



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
CAMPUS AEROPUERTO

---

---

# APLICACIÓN DE ONDAS DE CHOQUE PARA PRODUCCIÓN DE SÍLICES DE TALLA COMPATIBLE PARA SU INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS

---

---

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO BIOMÉDICO

PRESENTA

**JOSÉ CARLOS OLVERA OLVERA**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES CUÁN HERNÁNDEZ**

CO-DIRECTOR:

**DR. ACHIM MAX LOSKE MEHLING**

QUERÉTARO, QRO. A 10 DE DICIEMBRE DE 2020

## DEDICATORIA

*A mi madre por su esfuerzo, comprensión y amor incondicional que me llevaron a este punto de mi vida; quien me enseñó que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.*

*A mi familia que me han dado cariño, fortaleza y apoyo incondicional mostrado en múltiples formas.*

*A mis amigos y maestros por sus enseñanzas, motivación y momentos vividos.*

*A ustedes todo mi agradecimiento.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Licenciatura en Ingeniería Biomédica del Campus Aeropuerto, UAQ.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, en especial a los laboratorios de Ondas de Choque y Nanobio-óptica.

A mis tutores:

A la Dra. Luz María López Marín como pilar importante en el presente proyecto. Estoy plenamente agradecido por la confianza, la tutoría, el apoyo y el conocimiento adquirido.

Al Dr. Achim Max Loske Mehling por la acertada orientación, el conocimiento y la discusión crítica que me permitió crecer profesionalmente.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza por la asesoría, las enseñanzas y la confianza en la realización del proyecto.

A la Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández por la dedicación, el asesoramiento y el soporte para continuar por este camino.

Al Dr. Edgar Jiménez Cervantes por su colaboración, asesoramiento continuo y disponibilidad en el proyecto.

A Diana Catalina Tovar Ledesma, mi amiga y compañera, por su conocimiento, interés y motivación a seguir adelante.

Al personal académico del laboratorio de Nanobio-óptica, especialmente al M. en C. Carlos Valdemar Aguilar y al Dr. Ravichandran Manisekaran por sus consejos y asesorías.

Al personal administrativo y académico del Laboratorio de Ondas de Choque, el M. en C. Francisco Fernández Escobar, la Dra. Blanca Millán Chiu, la Dra. Pilar

Rodríguez Torres y Paula Bernardino Peláez por su apoyo en la realización de los experimentos.

A la M. en C. Ileri Segura Gutiérrez del Laboratorio de Nanotecnología, UAQ por su apoyo en los experimentos y estudios realizados.

A la M. en C. Martha Elizabeth Carranza Salas del laboratorio de Bioquímica de Hormonas, del Instituto de Neurobiología, UNAM por su disposición al hacer uso de los equipos.

A la Dra. Carmen Peza Ledesma del CFATA, UNAM por su apoyo y asesoramiento durante el desarrollo del proyecto.

A la M. en C. Lourdes Palma Tirado del Instituto de Neurobiología de la UNAM por su apoyo en los análisis de microscopía electrónica de transmisión.

A la Dra. Luz María Avilés Arellano del CINVESTAV, Querétaro, por su apoyo con las mediciones de dispersión dinámica de luz y potencial zeta.

A la Dra. Beatriz Marcela Millan Malo del CFATA, UNAM por la realización de los estudios de difracción de rayos X.

A la M. en C. Alicia del Real López del Laboratorio de Microscopía del CFATA, UNAM por la obtención de imágenes en microscopía electrónica.

A CONACYT por haber apoyado con recursos materiales a la realización de esta tesis mediante el proyecto Ciencia de Frontera 2019, número 53395 denominado Materiales biomiméticos basados en sílice: un nuevo concepto para liberación de fármacos y herramientas de diagnóstico en contra de la tuberculosis.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios del CFATA y de la UAQ, así como mis amigos de esta etapa de universidad por su amistad y soporte.

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1. Nanomedicina .....	4
2.2. Nanopartículas biocerámicas .....	5
2.2.1. Nanopartícula de sílices mesoporosas.....	5
2.2.2. Biocompatibilidad de la sílice.....	7
2.3. Espuma mesocelular de sílice (MCF).....	8
2.4. Ondas de choque.....	11
2.4.1. Propiedades de las ondas de choque usadas en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas .....	12
2.4.2. Generador de ondas de choque piezoeléctrico .....	14
2.4.3. Efectos de las ondas de choque en fragmentación de materiales .....	16
2.4.4. Ondas de choque tándem.....	18
2.5. Membrana celular y mecanismos de internalización.....	20
2.5.1. Internalización de nanopartículas en células de mamífero .....	21
2.6. Fluorocromos.....	22
2.6.1. Isotiocianato de fluoresceína, FITC .....	23
2.6.2. 4', 6'-diamidino-2-fenilindol, DAPI.....	23
2.6.3. Isotiocianato de tetrametil rodamina, TRITC.....	24
2.7. Microscopía confocal.....	25
2.8. Dispersión dinámica de luz.....	26
2.9. Microscopía electrónica de barrido .....	28

