



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MATERIALES

**1 SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO FUNCIONALIZADO CON MOLÉCULAS
ORGÁNICAS, PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MATERIALES

PRESENTA

LISBETH ALMEIDA RAMÓN

DIRECTOR:

DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS (DAIA-UJAT)

CO-DIRECTOR:

DR. JOSÉ GILBERTO TORRES TORRES (DACB-UJAT)

CUNDUACÁN, TABASCO

24 DE ABRIL DE 2017



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS
Dirección



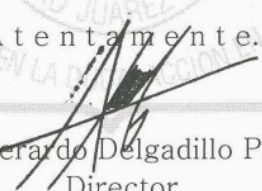
7 de marzo de 2017

Lic. Lisbeth Almeida Ramón
Pasante de la Maestría en Ciencias
con orientación en Materiales
Presente.

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado "Síntesis y evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de nanopartículas de ZnO funcionalizado con moléculas orgánicas, para el tratamiento de cáncer", en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Materiales.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente.


Dr. Gerardo Delgadillo Piñón
Director



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p.- Archivo
Dr'GDP/Dr'JLSC/emt

Miembro CUMEX desde 2008

 **Consorcio de
Universidades
Mexicanas**
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km. 1, Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tabasco
Tel/Fax (914)3360928, (993)3581500 Ext. 6702



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **"SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO FUNCIONALIZADO CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS, PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 24 días del mes de Abril del año 2017.

AUTORIZO

LIC. LISBETH ALMEIDA RAMÓN

Solo una cosa convierte en imposible un sueño:

El miedo a fracasar.

Paulo Coelho

DEDICATORIAS

A mi madre

Por ser un ejemplo de superación,
y el pilar fundamental en todo lo que soy,
en toda mi educación, tanto académica, como de la vida.
A ella, con todo mi cariño, respeto y admiración.

A mi padre

Por tu apoyo incondicional,
nunca dejaste de creer en mí.
A él, con todo mi cariño y respeto.

A mis hermanas

Maricela, Paola, Nayeli, Lucia
Por sus palabras de motivación,
y de ustedes aprendí que sí se puede.
A ellas, con todo cariño y admiración.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis

Por su valioso y acertado asesoramiento en el desarrollo de este trabajo, gracias por toda la motivación que me brindaron en todo momento.

Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus, por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, gracias por sus asesoramiento y apoyo, es una gran persona.

Dr. José Gilberto Torres Torres, por su disposición, asesoría y ayuda.

A la comisión revisora

Dra. Hermicenda Pérez Vidal, Dra. Alejandra Espinosa de los Monteros, Dr. José Miguel Mora Fonz, Dr. Ignacio Cuauhtémoc López, por sus valiosos comentarios y sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al personal del laboratorio de Nanotecnología

Agradezco a todo el personal del laboratorio de Nanotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura de la UJAT en especial a la Dr. Rosendo López González por sus comentarios y facilidades que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros de este laboratorio Melina, Lupita, Jorge, gracias por su apoyo.

Agradezco enormemente a CONACYT por el apoyo 333134 y el proyecto CONACYT CB 183196 para la realización de dicho trabajo de investigación, y a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por las facilidades prestadas.

ÍNDICE

Introducción.....	8
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Justificación.....	11
Capítulo 1 Nanopartículas con Actividad Citotóxica.....	12
1.1 Generalidades del Óxido de Zinc.....	13
1.1.1 Propiedades Físico-Químicas de Óxido de Zinc.....	13
1.1.2 Método Sol-Gel.....	14
1.1.3 Síntesis de ZnO por Sol-Gel.....	15
1.1.4 Efecto del pH en la Síntesis del ZnO.....	17
1.1.5 Óxido de Zinc como Matriz de Soporte.....	19
1.2 Generalidades de los Funcionalizantes.....	21
1.2.1 Propiedades Físico-Químicas de la 1,10-Fenantrolina.....	21
1.2.1.1 Actividad Citotóxica de la 1,10-Fenantrolina.....	22
1.2.2 Propiedades Físicas y Químicas del Ácido Acético.....	23
1.2.2.1 Actividad Citotóxica del Ácido Acético.....	24
1.2.3 Propiedades Físicas y Químicas del Ácido Ascórbico.....	25
1.2.3.1 Actividad Citotóxica del Ácido Ascórbico.....	26
1.3 Nanotecnología para el Tratamiento del Cáncer.....	28
1.3.1 Cáncer Cervico Uterino.....	29
Capítulo 2 Parte Experimental.....	30
2.1 Síntesis de Nanopartículas de ZnO.....	30
2.2 Obtención de Nanopartículas de ZnO Funcionalizadas con 1,10-Fenantrolina, Ácido Acético y Ácido Ascórbico.....	33
2.3 Técnicas de Caracterización de Nanopartículas.....	35
2.3.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible con Reflectancia Difusa.....	35
2.3.2 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	37
2.3.3 Fisisorción de Nitrógeno.....	39
2.3.4 Análisis Termogravimétrico.....	43
2.3.5 Difracción de Rayos X.....	44
2.3.6 Microscopía Electrónica de Barrido.....	45
2.3.7 Dispersión Dinámica de Luz y Potencial Z.....	46

2.4 Métodos de Evaluación de la Actividad Biológica <i>In Vitro</i> con la Técnica XTT	48
2.4.2.1 Cultivo Celular	49
2.4.1 Ensayo de Citotoxicidad	50
2.4.2 Ensayo de Proliferación Celular	50
Capítulo 3 Resultados y Discusiones	51
3.1 Efecto del Solvente y el pH en la Formación de Nanopartículas de ZnO	52
3.1.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible en Reflectancia Difusa	52
3.1.2 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier	54
3.1.3 Propiedades Texturales	60
3.1.4 Difracción de Rayos X	64
3.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido	68
3.2 Efecto de la Funcionalización con Moléculas Orgánicas en la Estructura y Actividad Biológica del ZnO	77
3.2.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible	78
3.2.2 Espectroscopía Infrarrojo con Transformada De Fourier	80
3.2.3 Propiedades Texturales	83
3.2.4 Análisis Termogravimétrico	87
3.2.5 Difracción de Rayos X	89
3.2.6 Dispersión Dinámica de Luz y Potencial Z	91
3.2.5 Estudios de la Actividad Biológica <i>In Vitro</i> de los Materiales de ZnO y ZnO Funcionalizado	94
3.5.1 Análisis de Viabilidad Celular	95
3.5.2 Estudios de la Actividad Antiproliferativa	98
Conclusiones	104
Perspectivas	105
Bibliografía	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina del ZnO tipo wurtzita [17].	13
Figura 2. Estructura química molecular de 1,10-fenantrolina, los átomos de C se muestran en color gris, H en blanco y N en azul [86].	21
Figura 3. Estructura química molecular del ácido acético, los átomos de C, O y H se muestran en color gris, rojo y blanco respectivamente.	23
Figura 4. Estructura química molecular del ácido ascórbico, los átomos de C, O y H se muestran de color gris, rojo y blanco respectivamente.	25
Figura 5. Representación de reflexión especular y difusa.	35
Figura 6. Representación esquemática de los seis tipos de isothermas de adsorción.	40
Figura 7. Tipos de ciclos de histéresis.	41
Figura 8. Sistema para medición de potencial Z.	47
Figura 9. Espectros UV-Vis de sólidos en reflectancia difusa de los materiales de ZnO calcinados a 400°C: a) materiales de ZnO con catalizador, b) material de ZnO sin catalizador (Z).	52
Figura 10. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de materiales de ZnO: 9a) materiales frescos de ZnO sintetizados con catalizador (ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA), la muestra sintetizada sin catalizador (Z) y ZnAcAc. 9b) materiales calcinados a 400°C (ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z).	55
Figura 11. Isothermas de adsorción-desorción tipo IV (clasificación IUPAC) por el método BET de materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z calcinadas a 400°C.	62
Figura 12. Distribución de diámetro de poros por el método BJH de materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z calcinados a 400°C.	63
Figura 13. Difractogramas de materiales secos a 70°C (fresco) ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z, comparando con acetilacetato de zinc hidratado (ZnAcAc).	64
Figura 14. Difractogramas de materiales de ZnO calcinados a 400°C, ZBNa, ZENa, ZEA, ZBA y Z.	66
Figura 15. Micrografías de material Z, comparado con acetilacetato de zinc hidratado: a) MEB del material calcinado a 400°C a 20,000X de magnificación, b) MEB del material seco a 70°C (fresco) a 5,000x de magnificación, c) FESEM de acetilacetato de zinc hidratado a 5000X de magnificación.	69
Figura 16. Micrografía de material ZBNa: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) con 3,500X de magnificación; b) FESEM de material calcinado a 400°C con 50,000X de magnificación.	70

- Figura 17. Micrografía de material ZBA: a) MEB del material seco a 70°C (fresco) con 5,000X de amplificación, b) FESEM del material calcinado a 400°C con 50,000X de amplificación..... 71
- Figura 18. Micrografía de material ZENa: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) con 10,000X de amplificación, b) FESEM de material calcinado a 400°C con 100,000X de amplificación. 72
- Figura 19. Micrografía de material ZEA: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) a 10,000X de magnificación, b) FESEM calcinado a 400°C a 100,000X de magnificación..... 73
- Figura 20. Espectros UV-Vis de materiales sólidos de ZnO: a) materiales ZBA y ZEA calcinados a 400°C, b) 1,10-fenantrolina (FEN) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con FEN, c) L-ácido ascórbico (AS) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con AS, d) solución 0.1 M de ácido acético glacial (AC) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con AC..... 78
- Figura 21. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de materiales de ZnO funcionalizados: 20a) muestra ZEA calcinada a 400°C y funcionalizada con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC); 20b) muestra ZBA calcinada a 400°C y funcionalizada con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC). 80
- Figura 22. Isotermas de adsorción-desorción por el método BET de materiales de ZnO funcionalizados: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); b) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC). 84
- Figura 23. Gráficas de distribución de diámetros de poros de materiales de ZnO funcionalizados: a) y b) material ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); c) y d) material ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC)..... 85
- Figura 24. Termogramas de los materiales de ZnO funcionalizados: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); b) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC). 87
- Figura 25. Difractogramas de ZnO funcionalizado: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC); b) ZBA calcinado a 400°C; c) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC); d) ZEA calcinado a 400°C..... 89
- Figura 26. Tamaño promedio de partículas de ZnO, calculado por dispersión dinámica de luz: a) material ZBA y ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC); b) material ZEA y ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC). 92
- Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular en monocitos, después de 48 horas de tratamiento con las concentraciones de 10, 15 y 20 µg/ml: a) materiales ZEA, ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AS; b) materiales ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AS. 95
- Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular evaluado en monocitos después de 72 horas de tratamiento con 30 µg/mL de: a) material ZEA calcinado a 400°C y funcionalizado (ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AS) y b) ZBA calcinado a 400°C y funcionalizado (ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AS). 96

Figura 29. Porcentaje de proliferación celular después de 72 horas de tratamiento con los materiales ZEA calcinada a 400°C y funcionalizada (ZEA-AC, ZEA-FEN y ZEA-AS), evaluada en tres concentraciones, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$, comparando su efecto con cis-platino a 10 μM , en las líneas tumorales: a) CaSki, b) SiHa y c) HeLa. 98

Figura 30. Porcentaje de proliferación celular después de 72 horas de tratamiento con los materiales ZBA calcinada a 400°C y funcionalizada (ZBA-AC, ZBA-FEN y ZBA-AS), evaluada en tres concentraciones, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$, comparando su efecto con cis-platino a 10 μM , en las líneas tumorales: a) CaSki, b) SiHa y c) HeLa. 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción del precursor de Zn, el solvente y el catalizador empleado en la síntesis de nanopartículas de ZnO a pH 11. 31

Tabla 2. Descripción del solvente utilizado para impregnar los materiales de ZnO calcinados a 400°C. 33

Tabla 3. Descripción del nombre que identifica los materiales de ZnO, de acuerdo al solvente y el catalizador utilizado en la síntesis. 51

Tabla 4. Asignación de las bandas de FT-IR de materiales de ZnO secos a 70°C (fresco) y acetilacetato de zinc hidratado (ZnAcAc). 56

Tabla 5. Asignación de bandas FT-IR de materiales de ZnO calcinados a 400°C. 58

Tabla 6. Parámetros de textura obtenidos por el método BET de los materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z secos a 70°C (frescos) y calcinados a 400°C. 60

Tabla 7. Tamaño de cristalito calculado con la ecuación de Scherrer, con respecto al pico (101), de los materiales ZBNa, ZBA, ZEA, ZENa y Z secados a 70°C (frescos). 65

Tabla 8. Tamaño de cristalito calculado con la ecuación de Scherrer con respecto al pico (101), de materiales ZBNa, ZBA, ZEA, ZENa y Z, calcinados a 400°C. 67

Tabla 9. Morfologías de partículas de ZnO de acuerdo con el solvente y el tratamiento térmico. 74

Tabla 10. Descripción del nombre dado a las muestras ZBA y ZEA funcionalizadas por el método de impregnación. 77

Tabla 11. Asignación de bandas de FT-IR de las muestras ZEA y ZBA funcionalizada con 1,10-fenantrolina, ácido ascórbico, ácido acético. 81

Tabla 12. Parámetros de textura de materiales ZBA y ZEA funcionalizados. 83

Tabla 13. Tamaño de cristalito calculado mediante la ecuación de Scherrer con respecto al pico (101), para los materiales ZBA y ZEA funcionalizados con 1,10-fenantrolina, ácido ascórbico y ácido acético. 90

Tabla 14. Valor de potencial Z de materiales ZBA y ZEA funcionalizados. 91

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AS	Ácido ascórbico
ATCC	American Type Culture Collection
CaCU	Carcinoma cérvico uterino
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
FEN	1,10-fenantrolina
FBS	Fetal Bovine Serum
FT-IR	Fourier Transformer Infrarrojo
PBS	Phosphate buffered saline
VPH	Virus de papiloma humano
ZnO	Óxido de zinc

INTRODUCCIÓN

El uso de la nanotecnología en aplicaciones médicas ha crecido rápidamente principalmente en lo que se refiere a la liberación controlada de fármacos y en la terapia de diversas enfermedades [1]. En la mayoría de estas aplicaciones se han empleado materiales orgánicos como liposomas y polímeros biodegradables por que han resultado no ser nocivos para el cuerpo humano [2]. En el sentido opuesto, la aplicación de materiales inorgánicos en medicina (nanotubos de carbono, metales, y nanopartículas de óxidos metálicos) se había limitado por su “probables” propiedades nocivas para el cuerpo humano. Sin embargo, a partir del momento en que fueron reportados estudios de citotoxicidad que demostraron la biocompatibilidad de los nanotubos de carbono y de nanopartículas de óxidos metálicos, estos han ganado interés para su aplicación en los diversos campos de la medicina [3]. Resultando incluso con mayores ventajas sobre los nanomateriales orgánicos en lo que se refiere al control de su tamaño, estructura y funcionalización de su superficie para que atraviesen la membrana celular sin problema.

El cáncer es una enfermedad que actualmente es causante de muchas muertes a nivel mundial, y la terapia que se emplea para su tratamiento suele tener efectos adversos sobre los pacientes. Lo anterior nos lleva a pensar en el desarrollo de nuevos métodos de fabricación de los fármacos que se utilizan para esta enfermedad. Uno de los tratamientos de mayor importancia es la quimioterapia, estos pueden ser de origen orgánico o inorgánico, todos ellos atacan células de rápida proliferación e induciendo muerte celular por necrosis, generando que los efectos secundarios sean severos [4].

En este sentido, materiales a base de óxido de zinc (ZnO) se han evaluado como matriz de soporte para la liberación de fármacos, se ha encontrado que el material es biocompatible, con actividad antimicrobiana y antifúngica [5]. Por otro lado, estudios sobre la 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico han puesto de manifiesto su actividad citotóxica sobre diversas líneas tumorales [6].

Pensando en todo lo descrito anteriormente en este trabajo de investigación se realizó la síntesis de ZnO por el método sol-gel, mismo que fue funcionalizado por el método de impregnación con ácido acético (AC), ácido ascórbico (AS) y 1,10-fenantrolina (FEN). Simultáneamente se realizaron las caracterizaciones elementales que nos permitieron conocer las propiedades físicas y químicas de los materiales. Por último, se llevaron a cabo las evaluaciones de actividad citotóxica y antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa, CaSki y HeLa por la técnica de XTT.

Esta tesis se divide en los siguientes capítulos, en el capítulo 1 se presentan la descripción de las propiedades físicas y químicas del ZnO, así como los factores que afectan el proceso de formación de este material por el método sol-gel. El ZnO fue funcionalizado con moléculas orgánicas para mejorar su actividad citotóxica y antiproliferativa en líneas tumorales, por lo que también se describe las propiedades físicas y químicas de los funcionalizantes.

En el capítulo 2 se explica la síntesis de los materiales de ZnO por sol-gel y la funcionalización del material por el método de impregnación. Por otro lado, se describen los fundamentos de las técnicas de caracterización y de evaluación de la actividad biológica de los materiales, así como las condiciones de uso de los equipos utilizados en cada análisis.

El capítulo 3 se presenta los resultados y discusiones de los estudios de caracterización y pruebas de citotoxicidad realizados; y finalmente se concluye en base a los resultados obtenidos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la funcionalización de nanopartículas de ZnO en la actividad biológica *in vitro* en líneas celulares de cáncer de cérvix.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del solvente y el pH de síntesis en las propiedades fisicoquímicas del ZnO a partir de acetilacetato de zinc.
- Evaluar el efecto de la funcionalización de nanopartículas de ZnO por el método de impregnación con 1,10-fenantrolina (FEN), ácido acético (AC) y ácido ascórbico (AS).
- Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* en líneas tumorales de cáncer de cérvix.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en México el 10% total de muertes anuales son a causa de algún tipo de cáncer, el más común entre la población femenina es cérvico-uterino y entre la población masculina el cáncer de pulmón [7].

La calidad de salud de pacientes con cáncer es importante por lo que resulta urgente desarrollar fármacos citostáticos que actúen de manera específica en la zona tumoral, es decir, que no interfieran en los circuitos bioquímicos de las células sanas. Los fármacos disponibles por lo general causan toxicidad sistémica por no diferenciar a las células del cáncer de las normales, lo cual da como resultado efectos adversos de diferente tipo en los pacientes.

En este sentido compuestos que contienen 1,10-fenantrolina han sido estudiados por sus propiedades anticancerígenas [6]. Investigaciones recientes sobre inhibición de crecimiento de células cancerígenas y actividad citotóxica, reportan al ácido ascórbico y acético con potencial para esta aplicación [8]. Por otro lado se sabe el óxido de zinc es empleado en la combinación de fármacos, por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas.

Por todo lo anterior se realizaron materiales con actividad citotóxica a base de ZnO funcionalizado con 1,10-fenantrolina y acético.

CAPÍTULO 1 NANOPARTÍCULAS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Actualmente las nanopartículas son un área de gran interés en la investigación científica debido a que poseen propiedades distintas, que pueden depender de su tamaño, la morfología y la distribución; de tal manera que es posible crear y mejorar productos con una amplia variedad de aplicaciones en los campos biomédicos, ópticos y electrónicos. Desde hace varios años se han realizado síntesis de nanopartículas de diferentes materiales, desde polímeros naturales como la celulosa, alginato, poli (ácido láctico) (PLA) [9]; se han realizado también nanopartículas metálicas de diferentes tipos como cobre [10], plata [11], zinc [12], titanio, oro [13], y nanopartículas de compuestos inorgánicos como óxido de silicio, titanio, zirconio, aluminio y zinc, especialmente las nanopartículas de óxido de zinc, tiene gran potencial en diversas aplicaciones, tales como electrónica, óptica, fotónica y biológica como agente antimicrobiano, antifúngico y recientemente se comenzó a investigar su actividad citotóxica, resultado que estas nanopartículas tienen actividad en células tumorales, lo que hace sean atractivas para explotar esta aplicación.

Se sabe que las propiedades físico-químicas de los materiales dependen en gran medida de los parámetros de síntesis empleados, de tal manera que la literatura fue fundamental para determinar el método de elaboración de los materiales de ZnO y la selección de las moléculas orgánicas que lo modificaron para obtener materiales con mayor actividad citotóxica.

1.1 GENERALIDADES DEL ÓXIDO DE ZINC

1.1.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ÓXIDO DE ZINC

Los materiales nanoestructurados de ZnO han recibido gran atención, especialmente en aplicaciones de electrónica, óptica y propiedades químicas, entre otras [14]. El ZnO es un compuesto de origen natural conocido como el raro mineral zincita, que cristaliza en la estructura hexagonal wurtzita (Figura 1) [15]. El mineral zincita fue descubierto en 1810 por Bruce en Franklin. La estructura de ZnO se puede describir simplemente como un número de planos compuestos por O^{2-} tetraédricamente coordinado y iones Zn^{2+} apilados alternativamente a lo largo del eje c [16]. Por otra parte Z. L. Wang y colaboradores afirmaron que la coordinación tetraédrica de ZnO se traduce en su estructura central no simétrica, la piezoelectricidad y piroelectricidad.

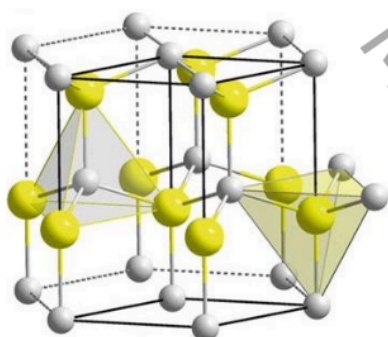


Figura 1. Estructura cristalina del ZnO tipo wurtzita [17].

El ZnO comúnmente es sintetizado por método físicos, tales como el método de evaporación y condensación térmica, que son favorecidos por la alta calidad del producto final ZnO, sin embargo estos métodos necesitan alto vacío y altas temperaturas [18]. En opuesta a los métodos físicos, las rutas en fase de solución, basado en una sustancia química húmeda, han demostrado ser eficientes y adecuadas en la preparación de diversas nanoestructuras de ZnO, debido a las condiciones suaves de síntesis del material, tales como, baja temperatura de

crecimiento, facilidad en la adición de elementos en la red de los materiales, y potencial para la producción en masa. Recientemente el proceso de sol-gel se ha empleado para sintetizar materiales de ZnO a nano-escala [14].

1.1.2 MÉTODO SOL-GEL

El método sol-gel (solución-gelación) es una forma eficaz de obtención de materiales con características muy específicas por que las propiedades estructurales, morfológicas y electrónicas se puede controlar desde el inicio, el proceso consiste en la formación de un sol (suspensión coloidal de partículas sólidas) y subsecuentemente las nanopartículas coloidales se unen formando una red sólida en 3D que es un gel viscoso [19]. En la práctica, el proceso se puede iniciar a partir de la gelificación de soluciones coloidales a partir de la hidrólisis y condensación de sales inorgánicas o precursores organometálicos en agua o disolventes orgánicos [3]. En la etapa de hidrólisis se emplean catalizadores ácidos o básicos así como co-solventes que favorecen la miscibilidad del precursor y el agua [20].

T. López y colaboradores describieron que utilizar el método sol-gel contribuye en la obtención de materiales con muy alta homogeneidad y pureza, mayor estabilidad térmica, áreas superficiales altas y tamaño de poro regulado, además que permite el control del tamaño de partícula, de tamaño de poro y la resistencia mecánica mediante la regulación de las condiciones de secado y envejecimiento, de igual forma se puede controlar la cristalinidad, manipulando la porosidad, posibilidad de controlar la funcionalización, modificando los precursores y la velocidad de hidrólisis y condensación, y disminuye la degradación térmica, porque las etapas son a bajas temperaturas [3].

1.1.3 SÍNTESIS DE ZnO POR SOL-GEL

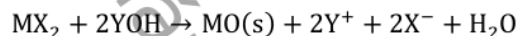
Cada técnica de síntesis de materiales tiene sus propias ventajas y puede producir diversas estructuras de ZnO con diferentes propiedades. Las estructuras de ZnO pueden aparecer como nanopartículas simples, nanovarillas, nanocables, nanocintas, jerárquicos ramificados, nanoespirales, nanoanillos, nanoestructuras *core-shell*, nanocajas, nanoflores, y los nanotubos, entre otras estructuras [14].

El proceso de sol-gel es uno de los métodos más utilizados en la síntesis de nanopartículas de ZnO, debido a su buena homogeneidad, la facilidad en el control de la composición, baja temperatura de procesamiento, y buenas propiedades ópticas [21]. Son cuatro tipos de materiales se utilizan en la síntesis de ZnO utilizando el método sol-gel, precursor, disolvente, catalizador y estabilizador. El precursor es el principal material que permite que la reacción química que se produzca en el proceso sol-gel. Aunque los materiales precursores normalmente consisten en iones metálicos, también se utilizan otros elementos rodeados de varias especies reactivas llamadas ligandos y son conocidos como alcóxidos de metales, que son los más preferidos, ya que reaccionan fácilmente con agua [22]. Un disolvente mutuo, tal como alcohol (etanol, metanol, e isopropanol) es utilizado porque alcóxidos y agua son inmiscibles [3].

Se necesita un catalizador para asegurar la aparición de hidrólisis y condensación. Algunos ejemplos de catalizador son el ácido clorhídrico, hidróxido de potasio, NaOH, e hidróxido de amonio. Estabilizadores, tales como dietanolamina, hidróxido de tetrametilamonio, y etilendiaminotetra acetato, se añaden para estabilizar el sol. Este es importante para garantizar que el sol no cambie rápidamente a gel. Las propiedades de una red de sol-gel, están relacionados con una serie de factores que afectan a la velocidad de hidrólisis y reacción de condensación, tales como pH, temperatura de síntesis, tiempo de reacción, concentración de reactivo, la naturaleza y concentración del catalizador, la temperatura de secado, el tiempo y proceso de secado de envejecimiento [14].

El proceso de sol-gel generalmente implica cuatro etapas: la hidrólisis, condensación y polimerización de monómeros para la formación de partículas, el crecimiento de partículas y aglomeración de partículas. Estas etapas son seguidas por la formación de las redes que se extienden por todo el medio líquido, que resulta en la formación y engrosamiento del gel [23].

Durante el proceso de sol-gel, se produce el proceso de nucleación de partículas de óxido de metal normalmente por precipitación. Este proceso implica la reacción entre la sal de metal soluble con los iones hidróxido (YOH) o agua. La reacción de nucleación de sal de metal divalente (MX₂) y una solución que contiene YOH se describe como sigue [24]:



Donde M es el tipo de metal (en particular Zn), X es el anión (por ejemplo, CH₃CO₂⁻, Br⁻, y ClO₄⁻), Y es el catión (tales como Na, Li y K). El proceso de crecimiento se produce entonces en la solución sobresaturada hasta que la concentración de saturación del sólido se alcanza. Después de la nucleación y el crecimiento, el tamaño medio de partícula y distribución de tamaño se pueden cambiar por el envejecimiento. Los dos procesos de envejecimiento dominantes son la agregación y engrosamiento, que depende en gran medida en los parámetros experimentales. Estos factores afectan el tamaño de partícula final y tamaño de distribución [23].

1.1.4 EFECTO DEL pH EN LA SÍNTESIS DEL ZnO

El pH influye significativamente en las propiedades de ZnO cuando se sintetiza ZnO por el método sol-gel. El comportamiento de la hidrólisis y la condensación de la solución durante la formación del gel son controlados por pH; por lo tanto, la morfología de ZnO es también afectada [25]. Otros estudios muestran que las condiciones de la solución afectan sobre todo el tamaño de la partícula de polvo de ZnO. El pH puede cambiar también el número de núcleos de ZnO y unidades de crecimiento, el aumento de pH (de ácido a alcalino) de soles resulta en el crecimiento de partículas de ZnO [14].

Muchos estudios anteriores sobre ZnO se han centrado en la síntesis de un electrodo de ZnO con estructura hexagonal wurtzita, con superficie porosa y propiedades morfológicas de nanopartículas en el intervalo de ~50 nm, utilizando centrifugación de sol-gel de pH 6-11 [26]. Estos estudios utilizaron acetato de zinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como precursor, metanol como disolvente, y NaOH para ajustar el pH.

