hexano	22
Figura 6	Resultados del procedimiento para citología de células epiteliales de la mucosa oral.	26
Figura 7	Nps de CsPbBr ₃ hidratadas con baños de etanol	27
Figura 8	NPs de CsPbBr ₃ secas	27
Figura 9	NPs de CsPbBr ₃ secas, portaobjetos 1	29
Figura 10	Nps de CsPbBr ₃ base hexano secas, portaobjetos 2	30
Figura 11	Nps de CsPbBr ₃ base hexano, secas, portaobjetos 3.....	30
Figura 12	Tercer lavado con agua	31
Figura 13	Cuarto lavado con agua	32
Figura 14	Segundo lavado con hexano	33
Figura 15	Tercer lavado con hexano	33
Figura 16	Tratamiento 1a.....	35
Figura 17	Tratamiento 1b.....	35
Figura 18	Tratamiento 2a.....	36
Figura 19	Tratamiento 2b.....	36
Figura 20	Tratamiento 3a.....	37
Figura 21	Tratamiento 3b.....	37
Figura 22	Repetición de protocolo	39
Figura 23	Fenómeno de excitación de un electrón durante el proceso de absorción de la radiación UV-VIS.....	60
Figura 24	Diferencia entre microscopia de luz transmitida y la microscopia de fluorescencia	61
Figura 25	Diagrama de Jablonksi del proceso de absorción y emisión	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Métodos de síntesis utilizados en la fabricación de perovskitas.....	12
---------	--	----

Abreviaturas de Unidades Métricas

°C = Grados Celsius

h = Horas

min = Minutos

ml = Mililitros

mM = Milimolar

nm = Nanómetros

ns = Nanosegundos

pM = Pico molar

rpm = Revoluciones por minuto

μL = Microlitros

Resumen

INTRODUCCIÓN: Las nanopartículas (Nps) de CsPbBr₃ pertenecen a una familia de materiales conocida como perovskitas de halogenuros metálicos. Son materiales muy versátiles por sus propiedades ópticas como un alto rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PLQY), la capacidad de ajuste flexible de la longitud de onda de emisión y el espectro de emisión estrecho. Se ha reportado el uso de Nps de diferente composición a las Nps de CsPbBr₃ en las ciencias biomédicas que van desde la obtención de imágenes, la visualización de tumores, en pruebas diagnósticas y en observación microscópica, la información acerca de la aplicación de las Nps de CsPbBr₃ en las ciencias biomédicas es aún limitada.

OBJETIVO: Evaluar la internalización de nanopartículas de CsPbBr₃ base hexano sin modificar su fórmula y con modificación de su fórmula con el uso de ligandos orgánicos en células epiteliales de la mucosa oral.

METODOLOGÍA: En este trabajo se llevó a cabo un protocolo de exposición preliminar de células exfoliadas de la mucosa a Nps de CsPbBr₃ base hexano para evaluar su internalización. Posteriormente se llevó a cabo la funcionalización de las Nps haciendo uso de Albúmina de Suero Bovino (BSA) como ligando para evaluar su efecto en la internalización de Nps.

RESULTADOS: Las Nps de CsPbBr₃ base hexano, por si solas, no poseen alguna afinidad por las células exfoliadas de la mucosa oral. No obstante, la exposición de las Nps a albúmina de suero bovino (BSA), permitió observar una internalización de las Nps de CsPbBr₃ base hexano a las células exfoliadas de la mucosa oral.

CONCLUSIÓN: Las Nps de CsPbBr₃ base hexano lograron internalizarse en las células exfoliadas de la mucosa oral haciendo uso de BSA como ligando, abriendo la posibilidad de utilizar este tipo de Nps como marcadores fluorescentes. No obstante, es necesario llevar a cabo más estudios para poder utilizar estos materiales en marcaje celular, de manera que, se puedan dirigir solo al núcleo celular, y así poder evaluar la posibilidad de usarlos además en otras aplicaciones biomédicas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Nanopartículas y generalidades

Las nanopartículas (Nps), en una definición simple y concreta, son un amplio grupo de materiales, los cuales poseen un tamaño menor a los 100 nm (Khan et ál., 2019; Laurent et ál., 2008). No obstante, podemos encontrarnos con diferentes definiciones provenientes de distintas organizaciones que complementan esta primera definición. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) define a los nanomateriales como aquellos materiales que tienen al menos una dimensión en el rango de aproximadamente 1-100 nm y que exhiben fenómenos dependientes de la dimensión del material (Food and Drug Administration., 2014). De manera similar la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) define a los nanomateriales como materiales con cualquier dimensión externa a nanoescala o que posean estructura superficial a nanoescala (ISO., 2023). De estas dos definiciones podemos sacar distintas conclusiones que nos permiten ampliar la definición de nanopartícula. Primero que nada, podemos decir que el eje central de todas las definiciones es la medida en el rango de nanómetros, recordando que los nanómetros son una medida de longitud del sistema métrico, la cual corresponde a una milmillonésima parte de un metro (Instituto Nacional del Cáncer., 2011). Por otro lado, la definición de la FDA menciona un aspecto fundamental en el desarrollo e investigación de las Nps y es la existencia de fenómenos dependientes del tamaño de las Nps, lo cual es fundamental, puesto que las Nps poseen propiedades físicas y químicas únicas que las hacen ideales para ciertas áreas de investigación. Cabe resaltar que la definición de ISO para nanomateriales ha sido utilizada para definir algunos términos como nanoplacas, nanofibras, nanocables, puntos cuánticos entre otros (*Interpretation and implications of the European Commission's definition on nanomaterials 601358001*, s. f.).

1.2. Clasificación de nanopartículas

El estudio de las Nps ha dado como resultado el desarrollo de varios tipos de Nps con distintos materiales de origen y propiedades. Una forma de abordar a las Nps es reconociendo dos fuentes principales de Nps: las naturales, que como su nombre lo indica son producidas en la naturaleza por cualquier especie biológica y las Nps sintéticas que se sintetizan mediante métodos físicos, químicos, biológicos o por medio de métodos híbridos (Jeevanandam et ál., 2018).

Por otro lado, Khan et ál. (2019) abordan una clasificación que divide a las Nps en 6 grupos principales.

1. Nanopartículas a base de carbono

Como su nombre lo indica, la base de la estructura de estas Nps es el carbono. Los fullerenos y los nanotubos de carbono representan los dos grupos más importantes de las Nps a base de carbono. Los fullerenos son un grupo de nanomateriales que están formados a base de carbono y que pueden adoptar la forma de jaulas huecas con formas alotrópicas. Una de las propiedades fisicoquímicas más destacadas de estos compuestos es su tendencia a la agregación, lo que da lugar a la formación de cúmulos de diversas formas y tamaños. Estos materiales han adquirido interés comercial debido a su conductividad eléctrica, alta resistencia, estructura, afinidad electrónica y versatilidad, siendo utilizados en distintas ramas como la biomedicina, productos cosméticos, celdas solares y catalizadores (Astefanei et ál., 2015).

Por otro lado, los nanotubos de carbono son láminas cilíndricas de un diámetro de 1-2 nm de grafeno, donde una hoja de átomos de carbono con enlaces sp² se enrolla sobre sí misma para formar diferentes alótropos de carbono (Iijima y Ichihashi, 1993). Estos materiales exhiben propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas únicas que los hacen útiles en distintas aplicaciones como en nanoelectrónica, óptica y materiales (Ibrahim, 2013).

2. Nanopartículas metálicas

Estas Nps están hechas únicamente de precursores metálicos y a su vez poseen propiedades óptico eléctricas únicas. Las Nps formadas por metales alcalinos y nobles como el Cu, Ag u Au tienen una banda de absorción en la zona visible del espectro electromagnético, característica importante en la aplicación de estos materiales. Gracias a sus avances en los estudios de las propiedades ópticas, las Nps metálicas han sido utilizadas en distintas áreas del conocimiento. Como ejemplo tenemos a las Nps de oro (Nps Au) utilizadas para estudios de fluorescencia y de obtención de imágenes (Ceja-Fdez et ál., 2021).

3. Nanopartículas de materiales cerámicos

Las Nps de materiales cerámicos son sólidos inorgánicos no metálicos sintetizados a través de calentamiento seguido de un congelamiento. Pueden ser encontrados en forma de formas amorfas, formas policristalinas, densas, porosas o huecas (Sigmund et ál., 2006). Por sus propiedades favorables como una alta resistencia al calor y la inercia estas Nps han sido utilizadas en distintas aplicaciones como catalizadores, fotocatalisis, foto degradación por secado, aplicaciones en obtención de imágenes y en ciencias biomédicas han adquirido especial atención por su potencial como sistemas de liberación de fármacos (Thomas et al., s. f.).

4. Nanopartículas semiconductoras

Los materiales semiconductores poseen propiedades entre los metales y los no metales. Las Nps de semiconductores muestran una alteración significativa en sus propiedades con la sintonización de banda prohibida, la cual se puede definir como la energía mínima necesaria para que un electrón pase de un estado de valencia a uno de conductancia. Por lo tanto, son materiales muy importantes en fotocatalisis, foto óptica y dispositivos electrónicos (Sun et ál., 2000).

5. Nanopartículas poliméricas

El término de Nps poliméricas esta dado colectivamente a cada nanopartícula elaborada a base de polímeros. No obstante, en este grupo es importante resaltar a las nanoesferas y las nanocápsulas. El primer grupo lo conforman partículas de matriz cuya masa total es generalmente sólida y otras moléculas son adsorbidas en la superficie de la esfera. El otro grupo de materiales lo conforman moléculas capaces de encapsular totalmente a otras moléculas (Rao y Geckeler, 2011).

6. Nanopartículas de base lipídicas

Estas Nps contienen fracciones lipídicas y son usualmente utilizadas en funciones biomédicas. Generalmente las Nps lipídicas son esféricas y con un diámetro que ronda los 10 a 1000 nm. Como las Nps poliméricas, las Nps lipídicas poseen una cubierta sólida formada de lípidos y una matriz que contiene compuestos liposolubles (Rawat et ál., 2011). La nanotecnología a base de lípidos es un campo especial con una serie de desarrollos tecnológicos como la liberación de fármacos (Montoto et ál., 2020) o en el tratamiento del cáncer (Rosenblum et ál., 2020).

1.3. Nanopartículas en las ciencias biomédicas

Por su tamaño y características físicas, químicas y ópticas las Nps han ganado popularidad en la búsqueda de aplicaciones en las ciencias biomédicas. Como resultado de numerosas investigaciones, en torno a estos materiales se han encontrado una gran variedad de aplicaciones biológicas, biomédicas y farmacéuticas.

El uso de Nps en sistemas de liberación de fármacos es una aplicación muy estudiada en los últimos años (Attia et ál., 2019; Kumar et ál., 2020; Kurawattimath et ál., 2023; Montoto et ál., 2020; Thomas et ál., s. f.; Vilaça et ál., 2021). Las Nps pueden ofrecer ciertas mejoras de las propiedades de los fármacos que las han hecho atractivas para la investigación de liberación de fármacos como pueden ser: encapsular moléculas hidrofílicas o hidrofóbicas en sus núcleos, controlar la

liberación y distribución, mejorando la absorción del fármaco por mucosa o células y mediante la protección del fármaco de la degradación. Algunos nanoacarreadores permitieron el desarrollo de nuevos tratamientos con una mejor especificidad. Varios tipos de Nps como los liposomas, Nps poliméricas, Nps Au, Nps de sílice y puntos cuánticos son considerados como candidatos en la liberación de fármacos (Attia et ál., 2019). Por citar algunos ejemplos de Nps utilizadas en sistemas de liberación de fármacos, Vilaça et ál. (2021) trabajaron con Nps de zeolitas, las cuales se prepararon con dos estructuras de zeolitas, faujacita (NaY) y linde tipo L (LTL), en las cuales se encapsuló un medicamento anticancerígeno (5-fluorouracilo) y se evaluó la eficacia del sistema de liberación del fármaco en líneas celulares de cáncer de mama, carcinoma colon-rectal y líneas celulares de melanoma. Se obtuvieron mejores resultados en las líneas celulares de cáncer de mama HS578T con una mejor acción del 5-fluorouracilo encapsulado en LTL.

Por otro lado, debido a su tamaño y propiedades eléctricas y ópticas el uso de Nps en obtención de imágenes que ayuden o respalden algunos diagnósticos médicos ha llamado la atención de diversas investigaciones alrededor del mundo (Ceja-Fdez et ál., 2021; Cepeda-Pérez et ál., 2016; Kumar et ál., 2020; Song et ál., 2020). Las imágenes obtenidas por Nps aprovechan la intensidad de las señales, la estabilidad y el comportamiento de biodistribución de estos materiales. Así mismo, algunas propiedades como su alta superficie de contacto les dan a las nanopartículas ciertas ventajas como pudiera ser: i) una señal de imagen intensa y logitudinalmente estable, ii) diferentes estrategias de focalización o direccionamiento, esta puede ser pasiva a través de fagocitos o activa debido a dianas moleculares específicas como resultado de la funcionalización con ligandos, iii) una alta avidéz, esto se refiere a que las Nps poseen una alta afinidad y asociación constante ante la presencia de ligandos, iv) Capacidad de señal multimodal, lo cual se refiere a la detección de una misma Np haciendo uso de distintas modalidades o métodos de detección, lo cual las vuelve más versátiles y v) multiplexación, la cual se refiere a la capacidad de detectar diferentes blancos moleculares al mismo tiempo (Thakor et ál., 2016). Un ejemplo de Nps ampliamente estudiadas en la obtención de imágenes son las SPIO (superparamagnetic iron oxide), las cuales se han utilizado en conjunto con la resonancia magnética (MIR) para evaluar su uso en la detección y caracterización de lesiones hepáticas focales (FHLs) y carcinomas hepatocelulares (HCCs). Se ha encontrado que el uso de SPIOs en conjunto con la resonancia magnética posee una alta sensibilidad y una buena especificidad de diferenciar entre HCCs y otras FHLs (Y.-W. Li et ál., 2015).

1.4. Puntos cuánticos (quantium dots, QDs)

Los nanocristales coloidales semiconductores también conocidos como puntos cuánticos (Quantum Dots, QD) han adquirido gran importancia en la biotecnología gracias a sus propiedades ópticas como su rango de excitación más amplio y un pico de emisión más estrecho y definido, haciéndolos perfectos para estudios con fluorescencia (Barroso, 2011; Chan et ál., 2002; Gao y Nie, 2003; Jovin, 2003; Yu et ál., 2006). Los QDs ofrecen ciertas ventajas frente a marcadores fluorescentes convencionales como pudieran ser (Resch-Genger et ál., 2008):

- Tamaño de núcleo modificable (1-10 nm) que generan una amplia gama de picos de emisión fluorescente.
- Los QDs muestran una amplia gama de patrones de absorción que pueden excitarse lejos de sus espectros de emisión, lo cual es útil para evitar la dispersión de fondo.
- Los QDs poseen rendimientos cuánticos mayores en comparación con los marcadores fluorescentes convencionales
- Los QDs poseen mayor foto estabilidad en comparación con los marcadores fluorescentes convencionales a longitudes de onda similares.

No obstante pese a las ventajas anteriormente descritas, los QDs también pueden llegar a presentar algunas desventajas como el comportamiento de “parpadeo”, el cual se caracteriza por periodos de falta de emisión que interrumpen periodos largos de emisión fluorescente (Barroso, 2011; Lee y Osborne., 2009; Resch-Genger et ál., 2008). Sin embargo, este fenómeno de “parpadeo” no ha sido impedimento para que los QDs hayan sido utilizados para distintos propósitos como en el desarrollo de celdas solares (Selopal et ál., 2020) o de otras aplicaciones optoelectricas (X. Li et ál., 2015), así como en aplicaciones en distintas áreas de la biología y de las áreas biomédicas, las cuales por ser parte del eje central del presente proyecto se abordaran con mayor detalle a continuación.

1.5. QDs en biología y ciencias biomédicas

Por las distintas características ópticas que presentan los QDs y las ventajas que ofrecen frente a los marcadores fluorescentes convencionales, una de las aplicaciones más importantes de los QDs en el campo de las ciencias biomédicas es la obtención de imágenes utilizando fluorescencia. La razón de que los QDs sean tan buenos candidatos para la obtención de imágenes biológicas se debe a siete aspectos principalmente: 1) altos coeficientes de extinción; 2) altos rendimientos cuánticos; 3) menor destrucción química de un fluoróforo, o fotoblanqueamiento; 4) los fenómenos de absorción y emisión son dependientes del tamaño; 5) amplia ventana de excitación con picos de emisión bien definidos; 6) se pueden utilizar diferentes QDs al mismo tiempo con una mínima interferencia entre ellos; 7) menor toxicidad en comparación con colorantes convencionales; 8) los QDs pueden

funcionalizarse con diferentes agentes bioactivos. Las bioimágenes de fluorescencia utilizando QDs pueden ser clasificadas a su vez en cuatro tipos: por intensidad, por espectro, por tiempo de vida o por cronómetro. Generalmente el alto rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PLQY) de los QDs es necesario para los tipos de imágenes que utilizan la intensidad de la emisión (Bera et ál., 2010).

Se han utilizado Nps Au para la obtención de imágenes, así como la obtención de un espectro de espectroscopía de superficie asociada a Raman (SERS) en tejidos infectados con el virus de papiloma humano (HPV) y con indicios de cáncer cérvico uterino. Se han encontrado la presencia de Nps Au dentro de los dos tipos de tejidos así como una buena imagen haciendo uso de microscopía de fluorescencia. Por otro lado, el espectro de SERS mostró diferencias entre el tejido infectado con HPV y el tejido con cáncer cérvico uterino (Ceja-Fdez et ál., 2021). Por otro lado, tenemos el desarrollo de Nps de AgIS con recubierta de ZnS con la posible aplicación en la obtención de imágenes que pudieran auxiliar el diagnóstico de cáncer (Soheyli et ál., 2020).