2.10.	Microscopía electrónica de transmisión.....	28
<b>3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Objetivo general .....	31
5.2.	Objetivo particular.....	31
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>32</b>
6.1.	Síntesis de la espuma mesocelular de sílice (MCF) .....	32
6.2.	Funcionalización de la partícula de MCF con el grupo amino $-NH_2$ .....	33
6.3.	Aplicación de ondas de choque (SW) .....	33
6.3.1.	Generador Piezoson 100 Plus .....	34
6.3.2.	Generador de Ondas de Choque Multifuncional.....	35
6.3.3.	Preparación de muestras para aplicación de ondas de choque .....	36
6.3.4.	Aplicación de ondas de choque (SW).....	37
6.4.	Tamizaje de partículas tratadas con ondas de choque (MCF- $NH_2$ -SW) .....	38
6.5.	Liofilización de MCF- $NH_2$ -SW filtradas (MCFTSW) .....	38
6.6.	Protonación de partículas de MCFTSW .....	38
6.7.	Caracterización .....	39
6.7.1.	Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	39
6.7.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	39
6.7.3.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	40
6.7.4.	Isotermas de adsorción-desorción de $N_2$ a 77 K.....	40
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
7.1.	Caracterización de MCF y MCF- $NH_2$ .....	41
7.1.1.	Difracción de rayos X (XRD) a bajos ángulos.....	41
7.1.2.	Espectroscopia de infrarrojo (IR) .....	43
7.1.3.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	44
7.1.4.	Isotermas de adsorción-desorción de $N_2$ a 77 K.....	47
7.1.5.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	49
7.1.6.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	51

7.2.	Aplicación de ondas de choque (SW).....	53
7.2.1.	Caracterización de MCF-SW expuestas a ondas de choque en el generador Piezoson 100 Plus .....	53
7.2.1.1.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	54
7.2.2.	Caracterización de MCF-NH <sub>2</sub> -SW expuestas a ondas de choque en el Generador Multifuncional .....	55
7.2.2.1.	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	56
7.2.3.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	57
7.3.	Caracterización de MCFTSW .....	58
7.3.1.	Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	59
7.3.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	60
7.3.3.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	62
7.3.4.	Espectroscopía de infrarrojo (IR) .....	64
7.3.5.	Potencial zeta .....	65
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>TRABAJO A FUTURO.....</b>	<b>70</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ



## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha creado un gran avance en el diseño de nanomateriales, proporcionando un control más preciso de las propiedades físicas y químicas; y con ello un modelo que se adapte a todas las exigencias de su posterior aplicación. La nanotecnología es la ciencia y la ingeniería de hacer materiales, estructuras y dispositivos funcionales en el orden de una escala nanométrica, de 1 a 100 nm, aunque en la literatura incluyen escalas menores a micra. Una de las áreas donde la nanotecnología tiene un gran campo de aplicación es la nanomedicina. Los avances generados en el área de la nanomedicina han dado lugar a sistemas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos de mayor eficacia a los ya existentes, proporcionando nuevas oportunidades y una mayor calidad de vida para el hombre.

Los biomateriales juegan un papel crucial en la ingeniería biomédica. Su estudio requiere conocimientos de ingeniería, biología y medicina. En la actualidad, las tendencias en biomateriales están centradas fundamentalmente en el diseño y la fabricación de matrices para medicina regenerativa, sistemas de liberación controlada, sistemas de cultivo y validación, producción de ortobiológicos, superficies biofuncionales y dispositivos biónicos.

La nanomedicina se ha propuesto para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos conocidos hoy en día como “nanoacarreadores”. Estos sistemas consisten en utilizar nanoestructuras que transporten el fármaco hasta la zona dañada o al interior de la célula. Solamente cuando han reconocido esa zona liberan el fármaco como respuesta a cierto estímulo, o a través de interacciones y enlaces covalentes (Lechuga, 2005).

Las nanoestructuras son materiales constituidos por agregados de átomos con propiedades físicas y químicas específicas dadas por la organización a escala nanométrica, con una mayor área de relación superficie/volumen con respecto a materiales de mayor escala, y cuyas dimensiones físicas son comparables con las células (Montes et al., 2014). El desarrollo en el área de la nanotecnología ha

llevado a la creación de materiales mesoestructurados que representan una nueva generación de sólidos porosos, del orden de tamaño de los mesoporos de entre 2 a 50 nm. Por ello presentan una elevada superficie específica y un volumen de poro que les confiere propiedades para su utilización como catalizadores, adsorbentes y soportes (Calleja et al., 2003). La síntesis y caracterización inicial de este tipo de materiales fue llevada a cabo en 1992 en forma de silicatos o aluminosilicatos por la compañía "Mobil Oil Corporation" (Beck et al., 1992)(Kresge et al., 1992).

