

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INGENIERÍA y ARQUITECTURA



**“NANOPARTÍCULAS COMO
ACARREADORES DE COMPLEJOS
ORGANOMETÁLICOS CON ACTIVIDAD
ANTITUMORAL, PARA ENTREGA LOCALIZADA
EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL”**

TRABAJO RECEPCIONAL BAJO LA MODALIDAD
DE:

**TESIS
PRESENTA:**

**LIC. MARÍA GUADALUPE MÁRQUEZ
CHABLÉ**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA

DIRECTOR:

DRA. MAYRA ANGÉLICA ALVAREZ LEMUS
CUNDUACÁN, TABASCO, MÉXICO

OCTUBRE 2016



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura

DIRECCIÓN

OFICIO DAIA/2279/2016
FECHA: 30 de Agosto 2016
ASUNTO: Autorización de impresión definitiva

C. LIC. MARÍA GUADALUPE MÁRQUEZ CHABLÉ
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
PRESENTE.

En virtud de haber elaborado su trabajo de Tesis, para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería en el cual ha sido Dra. Mayra Angélica Álvarez Lemus ha sido Directora de Tesis denominado:

"NANOPATRÍCULAS COMO ACARREADORES DE COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL, PARA ENTREGA LOCALIZADA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL",

Tengo a bien autorizarle la **IMPRESIÓN DEFINITIVA** de dicho trabajo, continuando con los trámites correspondientes para su examen de obtención de grado.

Sin otro particular, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

DR. CANDELARIO BOLAINA TORRES
DIRECTOR

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE
DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA



DIRECCIÓN

C.c.p. Archivo

DR:CBT/Dr.JBF/apl***

Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, Km. 1 Col. La Esmeralda, C.P. 86690
Cunduacán, Tabasco.
Tel. 3-58-15-00 ext. 6752
direccion.daia@ujat.mx



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**División
Académica
de Ingeniería
y Arquitectura**

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Cunduacán, Tabasco a 23 de agosto de 2016

DE: **COMISIÓN SINODAL**
ASUNTO: **APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA**

Una vez hecha la revisión detallada del Trabajo de Tesis denominado:

**"NANOPARTÍCULAS COMO ACARREADORES DE COMPLEJOS
ORGANOMETÁLICOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL, PARA ENTREGA
LOCALIZADA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL",**

desarrollado por el C. **LIC. MARÍA GUADALUPE MÁRQUEZ CHABLÉ** de la
Maestría en Ciencias en Ingeniería, le comunicamos que aceptamos la impresión
del trabajo, ya que el mismo ha cumplido con los requisitos necesarios.

COMISIÓN SINODAL


DR. ERIK RAMÍREZ MORALES
PRESIDENTE


DRA. KARLA MARÍA AGUILAR CASTRO
SECRETARIA


DRA. MAYRA ANGÉLICA ÁLVAREZ LEMUS
VOCAL 1


DR. JUAN BARAJAS FERNÁNDEZ
VOCAL 2


DRA. LAURA LORENA DÍAZ FLORES
VOCAL 3

C.c.p. Archivo


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

Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, Km. 1 Col. La Esmeralda, C.P. 86600
Cunduacán, Tabasco.
Tel. 3-58-15-00 ext. 6752
direccion.daia@ujat.mx

CARTA 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 "Nanopartículas como acarreadores de complejos organometálicos con Actividad antitumoral, para entrega localizada en sistema nervioso central", 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 más 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 éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 24 días del mes de octubre del año 2016.

AUTORIZO



MARÍA GUADALUPE MÁRQUEZ CHABLÉ.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada, a la UJAT por la oportunidad de realizar mis estudios y esta investigación.

A mi asesora la Doctora Mayra Angélica Álvarez Lemus, mi más sincero agradecimiento por todo el apoyo y confianza a lo largo de toda la realización de esta tesis, por transmitirme sus conocimientos y por guiarme de forma precisa a través de este proceso, su constante ayuda y conocimientos en cada situación me han aportado mucho tanto en académica como personalmente. Muchas Gracias.

Al Dr. Erick Natividad de la Cruz y a la Dra. Nancy Patricia Gómez Crisóstomo por su contribución en la evaluación biológica.

A la Dra. Patricia Quintana y al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del CINVESTAV Mérida.

A la Ing. Anabel González por su apoyo en las caracterizaciones.

Al Grupo de investigación de nanotecnología para aplicaciones en biomedicina y medio ambiente, en especial a Meli, Lis y Jorge por las conversaciones tan interesantes.

A mi mamá le doy las gracias por su apoyo incondicional, a mis hermanas Nori y Lucy, a mi sobrino Pepito y a toda mi familia, mis tías, primas y primos por su constante apoyo.

Y a Dios por todas las bendiciones que ha derramado en mi vida.

Dedico este trabajo a mi madre y a mi familia pero especialmente a mi tío Héctor Chablé Juárez (+) por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I	13
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
REFERENCIAS	17
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
2.1 EL CÁNCER: UN PROBLEMA DE SALUD MUNDIAL	18
2.2 TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	19
2.3 LA NANOTECNOLOGÍA Y LOS SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.	22
2.4 EL MÉTODO SOL-GEL PARA LA FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	24
2.5 CITOTOXICIDAD DE NANOMATERIALES	27
2.6 SiO_2 COMO RESERVORIO DE PRINCIPIOS ACTIVOS	28
REFERENCIAS	30
CAPÍTULO III	34
DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
3.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS	34
3.1.1 Síntesis de $\text{SiO}_2\text{-N1}$	34
3.1.2 Síntesis de $\text{SiO}_2\text{-N2}$	35
3.1.3 Síntesis de $\text{SiO}_2\text{-PEG}$	36
3.1.3 Síntesis de $\text{SiO}_2\text{-PEG-ST}$	37
3.1.5 Síntesis del complejo $\text{Zn}(\text{acac})_2(\text{phen})$	38
3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	38
3.2.1 Resonancia Magnética Nuclear del Complejo de Zn	38
3.2.2 Difracción de rayos X de polvos	39
3.2.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	39
3.2.4 Espectroscopía Ultra violeta-Visible (UV-Vis) por reflectancia difusa.	39
3.2.5 Análisis térmico	40
3.2.6 Adsorción de nitrógeno	40
3.2.7 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	40
3.2.8 Dispersión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partícula y Potencial Zeta	40
3.3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO	41
3.3.1 Biocompatibilidad de las nanopartículas de SiO_2	41
3.3.2 Citotoxicidad de las nanopartículas-complejo	41
REFERENCIAS	43

CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE ZN.	44
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SiO₂	48
4.2.1 Espectroscopía UV-Vis por reflectancia difusa	48
4.2.2 Difracción de rayos X	50
4.2.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	52
4.2.4 Análisis térmico	53
4.2.5 Adsorción de nitrógeno	56
4.2.6 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	60
4.2.7 Dispersión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partícula y Potencial Zeta	63
4.2.8 Espectroscopía UV-VIS de los materiales impregnados	66
4.3 ESTUDIOS IN VITRO	67
4.3.1 Estudio de Biocompatibilidad	67
4.3.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa de los sistemas Zn(acac) ₂ (phen)-SiO ₂	69
REFERENCIAS	77
CAPÍTULO V	81
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
5.1 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	82
ANEXOS	83
A.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE ZINC	83
A.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	85
A 2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	85
A 2.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVOS	85
A 2.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	86
A 2.4 ESPECTROSCOPÍA ULTRA VIOLETA-VISIBLE (UV-Vis) POR REFLECTANCIA DIFUSA.	88
A 2.5 ANÁLISIS TÉRMICO	89
A 2.5.1 Análisis termogravimétrico (TGA)	89
A 2.5.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	89
A 2.6 ADSORCIÓN DE NITRÓGENO	90
A 2.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)	91
A 2.8 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS) PARA LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA	92
A 2.9 EVALUACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO	93
A 2.9.1 Biocompatibilidad de las nanopartículas de SiO ₂	93
A 2.9.2 Citotoxicidad de las nanopartículas-complejo	93
REFERENCIAS	94

Tabla de contenidos

Tabla 3.1 Descripción y claves de las nanopartículas preparadas.	34
Tabla 4.1 Valores de área superficial específica BET estimada por fisisorción de N ₂ .	58
Tabla 4.2 Valores de carga superficial de las diferentes nanopartículas, obtenidos a pH 7.	65
Tabla A.1.1 base de datos de rayos-X de monocristal del complejo.	83
Tabla A 2.1 Clasificación de la región infrarroja del espectro electromagnético.	87

Figuras

Figura 2.1 Representación de la barrera hematoencefálica.	21
Figura 2.2 La escala de los microorganismos.	22
Figura 3.1 Esquema de la síntesis con NH ₄ OH.	35
Figura 3.2 Esquema de la síntesis con PEG de acuerdo con la síntesis de Caturó.	36
Figura 3.2 Esquema de la síntesis con PEG de acuerdo con la síntesis de Caturó.	37
Figura 4.1 Estructura química del complejo bis(acetylacetonato-K ² O,O')(1,10-fenantrolina-K ² N,N') zinc(II) obtenido por RMN de ¹ H y ¹³ C.	44
Figura 4.2 Espectro RMN de a) ¹ H NMR del complejo Zn(acac) ₂ (phen) en DMSO-d ₆ , b) espectro RMN de ¹³ C NMR en DMSO-d ₆ , c) y d) ¹³ C CP/MAS, las señales con asterisco son debidas a bandas laterales giratorias a 10 KHz.	46
Figura 4.3 Difractogramas del complejo de zinc y 1,10-fenantrolina. S1,S2 y S3 hacen referencia a los tres diferentes lotes.	47
Figura 4.4 Espectros IR en modo transmitancia de a) acetilacetato de zinc, b) 1,10-Fenantrolina y c) complejo de Zn.	48
Figura 4.5 Espectros UV-Visible (reflectancia difusa) de los nanomateriales de SiO ₂ .	50
Figura 4.6 Difractogramas de las nanopartículas de SiO ₂ obtenidas por DRX de polvos.	51
Figura 4.7 Espectros infrarrojos de los materiales nanoparticulados de SiO ₂ sintetizados a diferentes condiciones.	53
Figura 4.8 Análisis térmico de los materiales realizado en atmósfera de aire. a) TGA y b) DSC, donde los picos hacia abajo indican un proceso endotérmico.	55
Figura 4.9 Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las nanopartículas de SiO ₂ . En el recuadro se muestra la isoterma correspondiente al material SiO ₂ -N2.	57
Figura 4.10 Distribución de tamaño de poro obtenida a partir de los datos de desorción por el método BJH.	59
Figura 4.11 Micrografías FE-SEM de los materiales SiO ₂ -N1(a,b) y SiO ₂ -N2 (c, d).	61
Figura 4.12 Micrografías FESEM SiO ₂ -PEG-ST (a y b), y SiO ₂ - PEG (c y d).	63
Figura 4.13 Distribución del tamaño de partícula hidrodinámico de los nanomateriales estimado a partir de Dispersión de luz dinámica. Las mediciones se realizaron en agua a pH 7.	64
Figura 4.14 UV-Vis de las nanopartículas impregnadas con el complejo.	66
Figura 4.15 Gráfica de la viabilidad celular de las nanopartículas de SiO ₂ mediante azul de tripano, las mediciones se realizaron por duplicado y las barras indican la desviación estándar obtenida por ANOVA.	69
Figura 4.16 Morfología de las células U-373 teñidas con cristal violeta. La imagen fue tomada a 60X. EN ella se observan su forma característica así como la excesiva presencia de células asociada al proceso de proliferación descontrolado.	70
Figura 4.17 Microfotografías representativas de los cultivos a 60X de a) SiO ₂ -N1, b) SiO ₂ -N2, c) SiO ₂ -PEG-ST y d) SiO ₂ -PEG, empleando una concentración de 10 µg/mL.	71

Figura 4.18 Microfotografías representativas de los cultivos a 60X de a) SiO ₂ -N1, b) SiO ₂ -N2, c) SiO ₂ -PEG-ST y d) SiO ₂ -PEG, a la concentración de 20 µg/mL.	71
Figura 4.19 Microfotografías de los cultivos celulares (60X) para las diferentes partículas cargadas con el complejo.	74
Figura 4.20 Análisis estadístico de la citotoxicidad inducida por nanopartículas sin complejo de zinc	75
Figura 4.21 Análisis estadístico de la citotoxicidad inducida por nanopartículas cargadas con el complejo de zinc en la línea celular U-373 a 10 y 20 µg/mL.	76
Figura A.1.1 Estructura molecular del complejo bis(acetylacetonato-K ² O,O')(1,10-fenantrolina-K ² N,N') zinc(II).	84
Figura A 2.1 Espectro de los diferentes tipos de radiación electromagnética y sus correspondientes frecuencias y longitudes de onda.	86
Figura A 2.2 Diferencia entre la reflectancia especular y difusa.	88
Figura A 2.3 Tipos de isothermas e histéresis de acuerdo con la clasificación de la IUPAC.	91

RESUMEN

En el presente trabajo se prepararon nanomateriales de óxido de silicio modificados con dos tipos de estructurantes (NH_4OH y PEG), empleando el proceso sol-gel. Los nanomateriales se caracterizaron por espectroscopías FTIR y UV-Visible, DRX, FE-SEM, Adsorción de N_2 , TGA, DSC, DLD y potencial zeta. Se preparó y caracterizó el complejo (bis (acetylacetonato- $\text{K}^2 \text{O}$, O') (1,10-fenantrolina- $\text{K}^2 \text{N}$, N') zinc (II)), el cual tiene actividad citotóxica y se empleó como molécula modelo para cargar las partículas de SiO_2 preparadas. Se obtuvieron nanopartículas bien definidas y con cierta mesoporosidad cuando se emplea NH_4OH , mientras que el PEG da origen a la obtención de nanopartículas menos uniformes en tamaño pero con mayor porosidad y área superficial específica. Para evaluar la actividad biológica in vitro de las nanopartículas se realizaron estudios de viabilidad celular en células mononucleares primarias no cancerígenas y posteriormente en la línea U373 proveniente de glioblastoma humano.

Los materiales exhibieron altos porcentajes de viabilidad celular en las células mononucleares siendo más alto en aquellos en los que se utilizó NH_4OH , sin embargo luego de cargar el complejo citotóxico en los materiales, las muestras en las que se utilizó el PEG como estructurante mostraron mayor efecto citotóxico ya que en ellos se logró impregnar una mayor cantidad del complejo. Los resultados obtenidos, demostraron el potencial de las nanopartículas obtenidas para su aplicación como sistema de entrega de principios activos en SNC.

ABSTRACT

In this work, NH_4OH and PEG were used as templates for obtaining silicon dioxide modified nanomaterials, by the sol-gel route. The nanomaterials were characterized by FTIR and UV-Vis spectroscopies, XRD, FE-SEM, N_2 adsorption, TGA, DSC, DLS and zeta potential. The nanomaterials were loaded with a cytotoxic complex (bis (acetylacetonato- $\text{K}^2 \text{O}$, O') (1,10-phenanthroline- $\text{K}^2 \text{N}$, N') zinc (II)) which was used as model molecule. Nanosized mesoporous particles were obtained for NH_4OH template whereas PEG directed to the formation of non-uniform mesoporous nanoparticles with higher specific surface area.

In order to evaluate biological activity of the nanoparticles, in vitro cell viability tests were performed in both primary mononuclear cells (non-cancer cells) and U373 cell line (human glioblastoma cells).

The nanomaterials exhibited high cell viability in non-cancer cells specially those prepared with NH_4OH , on the other hand PEG-templated nanoparticles were loaded more efficiently with the complex since cytotoxicity in U373 was higher than the observed for NH_4OH -templated nanoparticles. The results of this research demonstrated the potential of the obtained nanoparticles for further applications as delivery systems in NCS.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Debido a que actualmente, la expectativa de vida del ser humano se ha incrementado significativamente (más de 70 años), los trastornos neurodegenerativos y la prevalencia de cáncer han ido en aumento a nivel mundial en las últimas décadas [1]. Pese a los grandes avances en la Medicina durante el último siglo, el tratamiento de padecimientos neurológicos y en particular la administración de fármacos hacia el Sistema Nervioso Central (SNC), sigue siendo un reto clínico. Esto se debe en gran parte a la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) [2,3], que es la barrera fisiológica de mayor selectividad; ya que solo sustancias con bajo peso molecular y características químicas muy específicas son capaces de atravesarla [4,5].

Debido a esto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento y diagnóstico de padecimientos de origen neurológico, ya que son patologías con alta morbilidad-mortalidad, lo cual también genera altos costos tanto al sector salud como al paciente mismo.

En este sentido la terapia dirigida es un área que se ha explorado demostrando tener un gran potencial en el desarrollo de tratamientos más efectivos [6]. Uno de los campos de la ciencia que estudia y desarrolla nuevos métodos de terapia dirigida es la nanotecnología. La nanotecnología se encarga de diseñar, controlar y estudiar la materia a escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) [7]. Dentro de la gama de posibilidades que ofrece la construcción de nanomateriales, las nanopartículas se han venido estudiado intensamente desde hace más de dos décadas, obteniéndose resultados promisorios que apuntan a que en el mediano y largo plazo, puedan cubrir las expectativas y finalmente abran las puertas a nuevos tratamientos con mínimos efectos adversos.

Las nanopartículas son materiales que pueden diseñarse para tener grandes áreas superficiales, alta reactividad, biocompatibilidad, etc.; lo que permite entre otras cosas, su uso como acarreadores de principios activos.

Las nanopartículas y nanoestructuras de óxido de silicio son altamente compatibles con los sistemas biológicos y presentan la gran ventaja de que su superficie puede modificarse químicamente, de tal forma que puedan unirse a ligandos específicos de las células, lo que ayudaría a minimizar efectos adversos y facilitaría una terapia dirigida.

El adecuado control de las propiedades de las nanopartículas es de suma importancia para poder lograr una verdadera terapia dirigida. A pesar de los múltiples estudios que se han realizado hasta el momento, aún no se tienen resultados contundentes sobre muchas de las propiedades y posibles efectos de las nanopartículas. Esto debido a que cada material a escala nanométrica se comporta de diferente manera y que incluso dicho comportamiento se ve afectado por diversas variables, por lo que, se requiere de estudios específicos que nos proporcionen la mayor información acerca de las propiedades, beneficios e implicaciones sobre el uso de nanopartículas en seres vivos.

Existen diversos materiales en el rango de los micrómetros y nanómetros, que se han empleado como estrategias para la entrega de diversos fármacos. Los liposomas, vesículas y polímeros son algunos de estos sistemas y cada uno de ellos presenta diferentes ventajas y desventajas. Sin embargo, las nanopartículas de óxido de silicio han ganado terreno en ésta área debido a que pueden diseñarse y adaptarse a la naturaleza química de una variedad de moléculas bioactivas, permitiendo al mismo tiempo la liberación del principio activo y protegiéndolo de cambios como variaciones en el pH, temperatura y cambios en las concentraciones iónicas.

Dentro de las diferentes técnicas que existen hoy en día para la obtención de nanopartículas, el proceso sol-gel se considera una estrategia muy adecuada ya que puede ser un proceso sencillo en el que a través del adecuado control de los parámetros de síntesis, se pueden obtener variaciones significativas en las propiedades de los materiales lo que permite realizar una variedad de modificaciones con la intención de poder tener materiales con propiedades muy

específicas. Lo anterior permite que para su aplicación en liberación y entrega de fármacos, puedan construirse reservorios que se ajusten perfectamente a las propiedades de cada molécula, permitiendo que ésta se encuentre biodisponible, que pueda liberarse desde el reservorio de manera controlada y que además se pueda modificar la composición superficial del SiO_2 .

La simple modificación del material precursor en la formación de materiales sol-gel, puede llegar a implicar cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales lo cual sin duda, tendrá consecuencias en las interacciones entre éstos y los sistemas biológicos.

Entre las características que determinan la respuesta de los sistemas biológicos hacia las nanopartículas se encuentran la forma, carga superficial y el tamaño. Con la finalidad de poder obtener materiales adecuados para su uso en SNC, se requiere que sean materiales con nula o mínima toxicidad, pero que posean baja carga superficial y tamaño nanométrico. En el presente trabajo se realizó el diseño de nanopartículas de SiO_2 que poseen tamaño nanométrico, que pueden dispersarse fácilmente para su uso en medios acuosos, con baja carga superficial y mesoporosidad que les permita incorporar un agente con actividad citotóxica en células cancerígenas con la finalidad de obtener sistemas de entrega que minimicen los efectos adversos y baja selectividad de principios activos citotóxicos que se empleen en SNC. Para tales fines, se evaluó el efecto de diferentes agentes estructurantes en las propiedades fisicoquímicas del SiO_2 mediante diferentes técnicas de caracterización para posteriormente evaluar su eficiencia como un sistema de entrega in vitro en una línea celular de glioblastoma humano, el cual es uno de los tumores más invasivos y metastásicos del SNC.

OBJETIVO GENERAL

Obtener nanopartículas a base de SiO_2 biocompatibles, para la entrega de principios activos citotóxicos, en tumores de sistema nervioso central.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de agentes modificadores en las propiedades texturales y morfológicas en nanopartículas de SiO_2 .
2. Evaluar el efecto del modificador en la biocompatibilidad de los nanomateriales un estudio in vitro de viabilidad celular.
3. Incorporar un compuesto con actividad citotóxica (bis (acetylacetonato- K^2 O,O')(1,10-fenantrolina- K^2 N,N') zinc(II)) en las nanopartículas para realizar un estudio de liberación in vitro.
4. Evaluar la citotoxicidad del sistema (compuesto) nanopartícula, mediante un estudio in vitro en una línea celular de GBM.

REFERENCIAS

- [1] Caruso G., Caffo M., Alafaci C., Raudino G., Cafarella D., Lucerna S., Salpietro F., Tomasello F. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas?. *Nanomedicine*. **2011**. 7, 744-752
- [2] Kolb B., Whishaw I., *Neuropsychologia Humana*. Editorial Médica Panamericana S.A. **2008**
- [3] Biddlestone L., Marchi N., Guo K., Ghosh C., Janigro D., Valerie K., Yang H. Nanomaterial-mediated CNS delivery of diagnostic and therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 605-613
- [4] Yang, Z., Liu Z., Allaker R., Reip P., Oxford J., Ahmad Z., Ren G. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *J. R. Soc. Interface*. **2010**, 7, 411-422
- [5] Park B., Current and future applications of nanotechnology en: *Nanotechnology: Consequences for Human Health and the Environment*. Issues in Environmental Science and Technology, No. 24. Hester R.E y Harrison R.M Eds. The Royal Society of Chemistry, **2007**, 24, pp.1-18.
- [6] Ciriminna R., Fidalgo A., Pandarous V., Béland F., Ilharco L.M., Pagliaro M. The Sol-Gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 6592-6620 .
- [7] Setyawan H., Yuwana M., Balgis R. PEG-templated mesoporous silicas using silicate precursor and their applications in desiccant dehumidification cooling systems. *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, 218, 95-100

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 El cáncer: un problema de salud mundial

El cáncer es considerado como un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En el 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se estima que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% durante los próximos 20 años [1].

El cáncer es la enfermedad que se caracteriza por el crecimiento incontrolado de las células, causado por múltiples cambios en la expresión genética lo que provoca un desbalance entre la proliferación y la muerte celular, lo que finalmente lleva a la propagación de células anormales [2]. Una célula sana tiene la capacidad de nacer, crecer y reproducirse para luego morir; pero cuando una célula enferma pierde esta capacidad por una variedad de razones, ésta escapa a las limitaciones normales en su crecimiento y comienza a dividirse de una manera no regulada [3].

De acuerdo con Julie L. Boerner [3] en primer lugar, una célula experimenta una mutación que puede o no influir en su comportamiento inmediato. Esta célula puede entonces ser más susceptible a mutaciones posteriores y, con el tiempo, se acumularán gradualmente un número significativo de éste tipo de células, haciendo daño suficiente de manera que el mecanismo de control normal se perturba o es frenado. A esta acumulación gradual de mutaciones se le conoce entonces como el modelo de carcinogénesis de múltiples etapas y explica por qué el cáncer es generalmente una enfermedad de la vejez a menos que, la mutación primaria sea un trastorno hereditario.

La primera etapa histológica observable que experimenta un tejido enfermo es la hiperplasia o sobrecrecimiento celular, sin embargo este término también es utilizado para el caso de crecimiento de células cuando se genera alguna herida en el organismo, por el cual se tiene una reproducción acelerada para sanar la herida, aunque en este caso las células no pierden su capacidad de detenerse cuando ya se ha sanado la herida [4].

La etiología del cáncer indica que los factores genéticos y ambientales se relacionan con la aparición de este; el factor genético tiene una incidencia de entre un 5% y 10%, el factor ambiental es el que juega un papel más sobresaliente en la aparición de cáncer ya que se encuentran en el entorno y el estilo de vida [5]. De entre todos los tipos de cáncer, los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) presentan una gran dificultad y efectos adversos en su tratamiento, generalmente son tratados con una combinación de cirugía, radiación, quimioterapia sistémica, y la terapia fotodinámica (PDT); la esperanza de vida para pacientes que padecen cáncer en el SNC es muy baja [6].