Las reacciones FRET (Förster resonance energy transfer, transferencia de energía resonante de Förster) son reacciones no radiactivas de transferencia de energía, donde un fluoróforo donador transfiere energía a un fluoróforo aceptor cercano (Barroso, 2011; Wallrabe y Perasamy., 2005). Por las características espectrales de los QDs como su alta fotoestabilidad, espectro de emisión estrecho, y su amplio espectro de excitación hacen de estos materiales muy buenos candidatos para llevar a cabo reacciones del tipo FRET.

Las reacciones FRET mediadas por QDs han sido utilizadas en inmunoensayos in vitro, por ejemplo, Nps Au fueron utilizadas enlazándose a anticuerpos para la detección de deoxinivalenol como propuesta para una prueba rápida enfocada al control de las micotoxinas (Goryacheva et ál., 2021). Otro gran campo en el que se han utilizados los QD ha sido el de los biosensores (Imani et ál., 2021). Nps solubles de GSH-CdTe-QDs fueron utilizadas en el desarrollo de un biosensor para detectar una mutación puntual en el gen V617F Janus quinasa 2 (JAK2), obteniendo resultados satisfactorios y demostrando que el uso del biosensor era más sencillo, barato, conveniente y que a su vez presentaba una alta sensibilidad en comparación con otras herramientas de biología celular como la ARMS-PCR (Sistema de amplificación de mutaciones refractarias- reacción en cadena de la polimerasa) (Hakimi et ál., 2022).

Así mismo el uso de QDs como donadores en microscopía también se ha sido reportado con anterioridad. Por citar un ejemplo, se han utilizado Nps de CdTe/ZnS para la detección de núcleos del género de *Staphylococcus aureus* por medio de microscopía de fluorescencia (Huang et ál., 2008).

Como podemos observar los QDs han sido utilizados en las ciencias biomédicas con distintos propósitos como biosensores, inmunoensayos u obtención de imágenes aprovechando sus características ópticas para llevar a cabo pruebas

sencillas, sensibles y fácilmente interpretables. Por lo que la investigación de estos materiales abre el panorama para la mejora de metodologías ya existentes, para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, así como para mejorar la investigación biológica y el desarrollo de nuevas metodologías en área de medicina, biología molecular, entre otras.

1.6. Perovskitas de CsPbBr₃

Los QDs de CsPbBr₃, pertenecen a un grupo de materiales conocidos como perovskitas de halogenuros metálicos, los cuales se caracterizan por poseer excelentes propiedades opto eléctricas como pudiera ser su PLQY (cerca del 90%), fuerte absorción óptica, capacidad de ajuste flexible de la longitud de onda de emisión y espectro de emisión estrecho (con un ancho de ~ 12-40 nm) (X. Li et ál., 2016; Luo et ál., 2020; Mo et ál., 2020; Protesescu et ál., 2015, 2016; Zheng et ál., 2021). Por estas razones las nanopartículas (Nps) de CsPbBr₃ han sido utilizadas para la fabricación de celdas solares (Faheem et ál., 2020; Yang et ál., 2020), desarrollo de diodos de emisión (Park et ál., 2019; Suh et ál., 2018), fotodetectores (L. Lv et ál., 2016; Ramasamy et ál., 2016), materiales de ganancia óptica (X. Li et ál., 2020; Liu et ál., 2019; Yang et ál., 2020; H. Zhang et ál., 2019) entre otros.

Hablando de manera general de las perovskitas de halogenuros metálicos, tenemos que la fórmula ABX₃ se utiliza para describir los distintos componentes del material, donde A corresponde a un catión orgánico o inorgánico (A=Cs⁺, CH₃NH₃⁺), B representa un catión metálico (B=Pb²⁺, Sn⁴⁺), mientras que X representa un anión de halógeno (X= Cl⁻, Br⁻ y I⁻) (Kailasa et ál., 2021). Los materiales de perovskita le deben su nombre a Lev Perovski, quien junto a Gustav Rose, reportaron en 1839 un mineral de CaTiO₃ el cual se da de manera natural en los Montes Urales en Rusia. Este mineral puede ser reconocido como el material arquetípico de las perovskitas (Kovalenko y Bodnarchuk, 2017). Sin embargo, en el artículo de Swarnkar et ál. (2015) menciona que no fue hasta 1958 en el trabajo de Møller que fue reportada la síntesis de perovskitas de CsPbX₃ donde X podía ser Cl⁻, Br⁻ o I⁻, lo cual marcaría el comienzo de la investigación activa por encontrar variantes y aplicaciones sobre este tipo de materiales.

1.6.1. Estructura de las Nps de CsPbBr₃

Respecto a las Nps de CsPbBr₃, tenemos que las propiedades ópticas del material se deben principalmente a su estructura, esta consta de esquinas compartidas de un octaedro de PbBr₆⁻⁴ rodeadas por iones de Cs⁺ de relleno (Xu et ál., 2019). No obstante, la estructura cristalina del material se ve afectada por la humedad, la iluminación y la temperatura, pudiéndose presentar una aglutinación de las Nps acompañada de una alteración de sus propiedades ópticas (Kim et ál., 2015; Xu et ál., 2019). Es de vital importancia para el proyecto reconocer que ante la presencia

de disolventes polares o en la presencia de iluminación UV, las Nps de CsPbBr_3 presentan una aglutinación, siendo esta la principal razón de que su uso en las ciencias biomédicas se vea limitado. La figura 1 nos muestra una representación de la estructura cúbica del material o monocíclica, la cual es la mayormente utilizada para sus distintas aplicaciones.

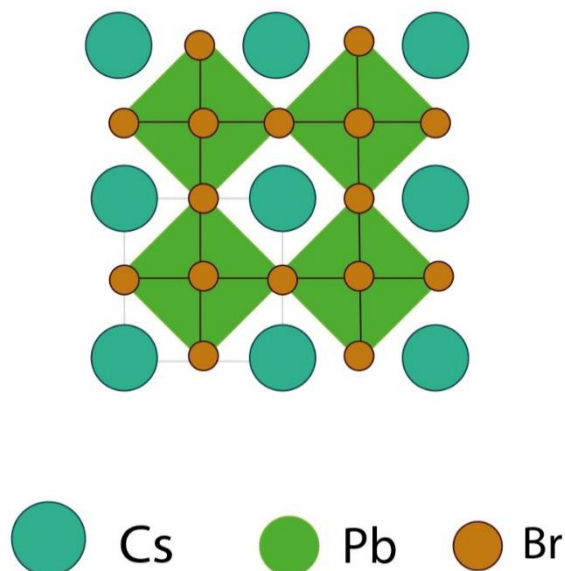


Figura 1 Modelo de la estructura cúbica de las Nps de CsPbBr_3

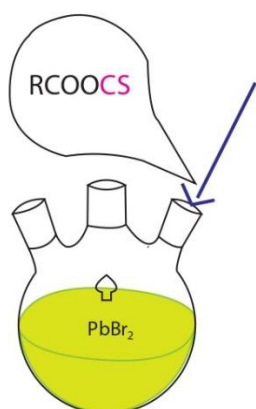
1.6.2. Métodos de síntesis

Recientemente se han descrito una gran variedad de métodos de síntesis para perovskitas, tanto inorgánicas, como orgánicas. La tabla 1 nos muestra los diferentes tipos de metodologías utilizadas para la síntesis de estos materiales (Kailasa et ál., 2021). No obstante, las Nps de CsPbBr_3 cúbicas son comúnmente sintetizadas utilizando el método de inyección en caliente. En este método de síntesis se inyectan precursores de Cesio oleico en solventes a alta temperatura mientras que contienen PbBr_2 y ligandos en ambientes inertes. Por otro lado, la forma monocíclica de las Nps de CsPbBr_3 se obtiene mediante el método de precipitación a temperatura ambiente, en el cual se agregan los precursores CsBr/PbBr_2 (Xu et ál., 2019). La figura 2 nos muestra un esquema simplificado de estos dos tipos de síntesis.

Tabla 1 Métodos de síntesis utilizados en la fabricación de perovskitas

Método de síntesis	Perovskita	Referencia
Reacción en estado sólido	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$	(Chen et ál., 2015)
Reprecipitación a temperatura ambiente	CsPbBr_3	(Nair et ál., 2022)
Inyección en caliente	CsPbBr_3	(Ma et ál., 2021)
Reacción de heterofase gas-sólido	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$	(Ha et ál., 2014)
Método de fase de vapor	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$	(Xing et ál., 2015)
Método hidrotérmico	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$	(Xia et ál., 2015)
Proceso de molienda de bolas	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$	(Prochowicz et ál., 2015)
Método mecano-químico	CsPbBr_3	(Jana et ál., 2017)
Impresión en 3D de chorro de microgotas bajo demanda	MAPbI_3	(Zhao et ál., 2020)
Proceso de fabricación in situ	FAPbBr_3	(Wu et ál., 2020)
Método de reprecipitación asistido por ligandos	FAPbBr_3	(Minh et ál., 2017)
Proceso asistido por ultrasonido	FAPbX_3	(Dou et ál., 2020)
Método de antisolvente	CsPbCl_3	(Mir et ál., 2017)
Cristalización a temperatura inversa	$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbCl}_3$	(Z. Zhang et ál., 2017)
Síntesis electroquímica	CsPbBr_3	(Q. Jiang et ál., 2018)
Método de microondas	CsPbX_3	(Pan et ál., 2017)

inyección en caliente



Re precipitación

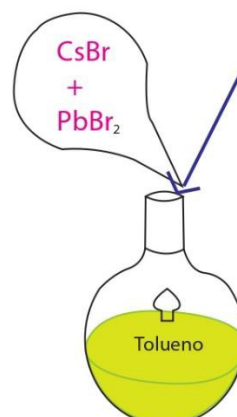


Figura 2 Esquema de métodos de síntesis de Nps de CsPbBr_3 por inyección en caliente y por reprecipitación a temperatura ambiente

Es importante resaltar que los espectros de absorción y emisión de las Nps de CsPbX_3 (donde $X = \text{Cl}^-$, Br^- o I^-) pueden ser fijados en cualquier punto de la región visible del espectro electromagnético, modificando la composición de las Nps y modificando el tamaño de partícula. Las Nps de CsPbX_3 por su diámetro de Bohr de hasta 12 nm, poseen la característica de ajuste de tamaño de sus energías de banda prohibida a través de toda la región espectral de 410-700 nm. Recordando que la banda prohibida corresponde a la energía mínima necesaria para que un electrón pase de estar en un estado de valencia a un estado libre que le permita participar en la conducción. La fotoluminiscencia (PL) de las Nps de CsPbX_3 se

caracteriza por bandas de emisión estrechos de 12-42 nm, altos rendimientos cuánticos de 50-90% y vidas radiactivas bajas de 1-29 ns (Protesescu et ál., 2015).

La síntesis de Nps de CsPbBr₃ base hexano por medio del método de inyección en caliente ha sido reportada con anterioridad por Han y col. (Han et ál., 2017), en la cual se encontró que estas Nps presentaron un PLQY obtenido de las Nps fue de más del 80% así como un primer pico de absorción en 506 nm, lo cual corresponde a la absorción de la banda prohibida de las Nps.

1.6.3. Mejoramiento de la estabilidad en medios acuosos

Como se mencionó con anterioridad, uno de los principales problemas o inconvenientes con las Nps de CsPbBr₃ es su baja estabilidad en presencia de solventes polares. No obstante, en los últimos años se han realizado distintos trabajos (Getachew et ál., 2022; Kumar et ál., 2020; Lee et ál., 2018; Ma et ál., 2021; Mo et ál., 2020; Shu et ál., 2022; Song et ál., 2020; Suhail et ál., 2022) con el objetivo de mejorar la estabilidad de estos materiales en medios acuosos, con el propósito de ampliar su uso en ciencias biomédicas, ya que muchos protocolos de diagnóstico, visualización, entre otros, hacen uso de solventes polares. Por esta razón, la modificación en la síntesis de las Nps de CsPbBr₃ para mejorar su estabilidad en medios acuosos va de la mano con las aplicaciones biológicas de estos materiales.

Los trabajos en mejoramiento de la estabilidad se han centrado principalmente en el recubrimiento de las Nps con cubiertas de polímeros. Por citar algunos ejemplos del recubrimiento con polímeros, podemos mencionar el trabajo realizado por Shu et ál. (2022), donde se recubrieron Nps de CsPbBr₃ con ácido poliacrílico modificado con octilamina (OPA), el cual es un polímero anfifílico que mejoró la estabilidad de las Nps en agua conservando el 80.13% de sus valores originales durante 15 días en agua. Anteriormente, el uso de polímeros anfifílicos como recubrimiento fue propuesto en el trabajo de Lee et ál. (2018), donde se probó una serie de copolímeros anfifílicos como el poli (etilenoxido), los cuales también mejoraron la estabilidad de las Nps en agua. Otro ejemplo del uso de polímeros es el trabajo publicado por Suhail et ál. (2022), donde se recubrieron a las Nps de CsPbBr₃ con carboximetilcelulosa, donde se pudo observar una disminución de la degradación en comparación con las Nps sin recubrimiento.

Por otro lado, otra de las estrategias más usadas para mejorar la estabilidad de las Nps de CsPbBr₃ en medios acuosos es el uso de recubrimientos con sílice (Kumar et ál., 2020; Ma et ál., 2021; Mo et ál., 2020; Song et ál., 2020). Podemos resaltar el trabajo realizado por Song et ál. (2020), en el cual se recubrieron las Nps de CsPbBr₃ con SiO₂, lo cual mantuvo la estabilidad de las Nps en medio acuoso por un periodo de 48 h.

Finalmente, se ha reportado el recubrimiento con moléculas orgánicas más polares para mejorar la estabilidad de las Nps de CsPbBr₃ en medios acuosos, se ha reportado el uso de QDs de (NH₄)_xCs_{1-x}PbBr₃ en la obtención de imágenes in vitro de cultivos de líneas celulares cancerígenas de HeLa, B16F1 y HepG2 (Getachew et ál., 2022).

1.6.4. Aplicaciones biológicas de las Nps de CsPbBr₃

Gracias a los trabajos realizados en los últimos años en torno la estabilidad de las Nps de CsPbBr₃ en medios acuosos, se ha empezado a plantear la posibilidad de utilizar estos materiales en aplicaciones biológicas, encontrando que pueden ser utilizadas para distintos propósitos dentro del área de las ciencias biomédicas.

Se puede mencionar como ejemplo, el trabajo de Ma et ál. (2021), donde se sintetizaron Nps de CsPbBr₃ enlazadas a QDs de Fe₃O₄ que a su vez estaban recubiertas por microesferas de poliestireno y con una cubierta de sílica para formar un complejo CsPbBr₃/Fe₃O₄@MPSs@SiO₂, el cual presentó la característica de ser estable, seguro y no tóxico. Esto permitió su uso en la visualización de células tumorales de cáncer de mama y cáncer pulmonar en la sangre de los pacientes. De igual manera se ha reportado el uso de Nps de CsPbBr₃ con cubierta de SiO₂, las cuales presentaron la característica de no ser tóxicas y que permitieron la obtención de imágenes de cultivos celulares de HeLa. En este mismo trabajo se aborda la posibilidad de utilizar estas Nps como acarreadores y en sistemas de liberación de fármacos (Kumar et ál., 2020). Por otro lado, el uso de Nps de CsPbBr₃ funcionalizadas con grupos carboxílicos, las cuales se enlazaron al DNA para aplicarlas posteriormente en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* con un límite de detección de 51.9 pM (X. Jiang et ál., 2022). Finalmente, la posibilidad de utilizar Nps de CsPbBr₃ en un sistema de liberación de fármacos fue llevado a cabo por Kumar et ál. (2020), publicado en su artículo del 2020 en donde se hizo uso de Nps de CsPbBr₃ con una cubierta de SiO₂ y se adsorbió al material doxorubicina encontrando una buena liberación cuando se inyectó en células HeLa.

1.7. Células exfoliadas de la mucosa oral

1.7.1. Tejidos de la cavidad oral

El epitelio de la mucosa oral es una barrera que separa los tejidos subyacentes del ambiente. Este tejido está conformado por dos capas, epitelio escamoso estratificado y una lámina propia más profunda. En la mucosa oral queratinizada, el epitelio está compuesto por cuatro capas, el estrato basal, el estrato espinoso, el

estrato granuloso y finalmente estrato corneo. En el epitelio oral no queratinizado se puede observar el estrato basal seguido de un estrato filamentosos y un estrato distendido. En la mucosa oral se pueden diferenciar distintos tipos celulares en mucosa de recubrimiento, mucosa masticatoria y mucosa especializada (Gartner, 1994; Groeger y Meyle, 2019). La mucosa de recubrimiento se localiza sobre las estructuras móviles de la boca como el velo de paladar, las mejillas, los labios, la mucosa alveolar, el fornix vestibular y el suelo de la boca. Este tipo de mucosa tiene las características de que es extensible y se une de manera laxa a estructuras adyacentes por un tejido conectivo rico en elastina y un epitelio escamoso no queratinizado. La mucosa masticatoria es una cubierta rígida y resistente, esta se encuentra en la encía y en el paladar duro, esta mucosa se encuentra estrechamente unida por tejido conjuntivo denso al hueso adyacente. El epitelio de esta mucosa posee la característica de ser queratinizado. La mucosa especializada se encuentra presente en el dorso de la lengua, muestra un epitelio queratinizado e incluye las papilas linguales y papilas gustativas, así como distintas estructuras especializadas (Gartner, 1994; Groeger y Meyle, 2019).

1.7.2. Uso de las células exfoliadas de la mucosa oral

Este linaje celular se obtiene de manera sencilla raspando el epitelio no queratinizado de la mucosa oral en el interior de la mejilla, siendo éste un procedimiento no invasivo para el paciente (Odio et ál., 2004). En adición, se ha reportado que las células epiteliales de la mucosa oral permiten una buena visualización de anomalías nucleares como micronúcleos, picnosis, cariólisis entre otras, lo cual permite que este linaje celular sea un buen indicador de daño citogenético (Tolbert et ál., 1992). Por esta razón, el ensayo de micronúcleos ha sido ampliamente utilizado para determinar el grado de exposición a sustancias con características genotóxicas, ya que la presencia de micronúcleos es proporcional al grado de exposición sufrido por una persona (DehghanNezhad et ál., 2020; Espitia-Pérez et ál., 2018; Mosavat et ál., 2022).