Los materiales nanoestructurados basados en una matriz cerámica son considerados los nuevos nanoacarreadores, ya que presentan una ventaja que es atravesar algunas barreras que el cuerpo utiliza para evitar la penetración de sustancias no deseadas al organismo. Sin embargo, a pesar de un gran avance en el campo de los nanomateriales, los materiales mesoestructurados de sílice, por ejemplo, aún presentan ciertas limitaciones en la actualidad, como lo es el tamaño de partícula, que restringe su aplicabilidad a ciertos procesos, a pesar de mostrar una alta biocompatibilidad y gran capacidad de adsorción en la superficie. La ventaja de los materiales compuestos por sílice es que en algunas de sus formas presentan una alta bioactividad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, como es el caso de las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSN) (Henstock et al., 2015). Otra ventaja en especial de las MSN es que se pueden utilizar como acarreadores de diversos agentes bioactivos debido a su estructura química altamente controlable, en cuanto a volumen de poro y su morfología.

Las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de las ondas de choque van en aumento. Ejemplo de ello son campos como la rehabilitación, la ortopedia, la traumatología, la cardiología, la medicina veterinaria y la urología. En urología la aplicación más común se denomina litotricia extracorpórea por ondas de choque, es decir, la pulverización no invasiva de cálculos urinarios hasta alcanzar un tamaño de 2 mm que le permita al paciente desecharlos por la orina. También se ha estudiado el uso de la sonoporación para transfección celular. Se trata de un método físico que permeabiliza transitoriamente las membranas celulares por medio de la

aplicación de ondas de choque para la incorporación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) al interior de las células (Armenta et al., 2006). En 2016 se estudió el efecto de la sonoporación, en presencia de MSN biomiméticas con cargo de ADN, y se encontró que la entrega del cargo mejoró en comparación con las eficiencias de transfección utilizando las MSN o los métodos físicos solos (Carrasco et al., 2016).

La litotricia extracorpórea hizo pensar en la posibilidad de reducir el tamaño de biomateriales a escala nanométrica aplicando ondas de choque como estímulo mecánico. En el presente estudio se desarrollaron espumas de sílice mesocelular (MCF, del inglés “mesocellular foam”), a las cuales se les aplicó ondas de choque para generar tamaños de partículas a escala submicrométricas, en la cual esta técnica mostró una erosión del material de MCF, produciendo partículas menores a 200 nm y conservando su estructura mesocelular, esto con la finalidad de obtener estructuras capaces de atravesar la membrana celular por un sistema activo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Nanomedicina**

La nanomedicina es un área de aplicación reciente de la nanotecnología para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades (Kumar et al., 2013). En el caso específico de la nanotecnología la podemos definir como la producción, manipulación y estudio de la materia con, al menos, un tamaño en un intervalo de 1 a 100 nanómetros (nm) en una dirección del espacio. Se sabe que cuando se reduce la materia en la escala nanométrica, los objetos se comportan de forma muy diferente a como lo hacen a escalas de tamaño mayores, debido a que en el nanomundo las propiedades fisicoquímicas de los materiales varían según su tamaño (Poole & Owens, 2003).

En nanomedicina se estudian las interacciones a nanoescala utilizando dispositivos, sistemas y tecnologías que incluyen nanoestructuras capaces de interactuar en un rango de los 100 nanómetros. De esta manera, se puede crear sistemas con nuevas propiedades y funciones manipulando su tamaño, a fin de diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades desde el interior del organismo, o más aún, entender los procesos patofisiológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada. En la práctica, el rango útil de la nanomedicina normalmente se encuentra entre 5 y 250 nm (Garnett & Kallinteri, 2006), por las propiedades y consecuencias fisiológicas y anatómicas. En la literatura encontramos el término submicrométrico para esta aplicación.

Los principales campos que se consideran que pueden ser objeto de interés son la monitorización, la reparación de tejidos, el control de la evolución de las enfermedades, la defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos, el diagnóstico, el tratamiento y la prevención y la administración de medicamentos directamente a las células, entre otros. Este último a través de nanoacarreadores, que pueden definirse como vehículos de entrega que se dirigen a los sitios de acción a través de diversos mecanismos fisicoquímicos y biológicos como adsorción, penetración celular y endocitosis (Goldberg et al., 2007).

## **2.2. Nanopartículas biocerámicas**

A fines del siglo XX, los biocerámicos como los fosfatos de calcio cristalinos, los vidrios bioactivos y las vitrocerámicas no podían cumplir con las necesidades clínicas de los biomateriales para implantes. Se requirieron biocerámicas con propiedades más exigentes para ser utilizadas, como andamios de células u otras sustancias biológicamente activas, capaces de inducir la regeneración y reparación de tejidos vivos basados en genes. De esa manera los nuevos biomateriales investigados actualmente están basados más bien en la biología, y el concepto de reemplazo de tejidos ha sido sustituido por la regeneración de tejidos (Salinas & Vallet-Regí, 2007).