S. Alias y colaboración, prepararon soluciones de ZnO mediante la adición de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente. Las soluciones se agitaron hasta que una solución clara fue obtenida. Las soluciones claras se transformaron en soluciones de suspensión de color blanco lechoso después de la titulación con NaOH debido al cambio en los niveles de pH de los soles a partir de pH 6 (ácido) a 11 (alcalino). Las soluciones de color blanco lechoso resultantes se agitaron de nuevo, y todas las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante el proceso de sol-gel. Posteriormente fueron centrifugadas para completar la gelificación, después de la hidrólisis por una semana, la centrifugación se llevó a cabo para mejorar el aislamiento entre ZnO y el disolvente. El ZnO blanco precipitado obtenido después de la centrifugación se secó en un horno. Finalmente, el precipitado seco se molió hasta que se convirtió en un polvo blanco fino.

En el experimento anteriormente descrito, se encontró que el tamaño de partícula disminuye inversamente proporcional al pH, que mostró que la cantidad de iones OH^- desempeñó un papel importante en la determinación de tamaño de la partícula ZnO. Después de alcanzar la cantidad suficiente de iones OH^- para la síntesis de ZnO (pH 8 y 9), el tamaño de partícula se redujo a causa de la disolución de ZnO. El tamaño de cristalito de ZnO aumentó a pH 8 y 9, lo que podría atribuirse al aumento en la cantidad de iones OH^- en ZnO. Sin embargo, aumentar aún más en la concentración de OH^- en ZnO (pH 10 y 11) redujo en mayor proporción los tamaños de cristalitos y de partículas debido a que la cantidad de OH^- disuelto fue mayor durante la síntesis de ZnO a estos niveles de pH [27]. La disolución disminuye el tamaño del cristalito y tamaños de partículas y facilita la aglomeración de partículas [14].

1.1.5 ÓXIDO DE ZINC COMO MATRIZ DE SOPORTE

El ZnO es un material que ha sido utilizado en diversas aplicaciones tales como catalizadores, adsorbentes, cristales fotónicos, sensores, vehículos de liberación de fármacos, células artificiales, etc. Otras investigaciones hablan de la actividad antibacteriana del ZnO, por ejemplo, K. Ajay y colaboración evaluaron complejos de Zn en cuatro sepas de hongos (*Cyrtomium falcatum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* y *Curvularia pallescence*) y cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Streptococcus pyogenes*), se evaluaron tres concentraciones diferentes. Se encontró que los materiales tienen actividad antifúngica y que inhibe el crecimiento de hongos [28].

A. K. Singh y colaboración prepararon un complejo de Zn, el cual fue evaluado en dos bacterias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) y su actividad antifúngica en cuatro hongos (*Colletotrichum falcatum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* and *Carvularia pallescence*). Se encontró que la actividad antifúngica y antibacteriana aumenta con la quelación [29].

Se sabe que el ZnO por sus propiedades fotocatalíticas posee actividad antibacteriana y antifúngica, por lo que también se emplea como principio activo de formas farmacéuticas, recientemente materiales nanoestructurados a base de ZnO son estudiados para la liberación de fármacos, a continuación, se describen algunos complejos formados a partir de este compuesto.

T. Chen y colaboración, prepararon un material nanoestructurado con ZnO como núcleo, el cual fue funcionalizado con ácido poli (L-lactida), un folato y un polisacárido sulfatado, los ensayos *in vitro* de citotoxicidad se realizaron en células HeLa (línea celular de cáncer cérvico uterino). Se encontró que los materiales presentan especificidad, debido a que solo tienen actividad citotóxica en células cancerosas [30]

Q. Yuang y colaboración, sintetizaron un complejo ZnO funcionalizado con ácido fólico conjugado con quitosán en donde encapsularon un fármaco anti-cáncer, llamado doxorubicina, se encontró que el fármaco es liberado de forma controlada [5].

H. Zhang y colaboración, prepararon nanovarillas de ZnO con daunorubicina (medicamento contra el cáncer en la terapia fotodinámica) por el método de reacción de estado sólido, la actividad anti-tumoral in vitro en células SMMC-7721 (hepatocarcinoma humano) se determinó por ensayo MTT y citometría de flujo, se encontró mayor efecto apoptótico con el tratamiento de las células con ZnO-daunorubicina con irradiación UV [31].

A. Ismail y colaboración, trataron células HepG2 (adecarcinoma de hígado humano) con nanopartículas de ZnO y ZnO revestido con sílice, estas fueron dopadas con Fe, Ag, Pb y Co, nanotubos de TiO₂, ZnO/TiO₂ bajo irradiación UV; los resultados fueron comparados con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina, se encontró que los materiales tienen mayor efecto citotóxico [32].

1.2 GENERALIDADES DE LOS FUNCIONALIZANTES

1.2.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA 1,10-FENANTROLINA

La 1,10-fenantrolina (FEN) es un ligando bidentado quelante para iones de metales de transición que han jugado un papel importante en el desarrollo de la química de coordinación y aún continúa a ser de considerable interés como material de partida versátil para química orgánica, inorgánica y supramolecular [33]. FEN es una molécula rígida planar e hidrófoba, también es un sistema heteroaromático pobre en electrones cuyos átomos de nitrógeno están muy bien situados para actuar cooperativamente con cationes vinculantes (ver Figura 2). Estas características estructurales son determinantes en su capacidad de coordinación hacia iones metálicos [34].

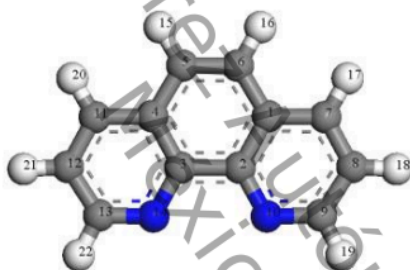


Figura 2. Estructura química molecular de 1,10-fenantrolina, los átomos de C se muestran en color gris, H en blanco y N en azul [86].

El ligando FEN se comporta como una base débil en solución acuosa. Debido a su excelente capacidad para coordinar muchos iones metálicos la 1,10-fenantrolina y sus derivados se utilizan con frecuencia en muchos procesos que implican complejos de metales donde pueden ser presentados en muchas funciones, tales como ligandos para la catálisis o como agentes estabilizantes para la síntesis de nanopartículas [35]. La molécula FEN forma fácilmente complejos octaédricos en solución acuosa del tipo $[M(FEN)(H_2O)_4]^{2+}$, $[M(FEN)_2(H_2O)_2]^{2+}$ y $[M(FEN)_3]^{2+}$, donde M, es el metal, correspondiente a la primera fila de cationes de metales de transición [36].

Por otro lado, estudios sobre modulación de niveles de toxicidad de fármacos anticancer estudian el desarrollo de metales de transición y compuestos basados en 1,10-fenantrolina, algunos complejos metálicos que contienen FEN son también conocidos por intercalar en el ADN.

1.1.1.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA 1,10-FENANTROLINA

La 1,10-fenantrolina (FEN) es un compuesto orgánico heterocíclico que actualmente es muy estudiado por su marcada actividad biológica como agente anti fúngico, antibacterial y anti-tumoral, a continuación, se describen algunas investigaciones en relación a la actividad biológica de este compuesto:

C. Deegan y colaboradores, evaluaron el efecto citotóxico de compuestos que contienen la molecula FEN como ligando, el 1,10-fenantrolina-5,6-diona, $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina-5,6-diona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, y $[\text{Ag}(1,10\text{-fenantrolina-5,6-diona})_2]\text{ClO}_4$ en dos líneas celulares neoplásicas humanas (A498 y Hep-G2) y en dos líneas no neoplásicas (CHANG and HK-2), este estudio fue comparado con el Cisplatino, se encontró que los materiales posee actividad citotóxica en las cuatro líneas celulares, el efecto sobre las dos líneas no neoplásicas fue menor en comparación del efecto inducido por el cisplatino [37]

P. Heffter y colaboración, prepararon el compuesto [tris (1,10-fenantrolina) de lantano (III)] tritioicianato el cual posee actividad anticancerígena. Los ensayos biológicos se realizaron in vitro en células KP772 (adecarcinoma de colon) e in vivo en ratones [38].

N. McGinely y colaboración prepararon el material [(1,10-fenantrolina) (etilendiamina) platino (II)]²⁺ usando como vehículo de entrega un aptámero sgc8c que es un oligonucleótido de ADN 41-base que se une a las células de leucemia con alta afinidad y especificidad, el cual fue puesto a prueba en líneas celulares de cáncer de ovario A2780 y A2780cp70. Se encontró que el complejo era capaz de

reconocer las células de leucemia, pero permaneció atrapado, por lo que el efecto citotóxico inducido fue muy bajo [39].

S. J. Park y colaboración, evaluaron la actividad biológica de dos tipos de fenantrolina, 1,10-fenantrolina, 3-metiladenina y carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona en la línea celular HeLa. Se encontró que estos compuestos inducen fisión mitocondrial: autofagia y fragmentación de la mitocondria [6].

1.2.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ÁCIDO ACÉTICO

El ácido acético (AC), $C_2H_4O_2$ (Figura 3), también conocido como ácido etanoico, ácido etílico y ácido metano carboxílico, es un líquido incoloro con un fuerte parecido al vinagre y es inflamable. Los grupos carbonilo y el hidroxilo del AC son aceptores activos de hidrógeno y donante, respectivamente, por lo que tiende a formar dobles enlaces de hidrogeno, dando como resultado un dímero en gas y algunos disolventes no polares, así como estructuras de cadena en liquido puro [40].



Figura 3. Estructura química molecular del ácido acético, los átomos de C, O y H se muestran en color gris, rojo y blanco respectivamente.

El AC tiene la propiedad de ser miscible con agua, alcohol, glicerol, éter, y tetracloruro de carbono [41]. El ácido acético glacial, que es el ácido acético puro, es altamente corrosivo [41]. Es un compuesto con usos domésticos incluyen aseo, metal y drenaje limpiadores y desoxidantes. Industrialmente, es utilizado en la

refinación de metales, fontanería, blanqueo, grabado, recubrimiento, la fotografía, la desinfección, municiones, fabricación de fertilizantes, limpieza de metales. Se utiliza como conservante en alimentos, como un disolvente para gomas, resinas, aceites volátiles, y es usado ampliamente en la síntesis orgánica [42].

Desde hace algunos años el AC se utiliza como agente activo para la detección visual del virus de papiloma humano (VPH), debido que al hacer contacto con el virus este genera un cambio de color [43]. Recientemente se comenzó a investigar la actividad citotóxica de compuesto derivados de ácido acético, resultando que la molécula tiene potencial en la aplicación.

1.2.2.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ÁCIDO ACÉTICO

El ácido acético (AC) es una molécula orgánica que se encuentra en el vinagre, el cual es responsable de su olor y sabor. Estudios sobre los derivados del AC reportan que posee actividad anti-tumoral, a continuación se describen algunas investigaciones de este tipo.

S. Zhou y colaboración, investigaron la actividad anti-tumoral de un compuesto derivado de ácido flavona-8-acético, el ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético. El estudio in vitro se realizó en la línea celular Caco-2, que es un modelo de la barrera intestinal de cáncer de colon. Se realizó un ensayo de sulforrodamina B, donde se encontró que el compuesto posee un efecto inhibitor de crecimiento en Caco-2 [44].

Y. Jeong y colaboración, estudiaron la foto-activación con rayos ultravioleta de ácido 5-hidroxiindol-3-acético (principal metabolito de la serotonina) para inducir apoptosis en células de cáncer de próstata y vejiga. El ensayo in vitro se realizó en células PC-3, TCCSUP y LNCaP, se encontró que el compuesto sin ser activado con UV no mostró citotoxicidad, por el contrario, con la foto-activación se produjo la muerte celular por apoptosis [45].

M. Jeong y colaboración, estudiaron la actividad anti-cáncer del compuesto 3,4-dihidroxifenil ácido acético en células HeLa, se encontró que inhibe el crecimiento de las células e induce la disminución del número de estas por apoptosis.

1.2.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico (AS) comúnmente es conocido como vitamina C, en su forma pura es un polvo cristalino blanco, extremadamente soluble en agua haciendo una solución incolora. Se sabe que es un nutriente esencial en el cuerpo para el mantenimiento y la reparación del tejido conectivo y posee una fuerte respuesta inmune; se sabe que tiene propiedades antioxidantes debido a que elimina los radicales libres que se producen a partir de reacciones bioquímicas y metabólicas [46]. Debido a la facilidad de la oxidación del ácido ascórbico, la comprensión de su papel como la vitamina C fue un gran desafío, en la Figura 4 se muestra la estructura molecular de la molécula de AS.

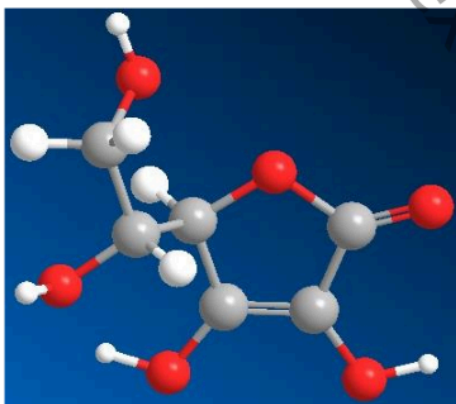


Figura 4. Estructura química molecular del ácido ascórbico, los átomos de C, O y H se muestran de color gris, rojo y blanco respectivamente.

El AS es una cetolactona hidrosoluble con dos grupos hidroxilo ionizables, por lo que tiende a actuar como un ácido cuando se mezcla con agua, lo que significa que pierde uno de sus átomos de hidrógeno, dando como resultado una molécula conocida como ascorbato, la cual es un excelente agente reductor y se somete fácilmente dos oxidaciones consecutivas de un electrón que resultan en la formación de un radical ascorbato y ácido deshidroascórbico (DHA), en este proceso también se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por tal motivo se ha propuesto al ascorbato como un profarmaco para la entrega de H_2O_2 a los tumores [38, 39]. Este conocimiento aporta la idea del uso del ácido ascórbico para inducir apoptosis en células cancerosas, de tal forma que resulta atractivo el estudio de esta molécula en el tratamiento del cáncer [47].

1.2.3.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Con el descubrimiento de que la administración de AS en pacientes con algún tipo de cáncer aumenta la tasa de sobrevivencia [48], se comenzó a investigar su actividad citotóxica, a continuación, se describen algunos estudios que indican que la molécula de AS tiene potencial en la aplicación.

J. Park y colaboración, realizaron la funcionalización con ácido ascórbico a un fármaco llamado Paclitaxel, el cual es usado como agente quimioterapéutico contra varios tipos de tumores, pero a menudo genera efectos secundarios tóxicos graves. En este estudio el AS se utilizó para reducir los efectos secundarios tóxicos, para ello se examinó este efecto utilizando una línea celular de cáncer de pulmón y en ratones implantados con células cancerosas. En la evaluación in vitro se encontró mayor efecto anticancerígeno en comparación con el tratamiento solo con Paclitaxel; en el experimento con ratones, estos no mostraron los efectos secundarios típicos, tales como reducción del número de células blancas y rojas de la sangre y el nivel de hemoglobina [49].

J. Kim y colaboración, realizaron un estudio *in vivo* sobre la influencia del agotamiento de AS en ratones implantados con células de cáncer de ovario. Se encontró que, en los animales suplementados con AS, tuvieron una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico, en comparación con los de control normal, por lo cual se concluye que la concentración de AS tiene un papel esencial en el mantenimiento de la citotoxicidad contra células cancerosas [50].

Otro estudio realizado por Y. Ha y colaboración, encontraron que la alta concentración de AS induce la apoptosis en células humanas de cáncer gástrico, el efecto citotóxico se determinó por el ensayo MTT [51].

Por otro lado, E. Song y colaboración, evaluaron el efecto del AS en el crecimiento sobre una línea celular de cáncer de pulmón, mismas que posteriormente fueron tratadas con vincristina, el cual es un fármaco quimioterapéutico, se encontró que el pre-tratamiento de las células con AS, generó una inhibición hasta 33 veces mayor al ser tratadas posteriormente con vincristina comparado con las células sin ser tratadas con AS [8].

Recientemente Bradley M. Roberts y colaboradores, caracterizaron el mecanismo de muerte celular inducido por AS en la línea tumoral HeLa. En este estudio se plantea la hipótesis de que en altas concentraciones (5-10 mM) de AS induce la muerte celular a través de una vía intrínseca apoptótica. Esto lo atribuyen a la generación de H_2O_2 a través del AS. Los resultados sugieren que el ácido L-ascórbico podría ser un agente terapéutico potencial para el cáncer de cuello uterino [47].

1.3 NANOTECNOLOGÍA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

La nanotecnología es un área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales a escalas nanoscópicas, y los usa para alguna aplicación práctica. El término fue descrito por Norio Taniguchi, como un "proceso que consiste en la separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula". Durante las últimas décadas, la nanotecnología se ha convertido en una poderosa herramienta que nos ayudara a superar las limitaciones que enfrenta la medicina. El desarrollo de materiales cerámicos, metálicos, poliméricos o de origen biológico para aplicaciones en medicina, se han convertido en un área de investigación de gran interés.

Estos nuevos materiales nanométricos se han propuesto como buenos candidatos para la entrega de fármacos, dispositivos, herramientas quirúrgicas, entre otras aplicaciones, que debido a su pequeño tamaño pueden circular por todo el cuerpo sin el riesgo de producir embolia. Tal es el caso de los tumores cancerígenos que poseen ventanas de ciertos epitelios, las partículas pueden permeabilizar al tumor a través de los compartimientos sanguíneos. Recientemente se investiga el uso de nanopartículas inorgánicas como vehículos para transportar fármacos, debido a su nula reactividad y alta compatibilidad con sistemas biológicos, estas partículas en forma de óxidos se han estudiado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

En México, el cáncer cervicouterino se ha mantenido como la segunda neoplasia más importante entre la población mexicana y como la primera causa de muerte en la población femenina [52]. En un estudio realizado en la Ciudad de México, Lazcano Ponce y colaboradores reportan que el riesgo de enfermedad para cáncer cervicouterino se incrementó hasta siete veces en mujeres con virus del papiloma humano (VPH) 16-18 positivo [52]. Uno de los compuestos más utilizados para tratar este tipo de neoplasia es el cisplatino (cis-diclorodiamin platino), es un compuesto capaz de formar enlaces covalentes con las bases nitrogenadas del ADN, por lo cual se bloquea la replicación y transcripción del ADN, una de las limitantes de este medicamento son sus efectos secundarios que puede generar.

1.3.1 CÁNCER CERVICO UTERINO

En un organismo sano se encuentran en equilibrio los procesos de proliferación y muerte celular. La célula cancerosa es el resultado de la acumulación de una serie de alteraciones en el ADN, como consecuencia se desarrolla una célula transformada que tiene la capacidad que proliferar, invadir y producir metástasis, y de suprimir el proceso apoptótico. La desregulación de la apoptosis ha sido implicada en el origen del cáncer por la prolongación anormal de la supervivencia de la célula.

El carcinoma cérvico uterino (CaCU), representa la segunda causa de mortalidad en población femenina a nivel mundial, y es una las principales causas de muerte en la población femenina mexicana [52]. Este tumor representa más de 24% de todas las neoplasias malignas reportadas en México, haciendo de esta neoplasia uno de los problemas de salud más graves en nuestro país [53].

Se ha demostrado que los genomas de los VPH de alto riesgo usualmente se integran al genoma de la célula hospedera; esta integración se realiza en diversos sitios, algunos de ellos cercanos a oncogenes específicos o sitios frágiles, sugiriendo que este evento puede tener un papel importante en el desarrollo de los tumores cervicales [53]. Los VPH 16, 18, 31, 45, 56, son de fácil reconocimiento clínico y de alto poder oncogénico, sobre todo en el cérvix. El VPH-16 tiene mayor proporción en el cáncer escamoso, mientras que el VPH-18 se encuentra más relacionado con el adenocarcinoma [52].

La propiedad oncogénica principal de las proteínas virales E6 y E7 es su capacidad de inactivar a las proteínas celulares supresoras de tumor pRB y p53 respectivamente, permitiendo así la transformación de inmortalización de las células infectadas. La inactivación de los genes supresores de tumor, ya sea por mutaciones génicas o por presencia de virus genera la desregulación del ciclo celular y la activación de varios proto-oncogenes. Estas interacciones no han sido totalmente estudiadas y se desconoce, por lo tanto, el comportamiento global del CaCU.

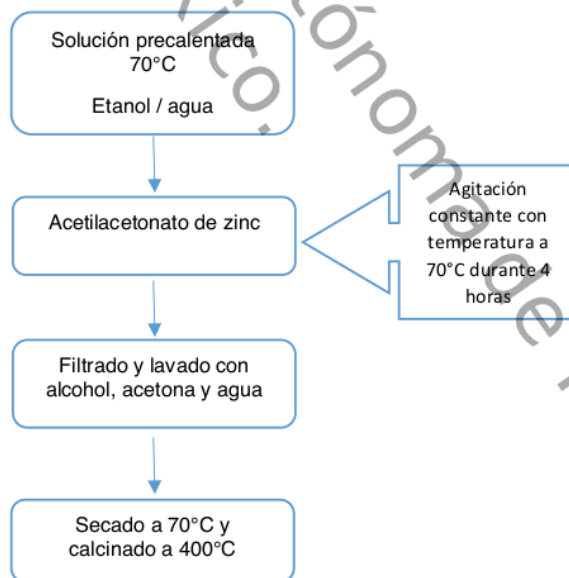
CAPÍTULO 2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO

El óxido de zinc se obtuvo por el método sol-gel con la finalidad de estudiar sus propiedades como muestra blanco y para modificar su superficie incorporando moléculas orgánicas (1,10-fenantrolina, ácido ascórbico y ácido acético), los materiales se prepararon de la siguiente manera:

🚦 ZnO sin ajustar pH de reacción

Se sintetizó ZnO como se muestra en el esquema 1, agregando acetilacetionato de zinc hidratado (sigma-aldrich 98%) en una solución precalentada a 70°C de agua/etanol (Sigma-aldrich 99.5%), sin modificar el pH de reacción, la solución se mantuvo con agitación constante a una temperatura de 70°C por 4 horas, transcurrido este tiempo solo la agitación fue mantenida hasta lograr la gelación. Posteriormente el material fue filtrado y lavado con etanol, acetona y agua, la muestra fue secada a 70°C y calcinada a 400 °C durante 4 horas con rampa de 2°C por minuto.



Esquema 1. Metodología de síntesis de ZnO.

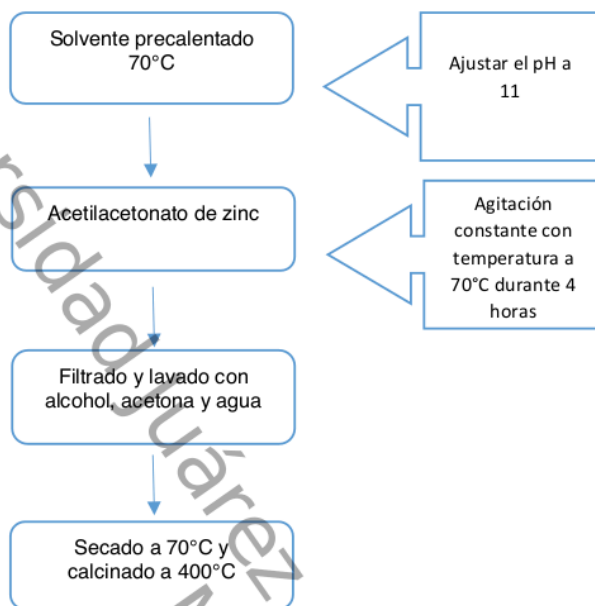
ZnO a pH 11

En la búsqueda de materiales en escala nanométrica y con tamaños uniformes se realizaron cuatro síntesis para obtener nanopartículas de ZnO, para ello se evaluó la influencia del solvente y del catalizador, se experimentaron dos solventes y dos catalizadores para ajustar el pH a 11, mismos que se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción del precursor de Zn, el solvente y el catalizador empleado en la síntesis de nanopartículas de ZnO a pH 11.

Precursor de Zn	Solvente	Catalizador
Acetilacetato de zinc hidratado	Butanol	Hidróxido de sodio
Acetilacetato de zinc hidratado	Butanol	Hidróxido de amonio
Acetilacetato de zinc hidratado	Etanol/agua	Hidróxido de amonio
Acetilacetato de zinc hidratado	Etanol/agua	Hidróxido de sodio

Los materiales fueron realizados con las mismas condiciones de síntesis anteriormente descritas en el esquema 1, utilizando como solvente una solución etanol/agua o butanol (sigma-aldrich 99.4%) y ajustando el pH a 11 con hidróxido de sodio o hidróxido de amonio. Las muestras fueron filtradas y lavadas con etanol o butanol (dependiendo el alcohol utilizado), acetona y agua, posteriormente fueron secadas en un horno a 70°C y calcinadas a 400°C durante 4 horas con incrementos de temperatura de 2°C/min, en el esquema 2 se presenta la metodología de síntesis de nanopartículas de ZnO.



Esquema 2. Metodología de síntesis de ZnO a pH 11.

2.2 OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO FUNCIONALIZADAS CON 1,10-FENANTROLINA, ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO ASCÓRBICO.

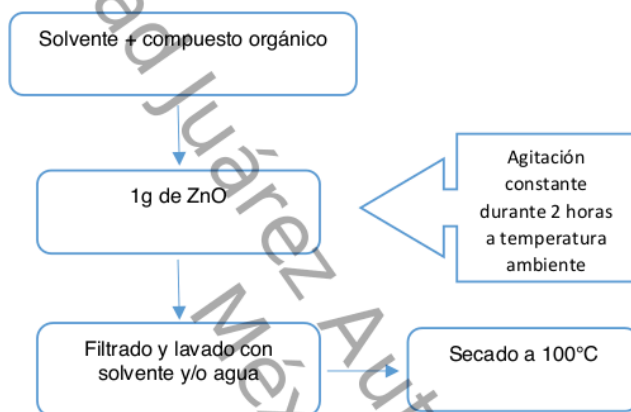
Las nanopartículas de ZnO fueron modificadas superficialmente con 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico por el método de impregnación, este proceso es muy utilizado en la industria para la preparación de catalizadores metálicos soportados por la simplicidad del método, la cual consiste en añadir el soporte seco a una disolución que contiene el componente que se desea incorporar, y el disolvente es eliminado por evaporación. Dependiendo de la relación entre el volumen de la disolución del compuesto y el volumen de poros del soporte, se habla de impregnación normal o por humedad incipiente. En este último tipo de impregnación el volumen de disolución del componente activo debe ser aproximadamente igual a su volumen de poros del soporte, de tal manera que la disolución es embebida por el soporte debido a las fuerzas capilares. La utilización del tipo de impregnación, así como las condiciones de trabajo, puede establecer diferentes distribuciones del compuesto en el soporte.

En este trabajo se impregnó ZnO con tres componentes orgánicos por separado 1,10-fenantrolina (sigma-aldrich, 99%), ácido acético glacial (REASOL, 99.7%) y L-ácido ascórbico (sigma-aldrich, 99%) al 5% en peso. En la tabla 2 se describe el solvente utilizado en cada compuesto orgánico para impregnar el ZnO.

Tabla 2. Descripción del solvente utilizado para impregnar los materiales de ZnO calcinados a 400°C.

COMPUESTO ORGÁNICO	DISOLVENTE
1,10-fenantrolina	Etanol
Ácido acético glacial	Agua
L-ácido ascórbico	Agua

Para obtener los materiales impregnados se diluyó cada compuesto orgánico en 5mL de un disolvente (tabla 2), la solución contiene la concentración correspondiente a 5% en peso para ser agregado a 1g de ZnO, seguidamente se mantuvo en agitación constante por 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente el material fue filtrado y lavado con etanol o agua (dependiendo el disolvente) y finalmente secado a 100°C, en el esquema 3 se muestra la metodología seguida para la obtención de dichos materiales.



Esquema 3. Metodología de impregnación de los materiales de ZnO con moléculas orgánicas.

2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

En la búsqueda de las propiedades físico-químicas de los materiales sintetizados, se emplearon técnicas de caracterización espectroscópica, microscópica y de dispersión, de tal forma que nos permitieran confirmar la obtención de nanopartículas de ZnO y ZnO funcionalizado con moléculas orgánicas, en este apartado se describe brevemente los fundamentos básicos de cada una de las técnicas utilizadas y las condiciones de uso de cada equipo para el análisis de las muestras.