En resumen, las células exfoliadas de la mucosa oral son un linaje celular de fácil extracción, la cual no es invasiva para el paciente, que no requiere de realizar cultivos celulares. Por lo que su uso es relativamente económico en comparación con otras líneas celulares y que, a su vez, este tejido tiene valor diagnóstico por ser un buen indicador de daño citogenético.

2. ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado con anterioridad una de las Nps más prometedoras para las nanociencias son las perovskitas de CsPbBr₃. Pese a las ventajas que

ofrecen las células exfoliadas de la mucosa oral, la evidencia de internalización de Nps a células exfoliadas de la mucosa oral humana es limitada. El trabajo de Cepeda-Pérez et ál. (2016) hace uso de la BSA (Albúmina de Suero Bovino) para corregir la toxicidad de Nps de CdTe en un protocolo de internalización de Nps a células exfoliadas de la mucosa oral, obteniendo como resultado una buena visualización celular inclusive con la ventaja de poder apreciar el núcleo de la célula. No obstante, el uso de Nps de CsPbBr₃ en células exfoliadas de la mucosa oral no ha sido reportado con anterioridad.

Una de las aplicaciones biomédicas para las perovskitas de halogenuros metálicos que se han obtenido a base de mejorar su estabilidad en medios acuosos es la de la obtención de imágenes (Getachew et ál., 2022; Talianov et ál., 2021). En base a estos dos antecedentes, surge la idea de hacer uso de Nps de CsPbBr₃ como marcador fluorescente para la obtención de imágenes de alta calidad a través de la microscopía de fluorescencia. No obstante, debido a que no hay suficiente información del uso de Nps de CsPbBr₃ en células exfoliadas de la mucosa oral, se desconoce si estas mismas poseen cierto grado de afinidad con las células exfoliadas de la mucosa oral.

Sanjayan et ál. (2021) reporta el uso de Nps de CsPbBr₃ con ácido succínico como ligando, para mejorar su estabilidad en medios acuosos encontrando solo una disminución del 15% en su intensidad de fotoluminiscencia. Posteriormente se puso a reaccionar con N-hidroxisuccinimida (NHS), la cual usaron para mejorar la reactividad del grupo carboxilo del ácido succínico. Para finalmente usar este complejo en la identificación de albúmina de suero bovino (BSA) por medio de un enlace entre un grupo amino de la BSA y el grupo carboxilo del ácido succínico, obteniendo buenos resultados de conjugación con biomoléculas, mostrando un límite de detección de 55.47 mM. Con este artículo se resalta la posibilidad de funcionalizar a las Nps de CsPbBr₃ con moléculas orgánicas sin alterar en gran medida sus propiedades ópticas y la importancia de los grupos funcionales la conjugación de Np-biomolécula.

Como posible ligando para funcionalizar a las Nps de CsPbBr₃ se tiene la propuesta del uso de la BSA. La albúmina es la proteína más abundante en el suero sanguíneo y posee gran afinidad por ácidos grasos, moléculas orgánicas, drogas y algunos metales como el Zn. Por lo que sus principales funciones en el organismo son de actuar como ligando de distintas moléculas (*UniProt*, s. f.). Por estas características, BSA ha sido ampliamente utilizada, ya que además es homóloga en conformación y secuencia con la albúmina humana, así como por su sencilla purificación y rentabilidad (Y. Lv et ál., 2022). La BSA es una proteína compuesta por 583 aminoácidos, los cuales se dividen en tres dominios: dominio I (1-193), dominio II (194-384) y dominio III (385-583) de los cuales cada dominio se encuentra dividido en los subdominios A y B. Los subdominios IIA (194-296) y IIIA (385-497) forman los sitios de unión a distintos compuestos endógenos y exógenos (Jahanban-Esfahlan y Panahi-Azar, 2016; Y. Lv et ál., 2022), estos sitios de unión se les

reconoce como sitios de Sudlow, llamándose I y II respectivamente (Tayeh et ál., 2009). La BSA es una macromolécula globular con forma de corazón con un peso molecular de 66.4 kDa, donde sus tres dominios homólogos (I, II y III) divididos por 17 puentes disulfuro formando 9 bucles (L1-L9). Los estudios de cristalografía con rayos X han mostrado que la BSA está conformada principalmente por hélices α , y los polipéptidos remanentes forman giros y regiones extendidas o flexibles entre dominios sin láminas β (Jahanban-Esfahlan y Panahi-Azar, 2016).

2.1. Caracterización de Nps

El proyecto fue una colaboración con el Departamento de Materiales Cerámicos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, donde se sintetizaron y caracterizaron las Nps de CsPbBr_3 . Los detalles de su síntesis y su caracterización se explican con mayor detalle en el trabajo de tesis de Aguilar Saldivar. (2023). La microscopia electrónica de barrido permitió determinar el tamaño promedio de las Nps siendo éste de 12 nm. Por otro lado, el uso de la difracción de rayos X permitió corroborar la estructura cúbica de las Nps. La figura 3 nos muestra el resultado de la caracterización utilizando UV-VIS de las Nps de CsPbBr_3 base hexano.

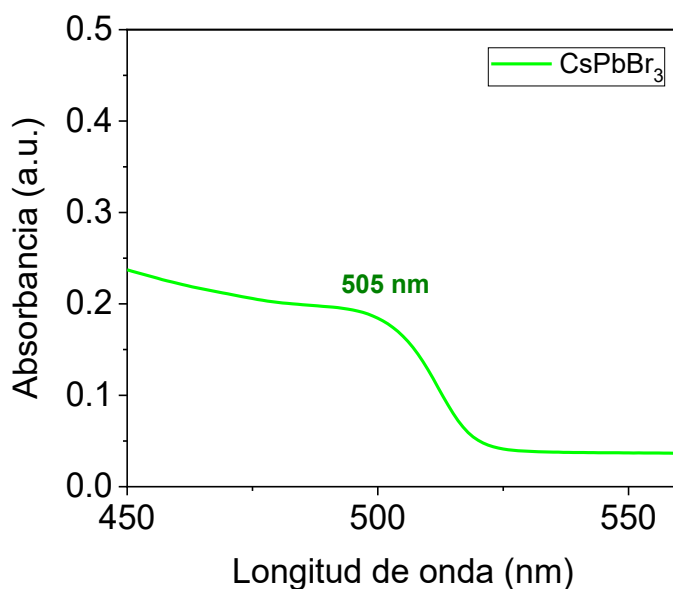


Figura 3 Espectro UV-VIS de la caracterización de Nps de CsPbBr_3 base hexano

El espectro de UV-VIS obtenido de la caracterización por UV de las Nps de CsPbBr_3 base hexano nos muestra un pico de emisión a 505 nm, lo cual contrasta levemente con la caracterización bibliográfica de Han et ál. (2017), en el cual se reporta el pico

a 506 nm. Como se mencionó con anterioridad en el punto 1.6.2 del presente trabajo, este pico de absorción corresponde a la absorción de la banda prohibida de las Nps de CsPbBr₃.

A continuación, la figura 4 nos muestra el pico de PL de las Nps obtenidos por medio de espectroscopia de fluorescencia. El espectro muestra un pico máximo a una longitud de onda a 520 nm indicativo de la emisión color verde en esta región del espectro y que ya ha sido reportado con anterioridad para este tipo de Nps (Protesescu et ál., 2015).

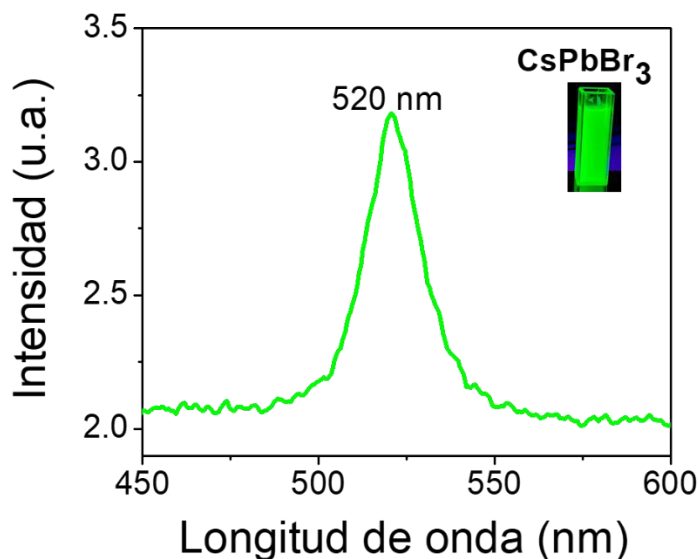


Figura 4 Espectro de fotoluminiscencia de las Nps de CsPbBr₃ base hexano

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente la investigación en torno a las Nps de CsPbBr₃ se ha centrado en mayor medida en sus aplicaciones en celdas solares, diodos de emisión, foto detectores, entre otras. No obstante, las investigaciones que plantea su uso en las ciencias biomédicas son escasos, aún y cuando poseen características que podrían ser útiles en diversas aplicaciones biotecnológicas, que pudieran aportar mejoras en protocolos de marcaje celular, obtención de sus imágenes y en un futuro para el diagnóstico de enfermedades. Sin embargo, aún no se sabe si este tipo de Nps, poseen afinidad por las células exfoliadas de la mucosa oral, por lo que, evaluar su internalización a las células exfoliadas de la mucosa oral nos permitirá utilizarlas como marcadores celulares fluorescentes.

3.1. Pregunta de investigación

¿Las Nps de CsPbBr₃ base hexano pueden internalizarse en las células exfoliadas de la mucosa oral?

4. JUSTIFICACIÓN

La principal razón de usar Nps como marcadores fluorescentes es que, los QDs hasta ahora utilizados, ofrecen muchas ventajas en comparación con los marcadores fluorescentes tradicionales, como el bromuro de etidio o el DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Algunas de estas ventajas son 1) tamaño modificable (1-10 nm) que generan una amplia gama de picos de emisión fluorescente; 2) los QDs muestran una amplia gama de patrones de absorción que pueden excitarse lejos de sus espectros de emisión, lo cual es útil para evitar la dispersión de fondo; 3) los QDs poseen rendimientos cuánticos mayores en comparación con los colorantes convencionales anteriormente mencionados; 4) Los QDs poseen mayor foto estabilidad en comparación con los colorantes convencionales a longitudes de onda similares; 5) mayores tiempos de vida media de la fluorescencia, mientras que los marcadores convencionales poseen un tiempo de vida media de fluorescencia de 1-10 ns con decaimiento mono exponencial, los QDs poseen tiempos de vida media de 10-100 ns con decaimiento multi exponencial (Resch-Genger et ál., 2008), aunque este dato no se conoce con certeza para los QDs de perovskitas. Estas ventajas frente a los marcadores fluorescentes convencionales pueden ser aprovechadas para mejorar el desarrollo de distintas metodologías; más aún si los comparamos con los colorantes tradicionales que hoy son más utilizados en histología. Por esto mismo, la investigación y la búsqueda de aplicaciones biomédicas de las Nps de CsPbBr₃ abre la posibilidad de una nueva área de investigación interdisciplinaria que promete encontrar distintas aplicaciones a estos materiales, con lo cual, se podrían tener técnicas de marcaje de daño celular más específicas y probablemente menos costosas con aplicación diagnóstica.

5. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de CsPbBr₃ base hexano si pueden internalizar en las células exfoliadas de la mucosa oral con lo cual será factible su uso en protocolos de marcaje celular fluorescente.

6. OBJETIVOS

6.1. General

- Evaluar la internalización de nanopartículas de CsPbBr₃ base hexano sin modificar su fórmula y con modificación de su fórmula con el uso de ligandos orgánicos en células epiteliales de la mucosa oral.

6.2. Específicos

- Exponer a las células exfoliadas de la mucosa oral con las Nps de CsPbBr₃ base hexano sin modificar su formulación.
- Observar mediante microscopia de fluorescencia la posible internalización de las Nps de CsPbBr₃ base hexano sin modificar en células exfoliadas de la mucosa oral.
- Desarrollar un protocolo de funcionalización de las Nps de CsPbBr₃ base hexano mediante el uso de ligandos orgánicos
- Exponer las células exfoliadas de la mucosa oral con las NPs de CsPbBr₃ funcionalizadas.
- Valorar la internalización de las Nps de CsPbBr₃ base hexano funcionalizadas en células exfoliadas de la mucosa oral.
- Valorar el uso de Nps de CsPbBr₃ como posibles marcadores fluorescentes.

7. METODOLOGÍA

7.1. Listado de materiales, equipo y reactivos

7.1.1. Materiales

- Cepillo para estudio citológico (citobrush. Harmony S.A. de C.V.).
- Tubos de ensayo.
- Tapones para tubo de ensayo de goma.
- Pipeta volumétrica de 1 ml.
- Probeta de 10 ml.
- Vaso de precipitado de volumen variable.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Gradilla.
- Portaobjetos electro cargados (StarFrost. 76 x 26 mm).
- Tiras de pH.

7.1.2. Equipo

- Centrífuga Labnet. HERMILE Z 300.
- Vortex (Vortex-Genie 2. Scientific Industries Inc. Modelo: G560.
- Microscopio fluorescente Olympus BX51, Modelo BX51TF.
- Micropipeta LabMate+ (10-100 µm).

- Micropipeta LabMate+ (100-1000 μm).

7.1.3. Reactivos

- Agua destilada (Teknia. NFPA= salud 0, peligro de incendio 0, reactividad 0)
- Metanol (Jalmek M6125-13. CAS 67-56-1. NFPA= salud 1, peligro de incendio 3, reactividad 0.)
- BSA (Sigma, A2153-50G, $\geq 96\%$. NFPA= salud 0, peligro de incendio 0, reactividad 0).

7.1.3.1. Nanopartículas

La figura 5, nos muestra el vial con las Nps de CsPbBr_3 base hexano, sintetizadas y caracterizadas en el Departamento de Materiales Cerámicos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El contenido del vial es una solución homogénea de un color verde fosforescente. Estas Nps fueron sintetizadas siguiendo el método de inyección caliente sin atmósfera controlada y (Aguilar Saldívar., 2023). Los resultados de la caracterización por UV-VIS y su intensidad de PL son presentados en el punto 2.1 del presente trabajo.

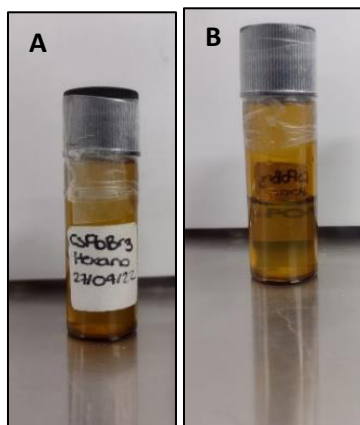


Figura 5 Vial de nanopartículas de CsPbBr_3 base hexano; A. Imagen frontal del vial; B. Imagen Posterior del vial

7.2. Transporte de Nps

El transporte de Nps al laboratorio se realizó a una temperatura de -4 a 4 $^{\circ}\text{C}$. El transporte se realizó en una hielera con bolsas de gel refrigerante previamente congelados a -20 $^{\circ}\text{C}$ para proteger la estabilidad de las Nps. Así mismo se

transportaron en un vial color ámbar para proteger a las Nps de la luz. Finalmente, una vez recibidas en el laboratorio se almacenaron en un refrigerador a una temperatura media de 4 °C.

7.3. Procedimiento experimental

7.3.1. Exfoliación celular

Con el objetivo de obtener una buena visualización celular se realizó un protocolo de exfoliación, el cual se basa en la realización de lavados celulares seguidos de una dilución para obtener mejores resultados visuales y facilitar el conteo celular. Este protocolo se describe a continuación.

- a) Se realizó una toma de muestra de células epiteliales provenientes de la mucosa bucal (revestimiento de labio y mejilla), con un cepillo para estudio citológico se raspó el interior de la mejilla.
- b) Se separó la brocha del vástago y se colocó dentro de un tubo de Eppendorff con 1ml de metanol.
- c) Posteriormente se tapó el Eppendorff rápidamente para evitar alguna contaminación y se agitó en el vortex durante 1-5 min hasta que se obtuvo una solución homogénea.
- d) Se retiró la brocha del tubo y se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 5 min.
- e) Se descartó el sobrenadante evitando eliminar el material celular.
- f) Se agitó el sedimento por un minuto en el vortex hasta que se obtuvo una solución homogénea y con la menor cantidad de grumos posible.
- g) Se agregó 1 ml de metanol, posteriormente se volvió a agitar por 3-5 min en el vortex y se centrifugó por 5 min a 3500 rpm.
- h) Se decantó el sobrenadante evitando eliminar material celular.
- i) Se adicionaron 25 μ L de material celular en otro tubo anterior con el fin de hacer una dilución 1:10 con metanol.
- j) De la mezcla obtenida colocar 50 μ L sobre el portaobjetos previamente rotulado.
- k) Dejar secar a temperatura ambiente.

7.3.2. Exposición preliminar de Nps

Continuando con el propósito principal del proyecto, se expusieron las células previamente fijadas con metanol a las Nps de CsPbBr₃ base hexano. Para evaluar distintos escenarios se prepararon dos portaobjetos, a los cuales se les llamo 1 y 2 respectivamente, las cuales fueron preparadas siguiendo el protocolo de exfoliación

celular previamente mencionado. Al portaobjetos 1 se le realizó un proceso de hidratación celular, mientras que para el segundo portaobjetos la exposición se llevó a cabo sin hidratación previa de las células.