Los nanomateriales son muy diversos en su naturaleza física, química y biológica. Tienen propiedades muy distintas a las de sus homólogos a gran escala debidas a su elevado cociente área-superficie y fuerza-peso, y a la aparición de efectos cuánticos (Morales, 2007).

En la actualidad se estudian nuevos tipos de biocerámicos avanzados, como los híbridos orgánicos-inorgánicos y los materiales mesoporosos de sílice, también llamados vidrios mesoporosos ordenados.

### **2.2.1. Nanopartícula de sílices mesoporosas**

A principios de los años 90's, científicos de la "Mobil Oil Corporation" presentaron una nueva familia de materiales mesoporosos ordenados de sílice, bautizada como M41S. De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) un material mesoporoso se define como un material con diámetros de poro entre 2 y 50 nm. Desde entonces han sido numerosos los desarrollos de nuevos tipos de nanopartículas de sílice mesoporoso (MSN, del inglés mesoporous sílica nanoparticles) para la mejora y exploración de nuevos procesos de obtención.

Entre los materiales mesoporosos ordenados de sílice más representativos se encuentra el MCM-41 (Mobil Composition of Matter), formado por el empaquetamiento de canales unidireccionales en geometría hexagonal; el SBA-15 (Santa Barbara Amorphous), análogo al MCM-41, pero con interconexión entre los canales; el KIT-6 (Korean Institute of Technology), constituido por una red tridimensional cúbica bicontinua, y la espuma de sílice mesocelular MCF (Mesocellular Foam), con estructura tridimensional en forma de espuma compuesta por celdas esféricas de gran tamaño interconectadas por ventanas (Valle, 2013).

Esta diferencia en las propiedades de textura y mesoestructura tiene un efecto en las propiedades de adsorción y desorción de los materiales mesoporosos. Debido a que la utilidad de estos materiales se debe, en gran medida, a la estructura y al tamaño de sus poros, se han desarrollado una serie de estrategias para controlar el tamaño, la forma y la conectividad de los sistemas de poro. Se busca aumentar el área superficial de la partícula que brinde la capacidad de interaccionar con átomos, iones o moléculas no sólo en la superficie del material, sino a través del interior de la pared de los poros, dando como resultado el encapsulamiento de moléculas orgánicas activas.

En la superficie de la sílice existen distintos grupos terminales, ya sea grupos siloxanos ( $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$ ) o grupos silanoles ( $\equiv \text{Si} - \text{OH}$ ). Debido a su estructura, la superficie es polar (Bracho, 2013).

La superficie de la sílice puede ser protonada en presencia de ácidos fuertes; debido a la presencia de pares de electrones sin compartir sobre el átomo de oxígeno en el grupo hidroxilo, lo que resulta, es un ion alquiloxonio (Lamarque et al., 2008). Por un lado, en medio base ocurre la disociación produciéndose carga negativa en la superficie, por el otro, en medio ácido ocurre la protonación y la consiguiente aparición de una carga positiva (Palacios et al., 2012).

Pueden destacarse características estructurales únicas de las MSN, como poros de tamaño nanométrico, mesoestructuras, gran área superficial, alto volumen de poros

y superficies fácilmente modificables. Estas características estructurales permitieron a las MSN convertirse en una clase muy prometedora de materiales encapsulantes efectivos para fármacos o moléculas bioactivas, biosensores, biocatalizadores o agentes de bioimagen específicos del sitio (Asefa & Tao, 2012).

### **2.2.2. Biocompatibilidad de la sílice**

A medida que la investigación se dirige hacia la obtención de nuevas MSN y sus aplicaciones en biología y medicina, es importante comprender su impacto en el medio fisiológico. Cualquier material que sea diseñado con objeto de ejercer una función en contacto con el organismo vivo ha de ser biocompatible y no presentar ningún tipo de toxicidad.

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para cumplir su función terapéutica sin producir efectos indeseados (Nieto, 2011), es decir, inducir una respuesta adecuada por parte del organismo para poder así desempeñar su función de la manera más conveniente.

Hasta la fecha, varios grupos de trabajo han evaluado la citotoxicidad in vitro en relación a las propiedades fisicoquímicas como concentración, tamaño, área de superficie y carga, estudiando el comportamiento de una variedad de MSN y tipos de células.