2.2 Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)

Debido a que el cáncer tiene su origen en la célula, la diversidad de tumores que existen se debe a la variedad de tipos de células que tenemos en nuestro organismo. Las características varían de un tumor a otro y de un paciente a otro. Los tumores del SNC representan poco menos del 2% de las malignidades sin que la incidencia se vea influenciada significativamente por el lugar geográfico. Sin embargo, a pesar de que representan una pequeña porción de todos los tipos de tumores, sin duda alguna, la dificultad para su diagnóstico sumado a la falta de terapias eficientes, hacen que la expectativa de vida no exceda en promedio los 5 años [7].

El acceso a este tipo de tumores, es por razones obvias bastante complicado. Cuando un tumor crece dentro del cráneo, a diferencia de otros tumores, la

presión ejercida sobre otras regiones del cerebro, termina afectando regiones que pueden traer complicaciones como pérdida de motricidad o incluso de la respiración, dependiendo de la zona del cerebro en que se localice el tumor, así como, también de las células que lo originen.

El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal y requiere para su funcionamiento de un aporte continuo de sustratos energéticos, fundamentalmente oxígeno y glucosa, suministrados a través de una red de capilares [8]. El cerebro es un órgano que se encuentra protegido por dos grandes “obstáculos”, la Barrera Hematoencefálica (BHE) y el Líquido Cefalorraquídeo [9].

La Barrera Hematoencefálica (BHE) es la estructura morfológica constituida por las células del endotelio vascular [10], en la Figura 2.1 se presenta un esquema de la BHE. Es la interface celular entre la sangre y el SNC, que mantiene el ambiente del fluido intersticial para garantizar el funcionamiento adecuado de las neuronas [11]. La BHE actúa como una barrera física, que regula el paso de las moléculas de la corriente sanguínea al cerebro, restringiendo así los tipos de sustancias que pueden alcanzar al cerebro [12]. Dado que la membrana celular es predominante lipídica, las sustancias liposolubles vencen la barrera con cierta facilidad [13] aunque existen también diversos reportes sobre el efecto de la carga molecular en la capacidad de atravesar dicha membrana [14].

La BHE realiza tres funciones importantes:

1. Protege al cerebro de los compuestos y moléculas circulantes en el torrente sanguíneo, gracias a las uniones estrechas (gap-junctions) del endotelio de los capilares cerebrales, lo cual permite que solo el oxígeno, la glucosa, aminoácidos y otros nutrientes esenciales crucen la BHE.

2. Transporta selectivamente desde la red capilar al parenquima cerebral, por medio de transporte facilitado, o bien por difusión activa que depende del ATP.
3. La BHE metaboliza o modifica elementos de la sangre hacia el tejido nervioso y viceversa [10].

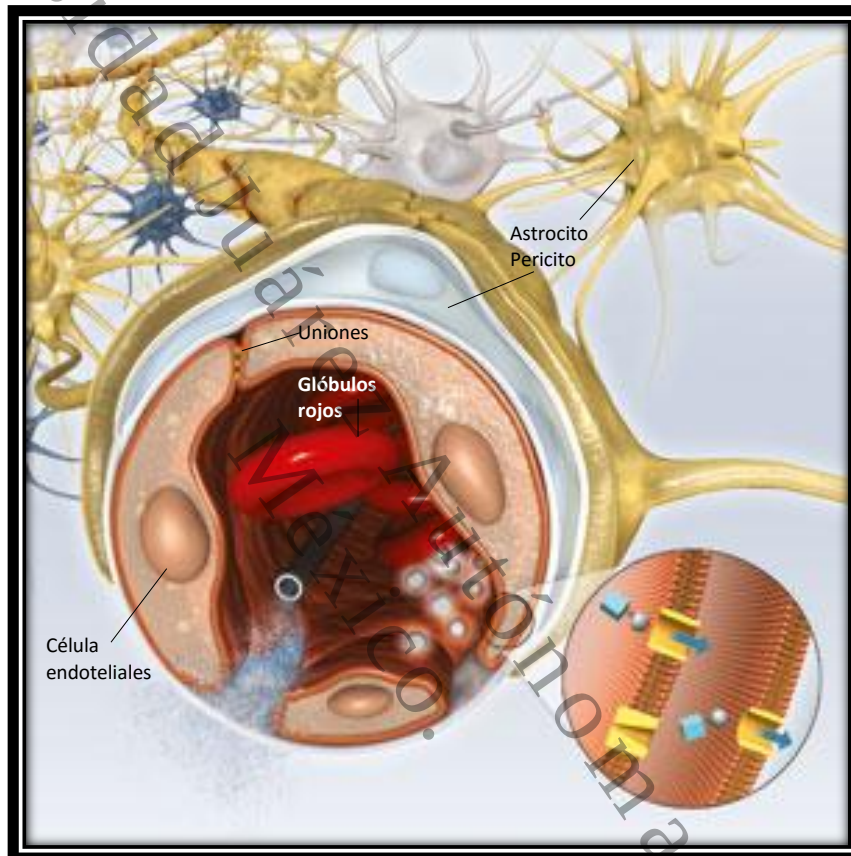


Figura 2.1 Representación de la barrera hematoencefálica [15]

La BHE, frecuentemente es el factor limitante para la administración de fármacos neurológicos. La mayoría de estos fármacos, suelen administrarse por vía parental, siendo metabolizados en diferentes órganos como el hígado o riñón, lo cual causa otros efectos e implica la administración de dosis altas para poder alcanzar las dosis terapéuticas en el tejido diana.

2.3 La nanotecnología y los sistemas de administración controlada de fármacos.

La palabra nanotecnología se usa para definir las ciencias y técnicas que se aplican al nivel de nanoescala, es decir, del orden de 1×10^{-9} m. Dentro de la nanotecnología se contempla el control de las estructuras moleculares y sus átomos. Es por ello, que se puede decir que existe la posibilidad de fabricar materiales y máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas controlando sus propiedades, tamaño y forma [16, 17].

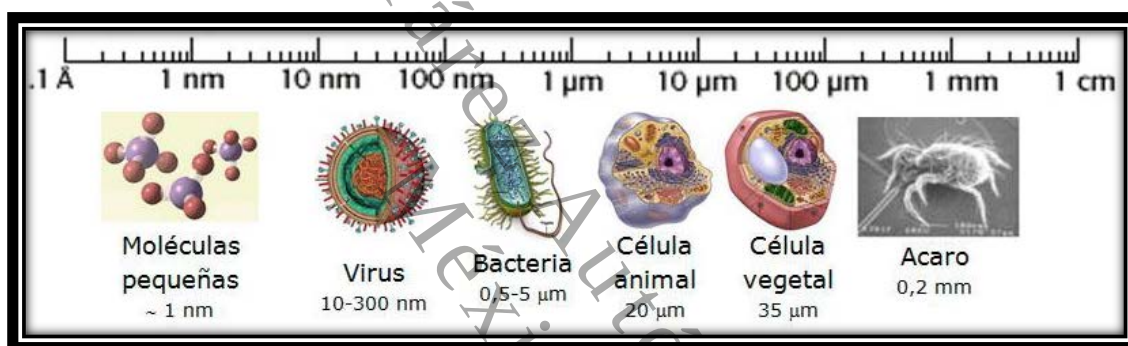


Figura 2.2 La escala de los microorganismos. Modificado de [18].

Una de las características de los nanomateriales, es que a esta escala las propiedades que exhiben pueden ser mejores que sus contrapartes en volumen (bulk) o incluso ser completamente distintas. En las últimas décadas, se ha tenido gran interés por el estudio y desarrollo de estos materiales, se han desarrollado una gran variedad de nanomateriales de los cuales incluso algunos ya se encuentran en etapa de comercialización.

Las posibilidades de aplicación de éstos nanomateriales van desde la producción de ahorro de energía, baterías para vehículos, sensores biológicos, eliminación de contaminantes, paneles de energía solar, entre otros [19].

Las nanopartículas (NPs), ofrecen un gran potencial para una amplia variedad de aplicaciones biomédicas. El diagnóstico, la entrega de medicamentos, encapsulación de moléculas de interés biológico y células son las aplicaciones que mayor potencial presentan hoy en día. Con esto, el uso de las herramientas nanotecnológicas al campo de la medicina, ha dado origen a la disciplina de *Nanomedicina*.

De acuerdo con la definición presentada por Tang [20] el objetivo principal de la nanomedicina es el de “diseñar y sintetizar los vehículos de administración de fármacos los cuales pueden transportar suficiente carga de drogas, atravesar eficazmente las barreras fisiológicas para poder llegar a los sitios de destino, de forma segura y sostenible para curar enfermedades”.

Recientemente, se han investigado y fabricado nuevos materiales orgánicos e inorgánicos para aplicaciones en la nanomedicina, tales como liposomas, dendrímeros, polímerosomas, micelas, materiales a base de oro, óxido de hierro, silicio, así como también semiconductores con diferentes morfologías incluyendo puntos cuánticos, nanocapsulas y nanotubos [21]. El uso de nanopartículas para la administración localizada de principios activos terapéuticos está dirigido a incrementar el tiempo de circulación del fármaco en el cuerpo y la orientación de las células o tejidos de interés, esto gracias a la presencia de ligandos en la superficie que se unen a receptores específicos [22]. La investigación sobre sistemas de entrega de principios activos se ha desarrollado significativamente, explorándose una variedad de acarreadores como nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, vehículos lipídicos nanoestructurados, liposomas, dendrímeros, polímerosomas, micelas poliméricas, nanopartículas y nanosuspensiones [23]. Como es de esperarse, estos materiales presentan ventajas y desventajas asociadas con la naturaleza del mismo. Un ejemplo de ello son los liposomas, los cuales a pesar de presentar una gran capacidad de carga de fármaco, sufren de inestabilidad estructural [20].

En el caso de los fármacos para el tratamiento del cáncer (agentes quimioterapéuticos), la terapia dirigida se ha convertido en una estrategia

anhelada debido a que los agentes usados para éste padecimiento inducen la muerte de las células del tumor. Sin embargo, estos agentes no son selectivos, es decir, son citotóxicos tanto hacia células sanas, como células cancerosas, lo que provoca severos problemas en pacientes que reciben quimioterapia. Aunado a ello, la mayoría de los casos de tumores cerebrales son diagnosticados tardíamente, lo que muchas veces implica quimioterapias más agresivas que incluyen la administración de dos o más citotóxicos, impactando negativamente en la calidad de vida del paciente.

En la actualidad, aún no existen comercialmente medicamentos anticáncer, que empleen nanotecnología. Las propiedades de los diferentes agentes citotóxicos requieren de la búsqueda de una formulación adecuada para cada uno de ellos. Para ello, se ha considerado que las propiedades del óxido de silicio (SiO_2) lo hacen un prometedor vehículo para liberación controlada de fármacos, aunque existen pocos estudios sobre su potencial para entrega en SNC.

2.4 El método Sol-Gel para la fabricación de nanopartículas

Hoy en día podemos encontrar una gran variedad de metodologías para la fabricación de nanopartículas. La elección de la más adecuada, dependerá de las propiedades buscadas y la versatilidad del método. Una metodología que emplea condiciones de síntesis “suaves”, que es relativamente económica y además permite controlar diferentes parámetros que afectan las propiedades del material obtenido, es el proceso sol-gel. La polimerización inorgánica conocida también como proceso sol-gel, es un método general para la preparación de óxidos por la ruta húmeda a temperatura ambiente o por debajo de 120°C , este método permite la síntesis de materiales que pueden ser puramente inorgánicos o híbridos [24, 25]. Esta técnica tiene la ventaja de que al ser bien controlada, se pueden obtener materiales homogéneos y tiene un alto grado de reproducibilidad.

Se pueden emplear como precursores sales inorgánicas o compuestos organometálicos. El proceso involucra dos grandes tipos de reacciones: una

reacción de hidrólisis y otra de condensación, generalmente en soluciones alcohólicas, Brinker y Scherer definieron el proceso “sol-gel” como “la obtención de materiales óxidos por medio de la preparación de un sol, la gelación del sol y la eliminación del solvente” [16].

Un sol es básicamente una suspensión estable de partículas sólidas coloidales (1-100 nm) dentro de un líquido y un gel es una red rígida interconectado con poros de dimensiones submicrométricas.

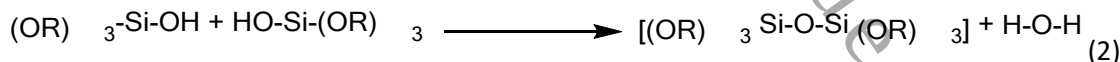
El proceso general sol-gel se basa principalmente en cuatro reacciones: hidrólisis, condensación, añejamiento y secado de los geles a temperatura ambiente, y por último el tratamiento térmico.

Etapas del proceso Sol-Gel

Hidrólisis: Una reacción de hidrólisis para la formación de $M(OH)_4$ es muy difícil de lograr completamente, pero se puede producir la condensación entre cualquiera de los dos grupos $-OH$ o $M-OH$ y un grupo alcoxi para formar puentes de oxígeno y agua o una molécula de alcohol.

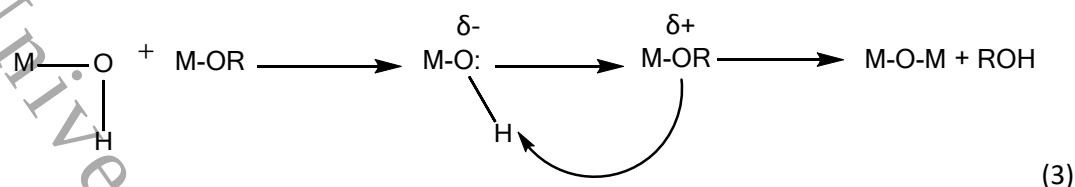


Condensación: es un proceso es complejo y puede ocurrir en cuanto se formen los grupos hidroxilo (MOH). Durante esta etapa de la reacción ocurre la formación de un gran número de grupos hidroxilo.

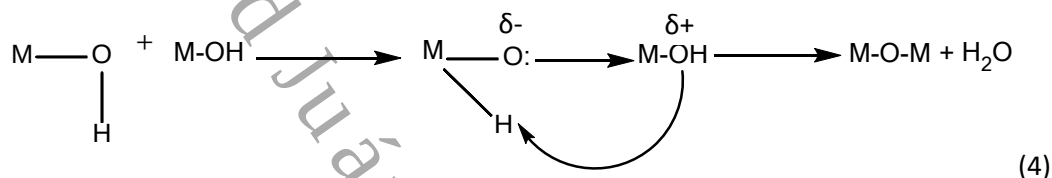


Dependiendo de las condiciones experimentales se han propuesto tres mecanismos competitivos, alcoxolación, oxolación y olación.

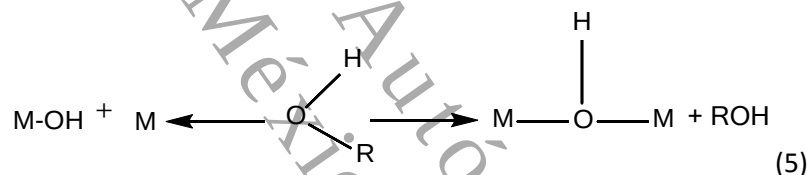
a) **Alcoxolación:** es la reacción por la cual se realiza el puenteo oxo a través de la eliminación de una molécula de alcohol:



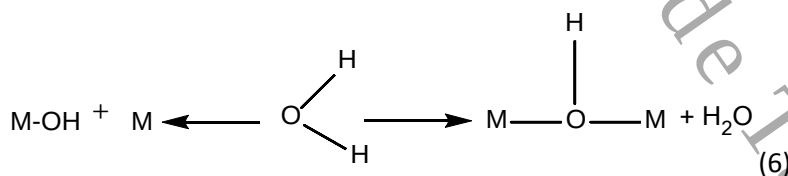
- b) Oxolación: sigue el mismo mecanismo que la alcoxolación, pero el grupo R de la especie saliente es el protón y el grupo saliente es una molécula de agua:



- c) Olación: cuando $N-Z > 0$ (N es el número de coordinación del catión M, y Z es el estado de oxidación del catión), la condensación puede ocurrir por olación:



La termodinámica de la hidrólisis, alcoxolación y oxolación están gobernadas por la fuerza del nucleófilo entrante, el carácter electrofílico del metal y la carga parcial y estabilidad del grupo saliente [26].



2.5 Citotoxicidad de nanomateriales

Una de las definiciones de la citotoxicidad es “capacidad que poseen ciertos compuestos para producir una alteración de las funciones celulares básicas que conllevan a un daño que puede ser detectado”.

La citotoxicidad de las nanopartículas depende de los parámetros como la morfología (forma y tamaño), hidrofobicidad, área de la superficie (rugosidad y porosidad) y la carga superficial. A menudo depende también a la solubilidad y la liberación de componentes tóxicos, así como a la adsorción de compuestos.

Otros de los parámetros que influyen en la citotoxicidad son los parámetros biológicos, estos pueden ser el tipo de células empleadas en el estudio, las condiciones de cultivo y de exposición, dentro de los que se puede mencionar la densidad celular, concentración de partículas, composición del medio, y la temperatura.

Para la cuantificación de la citotoxicidad de un compuesto existen métodos diversos, entre estos se encuentran aquellos que miden la actividad metabólica celular y los que se basan en el principio de exclusión celular.

Los ensayos que miden la actividad metabólica utilizan enzimas, para realizar este método se requiere: un contacto con las células vivas en medio de cultivo y expuestas a cantidades conocidas de los compuestos que se desean analizar; incubar de las células en diferentes intervalos de tiempo; un colorante que tenga un estado oxidado, un sustrato para la enzima citoplasmática.

Los ensayos basados en el principio de exclusión celular, utilizan sustancias capaces de atravesar la membrana plasmática y teñir las células. Cuando se realiza el conteo celular, este se puede realizar gracias a que se pueden distinguir las células vivas de las muertas, ya que las vivas poseen la capacidad de excluir el colorante activamente de sus citoplasmas. Algunos de los colorantes que se utilizan para hacer este ensayo es el Rojo Neutro, Cristal Violeta y Azul de Tripano [27,28].

2.6 SiO₂ como reservorio de principios activos

Durante la última década, se han reportado numerosas publicaciones sobre el uso de partículas de sílica como medio para encapsular diferentes principios activos [29], con la finalidad de poder mejorar la eficacia de dichos principios, disminuir las dosis empleadas que normalmente son altas debido a las pérdidas al recorrer el organismo antes de alcanzar la diana terapéutica. En la liberación de agentes citotóxicos para el tratamiento de cáncer, se busca además minimizar los efectos adversos asociados a la falta de selectividad.

Con respecto a agentes con actividad antitumoral, se ha empleado la sílica para encapsular fármacos aprobados por la FDA. Sin embargo, a pesar de los resultados alentadores de estos sistemas acarreadores, la baja selectividad de los fármacos es aún una limitante de éste tipo de terapias, por lo que el diseño de las partículas sigue siendo un área atractiva para desarrollar sistemas más eficientes [30]. Evidentemente, la mejora en las propiedades de los fármacos permitirá mejorar la eficiencia de las terapias contra el cáncer, especialmente cuando los tumores se localizan en el SNC, ya que como se ha mencionado, el acceso al cerebro está muy restringido por las barreras fisiológicas. Es en este sentido que se investiga sobre el diseño de nuevas moléculas que puedan ser menos agresivas hacia células sanas pero que logren disminuir o controlar la proliferación de células cancerígenas.

Los complejos organometálicos han demostrado tener buena actividad citotóxica con menos efectos adversos, el rutenio es un metal que ha demostrado ser una alternativa al platino el cual en forma de complejo muestra alta actividad antitumoral con menores efectos sistémicos [31]. Por otro lado, los complejos de cobre son otro grupo de moléculas que se han estudiado como agentes citotóxicos con resultados favorecedores. Desde la década de los 60's, cuando se descubrió la actividad citotóxica del cisplatino, se ha buscado desarrollar compuestos organometálicos que puedan igualar superar su actividad citotóxica, pero que a su vez disminuyan los efectos adversos que el cisplatino induce. En

este sentido, el diseño de nuevos compuestos citotóxicos ha generado un gran número de investigaciones, sin que aún se tengan alternativas viables. Hoy en día, se han desarrollado complejos organometálicos empleando rutenio, cobre y platino principalmente, pero de ellos pocos se encuentran en etapa de ensayos clínicos. En México, solo el trabajo realizado por Ruiz-Azuara y colaboradores [33] ha generado resultados prometedores que actualmente se encuentran en fases pre-clínicas.

EL zinc es un elemento que juega un papel muy importante en el desarrollo de varios procesos biológicos en los seres humanos. Éste elemento, tiende a poder formar complejos los cuales, diseñados adecuadamente pueden resultar competitivos con los complejos de rutenio y cobre, es por ello que en el presente trabajo, se empleó el complejo (bis (acetylacetonato- K^2 O, O') (1,10-fenantrolina- K^2 N, N') zinc (II)), el cual ya se ha reportado su síntesis [32], no así sus propiedades citotóxicas. En el presente trabajo, se reporta una metodología de síntesis simple para la obtención del complejo, con la finalidad de ser empleado como principio activo para ser cargado en las nanopartículas de SiO_2 y evaluar su citotoxicidad en una línea cancerígena.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud. 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- [2] Prabhu R., Patravale V., Joshi Medhna. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int. J. Nanomedicine*. **2015**, 10, 1001-1018.
- [3] Boerner J., Biscardi J., Parsons S. Overview of Oncogenesis en the Cáncer Handbook. Malcolm A. Wiley & son. **2007**
- [4] Marshman E., Booth C. Cell and Tissue Organisation en the Cáncer Handbook. Malcolm A. Wiley & son. **2007**
- [5] Llopis A., Capilla T., Chenlo U., Rubio N., Alegre A., Morales M. Central nervous system (CNS) cancer in children and young people in the European Union and its involvements with socio-economic and environmental factors. *J. Neurol. Sci*. **2015**, 359, 151-155
- [6] Caruso G., Caffo M., Alafaci C., Raudino G., Cafarella D., Lucerna S., Salpietro F., Tomasello F. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas?. *Nanomedicine*. **2011**.
- [7] Ruddon R.W., *Cancer Biology*, 4th Ed., 2007, Oxford University Press, New York, pp. 77-78.
- [8] Lun H., Yu X., Bendayan R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **2012**, 64, 686-700.
- [9] Pérez E., Fernández A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **2015**.
- [10] Escobar A., Gomez B. Barrera hematoencefálica. *Nurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Rev Mex Neuroci*. **2008**, 9, 395-405

- [11] Hansen J.T., Koeppen B.M., Atlas of neuroanatomy and neurophysiology Special Edition., Novartis Pharma, **2002**, p. 54
- [12] Gastaldi L., Battaglia L., Peira E., Chirio D., Muntoni E., Solazzi I., Gallarete M., Dosio F. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. Eur. J. Pharm. Biopharm. **2014**, 87, 433-444.
- [13] Escobar M., Pimienta H. Sistema nervioso. 2006. U. del Valle., 420
- [14] Bradbury M.W., History and physiology of the Blood-Brain-Barrier in relation to delivery of drugs, in: Begley D.J., Bradbury M.W., Kreuter J., Eds. The Blood—Brain-Barrier and drug delivery to the Central Nervous System, Marcel Dekker, Inc. New York, 2000, pp.13-15.
- [15] https://www.google.com.mx/search?q=barrera+hematoencefalica&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwiQyLvmkt_NAhWLeT4KHZf1CyAQ_AUIBigB#imgsrc=6QscPzdahpJF_M%3A
- [16] Jeffrey Brinker. Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. 1^{ra} Ed. Academic Press, Inc. 1990. pp. 2-10
- [17] Introduction sol-gel processing. The Kluwer international series in sol-gel processing: Technology and applications
- [18] Brito F.M., Castro G.R., Nanotecnología, hacía un nuevo portal científico Química Viva, **2012**, 11(3), 171-183).
- [19] Pratheep A., Depana D., Singh N., Pal R. Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization—Trends and future perspectives. Prog. Polym. Sci. **2009**, 34, 479-515.
- [20] Tang L., Cheng J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. Nano today. **2013**, 8, 290-312.

- [21] Deng Z., Zhen Z., Hu X., Wu S., Xu Z., Chu P. Hollow chitosanesilica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials*. **2011**, 32, 4976-4986.
- [22] Ridi F., Meazzini I., Castroflorio B., Bonini M., Berti D., Baglioni P. Functional calcium phosphate composites in nanomedicine. *Adv. Colloid Interface Sci*. **2016**.
- [23] Denning T., Rao S., Thomas N., Prestidge C. Oral nanomedicine approaches for the treatment of psychiatric illnesses. *J. Controlled Release*. **2016**, 223, 137-156.
- [24] Corriu R., Nguyễn A. *Molecular Chemistry of Sol-Gel Derived Nanomaterials*. 1^{ra} Ed., 2009. John Wiley & Sons, Ltd. pp.38-53.
- [25] Singh L., Bhattacharyya S., Kumar R., Mishra G., Sharma U., Singh G., Ahalawat S., Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Adv. Colloid Interface Sci*. **2014**, 214, 17-37.
- [26] Alvarez M. Efecto de M^{+X}/ZrO_2 , con $M=Mn, Fe, Co, Ni$ y Cu , en las propiedades fisicoquímicas del ZrO_2 . Tesis. Univ. Autónoma Metropolitana Azcapalapa. **2008**
- [27] Segura M., Chel L., Betancur D. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. 1^{ra} Ed., 2013. OmniaScience. pp.50.
- [28] Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. **2012**, 7, 5577–5591.
- [29] Wang Y., Zhao Q., Han N., Bai L., Li J., Liu J., Che E., Hu L., Zhang Q., Jiang T., Wang S., Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2015**, 11, 313-327.
- [30] França de Oliveira L., Bouchmella K., de Almeida Gonçalves K., Bettini J., Kobarg J., Borba Cardoso M., Functionalized silica nanoparticles as an alternative

platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs, *Langmuir*, **2016**, 32, 3217-3225

[31] Kostova I., Ruthenium complexes as anticancer agents, *Curr Med Chem.* **2006**, 13,1085-107.).