- a) Se tomó el portaobjetos 1, a la cual se le añadieron 100 μ l de una solución de etanol 70% en la parte superior del portaobjetos y se inclinó para que recorriera el portaobjetos, posteriormente se puso a incubar por 3 min a 37°C.
- b) Terminado el tiempo de incubación, se añadieron 100 μ L de una solución de etanol 30% de la misma forma que la solución al 70% y se incubó por 3 min a 37°C.
- c) Se escurrió el sobrenadante del primer portaobjetos.
- d) Se agregaron 50 μ L de Nps a los portaobjetos 1 y 2.
- e) Finalmente se incubaron ambos portaobjetos por 5 min a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se observaron ambos portaobjetos en el microscopio de fluorescencia.

7.3.3. Variación de tiempo y temperatura

Con el propósito de evaluar si la temperatura y el tiempo de incubación poseen algún efecto en la internalización de las Nps, se realizó una prueba que permitiera poder evaluar estas dos condiciones simultáneamente. Para ello se fijaron dos tiempos de 1 y 2 h de incubación a 37 y a 60 °C respectivamente. Esta última temperatura elegida en base a la metodología de la tinción de Feulgen utilizada para la observación de micronúcleos. Se tomó como máximo de tiempo las 2 h tomando como referencia el tiempo de incubación utilizado en el trabajo de Cepeda-Pérez et ál. (2016). De tal manera que se prepararon 3 portaobjetos. Los portaobjetos 1 y 2 corresponden a un tratamiento de 60 °C con una y dos horas de incubación respectivamente, mientras que el portaobjetos 3 se incubó a 37 °C durante una hora. En adición es importante mencionar que se decidió trabajar con células sin hidratar, la razón de esta decisión se discute con mayor detalle en el punto 8.3 del presente trabajo.

7.3.4. Protocolos de lavados

Con el objetivo de obtener una mejor visualización celular se realizaron dos protocolos de lavados de los portaobjetos para eliminar el exceso de Nps poder mejorar de mejor manera las células. Para el primer método se realizó el protocolo de exposición correspondiente al punto 7.3.2 sin hidratar a las células y posteriormente se realizaron cuatro lavados con agua destilada dejando los portaobjetos con un tiempo de lavado de 5 min en cada uno. Posteriormente se

realizó un segundo método de lavado donde se sustituyó el agua destilada por hexano dejando los portaobjetos con un tiempo de lavado de 5 min en cada uno.

7.3.5. Protocolo con uso de BSA

Con el propósito de evaluar si el uso de BSA posee algún efecto significativo en la internalización de Nps a las células exfoliadas de la mucosa oral se realizó el siguiente protocolo donde se evaluaron distintas matrices y tiempos de incubación.

1. Se realizó una exfoliación y suspensión celular en 1 ml de agua destilada (I), metanol (II) o una mezcla de metanol:ácido orgánico pH=3 (III) (dependiendo del tratamiento). Se prepararon dos series de cada tratamiento marcando cada serie como a y b respectivamente. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y desechar el sobrenadante.
2. Al residuo se le agregaron 250 μ L de I, II o III dependiendo del tratamiento.
3. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml agregar solución de BSA con nanopartículas de CsPbBr₃ suficiente para cada tratamiento.
PROPORCIÓN: por cada muestra debe de ir 50 μ L de BSA +25 μ L de NPs
4. Se agitó el tubo Eppendorf en el vortex por un periodo de 10-15 min
5. Se agregaron 75 μ L de la solución del tubo Eppendorf a cada tratamiento buscando que la solución este lo más homogénea posible antes de pipetear.
6. Con el propósito de evaluar si el tiempo de incubación posee un efecto en la internalización de Nps se trabajó con un periodo de incubación corto y otro más prolongado (serie a=5 min y serie b= 30 min) a 37 °C en la incubadora
7. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y medir el pH de cada uno.
8. Se añadieron 0.5 ml de I, II o III dependiendo del tratamiento y finalmente se tomaron 50 μ L de cada muestra en un portaobjetos, dejar secar y observar al microscopio en campo claro, fluorescencia y con ambos para evaluar la internalización de las Nps.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Exfoliación celular

La figura 6 nos muestra los resultados de visualización celular realizada con el procedimiento anteriormente descrito para citología de células exfoliadas de la mucosa oral teñidas con azul de metileno con el propósito de contrastar estos resultados con la observación de células con Nps. En esta figura podemos apreciar

una buena identificación individual de las células, así como una clara visualización del núcleo, el cual es de un azul marino. Este color contrasta con el citoplasma de las células que se puede observar de un color azul más tenue en comparación del núcleo. Así mismo, es importante resaltar el contraste que existe entre las células y el fondo que facilita su observación. Así mismo, se puede apreciar la presencia de basura en la imagen provocada por el colorante en la célula ubicada en el cuadrante superior derecho de la figura. Es importante mencionar que la tinción con azul de metileno no es específica para contrastar el citoplasma del núcleo celular, existen tinciones específicas para la visualización del núcleo celular como la tinción de Schiff cuya preparación de los colorantes así como su protocolo, son largos y hacen uso de una cantidad considerable de reactivos, de los cuales algunos son considerados carcinógenos y sus desechos son contaminantes para el ambiente. El uso de marcadores fluorescentes disminuye en gran medida dichos inconvenientes, más sin embargo aún hay marcadores como el bromuro de etidio que son catalogados como carcinógenos y dañinos para la salud humana.

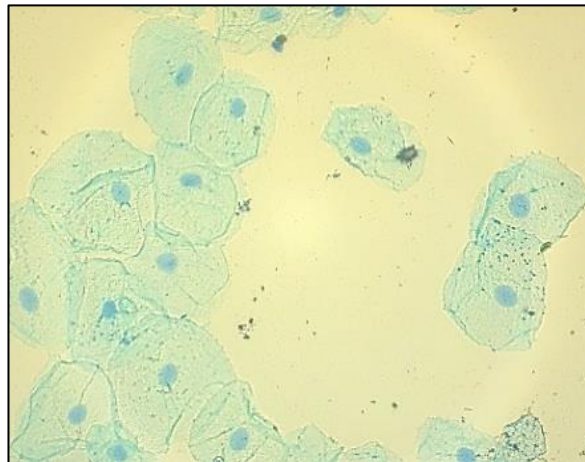


Figura 6 Resultados del procedimiento para citología de células epiteliales de la mucosa oral. Dilución 1:10. Tinción con azul de metileno. Objetivo de 40x

8.2. Exposición preliminar

La figura 7 nos presenta los resultados de la exposición preliminar de las Nps de CsPbBr_3 base hexano a las células exfoliadas de la mucosa oral hidratando las células con dos baños de etanol previas a la exposición con las Nps. Por otro lado, los resultados de la incubación en seco se encuentran en la figura 8.

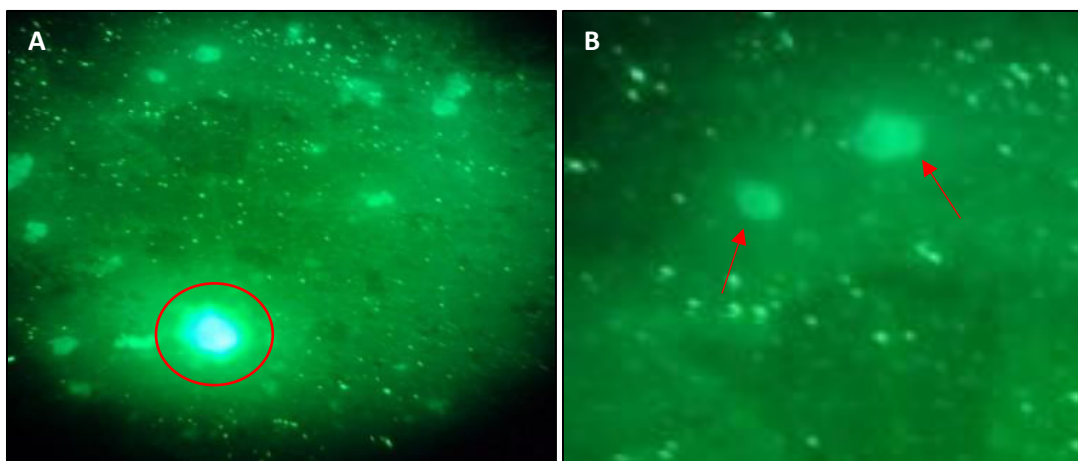


Figura 7 Nps de CsPbBr₃ hidratadas con baños de etanol, observación en microscopio de fluorescencia filtro verde (500-560 nm), objetivo 10x; A. Círculo rojo indica un aglomerado de Nps; B. Zoom de la imagen A a 70x donde las flechas rojas indican la sospecha de células.

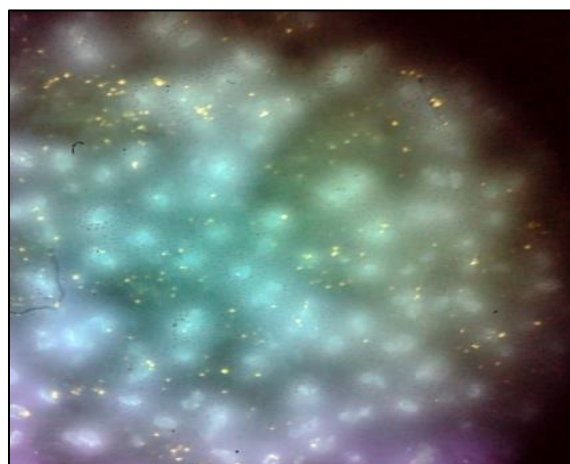


Figura 8 NPs de CsPbBr₃ secas, observación al microscopio de fluorescencia filtro UV (315-400 nm), objetivo 10x.

Se puede apreciar en la figura 7 que la emisión de las nanopartículas es color verde fosforescente. Para su visualización se utilizó el filtro verde del microscopio de fluorescencia, en el cual se encuentra el rango de absorción y emisión de las Nps de CsPbBr₃ (505 y 520 nm respectivamente). De manera general se puede apreciar un aglomerado de Nps, el cual resalta por medio de un círculo rojo en la figura 7.A en el cuadrante inferior izquierdo de la figura. El aglomerado de Nps observado durante la exposición de las células con etanol junto a lo anteriormente mencionado en el punto 1.6.1 del presente trabajo, sugiere que la presencia de un solvente polar, como lo es el etanol, no ayuda a la internalización de las Nps provocando un aglomerado de las mismas. Por otro lado, la figura 7.B. corresponde a un zoom del

cuadrante superior izquierdo de la figura 7.A, donde las flechas rojas indican la presencia de, lo que se sospecha son células, debido a su forma y tamaño. No obstante no se alcanza a observar algún núcleo celular, por lo tanto, se puede sugerir que no se ha realizado una internalización de las Nps a las células sino una unión a la membrana plasmática. Sin embargo, el fenómeno de aglomeración de Nps observado en este mismo portaobjetos realza la duda de que estos cuerpos observados en la figura 7.B no sean células sino aglomeraciones de Nps.

En la figura 8, podemos observar las células de un color blanco, mientras que las Nps se encuentran presentes de un color amarillo-verdoso opaco. Esto debido al uso del filtro UV del microscopio de fluorescencia que nos permite ver células, sin embargo, este rango no es útil para observar la emisión de las Nps puesto que estas mismas no absorben ni emiten en estas longitudes de onda. Como se puede ver, las Nps se encuentran alrededor de las células o por encima, pero no es apreciable ninguna internalización a las células. Así mismo se puede observar la disminución de aglomerados de Nps sin hidratar previamente a las células, facilitando en gran medida la observación de la placa.

La membrana celular es una bicapa lipídica que posee la característica de ser selectivamente permeable, esto quiere decir que solo permitirá que pasen ciertos iones o moléculas. La membrana plasmática favorece el movimiento de sustancias de dos formas: un transporte pasivo o un transporte activo. El transporte pasivo consta en la difusión de las sustancias a través de la membrana celular de un medio de mayor concentración a uno de menor concentración sin la necesidad de utilizar energía. Este transporte pasivo se puede dar de tres maneras principalmente: 1) por difusión simple, donde las moléculas muy pequeñas sin carga neta, gases disueltos como el oxígeno y el dióxido de carbono, moléculas liposolubles, vitaminas (A, D y E) y las hormonas esteroideas, se difunden a través de la bicapa de fosfolípidos por sus gradientes de concentración; 2) por difusión facilitada, la cual es la difusión iones o moléculas a través de una proteína de canal o portadora y 3) por ósmosis, la cual es la difusión de agua a través de una región de mayor concentración a una de menor concentración. Por otro lado, en el transporte activo, las proteínas de membrana requieren de energía para mover moléculas o iones a través de la membrana celular (Audesirk et ál., 2013).

Las Nps de CsPbBr₃ poseen características que nos hacen pensar que este tipo de materiales pueden pasar la membrana celular por difusión simple pues cuentan con las características de ser pequeñas (12 nm), no poseen carga neta y son liposolubles. Sin embargo los resultados obtenidos en el protocolo de exposición preliminar parecen indicar lo contrario. En el caso de que las células epiteliales se encuentren hidratadas, el hexano al ser completamente inmiscible en etanol, el solvente con que se llevó a cabo la hidratación disminuyendo a interacción de las Nps con las células, así mismo la formación de aglomerados de Nps de gran tamaño impiden la internalización de las Nps en las células exfoliadas de la mucosa oral. Por otro lado, los resultados de la incubación en seco, aunque presentan una

disminución del número de aglomerado de Nps, parecen no indicar una afinidad e las Nps con las células y no muestran evidencia de internalización. Esto sugiere que las Nps no atraviesan la membrana celular por difusión simple y que requieran de algún ligando o de un transporte activo para poder atravesar la membrana plasmática.

8.3. Variación de tiempo y temperatura de incubación

Con el propósito de evaluar si la variación del tiempo y la temperatura de incubación tenían algún efecto significativo en la internalización de las Nps a las células, se trabajó con diferentes tiempos y temperaturas de incubación (punto 7.3.3 de la metodología). Los resultados de la variación de los tiempos y temperatura de incubación se plasman en las figuras 9, 10 y 11.

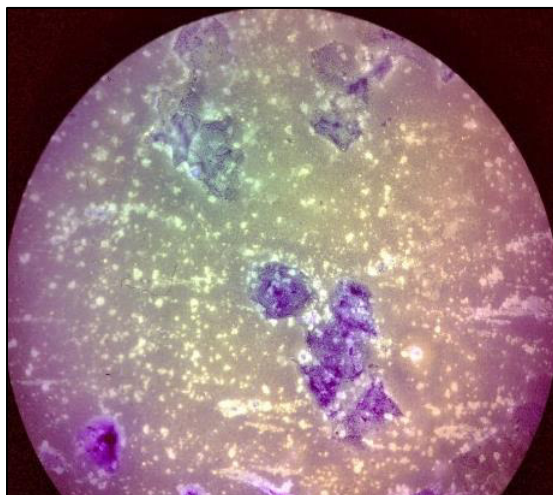


Figura 9 NPs de CsPbBr₃ secas, portaobjetos 1, incubación de 1 h durante 60°C. Observación al microscopio de fluorescencia filtro UV (315-400 nm), objetivo 10x.

En los resultados del portaobjetos 1 observados en la figura 9, obtenidos por medio del microscopio de fluorescencia con el filtro UV nos muestra a las células de un color violeta azulado y las Nps de un color amarillo-verdoso de fondo, a su vez se pueden apreciar como las Nps forman aglomerados y se encuentran rodeando las células sin evidencia de internalización de las Nps a las células, ya que el brillo proviene por fuera de las células y no por dentro de las mismas que es lo que se buscaría en la internalización de las Nps.

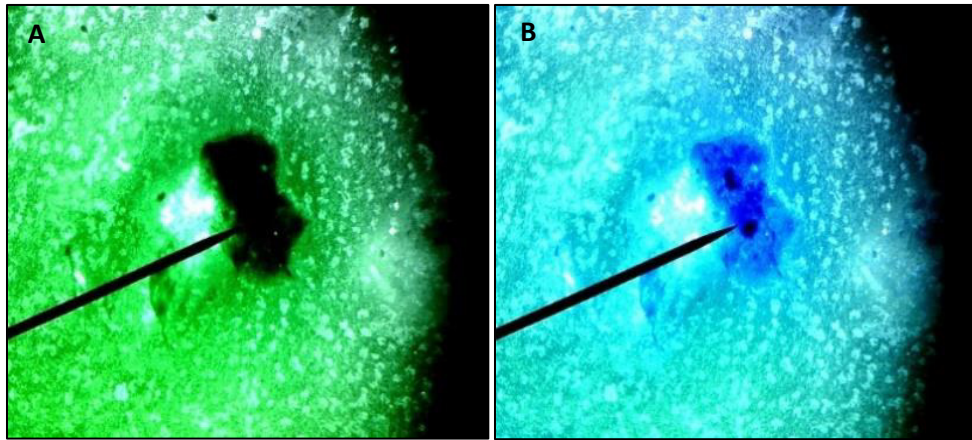


Figura 10 Nps de CsPbBr₃ base hexano secas, portaobjetos 2, incubación de 2 h a 60°C; A Nps de CsPbBr₃ secas, observación con microscopio de fluorescencia, filtro verde (500-560 nm), objetivo de 40x; B Nps de CsPbBr₃ secas, filtro UV (315-400 nm), objetivo de 40x.