En cuanto al tamaño de partícula, se ha visto que las nanopartículas de sílice alrededor de 10 nm pueden inducir efectos nocivos contrario a partículas de 100 nm. Las partículas más pequeñas aumentan el estrés oxidativo con ROS y peroxidación de lípidos (McCarthy et al., 2012). La baja toxicidad de las nanopartículas de 100 nm puede deberse a la inducción de enzimas antioxidantes como tioredoxina reductasa o catalasa (Passagne et al., 2012). Se ha demostrado que las MSN en forma de barra son más nocivos en comparación con las MSN en forma de esfera (Niu et al., 2016). Por otro lado, la porosidad y la funcionalización orgánica de las nanopartículas mejora su biocompatibilidad (Han et al., 2010; Liu et

al., 2019). Los restos de la superficie, tales como silanoles, silanolatos y siloxanos, de nanopartículas de sílice son específicos del proceso de producción y parecen ser los determinantes clave de la toxicidad (Murugadoss et al., 2017). Muchos de los ensayos in vitro se han estudiado en diferentes líneas celulares, indicando que el impacto citotóxico depende del tipo de célula (Blechinger et al., 2013) (Lin & Haynes, 2010), sin embargo, el efecto de la concentración es crucial. Las concentraciones bajas se relacionan con poca toxicidad. A concentraciones mayores de 100 µg/mL y tiempos por más de 24 horas, disminuye considerablemente la viabilidad celular (Asefa & Tao, 2012) (Decan et al., 2016). La genotoxicidad se ha revisado poco en las nanopartículas de sílice. Zhang y colaboradores expusieron la línea celular HEK-293 a las MSN de tamaño de partícula de 100 nm, en una concentración de 120 µg/mL durante la noche, encontrando que, aunque hay cambios en la expresión de algunos genes, no se manifestó una genotoxicidad grave que implique carcinogénesis (Zhang et al., 2015).

### **2.3. Espuma mesocelular de sílice (MCF)**

La sílice mesoporosa de un tamaño de poro grande se ha estudiado para aumentar la adsorción de biomoléculas grandes y el transporte de masa en catálisis y reacciones enzimáticas (Hermida et al., 2019). La espuma mesocelular de sílice (MCF) es un ejemplo de sílice mesoporosa de tamaño de poro grande del rango de 20-50 nm y un área superficial de 500–800 m<sup>2</sup>/g (Han et al., 2010). Se caracteriza por poseer una distribución particular de poros que consiste en celdas y ventanas. Como se muestra en la Figura 1, las celdas están enmarcadas por una matriz desordenada de puntales de sílice y las ventanas interconectan las celdas para formar un sistema poroso tridimensional (Schmidt-Winkel et al., 1999).



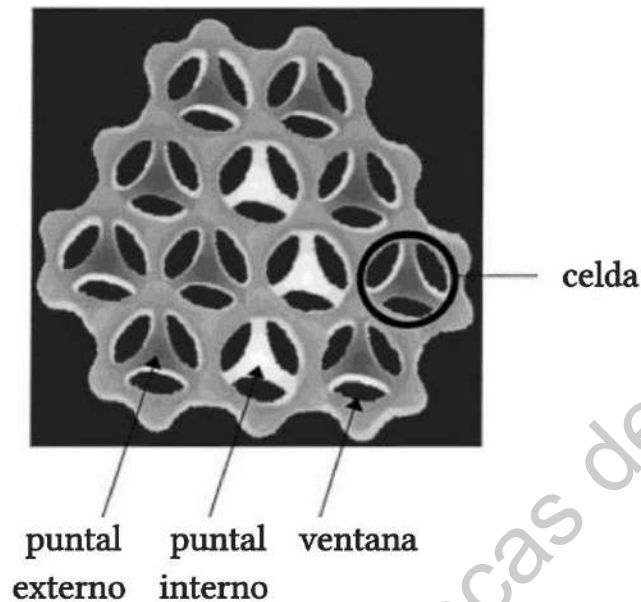


Figura 1. Esquema de una sección transversal de la estructura exhibida por MCF (Schmidt-Winkel et al., 2000).

Debido a su estructura, tienen mejores propiedades de transporte de masa en comparación con otras sílices mesoporosas, lo que permite un rendimiento mejorado como soporte para enzimas inmovilizadas (Choi et al., 2015) y como adsorbentes de macromoléculas (Tovar, 2020). Sin embargo, la MCF convencional tiene una morfología de partículas irregular y un tamaño de partícula de decenas de micras (Song et al., 2017), por lo tanto, tiene una deficiencia en muchas aplicaciones (Schmidt-Winkel et al., 2000).

Se ha reportado cambios de parámetros de síntesis, como la temperatura, los tiempos de envejecimiento y la velocidad de agitación en la producción hidrotérmica de MCF (Fantini et al., 2004)(Hwang et al., 2004)(Mardones et al., 2019)(Meoto et al., 2017)(Pitchumani et al., 2005)(Silva et al., 2008), así como la presencia de sales inorgánicas, agentes de hinchamiento orgánicos, codisolventes y cosurfactantes

(Choi et al., 2015)(Han et al., 2010)(Peña et al., 2009)(Que et al, 2001) que podrían afectar la morfología y el tamaño de las partículas.