[32] Nie X., Qu J-N. Crystal structure of bis(1,10-phenanthroline- κ^2 N,N')-(malonato- κ^2 O¹,O³) zinc(II) pentahydrate, $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Z Kristallogr NCS*, **2011**, 226, 343-344.

[33] Ruiz-Azuara L., Bravo-Gómez M.E., Copper compounds in cáncer chemotherapy, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 3606-3615.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Síntesis de las nanopartículas

Los materiales del presente trabajo, se obtuvieron empleando el método sol-gel, partiendo del Tetraetil ortosilicato (TEOS) como precursor orgánico para el dióxido de silicio, etanol y agua. Se prepararon cuatro materiales de base, a los cuales posteriormente se les cargó con el complejo de zinc. Los materiales preparados se nombraron de acuerdo a la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Descripción y claves de las nanopartículas preparadas.

Descripción	Nombre
SiO ₂ : NH ₃ 1:1	SiO ₂ -N1
SiO ₂ : NH ₃ 1:2	SiO ₂ -N2
SiO ₂ , polietilenglicol como estructurante	SiO ₂ -PEG
SiO ₂ , polietilenglicol como estructurante, extracción solvotermal	SiO ₂ -PEG-ST
SiO ₂ : NH ₃ 1:1 + Zn(acac) ₂ (phen)	SiO ₂ -N1-Zn
SiO ₂ : NH ₃ 1:2 + Zn(acac) ₂ (phen)	SiO ₂ -N2-Zn
SiO ₂ , polietilenglicol como estructurante + Zn(phen)(acac) ₂	SiO ₂ -PEG-Zn
SiO ₂ , polietilenglicol como estructurante, extracción solvotermal + Zn(acac) ₂ (phen)	SiO ₂ -PEG-ST-Zn

3.1.1 Síntesis de SiO₂-N1

En un matraz erlenmeyer se colocaron 9.5 mL de etanol (CIVEQ, 96%) y 16.5 mL de agua desionizada (CIVEQ, conductividad 20x10⁻⁶) a esta mezcla se le agregaron 7.5 mL de NH₄OH (CIVEQ, 28-30%), se mantuvo en agitación durante

10 minutos (solución A). Por separado, se mezclaron 9.5 mL de etanol y 19 mL de TEOS (Sigma-Aldrich, 98%) y se colocaron en un embudo de adición. Esta mezcla se adicionó gota a gota a la solución A y se dejó reaccionar a temperatura de 35°C durante 8 días, con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se observó la formación de una suspensión, la cual, se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante se retiró y posteriormente se secó en un horno (ECOSHEL) durante 12 h a una temperatura de 40°C. Una vez seco, el material se pulverizó empleando un mortero de ágata y se almacenó para su posterior caracterización.

3.1.2 Síntesis de $\text{SiO}_2\text{-N2}$

Para la síntesis de este nanomaterial, el procedimiento fue similar al descrito para el $\text{SiO}_2\text{-N1}$, solo se modificaron las siguientes cantidades: 9.1 mL de agua desionizada y 14.9 mL de NH_4OH .

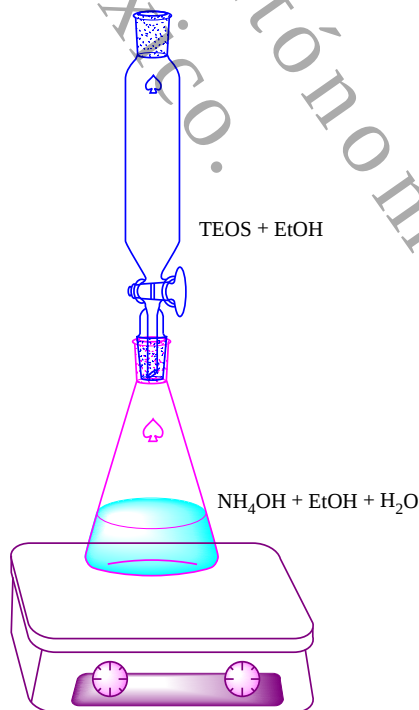


Figura 3.1 Esquema de la síntesis con NH_4OH .

3.1.3 Síntesis de SiO_2 -PEG

Para la síntesis de éste material se empleó una modificación de la metodología reportada por Caturo y colaboradores [1]. En un matraz de tres bocas, se disolvieron 2.82 mL de polietilenglicol (PEG, Sigma-Aldrich, M_n promedio: 400), con 9.5 mL de etanol a una temperatura de 60°C la solución se mantuvo en agitación constante y bajo reflujo, una vez disuelto el PEG se adicionaron 24 mL de agua desionizada y se añadieron 19 ml de TEOS gota a gota con un embudo de adición. La temperatura y el reflujo se mantuvieron por 24 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el calentamiento y la solución transparente se mantuvo en agitación por 15 días, el gel formado se dejó a 60°C en un horno de secado durante 24 h. Una vez seco, el nanomaterial se pulverizó en un mortero de ágata y se calcinó a 550°C durante 4 h con una velocidad de calentamiento de $2^\circ\text{C}/\text{min}$. El polvo obtenido se almacenó para su posterior caracterización.

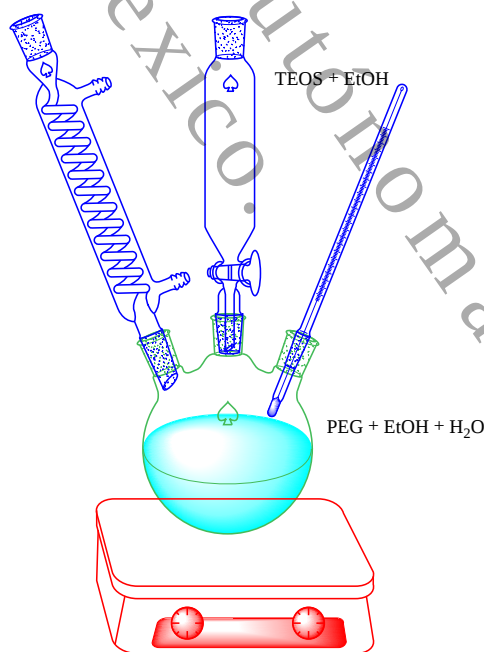


Figura 3.2 Esquema de la síntesis con PEG de acuerdo con la síntesis de Caturo.

3.1.3 Síntesis de SiO_2 -PEG-ST

La metodología empleada se basó en lo reportado por Setyawan y colaboradores [2] a excepción del precursor empleado. Previamente, se preparó una **solución A** con 2.82 mL de PEG y 100 mL de agua desionizada, además de una **solución B** de HCl 1 M. En un matraz de tres bocas, se colocaron 30 mL de la solución A y 45 mL de la solución B. La mezcla se preparó a temperatura ambiente y se mantuvo con agitación vigorosa. Se ajustó el pH a 4 con una solución de NaOH 5M, la mezcla se dejó sin agitación y se dejó envejecer por 1 h a temperatura de 35°C. Posteriormente, se incrementó la temperatura a 80°C y se reinició la agitación dejando la mezcla en estas condiciones por un periodo de 2 h, observándose la formación de un gel blanco. El gel se secó a 90°C durante 16 h. El material se pulverizó en un mortero de ágata y se lavó 4 veces con 20 mL de agua desionizada, para luego ser cado a 90°C durante 2 h. Para extraer el PEG, se empleó un equipo Soxhlet y la siguiente metodología: en el cartucho de celulosa se colocó el polvo y se adicionaron 200 mL de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% v/v manteniendo en reflujo por 18 h a una temperatura de 160°C. Después, el material se secó a 100°C durante 24 h. El material se almacenó para su posterior análisis.

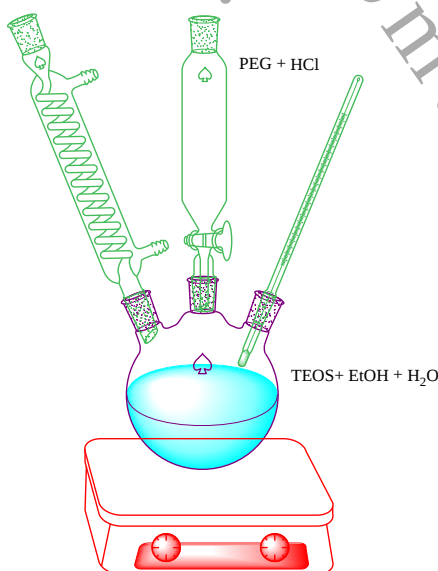


Figura 3.2 Esquema de la síntesis con PEG de acuerdo con la síntesis de Caturo.

3.1.5 Síntesis del complejo $Zn(acac)_2(phen)$

En un matraz Erlenmeyer, se disolvieron 1.6476 g de acetilacetato de zinc monohidratado (Sigma-Aldrich) en 200 mL de una solución al 70% v/v de etanol en agua. Una vez disuelto, se adicionaron 1.1207 g de 1,10-fenantrolina. La mezcla se mantuvo en agitación vigorosa durante 1.5 h. La suspensión formada se filtró y se lavó con etanol y agua desionizada. El material filtrado, se secó a 50°C en un horno de secado durante 24 h.

3.1.5 Carga del complejo $Zn(acac)_2(phen)$ en las nanopartículas.

En un matraz aforado se preparó una solución de ácido acético (CIVEQ, 99.7%) al 1% v/v en agua desionizada. En un matraz volumétrico de 50 mL se preparó otra solución con 500 mg del complejo $Zn(acac)_2(phen)$ y ácido acético al 1%(v/v) para tener una concentración de 10 mg/mL. En un vaso de precipitados se colocaron 5 mL de ésta solución y 500 mg de cada nanopartícula por separado. Se mantuvo en agitación por 4 horas y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se secaron a 50°C durante 12 h. Los materiales con el complejo se etiquetaron como $SiO_2-N1-Zn$, $SiO_2-N2-Zn$, $SiO_2-PEG-Zn$ y $SiO_2-PEG-ST-Zn$.

3.2 Técnicas de caracterización

3.2.1 Resonancia Magnética Nuclear del Complejo de Zn

La estructura química del complejo de zinc sintetizado para este trabajo se obtuvo mediante RMN de líquidos y sólidos. Para ello, se empleó en un espectrómetro Varian-Agilent 600 de con $\pi / 2$ de pulso de 8.7 y 8.6 μs para 1H y ^{13}C , respectivamente y los espectros se tomaron a 25°C. Para la resonancia de líquidos, se empleó DMSO- d_6 como solvente y los cambios químicos (ppm) se determinaron en relación al protón interno del tetrametilsilano (0.0 ppm). Para la

RMN de estado sólido del ^{13}C de (150,8 MHz) los espectros de polarización cruzada del giro al ángulo mágico (CP/MAS) se registraron a 22 ° C en un equipo Agilent 600 con rotores de ZrO_2 (diámetro 4,2 mm). Se utilizaron $\pi/2$ de pulso de 2.0 μs , 1.0 μs de tiempo de contacto y 5.0 s de demora de reciclaje. Los desplazamientos químicos (ppm) se determinaron en relación al adamantano (38,4 ppm).

3.2.2 Difracción de rayos X de polvos

Para el análisis tanto del complejo como de los materiales a base de SiO_2 , se empleó la difracción de rayos-X de polvos. Las muestras fueron analizadas en un equipo marca Bruker modelo D2 Phaser, los difractogramas se obtuvieron en el rango de 10-100° (2θ), usando $\text{Cu-K}\alpha$ como fuente de rayos-X cuya longitud de onda (λ) es de 1.541 Å y empleando un paso de 0.03 s $^{-1}$.

3.2.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Para el análisis de los materiales, se empleó la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Se prepararon pastillas al 5% en peso de muestra en bromuro de potasio (JT Baker. 99%) y fueron analizadas en un rango de 350-4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} utilizando un equipo marca Shimadzu, modelo IR-Affinity 1.

3.2.4 Espectroscopía Ultra violeta-Visible (UV-Vis) por reflectancia difusa.

Para el análisis de las nanopartículas, se empleó la Espectroscopia UV-Vis por reflectancia difusa. Las muestras fueron analizadas en un equipo marca Shimadzu modelo UV-2600/2700 con esfera de integración, los espectros se obtuvieron en el rango de 190-800 nm , usando como referencia sulfato de bario (BaSO_4).

3.2.5 *Análisis térmico*

El análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se obtuvieron en un analizador térmico simultaneo marca STA y modelo i-1000, los gráficos se generaron a partir de las siguientes condiciones con $10^{\circ}\text{C} / \text{min}$ y con flujo de aire ($10\text{ cm}^3 / \text{min}$) desde la temperatura ambiente hasta los 600°C .

3.2.6 *Adsorción de nitrógeno*

Las determinaciones de área superficial BET y tamaño de poro se realizaron mediante las isothermas de absorción, desorción de N_2 a 77K en un equipo Quanta Chrome (Autosorb 3B). Los materiales de desgasificaron a 100°C , durante 12 horas. Para la distribución de tamaño de poro se emplearon los datos de desorción empleando el método BJH.

3.2.7 *Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)*

Para el análisis de las nanopartículas se empleó un microscopio FESEM-7600 marca JEOL, con un voltaje de aceleración de 20 kV.

3.2.8 *Dispersión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partícula y Potencial Zeta*

El tamaño de partícula y su potencial zeta a pH 7, se determinaron mediante dispersión de luz dinámica en un equipo ZetaSizer Nanoseries (Malvern Instruments). Para las mediciones, 3 mg de cada muestra se suspendieron en 100 mL de agua destilada usando celdas DTS1060C para las mediciones de potencial zeta, mientras que para el tamaño de partícula se emplearon celdas tipo DTS10012.

3.3 Evaluación biológica in vitro

3.3.1 Biocompatibilidad de las nanopartículas de SiO₂

Se aislaron células mononucleares primarias usando la separación por gradiente de densidad con el reactivo Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones manufactureras. Todos los experimentos se establecieron con las células mononucleares extraídas de individuos normales (n = 5). Las células se cultivaron con medio RPMI 1640 más un 10% de suero bovino fetal, 10 mM de penicilina estreptomicina y 10 mM de L-glutamina (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) a 37 °C, 5% CO₂ en un incubadora humidificado. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano. Brevemente, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5 x 10³ cells / pocillo, y los compuestos se incorporan en el medio a una concentración de 20 µg / ml. Los compuestos empleados para los tratamientos eran recién preparados en sulfóxido de dimetilo (DMSO); las células de control sólo se incubaron con DMSO. Después de 48 horas de tratamiento, el número de células viables se evaluó con azul de tripano al 0,4% en el recuento manual en un microscopio invertid Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, GE), utilizando un hemocitómetro (Sigma-Aldrich, EE.UU.). El porcentaje de células viables en el grupo de tratamientos se ajustó al valor obtenido en el grupo de control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.2 Citotoxicidad de las nanopartículas-complejo

Se fijaron las células con 300 µL de formol al 10% v/v, se dejaron en agitación por 10 minutos, posteriormente se lavaron con 500 µl de agua destilada. Las células se tiñeron con 300 µL de cristal violeta al 0.1%w, y se dejaron en agitación por 30 minutos. Se les retiro el colorante y se lavaron con 600 µL de agua destilada hasta que el resultado de los lavados fuera transparente aproximadamente son 4 lavados. Una vez lavadas las células se les agregaron 300 µL de ácido acético al

10%v/v y se dejaron en agitación por 20 minutos. Pasados los 20 minutos se las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de 595nm.

Se utilizó la línea celular U373, provenientes de un astrocitoma humano, son células de crecimiento adherente con una morfología Pleomorfo/ astrocitoma. Para la lectura de los resultados de tinción celular se utilizó un equipo marca Epoch y modelo 150123, en modo de absorbancia y a una longitud de onda de 595nm.

REFERENCIAS

[1] Catauro M., Bollino F., Papale F., Gallicchio M., Pacifico S., Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique. *Mat. Sci. Eng. C* (2015) 48:548-555.

[2] Setyawan H., Yuwana M., Balgis R. PEG-templated mesoporous silicas using silicate precursors and their applications in desiccant dehumidification cooling systems. *Micropor. Mesopor. Mat.* (2015) 218:95-100.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis y caracterización del complejo de Zn.

Debido a que el zinc es un elemento que participa en un gran número de reacciones dentro del organismo se diseñó un compuesto que al formar un complejo con 1,10- fenantrolina, pudiera tener actividad hacia células cancerígenas. La metodología empleada es simple, y el rendimiento obtenido fue de 57%. El complejo se sintetizó empleando acetilacetonato, el cual también es un compuesto conocido por su capacidad de formar complejos. La reproducibilidad de la síntesis se confirmó mediante la caracterización de tres distintos lotes etiquetados como S1, S2 y S3. En la figura 4.1 se muestra la estructura del complejo bis (acetilacetonato- $K^2 O,O'$)(1,10-fenantrolina- $K^2 N,N'$) zinc(II) obtenido a través de los espectros de RMN del protón y de carbono-13 mostrados en las figura 4.2.

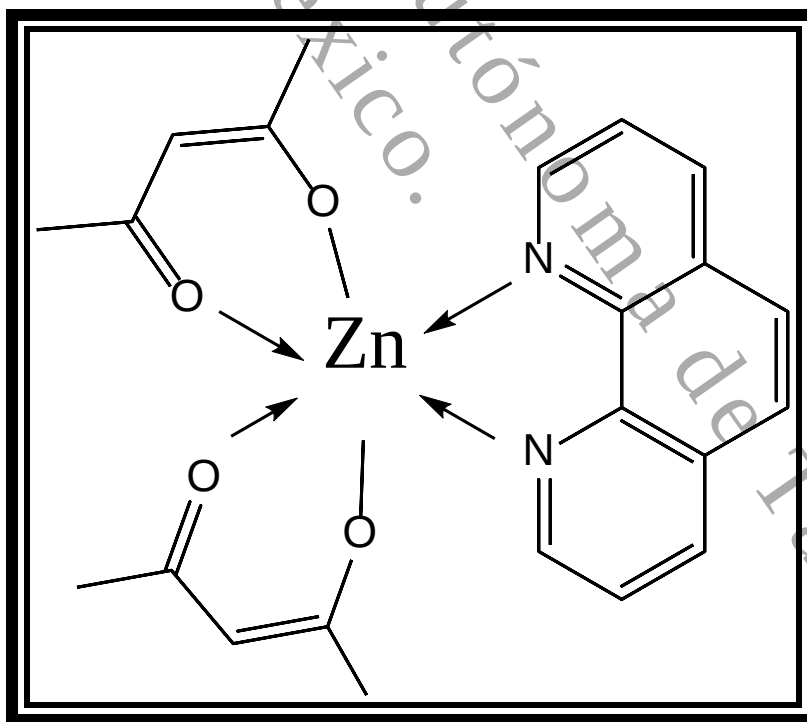


Figura 4.1 Estructura química del complejo bis(acetylacetonato- $K^2 O,O'$)(1,10-fenantrolina- $K^2 N,N'$) zinc(II) obtenido por RMN de 1H y ^{13}C .

La identidad del complejo se determinó en solución $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ (599.8 MHz) y en estado sólido ^{13}C (150.8 MHz) CP/MAS. El espectro en DMSO mostró solo un grupo de señales de resonancia para los dos ligandos quelantes bidentados, indicando la presencia de comportamiento fluxional, es decir, poseen más de una configuración geométrica, lo cual suele ser fácil en complejos de zinc [1]. La formación del complejo se da debido a la flexibilidad estereoquímica de coordinación de los iones Zn^{2+} , lo que permite la interacción con átomos donadores para formar complejos estables.

Los corrimientos químicos encontrados en el espectro fueron $\delta = 1.73$ (s, 6H, CH_3), $\delta = 5.14$ (s, 1H, $\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)\text{O}$), $\delta = 7.95$ (ancho, 1H, CHC), $\delta = 8.14$ (ancho, 1H, CH_D), $\delta = 8.69$ (ancho, 1H, CH_B), $\delta = 8.88$ (ancho, 1H, CH_A), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150.8 MHz, $\text{dmsO}-d_6$) $\delta = 27.69$ (CH_3), $\delta = 98.19$ ($\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)\text{O}$), $\delta = 124.38$, $\delta = 126.60$, $\delta = 126.60$, $\delta = 128.29$, $\delta = 137.66$, $\delta = 148.76$ (C-aromático). $\delta = 189.96$ ($\text{C}=\text{O}$). ^{13}C CP/MAS NMR (150.8 MHz) $\delta = 27.93$ (CH_3), $\delta = 96.84$ ($\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)\text{O}$), $\delta = 127.95$, $\delta = 135.73$, $\delta = 140.69$, $\delta = 152.01$ (C-aromático), $\delta = 190.35$ ($\text{C}=\text{O}$), lo cual confirma la estructura del complejo, mismo que ha sido reportado por Nie X. y colaboradores [2], y el cual se confirmó mediante análisis de rayos-X de monocristal (ANEXO A1).

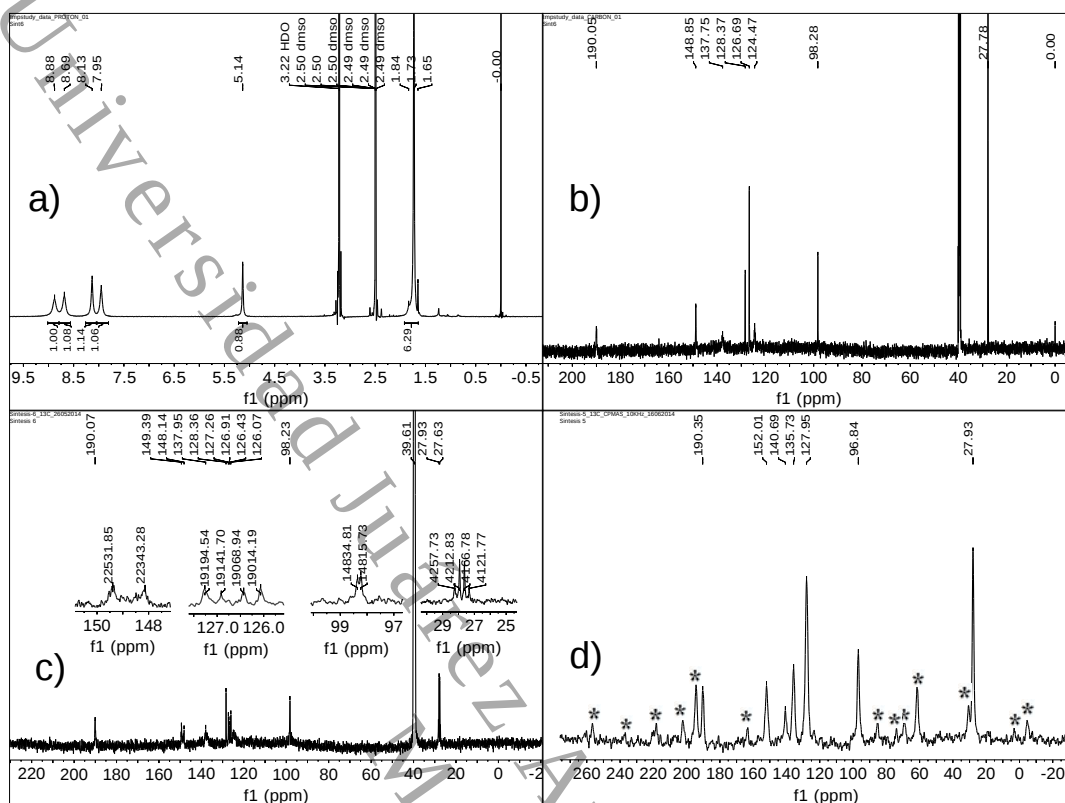


Figura 4.2 Espectro RMN de a) ^1H NMR del complejo $\text{Zn}(\text{acac})_2(\text{phen})$ en $\text{DMSO}-d_6$, b) espectro RMN de ^{13}C NMR en $\text{DMSO}-d_6$, c) y d) ^{13}C CP/MAS, las señales con asterisco son debidas a bandas laterales giratorias a 10 KHz.

En la figura 4.3 se muestran los difractogramas de las tres diferentes síntesis del complejo y la fenantrolina. En ella se observa señales de la fenantrolina a 14.3° , 17.2° , 20.7° , 22.4° y 23.2° (2θ), las cuales aparecen ligeramente desplazadas en el complejo de zinc indicando el acomplejamiento con el ión. Los patrones observados para el complejo en sus tres diferentes síntesis, fueron idénticos lo que nos confirma la reproducibilidad del método de síntesis.