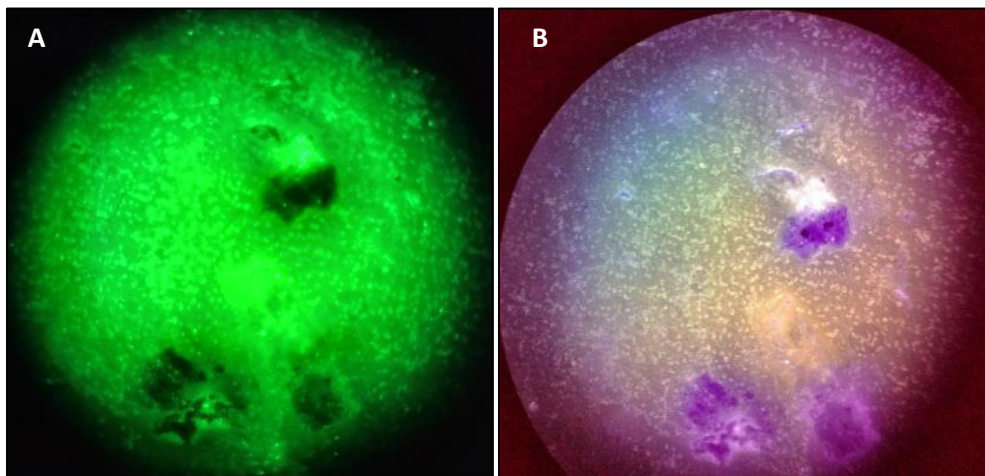


Figura 11 Nps de CsPbBr₃ base hexano, secas, portaobjetos 3, incubación de 1 h a 37 °C; A Nps de CsPbBr₃ secas, observación con microscopio de fluorescencia, filtro verde (500-560 nm), objetivo de 40x; B Nps de CsPbBr₃ secas, observación con microscopio de fluorescencia, filtro UV (315-400 nm), objetivo de 40x.

Las figuras 10 y 11 nos muestran los resultados de la placa 2 y la placa 3 respectivamente. En la figura 10.A se puede apreciar a las Nps de CsPbBr₃, que brillan de un color verde intenso de fondo. Así mismo, se puede apreciar muy claramente un hueco que corresponde a un par de células que se pueden visualizar de mejor manera en la figura 10.B la cual fue obtenida haciendo uso del filtro UV del microscopio de fluorescencia. En esta imagen podemos apreciar el núcleo de dos células una al lado de la otra. La figura 11 nos muestra los mismos resultados encontrados en la figura 10. En ambas imágenes podemos apreciar como las Nps rodean a las células sin mostrar afinidad por las mismas.

De los resultados de la variación del tiempo y temperatura de incubación observamos que las Nps de CsPbBr₃ base hexano por si solas no logran internalizarse en las células exfoliadas de la mucosa oral.

8.4. Protocolos de lavados

Continuando con los resultados obtenidos de los protocolos de lavados es importante recordar que éstos se realizaron con el objetivo de obtener una mejor visualización celular eliminando el exceso de Nps de fondo para evaluar una posible internalización celular. La razón de plantear estos objetivos fue la sospecha de que algunos elementos observados en la figura 7.B. del punto 8.2 pudieran ser células.

En el caso del primer protocolo de lavado haciendo uso de agua destilada. Los resultados obtenidos se plasman en las figuras 12-13.

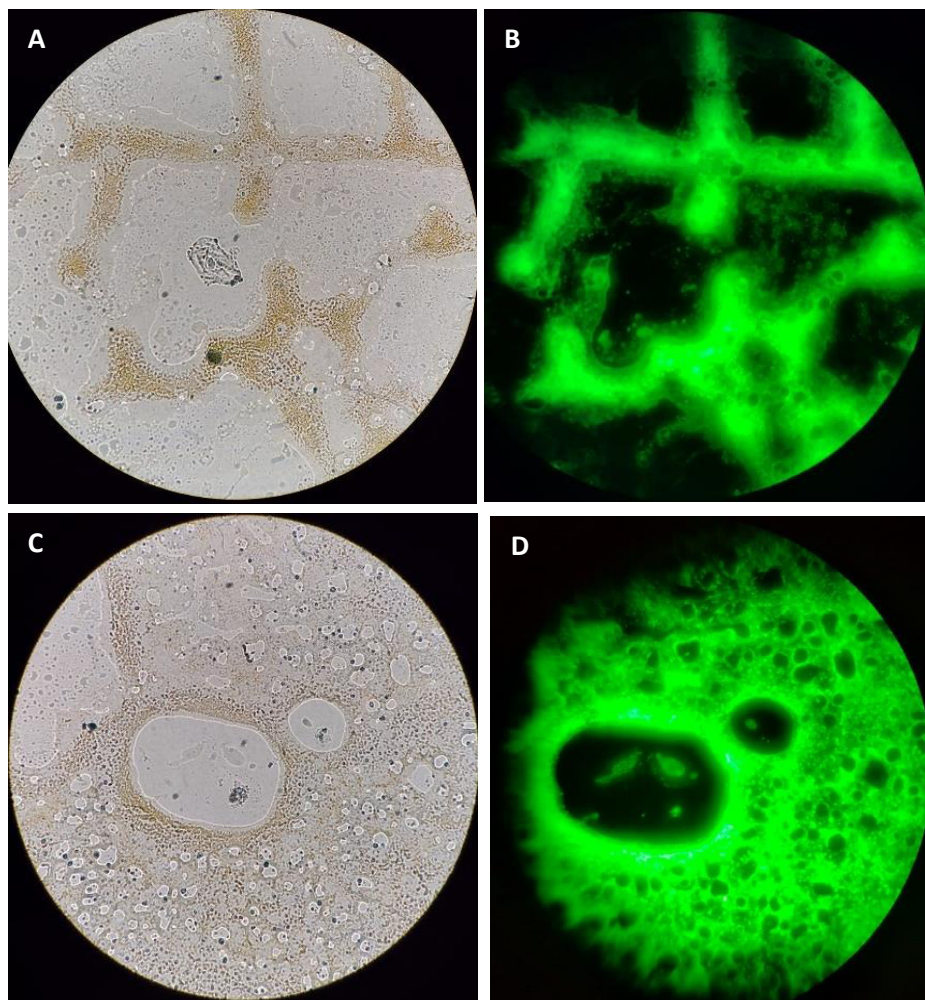


Figura 12 Tercer lavado con agua; Células con Nps de CsPbBr₃ base hexano observadas objetivo de 40x. A y C. Campo claro; B y D. Fluorescencia filtro 3

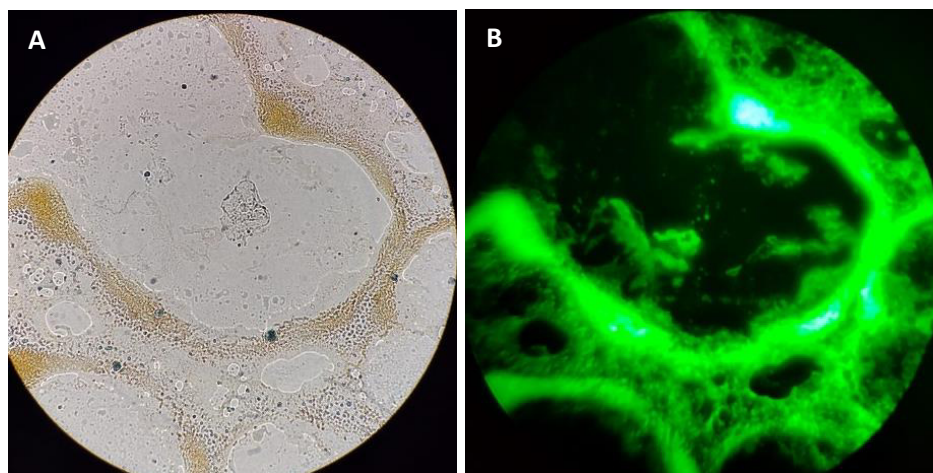


Figura 13 Cuarto lavado con agua; A. Células con Nps de CsPbBr₃ base hexano observadas a 40x. Campo claro; B. Fluorescencia filtro 3

Los resultados de los lavados realizados con agua destilada no muestran ninguna evidencia de internalización de las Nps, poniendo en evidencia que la elección del agua destilada no fue la más adecuada para eliminar el exceso de Nps. Se sospecha que debido a la naturaleza no polar del hexano, no se pudo retirar el exceso de Nps correctamente. De estas imágenes podemos resaltar el hecho de que las Nps no parecen tener interacción alguna con las células, ya que se puede comprobar que forman aglomeraciones y presencia de micelas alrededor de las células sin entrar en ellas. Esto se muestra en la figuras 12.A y 12.B, donde se puede apreciar en la captura de campo claro una célula epitelial justo en el centro de la figuras. No obstante, podemos observar en la figura que utilizando la emisión de fluorescencia, esta célula no se alcanza a visualizar confirmando el hecho de que estas Nps no logran entrar en las células y no parecen tener alguna interacción con las mismas. Es importante mencionar que en el caso de la figura 12.D podemos observar el mismo fenómeno reportado con anterioridad en la figura 7.B del punto 8.3, en el que pareciera ver una internalización por parte de las Nps en las células. No obstante, en la micrografía de campo claro plasmada en la figura 12.C, podemos observar que estos cuerpos no corresponden a células, sino que podrían ser resultado de la aglomeración de Nps.

Por parte del protocolo de lavados utilizando hexano los resultados se presentan en las figuras 14 y 15.

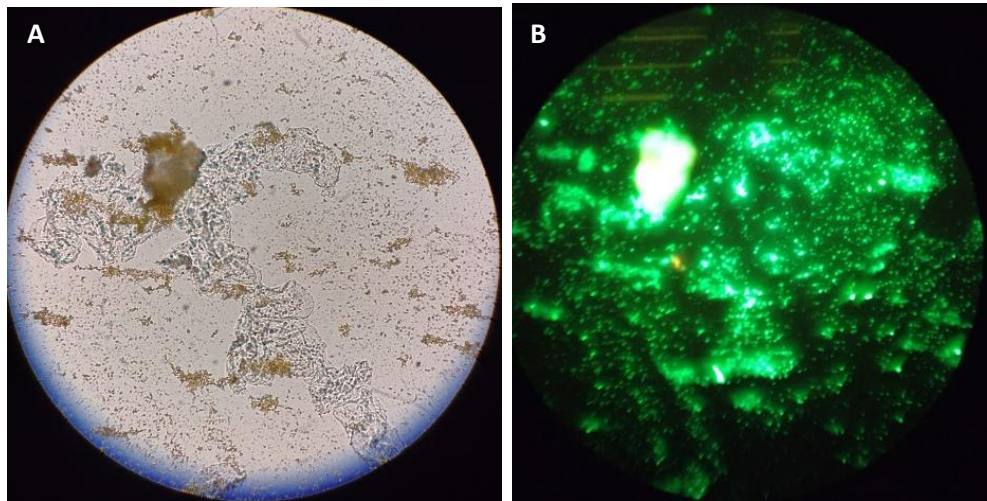


Figura 14 Segundo lavado con hexano; A. Células con Nps de CsPbBr₃ base hexano, objetivo de 40x. Campo claro; B. fluorescencia filtro 3

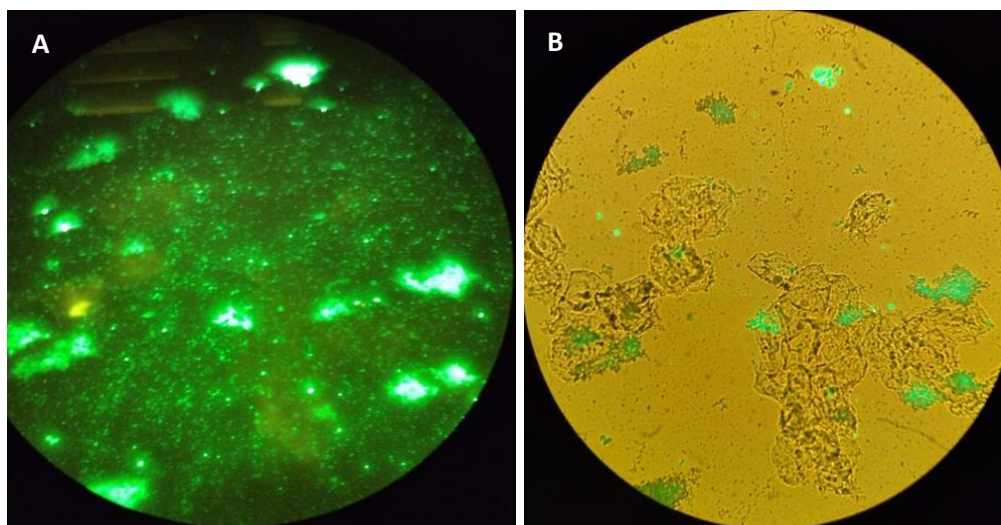


Figura 15 Tercer lavado con hexano; A. Células con Nps de CsPbBr₃ base hexano objetivo de 40x. A Fluorescencia filtro 3; B. Fluorescencia junto con luz visible

En los resultados de los lavados realizados con hexano, podemos observar que el uso de hexano en el protocolo presentó una mejor limpieza de la muestra en comparación del agua disminuyendo la cantidad de micelas. Por otro lado, en este punto del proyecto se utilizó el campo de luz visible en conjunto a la fluorescencia para poder apreciar la fluorescencia de Nps en conjunto con la visualización celular. Esto se puede apreciar con mejor detalle en las figuras 14 y 15 correspondientes al segundo y tercer lavado. En estas imágenes podemos confirmar que las Nps forman aglomeraciones alrededor y encima de las células sin mostrar signos de

internalización. Gracias a estas observaciones se puede confirmar sin la necesidad de un cuarto lavado que las Nps de CsPbBr₃ base hexano por si solas no logran internalizarse en las células exfoliadas de la mucosa oral y por lo tanto no parecen ser afines con las células.

8.5. Protocolo con uso de BSA

Con el propósito de evaluar si BSA es un buen ligando o proporciona grupos funcionales que pudieran proporcionar carga a las Nps que permitan su internalización a las células exfoliadas de la mucosa oral, se realizó la evaluación de su uso variando tiempos de incubación.

Para evaluar el efecto del tiempo de incubación se realizaron dos series (a y b), de las cuales la serie a se sometió a una incubación de 5 min, mientras que la serie b se sometió a una incubación de 30 min, ambas a 37 °C. La temperatura y los tiempos cortos de incubación se eligieron en base al trabajo de Cepeda Pérez y col.

A continuación se evaluó la matriz en la que se encuentran suspendidas las Nps para ver si posee un efecto significativo en la internalización a las células. Durante el desarrollo del experimento se utilizaron tres matrices diferentes:

- I. Agua destilada
- II. Metanol
- III. Metanol- ácido orgánico pH=3 proporción 3:1

Tomando esto en cuenta se realizaron los siguientes tratamientos:

- I. Células + agua destilada + BSA + Nps
- II. Células + metanol + BSA + Nps
- III. Células + ácido orgánico pH= 3 proporción 3:1+ BSA + Nps

La razón de usar metanol y la mezcla de metanol: ácido orgánico es que estos funjan como fijadores de las células a las laminillas. Por otro lado, la razón de usar un ácido orgánico es que en el artículo de Sanjayan et ál., (2021) el ácido succínico resultó ser el ligando más afín a las Nps y resalta la importancia del grupo carboxilo para el enlace con un grupo amino de la BSA. Teniendo esto en cuenta, se optó el usar un medio ácido como suplente del ácido succínico con la finalidad de que su efecto en la posible internalización de las Nps sea significativo.

A su vez, suponiendo que el pH posee algún efecto significativo en la internalización de las nanopartículas, se midió el pH de los sobrenadantes recuperados durante el protocolo. Encontrando que para el tratamiento 1 la serie “a” presentó un pH de 4, mientras que la serie “b” presentó valores entre 3 y 4. Por otro lado, tanto el protocolo 2, como el 3, tanto las series “a” como la “b” mostraron valores de pH de 3.

Las figuras 16 a 21 nos muestran los resultados del protocolo con uso de BSA. De estos resultados, las figuras 16-17 corresponden al uso de agua destilada como matriz. Las figuras 18-19 muestran los resultados obtenidos del uso de metanol

como matriz. Finalmente, los resultados de las figuras 20-21 muestran los resultados obtenidos utilizando una mezcla de metanol con un ácido orgánico pH=3 como matriz.