En general, las MCF se producen mediante el uso de surfactantes que forman micelas cilíndricas que sirven como patrón o plantilla sobre las cuales se da el proceso sol-gel (Figura 2), recubriendo las paredes de las micelas con sílice. Al final, el surfactante se retira mediante calcinación, obteniéndose un material estructurado. Se agrega el agente de hinchamiento 1,3,5-trimetilbenceno (TMB) antes de la reacción sol-gel, que se dirige a los núcleos hidrófobos de las micelas e incrementa el volumen micelar (Zhao et al., 1998), causando la transformación de la mesoestructura 2D hexagonal del SBA-15 a la fase característica de la MCF. La primera síntesis de las MCF se reportó por primera vez con tamaños de poro que varían de 20 a 30 nm en condiciones fuertemente ácidas usando un copolímero tribloque (P123) y tetraetilortosilicato (TEOS) como plantilla orgánica y precursor de sílice, respectivamente, en presencia de TMB como un expansor de poros (Schmidt-Winkel et al., 1999).

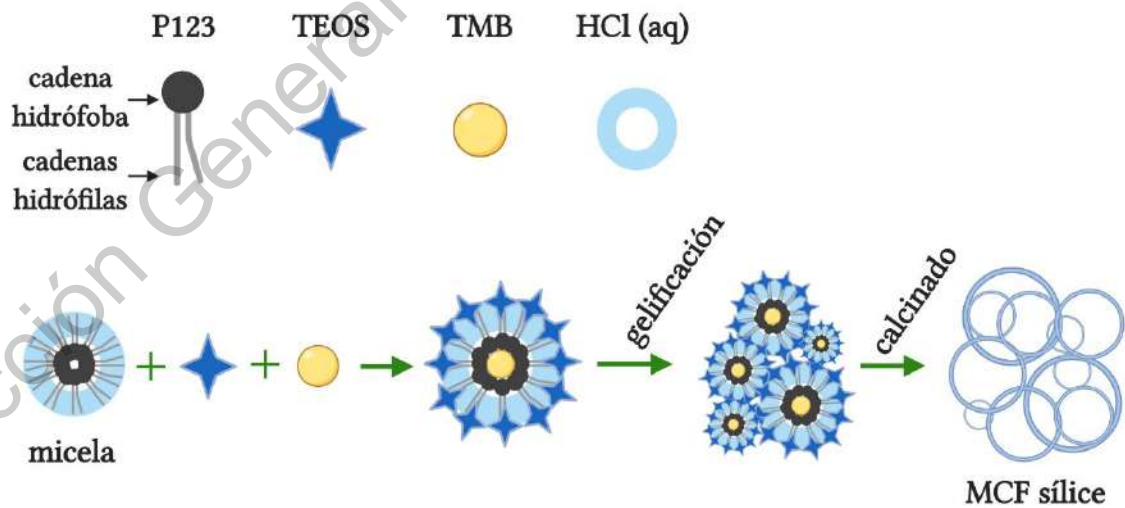


Figura 2. Mecanismo de síntesis de la MCF (Figura adaptada de Song et al., 2017).

La modificación de la carga y la polaridad superficial es clave en una multitud de aplicaciones. La funcionalización es una de las estrategias empleadas para modificar las propiedades físico-químicas de los materiales mesoporosos de sílice mediante la incorporación de moléculas orgánicas, tales como 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES) con un grupo amino terminal ( $-NH_2$ ) (Hernández et al., 2012; Wang et al., 2005).

A la adición de moléculas orgánicas a un material mesoporoso se le denomina anclaje, es decir, la modificación post-síntesis del material con el surfactante ya eliminado, mediante la reacción de los grupos silanoles de la sílice mesoporosa con las moléculas precursoras de los grupos orgánicos (apolares o polares), para formar un grupo funcional en la capa superficial de sílice mesoporosa por unión covalente. Es uno de los métodos prometedores para la funcionalización superficial de sílice mesoporosa (Cestari et al., 2006). Se sabe que una funcionalización adecuada de la superficie de estos materiales permite ejercer un control en la interacción de la partícula con otras biomoléculas, ya que se cambian las propiedades fisicoquímicas de éste.

#### **2.4. Ondas de choque**

Durante la Segunda Guerra Mundial se observó que los pulmones de náufragos expuestos a ondas de choque (SW, del inglés "shock wave") generadas por explosiones en el agua, lejanas a su ubicación, estaban dañados, sin observarse lesiones en partes externas del cuerpo. Las investigaciones dieron lugar a la idea de desintegrar cálculos renales con ondas de choque generadas fuera del paciente. La técnica se denominó litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOCH). Las primeras aplicaciones clínicas se realizaron a principios de los 80's.

Las ondas de choque de tipo mecánico son frentes de onda con una duración sumamente corta, que experimentamos en nuestra vida cotidiana durante la emisión

acústica de un trueno en una tormenta eléctrica, una explosión o cuando un avión rompe la barrera del sonido. Las ondas de choque son el resultado de una liberación repentina de energía mecánica, eléctrica, química o nuclear en un espacio relativamente limitado. Frecuentemente se definen como una discontinuidad a través de la cual existe un cambio repentino en la presión, densidad, temperatura, entropía y velocidad de las partículas (Loske, 2007).