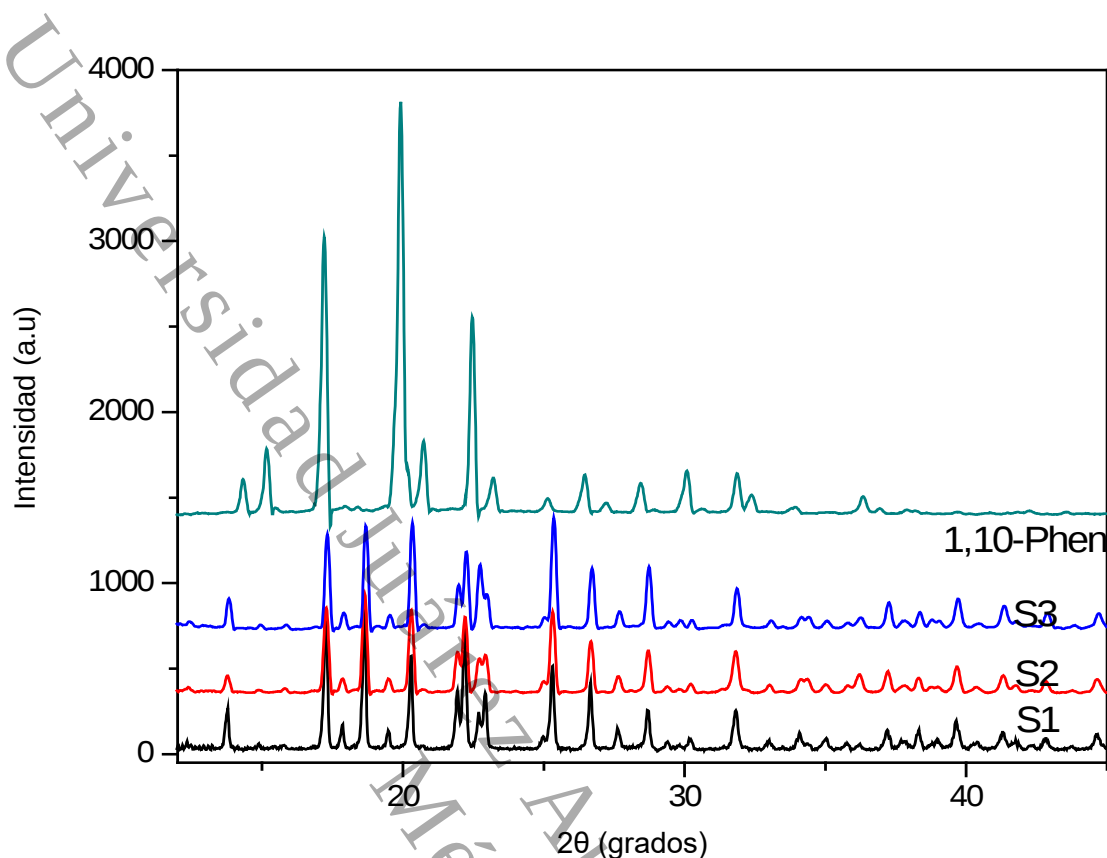


Figura 4.3 Difractogramas del complejo de zinc y 1,10-fenantrolina. S1, S2 y S3 hacen referencia a los tres diferentes lotes.

Se colectaron los espectros infrarrojo de ambos precursores y del complejo de zinc sintetizado, con la finalidad de identificar las bandas correspondientes a los grupos funcionales de ambos precursores en el complejo. Para el espectro del complejo, en la región de $3600\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, se observó una banda centrada a 3421 cm^{-1} asociada posiblemente con la presencia de agua adsorbida, la cual aparece desplazada con respecto a la que mostraron los precursores. Las bandas de vibración correspondiente al enlace $\text{C}=\text{N}$ a 1589 cm^{-1} y 1512 cm^{-1} debidas a la presencia del anillo aromático de la fenantrolina se desplazaron hacia 1581 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} , respectivamente. El principal cambio se observó en la banda asociada a las vibraciones $\nu(\text{C-H})$ de la fenantrolina localizadas a 844 cm^{-1} y 732 cm^{-1} las cuales se desplazaron hasta 848 cm^{-1} y 763 cm^{-1} . Lo anterior puede atribuirse a que los átomos de nitrógeno de la fenantrolina pueden donar un par de electrones cada uno al átomo de zinc formando un enlace covalente [3].

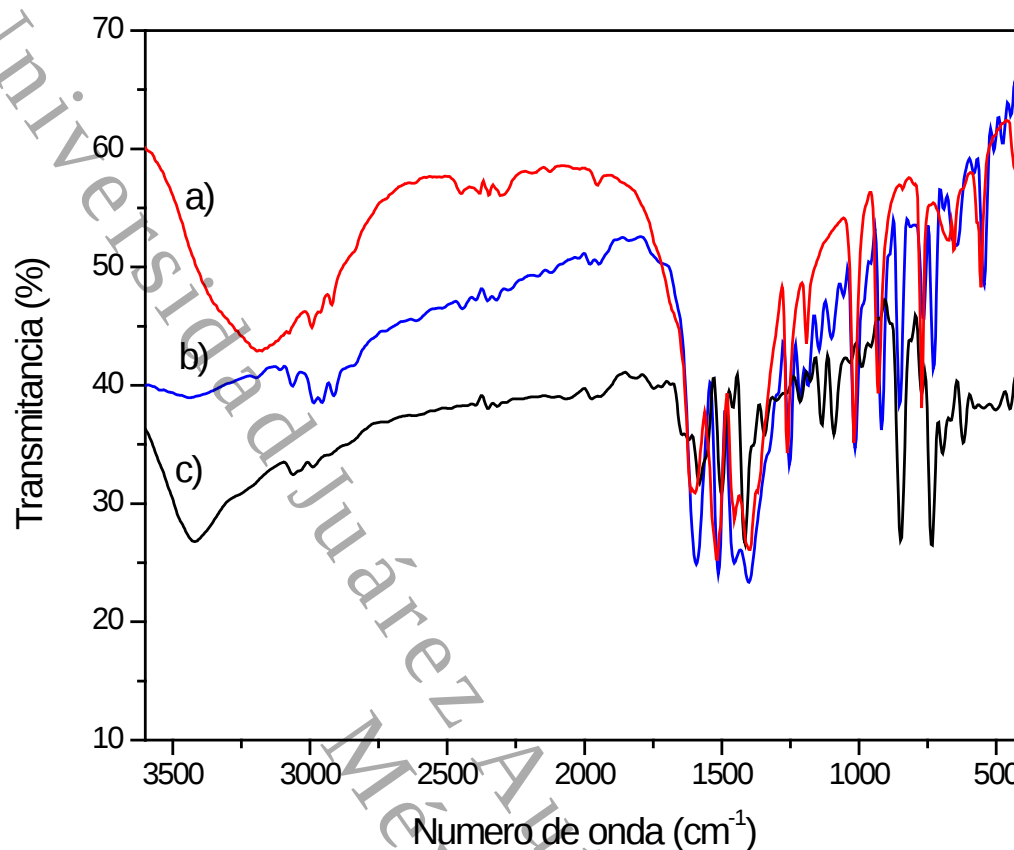


Figura 4.4 Espectros IR en modo transmitancia de a) acetilacetato de zinc, b) 1,10-Fenantrolina y c) complejo de Zn.

Por otro lado, las bandas características del acetilacetato se encuentran traslapadas con algunas de las bandas de la fenantrolina, sin embargo la banda a 929 cm^{-1} corresponde a las vibraciones $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$, la cual se observa claramente en el espectro del complejo.

Lo anterior, confirma la estructura del complejo obtenido y demuestra nuevamente que la metodología es reproducible.

4.2 Caracterización de las nanopartículas de SiO_2

4.2.1 Espectroscopía UV-Vis por reflectancia difusa

Los espectros UV-Vis de los nanomateriales $\text{SiO}_2\text{-N1}$, $\text{SiO}_2\text{-N2}$ y $\text{SiO}_2\text{-PEG-ST}$, se muestran en la Figura 4.5. Las nanopartículas de sílica se han estudiado en

otros campos diferentes a la nanomedicina, debido a un interesante fenómeno óptico causado por los defectos puntuales que presente la red continua, como vacancias de oxígeno o de silicón [4]. El SiO_2 es considerado un material aislante con una banda característica de absorción alrededor de los 300 nm. En los materiales de SiO_2 obtenidos, se observan bandas de absorbancia similares a las reportadas por Sowri K. [5]. Sin embargo, existen diferencias notables entre los diferentes espectros. EL material SiO_2 -PEG presenta una banda de absorción ancha y muy intensa a 282 nm, mientras que para el resto de las muestras esta banda aparece con muy baja intensidad, esto señal ancha e intensa de la muestra SiO_2 -PEG debe al tratamiento térmico a la que fue sometida para la eliminación del PEG. Las nanopartículas de SiO_2 sintetizadas con amonía presentan dos señales, la primera es una banda que parece en el rango de 220-230 nm aproximadamente y la segunda aparece cerca de los 280 nm. Las diferencias entre las posiciones e intensidades de las bandas, pueden asociarse a diferencias en los tamaños de partícula [6], ya que existen diferencias notables en éste parámetro de acuerdo a lo que se discute en secciones posteriores.

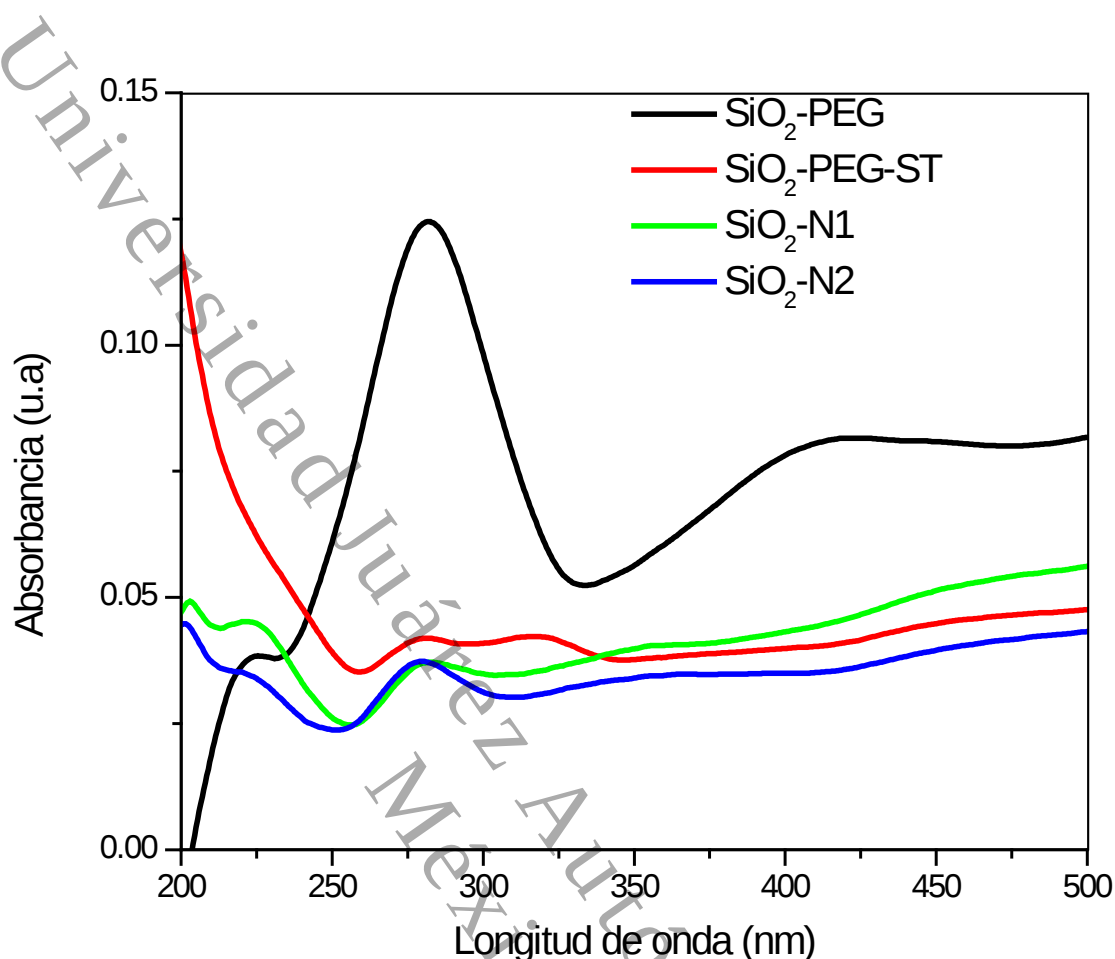


Figura 4.5 Espectros UV-Visible (reflectancia difusa) de los nanomateriales de SiO₂.

4.2.2 Difracción de rayos X

El SiO₂ presenta tres fases cristalinas de forma natural las cuales son el cuarzo, tridimita y cristobalita, además de que se puede encontrar la sílice amorfa. Con respecto a las aplicaciones biológicas, solo la estructura amorfa es considerada como inerte, lo que permite su aplicación en biología y medicina [5,7].

La Difracción de Rayos X se realizó para estudiar la estructura de los materiales y los difractogramas obtenidos se muestran en la Figura 4.6. Para las 4 muestras se observó una señal amplia en 22°(2θ) aproximadamente, lo cual corresponde con lo reportado en la literatura [8, 9, 10], ya que se describe que el difractograma de la sílica amorfa presenta una joroba en la región de 20-30°(2θ).

Independientemente de la cantidad de amoníaco usado o de la forma de extracción del PEG, el SiO_2 retuvo su estructura amorfa. Esta característica ha sido observada por otros autores en donde incluso la variación en el contenido de PEG tampoco ejerce modificaciones en la estructura [11]. Respecto a la toxicidad de las nanopartículas de SiO_2 y otros óxidos inorgánicos, los estudios tienen resultados contrastantes. Existen reportes en donde partículas amorfas de SiO_2 inducen citotoxicidad [12], pero es generalmente aceptado que la sílica cristalina posee mayor citotoxicidad [13]. En el caso particular del presente trabajo, se obtuvieron materiales amorfos, tales resultados eran los deseados, ya que se considera que su toxicidad es baja, esto con la finalidad de que al actuar como acarreadores de un agente citotóxico, actúen únicamente como medio de entrega y no ejerzan algún efecto dañino en las células.

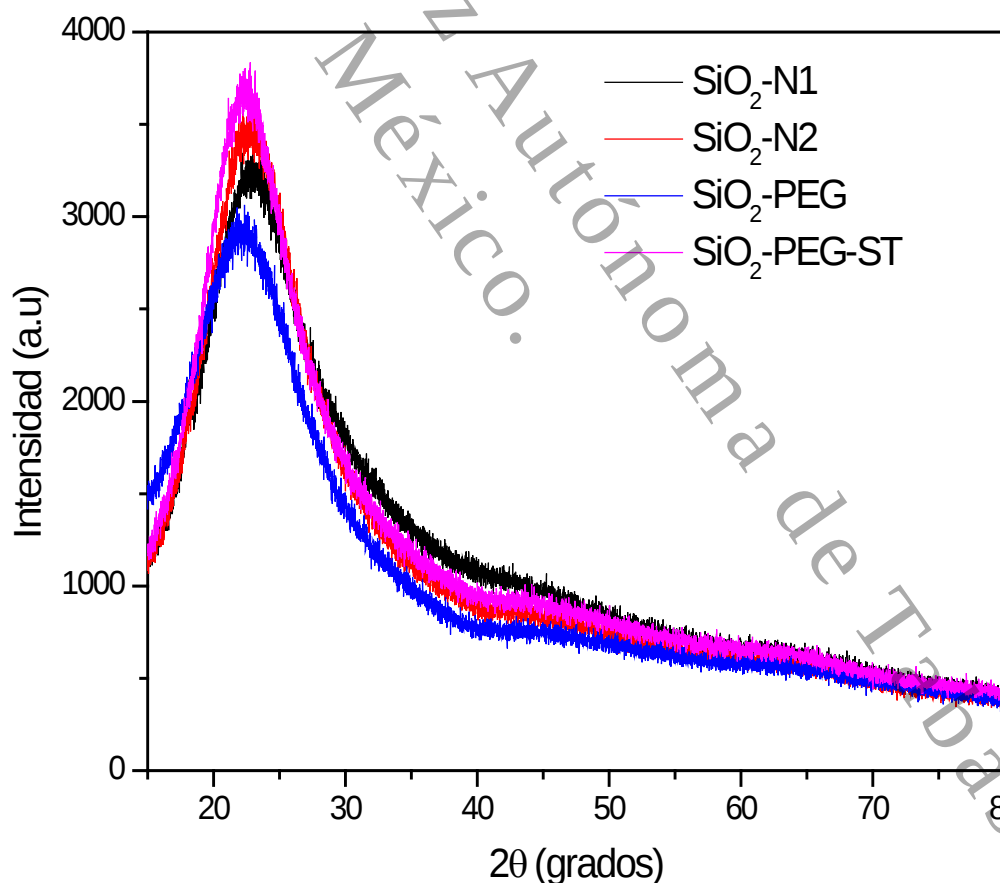


Figura 4.6 Difractogramas de las nanopartículas de SiO_2 obtenidas por DRX de polvos.

4.2.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

En el análisis de espectroscopia de infrarrojo se pueden identificar los grupos funcionales presentes en un material. En el estudio de materiales, es una herramienta muy útil, ya que nos proporciona información acerca de las interacciones entre una matriz sólida y moléculas modificadoras de superficie. Para el caso particular de nuestro estudio, es importante determinar la presencia de agentes diferentes al óxido de silicio, en este caso PEG y amoniaco los cuales actuaron como estructurantes del SiO_2 . En la Figura 4.7 se muestran los espectros infrarrojos de los materiales en el rango del infrarrojo medio. Para las 4 materiales se observa una banda ancha de entre 3600 cm^{-1} y 3100 cm^{-1} que corresponde a la vibración de tipo tensión del enlace $\text{O-H}(\nu_{\text{OH}})$, correspondientes a grupos hidroxilo del agua, etanol e hidroxilación del gel (Si-OH) [6], la señal que aparece entre los 1630 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del grupo hidroxilo asociados a la presencia de agua molecular.

La banda intensa que aparece entre 1100 cm^{-1} y 1120 cm^{-1} con un hombro a los 1250 cm^{-1} , para el caso de $\text{SiO}_2\text{-N1}$, $\text{SiO}_2\text{-PEG}$ y $\text{SiO}_2\text{-PEG-ST}$ se atribuye a las vibraciones de estiramiento del enlace Si-O y al enlace Si-O-Si , esta misma señal aparece desplazada a los 1400 cm^{-1} para $\text{SiO}_2\text{-N2}$ [14, 15]. La banda que aparece entre los 950 cm^{-1} y 970 cm^{-1} se puede atribuir a la vibración de estiramiento de los átomos que no forman puentes de oxígeno tales como el enlace Si-OH o el enlace $\text{Si-H}_2\text{O}$. Por último las bandas de 800 cm^{-1} y 470 cm^{-1} corresponden a los enlaces de las vibraciones en modo de doblez para los enlaces O-Si-O y Si-O-Si [16].

De manera general, no se observaron cambios significativos entre los diferentes espectros, ni la aparición de bandas correspondientes al PEG ni al amoniaco, lo cual es indicativo de una eficiente eliminación de los estructurantes.

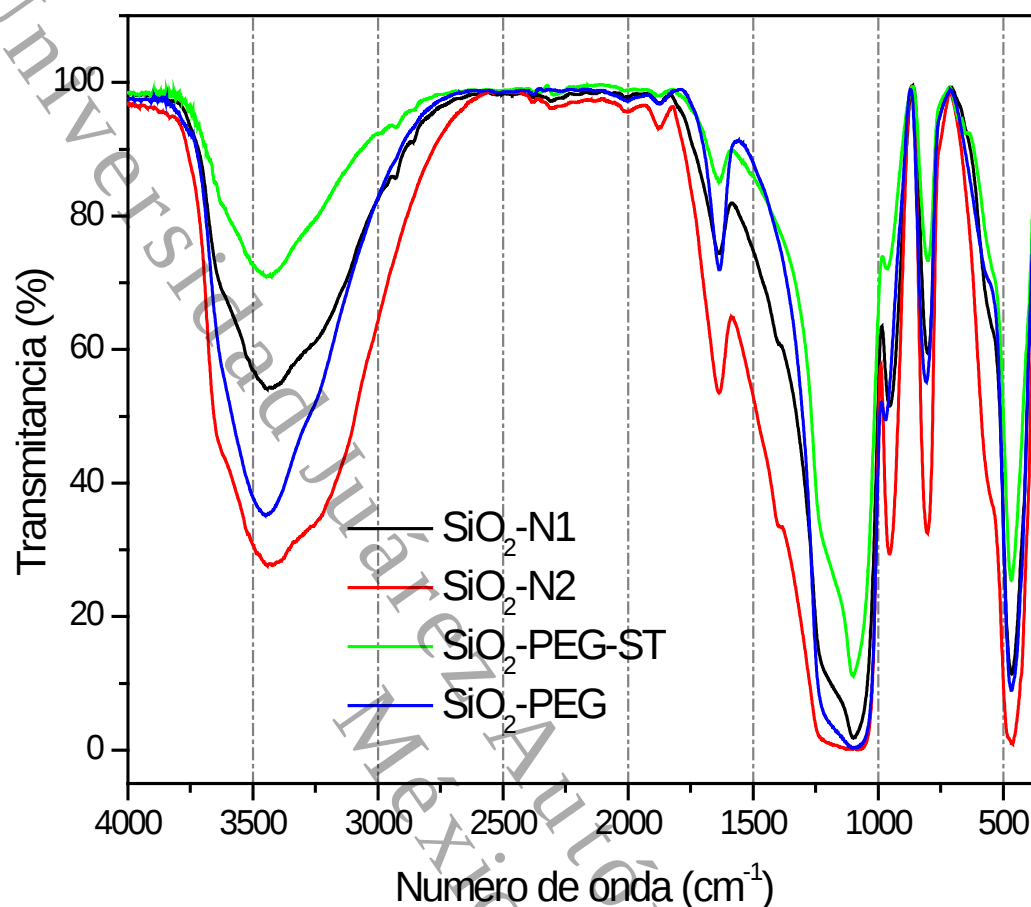
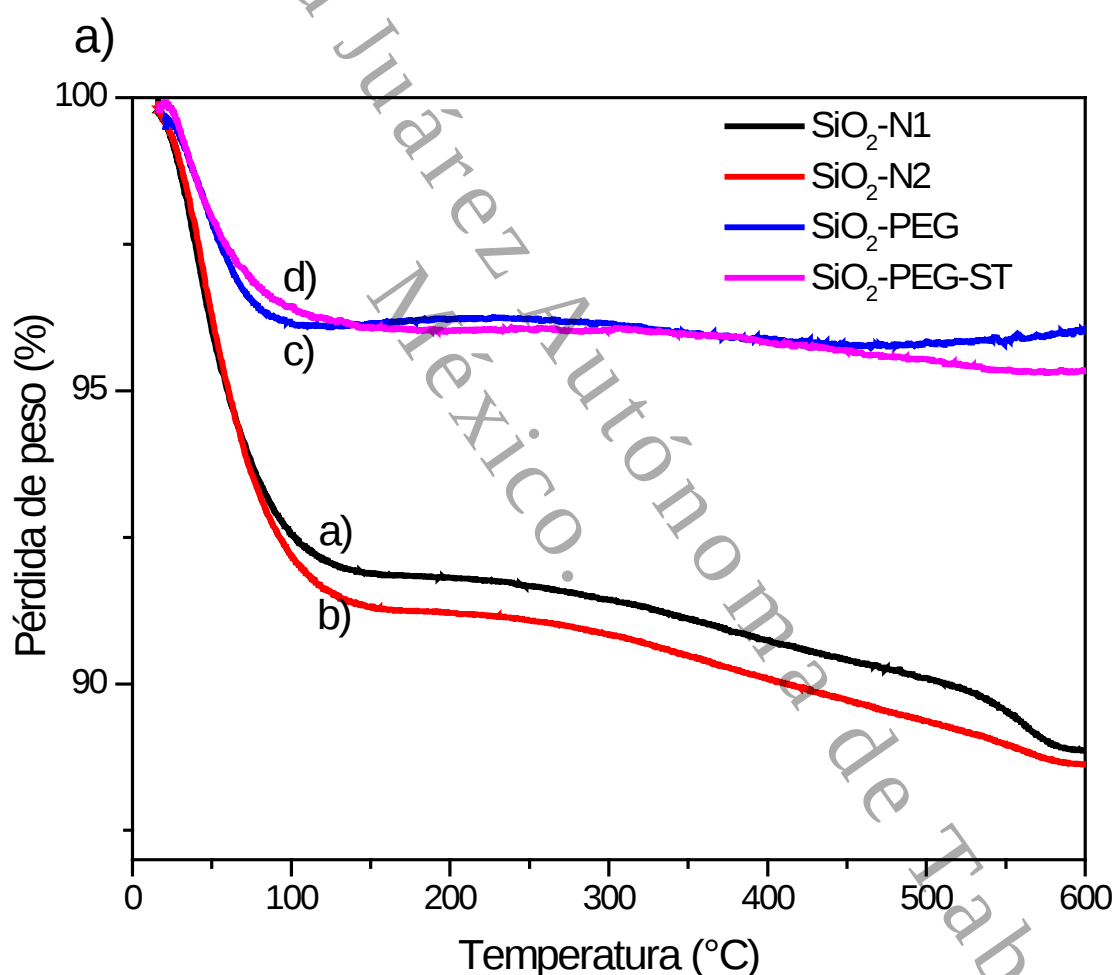


Figura 4.7 Espectros infrarrojos de los materiales nanoparticulados de SiO₂ sintetizados a diferentes condiciones.