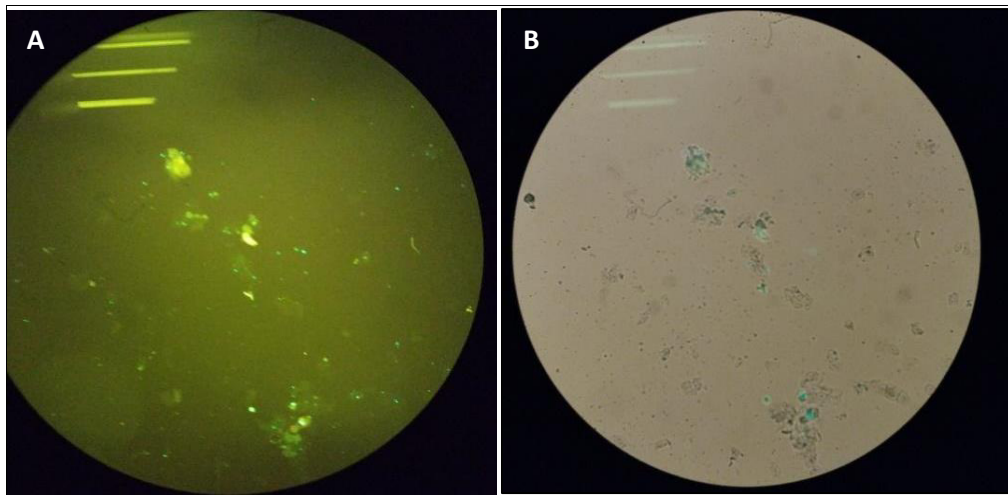


Figura 16 Tratamiento 1a: 5 min de incubación, objetivo 10x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

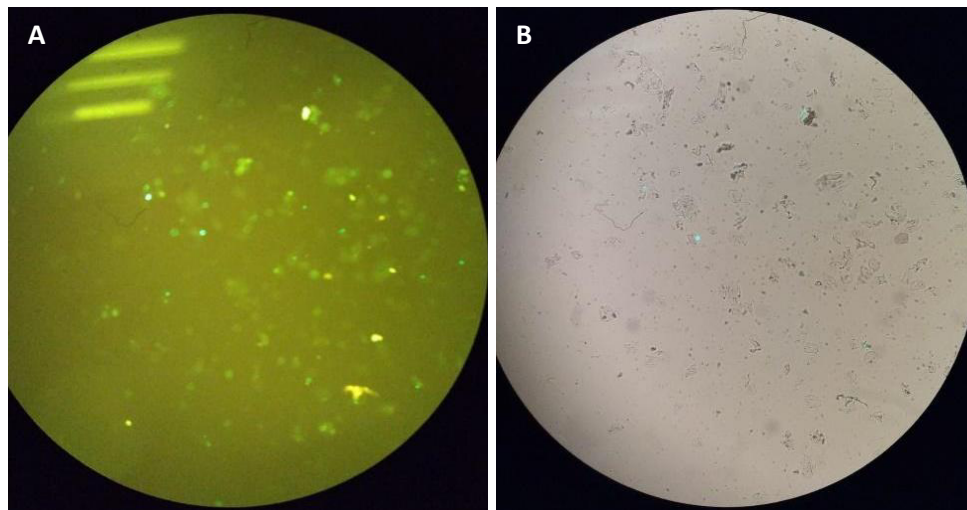


Figura 17 Tratamiento 1b: 30 min de incubación, objetivo 10x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

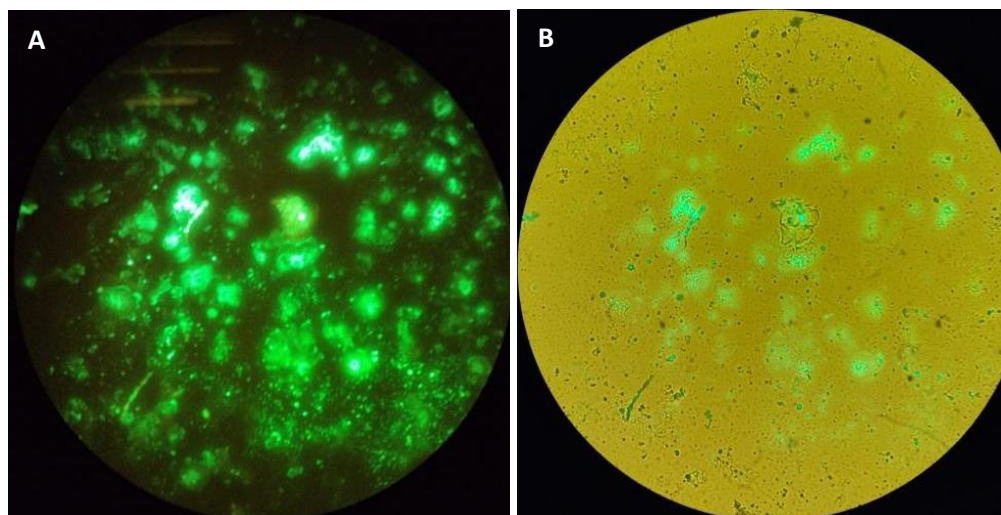


Figura 18 Tratamiento 2a: 5 min de incubación, objetivo de 40x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

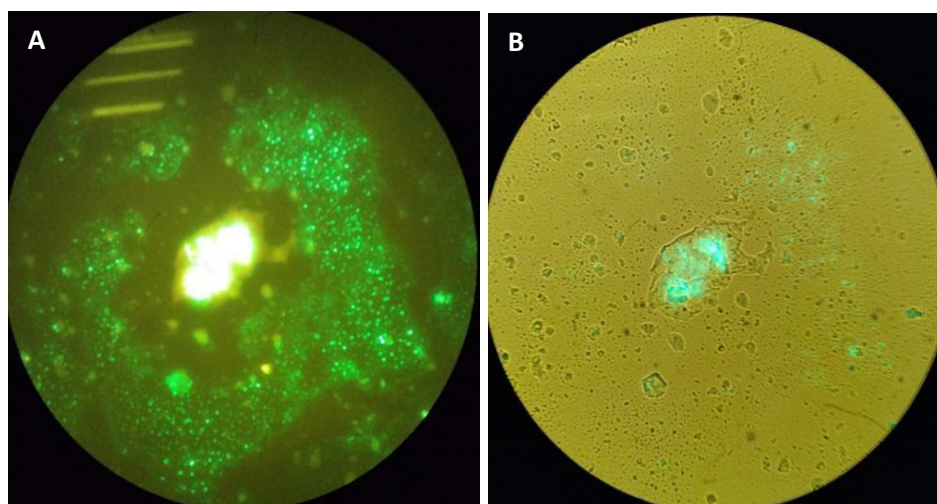


Figura 19 Tratamiento 2b: 30 min de incubación, objetivo de 40x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

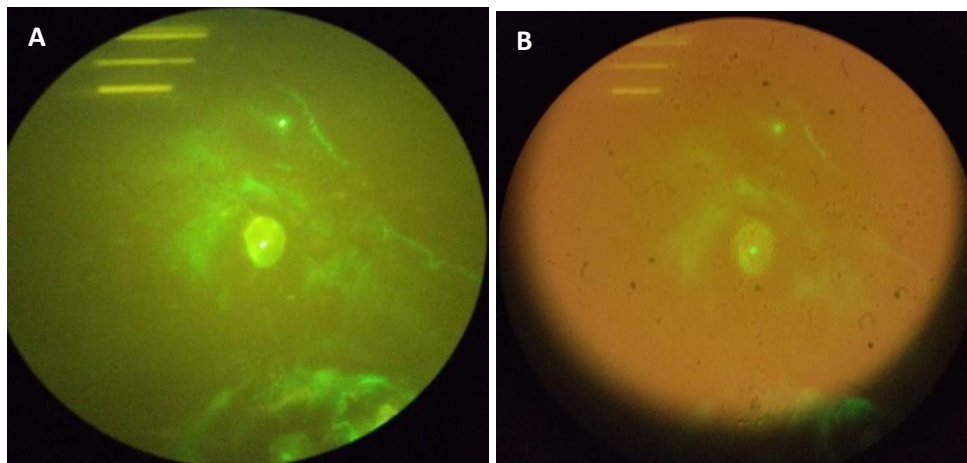


Figura 20 Tratamiento 3a: 5 min de incubación, objetivo de 40x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

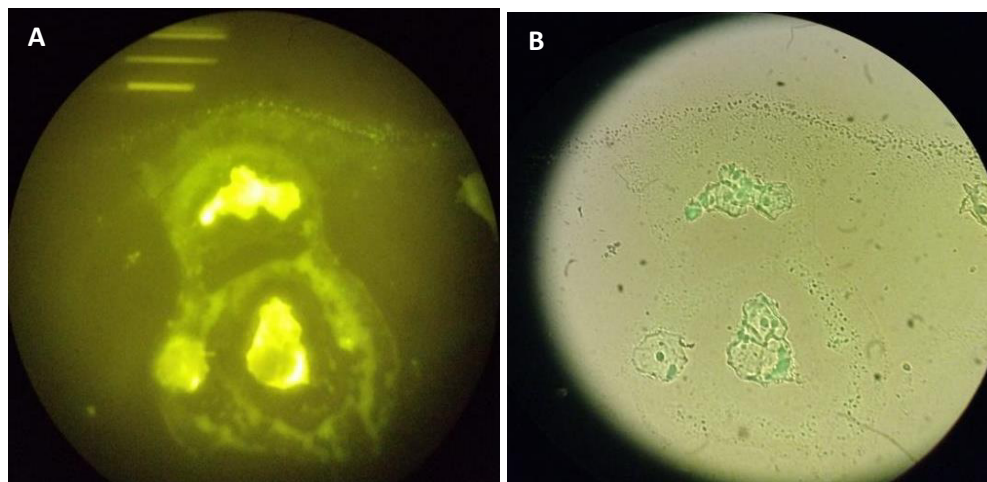


Figura 21 Tratamiento 3b: 30 min de incubación, objetivo de 40x; A. Fluorescencia; B. Campo claro junto con fluorescencia

Como resultado del desarrollo de los distintos tratamientos se tomaron una serie de micrografías plasmadas en las figuras 16-21. Por parte de los resultados del tratamiento 1 (plasmados en las figuras 16-17), podemos observar que hay poca internalización de las nanopartículas a las células. Esto se puede ver muy claramente en la combinación del campo claro junto con la fluorescencia (figuras 16.B y 17.B). En los resultados de este tratamiento se observó una baja densidad de Nps en comparación de resultados obtenidos con los protocolos anteriores.

Posteriormente, en los resultados del tratamiento 2 (plasmados en las figuras 18-19), podemos apreciar ya una afinidad de las Nps a las células. Esto se puede sospechar viendo la figura 19, donde el brillo ya no parece provenir solo de alrededor de la célula sino también sobre ella. De manera similar en ambas imágenes podemos ver que las nanopartículas se encuentran a su vez en un

precipitado alrededor de las células. Anteriormente se preparó la solución de BSA, pero utilizando como matriz el metanol, encontrando que la BSA no era soluble en esta matriz. La aparición de un precipitado en los resultados del segundo tratamiento, así como el antecedente de la solución de BSA previamente preparada, aportan evidencia de que sea BSA precipitado y el hecho de la presencia de fluorescencia nos confirma el hecho de que las nanopartículas se relacionan en primera estancia con BSA. Este precipitado es más evidente en la figura 18, donde se puede observar en el centro una célula rodeada de una gran cantidad de precipitado. No obstante, estos resultados difieren en gran medida con los resultados obtenidos en los puntos 8.4 y 8.5 del presente trabajo donde se podía apreciar el fondo con una gran cantidad de Nps, mientras estas no presentaban ninguna interacción con las células epiteliales mientras que en los resultados de la figura 19 podemos observar una interacción de las Nps con las células, puesto que se puede apreciar una célula en el centro de la imagen con Nps en ella.

Finalmente, las figuras 20-21 muestran los resultados del tratamiento 3, apreciando principalmente en la figura 20 una buena internalización de las Nps. La imagen permite la visualización del núcleo celular, lo cual es un indicativo de que las Nps no se encuentran alrededor de la célula sino dentro de ella. En la figura 21 se puede observar una muy alta concentración de nanopartículas, a tal punto de que no se llega a apreciar el núcleo de las células como en el caso del tratamiento de 5 minutos. Por lo que se sospecha que para el protocolo de internalización el manejo de tiempos cortos de incubación favorece la visualización celular. Por último, cabe resaltar la disminución del precipitado que se llegó a observar con el tratamiento con solo metanol. En el trabajo realizado por Sanjayan et ál. (2021) se comenta que BSA reacciona con el grupo carboxilo a partir de un grupo amino. La hipótesis es que la interacción del grupo carboxilo del ácido orgánico con un grupo amino de la BSA disminuye el efecto sobre el metanol, provocando una disminución del precipitado.

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos se repitió el procedimiento anterior utilizando como base la mezcla de metanol: ácido orgánico pH=3 en una proporción 3:1, así como un tiempo de incubación de 15 min. Los resultados se plasman en la figura 22 a continuación.

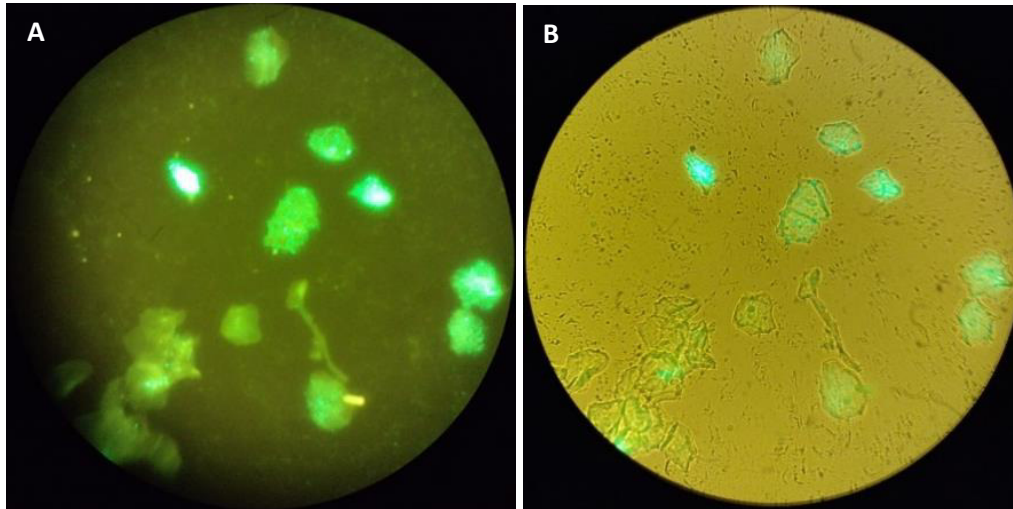


Figura 22 Repetición de protocolo; Nps de CsPbBr₃ en células exfoliadas de la mucosa oral objetivo de 40 x; A. Fluorescencia filtro 3; B. Campo claro junto con fluorescencia

La figura 22, obtenida de la repetición del protocolo, se corrobora los resultados anteriormente observados, donde se puede apreciar una disminución de la emisión de las Nps en el fondo de la imagen. Al contrario de los protocolos iniciales del presente trabajo, ya se puede apreciar la emisión de las Nps provenientes de las células. Por otro lado, la repetición del protocolo resalta la importancia que tiene el medio ácido junto con BSA para la internalización de Nps de CsPbBr₃ en células exfoliadas de la mucosa oral.

Con la presente metodología podemos resaltar dos observaciones importantes, la primera de ellas es que la BSA logra mejorar la internalización de Nps a células exfoliadas de la mucosa oral y la segunda, que el medio ácido posee un efecto significativo en la obtención de resultados.

La BSA posee una estructura que puede ser fácilmente alterada cambiando el pH del medio. La estructura normal o nativa de la proteína es conocida como forma N y se muestra a pH neutro. La forma B es la forma básica de la proteína, la cual se observa a pH por encima de 8; se le denomina como forma F a la estructura de la proteína que poseen una migración rápida (fast migration), la cual se manifiesta en pH menor a 4.3. La forma E es la forma desnaturizada de la proteína, la cual se puede observar a pH menor a 2.7 y finalmente la forma A es producida a un pH superior a 10 (Ahmad et ál., 2004; Cao et ál., 2013; Carter y Ho, 1994; Sogami et ál., 2002). El pH del medio medido durante el desarrollo de las pruebas con BSA se encontró entre un valor de 3-4, lo cual correspondería al rango de pH de la forma F de la proteína. Ha sido reportado con anterioridad que valores de pH menores a 3.5 se da una transición entre la forma F y la forma E de la proteína, es decir que a valores bajos de pH la proteína se desnaturiza produciendo cambios

conformacionales en la estructura terciaria y secundaria de la proteína (Cao et ál., 2013; Jr, 1995).

Basándonos en los resultados obtenidos en el trabajo de Cao et ál. (2013), parece indicar que el enlace entre Nps y la BSA se da de manera más sencilla cuando la estructura de la proteína se encuentra desnaturalizada. Esto indica que el pH del medio es entonces un factor importante para que la BSA se enlace junto con las Nps de CsPbBr₃.

No obstante, el mecanismo mediante el cual la BSA logra ingresar dentro de las células, así como su afinidad a componentes dentro de las mismas se desconoce hasta el momento.

Por otro lado, los resultados obtenidos ponen en evidencia la posibilidad de usar las Nps de CsPbBr₃ como posibles marcadores fluorescentes para las células exfoliadas de la mucosa oral con la obtención de buenas imágenes por medio del microscopio de fluorescencia. Esto puede favorecer el diagnóstico de fenómenos citotóxicos en este tipo de tejido o inclusive abrir la posibilidad de utilizar estos materiales en otros linajes celulares en la búsqueda de aplicaciones biomédicas para las Nps de CsPbBr₃. No obstante, aún es necesario realizar más investigaciones con respecto a esta aplicación, puesto que aún falta por evaluar factores como el grado de internalización, la intensidad de PL obtenida, el tiempo de vida media, la estabilidad en medio acuoso, entre otros aspectos importantes. Estos factores son indispensables para poder aplicar estas Nps como marcadores fluorescentes con una posible aplicación diagnóstica. Sin embargo, los resultados obtenidos en este proyecto son prometedores con respecto al uso de estos materiales como marcadores fluorescentes con posible mejora de procedimientos de diagnóstico de enfermedades.

9. CONCLUSIÓN

En este proyecto se evaluó si las Nps de CsPbBr₃ podían internalizarse en células exfoliadas de la mucosa oral, encontrando que, por la naturaleza no polar del hexano, las Nps, por sí mismas, no se internalizaron en las células, observándose aglomeraciones de Nps alrededor y sobre las mismas células. No obstante, haciendo uso de la albúmina de suero bovino (BSA), como ligando y en un medio ácido (pH=3) se pudo apreciar una buena internalización de las Nps a las células abriendo la posibilidad de usar estos materiales como marcadores fluorescentes que pudieran ser utilizadas para aplicación diagnóstica, debido a que las nanopartículas ofrecen ventajas ante marcadores convencionales como el DAPI o el bromuro de etidio. Esta nueva metodología cumple con las características de ser sencilla y económica, así mismo, permitirá ampliar las investigaciones en torno a las perovskitas de halogenuros metálicos y ampliar la búsqueda de utilizar estos materiales con buenas propiedades ópticas y físicas en aplicaciones biomédicas.