2.3.1 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE CON REFLECTANCIA DIFUSA

La espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) con reflectancia difusa, es una técnica empleada para poder describir el comportamiento electrónico de los sólidos. Se refiere a la incidencia de radiación electromagnética en la región ultravioleta (200-400 nm) y visible (400-800 nm). La espectroscopia UV-Vis comprende básicamente cambios electrónicos que se presentan en los niveles de energías que involucran pares de electrones no compartidos o electrones en enlaces tipo π . La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión, y predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débiles absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación a la longitud de onda, en la figura 5 se muestra gráficamente la diferencia entre reflexión especular y reflexión difusa.

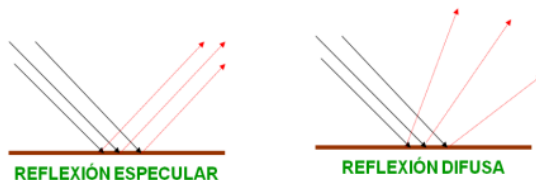


Figura 5. Representación de reflexión especular y difusa.

Las longitudes de onda ultravioleta que absorbe una molécula están determinadas por las diferencias de energía entre los orbitales de la molécula. Los enlaces sigma (σ) son muy estables y los electrones situados en estos enlaces no se ven afectados por longitudes de onda mayores de 200 nm. Sin embargo, los electrones situados en enlaces de tipo π están menos sujetos a la acción tractiva del núcleo atómico y por ello pueden ser excitados más fácilmente que los electrones situados en orbitales σ , promocionándose a orbitales de mayor energía. Cuando la energía del fotón del rayo de luz incidente coincide con la energía necesaria para que un electrón salte de un estado basal, el fotón se absorbe, entonces pasa a un nivel vacío, llamado estado excitado. La absorción de radiación ultravioleta y visible por una especie, puede considerarse un proceso de dos etapas, la primera de las cuales corresponde a la excitación. La partícula atómica o molecular en su estado electrónico excitado se produce como el resultado de la absorción de un fotón. Este estado de excitación tiene un tiempo de existencia muy breve (10^{-8} a 10^{-9} s), y desaparece a través de alguno de los diferentes procesos de relajación. Los tipos más comunes de relajación comprenden la conversión de la energía de excitación en calor. La absorción de la radiación ultravioleta o visible, se produce por lo general como consecuencia de la excitación de los electrones de enlace; debido a esto, la longitud de onda de los picos de absorción se puede correlacionar con los tipos de enlace existentes en la especie que se estudia, por lo que la espectroscopia de absorción resulta valiosa para la identificación de los grupos funcionales en una molécula.

En este trabajo esta técnica espectroscópica nos permitió identificar las señales características del ZnO que se encuentra a ~ 368 nm y de las moléculas orgánicas 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico. Los espectros de sólidos en reflectancia difusa se obtuvieron en un equipo UV-Vis 2600 Shimadzu en el rango de 200 a 800 nm.

2.3.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopía vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopia de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. La región infrarroja del espectro electromagnético se encuentra entre $12800\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano: $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ IR lejano: $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales [54].

El IR cercano requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra. Con frecuencia se combina con un espectrofotómetro UV-Vis y dispositivos de fibra óptica para análisis remoto, encontrando especial interés en control de procesos. Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales. Por lo que respecta al IR medio, existen espectrofotómetros comerciales desde 1940, aunque los avances más significativos en la técnica se produjeron con el desarrollo de instrumentos que incorporan el método de transformada de Fourier (FT-IR), que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos. Hoy en día, casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopia infrarroja están equipados con sistema de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra.

Un espectro IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. Como en otros procesos de absorción de

radiación electromagnética, la interacción de la radiación IR con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso que nos ocupa, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. No todas las vibraciones y/o rotaciones producen una absorción de radiación incidente. Solo los modos vibracionales y rotacionales de moléculas con momento dipolar diferente de cero, o bien aquellos modos que induzcan un momento diferente de cero en la molécula, son activos al IR. Para que exista un espectro rotacional activo en el IR se requiere que la molécula sea polar, mientras que para un espectro vibracional activo en el IR basta que el movimiento vibracional de los átomos de la molécula induzca un momento bipolar no nulo [54].

Por medio de esta técnica se identificaron las distintas bandas de flexión y vibración en cada una de las muestras de ZnO y ZnO funcionalizado con moléculas orgánicas, para ello los materiales fueron mezclados con KBr al 5% para hacer pastillas transparentes. Los espectros de FT-IR fueron registrados utilizando un espectrofotómetro Iffinity-1, Shimadzu, se realizaron 32 exploraciones en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.3.3 FISISORCIÓN DE NITRÓGENO

El fenómeno de fisisorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son adsorbidos o retenidos en la superficie de un material. El resultado es la formación de una película líquida o gaseosa en la superficie del cuerpo sólido o líquido. La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material. El resultado es la formación de una película líquida o gaseosa en la superficie del cuerpo sólido o líquido. Es importante destacar que la adsorción, un fenómeno de superficie, es un concepto totalmente diferente de la absorción, que es un fenómeno de volumen.

El origen del fenómeno de adsorción es la descompensación de las fuerzas existentes en los átomos de la superficie externa de las partículas. Cuando un cuerpo sólido de superficie limpia se encuentra expuesto a una atmósfera gaseosa, en el interior del material todos los enlaces químicos se encuentran satisfechos. En cambio, por definición, la superficie presenta átomos con una serie de enlaces insatisfechos o incompletos, confiriendo a la zona, centro activo, una querencia por átomos externos que satisfagan y neutralicen las fuerzas atómicas superficiales. Por ello, la adsorción es un proceso exotérmico que se produce de forma espontánea.

La cantidad de gas adsorbido, por unidad de masa de sólido es dependiente de la presión de equilibrio, de la temperatura y de la naturaleza del sistema gas-sólido. Habitualmente, las isothermas de adsorción se expresan gráficamente como una curva en un diagrama XY, donde el eje de ordenadas representa la cantidad de gas adsorbido y el eje de abscisas la presión relativa de equilibrio (P/P_0), que varía entre 0 y 1, donde P_0 es la presión de saturación a la cual el gas se transforma en líquido a la temperatura de la isoterma.

La mayoría de las isothermas de adsorción pueden agruparse en seis tipos, aunque los cinco primeros tipos de isothermas fueron propuestos por Brunauer, Deming, Deming & Teller, como la clasificación BDDT, posteriormente se incorporó una sexta tipología, creando la clasificación conocida como clasificación de la IUPAC, en la figura 6 se presentan los seis tipos de isothermas [55].

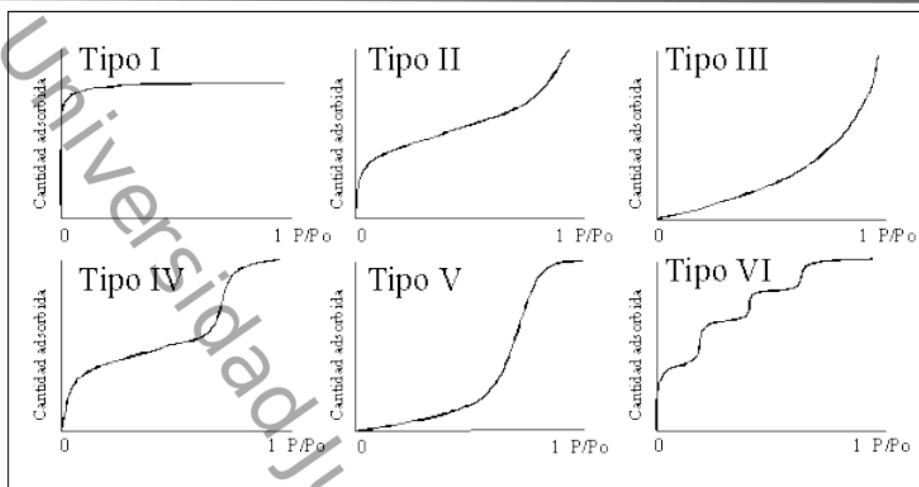


Figura 6. Representación esquemática de los seis tipos de isothermas de adsorción.

- ✓ La isoterma tipo I se caracteriza porque la adsorción se produce a presiones relativas baja. Característica de los sólidos microporosos.
- ✓ La isoterma tipo II es característica de sólidos macroporosos o no porosos, tales como negros de carbón.
- ✓ La isoterma tipo III ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja. Ejemplo: adsorción de agua en negros de carbón grafitizados.
- ✓ La isoterma tipo IV es característica de sólidos mesoporosos. Presenta un incremento de la cantidad adsorbida importante a presiones relativas intermedias, y ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas.
- ✓ La isoterma tipo V, al igual que la isoterma tipo III, es característica de interacciones adsorbato-adsorbente débiles, pero se diferencia de la anterior en que el tramo final no es asintótico.
- ✓ La isoterma tipo VI es poco frecuente. Este tipo de adsorción en escalones ocurre sólo para sólidos con una superficie no porosa muy uniforme. Ejemplo: adsorción de gases nobles en carbón grafitizado.

Cuando una molécula de gas se incorpora a un punto de adsorción y se mueve por la superficie sólida hasta que vuelve a salir despedida y se une al caos reinante en

la fase gaseosa (desorción). Sin embargo, puede ocurrir que antes de liberarse de nuevo, la molécula adsorbida sea empujada a otros puntos de adsorción. La intensidad y frecuencia del movimiento en superficie está relacionado directamente con la temperatura del sólido y la energía cinética de las moléculas. Por esta razón, cuanto menor es la temperatura, mayor es la adsorción en la superficie del sólido. La desorción es el fenómeno por el que una molécula de gas adsorbida en la superficie de un sólido, como respuesta a un descenso de la presión del medio, se desprende de la superficie y vuelve al seno del fluido. Es por definición el proceso inverso a la adsorción. Si la adsorción implicaba un aumento de la cantidad de gas adsorbido a medida que aumenta la presión del sistema, la desorción se traduce en una disminución del número de moléculas adsorbidas en superficie como consecuencia de la disminución de presión del sistema en equilibrio.

Durante el proceso de adsorción el capilar se llena por completo al llegar a la presión correspondiente al tamaño del interior del poro, pero durante la desorción se vacía por completo al reducirse la presión al valor correspondiente al tamaño de la garganta. Esta diferencia entre la presión de llenado y la presión de vaciado de un poro es la que genera la histéresis.

La histéresis que aparece en el rango de multicapa de las isothermas de fisisorción es debida fundamentalmente por la condensación capilar de forma irregular en la estructura de mesoporos. Se han definido cuatro tipos de ciclos de histéresis que se observan en la figura 7.

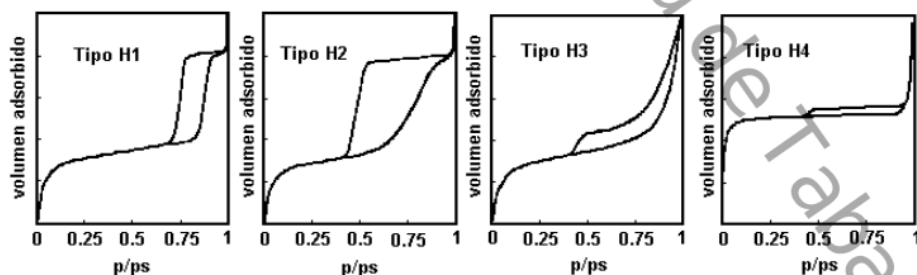


Figura 7. Tipos de ciclos de histéresis.

- ✓ Tipo H1: poros con tamaño y forma uniforme. Este ciclo de histéresis se caracteriza por tener una curva de adsorción y una curva de desorción prácticamente vertical y paralela. Se observa habitualmente en materiales mesoporosos con una distribución de tamaños de poro muy estrecha y en aglomerados de partículas esféricas de tamaño uniforme [75].
- ✓ Tipo H2: poros con tamaño y forma no uniforme. Este tipo de histéresis, mucho más ancha que el caso anterior, se caracteriza por presentar una curva de desorción mucho más vertical que la curva de adsorción. Ocurre en materiales con una distribución de tamaños de poro y morfología no muy bien definida como el gel de silicio. En cualquier caso, este ciclo de histéresis corresponde a una distribución de tamaños de poro más amplia que la que se deduce del ciclo de histéresis de tipo H1.
- ✓ Tipo H3: sólidos con poros abiertos o partículas parecidas a platos con tamaño y forma no uniforme. Este tipo de ciclo, a diferencia de los tipos H1 y H2, se caracteriza por no presentar una plataforma de adsorción límite en condiciones de presión relativas altas cercanas a la presión de saturación. Es característico de materiales compuestos por partículas laminares, como las arcillas, y poros flexibles con morfología de tipo rendija.
- ✓ Tipo H4: sólidos con poros abiertos o partículas parecidas a platos con tamaño y forma uniforme. Ciclo característico de sólidos que contienen poros en forma de rendija muy estrechos, como los carbones activados. Como en el tipo anterior, este ciclo no presenta una adsorción límite en condiciones de presión relativas altas cercanas a la presión de saturación.

En este trabajo se determinó el área específica utilizando el método BET, el tamaño y distribución de poros se analizó por el método Barret-Joyner-Halenda (BJH). Para ello se obtuvieron las isothermas adsorción-desorción de N₂ en un equipo Quanta Chrome (Autosorb 3B). Las muestras fueron previamente degasificadas para la eliminación de impurezas a 80 °C durante 24 horas. Posteriormente se realizaron las mediciones a temperatura de N₂ líquido (77 K) y con presión de vacío.

2.3.4 ANALISIS TERMOGRAVIMETRICO

En un análisis termogravimétrico (TGA) continuamente se registra la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma [54]. La instrumentación del TGA tiene una termobalanza, que permite medir las variaciones de masa de la muestra en función de la temperatura, la cual aumenta linealmente bajo un programa de calentamiento. La balanza opera generalmente bajo el principio de balance a cero y sus brazos se mantienen en la posición de referencia por medio de un mecanismo activado por un sistema eléctrico que a su vez es regulado ópticamente. El TGA presenta dos formas principales de operación: La termogravimetría estática o isotérmica, en la cual la masa de la muestra se registra como una función del tiempo a temperatura constante; y la termogravimetría dinámica, en la que la muestra se calienta en una forma programada, este último TGA es el de mayor interés en la práctica [54].

El análisis termogravimétrico se realizó en un analizador térmico simultáneo marca STA, modelo i-1000, mediante el cual se obtuvieron los termogramas que nos permitieron analizar la estabilidad de los grupos funcionales en la superficie del ZnO. Se analizaron entre 5 y 10 mg de cada muestra, en un rango de temperatura entre 25°C y 600 °C con una velocidad de calentamiento de 5 °C / min y con flujo de aire (10 cm³ / min).

2.3.5 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X (DRX) se refiere a la dispersión de los rayos X por las unidades de un sólido cristalino. En este método los electrones de los átomos ordenados en los cristales, desvían los rayos X originando patrones de difracción, a partir de los cuales se puede determinar la composición de las fases cristalinas. El fenómeno de la difracción de rayos X consiste básicamente en un proceso de interferencias constructivas de ondas de rayos X que se produce en determinadas direcciones de espacio. Significa que las ondas tienen que estar en fase, lo que ocurre cuando una onda encuentra una serie de obstáculos espaciados regularmente, tal que son capaces de dispersar la onda, y que los espacios son comparables en magnitud a la longitud de onda.

En el momento en el que un haz de rayos X incide en la superficie de un cristal (a cierto ángulo θ), una parte se dispersa por la capa de átomos de la superficie, mientras, que la otra no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos, donde de nuevo una fracción se dispersa y el resto pasa a la tercera capa. El efecto acumulativo de esta dispersión de los centros regularmente espaciados del cristal es una difracción del haz en forma muy parecida a como la radiación visible es difractada por una rejilla de reflexión. Como se dijo anteriormente, los rayos X de la misma longitud que se encuentran en fase serán reforzados mutuamente y producirán una onda que sea más fuerte que cualquiera de las ondas originales y de lugar a la difracción del haz [56].

En este trabajo se determinó la fase cristalina mediante DRX en los materiales de ZnO y las posibles modificaciones estructurales al material por la inserción de 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico. Las mediciones se realizaron en un difractómetro marca Bruker modelo D8 Advance. Los difractogramas se obtuvieron en el rango de 10 a 90° (2 θ), usando Cu-K α como fuente de rayos-X cuya longitud de onda es de 1.541 Å, empleando un paso 0.02 S⁻¹.

2.3.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (MEB) y el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, conocido como FESEM por sus siglas en inglés (*Field emission electron microscope*), constituyen el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el MEB se genera por la interacción de un haz de electrones que barre un área determinada sobre la superficie de la muestra. El MEB explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el microscopio electrónico de transmisión, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones [56].

El MEB y FESEM están compuesto por tres detectores que se clasifican en imágenes de electrones secundarios, imágenes de electrones retrodispersado y el analizador de energía dispersiva (EDS) de rayos X, los cuales están instalados dentro de la cámara de vacío. La muestra se coloca en el portamuestras de la cámara de vacío del microscopio, es donde es escaneada por medio de un haz de luz de electrones, convirtiendo las señales eléctricas en una imagen tridimensional. La señal de electrones secundarios es la que se emplea normalmente para obtener una imagen de la muestra, nos proporciona una imagen más real de la superficie que estemos estudiando. La señal de electrones retrodispersados está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV. Estos electrones proceden en su mayoría del haz incidente que rebota en el material después de diferentes interacciones. La intensidad de la señal de retrodispersado, para una energía dada del haz, depende del número atómico del material (a mayor número atómico mayor intensidad). Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. El analizador EDS de rayos X del microscopio realiza diversos análisis representados con histogramas e imágenes de distribución de los elementos químicos presentes en la muestra [54].

La mayor diferencia entre un MEB y un FESEM reside en el sistema de generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.2 a 5 KV). Otra característica destacable es que este microscopio utiliza detectores dentro de la lente, (in lens). Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento del equipo.

En este trabajo para el análisis de nanopartículas por MEB se utilizó un equipo marca JEOL modelo JSM-6010LA, y un microscopio FESEM-7600 marca JEOL, con alto voltaje de aceleración de 20 kV.

2.3.7 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ Y POTENCIAL Z

La dispersión dinámica de luz (DDL) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión, o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros [57]. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada [57].

Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas [57]. La técnica de DDL permite determinar el tamaño de partículas en suspensión hasta rangos del orden de los nanómetros, el uso del movimiento Browniano de las partículas en suspensión.

permite alcanzar estos límites de sensibilidad, adicionalmente este método no altera de ninguna manera la matriz de estudio debido a que es una técnica no destructiva. El término dinámica no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen [58].

El potencial Z es una medición de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático. Cuando partículas se encuentran en solución, la presencia de una carga neta en la superficie afecta la distribución de los iones que se encuentran a su alrededor, lo que resulta en un incremento de la concentración de sus contra-iones. La zona sobre la cual se encuentra esta influencia se llama capa eléctrica doble. Cuando la partícula se mueve a través de la solución, ya sea mediante la acción de la gravedad o la aplicación de un voltaje, los iones se mueven con ella. El valor de potencial Z depende tanto de las condiciones químicas de la superficie de la partícula como del dispersante, pequeños cambios del pH o concentración provoca cambios en el potencial Z, este valor se calcula a través de la movilidad electroforética que es el movimiento de una partícula cargada relativamente al líquido. La muestra es introducida en una celda capilar donde se aplica un campo eléctrico alterno. Las partículas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta (Figura 8).

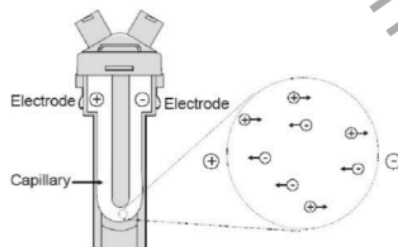


Figura 8. Sistema para medición de potencial Z.

El potencial Z es una medición necesaria para determinar la estabilidad de partículas en una suspensión coloidal, si las partículas tienen una carga positiva o negativa grandes, se repelerán entre ellas, y por lo tanto la suspensión será estable, valores altos o bajos se traduce en fuerzas de repulsión altas o bajas.

En este trabajo se utilizó la técnica de DDL para determinar el tamaño de partícula y la medición de su potencial zeta a pH 7, se realizó en un equipo ZetaSizer Nanoseries (Malvern instruments). Para las mediciones de 3 mg de cada muestra se suspendieron en 100 ml de agua destilada, usando celda DTS1060C para las mediciones de potencial zeta, mientras que para el tamaño de partículas se emplearon celdas tipo DTS10012.

2.4 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* CON LA TÉCNICA XTT

Para evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de los materiales de ZnO se realizó un ensayo colorimétrico basado en XTT (Hidrato del ácido 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis (4-metoxi-6-nitro) bencenosulfónico) para la cuantificación del porcentaje de células que sobrevivieron a los tratamientos.

Las sales de tetrazolio se han utilizado ampliamente como reactivos de detección durante muchos años en estudios de localización histoquímica y ensayos de biología celular. La segunda generación de tinte de tetrazolio, XTT, se puede usar eficazmente en la proliferación celular, citotoxicidad y ensayos de apoptosis, son especialmente útiles para el ensayo de la cuantificación de células viables [59].

El ensayo de proliferación de células XTT fue explicado por Scudiero y colaboradores en 1988, se describió como un método eficaz para medir el crecimiento celular y la sensibilidad a fármacos en líneas de células tumorales [60]. El XTT es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo que cuando se reduce se vuelve brillantemente naranja. El cambio de color se logra dividiendo el Anillo de tetrazol cuaternario que está cargado positivamente. El producto de la reducción de XTT es conocido como formazano. La sensibilidad de un ensayo XTT se mejora en gran medida mediante el uso de un portador de electrones intermedio, PMS (N-metil dibenzopirazina metil sulfato). El PMS ayuda a reducir el XTT y la formación de su formazano derivado.

Para realizar los ensayos de actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de los materiales se utilizaron líneas celulares de CaCU que contienen VPH de alto riesgo:

- ✚ **CaSki**, es una línea celular humana derivada de un carcinoma epidermoide de cérvix, esta línea contiene a su genoma cerca de 600 copias por célula del ADN del VPH-16.
- ✚ **SiHa**, es una línea celular humana derivada de un carcinoma epidermoide de cérvix. Se sabe que forma tumores epidermoides poco diferenciados de grado III. Esta línea contiene integrado a su genoma de 1 a 2 copias por célula del ADN del VPH-16.
- ✚ **HeLa**, es una línea celular derivada de un carcinoma de cérvix, también ha sido encontrada en carcinomas escamosos de cérvix. Se ha reportado que esta línea contiene VPH-18.

El cultivo de las células mononucleares, las líneas celulares SiHa, HeLa y CaSki y el tratamiento de estas líneas celulares con los materiales de ZnO se realizó de la siguiente manera.

2.4.2.1 CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares SiHa, HeLa y CaSki se adquirieron de ATCC y se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, life technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen, Life Technologies), penicilina-estreptomicina a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

2.4.1 ENSAYO DE CITOTÓXICIDAD

Se determinó la toxicidad de los materiales de ZnO en células mononucleares que fueron aisladas de la sangre periférica de un individuo sano, el ensayo se llevó a cabo por la técnica de XTT. Las células normales cultivadas en su medio fueron tratadas con tres dosis 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$ de cada material, los tratamientos se dejaron actuar por 48 horas con atmosfera controlada de CO_2 a temperatura de 37°C , transcurrido el tiempo se retiraron las células de su medio, posteriormente para teñir las células se agregaron 50 μl de solución XTT y se dejó reaccionar durante 2 horas, luego se tomó la lectura de la densidad óptica en un espectrofotómetro para microplacas con tres filtros Thermo Scientific, Multiskan FC.

2.4.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se determinó usando el kit de proliferación celular II (XTT, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma-aldrich). En resumen, las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos (Corning) a 3×10^3 células/pocillo en 0,1 ml de medio completo (DMEM/F12 + FBS al 10%) 24 horas antes del comienzo del tratamiento. Después del tratamiento durante 72 horas, se aspiró el medio y se lavaron las células con PBS. Las células se cultivaron en una mezcla de 60 μl de medio DMEM/F12 sin FBS más 40 μl de solución XTT durante 2 horas en una incubadora humidificada (a 37°C , CO_2 al 5%). La producción de formazano se cuantificó utilizando un lector de microplacas (Epoch, Bioteck, mediante el control de la diferencia de absorbancia a 492 y 690 nm). Todos los experimentos se repitieron tres veces. El efecto de cada tratamiento se expresó como un porcentaje de la proliferación celular en relación con las células control que no fueron sometidas a tratamiento.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se muestra el estudio de la influencia de los parámetros de síntesis en las propiedades físicas y químicas de los materiales de ZnO. De igual forma se caracterizó el efecto de la funcionalización con moléculas orgánicas en la estructura del ZnO, y, además, se evaluó su actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* en cultivos de líneas de células normales y tumorales.

El método de obtención de materiales de ZnO por el método sol-gel y la funcionalización de estos materiales por el método de impregnación, de igual forma se experimentó la influencia del catalizador en el proceso de síntesis, utilizando etanol/agua o butanol como solvente, y como catalizador hidróxido de sodio o hidróxido de amonio, estos materiales se identificaron como muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción del nombre que identifica los materiales de ZnO, de acuerdo al solvente y el catalizador utilizado en la síntesis.

Nombre	Solvente	Catalizador
ZBNa	Butanol	Hidróxido de sodio
ZBA	Butanol	Hidróxido de amonio
ZEA	Etanol/agua	Hidróxido de amonio
ZENa	Etanol/agua	Hidróxido de sodio
Z	Etanol/agua	

3.1 EFECTO DEL SOLVENTE Y EL pH EN LA FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO

3.1.1 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE EN REFLECTANCIA DIFUSA

La espectroscopia UV-Vis en reflectancia difusa es una técnica que comprende el comportamiento electrónico de los sólidos, por lo tanto, proporciona información sobre la absorción de grupos funcionales. En la Figura 9 se presentan los espectros UV-Vis de sólidos en reflectancia difusa de los materiales de ZnO calcinados.

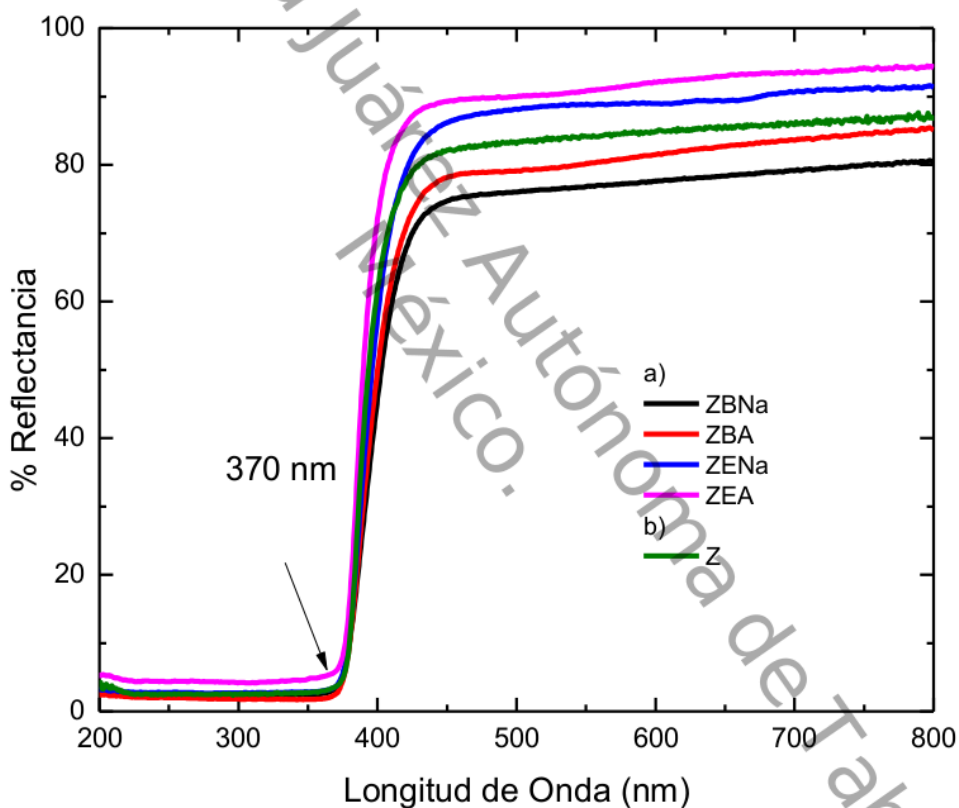


Figura 9. Espectros UV-Vis de sólidos en reflectancia difusa de los materiales de ZnO calcinados a 400°C: a) materiales de ZnO con catalizador, b) material de ZnO sin catalizador (Z).