4.2.4 Análisis térmico

En la Figura 4.8 se muestran los termogramas de los materiales sintetizados. Los materiales preparados con amoníaco, muestran una pérdida de peso inicial de aproximadamente 8 y 9% para el SiO₂-N1 y SiO₂-N2 respectivamente en el rango de temperatura ambiente hasta aproximadamente 150°C. De 154°C hasta 600°C se tiene una pérdida gradual de aproximadamente 2% la cual se atribuye al reacomodo de los grupos OH estructurales, transformación que es característica de materiales sol-gel. Las nanopartículas con PEG, SiO₂-PEG-ST y SiO₂-PEG muestran una pérdida de peso inicial de aproximadamente 3 y 4%.

respectivamente, esta pérdida se generó a partir de la temperatura ambiente hasta aproximadamente los 120°C. A partir de los 300°C hasta los 600°C se observó una pérdida de 1% esto puede deberse al igual que en el caso de las muestras con amoníaco, al reacomodo de los grupos OH estructurales. Lo que puede atribuirse a la pérdida de agua y disolvente orgánico residual de acuerdo con lo reportado por Li Z [10, 17].



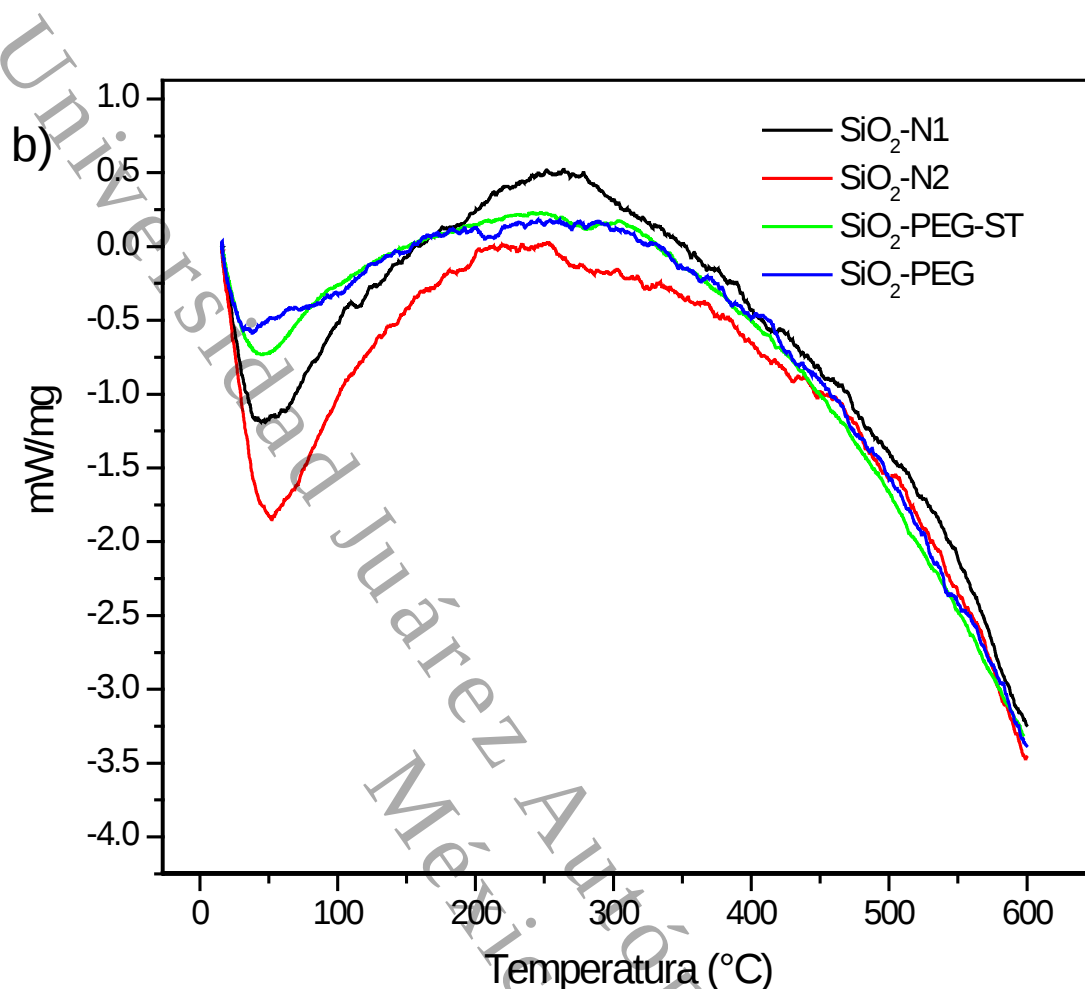


Figura 4.8 Análisis térmico de los materiales realizado en atmósfera de aire. a) TGA y b) DSC, donde los picos hacia abajo indican un proceso endotérmico.

La pérdida de masa inicial, va acompañada de un pico endotérmico, el cual es más intenso en los materiales preparados con amonía que para los preparados con PEG. Esto posiblemente se deba a que los primeros, fueron secados a condiciones suaves (por debajo de 100 grados) por lo que aún se encuentra agua del ambiente en la superficie de ambos nanomateriales. Por otro lado, esto coincide con la diferencia en pérdida de masa con relación a los materiales con PEG, ya que debido al proceso posterior a la formación del gel (calcínación para SiO₂-PEG y extracción térmica con solvente para el SiO₂-PEG-ST), la cantidad de agua presentes en la superficie es significativamente menor. El pico exotérmico que se observa alrededor de los 300°C es mayor para el SiO₂-N1 y

corresponde al reacomodo estructural de los OH de la red del SiO₂. Esta diferencia puede atribuirse a la influencia de la forma y tamaño de la partícula. Los resultados reportados por Rahman N [3], los termogramas de TGA para los caso específicos de SiO₂-PEG y SiO₂-PEG-ST, podemos confirmar que el PEG se eliminó por completo ya que de acuerdo con lo reportado en la literatura la presencia de PEG en las muestras hace que el peso en el análisis TGA caiga drásticamente a una temperatura de aproximadamente de entre 200°C y 600°C [15].

Con el resultado obtenido tanto en el TGA como en DSC se confirma lo observado por espectroscopía FTIR, ya que no se detecta la presencia de restos de alguno de los estructurantes.

4.2.5 Adsorción de nitrógeno

Una de las principales características para el uso de nanomateriales como acarreadores de fármacos, es que sus dimensiones pequeñas, incrementan el área superficial disponible para poder cargarlas con principios activos. El SiO₂ es un material que puede encontrar aplicaciones como adsorbente, debido a que puede obtenerse con valores de área BET de hasta 500 m²/g. Es sabido que para la preparación de materiales mesoporosos, se requiere normalmente de aditivos (estructurantes) que una vez que la formación del gel se ha logrado, se requiere eliminarlos mediante tratamiento térmico, ya que en su mayoría, los estructurantes suelen ser tensoactivos de origen orgánico. Sin embargo, cuando la sílica es sometida a tratamiento térmico, tiene lugar el proceso de sinterización (colapso de la estructura porosa). Por ello, es necesario buscar alternativas que permitan obtener materiales con alta pureza, homogeneidad y con superficies grandes empleando condiciones de síntesis suaves. En la Figura 4.9 se muestran las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77K, de los nanomateriales de SiO₂.

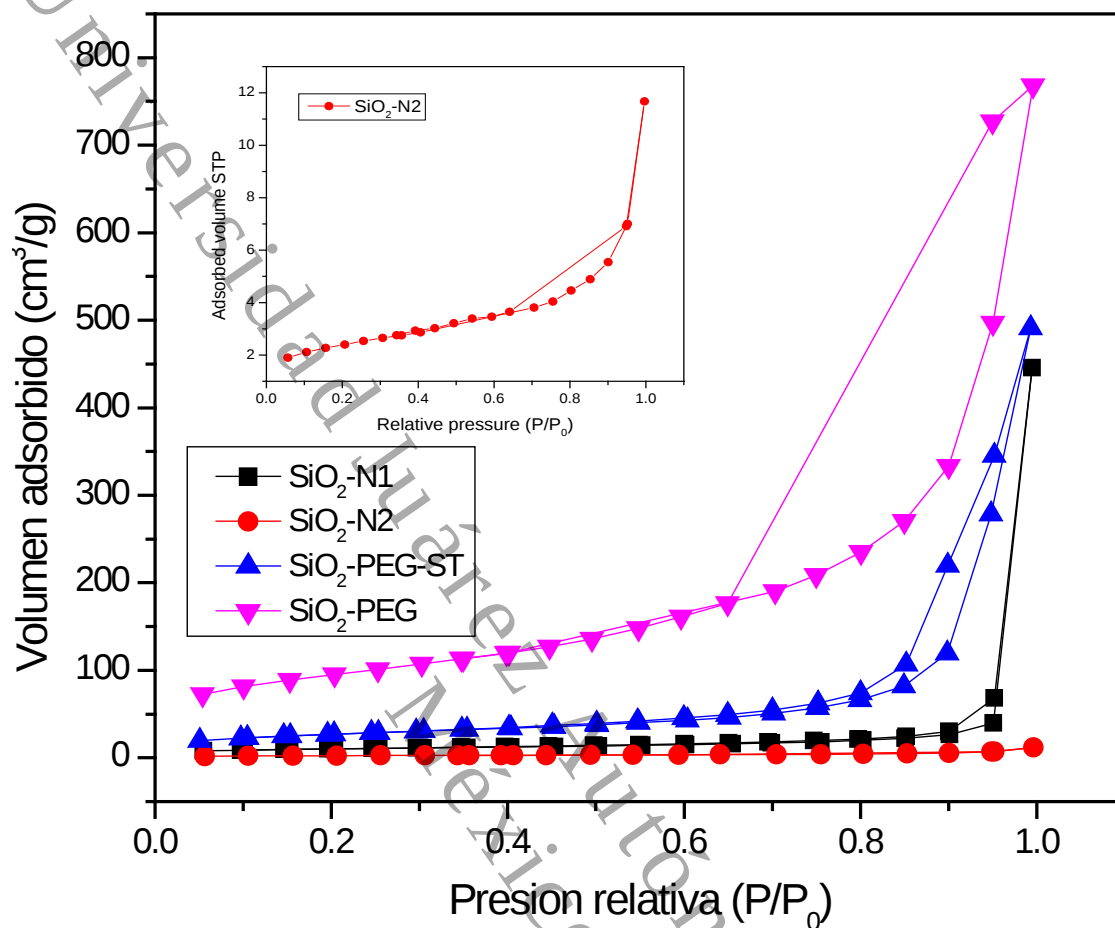


Figura 4.9 Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las nanopartículas de SiO_2 . En el recuadro se muestra la isoterma correspondiente al material $\text{SiO}_2\text{-N2}$.

Los materiales sol-gel y en particular los óxidos suelen exhibir isotermas del tipo IV, de acuerdo con la clasificación IUPAC. Esta isoterma se caracteriza por mostrar una diferencia entre la curva de adsorción y desorción que da lugar a la formación de histéresis. Hablar de isotermas tipo IV implica la presencia de mesoporosidad, un mesoporo se define como un poro cuyas dimensiones se encuentran entre 20-500 Å (2 a 50 nm), aunque a veces se puede hablar de mesoporos con valores por debajo pero cercanos a 20Å [18]. Para los materiales preparados, se observaron isotermas del tipo IV. Los materiales preparados con PEG muestran una histéresis del tipo H2 (b), las cuales se asocian con el bloqueo

de poros, estas son características de algunas sílicas mesocelulares y se han observado en algunas sílicas mesoporosas ordenadas obtenidas por métodos solvotermales [19]. Las isothermas de los materiales preparados con amonía, exhiben unas isothermas más complejas, ya que si bien presentan una forma tipo IV, su lazo de histéresis es apenas perceptible tendiendo más bien a ser mínimo, por lo que la histéresis puede clasificarse como del tipo H1, ya que se encuentra después de valores de presión relativa mayores a 0.4. La distribución de poro calculada por el método BJH (Brunauer-Joyner-Halenda) mostrados en la Figura 4.10, nos confirman la presencia de mesoporos para todos los materiales, sin embargo el material $\text{SiO}_2\text{-N2}$ presenta macroporos ($>500 \text{ \AA}$) de donde concluimos que los materiales preparados con PEG presentan una mayor cantidad de poros, los cuales pueden estar más disponibles y los hacen más adecuados para depositarles el complejo citotóxico. Los valores del área superficial específica se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Valores de área superficial específica BET estimada por fisisorción de N_2 .

Nanomaterial	Area superficial BET (m^2/g)
$\text{SiO}_2\text{-N1}$	34
$\text{SiO}_2\text{-N2}$	8
$\text{SiO}_2\text{-PEG}$	331
$\text{SiO}_2\text{-PEG-ST}$	94

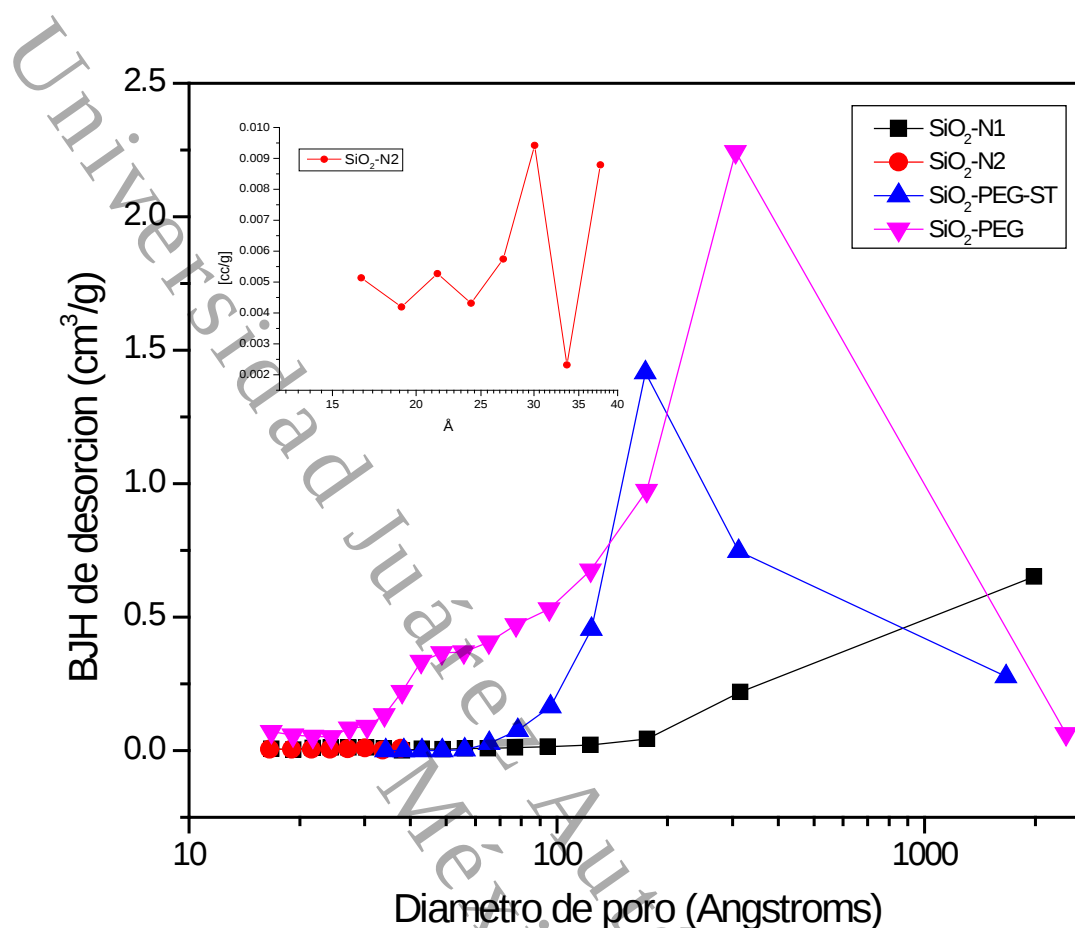


Figura 4.10 Distribución de tamaño de poro obtenida a partir de los datos de desorción por el método BJH.

La baja adsorción de nitrógeno explica los valores BET encontrados para los materiales preparados con amoníaco, ya que fueron inferiores a los 50 m²/g. Para los materiales preparados con PEG se observó un cambio significativo e interesante. A pesar de que el SiO₂-PEG tuvo un tratamiento térmico de 550°C para poder eliminar el PEG, éste presenta un área 3 veces mayor que el material con el método solvotermal. Esto puede deberse a que la extracción se realiza a temperatura de 120°C, lo cual de alguna manera influye en la disminución de grupos OH terminales, tal como se aprecia con la disminución de la intensidad de la banda atribuida a este grupo en el espectro FTIR correspondiente (Figura 4.6) afectando la estructura porosa.

4.2.6 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Como ya se ha mencionado, la morfología de las nanopartículas es un parámetro que puede influir significativamente en las interacciones con células y moléculas biológicas. Se cree, que por el simple hecho de tener dimensiones nanométricas, una nanopartícula puede tener acceso a compartimientos celulares sin ninguna restricción [20,21]. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas, se ha visto que ésta si bien es una condición necesaria no es la más importante. Las nanopartículas pueden obtenerse hoy en día con diferentes formas que van desde los cilindros, esferas, cubos, esferas huecas, bastones, alambres entre otras. Dependiendo de la forma y del tamaño, las especies químicas que se encuentran en la superficie pueden dotar a la nanopartícula de propiedades más o menos reactivas con respecto a otras estructuras. Diversos estudios en donde se busca encapsular algún principio activo, han empleado morfologías esféricas de dimensiones variadas [22] haciendo que esta morfología, sea una de las más utilizadas para tales fines. La síntesis de esferas de SiO_2 puede lograrse por el método de Stöber o empleando tensoactivos. Hasta el momento, con respecto al primer método, no se encuentran reportes acerca del efecto del contenido de amoníaco en la porosidad de las partículas. En el presente trabajo, decidimos explorar el efecto de dos concentraciones de amoníaco en la forma y tamaño de las nanoesferas de SiO_2 , así como también de manera simultánea el efecto del PEG en las mismas propiedades, con la finalidad de obtener estructuras nanométricas capaces de contener un principio activo citotóxico.

Las imágenes obtenidas por FE-SEM de las muestras obtenidas con amoníaco se muestran en la Figura 4.11. Podemos observar el efecto del contenido de amoníaco, ya que cuando se empleó una razón molar 1:1 ($\text{TEOS}:\text{NH}_3$), las partículas obtenidas fueron esféricas bastante homogéneas y con diámetros aparentes de cerca de 100 nm. Las nanopartículas formaron agregados donde se observan perfectamente las partículas individuales. Al incrementar el contenido de amoníaco (1:2), las nanopartículas incrementaron su diámetro, observándose tamaños de partícula menos homogéneos ya que se perciben

partículas con tamaños de alrededor de 350 nm y hasta 500 nm, sin embargo nuevamente se observa la agregación de las partículas aunque menor compactadas que en las de menor relación de amoniaco (1:1).

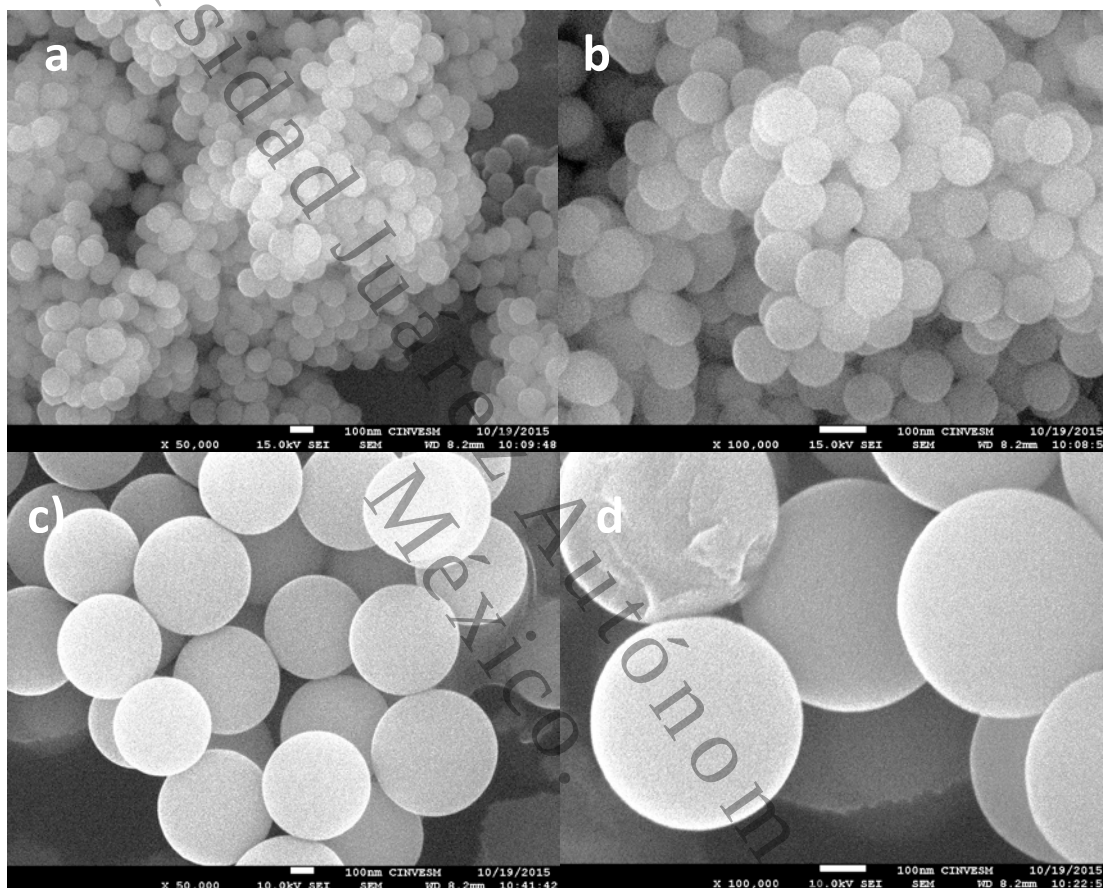


Figura 4.11 Micrografías FE-SEM de los materiales $\text{SiO}_2\text{-N1}$ (a,b) y $\text{SiO}_2\text{-N2}$ (c , d).

El uso de PEG en la síntesis de nanopartículas de óxidos se ha reportado en algunos trabajos, la intención de añadir tal aditivo puede ser básicamente con el propósito de funcionalizar la superficie del mismo [23] aunque existen varios reportes sobre su aplicación para la formación de composites híbridos con una variedad de materiales inorgánicos [24,25]. En el caso de los materiales preparados, se buscaba obtener un material con mayor mesoporosidad y evaluar el efecto del PEG en la morfología de las partículas. La Figura 4.12 muestra las

microfotografías de los dos materiales preparados con PEG. Las diferencias entre las variantes empleadas son notables. Al extraer el solvente mediante el método solvotermal (a y b), se observa que las partículas forman agregados y aglomerados de diferentes tamaños y sin una morfología definida, comparado con los resultados obtenidos por Setyawan y col., en el cual ellos obtuvieron partículas esféricas del orden de 0.5-2 μm , por tanto, cambiar el precursor modifica completamente los resultados obtenidos por ellos. Los agregados más pequeños varían en tamaño de entre 100 y 300 nm aproximadamente, mientras que los aglomerados alcanzan hasta 1 micra. El emplear tratamiento térmico modificó la apariencia de las partículas del SiO_2 , ya que si bien, también se observa agregación de partículas (c y d), se distingue una mayor homogeneidad en el tamaño, aunque nuevamente no se observa una forma definida. En ambos casos se notan cambios en la superficie de las nanopartículas con respecto a las superficies observadas en las nanoesferas obtenidas con amoníaco, ya que la superficie de los materiales preparados con PEG tiene una apariencia porosa, lo cual era uno de los objetivos de ésta investigación. A diferencia de lo reportado por Rahman y colaboradores [15], para materiales tratados a la misma temperatura, encontraron que al eliminar el PEG se forman partículas de entre 300-400 nm con alta porosidad y tamaños de poro de cerca de 18 nm. En el caso de los materiales preparados las partículas individuales se observan del orden de 50-100 nm, siendo estos materiales los que presentaron valores más altos de área superficial y porosidad, con lo que confirmamos que el método de obtención favoreció la obtención de mesoporosidad y áreas superficiales intermedias.