10. REFERENCIAS

- Aguilar Saldivar, J.B. (2023). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PUNTOS CUÁNTICOS DE PEROVSKITA CsPbBr₃ y CsPbI₃ POR INYECCIÓN COLOIDAL, SIN ATMÓSFERA CONTROLADA. [Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]
- Ahmad, B., Kamal, M. Z., & Khan, R. H. (2004). Alkali-Induced Conformational Transition in Different Domains of Bovine Serum Albumin. *Protein and Peptide Letters*, 11(4), 307-315. <https://doi.org/10.2174/0929866043406887>
- Astefanei, A., Núñez, O., & Galceran, M. T. (2015). Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 882, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
- Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., & Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8), 1185-1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>
- Audesirk, T., Audesirk, G. & Byers, B.E. (2013). Biología. La vida en la Tierra. Con fisiología. Novena edición. Pearson Educación de México, S.A de C.V. ISBN: 978-607-32-1526-8
- Barroso, M. M. (2011). Quantum Dots in Cell Biology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(3), 237-251. <https://doi.org/10.1369/0022155411398487>
- Bera, D., Qian, L., Tseng, T.-K., & Holloway, P. H. (2010). Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ma3042260>

- Cao, X.-L., Li, H.-W., Yue, Y., & Wu, Y. (2013). pH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission. *Vibrational Spectroscopy*, *65*, 186-192.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2013.01.004>
- Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. En C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, & D. S. Eisenberg (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 45, pp. 153-203). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60640-3)
- Ceja-Fdez, A., Carriles, R., González-Yebra, A. L., Vivero-Escoto, J., de la Rosa, E., & López-Luke, T. (2021). Imaging and SERS Study of the Au Nanoparticles Interaction with HPV and Carcinogenic Cervical Tissues. *Molecules*, *26*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/molecules26123758>
- Cepeda-Pérez, E., López-Luke, T., Plascencia-Villa, G., Perez-Mayen, L., Ceja-Fdez, A., Ponce, A., Vivero-Escoto, J., & de la Rosa, E. (2016). SERS and integrative imaging upon internalization of quantum dots into human oral epithelial cells. *Journal of Biophotonics*, *9*(7), 683-693.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201600034>
- Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., & Nie, S. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(1), 40-46.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00282-3)
- Chen, L., Tang, F., Wang, Y., Gao, S., Cao, W., Cai, J., & Chen, L. (2015). Facile preparation of organometallic perovskite films and high-efficiency solar cells

using solid-state chemistry. *Nano Research*, 8(1), 263-270.

<https://doi.org/10.1007/s12274-014-0662-1>

DehghanNezhad, M., Jalayer Naderi, N., & Semyari, H. (2020). Micronucleus Assay of Buccal Mucosa Cells in Waterpipe (Hookah) Smokers: A Cytologic Study. *Iranian Journal of Pathology*, 15(2), 75-80.

<https://doi.org/10.30699/ijp.2020.101701.2010>

Dou, Y., Wang, S., Zhang, C., Luo, H., Li, X., Wang, H., Cao, F., Shen, P., Zhang, J., & Yang, X. (2020). Ten-Gram-Scale Synthesis of FAPbX₃ Perovskite Nanocrystals by a High-Power Room-Temperature Ultrasonic-Assisted Strategy and Their Electroluminescence. *Advanced Materials Technologies*, 5(4), 1901089. <https://doi.org/10.1002/admt.201901089>

Espitia-Pérez, L., da Silva, J., Brango, H., Espitia-Pérez, P., Pastor-Sierra, K., Salcedo-Arteaga, S., de Souza, C. T., Dias, J. F., Hoyos-Giraldo, L. S., Gómez-Pérez, M., Salcedo-Restrepo, D., & Henriques, J. A. P. (2018). Genetic damage in environmentally exposed populations to open-pit coal mining residues: Analysis of buccal micronucleus cytome (BMN-cyt) assay and alkaline, Endo III and FPG high-throughput comet assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836(Pt B), 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.002>

Faheem, M. B., Khan, B., Feng, C., Farooq, M. U., Raziq, F., Xiao, Y., & Li, Y. (2020). All-Inorganic Perovskite Solar Cells: Energetics, Key Challenges, and Strategies toward Commercialization. *ACS Energy Letters*, 5(1), 290-320. <https://doi.org/10.1021/acseenergylett.9b02338>

Food and Drug Administration. (2014). Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Guidance for Industry. Consultado el 08 de Noviembre del 2023. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>

Gao, X., & Nie, S. (2003). Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 371-373. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00209-9)

Gartner, L. P. (1994). Oral anatomy and tissue types. *Seminars in Dermatology*, 13(2), 68-73.

Getachew, G., Huang, W.-W., Chou, T.-H., Rasal, A. S., & Chang, J.-Y. (2022). Brightly luminescent (NH₄)_xCs_{1-x}PbBr₃ quantum dots for in vitro imaging and efficient photothermal ablation therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 605, 500-512. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.07.116>

Goryacheva, O. A., Beloglazova, N. V., Goryacheva, I. Y., & De Saeger, S. (2021). Homogenous FRET-based fluorescent immunoassay for deoxynivalenol detection by controlling the distance of donor-acceptor couple. *Talanta*, 225, 121973. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121973>

Groeger, S., & Meyle, J. (2019). Oral Mucosal Epithelial Cells. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00208>

Ha, S. T., Liu, X., Zhang, Q., Giovanni, D., Sum, T. C., & Xiong, Q. (2014). Synthesis of Organic–Inorganic Lead Halide Perovskite Nanoplatelets:

Towards High-Performance Perovskite Solar Cells and Optoelectronic Devices. *Advanced Optical Materials*, 2(9), 838-844.

<https://doi.org/10.1002/adom.201400106>

Hakimi, F., Khoshkam, M., Sadighian, S., & Ramazani, A. (2022). A facile and high-sensitive bio-sensing of the V617F mutation in JAK2 gene by GSH-CdTe-QDs FRET-based sensor. *Heliyon*, 8(12), e12545.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12545>

Han, Q., Wu, W., Liu, W., & Yang, Y. (2017). The peak shift and evolution of upconversion luminescence from CsPbBr₃ nanocrystals under femtosecond laser excitation. *RSC Advances*, 7(57), 35757-35764.

<https://doi.org/10.1039/C7RA06211G>

Huang, S., Xiao, Q., He, Z. K., Liu, Y., Tinnefeld, P., Su, X. R., & Peng, X. N. (2008). A high sensitive and specific QDs FRET bioprobe for MNase. *Chemical Communications*, 45, 5990-5992.

<https://doi.org/10.1039/B815061C>

Ibrahim, K. S. (2013). Carbon nanotubes-properties and applications: A review. *Carbon Letters*, 14(3), 131-144. <https://doi.org/10.5714/CL.2013.14.3.131>

Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363(6430), Article 6430. <https://doi.org/10.1038/363603a0>

Imani, M., Mohajeri, N., Rastegar, M., & Zarghami, N. (2021). Recent advances in FRET-Based biosensors for biomedical applications. *Analytical Biochemistry*, 630, 114323. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114323>

Interpretation and implications of the European Commission's definition on nanomaterials 601358001. (s. f.). Recuperado 19 de marzo de 2023, de <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/601358001.html>

Instituto Nacional del Cáncer. (2011). Definición de nanómetro. Consultado el 8 de Noviembre del 2023.

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/nanometro>

ISO. (2023). ISO 80004-1:2023. Nanotechnologies-Vocabulary. Part 1: Core Vocabulary. Consultado el 8 de Noviembre del 2023.

<https://www.iso.org/standard/79525.html>

Jahanban-Esfahlan, A., & Panahi-Azar, V. (2016). Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. *Food Chemistry*, 202, 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.026>

Jana, A., Mittal, M., Singla, A., & Sapra, S. (2017). Solvent-free, mechanochemical syntheses of bulk trihalide perovskites and their nanoparticles. *Chemical Communications*, 53(21), 3046-3049. <https://doi.org/10.1039/C7CC00666G>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050-1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jiang, Q., Zeng, X., Wang, N., Xiao, Z., Guo, Z., & Lu, J. (2018). Electrochemical Lithium Doping Induced Property Changes In Halide Perovskite CsPbBr₃

Crystal. *ACS Energy Letters*, 3(1), 264-269.

<https://doi.org/10.1021/acsenerylett.7b01230>

Jiang, X., Zeng, H., Duan, C., Hu, Q., Wu, Q., Yu, Y., & Yang, X. (2022). One-pot synthesis of stable and functional hydrophilic CsPbBr₃ perovskite quantum dots for “turn-on” fluorescence detection of Mycobacterium tuberculosis.

Dalton Transactions, 51(9), 3581-3589.

<https://doi.org/10.1039/D1DT03624F>

Jovin, T. M. (2003). Quantum dots finally come of age. *Nature Biotechnology*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nbt0103-32>

Jr, T. P. (1995). *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press.

Kailasa, S. K., Vajubhai, G. N., Koduru, J. R., Park, T. J., & Hussain, C. M. (2021).

Recent progress on the modifications of ultra-small perovskite

nanomaterials for sensing applications. *TrAC Trends in Analytical*

Chemistry, 144, 116432. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116432>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), Article 7.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Kovalenko, M. V., & Bodnarchuk, M. I. (2017). Lead halide perovskite nanocrystals:

From discovery to self-assembly and applications. *Chimia*, 71(7-8), Article 7-

8. <https://doi.org/10.2533/chimia.2017.461>

Kumar, P., Patel, M., Park, C., Han, H., Jeong, B., Kang, H., Patel, R., Koh, W.-G., & Park, C. (2020). Highly luminescent biocompatible CsPbBr₃@SiO₂ core-

- shell nanoprobe for bioimaging and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(45), 10337-10345. <https://doi.org/10.1039/D0TB01833C>
- Kurawattimath, V., Wilson, B., & Geetha, K. M. (2023). Nanoparticle-based drug delivery across the blood-brain barrier for treating malignant brain glioma. *OpenNano*, 10, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100128>
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>
- Lee, S. M., Jung, H., Park, W. I., Lee, Y., Koo, E., & Bang, J. (2018). Preparation of Water-Soluble CsPbBr₃ Perovskite Quantum Dot Nanocomposites via Encapsulation into Amphiphilic Copolymers. *ChemistrySelect*, 3(40), 11320-11325. <https://doi.org/10.1002/slct.201802237>
- Lee, S. F., & Osborne, M. A. (2009). Brightening, blinking, bluing and bleaching in the life of a quantum dot: friend or foe?. *ChemPhysChem*, 10(13), 2174-2191. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900200>
- Li, X., Liu, W., Song, Y., Long, H., Wang, K., Wang, B., & Lu, P. (2020). Two-photon-pumped high-quality, single-mode vertical cavity lasing based on perovskite monocrystalline films. *Nano Energy*, 68, 104334. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2019.104334>
- Li, X., Rui, M., Song, J., Shen, Z., & Zeng, H. (2015). Carbon and Graphene Quantum Dots for Optoelectronic and Energy Devices: A Review. *Advanced*

Functional Materials, 25(31), 4929-4947.

<https://doi.org/10.1002/adfm.201501250>

Li, X., Wu, Y., Zhang, S., Cai, B., Gu, Y., Song, J., & Zeng, H. (2016). CsPbX₃ Quantum Dots for Lighting and Displays: Room-Temperature Synthesis, Photoluminescence Superiorities, Underlying Origins and White Light-Emitting Diodes. *Advanced Functional Materials*, 26(15), 2435-2445.

<https://doi.org/10.1002/adfm.201600109>

Li, Y.-W., Chen, Z.-G., Wang, J.-C., & Zhang, Z.-M. (2015). Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging for focal hepatic lesions: Systematic review and meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 21(14), 4334-4344. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4334>

Lichtman, J. W., & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>

Liu, Y., Gao, Z., Zhang, W., Sun, X., Wang, Z., Wang, X., Xu, B., & Meng, X. (2019). Stimulated emission from CsPbBr₃ quantum dot nanoglass. *Optical Materials Express*, 9(8), 3390-3405. <https://doi.org/10.1364/OME.9.003390>

López-Saavedra, A., Fabian-Morales, E., & Herrera, L. (2019). *Técnicas de microscopía avanzada*. XLI, 61-72.

Luo, C., Yan, C., Li, W., Chun, F., Xie, M., Zhu, Z., Gao, Y., Guo, B., & Yang, W. (2020). Ultrafast Thermodynamic Control for Stable and Efficient Mixed Halide Perovskite Nanocrystals. *Advanced Functional Materials*, 30(19), 2000026. <https://doi.org/10.1002/adfm.202000026>

Lv, L., Xu, Y., Fang, H., Luo, W., Xu, F., Liu, L., Wang, B., Zhang, X., Yang, D., Hu, W., & Dong, A. (2016). Generalized colloidal synthesis of high-quality, two-

dimensional cesium lead halide perovskite nanosheets and their applications in photodetectors. *Nanoscale*, 8(28), 13589-13596.

<https://doi.org/10.1039/C6NR03428D>

Lv, Y., Liang, Q., Li, Y., Liu, X., Zhang, D., & Li, X. (2022). Study of the binding mechanism between hydroxytyrosol and bovine serum albumin using multispectral and molecular docking. *Food Hydrocolloids*, 122, 107072.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107072>

Ma, X., Yang, W., Ge, X., Wang, C., Wei, M., Yang, L., Yang, N., Li, R., & Liu, W. (2021). Design a novel multifunctional (CsPbBr₃/Fe₃O₄)@MPSs@SiO₂ magneto-optical microspheres for capturing circulating tumor cells. *Applied Surface Science*, 551, 149427.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149427>

Minh, D. N., Kim, J., Hyon, J., Sim, J. H., Sowlih, H. H., Seo, C., Nam, J., Eom, S., Suk, S., Lee, S., Kim, E., & Kang, Y. (2017). Room-Temperature Synthesis of Widely Tunable Formamidinium Lead Halide Perovskite Nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 29(13), 5713-5719.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b01705>

Mir, W. J., Jagadeeswararao, M., Das, S., & Nag, A. (2017). Colloidal Mn-Doped Cesium Lead Halide Perovskite Nanoplatelets. *ACS Energy Letters*, 2(3), 537-543. <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.6b00741>

Mo, Q., Shi, T., Cai, W., Zhao, S., Yan, D., Du, J., & Zang, Z. (2020). Room temperature synthesis of stable silica-coated CsPbBr₃ quantum dots for amplified spontaneous emission. *Photonics Research*, 8(10), 1605-1612.

<https://doi.org/10.1364/PRJ.399845>

- Montoto, S. S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, undefined-undefined. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>
- Mosavat, F., Mahdavi, N., & Safari, S. (2022). Cytotoxicity, genotoxicity, and immunohistochemical expression of p53 in the oral mucosal epithelium of adults following cone-beam computed tomography. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 879-880, 503496. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503496>
- Nair, G. B., Tamboli, S., Kroon, R. E., Dhoble, S. J., & Swart, H. C. (2022). Facile room-temperature colloidal synthesis of CsPbBr₃ perovskite nanocrystals by the Emulsion-based ligand-assisted reprecipitation approach: Tuning the color-emission by the demulsification process. *Journal of Alloys and Compounds*, 928, 167249. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2022.167249>
- Odio, A., Batista Duharte, A., Carnesoltas, D., García, L., Loaces, E., Almarales, D., Mora, Y., & Cabrera, L. (2004). Efectos citogenéticos por exposición ocupacional a citostáticos. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 42, 487-492.
- Pan, Q., Hu, H., Zou, Y., Chen, M., Wu, L., Yang, D., Yuan, X., Fan, J., Sun, B., & Zhang, Q. (2017). Microwave-assisted synthesis of high-quality “all-inorganic” CsPbX₃ (X = Cl, Br, I) perovskite nanocrystals and their application in light emitting diodes. *Journal of Materials Chemistry C*, 5(42), 10947-10954. <https://doi.org/10.1039/C7TC03774K>

- Park, J. H., Lee, A., Yu, J. C., Nam, Y. S., Choi, Y., Park, J., & Song, M. H. (2019). Surface Ligand Engineering for Efficient Perovskite Nanocrystal-Based Light-Emitting Diodes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(8), 8428-8435. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b20808>
- Prochowicz, D., Franckevičius, M., Cieślak, A. M., Zakeeruddin, S. M., Grätzel, M., & Lewiński, J. (2015). Mechanosynthesis of the hybrid perovskite CH₃NH₃PbI₃: Characterization and the corresponding solar cell efficiency. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(41), 20772-20777. <https://doi.org/10.1039/C5TA04904K>
- Protesescu, L., Yakunin, S., Bodnarchuk, M. I., Bertolotti, F., Masciocchi, N., Guagliardi, A., & Kovalenko, M. V. (2016). Monodisperse Formamidinium Lead Bromide Nanocrystals with Bright and Stable Green Photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 138(43), 14202-14205. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b08900>
- Protesescu, L., Yakunin, S., Bodnarchuk, M. I., Krieg, F., Caputo, R., Hendon, C. H., Yang, R. X., Walsh, A., & Kovalenko, M. V. (2015). Nanocrystals of Cesium Lead Halide Perovskites (CsPbX₃, X = Cl, Br, and I): Novel Optoelectronic Materials Showing Bright Emission with Wide Color Gamut. *Nano Letters*, 15(6), 3692-3696. <https://doi.org/10.1021/nl5048779>
- Ramasamy, P., Lim, D.-H., Kim, B., Lee, S.-H., Lee, M.-S., & Lee, J.-S. (2016). All-inorganic cesium lead halide perovskite nanocrystals for photodetector applications. *Chemical Communications*, 52(10), 2067-2070. <https://doi.org/10.1039/C5CC08643D>

- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887-913. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Rawat, M. K., Jain, A., & Singh, S. (2011). Studies on Binary Lipid Matrix Based Solid Lipid Nanoparticles of Repaglinide: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2366-2378. <https://doi.org/10.1002/jps.22435>
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>
- Rosenblum, D., Gutkin, A., Kedmi, R., Ramishetti, S., Veiga, N., Jacobi, A. M., Schubert, M. S., Friedmann-Morvinski, D., Cohen, Z. R., Behlke, M. A., Lieberman, J., & Peer, D. (2020). CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Science Advances*, 6(47), Article 47. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9450>
- Sanjayan, C. G., Jyothi, M. S., Sakar, M., & Balakrishna, R. G. (2021). Multidentate ligand approach for conjugation of perovskite quantum dots to biomolecules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 603, 758-770. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.06.088>
- Selopal, G. S., Zhao, H., Wang, Z. M., & Rosei, F. (2020). Core/Shell Quantum Dots Solar Cells. *Advanced Functional Materials*, 30(13), 1908762. <https://doi.org/10.1002/adfm.201908762>
- Shu, Y., Wang, Y., Guan, J., Ji, Z., Xu, Q., & Hu, X. (2022). Amphiphilic Polymer Ligand-Assisted Synthesis of Highly Luminescent and Stable Perovskite