Como se mencionó anteriormente, las ondas de choque se aplican también en otros campos de la medicina como, por ejemplo, en ortopedia, traumatología, cardiología, rehabilitación, terapia estética y medicina veterinaria. Paralelamente se está estudiando su potencial en transfección celular y transformación de hongos y bacterias (Loske, 2017b).

#### **2.4.1. Propiedades de las ondas de choque usadas en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas**

Para la mayoría de las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas las ondas de choque, consisten en un pulso de compresión (Figura 3) de aproximadamente 0.5 a 3  $\mu$ s y una presión positiva máxima ( $P^+$ ) entre 10 y 150 MPa, la cual se alcanza en un tiempo de pocos nanosegundos. El tiempo de subida ( $t_s$ ) se define como el tiempo que tarda la presión en aumentar del 10% al 90% de la presión positiva máxima  $P^+$ . Al pulso positivo le sigue un pulso de descompresión ( $P^-$ ) con una amplitud de hasta 25 MPa (valor absoluto), con duración entre 2 y 20  $\mu$ s.

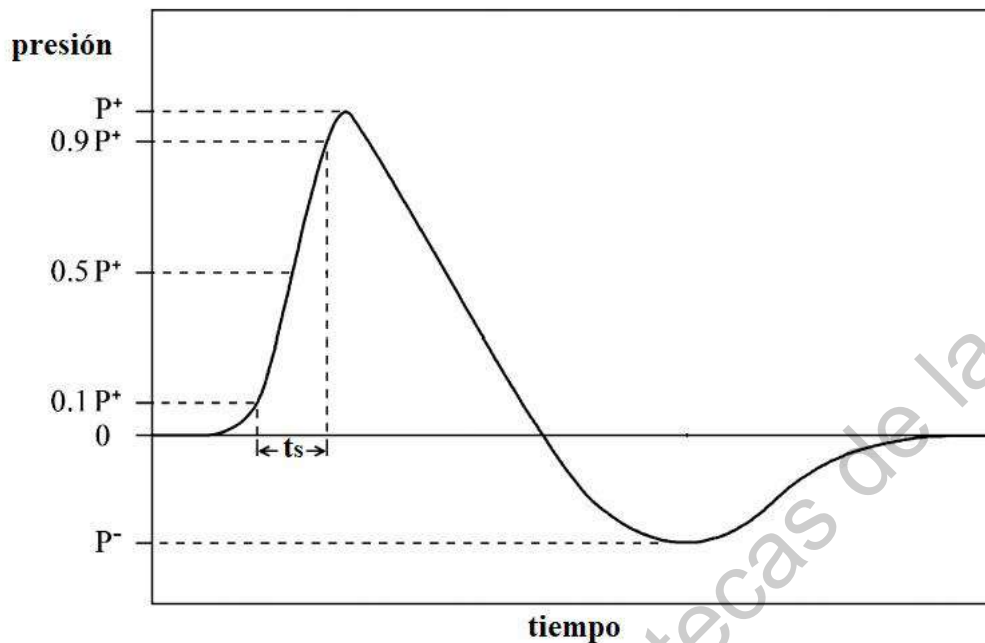


Figura 3. Esquema simplificado de la variación de presión generada por una onda de choque. El eje origen de la presión corresponde a la presión de equilibrio del medio por el que se propaga la onda de choque. La escala del diagrama fue aumentado para su claridad (Canseco et al., 2011)

Debido a que un cambio de densidad del medio de propagación provoca reflexión y refracción de las ondas de choque (Loske, 2017a), en la mayoría de los equipos de LEOCH se usa agua como medio para generar, transmitir y acoplar las ondas al interior del cuerpo humano. La impedancia acústica del agua y otros líquidos es similar a la de los tejidos blandos, evitando reflexión, refracción y pérdida de energía en la interfase agua-tejido. Otro motivo por el cual se usan fluidos de acoplamiento para aplicaciones médicas y biomédicas es que, con una energía relativamente baja, se pueden obtener presiones altas. Esto se debe a que los líquidos son difícilmente compresibles. Independientemente de ello, sería muy peligroso generar presiones del orden de magnitud mencionado en aire.

#### 2.4.2. Generador de ondas de choque piezoeléctrico

En el área biomédica generalmente se usan cuatro tipos de generadores de ondas de choque. El generador electrohidráulico, que utiliza descargas eléctricas de alto voltaje como fuente de energía puntual; el electromagnético, basado en una bobina electromagnética y una membrana metálica opuesta a ella, el generador que produce ondas acústicas aprovechando el efecto piezoeléctrico inverso y los generadores de ondas de choque balísticos, cuyo principio de funcionamiento es similar al de los martillos neumáticos usados en la construcción (Shrivastava & Kailash, 2005).