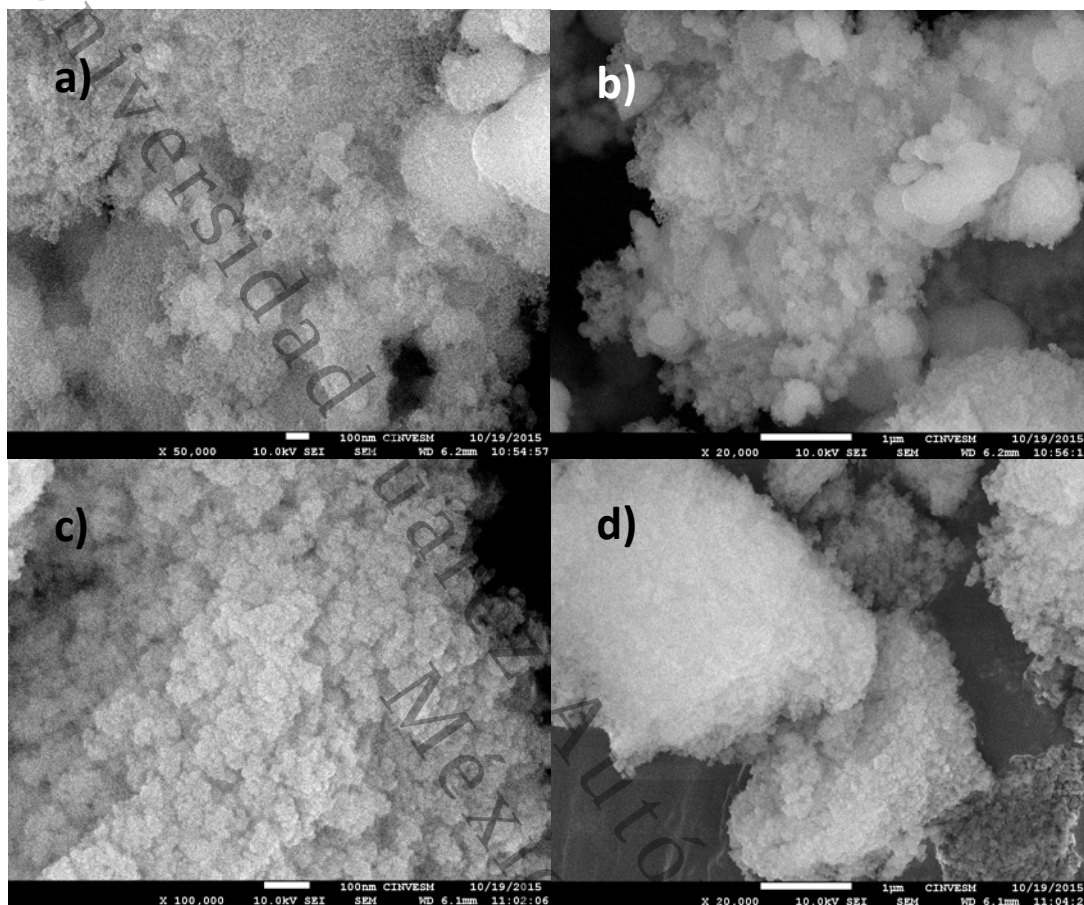


Figura 4.12 Micrografías FESEM SiO_2 -PEG-ST (a y b), y SiO_2 -PEG (c y d).

1

4.2.7 Dispersión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partícula y Potencial Zeta

El diámetro hidrodinámico de las nanoesferas de silicio sintetizados fueron determinados mediante la técnica de dispersión de luz dinámica el cual se observa en la Figura 4.13 e indica que se obtuvo el tamaño más pequeño para SiO_2 -N1 con una distribución bimodal (142 y 190 nm) y aumentan con la cantidad de NH_3 , SiO_2 -N2, con una distribución de tamaño trimodal (342, 396 y 458 nm). En caso de las muestras con PEG, el tamaño de las esferas aumenta en comparación con la anterior debido la longitud de la cadena de polímero, cuando PEG fue eliminado por el método solvotermal el tamaño aumenta con una

distribución bimodal en 396 y 458 nm, y cuando se elimina por térmica efectuar el tamaño permanece constante con la misma distribución bimodal, no importa la forma en que la eliminación de PEG el tamaño no se ve afectada.

Los grupos silanol (Si-OH) detectados por FTIR son los principales responsables de la carga superficial de nanoesferas de sílice, para adsorber compuestos inorgánicos u orgánicos en solución [26] y también afectan a la dispersión en medios acuosos, este comportamiento también se ve afectada por la presencia de siloxanos (Si₂O), según los resultados experimentales la menor de las señales de ambas especies favorece la dispersión de nanoesferas siendo el SiO₂-PEG-ST el mejor material dispersante.

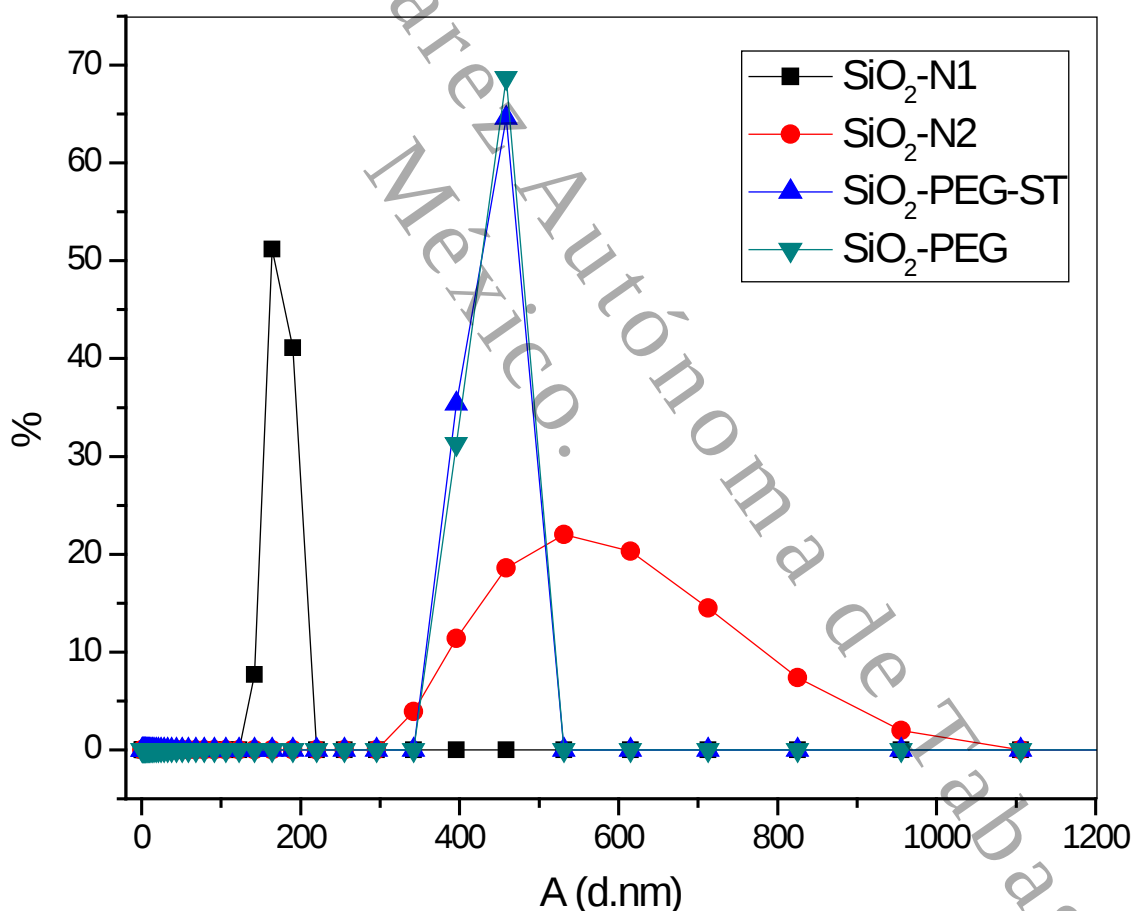


Figura 4.13 Distribución del tamaño de partícula hidrodinámico de los nanomateriales estimado a partir de Dispersión de luz dinámica. Las mediciones se realizaron en agua a pH 7.

Estos resultados difieren de los obtenidos por la técnica de FE-SEM en la cual se observan tamaños más pequeños esto es porque las mediciones DLS reportan los radios hidrodinámico de las partículas así como también una menor tendencia a la aglomeración de las partículas.

En cuanto al potencial zeta, se sabe que el método de síntesis afecta significativamente la carga superficial de las nanopartículas. Los valores estimados para las nanopartículas preparadas se muestran en la Tabla 4. 2

Tabla 4.2 Valores de carga superficial de las diferentes nanopartículas, obtenidos a pH 7.

Nanomaterial	Potencial zeta (mV)
SiO ₂ -N1	-1.50
SiO ₂ -N2	-1.12
SiO ₂ -PEG-ST	-1.60
SiO ₂ -PEG	0.05

Los valores reportados en la tabla, se obtuvieron como el promedio de 5 lecturas. La carga superficial de una nanopartícula es un punto clave en la interacción con células o moléculas biológicas. Para aplicaciones en SNC, es deseable que la carga superficial sea baja, de donde podemos concluir de acuerdo a los valores encontrados que se tiene una carga superficial adecuada para la aplicación pretendida. Se ha reportado que la funcionalización con moléculas de amoniaco, puede producir modificaciones en la superficie de la sílica, haciéndola menos electronegativa. Los valores de potencial zeta de sílica comercial en el rango de pH 6-10, se han reportado entre -40 y -50 mV pero al ser modificada puede obtenerse valores menos electronegativos como los reportados por Kim et al, los cuales están en el rango de -20 a -10 mV, dependiendo de la molécula modificadora [27]. Debido a la composición de las membranas celulares, una carga menos electronegativa favorecerá la entrada de las nanopartículas, por lo que podemos observar que los materiales preparados, poseen características deseables que le facilitarán su interacción con las células.

4.2.8 Espectroscopía UV-VIS de los materiales impregnados

En la figura 4.14 se muestran los UV-VIS de las nanopartículas impregnadas con el complejo, en ella se puede apreciar que todas las muestras muestran un comportamiento similar, lo que nos indica que el complejo está presente en las nanopartículas, mostrando que para el caso de SiO_2 -PEG la señal es más intensa esto posiblemente a que el área superficial es mucho mayor que las demás y por ello el complejo se encuentra en mayor cantidad, para los otros tres materiales la intensidad decrece de acuerdo con el área superficial reportada anteriormente, siendo así la muestra SiO_2 -N2 la de menor intensidad debido a que esta solo tiene un área superficial de $8 \text{ m}^2/\text{gr}$.

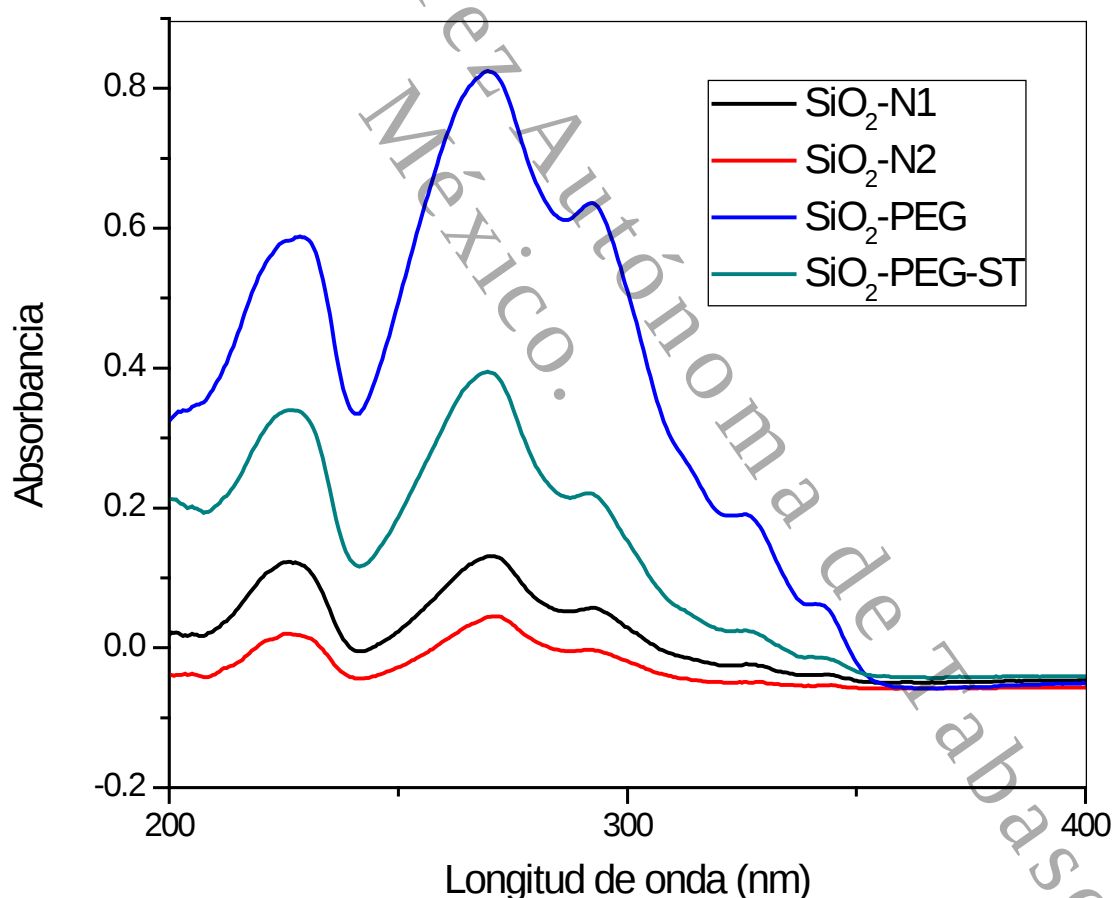


Figura 4.14 UV-Vis de las nanopartículas impregnadas con el complejo.

4.3 Estudios in vitro

Emplear materiales nanoparticulados inorgánicos como acarreadores de principios activos, tiene varias aplicaciones. Entre ellas podemos mencionar las siguientes:

- Se busca mejorar la biodisponibilidad de los fármacos ya que las matrices inorgánicas suelen ser más resistentes a cambios fisiológicos (pH, concentración de iones y temperatura),
- Evitar la difusión poco controlada que se tiene con los polímeros orgánicos biodegradables ya que un polímero sufre erosión y al entrar en contacto con los fluidos, por diferencia de concentraciones el fármaco se difunde, lo que requiere estudios de biodegradación.
- Diseñar un vehículo adecuado para cada fármaco basado en la naturaleza química del mismo.

Por estas razones, el estudio de nanopartículas inorgánicas para la entrega de fármacos ha generado interés en todo el mundo. Sin embargo, es necesario evaluar la bioseguridad de todos y cada uno de estos nuevos nanomateriales. Existen diversas técnicas biológicas para tales efectos y la elección de la más adecuada dependerá de la información que se desea obtener. En este trabajo, con la finalidad de evaluar la biocompatibilidad de las nanopartículas preparadas, se evaluó el efecto de cada una de ellas en una línea celular no cancerígena (monocitos) mediante la técnica de tinción azul de tripano.

4.3.1 Estudio de Biocompatibilidad

La viabilidad celular, se refiere al número o porcentaje de células que se encuentran viables (funcionales). En nuestros experimentos, se colocaron dosis de 20 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas que fueron incubadas durante 48 h con monocitos provenientes de sangre periférica de un individuo sano. Los resultados del estudio se muestran en la gráfica de la figura 4.15, en donde se realizó el conteo

del número de células no viables (muertas) y viables (vivas). Podemos observar que el grupo control (células sin nanopartículas) después de 48 h presenta un porcentaje de muerte (cerca del 39%) debido a los procesos naturales de las células como la disminución de nutrientes, falta de espacio asociado con la proliferación celular, etc). Para la muestra SiO₂-PEG se observó la menor cantidad de células no viables (40%), que en comparación con el control, no representa una cifra significativa. Mientras que las nanopartículas de SiO₂-N1 mostraron la mayor biocompatibilidad permitiendo incluso mayor proliferación que en el grupo control. Las muestras SiO₂-N2 y SiO₂PEG-ST mostraron comportamiento similar entre ellas con valores de 36 y 34% respectivamente. De lo anterior, podemos señalar que las nanopartículas de menor tamaño (SiO₂-N1) no afectaron la viabilidad de las células empleadas a la concentración estudiada y podemos decir que a mayor tamaño de partícula puede esperarse una disminución de la viabilidad celular. Sin embargo esta disminución en el caso de los materiales preparados no es significativa. Esto puede explicarse por el hecho de que las partículas grandes pueden bloquear receptores y/o canales específicos en la superficie de la célula impidiendo el paso de nutrientes hacia el interior de la célula. Una característica que se observó en los materiales es que al ponerse en contacto con el medio de cultivo, se dispersaron mejor las nanopartículas de menor tamaño las cuales fueron SiO₂-N1 y SiO₂-N2

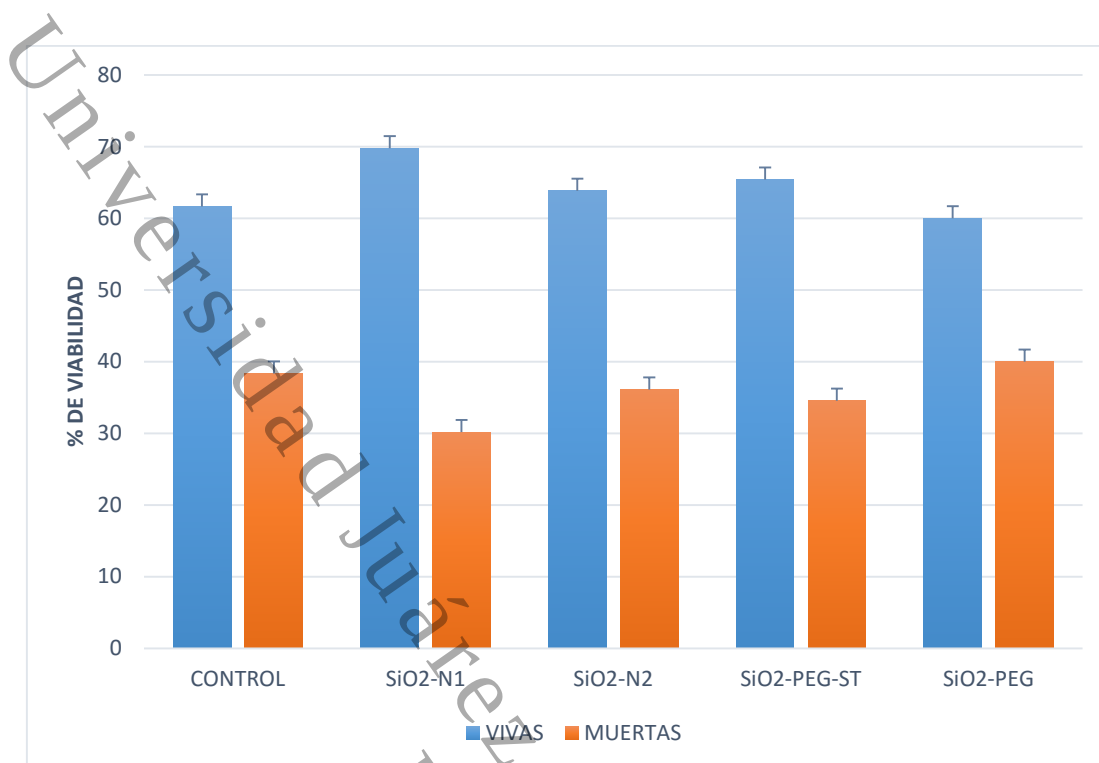


Figura 4.15 Gráfica de la viabilidad celular de las nanopartículas de SiO_2 mediante azul de tripano, las mediciones se realizaron por duplicado y las barras indican la desviación estándar obtenida por ANOVA.

4.3.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa de los sistemas $\text{Zn}(\text{acac})_2(\text{phen})\text{-SiO}_2$

Para determinar el efecto del complejo, una vez encapsulado en las matrices de sílica, se emplearon células U-373, que son provenientes de astrocitoma humano, la morfología de estas células (control) se muestra en la Figura 4.16, donde se observa que son células alargadas que poseen prolongaciones terminales. Se observan conexiones entre las células pero se puede visualizar que cada una preserva su individualidad. Inicialmente, se determinó el efecto de las nanopartículas en dicha línea incubando 1×10^5 células por pozo con 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 h. Las imágenes de los cultivos se muestran en las Figuras 4.16 y 4.17 respectivamente.

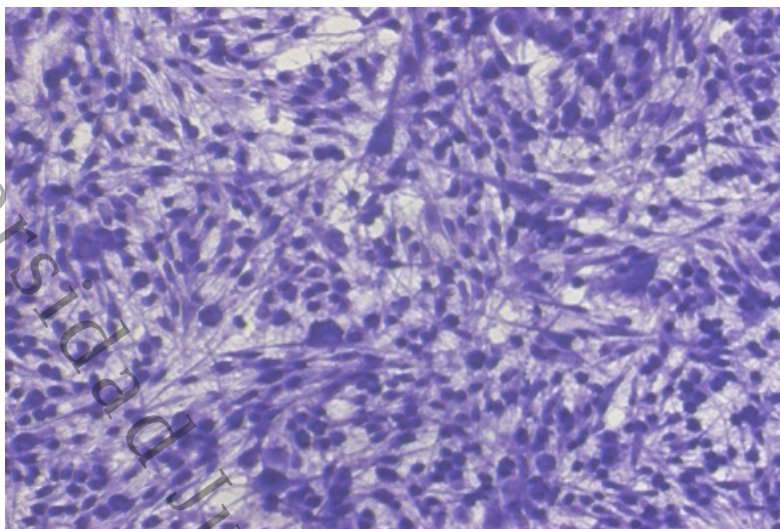


Figura 4.16 Morfología de las células U-373 teñidas con cristal violeta. La imagen fue tomada a 60X. EN ella se observan su forma característica así como la excesiva presencia de células asociada al proceso de proliferación descontrolado.

De manera general, a 10 $\mu\text{g/mL}$ no se observaron cambios morfológicos en las células sí en la proliferación. Para el material $\text{SiO}_2\text{-N1(a)}$ se observa que el número de células se incrementa, dando una disminución del lumen (espacio entre las células) lo anterior, coincide con los resultados estadísticos (Figura 4.20), donde se observó que las viabilidades celulares para todos los nanomateriales fueron de casi el 100%. Podemos decir que solamente las nanopartículas $\text{SiO}_2\text{-PEG}$ tuvieron cierto efecto citotóxico pero comparado con el control, no se considera significativo. Lo anterior, nos confirma que las nanopartículas por sí solas no ejercen efecto alguno en la línea celular a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

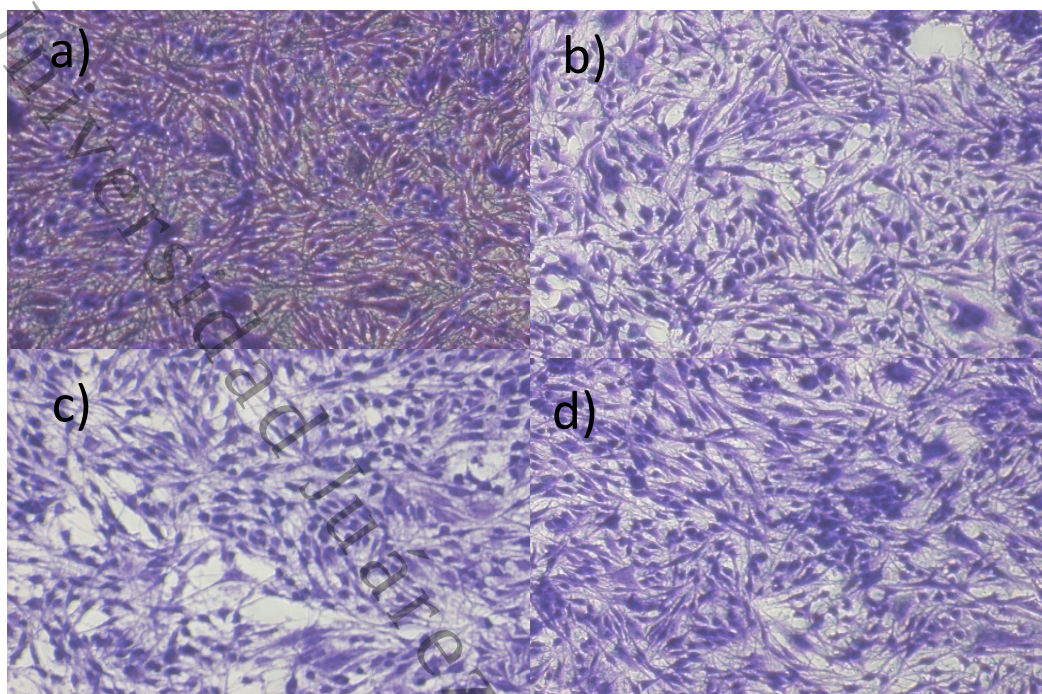


Figura 4.17 Microfotografías representativas de los cultivos a 60X de a) SiO₂-N1, b) SiO₂-N2, c) SiO₂-PEG-ST y d) SiO₂-PEG, empleando una concentración de 10 µg/mL.