El ZnO es un material de mucho interés por sus propiedades electrónicas, ópticas y fotónicas, que le dan gran potencial para diversas aplicaciones [61, 14]. En este trabajo se utilizó la espectroscopía UV-Vis como herramienta cualitativa de la absorción del grupo Zn-O (Figura 9), todos los materiales presentan una señal de absorción en la región UV aproximadamente a 370 nm, misma que es característica para el ZnO de acuerdo a la literatura [62]. En los espectros UV-Vis, no hay señales de materia residual orgánica y/o cambios significativos de absorción en la región ultravioleta-visible que puedan atribuirse al efecto del solvente o el catalizador en la formación de las nanopartículas de ZnO.

3.1.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopía de absorción infrarroja nos brindó información sobre los grupos funcionales presentes en las muestras a través del estado vibracional de las moléculas, por lo que fue una herramienta importante para comparar la influencia del solvente y el catalizador en la formación del ZnO. Este material comúnmente se ha elaborado por métodos físicos, recientemente se comenzó a investigar su obtención por el método sol-gel a nano-escala, a partir de acetilacetionato de zinc. A continuación, en la Figura 10a se presentan los espectros FT-IR de materiales de ZnO frescos, comparados con acetilacetionato de zinc, en la tabla 4 se describe cada una de las señales de esta figura. Los materiales de ZnO calcinados a 400°C se presentan en la Figura 10b, en la Tabla 5 se describe cada una de las señales encontradas en el FT-IR de estos materiales.

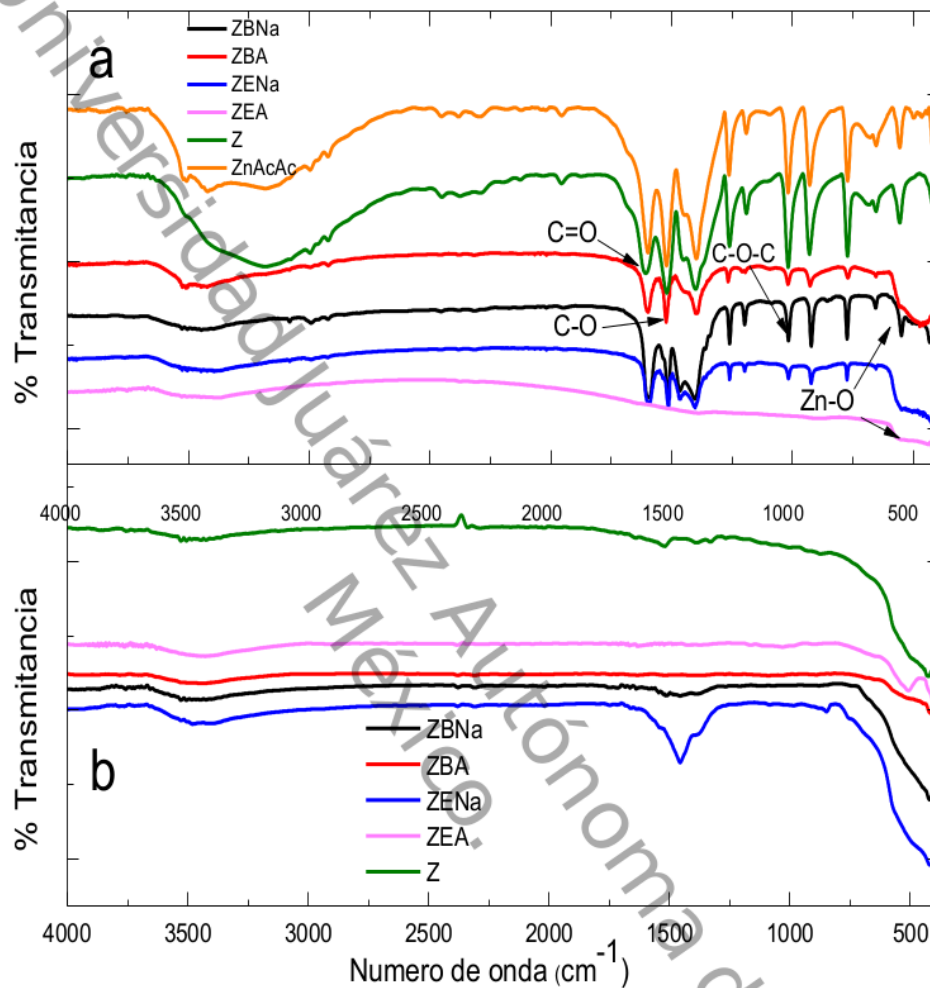


Figura 10. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de materiales de ZnO: a) materiales frescos de ZnO sintetizados con catalizador (ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA), la muestra sintetizada sin catalizador (Z) y ZnAcAc. b) materiales calcinados a 400°C (ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z).

Tabla 4. Asignación de las bandas de FT-IR de materiales de ZnO secos a 70°C (fresco) y acetilacetato de zinc hidratado (ZnAcAc).

Número de Onda (cm ⁻¹)						Asignación de bandas	
ZBNa	ZBA	ZENa	ZEa	Z	ZnAcAc		
3450	3450	3450	3450	3220	3260	Estiramiento	OH (Zn-OH)
	3520 y 3432					Estiramiento	C-N (NH ₃ OH)
				3514		Estiramiento	asimétrico C-OH
				3170	3170	Estiramiento	asimétrico CH
2998				2998	2998	Vibración	asimétrica CH ₂
2923				2923	2923	Vibración	simétrica CH ₂
				2449-1954	2449-1954	Sobretono de flexión	fuera del plano =CH
1610	1610	1610		1610	1610	Estiramiento	asimétrico C=O
1514	1514	1514		1516	1514	Estiramiento	asimétrico C-O
1452	1452	1452		1452	1452	Flexión	asimétrico CH ₃
1397	1397	1397		1397	1397	Flexión	simétrico CH ₃
1260	1260	1260		1260	1260	Torsión	C=O
1194	1194	1194		1194	1194	Torsión	C=O
1019	1019	1019		1019	1019	Estiramiento	C-O-C
929	929	929		929	929		
772	772	772		772	772	Flexión	fuera del plano =C-H
648	648	648		648	648		
547	547	547	547	556	556	Estiramiento	Zn-O
414	455	414	414	414	414	Estiramiento	Zn-O

El ZnO es un material con potencial para aplicaciones como electrónica, óptica, sensores y actividad anti-bacterial, anti-fúngica, entre otros, recientemente se investiga su actividad citotóxica [63], resultando esta última de mucho interés puesto que el material demuestra actividad en la aplicación. Nuestro enfoque ha sido obtener materiales con actividad citotóxica y además con la menor cantidad posible de residuos orgánicos. A continuación, se discuten la influencia del solvente y/o el catalizador en la formación del ZnO, de acuerdo a las señales de FT-IR presentes en los materiales fresco (Figura 10a) y calcinado a 400°C (Figura 10b).

De acuerdo a la Figura 10a y la Tabla 4 correspondiente a materiales frescos (secados a 70°C), todas las muestras de ZnO presentan una señal ancha centrada en 3450 cm⁻¹ para los materiales a pH 11 y 3220 cm⁻¹ el material Z, que es originada por el estiramiento del grupo O-H. El material Z tiene una señal en 3170 cm⁻¹ que corresponde al estiramiento asimétrico de CH proveniente del acetilacetato de zinc. En las muestras ZBNa, ZENa, ZBA y Z hay presentes dos señales de vibración simétrico y asimétrico de CH₂ en 2998 y 2923 cm⁻¹ respectivamente que corresponden a la cadena alifática del solvente. Además, en estos materiales, se encuentra una señal en 1610 cm⁻¹ que es debida al estiramiento del grupo carbonilo (C=O), otras dos señales en 1514 y 1019 cm⁻¹ que es debida a la vibración simétrica de C-O y C-O-C respectivamente. Es evidente que el tratamiento térmico a 70°C no fue suficiente para eliminar residuos del solvente y de acetilacetato de zinc. En las muestras ZBNa, ZENa, ZBA, ZEA y Z se encuentran las señales correspondientes al estiramiento de Zn-O aproximadamente a 552 y 414 cm⁻¹, estas señales indican la transformación de Zn(OH)₂ a ZnO de acuerdo con Željka Petrović, 2014 [64]. La muestra ZEA, no presenta señales de grupos funcionales correspondiente al precursor de Zn y del solvente, esto es originado por la adición del NH₄OH que inicia la precipitación del sistema a Zn(OH)₄²⁻, y este a su vez acelera el proceso de disolución de la fase sólida por la alta concentración de OH⁻, pero como el catión NH₄⁺ es mejor grupo saliente que el catión Na⁺, ocurre la descomposición del complejo Zn(OH)₄²⁻ y la formación de Zn(OH)₂ por una reacción competitiva [14].

Tabla 5. Asignación de bandas FT-IR de materiales de ZnO calcinados a 400°C.

Número de Onda (cm ⁻¹)					Asignación de bandas
ZBNa	ZBA	ZENa	ZEA	Z	
3680-3200	3680-3200	3680-3200	3680-3200	3660-3200	Estiramiento OH (Zn-OH)
				2402-2280	Sobretono de flexión fuera del plano =CH
1605		1609	1609	1604	OH molécula de agua
1550		1550		1540	Estiramiento simétrico C-O
1452		1456		1452	Flexión asimétrica CH ₃
1373		1373		1383	Flexión simétrica CH ₃
				1332	Torsión C=O
573	573	573	573	573	Estiramiento Zn-O
427	427	427	427	438	Estiramiento Zn-O

Analizando la Figura 10b y de acuerdo con la Tabla 5 que corresponde a materiales de ZnO calcinados. Con el tratamiento térmico a 400°C se eliminaron los residuos orgánicos en los materiales ZBA y ZEA, no fue así con sintetizados con NaOH (ZBNa y ZENa) y Z, puesto que las muestras ZBNa y Z presentan señales de absorción de materia orgánica residual en 1452 y 1373 cm⁻¹, la muestra ZENa también tiene estas señales, pero la señal de 1452 cm⁻¹ aparece en 1456 cm⁻¹ y es más intensa, esto nos sugiere que el catalizador NaOH no favorece eliminación completa de materia residual orgánica. Además, estos materiales (ZBNa, ZENa y Z), presentan una banda ancha centrada en 3490 cm⁻¹ que corresponde a la absorción de los grupos OH⁻, el material Z tiene las señales de flexión de sobretono fuera del plano en 2402 a 2280 cm⁻¹ que es debido a la presencia de residuos del acetilacetato de zinc, además, estos tres materiales (ZBNa, ZENa y Z) tienen señales de estiramiento simétrico de C-O, flexión simétrico y asimétrico de CH₃ en 1550, 1452 y 1383 cm⁻¹ respectivamente.

De acuerdo con Siti Salwa Alias, Ahmad Azmin Mohamad y Željka Petrović y colaboración, la formación de ZnO está representado por la vibración de estiramiento de Zn-O aproximadamente a ~550 y 453 cm⁻¹, estas dos señales están

presentes en ZBNa, ZBA, ZENa y ZEA en 573 y 427 cm^{-1} [26] [14] [65], la muestra Z presenta los mismos modos de flexión que las muestras sintetizadas con NaOH o NH_4OH , pero la señal de 427 cm^{-1} correspondientes al estiramiento de Zn-O se encuentra desplazada a 438 cm^{-1} , esto es debido al efecto del pH que influye en el tamaño de partículas de ZnO, lo que genera que el pico se desplace, este resultado soporta lo obtenido por MEB y FE-SEM, puesto que el material Z calcinado a 400°C tiene tamaños de partículas mayores que los otros materiales, este hecho fue corroborado por Siti Salwa y Ahmad Azmin [14].

3.1.3 PROPIEDADES TEXTURALES

El análisis de área superficial y porosidad permite comparar el efecto del solvente, el catalizador y el tratamiento térmico en las propiedades texturales de los materiales de ZnO obtenidos por el método sol-gel bajo las mismas condiciones de síntesis. Mediante fisisorción de N₂ se obtuvieron los siguientes parámetros de textura (Tabla 6): área superficial, diámetro y volumen de poro de acuerdo con el tratamiento térmico; las isothermas adsorción-desorción (Figura 11) y la distribución de diámetro poros (Figura 12) de los materiales calcinados.

Tabla 6. Parámetros de textura obtenidos por el método BET de los materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z secos a 70°C (frescos) y calcinados a 400°C.

MUESTRAS	ÁREA SUPERFICIAL (m ² /g)		DIÁMETRO DE PORO (nm)		VOLUMEN TOTAL DE PORO (cm ³ /g)	
	70°C	400°C	70°C	400°C	70°C	400°C
ZBNa	46	13	4	31	0.2	0.1
ZBA	5	21	3	31	0.1	0.3
ZENa	5	6	4	4	0.03	0.02
ZEA	8	5	4	4	0.1	0.03
Z	7	3	4	3	0.04	0.01

El ZnO es un material con poca área superficial comparándolo con otros materiales como silica, titania, alumina, etc. En la literatura encontramos que las propiedades texturales del ZnO dependen en gran manera de los parámetros y el método de síntesis, se han elaborado partículas de ZnO con área superficial de 283.8 m²/g, reportadas por Xiulan Hu, 2013 [66] quien compara sus resultados con partículas de ZnO comercial (NanoTek® ZnO, Japan) de 30 m²/g. Otras muestras de ZnO reportadas por Jing Wang, 2016 [67] que modificó partículas de ZnO comercial (sigma, >99.5%) con área superficial 43.4 m²/g.

Se observó la influencia del solvente y el tratamiento térmico en las propiedades texturales del ZnO (Tabla 6), puesto que, dependiendo el tratamiento térmico se obtuvieron variaciones pequeñas en los parámetros texturales, posiblemente como un resultado de la eliminación de residuos orgánicos.

El material ZBNa fresco (seco a 70°C) tiene un área superficial de 46 m²/g, diámetro de poro de 4 nm y volumen de poro de 0.23 cm³/g, cuando este material fue calcinado a 400°C su área superficial disminuyó a 13 m²/g y aumentó el diámetro de poro a 31 nm. Por otro lado, el material ZBA fresco posee 5 m²/g de área superficial y 3 nm de diámetro de poro, después del tratamiento térmico a 400°C su área superficial aumento a 20.9 m²/g y el diámetro de poro a 30.7 nm. Los cambios en las propiedades texturales pueden estar relacionados al cambio de morfología de las partículas por el tratamiento térmico.

El material ZENa fresco posee área superficial de 5 m²/g, después del tratamiento térmico a 400°C este valor ligeramente aumenta a 6 m²/g, lo cual podría estar relacionado con el cambio de su morfología. El material ZEA su área superficial disminuye de 8 a 5 m²/g. En los materiales (ZENa y ZEA) el tratamiento térmico no modificó el tamaño y volumen de poro. En la muestra Z el tratamiento térmico afectó el área superficial que disminuyó de 7 a 3 m²/g.

Los materiales elaborados con butanol (ZBNa y ZBA) calcinados a 400°C poseen área superficial, diámetro de poro y volumen total de poro con mayor valor que los materiales sintetizados con la solución agua/etanol Z, ZBA y ZEA calcinados, esto nos indica la influencia del solvente en las propiedades texturales del ZnO y soporta los resultados de MEB y FE-SEM; puesto que el cambio en los parámetros de textura están relacionadas con el cambio en tamaño y morfología de partícula observada en las micrografías, este mismo comportamiento fue descrito por Jing Wang, 2016 [67].

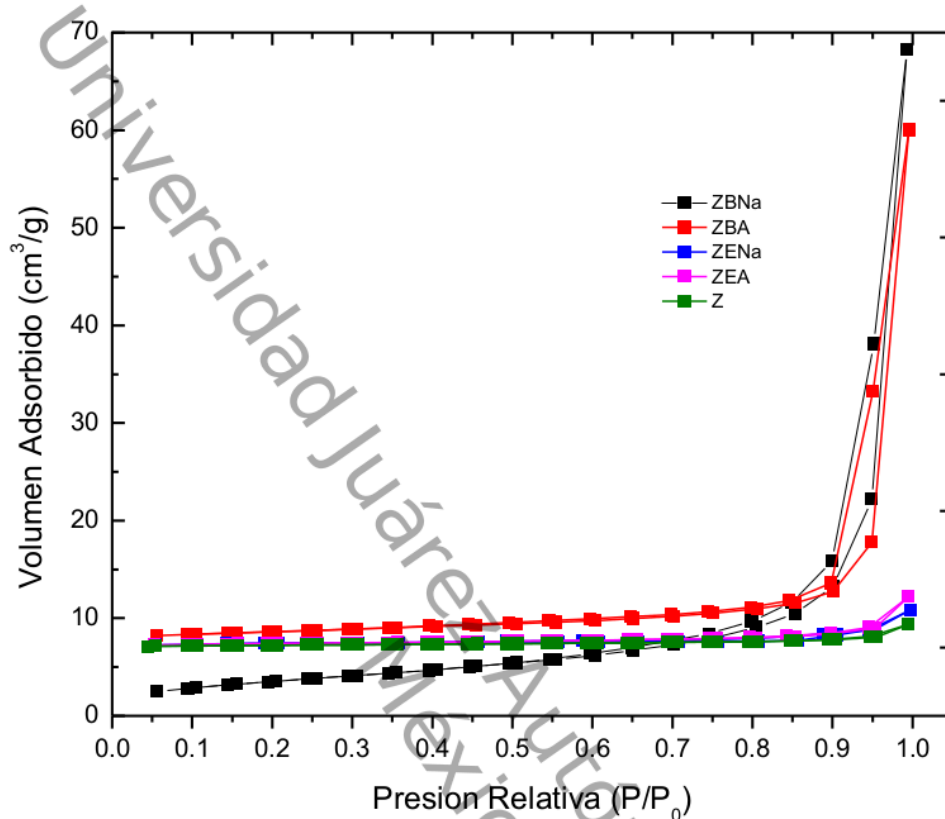


Figura 11. Isotermas de adsorción-desorción tipo IV (clasificación IUPAC) por el método BET de materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z calcinadas a 400°C.

Se obtuvieron las isotermas de adsorción-desorción de los materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z tratados térmicamente a 400°C (Figura 11) por el método BET, se observa que en todas las muestras el comportamiento de la ruta de adsorción y desorción de N_2 se desarrolló con un comportamiento similar, las isotermas pueden ser clasificadas del tipo IV según la IUPAC, esto nos indica que los materiales son mesoporosos, el lazo de histéresis de las isotermas son del tipo H3 que corresponde a sólidos con poros abiertos con tamaño y forma no uniforme. Este tipo de histéresis es característico de materiales compuestos por partículas laminares, como las arcillas, y poros desordenados en la estructura o con morfología de tipo rendija. En

las isothermas se observa que el volumen adsorbido de N₂ de cada material está en relación al valor de área superficial (ver Tabla 6).

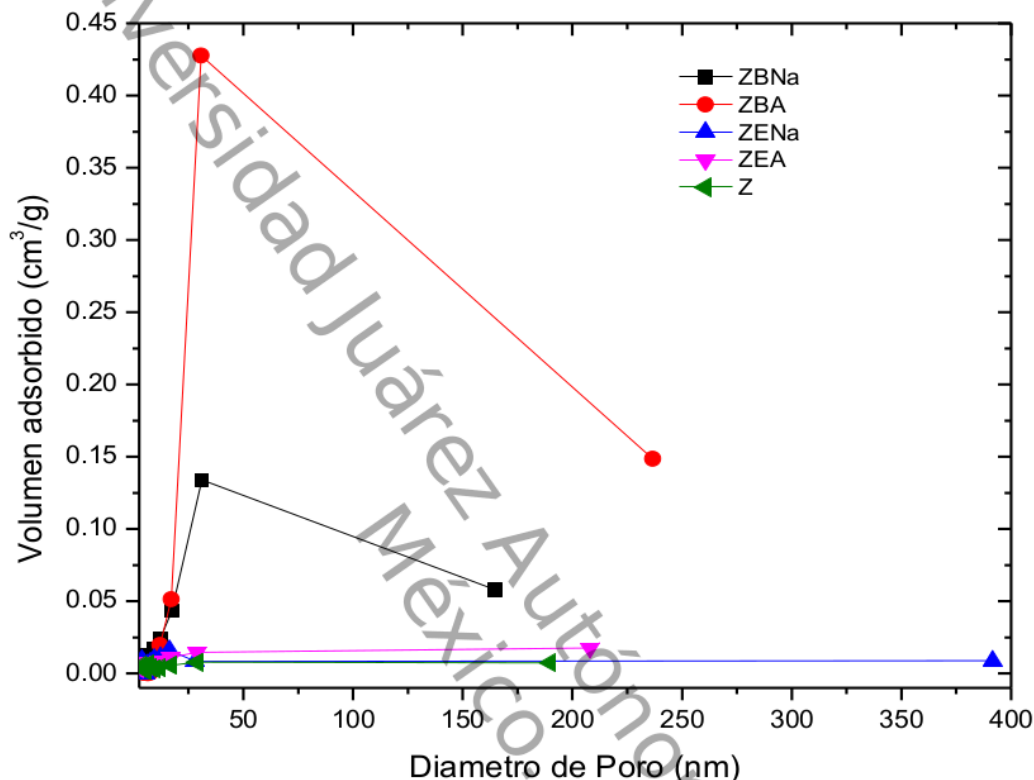


Figura 12. Distribución de diámetro de poros por el método BJH de materiales ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z calcinados a 400°C.

De acuerdo con las gráficas de distribución de poros (Figura 12) todos los materiales calcinados poseen diámetros en el rango de mesoporos, arriba de 3 nm, la distribución de poros no es homogénea, esto puede atribuirse a la morfología y tamaños de partículas aglomeradas que se obtuvieron en cada material de acuerdo con el solvente utilizado. Los volúmenes adsorbidos de N₂ con respecto al diámetro de poro, están en relación a los parámetros texturales de cada material (Tabla 6).

3.1.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El ZnO es un material conocido por poseer un patrón de difracción cristalino, por tal motivo la técnica de difracción de rayos X fue importante para evaluar el efecto del solvente y el pH en la formación de la estructura cristalina de ZnO sintetizado a partir del acetilacetionato de zinc por el método sol-gel.

A continuación, se presentan en la Figura 13 los difractogramas de los materiales de ZnO secos a 70°C (frescos) y acetilacetionato de zinc hidratado, en la Figura 14 se observan los difractogramas de materiales de ZnO calcinados a 400°C. Se realizó el cálculo de los tamaños de cristalito de los materiales de ZnO frescos (Tabla 7) y calcinados (Tabla 8) usando la fórmula de Scherrer.

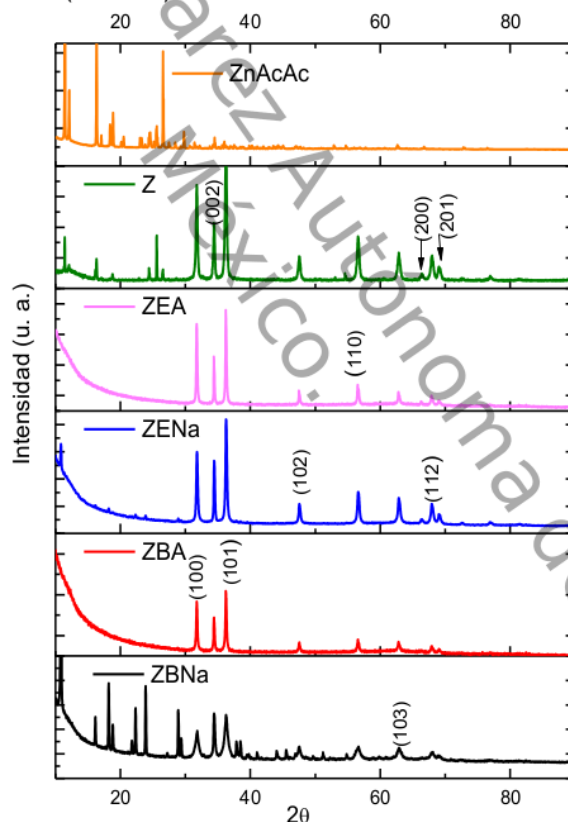


Figura 13. Difractogramas de materiales secos a 70°C (fresco) ZBNa, ZBA, ZENa, ZEA y Z, comparando con acetilacetionato de zinc hidratado (ZnAcAc).

Tabla 7. Tamaño de cristalito calculado con la ecuación de Scherrer, con respecto al pico (101), de los materiales ZBNa, ZBA, ZEA, ZENa y Z secados a 70°C (frescos).

Materiales	Tamaño de cristalito (nm)
ZBNa	16
ZBA	34
ZEA	35
ZENa	29
Z	40

El ZnO es un material cristalino, se sabe que esta propiedad aumenta después del tratamiento térmico, en este trabajo se utilizó la difracción de rayos X para evaluar la influencia del tratamiento térmico, el pH y el solvente en la formación del patrón cristalino de los materiales, por esta razón los materiales frescos se comparan con el difractograma del acetilacetato de zinc hidratado.

En la Figura 12, se observan los difractogramas de las muestras frescas ZBNa, ZBA, ZEA, ZENa y Z, en todas ellas se observan los planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) y (201) que son característicos de la estructura hexagonal wurtzita, de acuerdo con Željka Petrović, 2014 [64] y Gabriela Ambrožič, 2011 [68].

Los materiales sintetizados con NaOH (ZBNa y ZENa) y Z presentan reflexiones adicionales; en la muestra Z se observan picos de difracción en 10°, 12°, 16°, 18°, 24°, 25° y 26° (2 teta), los cuales también se encuentran en el difractograma de acetilacetato de zinc hidratado. El material ZBNa también presenta picos de difracción de manera similar, estos se encuentran situados en 10°, 16°, 18°, 22°, 24°, 28°, 38°, 44°, 45° y 51° (2 teta), la muestra ZENa presenta un pico de difracción en 10° (2 teta), el tratamiento térmico a 70°C no fue suficiente para eliminar los residuos de materia orgánica en estas muestras. No fue así para los materiales ZBA y ZEA sintetizados con NH₃OH, puesto que estos materiales solo presentan los

picos de difracción de la fase hexagonal wurtzita; estos resultados nos sugieren que el uso del NH_3OH en la síntesis de ZnO influye en la formación de la fase más estable del ZnO [68], estos resultados también soportan los resultados obtenidos por FT-IR, donde se observan impurezas del solvente en estos materiales.

Los tamaños de cristalito de las muestras ZBNa, ZBA, ZENa y ZEA frescas (Tabla 7) son menores que la muestra Z, de acuerdo con Siti Salwa Ahmad Azmin, la alta concentración de iones OH^- favorece la formación de partículas y cristales de menor tamaño [14].

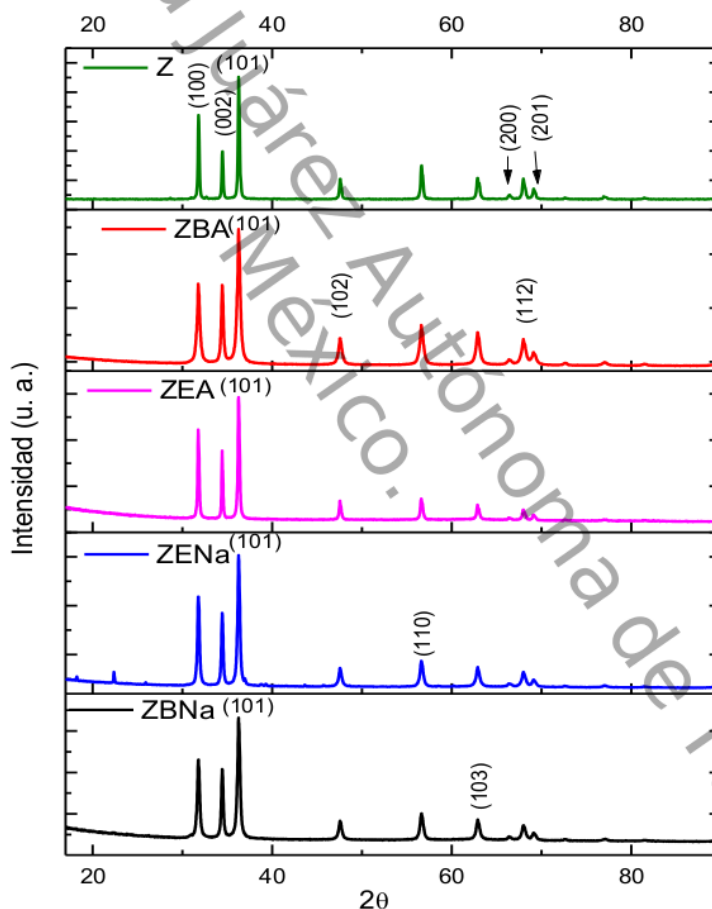


Figura 14. Difractogramas de materiales de ZnO calcinados a 400°C, ZBNa, ZENa, ZEA, ZBA y Z.