- Nanocrystals for Sweat Fluorescent Sensing. *Analytical Chemistry*, 94(13), 5415-5424. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00235>
- Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., Taylor, J., & Nino, J. C. (2006). Processing and Structure Relationships in Electrospinning of Ceramic Fiber Systems. *Journal of the American Ceramic Society*, 89(2), 395-407. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2005.00807.x>
- Sogami, M., Petersen, H. A., & Foster, J. F. (2002, mayo 1). *Microheterogeneity of plasma albumins. V. Permutations in disulfide pairings as a probable source of microheterogeneity in bovine albumin* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bi00829a008>
- Soheyli, E., Ghaemi, B., Sahraei, R., Sabzevari, Z., Kharrazi, S., & Amani, A. (2020). Colloidal synthesis of tunably luminescent AgInS-based/ZnS core/shell quantum dots as biocompatible nano-probe for high-contrast fluorescence bioimaging. *Materials Science and Engineering: C*, 111, 110807. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110807>
- Song, W., Wang, Y., Wang, B., Yao, Y., Wang, W., Wu, J., Shen, Q., Luo, W., & Zou, Z. (2020). Super stable CsPbBr₃@SiO₂ tumor imaging reagent by stress-response encapsulation. *Nano Research*, 13(3), 795-801. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2697-9>
- Suh, Y.-H., Kim, T., Choi, J. W., Lee, C.-L., & Park, J. (2018). High-Performance CsPbX₃ Perovskite Quantum-Dot Light-Emitting Devices via Solid-State Ligand Exchange. *ACS Applied Nano Materials*, 1(2), 488-496. <https://doi.org/10.1021/acsanm.7b00212>

- Suhail, A., Kumar, J., Teron, G., & Bag, M. (2022). Improving stability and photoluminescence of CsPbBr₃ quantum dots/CMC polymer composite for optoelectronics application. *Optical Materials*, 134, 113200.
<https://doi.org/10.1016/j.optmat.2022.113200>
- Sun, S., Murray, C. B., Weller, D., Folks, L., & Moser, A. (2000). Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *Science*, 287(5460), 1989-1992.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1989>
- Swarnkar, A., Chulliyil, R., Ravi, V. K., Irfanullah, M., Chowdhury, A., & Nag, A. (2015). Colloidal CsPbBr₃ Perovskite Nanocrystals: Luminescence beyond Traditional Quantum Dots. *Angewandte Chemie*, 127(51), 15644-15648.
<https://doi.org/10.1002/ange.201508276>
- Talianov, P. M., Peltek, O. O., Masharin, M., Khubezhov, S., Baranov, M. A., Drabavičius, A., Timin, A. S., Zelenkov, L. E., Pushkarev, A. P., Makarov, S. V., & Zyuzin, M. V. (2021). Halide Perovskite Nanocrystals with Enhanced Water Stability for Upconversion Imaging in a Living Cell. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(37), 8991-8998.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.1c01968>
- Tayeh, N., Rungassamy, T., & Albani, J. R. (2009). Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(2), 107-116.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.015>
- Thakor, A. S., Jokerst, J. V., Ghanouni, P., Campbell, J. L., Mittra, E., & Gambhir, S. S. (2016). Clinically Approved Nanoparticle Imaging Agents. *Journal of*

Nuclear Medicine, 57(12), Article 12.

<https://doi.org/10.2967/jnumed.116.181362>

Thomas, S. C., Harshita, Mishra, P. K., & Talegaonkar, S. (s. f.). Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 21(42), 6165-6188.

Tolbert, P. E., Shy, C. M., & Allen, J. W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 69-77.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-I](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-I)

UniProt. (s.f.). ALB - Albumin - Bos taurus (Bovine). P02769 · ALBU_BOVIN.
Consultado el 8 de Noviembre del 2023.
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02769/entry>

Vilaça, N., Bertão, A. R., Prasetyanto, E. A., Granja, S., Costa, M., Fernandes, R., Figueiredo, F., Fonseca, A. M., De Cola, L., Baltazar, F., & Neves, I. C. (2021). Surface functionalization of zeolite-based drug delivery systems enhances their antitumoral activity in vivo. *Materials Science and Engineering: C*, 120, 111721. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111721>

Wallrabe, H. & Periasamy, A. (2005). Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1), 19-27.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.12.002>

Wu, Y., Liu, L., Wang, W., Zhang, W., Yu, H., Qian, J., Chen, Y., Shen, W., Sui, S., Deng, Z., Chen, S., & Huang, W. (2020). Enhanced stability and performance of light-emitting diodes based on in situ fabricated FAPbBr₃

nanocrystals via ligand compensation with n-octylphosphonic acid. *Journal of Materials Chemistry C*, 8(29), 9936-9944.

<https://doi.org/10.1039/D0TC01694B>

Xia, H.-R., Sun, W.-T., & Peng, L.-M. (2015). Hydrothermal synthesis of organometal halide perovskites for Li-ion batteries. *Chemical Communications*, 51(72), 13787-13790.

<https://doi.org/10.1039/C5CC05053G>

Xing, J., Liu, X. F., Zhang, Q., Ha, S. T., Yuan, Y. W., Shen, C., Sum, T. C., & Xiong, Q. (2015). Vapor Phase Synthesis of Organometal Halide Perovskite Nanowires for Tunable Room-Temperature Nanolasers. *Nano Letters*, 15(7), 4571-4577. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01166>

Xu, L., Li, J., Fang, T., Zhao, Y., Yuan, S., Dong, Y., & Song, J. (2019). Synthesis of stable and phase-adjustable CsPbBr₃@Cs₄PbBr₆ nanocrystals via novel anion–cation reactions. *Nanoscale Advances*, 1(3), 980-988.

<https://doi.org/10.1039/C8NA00291F>

Yang, X., Yang, H., Hu, X., Li, W., Fang, Z., Zhang, K., Huang, R., Li, J., Yang, Z., & Song, Y. (2020). Low-temperature interfacial engineering for flexible CsPbI₂Br perovskite solar cells with high performance beyond 15%. *Journal of Materials Chemistry A*, 8(10), 5308-5314.

<https://doi.org/10.1039/C9TA13922B>

Yu, W. W., Chang, E., Drezek, R., & Colvin, V. L. (2006). Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3), 781-786.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.160>

- Zhang, H., Jin, M., Liu, X., Zhang, Y., Yu, Y., Liang, X., Xiang, W., & Wang, T. (2019). The preparation and up-conversion properties of full spectrum CsPbX₃ (X = Cl, Br, I) quantum dot glasses. *Nanoscale*, *11*(39), 18009-18014. <https://doi.org/10.1039/C9NR06509A>
- Zhang, Z., Ren, L., Yan, H., Guo, S., Wang, S., Wang, M., & Jin, K. (2017). Bandgap Narrowing in Bi-Doped CH₃NH₃PbCl₃ Perovskite Single Crystals and Thin Films. *The Journal of Physical Chemistry C*, *121*(32), 17436-17441. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b06248>
- Zhao, Z., Li, Y., Wei, J., Du, Y., Zhang, L., & Lin, F. (2020). Preparation of Ordered MAPbI₃ Perovskite Needle-Like Crystal Films by Electric Field and Microdroplet Jetting 3D Printing. *Crystal Growth & Design*, *20*(3), 1405-1414. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00450>
- Zheng, L., Jiang, K., Li, X., Hong, P., Chen, K., Zhang, H., Song, Y., & Luo, B. (2021). Water-assisted preparation of ethanol-dispersed CsPbBr₃ perovskite nanocrystals and emissive gel. *Journal of Colloid and Interface Science*, *598*, 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.04.017>

ANEXO 1. Bases de UV-VIS

La espectroscopia UV-VIS puede definirse como la técnica espectroscópica que hace uso de longitudes de onda correspondientes a la región UV (10-400 nm) y visible (400-800 nm) del espectro electromagnético. El principio básico de la espectroscopia UV-VIS es el fenómeno de absorción de la luz, de tal manera que la cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra, por consiguiente, si se incrementa la concentración del analito la absorbancia incrementará de manera lineal mientras que la transmisión de la luz disminuye exponencialmente. Este fenómeno se plasma de manera muy clara en la ley de Lambert-Beer la cual describe la relación lineal entre la absorbancia de la luz y la concentración de especies absorbentes en la muestra:

$$A = \alpha lc$$

Donde:

- A= absorbancia
- α = coeficiente de absorción
- l=distancia que la luz atraviesa por el cuerpo
- c= concentración de la sustancia absorbente en el medio

En la región UV-VIS, el grado de absorción de la luz depende de la configuración electrónica de las especies absorbentes como átomos, moléculas iones o complejos. Un nivel energético consiste en varios niveles vibracionales energéticos, mientras que un solo nivel vibracional consiste en varios niveles rotacionales. Cuando un fotón ($h\nu$) interactúa con una molécula puede producir la transición en los niveles energéticos de los electrones si la energía provista por el fotón coincide con la diferencia de estos niveles energéticos. La cantidad de radiación absorbida por el analito se mide y se grafica contra la longitud de onda del espectro electromagnético. De esta manera, un espectro típico de UV-VIS se representa con la longitud de onda contra el grado de absorbancia de la muestra.

La absorción de radiación UV-VIS por una especie absorbente se asocia con la excitación de los electrones de valencia los cuales se encuentran en un estado basal los cuales pasan a un estado de excitación de mayor energía. Después de la absorción de energía, se da una transición electrónica del estado basal (E2) al estado de excitación (E1) que contiene el orbital molecular más alto (este fenómeno se conoce como antibonding).

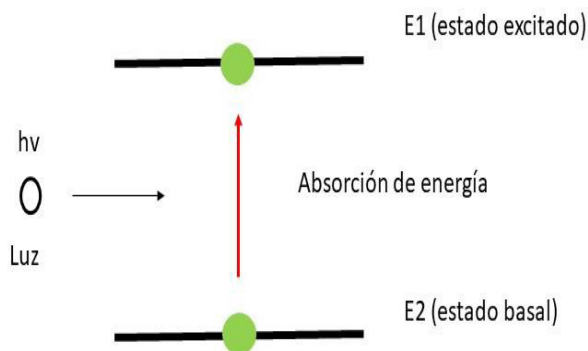


Figura 23 Fenómeno de excitación de un electrón durante el proceso de absorción de la radiación UV-VIS

Elementos del espectrofotómetro UV-VIS

COMPONENTE	DESCRIPCIÓN
FUENTE DE LUZ	Proporciona la suficiente luz en forma de luz policromática para llevar a cabo las mediciones. Usualmente la fuente de luz proporciona luz policromática sobre una amplia región del espectro.
MONOCROMADOR	Dispositivo que recibe la luz policromática en frente de la lámpara y proporciona luz monocromática de salida. Este aparato se utiliza para dispersar las radiaciones de luz policromática según la longitud de onda.
CUBETA	Las cubetas están diseñadas para sostener la muestra para su análisis espectroscópico. Las cubetas están disponibles en plástico, vidrio o de cuarzo de grado óptico que no absorban las longitudes de onda de nuestro interés.
DETECTOR	Dispositivo que mide la cantidad de luz que pasa por la muestra y convierte la luz recibida en señales eléctricas. Para UV-VIS existen tres tipos: celdas fotovoltaicas, fototubos y tubos fotomultiplicadores
UNIDAD DE PROCESAMIENTO	El espectrofotómetro provee la señal al registrador y la intensidad de las señales son amplificadas por el amplificador y elabora la respuesta por la computadora para su interpretación

Referencia

Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). *Essentials of pharmaceutical analysis* (pp. 29-56). Singapore:: Springer.

ANEXO 2. Fundamentos de la microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia, también llamada de epi-fluorescencia, es una técnica ampliamente en el campo de la biología debido a que permite la visualización selectiva de distintos componentes celulares, subcelulares o moleculares, por medio del uso de fluoróforos (moléculas con la capacidad de emitir fluorescencia) lo cual ha permitido el amplio uso de esta microscopía en las áreas de la biología como de las ciencias de la salud con la obtención de imágenes (Lichtman y Conchello, 2005).

La técnica se basa en la epi-fluorescencia de los fluoróforos utilizados y al contrario de la microscopía de luz transmitida donde la luz ilumina la muestra, posteriormente esta luz se transmite a través de nuestra muestra y es detectada del otro lado, en la microscopía de fluorescencia la iluminación y la detección se lleva a cabo del mismo lado del microscopio. En adición, otra diferencia significativa entre la microscopía de fluorescencia y la de luz transmitida es el uso de filtros de excitación, los cuales seleccionaran el rango de longitud de onda necesario para la excitación del fluoróforo de interés. Posteriormente, el filtro dicroico refleja la luz de excitación hacia la muestra. Finalmente, el filtro de emisión deja pasar de forma selectiva la emisión del fluoróforo hacia el ocular para la observación de la muestra (López-Saavedra et ál., 2019).

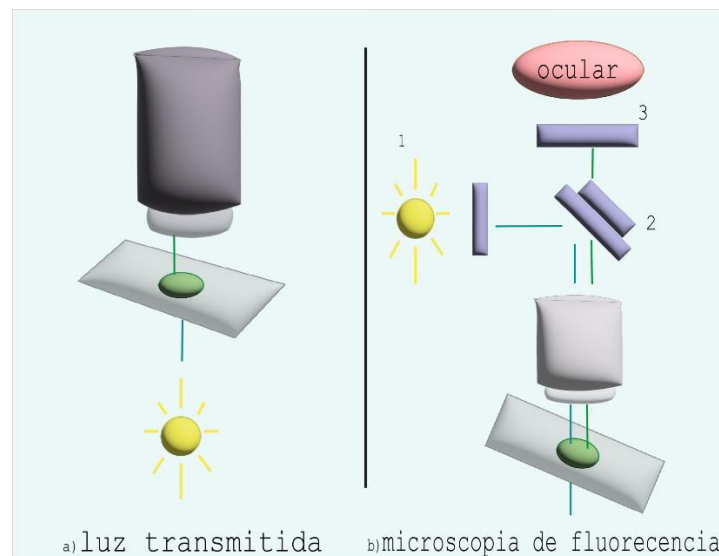


Figura 24 Diferencia entre microscopía de luz transmitida y la microscopía de fluorescencia; A. microscopía de luz transmitida; B. Microscopía de fluorescencia, donde 1 corresponde al filtro de excitación, 2 al filtro dicroico y 3 al filtro de emisión.

Fundamentos de la fluorescencia

Cuando un compuesto fluorescente en estado basal absorbe energía de la luz (fotón) se llevan a cabo alteraciones en los estados electrónicos, vibracionales y rotacionales de la molécula. La energía absorbida puede mover un electrón de un estado basal (S_0) a un orbital de mayor energía (S_2 o S_1) como se puede observar en la figura 25. Esta transición a un estado de excitación también pone en movimiento vibraciones moleculares en las que las distancias internucleares varían con el tiempo. Una vez excitada, la molécula utiliza diferentes caminos para perder la energía perdida y regresar a su estado basal. La conversión interna, es una transición entre los estados electrónicos del orbital (de S_2 a S_1). Estrictamente hablando la conversión interna permite transiciones isoenergéticas por lo que no se pierde energía durante este tipo de transición, no obstante, la energía adicional se elimina a través de la relajación vibracional. En buenos fluoróforos, después de realizar la relajación vibracional se pierde la energía y se regresa al estado basal por medio de la emisión de un fotón cuya energía cubre la brecha entre el estado vibratorio más bajo de S_1 y cualquiera de los estados vibracionales o rotacionales de S_0 . El espectro de emisión de un fluoróforo solo es el rango de longitud de onda que emite el fotón expulsado. La relajación vibracional y la emisión de fluorescencia son las maneras en las que los fluoróforos retornan a su estado basal de baja energía (Lichtman y Conchello, 2005).

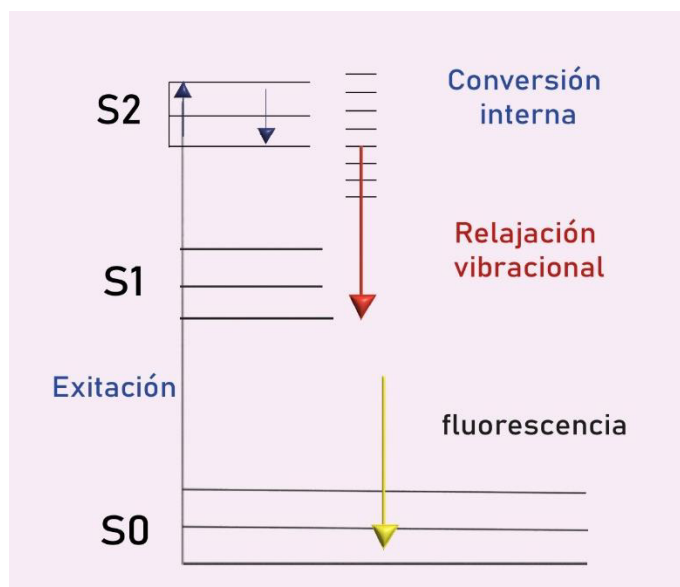


Figura 25 Diagrama de Jablonski del proceso de absorción y emisión donde S_0 se refiere al estado basal de la molécula y representa la energía de la molécula sin excitación de la luz. S_1 y S_2 son estadios de singuletes donde un electrón es impulsado por la excitación de la molécula. S_2 posee más energía que S_1 y a su vez S_1 posee mayor energía que el estado basal S_0

Referencias

Lichtman, J.W. & Conchello, J.A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2, 910-919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>

López-Saavedra, A., Fabian-Morales, E., & Herrera-Montalvo, L. A. (2019). Técnicas de microscopía avanzadall. *Mensaje Bioquímico*, (43), 61-72. <http://tab.facmed.unam.mx>