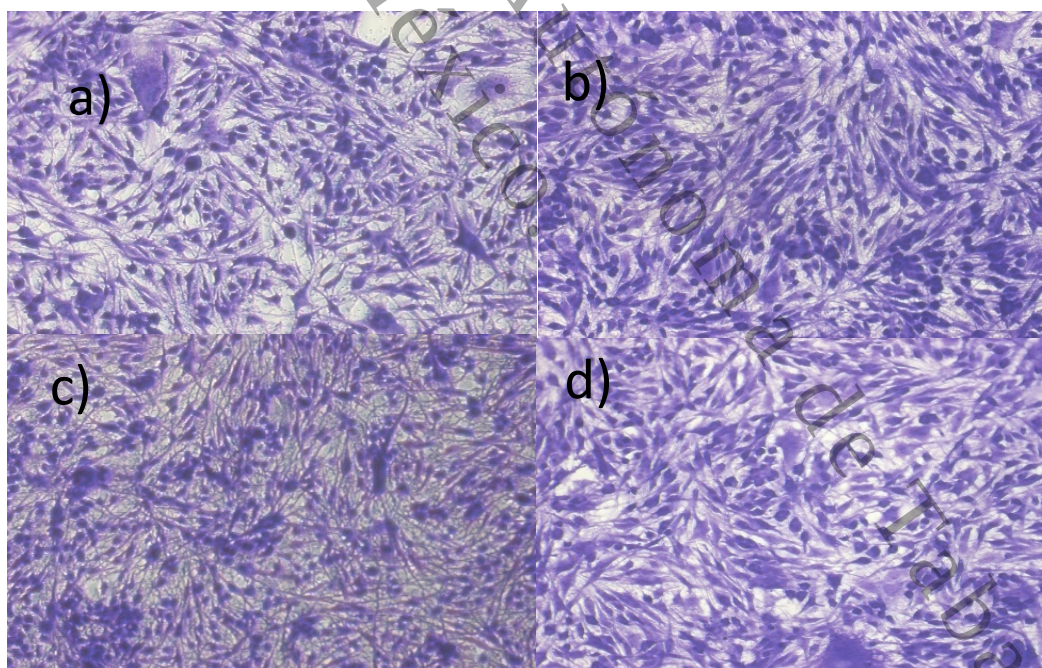


Figura 4.18 Microfotografías representativas de los cultivos a 60X de a) SiO₂-N1, b) SiO₂-N2, c) SiO₂-PEG-ST y d) SiO₂-PEG, a la concentración de 20 µg/mL.

Al incrementar la concentración de nanopartículas a 20 $\mu\text{g/mL}$, no se observó un cambio significativo ni en la morfología de las células ni en la proliferación de las mismas. De igual manera, cabe señalar que todas las partículas se dispersaron de manera homogénea en los cultivos ya que no se apreciaron agregados de partículas para ninguno de los casos.

La citotoxicidad de complejos organometálicos se ha estudiado desde que en la década de los 60s se descubrió que el cis-diamoncloro platino inducía la muerte celular. Desde entonces, se han dirigido múltiples investigaciones para evaluar la capacidad anticancerígena de complejos de platino, buscando agentes más eficientes. En las últimas décadas, se ha buscado sustituir al platino de este tipo complejos para tratar de disminuir los efectos adversos asociados a fármacos derivados de platino. Dentro de los elementos más empleados para estos fines el rutenio y el cobre han mostrado resultados prometedores. Sin embargo, aún no se tiene un agente que pueda ser lo suficientemente toxico para dañar a las células cancerígenas, pero a la vez provoque el menor daño posible en células sanas.

El zinc es elemento que toma parte en muchos de los procesos biológicos del ser humano. Por ello, es un buen candidato para formar complejos que puedan ser menos dañinos que aquellos que contienen platino o cobre. En esta investigación, propusimos el uso de un complejo de zinc, previamente reportado por Nie X. y col. [2] pero del cual no existen reportes acerca de su actividad antitumoral. Éste complejo fue previamente analizado por nuestro grupo en diferentes líneas celulares, mostrando significativa actividad antiproliferativa en la línea U373. Por ello, se empleó como principio activo para encapsularlo en los nanomateriales, buscando obtener un sistema complejo-nanopartícula que permita usar bajas dosis del mismo.

Al evaluar el comportamiento del complejo de zinc acoplado a las diferentes nanopartículas pudieron observarse algunas diferencias (Figura 4.19). Evidentemente, la capacidad de carga del complejo varía con respecto a las propiedades de cada material y para este estudio se tomó como referencias

cisplatino (el agente quimioterapéutico más empleado) y el complejo por sí solo. Se observó que las nanopartículas preparadas con amoníaco y cargadas con el complejo, no presentaron efecto citotóxico, esto puede deberse a la baja área superficial y porosidad que presentaron lo que influye en la capacidad de carga del citotóxico. Sin embargo, los materiales que se prepararon con PEG mostraron su mayor efecto a 20 $\mu\text{g/mL}$, cabe señalar que estas concentraciones fueron con respecto a las nanopartículas y que evidentemente la concentración del complejo es baja. Es notable señalar que el complejo muestra mayor citotoxicidad que el cisplatino, lo cual lo hace un candidato como agente quimioterapéutico alternativo.

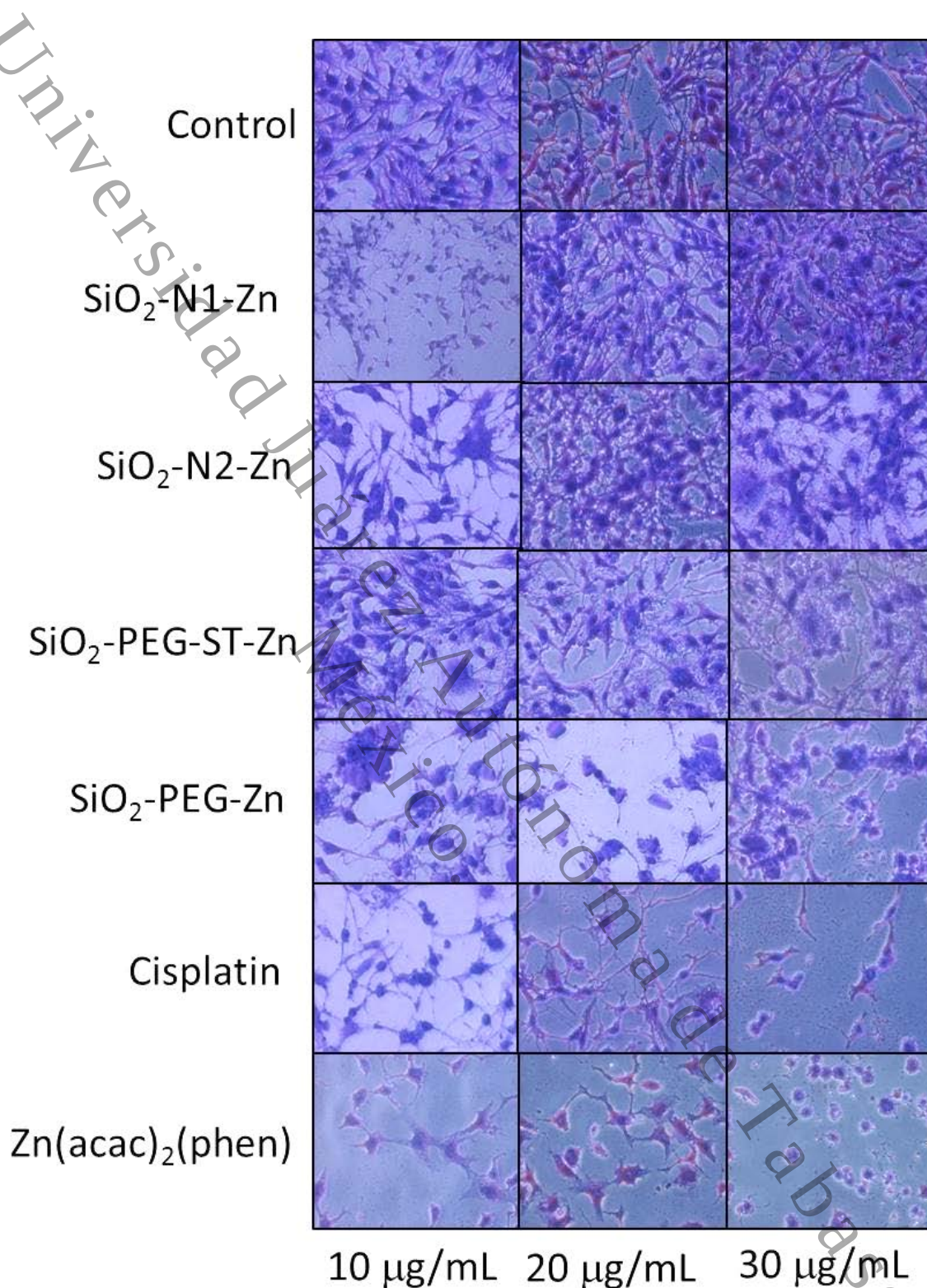


Figura 4.19 Microfotografías de los cultivos celulares (60X) para las diferentes partículas cargadas con el complejo.

Una característica que se observa en los cultivos celulares de las células cancerígenas, es el hecho de la aglomeración de las células con las partículas y el complejo. A diferencia del comportamiento observado en las nanopartículas sin complejo, existe una fuerte interacción del complejo con las células aún a concentración baja, ya que se observa la pérdida de estructura en algunas de las células así como también la formación de grupos compactos de células. Para la concentración más alta ($30\mu\text{g/mL}$) se logran observar algunos agregados de nanopartículas sin embargo, a estas condiciones las células pierden su forma y se incrementa el espacio entre las células que quedan.

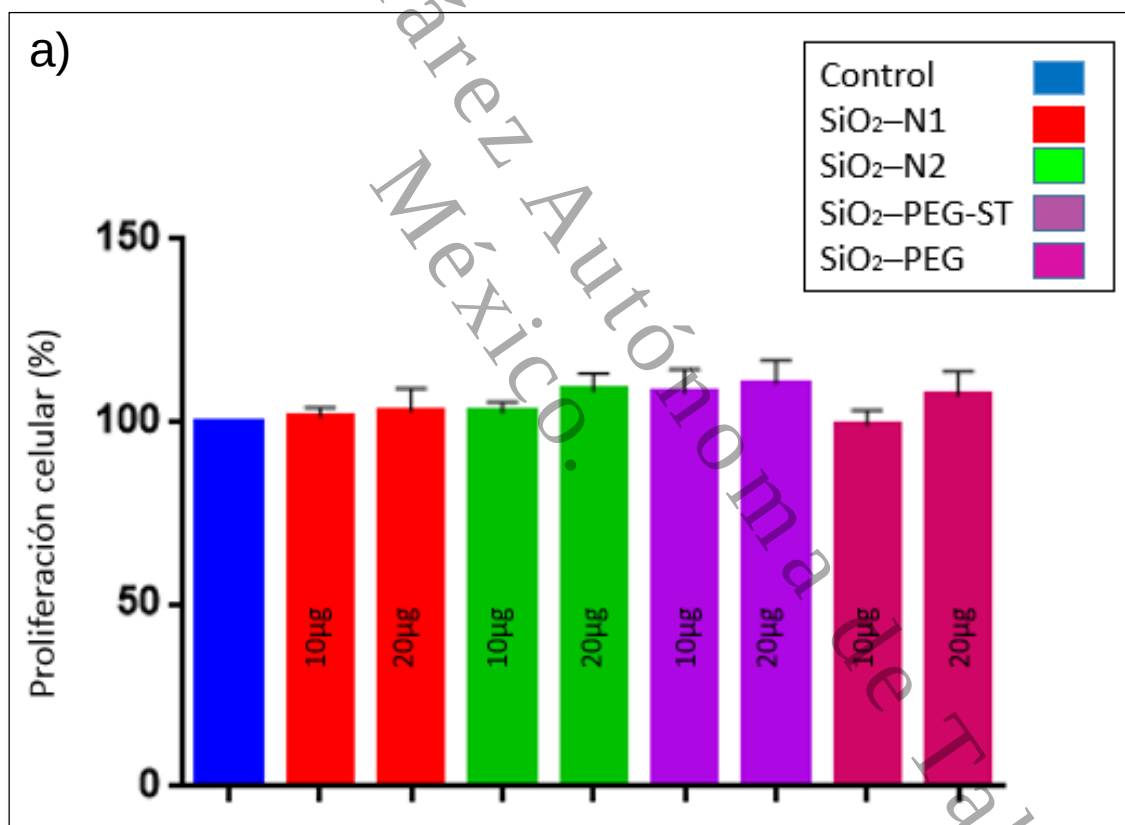


Figura 4.20 Análisis estadístico de la citotoxicidad inducida por nanopartículas sin complejo de zinc.

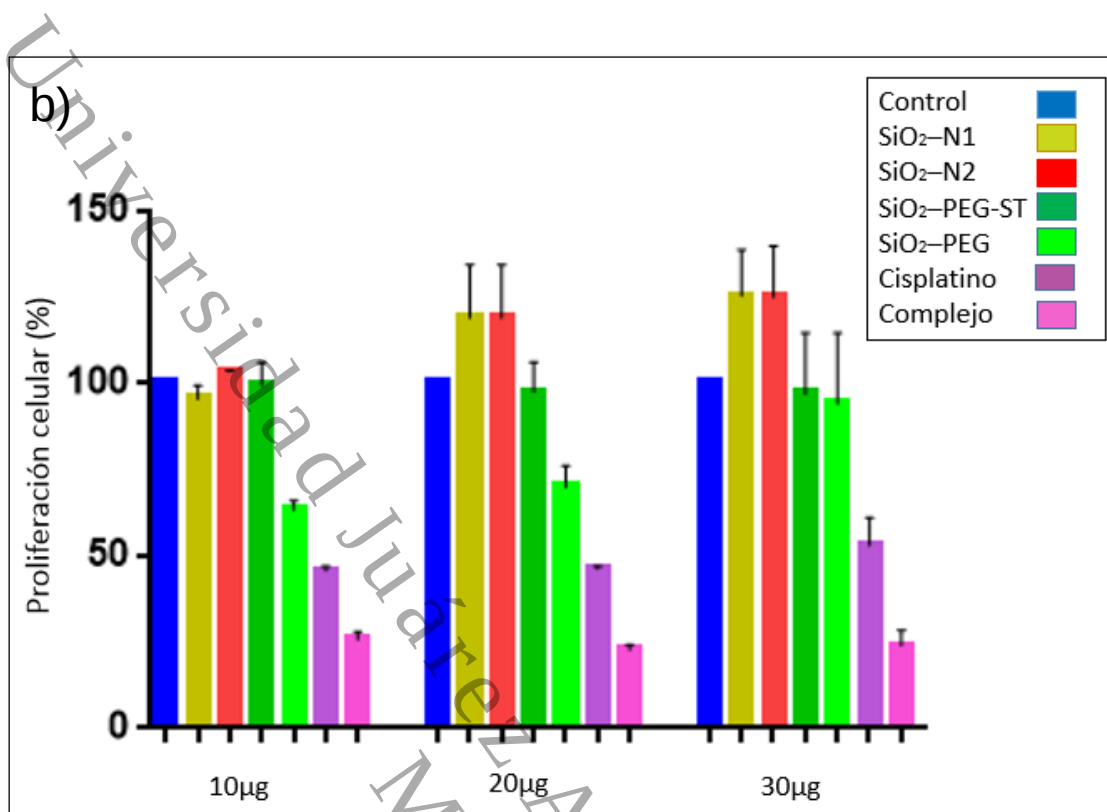


Figura 4.21 Análisis estadístico de la citotoxicidad inducida por nanopartículas cargadas con el complejo de zinc en la línea celular U-373 a 10 y 20µg/mL.

REFERENCIAS

- [1] Shriver D.F., Atkins P.W., Langford C.H., Química inorgánica. 2^{da} Ed. Reverté, Barcelona España, **2004**, p- 848.
- [2] Nie X., Qu J-N. Crystal structure of bis(1,10-phenanthroline- κ^2 N,N')-(malonato- κ^2 O¹,O³) zinc(II) pentahydrate, $\text{Zn}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_2(\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Z Kristallogr NCS, **2011**, 226, 343-344.
- [3] Raman N., Mahalakshmi R., Mitu L., Bio-sensitive activities of coordination compounds containing 1,10-phenanthroline as co-ligand: Synthesis, structural elucidation and DNA binding properties of metal (II) complexes. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc., **2014**, 131, 355-364.
- [4] Rahman I., Padavettan V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites. Journal of Nanomaterials. **2012**, 2012,15
- [5] Sowri K., Ramachandra A., Venugopal K. Controlling the size and optical properties of ZnO nanoparticles by capping with SiO₂. Mater. Res. Bull. **2014**, 49, 537-543.
- [6] West J.K., La Torre G., Hench L.I., The UV-Visible spectrum in porous type VI silica: application and theory, J. Non-Crystal. Solids, **1996**, 195, 45-53
- [7] Kaide A., Saeki T. Development of preparation method to control silica sol-gel synthesis with rheological and morphological measurements. Adv. Powder Technol. **2014**, 25, 773-779
- [8] Catauro M., Bollino F., Papale F., Gallicchio M., Pacifico S. Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique. Mater. Sci. Eng., C. **2015**, 48, 548-555.

- [9] Liu R., Wang C. Synthesis of hollow mesoporous silica spheres with radially aligned mesochannels and tunable textural properties. *Ceram. Int.* **2015**, 41, 1101-1106.
- [10] Halevas E., Nday C., Kaprara E., Psycharis V., Raptopoulou C., Jackson G., Litsardakis G., Salifoglou A. Sol-gel encapsulation of binary Zn (II) compounds in silica nanoparticles. Structure-activity correlations in hybrid materials targeting Zn (II) antibacterial use. *J. Inorg. Biochem.* 2015
- [11] Catauro M. Bollino F., Papale F., Gallicchio M., Pacifico S., Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO_2/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique, *Mat. Sci. Eng.C.*, 2015, 48, 548-555
- [12] Tarn D., Ashley C.E., Xue M., Carnes e.C., Zink J.I., Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers-biofunctionality and biocompatibility, *Acc. Chem. Res.* 2013, 46, 792-801.
- [13] Napierska D., Thomassen L.C.J., Lison D., Martens J.A., Hoet P.H., The nanosilica hazard: another variable entity, *Part. Fibre Toxicol.*, 2010, 7, 1-32
- [14] Setyawan H., Yuwana M., Balgis R. PEG-templated mesoporous silicas using silicate precursor and their applications in desiccant dehumidification cooling systems. *Microporous Mesoporous Mater.* 2015, 218, 95-100.
- [15] Rahman N., Widhiana I., Juliastuti S., Setyawan H. Synthesis of mesoporous silica with controlled pore structure from bagasse ash as a silica source. *Colloids Surf., A.* 2015, 476, 1-7.
- [16] Suteewong T., Sai H., Bradbury M., Estroff L., Gruner S., Wiesner U. Synthesis and Formation Mechanism of Aminated Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2012**, 24, 3895-3905
- [17] Li Z., Cheng X., He S., Huang D., Bi H., Yang H. Preparation of ambient pressuredried MTMS/TEOS co-precursorsilica aerogel by adjusting NH_4OH concentration. *Mater. Lett.* **2014**, 129, 12-15

- [18] Gregg S.J., Sing K.S.W., Adsorption, Surface área and porosity, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, USA, **1995**, pp 1-39.
- [19] Thommes M., Kaneko K., Neimark A.V., Olivier J.P., Rodríguez-Reinoso F., Rouquerol J., Sing K.S.W., Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of Surface área and pore size distribution (IUPAC Technical report), Pure Appl. Chem. **2015**, 87, 1051-1069.
- [20] Yildirim L., Thanh N.T., Loizidou M., Seifalian A.M., Toxicology and clinical potential of nanoparticles, Nanotoday, **2011**, 6, 585-607
- [21] Elsaesser A., Howard C.V., Toxicology of nanoparticles, Adv. Drug Del. Rev., **2012**, 64, 129-137.
- [22] Singh A., Garg G., Sharma P.K., nanospheres: A novel approach for targeted drug delivery system, J. Pharma. Sci. Rev. Res., **2010**, 5, 83-88
- [23] Naghibi S., Madaah Hosseini H.R., Faghihi Sani A., Shokrgozar M.A., Mehrjoo M., Mortality response of folate receptor-activated PEG-functionalized TiO₂ nanoparticles for doxorubicin loading with and without ultraviolet irradiation, Ceram. Int., **2012**, 40, 5481-5488
- [24] Santos M.C., Seabra A.B., Pelegrino M.T., Haddad P.S., Synthesis, characterization and cytotoxicity of glutathione- and PEG-glutathione-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nitric oxide delivery, Appl. Surf. Sci., **2016**, 367, 30, 26-35;
- [25] Kareem S.H., Ati A.A., Shamsuddin M., Lee S.L., Nanostructural, morphological and magnetic studies of PEG/Mn_(1-x)Zn_(x)Fe₂O₄ nanoparticles synthesized by co-precipitation, Ceram. Int. **2015**, 41, 11702-11709.
- [26] Teofil Jesionowski Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 222 (2003) 87 /94

[27] Kim K-M, Kim H-M, Lee W-J, Lee C-W, Kim T-il, Lee J-K, Jeong J, Paek S-M, Oh J-M, Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica, Int. J. Nanomed. **2014**, 9, 29-40.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se investigaron los efectos de las condiciones de síntesis en la Biocompatibilidad y citotoxicidad de nanopartículas de SiO_2 , para su uso como agentes acarreadores de un principio activo con actividad citotóxica en tumores de SNC. Las nanopartículas preparadas, tuvieron tamaños variables, relacionados con la metodología de síntesis, observándose que en el caso de los materiales preparados con amoníaco, existe una estrecha relación entre el contenido de amoníaco y el tamaño de partícula obtenida. Esta estrategia diseñada por Stöber, favorece la formación de nanopartículas esféricas, las cuales para nuestros fines son preferidas, ya que se ha visto que son más fácilmente aceptadas en los sistemas biológicos. Esto se confirmó mediante las pruebas de biocompatibilidad realizadas, en donde se observó su nulo efecto citotóxico.

En este trabajo también se utilizó PEG, con la finalidad de estudiar su efecto en las propiedades texturales y la morfología de las nanopartículas, por lo que se prepararon dos muestras empleando diferentes metodologías. Ambos materiales mostraron mesoporosidad y valores de área superficial superiores a los materiales sintetizados con amoníaco.

El complejo de zinc empleado en el presente trabajo, mostró ser una alternativa viable como agente citotóxico ya que exhibe mayor efecto antiproliferativo que el cisplatino. Al incorporar el complejo de zinc en las nanopartículas se observaron comportamientos diferentes entre los materiales que se sintetizaron con PEG, ya que sus propiedades texturales fueron la variable determinante para poder cargar una mayor cantidad de complejo, ya que se observó la biodisponibilidad del mismo cuando se aplicó en la línea cancerígena de astrocitoma.

Esta investigación, mostró resultados prometedores, ya que el uso de las nanopartículas en una línea celular derivada de astrocitos (células que dan origen

a la barrera hematoencefálica), puede ser viable como una estrategia para desarrollar sistemas de liberación de complejos organometálicos, los cuales si bien suelen tener actividad citotóxica significativa, aún no logran ser selectivos. Al término de 48 h el efecto observado en la línea cancerígena fue significativo en el estudio preliminar, lo que permite pensar que las matrices de SiO_2 actúan como cápsulas que gradualmente entregan el principio activo.

Podemos concluir que los materiales obtenidos, presentaron propiedades de tamaño, forma y porosidad aceptables para poder atravesar barrera hematoencefálica y poder liberar agentes citotóxicos. Sin embargo es evidente que se requieren estudios más específicos.

5.1 Perspectivas del trabajo

Para poder consolidar los resultados de esta investigación, se requiere de un estudio más profundo de los siguientes aspectos.

- Evaluar diferentes concentraciones de complejo en las nanopartículas.
- Realizar pruebas de liberación del complejo in vitro.
- Evaluar la bicompatibilidad de las nanopartículas en especies animales menores.
- Evaluar la actividad en otras líneas celulares provenientes de tumores del SNC.
- Estudios in vivo de la acción de los sistemas de entrega, en donde también se evalúe la capacidad de las nanopartículas para llegar hasta el cerebro, mediante inyección peritoneal.

ANEXOS

A.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE ZINC

Tabla 1 Tabla A.1.1 base de datos de rayos-X de monocristal del complejo.