Tabla 8. Tamaño de cristalito calculado con la ecuación de Scherrer con respecto al pico (101), de materiales ZBNa, ZBA, ZEA, ZENa y Z, calcinados a 400°C.

Materiales	Tamaño de cristalito (nm)
ZBNa	19
ZBA	13
ZEA	16
ZENa	18
Z	25

Analizando la Figura 14, todos los materiales de ZnO calcinados al igual que los materiales frescos presentan picos de difracción correspondientes a la estructura hexagonal wurtzita, de los planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) y (201) de acuerdo con la literatura [64], la muestra ZENa presenta un pico de difracción en 22° (2 θ) de materia orgánica residual, este resultado es respaldado con el espectro de FT-IR (Figura 10) donde se observan picos de difracción correspondientes a materia residual orgánica en esta muestra calcinada a 400°C.

El tratamiento térmico dado a los materiales influyó en el tamaño de cristalito (ver Tabla 8), debido a que después del tratamiento térmico a 400°C estos valores disminuyeron en todas las muestras, también es evidente que el uso del catalizador propicia la formación de cristales de menor tamaño.

3.1.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El ZnO es un material con diferentes morfologías que dependiendo la ruta de síntesis y los parámetros que se utilicen pueden obtenerse partículas o nanopartículas en forma de bastones, agujas, flores, varillas, tubos, etc. La microscopía electrónica de barrido (MEB) y la microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM) son un método eficaz para la obtención de imágenes de alta resolución de las superficies de materiales. Estos microscopios utilizan electrones para la formación de imágenes, como un microscopio óptico utiliza luz visible, la técnica es muy útil para un análisis cualitativo. En este trabajo se realizó el análisis de morfología y tamaño de partícula de los materiales de ZnO con ayuda de un MEB y FESEM, a continuación, se presentan las micrografías de los materiales de ZnO frescos y calcinados. En la micrografía 15 se observan la muestra Z, con fines comparativos se realizó MEB al acetilacetato de zinc. Posteriormente en las micrografías 16 y 17 se presentan los materiales sintetizados con catalizador hidróxido de sodio, finalmente en las micrografías 18 y 19 se muestran los materiales sintetizados con catalizador hidróxido de amonio.

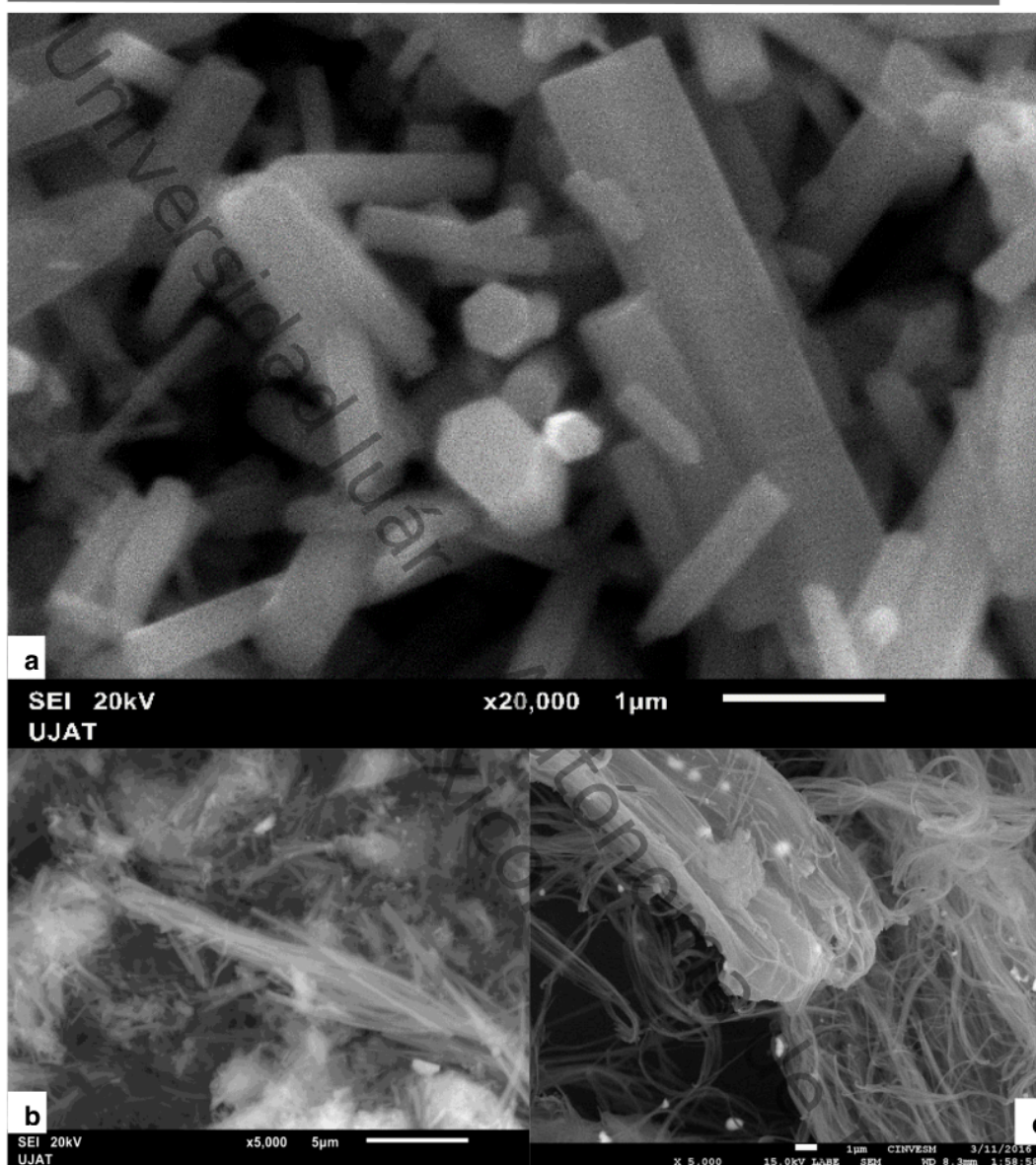


Figura 15. Micrografías de material Z, comparado con acetilacetato de zinc hidratado: a) MEB del material calcinado a 400°C a 20,000X de magnificación, b) MEB del material seco a 70°C (fresco) a 5,000x de magnificación, c) FESEM de acetilacetato de zinc hidratado a 5000X de magnificación.

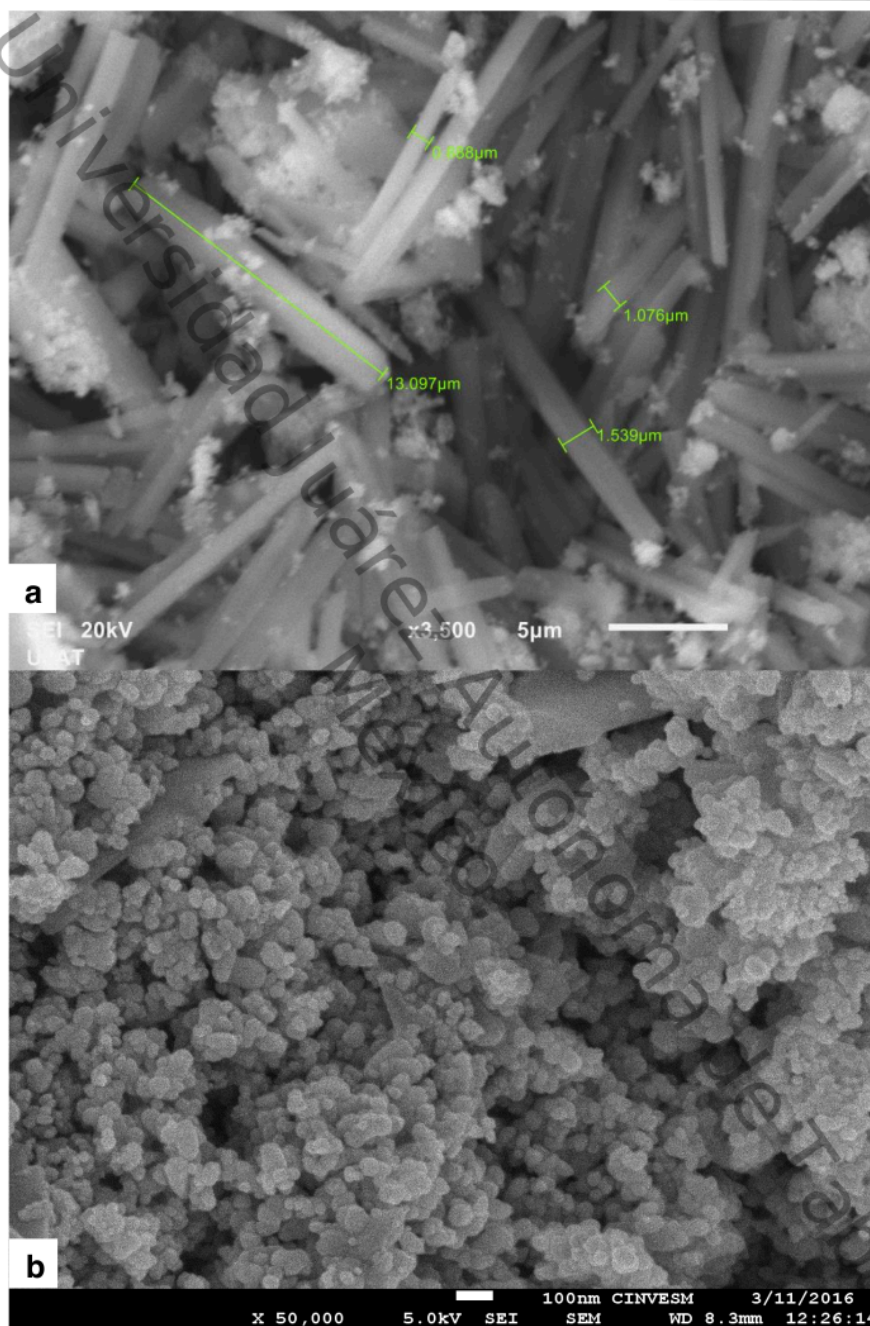


Figura 16. Micrografía de material ZBNa: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) con 3,500X de magnificación; b) FESEM de material calcinado a 400°C con 50,000X de magnificación.

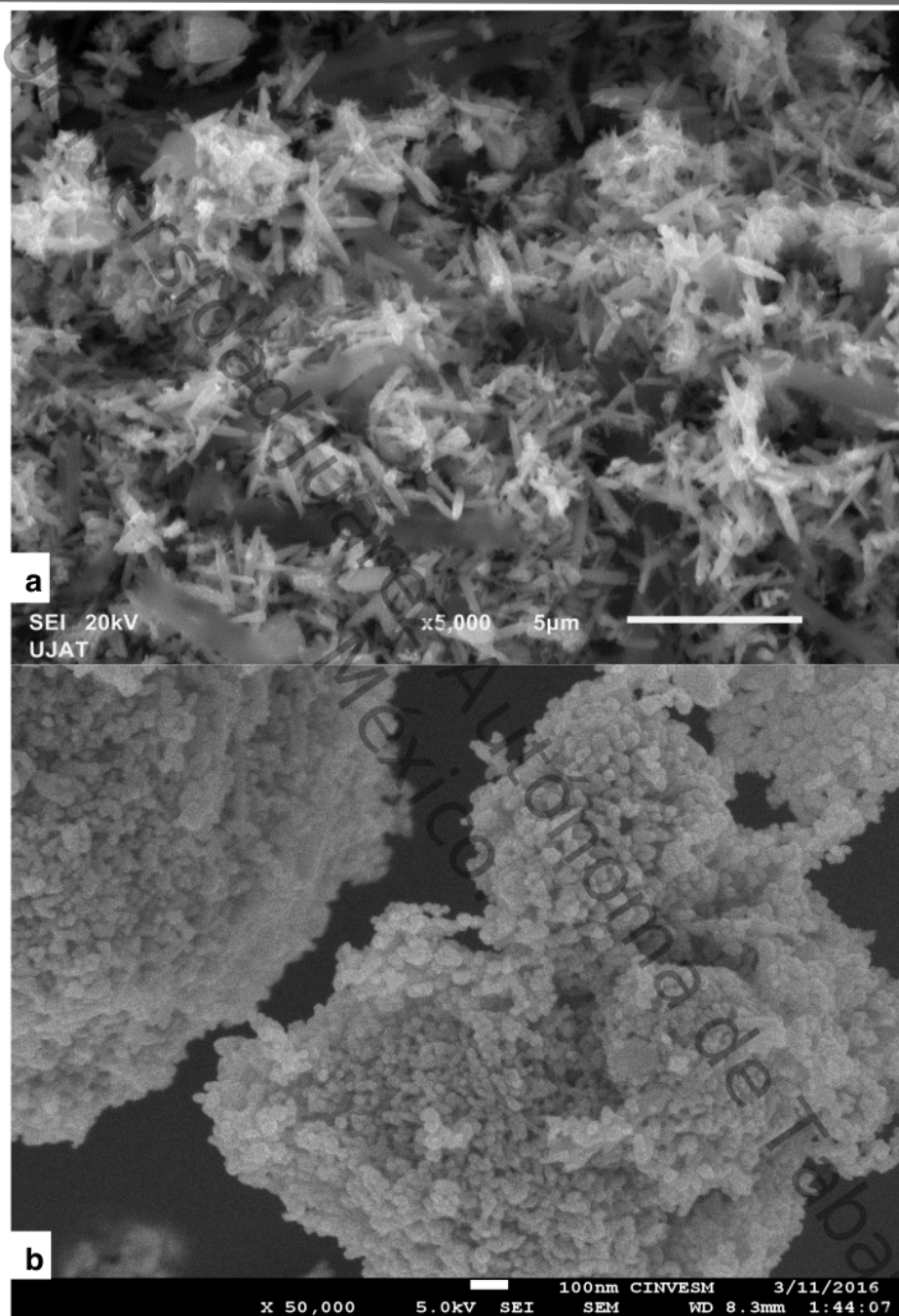


Figura 17. Micrografía de material ZBA: a) MEB del material seco a 70°C (fresco) con 5,000X de amplificación, b) FESEM del material calcinado a 400°C con 50,000X de amplificación.

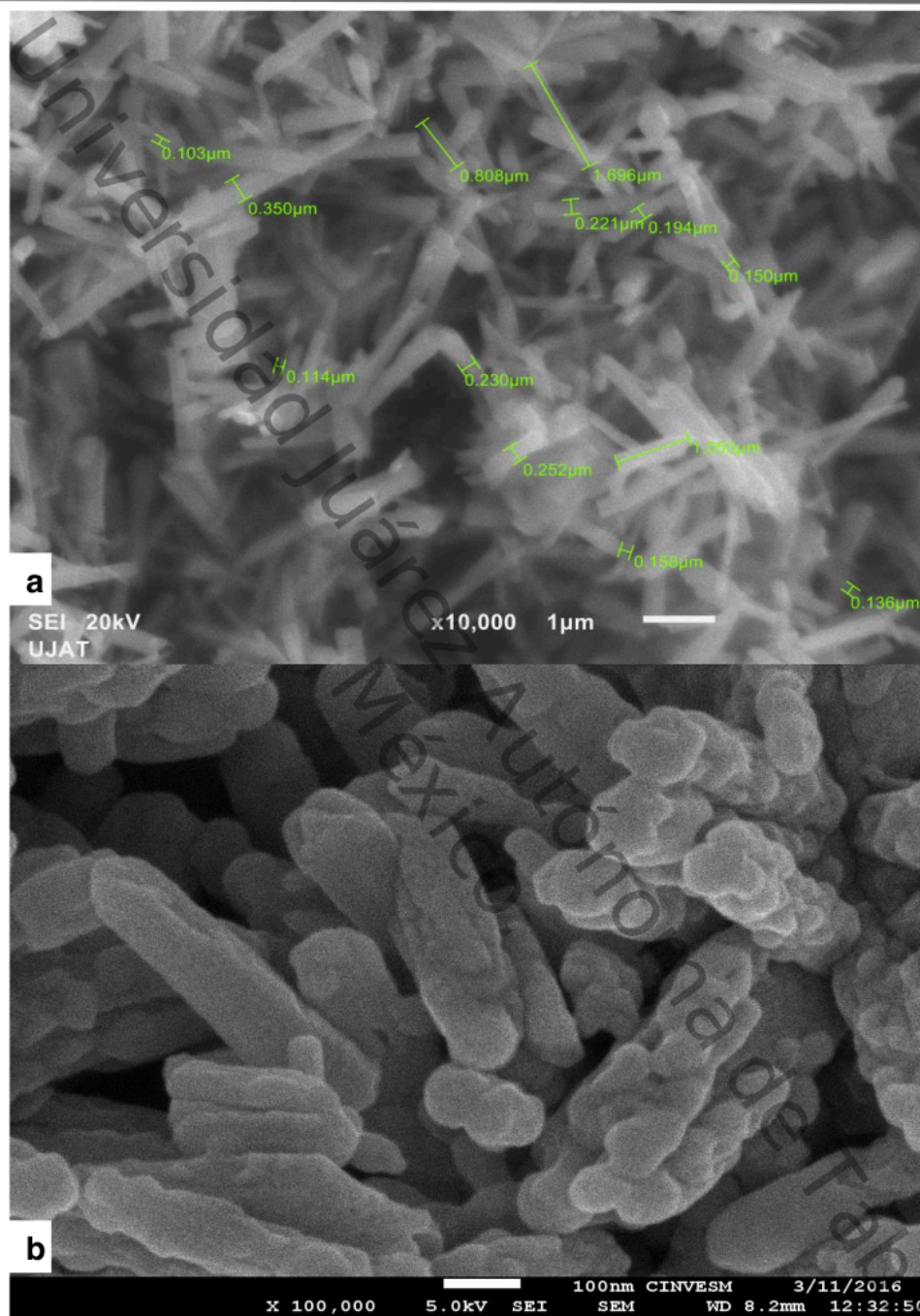


Figura 18. Micrografía de material ZENa: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) con 10,000X de amplificación, b) FESEM de material calcinado a 400°C con 100,000X de amplificación.

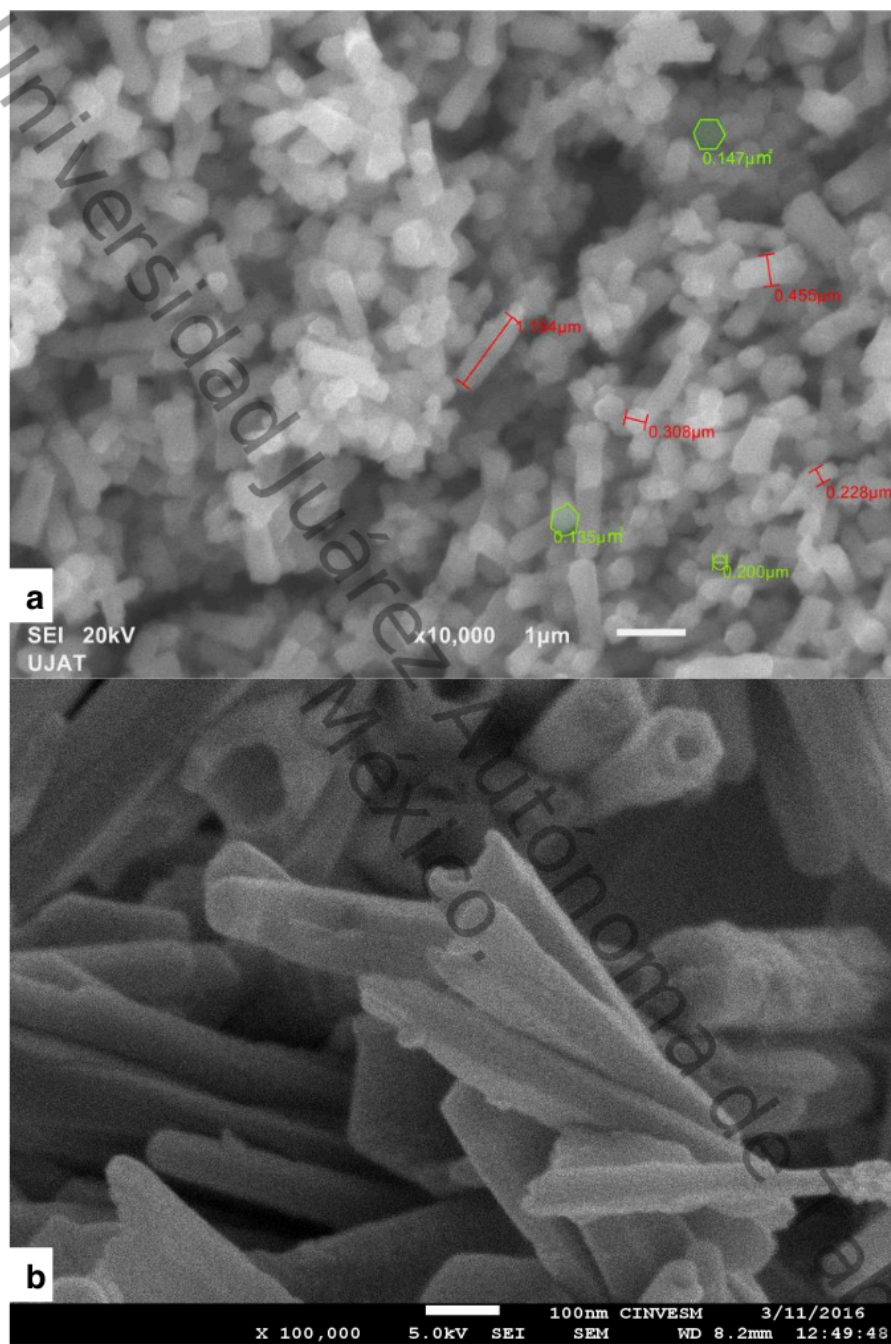


Figura 19. Micrografía de material ZEA: a) MEB de material seco a 70°C (fresco) a 10,000X de magnificación, b) FESEM calcinado a 400°C a 100,000X de magnificación.

En las micrografías se observa el cambio en la morfología de los materiales causado por el tratamiento térmico y el solvente. En la Tabla 9 se describen las diferentes formas de partículas obtenidas de acuerdo con el solvente y el tratamiento térmico.

Tabla 9. Morfologías de partículas de ZnO de acuerdo con el solvente y el tratamiento térmico.

MUESTRA	SOLVENTE	SECO A 70°C	CALCINADO A 400°C
ZBNa	Butanol	Varillas	Aglomerados esferoidales y hojas
ZBA	Butanol	Agujas	Aglomerados esferoidales
ZENa	Etanol/agua	Agujas	Bastones aglomerados
ZEa	Etanol/agua	Varillas hexagonales	Tubos hexagonales
Z	Etanol/agua	Varillas hexagonales	Varillas y agujas hexagonales

El material Z fresco (Figura 15a) son varillas con apariencia fibrosa y su forma es similar al acetilacetato de zinc hidratado (Figura 15c). Con el tratamiento térmico se formaron agujas y varillas con forma hexagonal en el rango de 50 a 900 nm de ancho y 200 nm a 1.5 μm de largo. Este material no tiene homogeneidad en el tamaño y forma de las partículas, lo cual podría estar relacionado con el hecho que este material se elaboró sin modificar el pH de reacción, de acuerdo con lo reportado por Heather A. Barrett, 2011 [69] y Amel Dakhlaoui, 2009 [70]; donde se discute la influencia de la concentración de OH^- en la variación de tamaño y la morfología del ZnO, por otro lado, la constitución hexagonal de partículas de ZnO Svetozar Musić, 2012 [71] lo atribuye a que el acetilacetato de zinc interacciona como una plantilla durante la hidrólisis dando la disposición hexagonal a las partículas.

En el material ZBNa el tratamiento térmico modificó su morfología, el material fresco (Figura 16a) posee forma de varillas con agregados de materia orgánica residual, este resultado soporta los datos obtenidos por DRX (Figura 13), tiene variedad en los tamaños de partículas entre 800 nm a 1.5 μm de ancho y de 5 a 13 μm de largo. Después del tratamiento térmico (Figura 16b) se formaron aglomerados de nanopartículas esferoidales con tamaños entre 100 y 150 nm, también se observa

parte de este material en forma de hojas de mayor tamaño. De forma similar, la morfología del material ZBA también se modificó con el tratamiento térmico, el material fresco (Figura 17a) con forma de agujas de 50 a 100 nm de ancho y 500 nm a 1.6 μm de largo y otra parte del material tiene forma de varillas de mayor tamaño. Con el tratamiento térmico (Figura 17b) la forma de las partículas cambio definitivamente a aglomerados esferoidales con tamaños entre 50 a 80 nm,

En ambos materiales elaborados con butanol se formaron nanopartículas esferoidales después del tratamiento térmico (Tabla 9), lo cual puede estar relacionado con la naturaleza del solvente, por otro lado, el material ZBA definió su morfología después del tratamiento térmico, no fue así para el material ZBNa puesto que se observan dos formas de partículas, lo cual nos sugiere que la definición de la morfología en la muestra ZBA es propiciada por el NH_3OH .

El material ZENa fresco (Figura 18a) tiene forma de agujas 100 a 200 nm de ancho y de 800 nm a 1.7 μm de largo, después del tratamiento térmico (Figura 18b) se observan partículas aglomeradas con forma de varillas con superficie porosa visible de tamaños entre 100 a 150 nm. El material ZEA fresco (Figura 19a) posee forma de varillas hexagonales de 100 a 300 nm de ancho y de 500 nm a 1.2 μm de largo, con el tratamiento térmico el tamaño de partícula disminuyó entre 50 y 80 nm con forma de tubos hexagonales con diferente amplitud de poro (Figura 19b). La formación tubular fue propuesta por H. Wang, 2010 [72] y Svetozar Musić, 2012 [71], donde explican que la formación de partículas huecas o tubulares de ZnO es originada por la disolución preferencial en el interior de varillas de ZnO y la correspondiente extracción de Zn^{2+} a lo largo del eje c, Svetozar Musić, explica que esto a su vez puede depender de la concentración de partida de acetilacetato de zinc, derivado de que en su trabajo a partir de 2g de acetilacetato obtuvieron partículas huecas [71], lo cual coincide con la cantidad de acetilacetato de zinc utilizado en el presente trabajo para realizar cada material de ZnO.

En los tres materiales sintetizados con solución etanol/agua (Z, ZENa y ZEA) después de ser tratadas térmicamente se obtuvieron partículas alargadas (varillas,

tubos, agujas o bastones) lo cual podemos atribuir a la naturaleza del solvente, por el hecho que en los materiales sintetizados con butanol se observan otras morfologías después del tratamiento térmico (Tabla 9).

Los catalizadores NaOH y NH_3OH influyeron en los tamaños de partículas puesto que los materiales frescos de ZBNa (Figura 16a), ZBA (Figura 17a), ZENa (Figura 18a) y ZEA (Figura 19a) son partículas de menor tamaño que el material Z. El NH_3OH propició la formación completa de los materiales ZBA y ZEA, ya que no se observan agregados de materia orgánica residual en los materiales frescos, este resultado soporta los datos obtenidos por FT-IR; además estos materiales adoptaron una sola morfología después del tratamiento térmico a 400°C en tamaños de partículas menores que ZBNa y ZENa (ver Tabla 9), por tal hecho con la intención que exista mayor eficiencia en la distribución e interacción entre las nanopartículas y el medio celular, son los materiales que se funcionalizaron con 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico.

3.2 EFECTO DE LA FUNCIONALIZACIÓN CON MOLÉCULAS ORGÁNICA EN LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ZnO

El cáncer es una enfermedad que ha aumentado en los últimos años y ha afectado a millones de personas en el mundo, entre los cánceres que afectan en mayor proporción a la población femenina se encuentra el cáncer de cérvix. Como bien se sabe la forma actual de tratamiento produce efectos adversos importantes, de ahí la necesidad de generar nuevas terapias de tratamiento; en ese sentido recientemente se inició la investigación de la actividad citotóxica del ZnO, resultando que este material tiene potencial en la aplicación. En este trabajo se realizó la funcionalización de dos materiales sintetizados de ZnO por el método sol-gel, de acuerdo con los resultados obtenidos en las caracterizaciones físico-químicas ZBA y ZEA calcinados fueron los materiales adecuados para explotar en la aplicación; los agentes funcionalizantes fueron moléculas orgánicas (1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico) con propiedades citotóxicas conocidas, con la finalidad que aporte mejoras en la dispersión del ZnO en el medio celular y a su vez genere mayor actividad específica en células tumorales. En la Tabla 10 se describe el nombre dado a las muestras ZBA y ZEA funcionalizadas por el método de impregnación.

Tabla 10. Descripción del nombre dado a las muestras ZBA y ZEA funcionalizadas por el método de impregnación.

NOMBRE	MUESTRA FUNCIONALIZADA	MOLECULA ORGÁNICA
ZBA-FEN	ZBA	1,10-fenantrolina (FEN)
ZBA-AS	ZBA	L-ácido ascórbico (AS)
ZBA-AC	ZBA	Ácido acético (AC)
ZEA-FEN	ZEA	1,10-fenantrolina (FEN)
ZEA-AS	ZEA	L-ácido ascórbico (AS)
ZEA-AC	ZEA	Ácido acético (AC)

3.2.1 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Por espectroscopía ultravioleta-visible se identificaron las bandas de absorción de los grupos funcionales incorporados en la superficie de ZnO, en la Figura 20 se presentan dichos resultados.

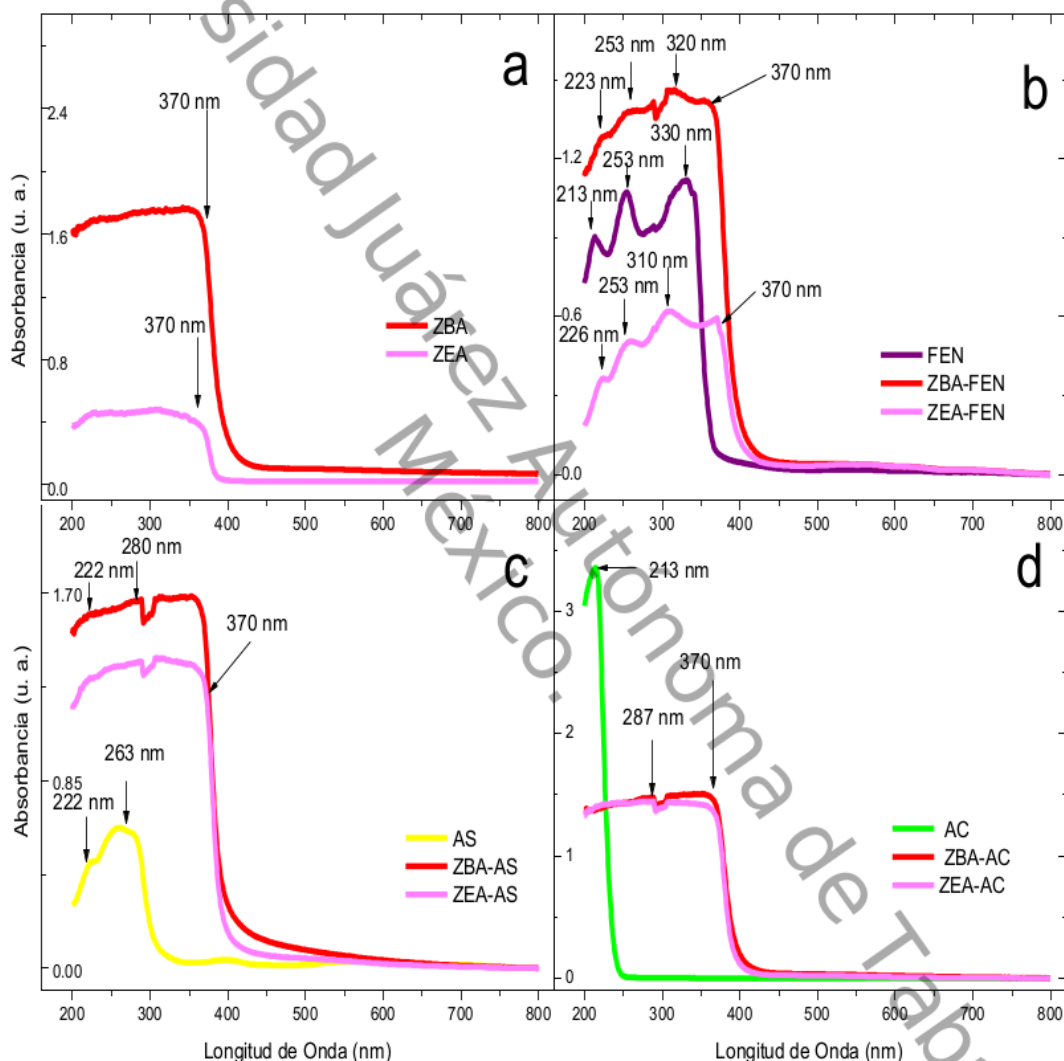


Figura 20. Espectros UV-Vis de materiales sólidos de ZnO: a) materiales ZBA y ZEA calcinados a 400°C, b) 1,10-fenantrolina (FEN) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con FEN, c) L-ácido ascórbico (AS) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con AS, d) solución 0.1 M de ácido acético glacial (AC) y materiales ZBA y ZEA funcionalizados con AC.

De acuerdo con la literatura el grupo Zn-O presenta una señal de absorción en la región ultravioleta aproximadamente ~360 nm, en ambas muestras ZBA y ZEA esta señal se localiza en 370 nm, en la Figura 20 observamos que esta señal aparece en todos los materiales funcionalizados. En el espectro de UV-Vis de FEN (Figura 20b) se encontraron 3 señales en la región UV, localizadas en 330, 253 y 213 nm; estas señales se localizaron en la muestra ZBA-FEN en 320, 353 y 223 nm, y ZEA-FEN en 310, 253 y 226 nm, de acuerdo con S. A. Sadeek estas señales son conocidas en hidrocarburos insaturados que contienen grupos similares a la piridona, en los materiales de ZnO estas señales se encuentran desplazadas indicando una posible interacción por puentes de hidrogeno o una coordinación del ligando FEN y el ion metálico [73].

En la Figura 20c observamos el espectro UV-Vis de AS con dos señales características para este compuesto en 263 y 222 nm [74], estas señales se localizaron en la muestra ZBA-AS y ZEA-AS en 280 y 222 nm. El espectro UV-Vis de AC (Figura 20d) presenta su señal característica del grupo carbonilo (C=O), en 213 nm, en las muestras ZBA-AC y ZEA-AC esta señal se desplazó a 287 nm. Los desplazamientos de las señales de UV-Vis en los materiales funcionalizados con AS y AC indican posibles enlaces por puentes de hidrógenos entre los grupos hidroxilos del óxido de zinc y las moléculas AS y AC.

3.2.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

Con la técnica espectroscópica de infrarrojo con transformada de Fourier se identificaron las señales características del ZnO y los grupos funcionales incorporados por impregnación de tres moléculas orgánicas, 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico, a continuación, se presentan en la Figura 21 dichos espectros y en la Tabla 11 se describen cada una de las bandas de absorción FT-IR en cada muestra.

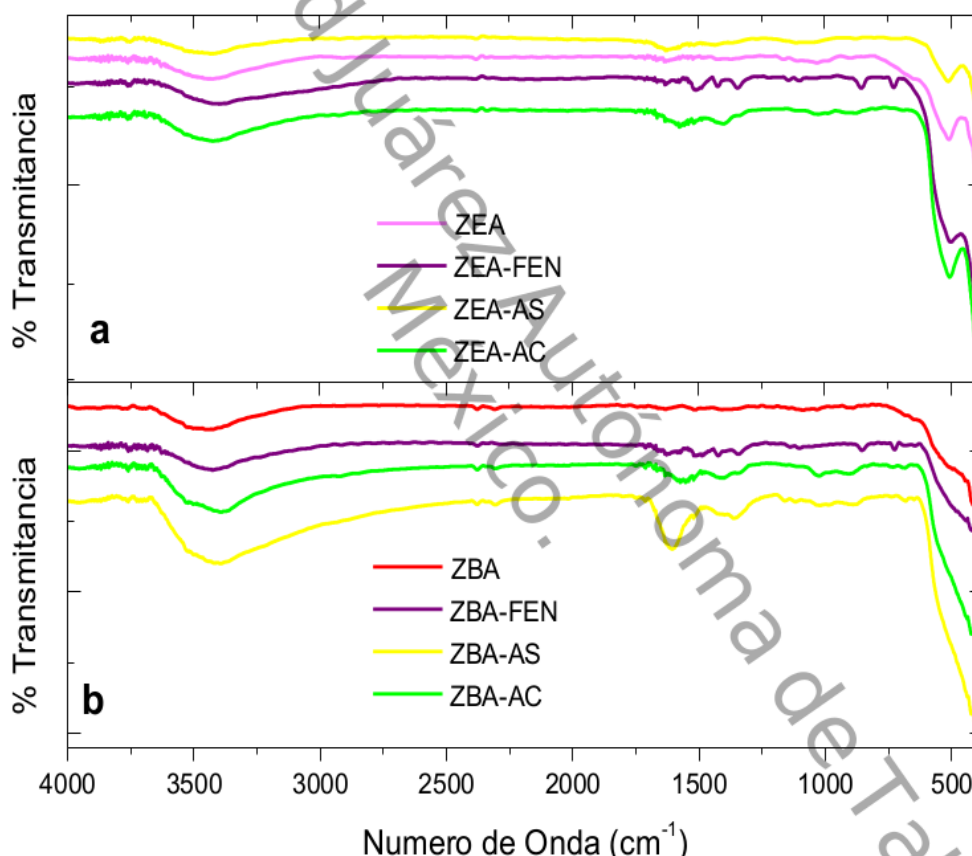


Figura 21. Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de materiales de ZnO funcionalizados: 20a) muestra ZEA calcinada a 400°C y funcionalizada con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC); 20b) muestra ZBA calcinada a 400°C y funcionalizada con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC).

Tabla 11. Asignación de bandas de FT-IR de las muestras ZEA y ZBA funcionalizada con 1,10-fenantrolina, ácido ascórbico, ácido acético.

Número de Onda (cm ⁻¹)						Asignación de bandas
ZBA-FEN	ZEA-FEN	ZBA-AC	ZEA-AC	ZBA-AS	ZEA-AS	
3429	3390	3439	3446	3401	3437	Tensión OH (Zn-OH)
2450-2306		2450-2306		2450-2306		Sobretono de flexión fuera del plano
1645						
		1624	1578	1583	1620	Estiramiento asimétrico C=O
				1418	1516	Vibración tijera C-H ₂
1511	1512					C-N (FEN)
1427	1430					C-N (FEN)
		1356	1389			Estiramiento simétrico C-O
				1036		Estiramiento C-C
				891		Estiramiento C-C
		881	875			Flexión C-O-H
850	854					C-H (FEN)
726	729					C-H (FEN)
571	554	540	535	540	526	Estiramiento Zn-O
416	423	427	402	416	404	Estiramiento Zn-O

Los materiales ZBA y ZEA fueron funcionalizados con 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico con la finalidad de crear nanopartículas con mayor actividad citotóxica, la técnica de FT-IR nos brindó información importante sobre la conformación de estos materiales. A continuación, se discute la Figura 21 que muestra los espectros FT-IR, la figura 21a corresponde a la muestra ZEA funcionalizada y 20b la muestra ZBA funcionalizada.

De acuerdo a la figura 21a, todas las muestras ZEA presentan la señal de estiramiento de grupos OH, en el material ZEA calcinado a 400 °C esta banda está situada aproximadamente en 3450 cm⁻¹, en los materiales funcionalizados estas señales se encuentran desplazadas a mayores energías (ver Tabla 11).

En el material ZEA-AS se observan la señal del grupo C=O y la vibración del tipo tijera de C-H₂ en 1620 cm⁻¹ y 1516 cm⁻¹ respectivamente [75]. La muestra ZEA-AC tiene las señales características de ácido acético, en 1528 cm⁻¹ el estiramiento asimétrico del grupo C=O, posteriormente en 875 cm⁻¹ se sitúa la señal de flexión del grupo C-O-H y en 1389 cm⁻¹ el estiramiento del grupo C-O.

En el material ZEA-FEN se aprecian las dos señales de estiramiento del grupo C-N en 1512 y 1430 cm⁻¹ [76]. En todos los materiales ZEA funcionalizados las bandas de FT-IR se desplazan a mayores energías con respecto al espectro del material ZEA, lo que nos indica que existe una interacción de tipo Van der Waals entre los grupos funcionales agregados por impregnación de 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico y el ZnO.

Analizando la Figura 20b, se observan diferencias en cuanto al rango de amplitud en la señal que corresponde al estiramiento de los grupos OH presentes en las muestras, en el material ZBA esta señal está situada en 3448 cm⁻¹, mientras que para las muestras funcionalizadas ZBA-FEN, ZBA-AC y ZBA-AS esta señal es más ancha y se encuentra desplazada a mayores energías (ver tabla 11). Los materiales ZBA-AC y ZBA-AS tienen la señal de estiramiento del grupo C=O en 1624 y 1620 cm⁻¹ respectivamente. El material ZBA-FEN tiene las dos señales características de estiramiento del grupo C-N en 1511 y 1427 cm⁻¹ [76]. Todos los materiales ZBA funcionalizados presentan las señales corresponde al estiramiento del grupo Zn-O, pero se observa que estas señales están desplazadas hacia energías más altas, lo que nos sugiere que pueden existir interacciones tipo Van der Waals entre el ZnO y las moléculas orgánicas.

3.2.3 PROPIEDADES TEXTURALES

El análisis de área superficial y porosidad permite identificar las modificaciones en la superficie del ZnO por la adición de las moléculas orgánicas. Mediante fisisorción de N₂ se obtuvieron los parámetros de textura (Tabla 12): área superficial, diámetro y volumen total de poro; las isotermas de adsorción-desorción (Figura 22) y la distribución de diámetro poros (Figura 23) de los materiales ZnO funcionalizados.

Tabla 12. Parámetros de textura de materiales ZBA y ZEA funcionalizados.

MUESTRAS	ÁREA SUPERFICIAL (m ² /g)	DIÁMETRO DE PORO (nm)	VOLUMEN TOTAL DE PORO (cm ³ /g)
ZBA	21	31	0.3
ZBA-FEN	17	31	0.2
ZBA-AS	21	31	0.2
ZBA-AC	20	31	0.2
ZEA	5	4	0.03
ZEA-FEN	4	3	0.01
ZEA-AS	4	3	0.01
ZEA-AC	6	4	0.03

La adición de grupos funcionales al ZnO no modificó de forma importante sus propiedades texturales (Tabla 12). Con respecto a ZBA, los materiales funcionalizados ZBA-AS y ZBA-AC no presentaron cambios relevantes en sus parámetros texturales, únicamente el material ZBA-FEN disminuyó ligeramente su valor de área superficial, lo cual puede atribuirse a una mayor retención de moléculas de FEN en la superficie o dentro de los poros del material ZBA. En los materiales ZEA funcionalizados la morfología de las nanopartículas (nanotubos hexagonales) tuvo un papel importante en el acomodo de los grupos funcionales. En las muestras ZEA-FEN y ZEA-AS los parámetros texturales disminuyen ligeramente con respecto a ZEA. Esto sugiere que la mayor parte de las moléculas de FEN y AS se incorporaron dentro de los nanotubos de ZEA. En la muestra ZEA-AC los parámetros texturales no cambiaron lo cual podría ser por la poca retención de moléculas de AC en el material ZEA.

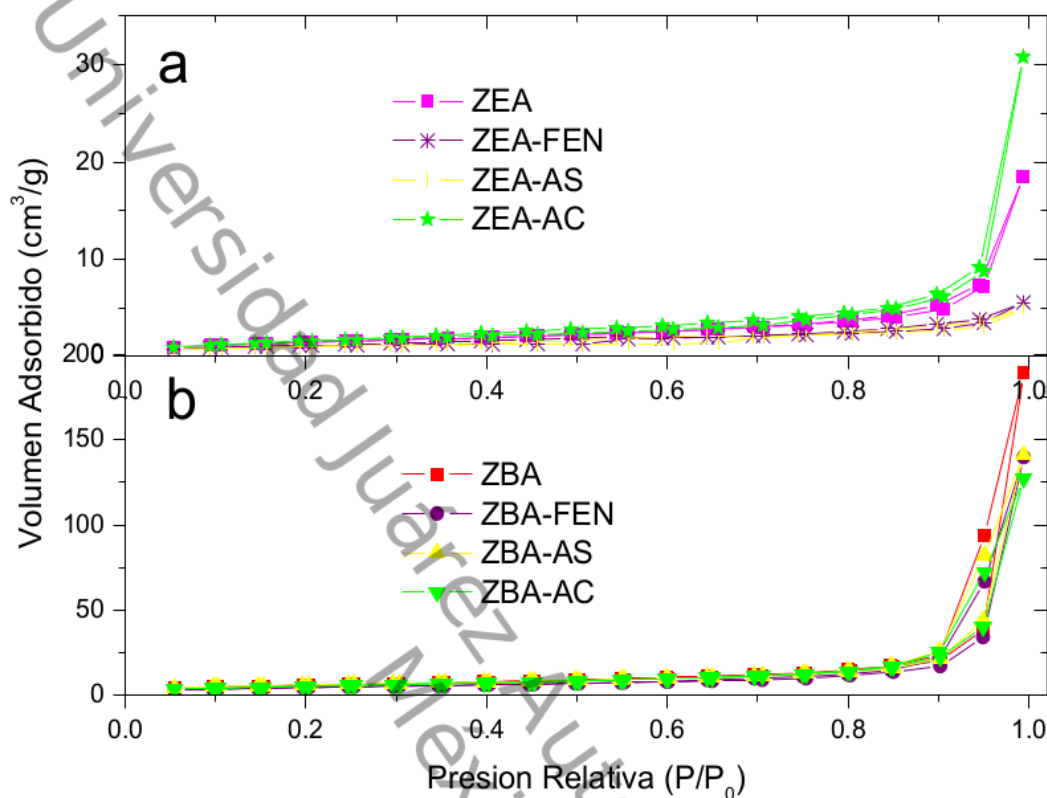


Figura 22. Isothermas de adsorción-desorción por el método BET de materiales de ZnO funcionalizadas: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); b) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC).

Se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción de N₂ de los materiales de ZnO funcionalizados (Figura 22). En todas las muestras ZBA y ZEA funcionalizadas se obtuvieron materiales mesoporosos, puesto que las isothermas son del tipo IV, de acuerdo con la clasificación IUPAC. El ciclo de histéresis de las muestras son de tipo H3 que corresponde a sólidos con poros abiertos con tamaño y forma no uniforme. Con respecto a ZBA, las muestras de ZBA funcionalizadas (ZBA-FEN, ZBA-AC, ZBA-AS), a presiones relativas altas, hay una pequeña disminución de

volumen de gas adsorbido, esto por la cantidad de grupos funcionales ocluidos en el ZnO. Por otro lado, con respecto a ZEA, las muestras ZEA-FEN y ZEA-AS disminuye el volumen adsorbido a partir de presiones relativas de 0.3 (P/P_0), lo cual está relacionado con la cantidad de 1,10-fenantrolina y ácido ascórbico que se encuentra ocluido en los poros del ZnO. Por el contrario, el material ZEA-AC aumenta el volumen adsorbido a partir de 0.3 (P/P_0), esto podría ser debido al acomodo del ácido acético en la superficie del ZnO.

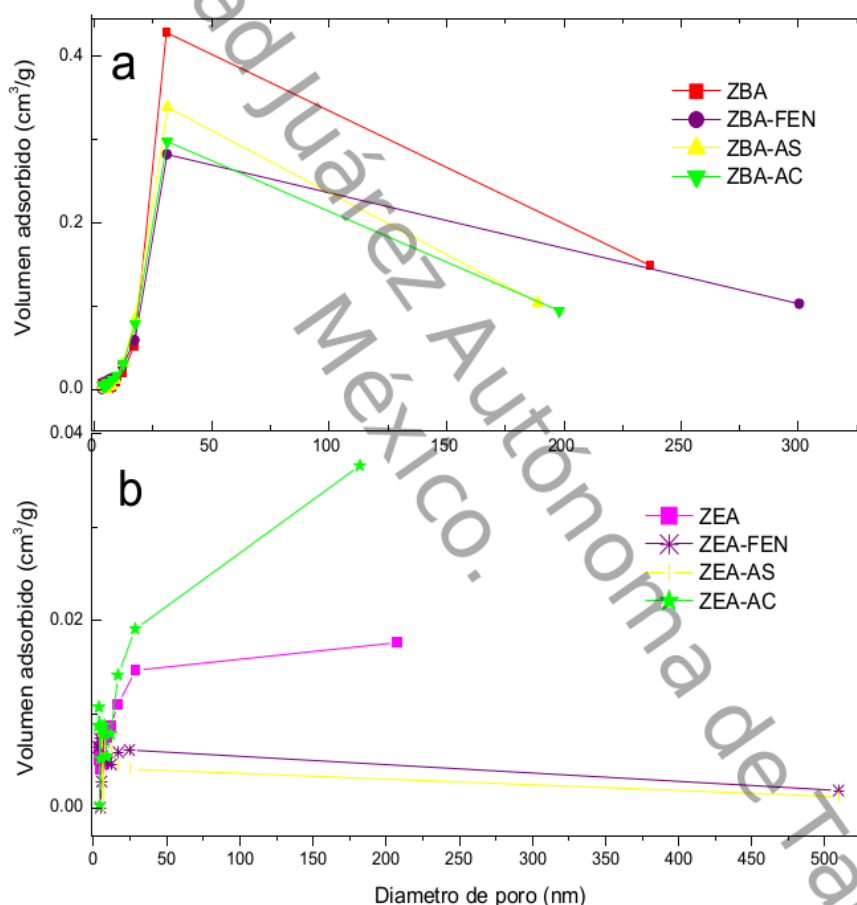


Figura 23. Gráficas de distribución de diámetros de poros de materiales de ZnO funcionalizados: a) y b) material ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); c) y d) material ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC).

En las gráficas de distribución de diámetros de poros de los materiales ZBA y ZEA funcionalizados (Figura 23) se aprecia la modificación del diámetro de poros por la adición de los grupos funcionales, en todas las muestras se obtuvieron materiales con distribución de poros no homogénea, con diámetros arriba de 3 nm hasta macroporos.

En las muestras ZBA funcionalizadas (ZBA-FEN, ZBA-AS, ZBA-AC) la distribución de poros es similar a la muestra ZBA, con cambios en el volumen adsorbido (Figura 23a), los volúmenes adsorbidos de N₂ son menores en los poros más anchos por la oclusión de las moléculas orgánicas.

En las muestras ZEA funcionalizadas (ZEA-FEN, ZEA-AS, ZEA-AC) los volúmenes adsorbidos están relacionados con el acomodo de los grupos funcionales en el ZnO. La muestra ZEA-AC posee una distribución de poros similar a ZEA (Figura 23b). En las muestras ZEA-FEN y ZEA-AS aumentan los diámetros de poros y los volúmenes adsorbidos son menores que las muestras ZEA y ZEA-AC, esto es debido al acomodo de la 1,10-fenantrolina y el ácido ascórbico en los poros del ZnO, lo cual puede ser favorecido por la morfología hueca de las partículas del material ZEA, mientras que el ácido acético podría encontrarse en la superficie o por la poca cantidad de esta molécula incorporada en el ZnO, de acuerdo con los datos obtenidos con el análisis termogravimétrico (Figura 24).

3.2.4 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El análisis termo gravimétrico se realizó con la finalidad de conocer la estabilidad térmica del ZnO funcionalizado con diferentes moléculas orgánicas, en la Figura 24 se presentan los termogramas de las muestras.

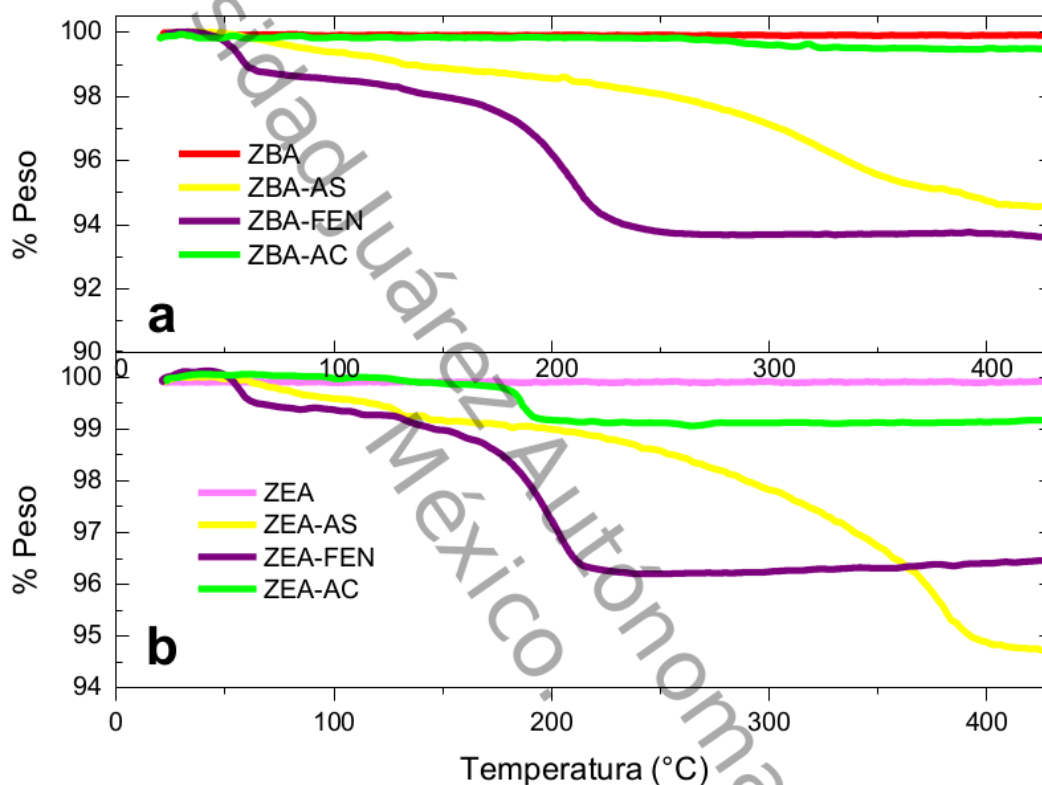


Figura 24. Termogramas de los materiales de ZnO funcionalizados: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS) y ácido acético (ZBA-AC); b) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS) y ácido acético (ZEA-AC).

El análisis termogravimétrico nos brindó información importante sobre la estabilidad de los grupos funcionales incorporados en la superficie del ZnO. De acuerdo con la Figura 24, los materiales de ZnO funcionalizados perdieron peso conforme aumento

la temperatura, no fue así con los materiales que no fueron funcionalizados (ZBA y ZEA), puesto que estos materiales fueron tratados térmicamente a 400°C. Los materiales funcionalizados con ácido ascórbico (ZBA-AS y ZEA-AS) presentaron pérdida del 1% de peso entre 50°C y 135°C, que corresponde a la eliminación de residuos de agua utilizada en el proceso de la funcionalización, posteriormente las muestras presentaron pérdida constante de peso aproximadamente del 5% entre 153°C a 400°C, que es debido a la descomposición de la molécula de AS. El punto de fusión de AS se encuentra ~190°C, este resultado supone la estabilidad del AS en la superficie del ZnO.

En cuanto a la funcionalización del ZnO con ácido acético, la descomposición de esta molécula se registró en temperaturas mayores a 150°C, esto nos indica la estabilidad de la funcionalización con AC, puesto que su punto de fusión se encuentra ~17°C. En el material ZBA-AC presentó pérdida de peso constante entre 280 y 350°C, de manera similar el material ZEA-AC perdió peso entre 150 y 190°C, estos materiales disminuyeron el 0.5 y 1% en peso respectivamente.

Los materiales funcionalizados con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN y ZEA-FEN) perdieron 0.5% y 1% de peso entre 50 y 70°C que es debido a la eliminación de residuos del solvente utilizado en el proceso de la funcionalización, posteriormente entre la temperatura de 70 y 150°C ambas muestras perdieron 2% y 1% en peso respectivamente, que corresponde a la pérdida de agua y la FEN que comienza a descomponerse. Después entre la temperatura de 150 y 250°C se registró pérdida importante de masa, en la muestra ZEA-FEN fue del 4% y en ZBA-FEN del 6%, esto puede ser por la descomposición de la molécula FEN, el punto de fusión de esta molécula es ~115°C, esto nos indica la estabilidad de la funcionalización con FEN.