Datablock: exp_77			
Bond precision: C-C = 0.0023 Å		Wavelength=0.71073	
Cell:	a=15.5755 (15)	b=10.1621 (6)	c=12.5920 (8)
	alpha=90	beta=90	gamma=90
Temperature:	100 K		
	Calculated	Reported	
Volume	1993.1 (3)	1993.1 (3)	
Space group	P b c n	P b c n	
Hall group	-P 2n 2ab	-P 2n 2ab	
Moiety formula	C22 H22 N2 O4 Zn	C22 H22 N2 O4 Zn	
Sum formula	C22 H22 N2 O4 Zn	C22 H22 N2 O4 Zn	
Mr	443.81	443.79	
Dx, g cm-3	1.479	1.479	
Z	4	4	
Mu (mm-1)	1.264	1.264	
F000	920.0	920.0	
F000'	921.48		
h,k,lmax	21,14,17	19,14,17	
Nref	2796	2438	
Tmin,Tmax	0.551,0.777	0.924,1.000	
Tmin'	0.526		
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.924 Tmax=1.000			
AbsCorr = MULTI-SCAN			
Data completeness= 0.872		Theta(max)= 29.560	
R(reflections)= 0.0307(2137)		wR2(reflections)= 0.0748(2438)	
S = 1.044		Npar= 134	

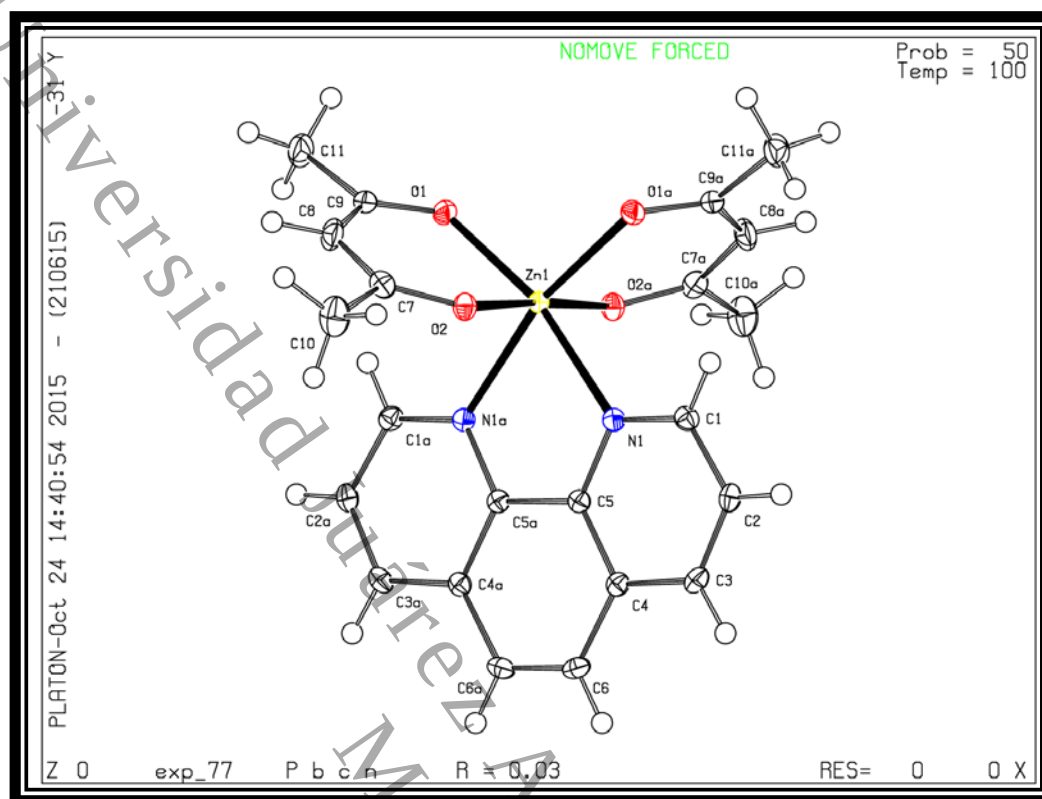


Figura A.1.1 Estructura molecular del complejo bis(acetylacetonato-K2 O,O')(1,10-fenantrolina-K2 N,N') zinc(II).

A.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

A 2.1 Resonancia Magnética Nuclear

La espectrometría de resonancia magnética nuclear es una técnica que utiliza las propiedades magnéticas de los núcleos de ciertos elementos para darnos información importante acerca de su estructura química y propiedades. Cuando un grupo de núcleos de espín $\frac{1}{2}$ se pone en interacción con un campo magnético, los estados de espín correspondiente se separan en energía. La intensidad de la transición que puede ocurrir entre los diferentes niveles es proporcional a la población del nivel electrónico más bajo y la absorción de energía se puede detectar, amplificar y registrar en una línea espectral que es conocida como señal de resonancia.

Bajo este principio, un espectro puede generarse por un compuesto que contiene átomos cuyos núcleos no tienen momentos magnéticos iguales a cero. Entre estos se encuentran el protón ^1H , ^{19}F , isótopos de nitrógeno ^{14}N y ^{15}N y a muchos otros de interés. Sin embargo, los núcleos de ^{12}C , que son de gran importancia en la química orgánica, no poseen un núcleo con momento magnético, por lo que, se hace uso del isótopo ^{13}C para poder obtener información de éste tipo de compuestos [1]. Dado que esta técnica puede ser empleada para elucidar la estructura química de un compuesto, resulta de gran utilidad en la caracterización de complejos organometálicos.

A 2.2 Difracción de rayos X de polvos

El fenómeno de difracción es la interferencia entre las ondas que se genera cuando hay un o varios objetos en su trayecto, los cuales son capaces de dispersar la onda y están separadas por distancias comparables en magnitud a la longitud de onda. La difracción es una consecuencia de las relaciones entre fases específicas, entre dos o más ondas dispersadas por los obstáculos.

La difracción de rayos X se produce al bombardear un metal con electrones de alta energía. Cuando los electrones penetran en el metal se desaceleran y emiten radiación en un intervalo de longitudes de onda.

La difracción de las ondas electromagnéticas se genera debido a que los elementos de una rejilla, absorben la radiación y estos a su vez actúan como fuentes secundarias remitiendo la radiación en todas direcciones [2, 3, 4].

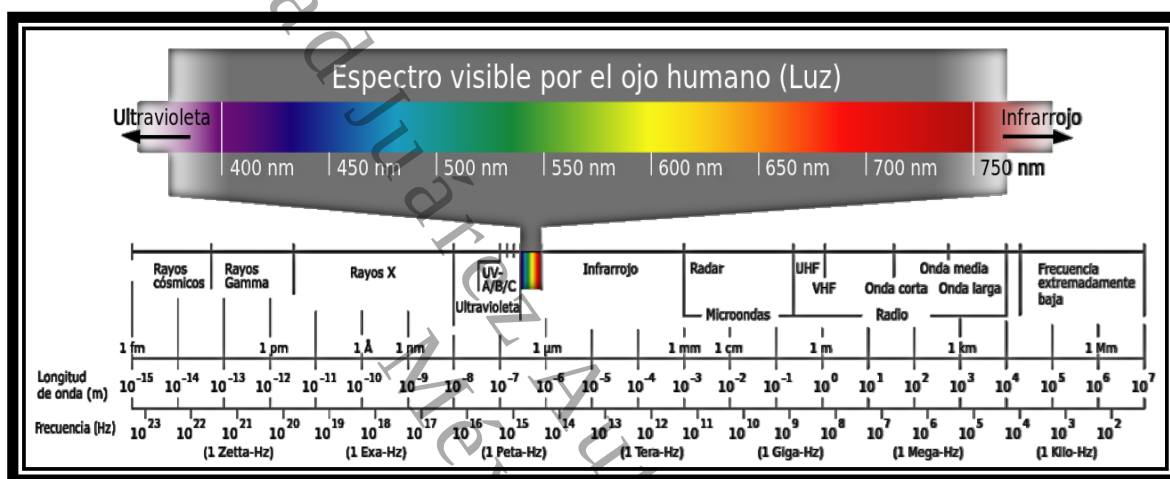


Figura A 2.1 Espectro de los diferentes tipos de radiación electromagnética y sus correspondientes frecuencias y longitudes de onda [5].

A 2.3 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia Infrarroja es una de las técnicas de caracterización de gran utilidad para obtener información cualitativa de las moléculas orgánicas e inorgánicas.

La radiación infrarroja es la radiación electromagnética con longitudes de onda más altas, es decir de menor frecuencia que los Rayos-X; una longitud de onda de este tipo de radiación es de alrededor de 1000 nm, esta longitud de onda corresponde a una frecuencia de unos 3×10^{14} Hz, y a su vez esta es comparable a la energía con la cual las moléculas vibran. Las vibraciones en las moléculas son excitadas por la absorción de los fotones. Los fotones de la luz infrarroja no

poseen la energía suficiente para generar transiciones electrónicas, pero si pueden producir que los grupos de átomos vibren respecto a los enlaces que los conectan; estas vibraciones corresponden a distintas energías y las moléculas absorben radiación infrarroja solo a ciertas longitudes de onda y frecuencia [4]. Las moléculas poseen niveles discretos de energía de rotación y de vibración. Las transiciones entre niveles de vibración se producen por absorción de fotones con frecuencia ν en el rango del infrarrojo medio. La radiación infrarroja se puede dividir en tres regiones, las cuales se muestran en la tabla 3.1:

Tabla A 2.1 Clasificación de la región infrarroja del espectro electromagnético.

Región	Longitud de onda (μm)	Energía (meV)	Numero de onda (cm^{-1})	Detector de
Infrarrojo	1000-1	1.2-1240	10-10000	
Lejano	1000-50	1.2-25	10-200	Vibraciones de red
Medio	50-2.5	25-496	200-4000	Vibraciones moleculares
Cercano	2.5-1	496-1240	4000-10000	Armónicos

Para que una molécula pueda absorber radiación infrarroja, esta debe de sufrir un cambio en el momento dipolar cuando vibra o gira. Un enlace con momento dipolar es aquel que se puede visualizar como una carga positiva y una carga negativa separadas por un muelle (energía de deformación), si este enlace se coloca en un campo eléctrico, se puede comprimir o alargar, dependiendo de la dirección del campo eléctrico. Únicamente en estas condiciones el campo eléctrico alternante de la radiación puede interaccionar con la molécula y modificar la amplitud de alguno de sus movimientos [6, 7, 8].

A 2.4 Espectroscopía Ultra violeta-Visible (UV-Vis) por reflectancia difusa.

La espectroscopía por absorción molecular en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético se utiliza ampliamente en la determinación cuantitativa una amplia cantidad de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas. La frecuencia que corresponde a la longitud de onda del ultravioleta es más corta y a energías mucho más altas en comparación con el infrarrojo. La región del UV se encuentra en un intervalo de frecuencia encima del visible. Los espectrofotómetros de UV se encuentran entre el rango de 200 y 400 nm, los cuales corresponden a la energía de un fotón de 70 a 140 Kcal/mol. Las energías UV-visible corresponden a transiciones electrónicas (energía necesaria para excitar un electrón desde un orbital molecular a otro). Las longitudes de onda de la luz UV absorbida por una molécula se determinan por las diferencias de energía electrónicas entre los orbitales de la molécula.

La espectroscopía UV-Vis por reflectancia difusa es de gran utilidad para obtener información sobre materiales cuyas superficies son rugosas, como en el caso de polvos. Esto es porque a diferencia de las superficies lisas, la componente difusa es más fuerte que la especular por lo que la información que nos proporciona es más adecuada [7, 8].

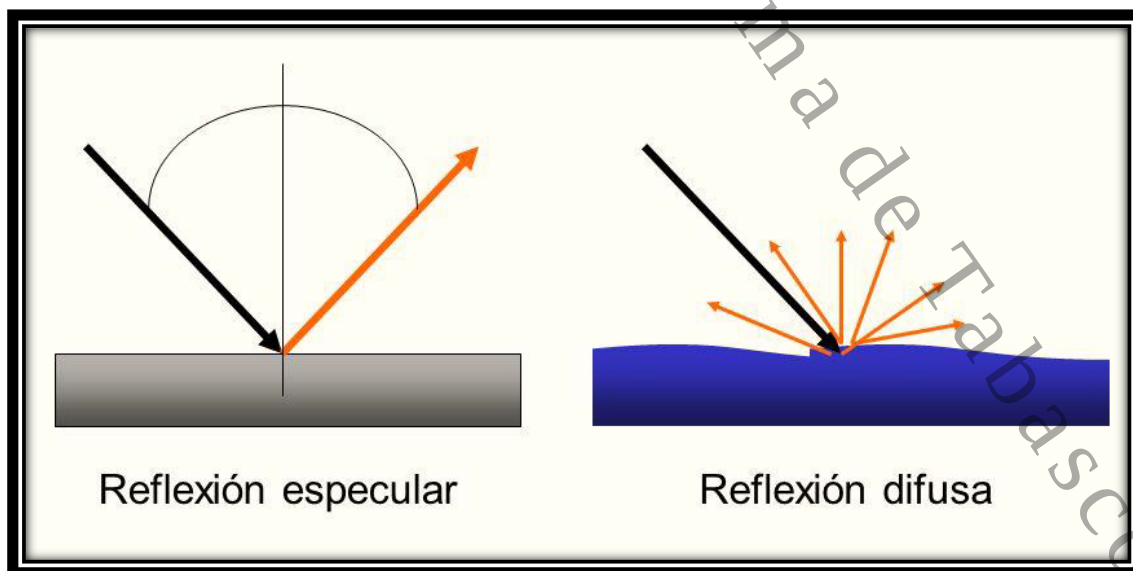


Figura A 2.2 Diferencia entre la reflectancia especular y difusa [9].

A 2.5 Análisis térmico

El análisis térmico es el conjunto de técnicas analíticas que permiten el estudio del comportamiento de los materiales frente a variaciones de temperatura, mismas que pueden inducir diferentes cambios en los materiales.

A 2.5.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría es una técnica que proporciona una medición cuantitativa, con la cual se determina la pérdida o ganancia de masa de una muestra en función de la temperatura, con respecto a una referencia. Las curvas termogravimétricas son características de un material dado, debido a la secuencia única de las transformaciones físicas y a las reacciones químicas que pueden tener lugar. Los cambios de peso en el material se deben a la formación o rompimiento de los enlaces físicos o químicos a temperaturas elevadas. Una de las formaciones más comunes que puede ocurrir al realizar esta caracterización es que debido a las altas temperaturas puede existir la formación de productos volátiles y por ello la pérdida de peso aunque también puede ocurrir una reacción química con lo que también existiría un cambio en el peso de la muestra, esto también dependerá de la atmósfera en que se realice. El intervalo de la temperatura usualmente para el TGA va desde temperatura ambiente hasta los 1200°C, tanto en atmosfera inerte como reactiva.

A 2.5.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) una técnica cuantitativa que permite conocer la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en el proceso de estudio, así como también el calor que está involucrado dentro del mismo proceso.

Mide las diferencias en la cantidad de calor aportado a una muestra y una sustancia de referencia en función de la temperatura de la muestra, estando las dos sometidas a un programa de temperatura controlado.

Se utilizan dos tipos de métodos para obtener los datos de calorimetría de barrido diferencial: DSC de potencia compensada y DSC de flujo de calor.

Con el método de DSC de potencia compensada, se miden las compensaciones de potencia efectuadas para que tanto la muestra en estudio como la referencia se mantengan a la misma temperatura, al someter a ambas a un programa de temperatura bajo atmósfera controlada. Mientras que el método de DSC de flujo de calor, mide la diferencia de cantidad de calor de la muestra y la de referencia cuando la temperatura de la primera se aumenta o disminuye linealmente. Cabe destacar que ambos métodos generan la misma información [4, 10, 11,12].

A 2.6 Adsorción de nitrógeno

El término de adsorción de acuerdo con la definición de la IUPAC es la adsorción positiva o negativa de uno o más componentes en una capa interfacial. La adsorción implica el enriquecimiento de un componente (adsorbato) en la superficie de otro (adsorbente). La adsorción se establece debido a las fuerzas de atracción entre las moléculas de un fluido y la superficie sólida.

El área superficial de los materiales se obtiene por medio de las medidas de adsorción física, uno de los métodos más utilizado es el método BET, desarrollado por Brunauer, Emmet y Teller. Este método se basa en la medida de sucesivos volúmenes de un gas no polar, por lo general nitrógeno o gases nobles, adsorbidos sobre la superficie interna de los poros del sólido a la vez que se mide la presión de las moléculas que se adsorben, hasta que se logra la saturación de la superficie. De acuerdo con la clasificación de la IUPAC, que los clasifica en base al tipo de superficie y porosidad del material, se presentan seis tipos distintos de isothermas de adsorción [13].

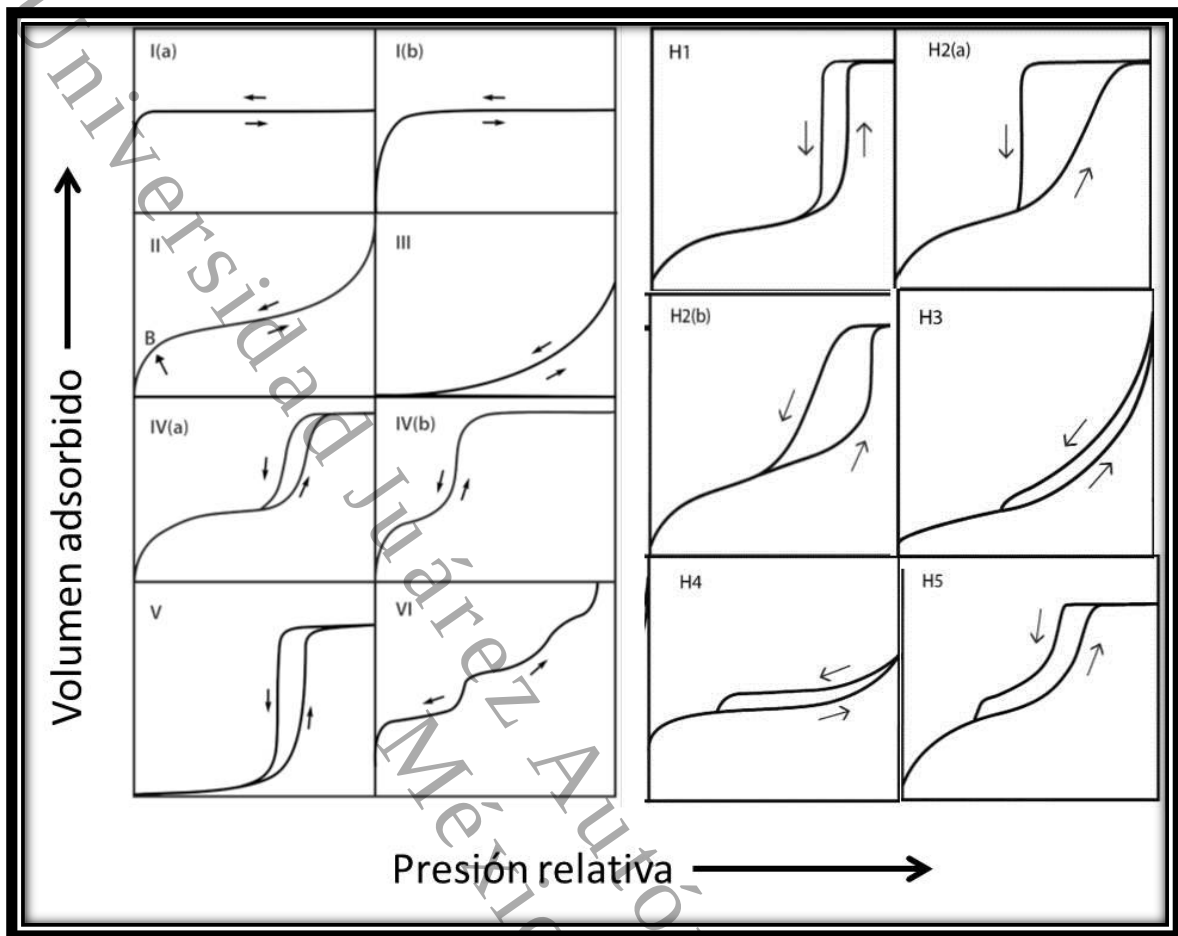


Figura A 2.3 Tipos de isothermas e histéresis de acuerdo con la clasificación de la IUPAC [14].

1

A 2.7 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), es un instrumento que al igual que la microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica indispensable para la caracterización de los materiales capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mayor. El principio fundamental de la técnica es igual a la del SEM y es el siguiente: "Un haz de electrones procedentes de un filamento es acelerado y focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas hacia una muestra". A partir de la interacción de los electrones con las muestras es que se generan una serie de señales que

son recogidas y amplificadas por un detector, y permiten obtener información de la morfología del material así como también su composición química.

El FESEM se diferencia del SEM en cuanto a la generación de electrones. Este utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía focalizados, por lo cual mejora la resolución y permite trabajar a muy bajas potencias, (0.02-5 kV). Con estas características del FESEM se logra minimizar el efecto de carga muestras no conductoras así como también a evitar daños en materiales sensibles al haz electrónico [15].

A 2.8 Dispersión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partícula y Potencial Zeta

La dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering) es una técnica que mide la difusión de partículas en movimiento browniano empleando la relación de Stokes-Einstein (la cual establece una relación entre los fenómenos de difusión y viscosidad), para convertir el valor obtenido en datos de tamaño y distribución del mismo.

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 su 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 existe esta influencia se llama capa eléctrica doble, la cual se cree que existe como dos regiones separadas. 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 potencial zeta es una medición necesaria para determinar la estabilidad de partículas en una suspensión coloidal. Si las partículas tienen una

carga negativa o positiva grandes, se repelerán entre ellas y por lo tanto la suspensión será estable.

A 2.9 Evaluación biológica in vitro

A 2.9.1 Biocompatibilidad de las nanopartículas de SiO₂

Existen diferentes metodologías para evaluar la viabilidad de células cuando estas se exponen a agentes extraños y así determinar su posible efecto antiproliferativo. Una de las más comunes es la técnica de exclusión por tinción con azul de tripano. Esta técnica se basa en el uso de azul de tripano el cual es un coloide que penetra las células que presentan la membrana rota. Con este método se puede saber la integridad de la membrana celular, dado que las células con la membrana dañada se tiñen de color azul, mientras que las células con la membrana integra se observan blancas o brillantes [16].

A 2.9.2 Citotoxicidad de las nanopartículas-complejo

El procedimiento de la tinción de Gram consiste en fijar el material orgánico a la superficie del portaobjetos del microscopio ya sea por calor o con metanol. Cabe destacar que el metanol preserva la morfología de las células huésped, así como la de las bacterias, además que es útil para examinar muestras de sangre. Después de la fijación se prosigue a la tinción con el colorante principal el cristal violeta. Luego se aplica el yodo de Gram, para que el colorante alcalino se una a la pared celular de las bacterias a través de enlaces químicos. La decoloración distingue células grampositivas de las gramnegativas. Las células grampositivas retiene el cristal violeta y las gramnegativas pierden el colorante [17].

REFERENCIAS

- [1] Günter H., NMR Spectroscopy. Basic principles, concepts and applications in chemistry, 2nd Ed., John Wilye & Sons, Ney York, USA, 1995, pp.1-10
- [2] Callister, W. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. 1^{ra} Ed. 2007.Reverte. pp. 55-57.
- [3] Barrow G. Química física para las ciencias de la vida. 1^{ra} Ed. 2006. Reverte. pp. 52-57
- [4] Atkins P., Jones L. Principios de química: los caminos del descubrimiento. Edt. Medica panamericana. (2007) 3: 196-197, 894-898.
- [5]https://www.google.com.mx/search?q=radiacion+electromagnetica&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwicj-mCIN_NAhWGWSYKHcjWDakQ_AUIBigB#tbm=isch&q=Espectro+de+los+diferentes+tipos+de+radiaci%C3%B3n+electromagn%C3%A9tica+y+sus+correspondientes+frecuencias+y+longitudes+de+onda+&imgsrc=tF_O3GNL5dP9GM%3A
- [6] Niemantsverdriet J. Spectroscopy in Catalysis. 1^{ra} Ed. 1993. Verlagsgesellschaft. pp. 193-197.
- [7] Wade L. Química Orgánica. 5^{ta} Ed. 2004. Pearson Educacion. pp. 490-496, 66-670
- [8] Skoog D., Holler F., Crouch S. Principios de análisis instrumental. 6^{ta} Ed. 2008. Cengage Learning. pp. 367-370, 431-435
- [9]https://www.google.com.mx/search?q=reflectancia+difusa&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjWqKa3k9_NAhXJKiYKH7eBmYQ_AUIBigB#imgsrc=z9lWDJCclp0q1M%3A

- [10] Wilches M., Ruiz L. Hernández M. Bioingeniería VI. Fundamentos de instrumentación para la química clínica y las radiaciones ionizantes. 1^{ra} Ed. 2007. Universidad de Antioquia. pp. 239-252.
- [11] Gómez S., Sierra M., Pérez D. Análisis Instrumental. 1^{ra} Ed. 2010. Netbiblo. pp. 206-213 páginas
- [12] Gil J., Barroso S., Camacho A. Introducción al conocimiento de los materiales y a sus aplicaciones. 1^{ra} Ed. 2010. Universidad Nacional de Educación a Distancia. pp.131-133
- [13] Carballo L. Introducción a la catálisis heterogénea. 1^{ra} Ed. 2002. Univ. Nacional de Colombia. pp.84-86
- [14] Thommes M., Kaneko K., Neimark A.V., Olivier J.P., Rodríguez-Reinoso F., Rouquerol J., Sing K.S.W., Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of Surface area and pore size distribution (IUPAC Technical report), Pure Appl. Chem. **2015**, 87, 1051-1069.
- [15] Hernández H., Espejo E. Mecánica de fractura y análisis de falla. 1^{ra} Ed. 2002. Univ. Nacional de Colombia. pp. 238.
- [16] Ramirez P., Mendoza A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. 1^{ra} Ed. 2008 Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecología. pp. 26-27
- [17] Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. Diagnostico Microbiológico. 12th Ed. 2007. Editorial Médica Panamericana. pp. 81.

María Guadalupe Márquez Chablé.pdf

 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:622761102

Fecha de entrega

10 sep 2026, 12:46 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

10 sep 2026, 1:07 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

María Guadalupe Márquez Chablé.pdf

Tamaño del archivo

5.9 MB

95 páginas

14.921 palabras

105.122 caracteres

18% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 125 palabras)
- Abstract

Fuentes principales

- 18%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
230 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

- 18%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1 Internet

ri.ujat.mx

18%