El análisis térmico confirmó la estabilidad de los grupos funcionales incorporados en el ZnO, puesto que las tres moléculas (AC, AS y FEN) necesitan mayor temperatura para descomponerse, esto podría ser por el efecto de la interacción de estas moléculas orgánicas con los grupos -OH del ZnO.

3.2.5 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La técnica de DRX permitió identificar las posibles modificaciones en la cristalinidad del ZnO por la funcionalización con moléculas orgánicas, en la Figura 25 se presentan los difractogramas y en el tamaño de cristalito calculado mediante la ecuación de Scherrer en la Tabla 13.

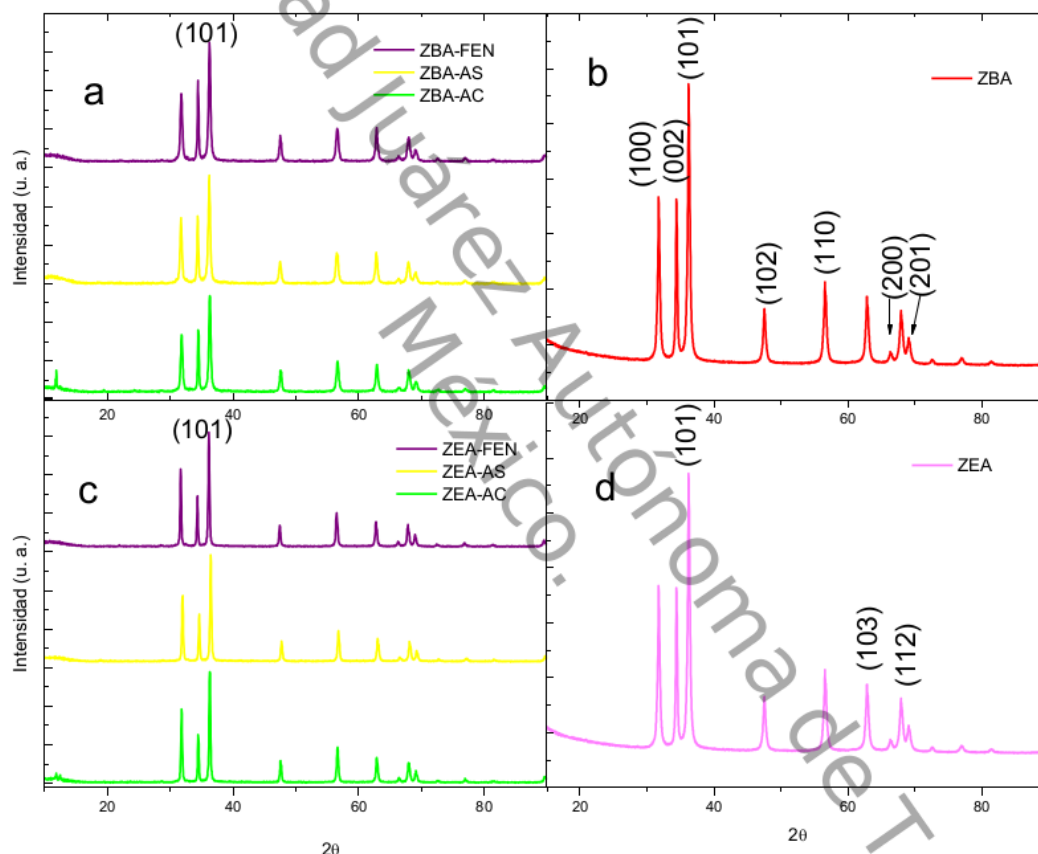


Figura 25. Difractogramas de ZnO funcionalizado: a) ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC); b) ZBA calcinado a 400°C; c) ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC); d) ZEA calcinado a 400°C.

Tabla 13. Tamaño de cristalito calculado mediante la ecuación de Scherrer con respecto al pico (101), para los materiales ZBA y ZEA funcionalizados con 1,10-fenantrolina, ácido ascórbico y ácido acético.

Materiales	Tamaño de cristalito (nm)
ZBA	13
ZBA-FEN	19
ZBA-AS	18
ZBA-AC	16
ZEA	18
ZEA-FEN	23
ZEA-AS	19
ZEA-AC	23

La adición de grupos funcionales en el ZnO no ha afectado su cristalinidad. En la Figura 25, observamos que los materiales ZBA y ZEA tratados térmicamente a 400°C poseen las reflexiones características de la fase hexagonal wurtzita [64]. Los materiales ZBA y ZEA funcionalizados poseen las mismas reflexiones que ZBA y ZEA, que corresponden a los planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) y (201) [68]. Los materiales ZBA-AC y ZEA-AC tienen una reflexión adicional en 11° (2 teta) que corresponde a residuos de materia orgánica (C=O, C-O) posiblemente por la adición de ácido acético en estos materiales.

El tamaño de cristalito no presenta cambios importantes con la incorporación de moléculas orgánicas (Tabla 13), puesto que este valor cambió ligeramente en las muestras ZBA y ZEA funcionalizadas.

3.2.6 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ Y POTENCIAL Z

La dispersión dinámica de luz (DDL) nos brindó información sobre el comportamiento de los materiales en solución, con esta técnica se determinó el tamaño promedio de partículas (Figura 26) y el potencial Z (Tabla 14) nos permitió identificar las cargas del radio hidrodinámico de los materiales ZBA y ZBA tratados térmicamente a 400°C, y funcionalizados.

Tabla 14. Valor de potencial Z de materiales ZBA y ZEA funcionalizados.

MATERIALES	POTENCIAL Z (mV)
ZBA	8
ZBA-FEN	18
ZBA-AS	-9
ZBA-AC	7
ZEA	1
ZEA-FEN	11
ZEA-AS	-7
ZEA-AC	14

Todos los materiales que tienen como objetivo ser explotados en una aplicación biológica, deben ser explorados extensamente en su naturaleza biocompatible. De acuerdo con Rajesh Kumar y colaboración, nanopartículas con una superficie de carga altamente positiva podrían generar afinidad con células de cáncer, puesto que estas tienen en su membrana una alta concentración de fosfolípidos con grupos funcionales cargados negativamente [77]. Las posibles interacciones electrostáticas entre las nanopartículas de ZnO y las células podría promover la internalización del ZnO para generar citotoxicidad.

De acuerdo con la Tabla 14, los materiales ZBA y ZEA tienen potencial zeta positivo, la adición de grupos funcionales modificó su potencial dependiendo la molécula. El material ZBA tiene potencial zeta de 8 mV; funcionalizar esta muestra con FEN aumentó su carga positiva a 18 mV, no fue así con la adición de AC que bajo su carga positiva a 7 mV y en el caso de la funcionalización con AS, el potencial zeta

es de -9 mV. Por otro lado, el material ZEA tiene potencial zeta de 1 mV, este material funcionalizado con FEN y con AC aumentó su carga positiva a 11 y 14 mV respectivamente, por el contrario, con AS el potencial disminuyó a -7.

Los materiales de ZnO funcionalizados con FEN y AC mantuvieron potenciales positivos, posiblemente como un resultado de la carga positiva generada por iones metálicos formados por la interacción de las moléculas de FEN y AC con el medio acuoso. La modificación del potencial zeta positivo del ZnO a negativo con la funcionalización con AS, puede ser un resultado de la oxidación de la molécula de AS por su interacción con el medio acuoso, lo que da paso a la formación del radical ascorbato, por lo que se genera carga negativa.

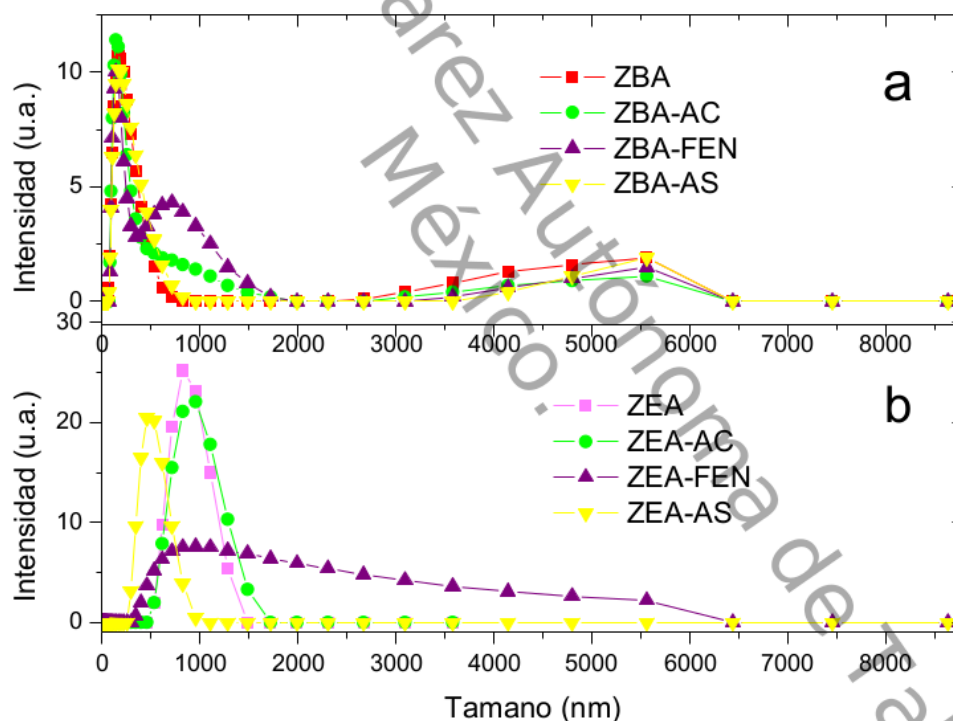


Figura 26. Tamaño promedio de partículas de ZnO, calculado por dispersión dinámica de luz: a) material ZBA y ZBA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZBA-FEN), ácido ascórbico (ZBA-AS), ácido acético (ZBA-AC); b) material ZEA y ZEA funcionalizado con 1,10-fenantrolina (ZEA-FEN), ácido ascórbico (ZEA-AS), ácido acético (ZEA-AC).

En la Figura 26 se presenta la distribución de tamaños de partículas de ZBA y ZEA tratados térmicamente a 400°C y ZBA y ZEA funcionalizados con moléculas orgánicas. Puede observarse que el material ZBA con tratamiento térmico a 400°C y ZBA-AS presenta una distribución de tamaños de 164 nm y 5537, con presencia de mayor número de partículas de 164 nm; los materiales ZBA-AC y ZBA-FEN tienen distribución de tamaños de partículas en 140 nm y 5537 nm, ambas muestras poseen mayor presencia de partículas de 140 nm, ZBA-FEN tiene otro grupo de tamaños de partículas de 700 nm, posiblemente como resultado de agregación en el medio acuoso de la 1,10-fenantrolina.

El material ZEA tratado térmicamente a 400°C presenta distribución de tamaños de partículas entre 627 a 1244 nm, el material ZEA-AS disminuyó su distribución de tamaños de partículas entre 354 a 719 nm; en cuanto al material ZEA-AC su distribución de tamaños de partículas se encuentra entre 514 a 1545 nm. Por otra parte, el material ZEA-FEN presenta un rango mayor en su distribución con partículas entre 400 a 6400 nm, al igual que ZBA-FEN podría ser resultado de la agregación de la 1,10-fenantrolina.

En todos los materiales que se realizó el estudio de DDL se obtuvieron diversos tamaños de partículas, esto nos indica que después de determinado tiempo se forman agregados de partículas en la solución, lo cual genera que la suspensión no sea totalmente estable.

3.2.5 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE LOS MATERIALES DE ZnO Y ZnO FUNCIONALIZADO

Anteriormente se han presentado y discutido las propiedades físico-químicas de los diferentes materiales de ZnO y ZnO funcionalizados, estos materiales han sido desarrollados con la finalidad de ser usados en aplicaciones biomédicas, por ello es indispensable el estudio de la respuesta biológica de los materiales.

Actualmente, el número de mujeres afectadas con cáncer de cérvix ha aumentado significativamente por la incidencia de casos de infección del virus de papiloma humano (VPH), por ello es de gran interés buscar nuevas terapias para atacar esta enfermedad, en ese sentido, recientemente se reportó la actividad citotóxica del ZnO. Los estudios *in vitro* son el primer paso que se suele utilizar para la comprensión de la actividad biológica de nanopartículas. Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan la complejidad de un sistema *in vivo*, debido al gran número de variables que interaccionan.

A continuación, se presentan los estudios de actividad citotóxica y antiproliferativa de los materiales de ZnO y ZnO funcionalizados, el análisis de actividad antiproliferativa se realizó en tres líneas celulares tumorales de cáncer de cérvix (SiHa, HeLa y casKi), que son provenientes de infección por VPH. Para el ensayo de citotoxicidad o viabilidad celular se aislaron células mononucleares de la sangre periférica de un individuo aparentemente sano, los dos ensayos se llevaron a cabo con la técnica XTT.

3.5.1 ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR

El estudio de viabilidad celular es el primer paso para conocer la citotoxicidad de los materiales, el análisis se realizó con la técnica XTT en monocitos aislados de la sangre periférica de un individuo aparentemente sano. Los resultados obtenidos de dicha evaluación corresponden a la medición de la absorbancia en 492 y 690 nm después de 48 horas de tratamiento en las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ con los materiales ZEA y ZBA funcionalizadas (Figura 27), y 72 horas de tratamiento en la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 28), en ambos ensayos se compararon los efectos de las concentraciones con las células control (CT) o sin tratamiento.

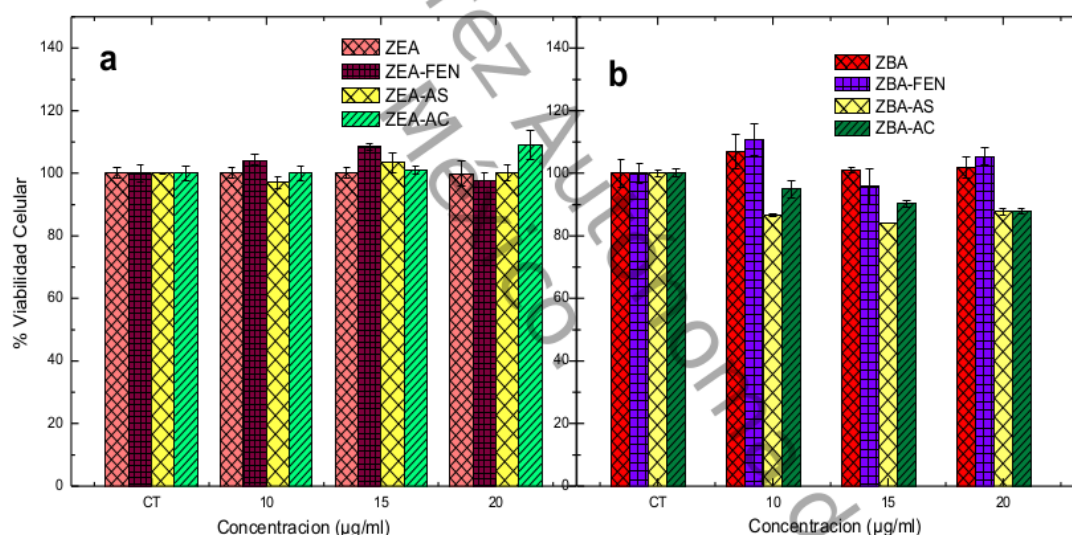


Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular en monocitos, después de 48 horas de tratamiento con las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$: a) materiales ZEA, ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AS; b) materiales ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AS.

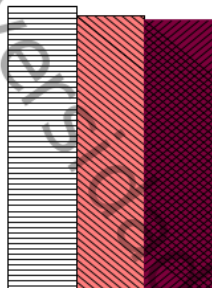


Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular evaluado en monocitos después de 72 horas de tratamiento con 30 $\mu\text{g/mL}$ de: a) material ZEA calcinado a 400°C y funcionalizado (ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AS) y b) ZBA calcinado a 400°C y funcionalizado (ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AS).

Se sabe que el ZnO puede generar toxicidad en concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/mL}$ [78], por esta razón se utilizaron concentraciones por debajo de este valor, puesto que los requerimientos básicos de biocompatibilidad de un material usado en el cuerpo humano son que éste debe ser no tóxico, no carcinógeno, no antigénico y no mutagénico [79]. El ensayo de viabilidad celular se realizó en monocitos con 48 horas de tratamiento en las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$ y a 72 horas de tratamiento en la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ para todas las muestras ZnO tratado térmicamente y ZnO funcionalizado. En la Figura 27a observamos los resultados de viabilidad celular obtenidos a 48 horas de tratamiento con la muestra ZEA y ZEA funcionalizada, el porcentaje de viabilidad celular se mantiene entre 97 y 100%, por lo tanto a estas concentraciones el material no es tóxico. En el ensayo de viabilidad con la muestra ZBA y ZBA funcionalizada (Figura 27b) a 48 horas de tratamiento, se obtuvo disminución del porcentaje en la viabilidad con los materiales ZBA-AC y ZBA-AS en la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, los tratamientos con ZBA-AC quedaron con 93, 99 y 86% de células vivas en las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

respectivamente, el porcentaje de viabilidad con el material ZBA-AS disminuyó a 90, 87 y 85 % para las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$; en la muestra ZBA-FEN y ZBA el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo entre 96 y 100%.

Se evaluó la citotoxicidad en mayor concentración y tiempo de tratamiento con la intención de descartar que la actividad biológica en células tumorales a la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ pueda ser inducida por la toxicidad de los materiales expresada en mayor tiempo de tratamiento. En la Figura 28 se observa que todos los materiales mantienen el porcentaje de viabilidad celular arriba del 90%, lo cual nos indica que los materiales son biocompatibles. En los materiales ZBA funcionalizado (ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AS) aumentó el porcentaje de viabilidad celular en comparación con el ensayo a 48 horas de tratamiento (Figura 27), esto puede ser efecto de la afinidad generada por los grupos funcionales provenientes de la FEN, AC y AS; en este último (AS) se ha reportado que actúa como un protector de efectos secundarios tóxicos en modelos *in vitro* [8] e *in vivo* de ensayos quimioterapéuticos y anticancerígenos en ratones [49].

3.5.2 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

La actividad antiproliferativa de los materiales ZEA, ZEA-FEN, ZEA-AS, ZEA-AC, ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AC, se evaluó en las concentraciones de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ después de 72 horas de tratamiento, el ensayo se realizó en las líneas tumorales CaSki, SiHa y HeLa, los resultados de los tratamientos se presentan en las Figuras 29 y 30. El efecto de los materiales se determinó como un porcentaje de la proliferación celular en relación con las células control (CT). Los ensayos son comparados con la actividad del cis-platino en la concentración de 10 μM (equivalente a 3 $\mu\text{g/ml}$), que es la dosis de tratamiento adecuada en pacientes [43].

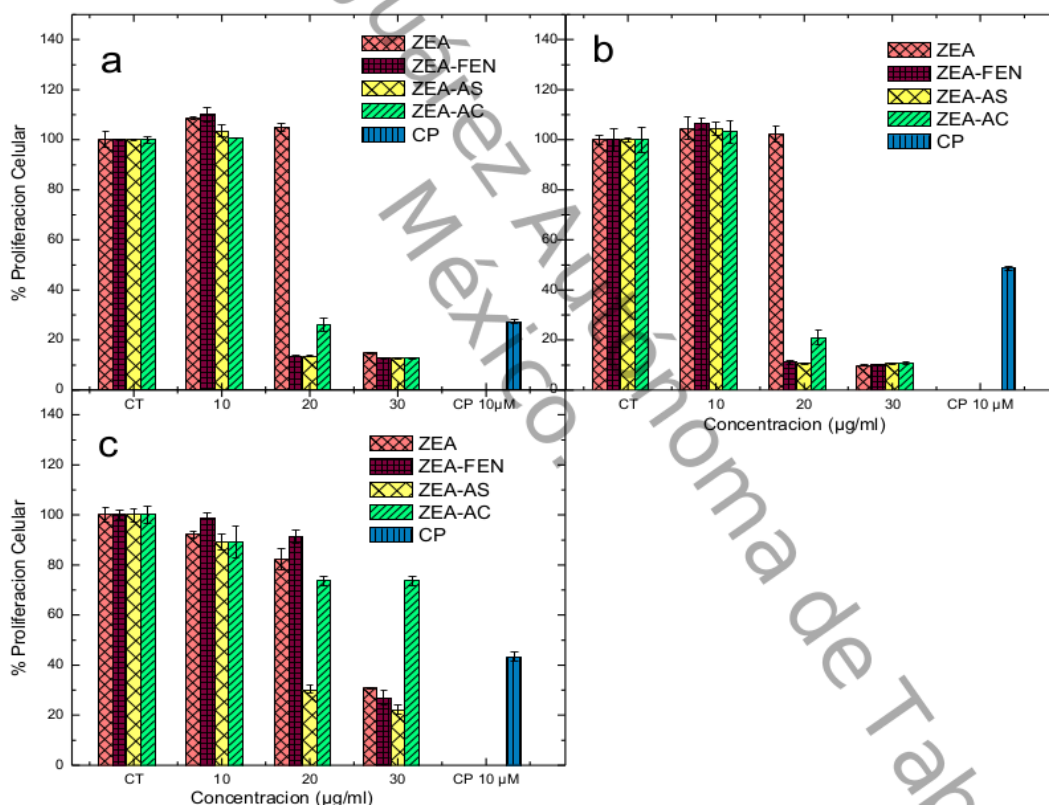


Figura 29. Porcentaje de proliferación celular después de 72 horas de tratamiento con los materiales ZEA calcinada a 400°C y funcionalizada (ZEA-AC, ZEA-FEN y ZEA-AS), evaluada en tres concentraciones, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$, comparando su efecto con cis-platino a 10 μM , en las líneas tumorales: a) CaSki, b) SiHa y c) HeLa.

Las líneas celulares CaSki, SiHa y HeLa, que se utilizaron en este estudio poseen la característica de proliferar abundantemente, por ello, medir el efecto de las nanopartículas de ZnO en esta actividad fue importante para determinar su potencial en la aplicación. En la Figura 28 se presentan las gráficas de los tratamientos con los materiales ZEA, ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AC en dichas líneas tumorales.

El ensayo en la línea tumoral CaSki (Figura 29a), muestra que los materiales ZEA funcionalizados (ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AC) tuvieron efecto importante en la reducción de la proliferación celular a partir de los 20 $\mu\text{g/ml}$ con respecto al control (sin tratamiento) y al material ZEA que se mantuvieron con el 100% de células vivas, y al cis-platino con el 25% aproximadamente; puesto que los materiales ZEA-FEN y ZEA-AS quedaron con 14% y ZEA-AC 26% de proliferación celular a esta concentración. En el tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$ el material ZEA mostró efecto con la reducción en la proliferación a 15% y los materiales ZEA-FEN, ZEA-AC y ZEA-AS aumentaron su actividad antiproliferativa a esta concentración puesto que la proliferación celular se mantuvo con el 13% de células vivas.

En las gráficas de porcentaje de proliferación en la línea tumoral SiHa con los tratamientos de los materiales ZEA calcinado a 400°C y ZEA funcionalizado (Figura 29b). Se observa que con el tratamiento a 10 $\mu\text{g/ml}$ no hay ningún efecto en la reducción de la proliferación celular; por otro lado, con el tratamiento a 20 $\mu\text{g/ml}$ aumentó la actividad antiproliferativa en los materiales de ZEA funcionalizados, puesto que el material ZEA-AC redujo a 20% la cantidad de células vivas, y los materiales ZEA-FEN y ZEA-AS redujeron a 10% de la proliferación celular, el efecto de estos materiales fue importante en comparación con el cis-platino que redujo a 35% de proliferación, el control y la muestra ZEA se mantuvieron con el 100% de células vivas. Con el tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$ aumenta la actividad antiproliferativa del material ZEA y ZEA-AC, quedando al igual que los materiales ZEA-FEN y ZEA-AS con el 10% de proliferación celular.

En los ensayos realizados con la línea tumoral HeLa (Figura 29c), se observa que todos los materiales de ZEA en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ tienen poca actividad

antiproliferativa con respecto al control, a esta dosis los materiales ZEA, ZEA-AC, ZEA-AS quedaron con 92 y 89%, y el material ZEA-FEN con 98% de proliferación celular. Con el tratamiento a 20 $\mu\text{g/ml}$ los materiales ZEA, ZEA-FEN y ZEA-AC el porcentaje de proliferación se redujo a 82, 91 y 74% respectivamente, el material ZEA-AS en comparación con el cis-platino, disminuye en gran medida el porcentaje de proliferación a esta concentración, puesto que con este material se reduce a 30% de células vivas. El tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$ los materiales ZEA, ZEA-FEN y ZEA-AS muestran actividad importante con la reducción a un porcentaje de 31, 27 y 22% en la proliferación, no fue así con el material ZEA-AC que se mantuvo en 74% en la proliferación celular.

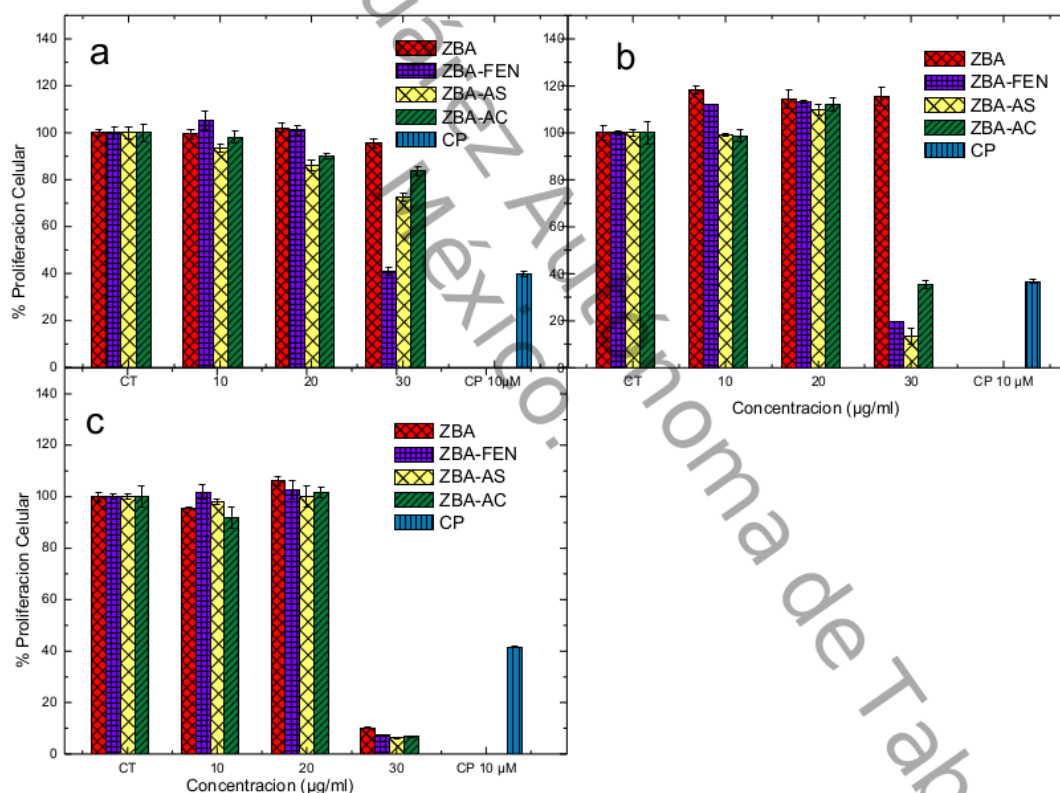


Figura 30. Porcentaje de proliferación celular después de 72 horas de tratamiento con los materiales ZBA calcinada a 400°C y funcionalizada (ZBA-AC, ZBA-FEN y ZBA-AS), evaluada en tres concentraciones, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$, comparando su efecto con cis-platino a 10 μM , en las líneas tumorales: a) CaSki, b) SiHa y c) HeLa.

En la Figura 30 se presentan las gráficas de los tratamientos con los materiales ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AC en las líneas tumorales CaSki, SiHa y HeLa.

En la figura 30a se presentan las gráficas de porcentaje de proliferación celular en la línea tumoral CaSki tratada con los materiales ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AC. Se observa que todos los materiales en las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ no mostraron efectos importantes en la reducción de la proliferación celular con respecto al cis-platino que redujo la proliferación a 47%, los materiales ZBA-AC y ZBA-AS disminuyeron a 90 y 87% en la proliferación celular respectivamente con la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. El tratamiento con 30 $\mu\text{g/ml}$ de los materiales ZBA-FEN y ZBA-AS redujo a 40% de células vivas, el material ZBA-AC redujo a 84% y ZBA a 95% de proliferación celular.

Las gráficas de los ensayos en la línea tumoral SiHa (Figura 30b), muestran que los tratamientos con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de ZBA, ZBA-FEN, ZBA-AC y ZBA-AS no inducen algún efecto en la reducción de la proliferación celular; por otro lado, con el tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$ los materiales ZBA-FEN, ZBA-AC y ZBA-AS quedaron con 20, 35 y 13% de proliferación celular respectivamente, mientras que ZBA no presenta actividad en ningún tratamiento en esta línea tumoral. El porcentaje de reducción en la proliferación de ZBA-FEN y ZBA-AS fue mayor que el cis-platino, la desviación estándar de estas muestras con respecto al cis-platino nos indica que esta diferencia es significativa o importante.

Las gráficas correspondientes a los tratamientos en la línea tumoral HeLa se presentan en la figura 30c, donde observamos que estos materiales muestran efecto en la reducción de la proliferación celular hasta el tratamiento con 30 $\mu\text{g/ml}$ y en mayor medida que el cis-platino, puesto que el material ZBA reduce a 10% y los materiales ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AC reducen a 7% la proliferación celular, la desviación estándar de cada muestra nos indica que esta diferencia es significativa con respecto a las otras concentraciones de tratamiento, el control y el cis-platino.

DISCUSIÓN

En ambos materiales de ZnO (ZEA y ZBA) se obtuvo que la funcionalización con moléculas orgánicas aumentó su actividad antiproliferativa en la línea de células tumorales CaSki; por otro lado, observamos que se obtuvieron mejores resultados con los materiales ZEA y ZEA funcionalizado (Figura 29) que el cis-platino y los materiales ZBA y ZBA funcionalizado (Figura 30). En particular los materiales ZEA-FEN y ZEA-AS disminuyeron gran parte de la proliferación celular desde el tratamiento a 20 $\mu\text{g/ml}$, cuando la dosis fue aumentada a 30 $\mu\text{g/ml}$ el efecto de los materiales ZEA-AC, ZEA-FEN y ZEA-AS fue muy cercano al porcentaje de reducción del material ZEA, lo cual nos sugiere que a esta concentración la actividad antiproliferativa en CaSki fue mediada por el ZnO.

En los ensayos con la línea celular SiHa se observó que las células fueron sensibles a los tratamientos con los materiales de ZnO funcionalizados. Los materiales ZEA-AC, ZEA-FEN y ZEA-AS (Figura 29) mostraron mayor actividad antiproliferativa que el cis-platino desde el tratamiento a 20 $\mu\text{g/ml}$. De forma similar los materiales ZBA-FEN, ZBA-AS y ZBA-AC (Figura 30) mostraron efecto en la reducción de la proliferación celular únicamente en el tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$, en particular los materiales ZBA-FEN y ZBA-AS. Esto nos indica que la incorporación de grupos funcionales, en particular con 1,10-fenantrolina y ácido ascórbico, ha aumentado la actividad antiproliferativa del ZnO en esta línea celular.

La muestra ZEA no tuvo efecto a 20 $\mu\text{g/ml}$ en SiHa, sólo hasta que la dosis fue aumentada a 30 $\mu\text{g/ml}$, en esta concentración los materiales ZEA-FEN, ZEA-AS y ZEA-AC tuvieron efecto similar a ZEA, lo cual sugiere que la actividad antiproliferativa en SiHa fue mediada por el ZnO.

Las líneas celulares CaSki y SiHa contiene en su ADN copias de VPH 16, estudios sobre la caracterización de las oncoproteínas E6 y E7 presentes en el VPH 16 informan que contienen grupos amino y carboxil enlazados con zinc [80], esto nos plantea la posibilidad que exista afinidad entre el ZnO y los grupos terminales de las

células, por lo cual se podría generar la internalización del Zn^{2+} , lo que generaría que se desencadene apoptosis por vía extrínseca [47].

En la línea celular HeLa hubo un comportamiento variado en cuanto al efecto antiproliferativo de los materiales de ZnO. Con respecto al material ZEA calcinado a 400°C y el cis-platino (Figura 29), se obtuvo que el material ZEA-AS mostró mayor efecto en la reducción de la proliferación desde el tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$. Cuando la dosis fue aumentada a 30 $\mu\text{g/ml}$ los materiales ZEA, ZEA-FEN y ZEA-AS aumentaron su efecto antiproliferativo, mientras que el material ZEA-AC no dio buenos resultados en cuanto a la reducción de la proliferación celular.

Por otro lado, los materiales de ZBA calcinado a 400°C y funcionalizados (Figura 30) disminuyeron en gran parte la proliferación celular con el tratamiento a 30 $\mu\text{g/ml}$, se observa que la diferencia entre el efecto del material ZBA y los funcionalizados (ZBA-FEN, ZBA-AC y ZBA-AS) es muy pequeña, lo cual nos sugiere que la actividad antiproliferativa en HeLa de estos materiales fue inducida en mayor proporción por la interacción entre el ZnO y los receptores celulares y no por efecto de la funcionalización del material.

La línea celular HeLa contiene en su ADN copias de VPH 18 y sus oncoproteínas E7 contiene en su terminal C, iones de zinc coordinado con cuatro ligandos sulfuro, que forman un núcleo hidrófobo y una estructura de zinc única que impide que otros ligandos accedan, lo que puede originar la resistencia de HeLa a los tratamientos. Pero su terminal N es una región con alta flexibilidad por la interacción de la proteína pRB con radicales hidroxilos, esto podría explicar el hecho que los materiales ZEA-FEN y ZEA-AS muestran mejores efectos que ZEA en la reducción de la proliferación en HeLa [81].

Por otro lado, está reportado que el ácido ascórbico, la 1,10-fenantrolina y el ácido acético, promueven la formación de radicales hidroxilos, lo que a su vez genera la producción de especies reactivas de oxígeno, estas al incrementarse dentro de las células tumorales pueden desencadenar peroxidación lipídica en la mitocondria de las células y posteriormente apoptosis vía intrínseca [47]. Además, también se

describe que el ZnO es susceptible a liberar iones Zn^{2+} produciendo glicolisis y la producción de especies reactivas de oxígeno [77]. Estos materiales demuestran que poseen la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales, por lo que deben estudiarse con más detalle sus funciones biológicas.

CONCLUSIONES

En la búsqueda partículas de ZnO en tamaño nanométrico, se realizó la síntesis y evaluación de la importancia que tiene el solvente, el catalizador y el pH de reacción en la formación de este material; así mismo se funcionalizó la superficie del ZnO con moléculas orgánicas, para obtener nanopartículas con mayor actividad citotóxica en células tumorales.

En todas las muestras sintetizadas, se observaron las señales características del ZnO. Fue evidente que el solvente orientó la morfología de las partículas, como un resultado de ello, las propiedades texturales de los materiales también fueron afectadas. Por otro parte, el pH de reacción influyó en los tamaños de partículas, puesto que con la síntesis de ZnO a pH 11 se propició la formación de partículas nanométricas. Se observó que la síntesis de ZnO con NH_4OH favorece que el material se forme con menor cantidad de materia residual orgánica, probablemente como resultado de la descomposición del complejo $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ que se forma cuando el sistema precipita con este catalizador.

La superficie de los materiales ZBA y ZEA fue funcionalizada con 1,10-fenantrolina, ácido acético y ácido ascórbico, las señales características de estas moléculas fueron observadas. Se determinó que los grupos funcionales modificaron la carga superficial del ZnO y están estables en su superficie, puesto que por termo gravimetría se observó que la descomposición de las moléculas se originó a temperaturas mayores al punto de fusión de cada molécula funcionalizante.

Por otro lado, la funcionalización del ZnO mostró ventajas en su actividad biológica en las células tumorales de cáncer de cérvix, generadas por infección de VPH; en particular el material ZEA funcionalizado con presentó mejor actividad antiproliferativa que el material ZEA sin funcionalizar, el cis-platino y el material ZBA funcionalizado, desde la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, de tal forma que se reduce la dosis necesaria para favorecer la muerte o inhibir el crecimiento de las células. Además, ambas series de materiales ZBA y ZEA funcionalizados, mostraron ser biocompatibles en monocitos aislados de un individuo aparentemente sano, por lo que puede ser seguro utilizar dichos materiales en un ser vivo.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización de los materiales de ZnO funcionalizados, se pretende continuar con la evaluación de los parámetros de síntesis del ZnO por sol-gel, para obtener materiales de menor tamaño. Por otra parte, el material ZEA funcionalizado mostró mejor actividad antiproliferativa que el fármaco utilizado actualmente para el tratamiento del cáncer de cérvix, por lo que es necesario determinar el mecanismo de muerte celular, entre otras variables biológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. H. Cheng, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, p. 345, 2007.
- [2] J. Pan y S. S. Feng, *Biomaterials*, p. 2663, 2008.
- [3] T. López, *La ciencia del futuro...hoy*, México, D.F.: Arkhé, 2011.
- [4] J. S. Kirby y C. J. Miller, «Intralesional chemotherapy for nonmelanoma skin cancer: A practical review,» *Journal American Academy Dermatology*, 2010.
- [5] Q. Yuang, S. Heing y R. D. Misra, «New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: Synthesis, characterization and in vitro drug delivery response,» *Acta Biomaterialia*, p. 2732–2739, 2010.
- [6] S. J. Park, J. H. Shin, E. S. Kim, Y. K. Jo, J. H. Kim, J. J. Hwang, J. C. Kim y D. H. Cho, «Mitochondrial fragmentation caused by phenanthroline promotes mitophagy,» *FEBS Letters*, p. 4303–4310, 2012.
- [7] «Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos,» *American Cancer Society*, pp. 1-37, 2011.
- [8] E. Song, V. Cheng, C. Chiang y C. Chao, «Potentiation of growth inhibition due to vincristine by ascorbic acid in a resistant human non-small cell lung cancer cell line,» *European Journal of Pharmacology*, pp. 119-125, 1995.
- [9] B. Kook Lee, Y. Yun y K. Park, «PLA micro- and nano-particles,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 107, p. 176–191, 2016.
- [10] G. Kaur, P. Singha, S. K. Mehta, S. Kumar, N. Dilbaghi y G. Chaudhary, «A facile route for the synthesis of Co, Ni and Cu metallic nanoparticles with potential antimicrobial activity using novel metallosurfactants,» *Applied Surface Science*, vol. 404, p. 254–262, 2017.
- [11] S. Ferraris, M. Miola, A. Cochis, B. Azzimontis, L. Rimondini, E. Prenesti y E. Verne, «In situ reduction of antibacterial silver ions to metallic silver nanoparticles on bioactive glasses functionalized with polyphenols,» *Applied Surface Science*, vol. 396, p. 461–470, 2017.
- [12] P. Zaca-Morán, C. F. Pastelín, C. Morán, G. F. Pérez-Sánchez y F. Chávez, «Microcautery based on zinc metallic nanoparticles photodeposited on the core of an optical fiber,» *Applied Surface Science*, vol. 392, p. 492–497, 2017.

- [13] D.-M. Yu, Y.-N. Liu, F.-L. Tian, X.-M. Pan y X.-Q. Sheng, «Accurate thermoplasmonic simulation of metallic nanoparticles,» *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, vol. 187, p. 150–160, 2017.
- [14] S. Salwa Alias y A. Azmin Mohamad, *Synthesis of Zinc Oxide by Sol–Gel Method for Photoelectrochemical Cells*, USA: Springer, 2014.
- [15] R. Wyckoff, *Crystal Structures*, New York: Interscience, 1963.
- [16] U. Ozgur., *J. Appl. Phys.* 98, pp. 301-341, 2005.
- [17] V. Cauda, R. Gazia, S. Porro, S. Stassi, G. Canavese, I. Roppolo y A. Chiolerio, «Nanostructured ZnO materials: synthesis, properties and applications,» *Handbook of Nanomaterials Properties*, 2014.
- [18] Z. W. Pan, Z. R. Dai y Z. L. Wang, *Science*, pp. 1947-1949, 2001.
- [19] F. Bradley, *Materials Chemistry*, Springer, 2011.
- [20] M. Sánchez, «Una aproximación vibracional al estudio in situ de los procesos de síntesis de tamices moleculares: obtención de sílice mesoporosa y de aluminosilicatos mesoporosos a partir de precursores de zeolitas,» 2008.
- [21] E. A. Meulenkamp, «Size dependence of the dissolution of ZnO nanoparticles,» *J. Phys. Chem.*, p. 7764–7769, 1998.
- [22] L. Hench y J. K. West, «The sol-gel process,» *Chem. Rev.*, p. 33–72, 1990.
- [23] G. Oskam, «Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application,» *Journal sol-gel science technology*, p. 161–164, 2006.
- [24] E. M. Wong, P. G. Hoertz, C. J. Liang y B. M. Shi, «Influence of organic capping ligands on the growth kinetics of ZnO nanoparticles,» *Langmuir*, p. 8362–8367, 2001.
- [25] R. Wahab, S. G. Ansari, Y. S. Kim, M. Song y H. S. Shin, «The role of pH variation on the growth of zinc oxide nanostructures,» *Application surface science*, p. 4891–4896, 2009.
- [26] S. S. Alias, A. B. Ismail y A. A. Mohamad, «Effect of pH on ZnO nanoparticle properties synthesized by sol–gel centrifugation,» *J. Alloy. Compd.*, p. 231–237, 2010.
- [27] Z. L. Wang, «Zinc oxide nanostructures: Growth, properties and applications,» *J. Phys. Condes. Matter*, 2004.
- [28] K. Ajay Singh, K. Sarvest Pandey, O. P. Pandey y S. K. Sengupta, «Synthesis and spectral characterization of Zn(II) microsphere series for antimicrobial application,» *Journal of molecular structure*, pp. 376-383, 2014.

- [29] A. K. Singh, O. P. Pandey y S. K. Sengupta, «Synthesis, spectral characterization and biological activity of zinc(II) complexes with 3-substituted phenyl-4-amino-5-hydrazino-1, 2, 4-triazole Schiff bases,» *pectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, pp. 1-6, 2012.
- [30] T. Chen, T. Zhao, D. Wei, Y. Li y H. Zhang, «Core-shell nanocarriers with ZnO quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery,» *Carbohydrate Polymers*, p. 1124–1132, 2013.
- [31] H. Zhang, B. Chen, H. Jiang, C. Wang, H. Wang y X. Wang, «A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment,» *Biomaterials*, pp. 1906-1914, 2011.
- [32] A. Ismail, A. Mamdouh y I. Laila, «Photodynamic therapy mediated antiproliferative activity of some metal-doped ZnO nanoparticles in human liver adenocarcinoma HepG2 cells under UV irradiation,» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, pp. 99-108, 2014.
- [33] L. A. Summers, *Heterocyclic Chemistry*, 1978.
- [34] G. Anderegg, *Helvetica Chimica Acta*, 1963.
- [35] I. J. Villar-Garcia, A. Abebe y Y. C, «1,10-Phenanthroline ionic liquids exhibiting excellent solubility for metal complexes: Potential solvents for biphasic and supported ionic liquid phase (SILP) catalysis,» *Inorganic Chemistry Communications*, p. 1–3, 2012.
- [36] A. Bencini y V. Lippolis, «1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes,» *Coordination Chemistry Reviews*, p. 2096–2180, 2010.
- [37] C. Deegan, C. Coyle, M. McCann, M. Devereux y D. A. Egan, «In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)3](ClO4)2·4H2O and [Ag(phendione)2]ClO4 using human epithelial cell lines,» *Chemico-Biological Interactions*, p. 115–125, 2006.
- [38] P. Heffter, M. Jakupc, W. Korner, S. Wild, N. G. Keyserlingk, L. Elbling, H. Zorbas, A. Korynevskaya, S. Knasmüller, H. Sutterluty, M. Micksche, B. K. Keppler y W. Berger, «Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)]trithiocyanate (KP772; FFC24),» *bioc hemica l pharmacology*, p. 42 6 – 44 0, 2006.
- [39] N. McGinley, J. A. Plumb y N. J. Wheate, «DNA-based aptamer fails as a simultaneous cancer targeting agent and drug delivery vehicle for a phenanthroline-based platinum(II) complex,» *Journal of Inorganic Biochemistry*, p. 124–130, 2013.
- [40] L. Pu, Y. Sun y Z. Zhang, «Hydrogen bonding in hydrates with one acetic acid molecule,» *J. Phys. Chem*, vol. 114, pp. 10842-10849, 2010.
- [41] W. E. Luttrell, «Acetic acid,» *Journal of Chemical Health & Safety*, pp. 37, 38, 2012.

- [42] M. J. O'Neil, P. E. Heckelman y C. Koch, «The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals,» Merck & Co, p. 11, 2006.
- [43] H. S. Saleh, «Can visual inspection with acetic acid be used as an alternative to Pap smear in screening cervical cancer?,» *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 19, p. 187–191, 2014.
- [44] S. Zhou, X. Feng, P. Kestell, J. W. Paxton, B. C. Baguley y E. Chan, «Transport of the investigational anti-cancer drug 5,6-dimethylxanthone-4-acetic acid and its acyl glucuronide by human intestinal Caco-2 cells,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 513–524, 2005.
- [45] J. M. Jeong, H. Li, S. Yeon, W. J. Park, H. Young, K. Jin, N. Soo, J. Hoon, S. Chul y D. Kim, «Photo-activated 5-hydroxyindole-3-acetic acid induces apoptosis of prostate and bladder cancer cells,» *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, pp. 50-56, 2011.
- [46] B. Gómez Ruiz, S. Roux y F. Cour, «Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements,» *Food Chemistry*, nº 211, p. 583–589, 2016.
- [47] B. M. Roberts, D. R. Fullerton y S. L. Elliott, «High concentrations of L-ascorbic acid (Vitamin C) induces apoptosis in a human cervical cancer cell line (HeLa) through the intrinsic and extrinsic pathways,» *BIOS*, vol. 86, nº 3, pp. 134-143, 2015.
- [48] H. S. Kizaltan, A. G. Bayair, M. Demirtas, I. Meral, O. Taspinar, A. H. Heris, T. Aydin y A. Mayadagli, «Ascorbic acid treatment for progressive bone metastases after radiotherapy: A pilot study,» *Altern. ther health Med*, pp. 16-20, 2014.
- [49] J. H. Park, K. Davis, . G. Lee, M. Jung, K. Jung, J. Park, S. Yi, C. Yeom y J. Kim, «Ascorbic acid alleviates toxicity of paclitaxel without interfering with the anticancer efficacy in mice,» *Nutrition Research*, pp. 873-883, 2012.
- [50] J. Kim, H. Cho, H. Yang, D. Jung, S. Hong, C. Hung, W. Lee y D. Kim, «Depletion of ascorbic acid impairs NK cell activity against ovarian cancer in a mouse model,» *Immunobiology*, pp. 873-881, 2012.
- [51] Y. Ha, M. Park, H. Kim, H. Seo, J. Lee y K. Chang, «High concentrations of ascorbic acid induces apoptosis of human gastric cancer cell by p38-MAP kinase-dependent up-regulation,» *Cancer Letters*, pp. 48-54, 2009.
- [52] J. A. Sánchez Hernández, M. I. Huerta Pineda, J. A. Rivera Tapia y M. Rosales Pérez, «Infección por VPH y cáncer cervicouterino,» *Revista Mexicana Patología Clínica*, vol. 52, nº 4, pp. 222-233, 2005.
- [53] G. Vázquez-Ortíz, P. Piña-Sanchez, A. Hidalgo, M. Lazos, J. Moreno, I. Alvarado, F. Cruz, D. M. Hernández, C. Pérez-Plascencia y M. Salcedo, «Análisis de expresión global del cáncer cérvico

- uterino: rutas metabólicas y genes alterados,» *Revista Investigación Clínica*, vol. 57, nº 3, pp. 434-441, 2005.
- [54] J. W. Niemantsverdriet, *The vibrational spectroscopies. An introduction*, Federal Republic of Germany: VCH, 1993.
- [55] A. Clark, *The theory of adsorption and catalysis*, United States of America: Academic Press, 1970.
- [56] I. E. Wachs, *Characterization of catalytic materials*, United States of America: Manning, 1992.
- [57] A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín-Martínez y J. Yañes Fernandez, «Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas,» *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, vol. 8, nº 4, p. 4314, 2014.
- [58] C. E. Díaz Uribe, W. A. Vallejo y J. Miranda, «Distribución del tamaño de partícula de la tetracarboxifenilporfirina de hierro (III) adsorbida sobre dióxido de silicio por dispersión dinámica de luz,» *Revista elementos*, nº 3, 2013.
- [59] A. S. Shawali y N. A. Samy, «Functionalized formazans: A review on recent progress in their pharmacological activities,» *Journal of Advanced Research*, nº 6, p. 241–254, 2015.
- [60] D. Scudiero, R. Shoemaker, K. Paul, A. Monks, S. Tierney, T. Nofziger, M. Currens, D. Seniff y M. Boyd, «Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines,» *Cancer Research*, vol. 48, pp. 4827-4833, 1988.
- [61] K. Ellmer, A. Klein y B. Rech, *Transparent conductive zinc oxide*, Berlin Heidelberg: Springer, 2008.
- [62] N. Kiamarsipourn y R. Shoja Razavi, «Hydrothermal synthesis of ZnO nanopigments with high UV absorption and vis/NIR reflectance,» *Ceramics International*, p. 11261–11268, 2014.
- [63] F. Namvar, H. Sulaiman Rahman, R. Mohamad, S. Azizi, P. Mohd Tahir, M. Stanley Chartrand y S. Keong Yeap, «Cytotoxic Effects of Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles on Murine Cell Line,» *Hindawi Publishing Corporation*, p. 11, 2015.
- [64] Ž. Petrović, M. Ristić y S. Musić, «Development of ZnO microstructures produced by rapid hydrolysis of zinc acetylacetonate,» *Ceramics International*, p. 10953–10959, 2014.
- [65] Ž. Petrović, M. Ristić, S. Musić, B. Sepiol y H. Peterlik, «The formation of ZnO nanoparticles from zinc gluconate,» *Ceramics International*, p. 4975–4981, 2015.
- [66] X. Hua, X. Shen, R. Huang, Y. Masuda, T. Ohji y K. Kato, «A facile template-free route to synthesize porous ZnO nanosheets with high surface area,» *Journal of Alloys and Compounds*, nº 580, p. 373–376, 2013.

- [67] J. Wanga, Y. Xiaa, Y. Dongb, R. Chena, L. Xiang y S. Komarneni, «Defect-rich ZnO nanosheets of high surface area as an efficient visible-light photocatalyst,» *Applied Catalysis B: Environmental*, nº 192, p. 8–16, 2016.
- [68] G. Ambrozic, S. kapin, M. Zigon y Z. Crnjak Orel, «The formation of zinc oxide nanoparticles from zinc acetylacetonate hydrate in tert-butanol: A comparative mechanistic study with isomeric C4 alcohols as the media,» *Materials Research Bulletin*, p. 2497–2501, 2011.
- [69] H. A. Barrett, O. Borkiewicz y M. P. S. Krekeler, «An investigation of zincite from spent anodic portions of alkaline batteries: An industrial mineral approach for evaluating stock material for recycling potential,» *Journal of Power Sources*, nº 196, p. 508–513, 2011.
- [70] A. Dakhlaoui, M. Jendoubi, L. Samia-Smiri, A. Kanaev y N. Jouini, «Synthesis, characterization and optical properties of ZnO nanoparticles with controlled size and morphology,» *Journal of Crystal Growth*, nº 311, p. 3989–3996, 2009.
- [71] S. Music' y A. Saric', «Formation of hollow ZnO particles by simple hydrolysis of zinc acetylacetonate,» *Ceramics International*, nº 38, p. 6047–6052, 2012.
- [72] H. Wang, M. Li, L. Jia, L. Li, G. Wang, Y. Zhang y G. Li, «Surfactant-Assisted in situ Chemical Etching for the General Synthesis of ZnO Nanotubes Array,» *Nanoscale Research Letters*, nº 5, p. 1102–1106, 2010.
- [73] S. A. Sadeek y S. M. Abd El-Hamid, «Preparation, characterization and cytotoxicity studies of some transition metal complexes with ofloxacin and 1,10-phenanthroline mixed ligand,» *Journal of Molecular Structure*, vol. 1122, pp. 175–185, 2016.
- [74] B. Gómez Ruiz, S. Roux, F. Courtois y C. Bonazzi, «Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements,» *Food Chemistry*, vol. 211, p. 583–589, 2016.
- [75] G. Singh, B. P. Mohanty y G. S. S. Saini, «Structure, spectra and antioxidant action of ascorbic acid studied by density functional theory, Raman spectroscopic and nuclear magnetic resonance techniques,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 155, p. 61–74, 2016.
- [76] A. Abduljabbar Rzokee y A. Ahmad, «Spectroscopic studies of charge-transfer complexes of 1,10-phenanthroline monohydrate with some pi acceptors,» *International Journals of Basic and Applied Chemical Sciences*, vol. 4, nº 1, pp. 37-50, 2014.
- [77] R. Kumar, A. Umar, G. Kumar y H. Singh Nalwa, «Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review,» *Ceramics International*, vol. 43, p. 3940–3961, 2017.

- [78] S. Hackenberg, A. Scherzed, A. Techna, M. Kessler, K. Froelich, C. Ginzke, C. Koehler, M. Burghartz y R. Hagen, «Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro,» *Toxicology in Vitro*, p. 657–663, 2011.
- [79] T. López, E. Ortiz, D. Meza, E. Basaldella, X. Bokhimi, C. Magaña, A. Sepúlveda, F. Rodríguez y J. Ruiz, «Controlled release of phenytoin for epilepsy treatment from titania and silica based materials,» *Materials Chemistry and Physics*, vol. 126, nº 922–929, 2011.
- [80] M. E. McLaughlin-Drubin y K. Münger, «The human papillomavirus E7 oncoprotein,» *Virology*, vol. 384, p. 335–344, 2009.
- [81] S. Liu, Y. Tian, F. T. Greenaway y M. Sun, «A C-terminal hydrophobic, solvent-protected core and a flexible N-terminus are potentially required for human papilloma virus 18 E7protein functionality,» *Biochimie*, vol. 92, pp. 901-908, 2010.
- [82] Y. Ge, J. P. Schimel y P. A. Holden, «Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities,» *Environment science technology*, pp. 1659-1664, 2011.
- [83] U. Gunduz, T. Keskin, G. Tansik, P. Mutlu, S. Yalcin, G. Unsoy, A. Yakar, R. Khodadust y G. Gunduz, «Idarubicin-loaded folic acid conjugated magnetic nanoparticles as a targetable drug delivery system for breast cancer,» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, p. 729–736, 2014.
- [84] A. Metaxa, E. Efthimiadou, N. Boukos, E. Fragogeorgi, G. Loudos y G. Kordas, «Hollow microspheres based on – Folic acid modified – Hydroxypropyl Cellulose and synthetic multi-responsive bio-copolymer for targeted cancer therapy: Controlled release of daunorubicin, in vitro and in vivo studies,» *Journal of Colloid and Interface Science*, p. 171–181, 2014.
- [85] Y. Nakayama, P. J. Pauzauskie, A. Radenovic, R. M. Onorato, R. J. Saykally, J. Liphardt y P. D. Yang, *Nature*, p. 1098., 2007.
- [86] X. Li, S. Deng y X. Xie, «Experimental and theoretical study on corrosion inhibition of o-phenanthroline for aluminum in HCl solution,» *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 45, p. 1865–1875, 2014.

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO FUNCIONALIZADO CON MOLÉCULAS ORGÁNICAS, PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	www.archivos.ujat.mx Internet	988 words — 4%
2	archivos.ujat.mx Internet	800 words — 3%
3	ri.ujat.mx Internet	104 words — < 1%
4	posgrados.ciateq.edu.mx Internet	42 words — < 1%
5	repositoriouba.sisbi.uba.ar Internet	28 words — < 1%
6	docplayer.es Internet	21 words — < 1%

EXCLUDE QUOTES ON

EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON

EXCLUDE SOURCES

EXCLUDE MATCHES

OFF

< 20 WORDS