Como se verá más adelante, los generadores piezoeléctricos usados para este estudio consisten en un arreglo de elementos piezoeléctricos montado en la superficie interna de un cascarón metálico cóncavo esférico, que se encuentra dentro de un contenedor de agua. A cada elemento piezoeléctrico se le induce un pulso de alto voltaje (Figura 4a y 4b), por lo que se expande súbitamente, generando un pulso de presión que se propaga hacia el centro,  $F$ , del arreglo. La superposición de todos los pulsos de presión, aunada a efectos no lineales, produce una onda de choque en las proximidades de  $F$  (Figura 4c). Para aplicaciones biomédicas, el volumen dentro del cual la presión es al menos la mitad de la presión máxima positiva, se define como zona focal de -6 dB. Las zonas focales generadas por litotritores extracorpóreos tienen una forma similar a la de un cigarro con su dimensión más larga a lo largo del eje de simetría (Figura 4d) (Loske, 2017b).

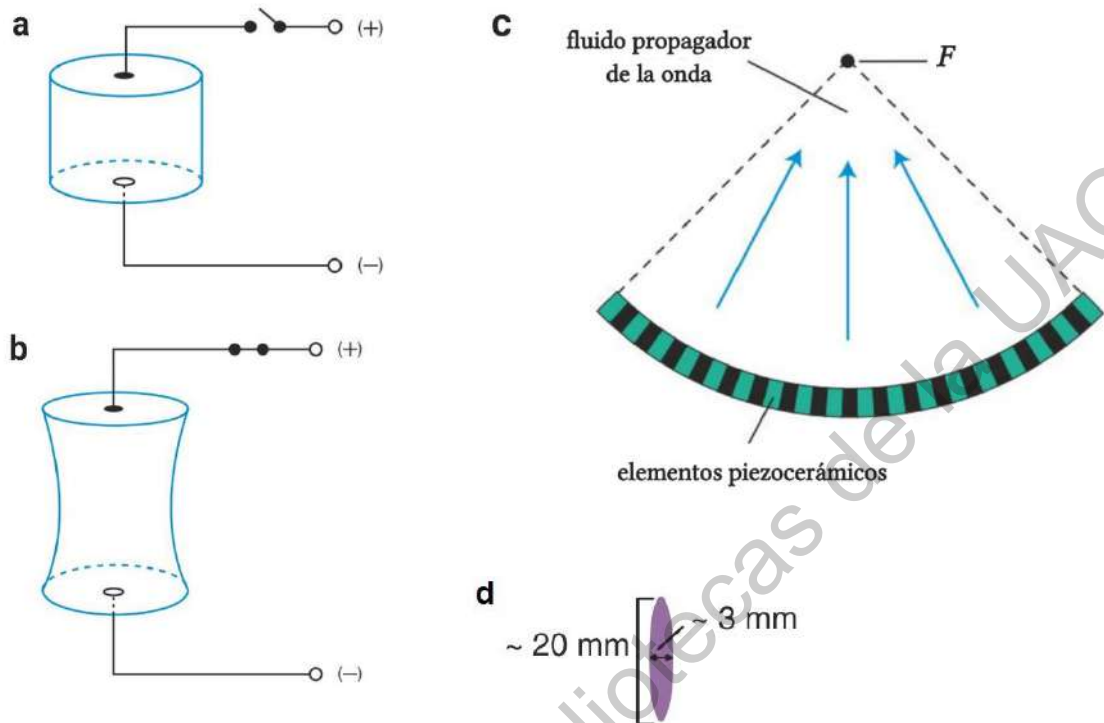


Figura 4. Esquema de un cristal piezoeléctrico a) antes y b) después de aplicarle un pulso eléctrico. c) Esquema de una fuente de ondas de choque piezoeléctricas de una sola capa. d) Zona focal de un generador piezoeléctrico (Loske, 2017b).

Algunos generadores tienen dos capas de elementos piezoeléctricos montados sobre el respaldo cóncavo esférico. La capa frontal se excita poco tiempo después de la capa posterior, de manera que los impulsos generados por ambas capas se superponen en la superficie del generador de ondas de choque. Una ventaja de las fuentes de ondas de choque de doble capa es su tamaño más pequeño (Riedlinger et al, 2001).

### 2.4.3. Efectos de las ondas de choque en fragmentación de materiales

La pulverización de cálculos renales por ondas de choque es un proceso dependiente del perfil de la onda de choque y de la dosis, en donde se combina los esfuerzos mecánicos y la cavitación acústica para fragmentar el cálculo (Lokhandwalla & Sturtevant, 2000). También depende de las propiedades del material a fracturar. La composición más común de un cálculo renal contiene calcio, combinado con fosfato u oxalato (Loske, 2007).

La rápida transición de presión de las ondas de choque a través del material causa esfuerzos de tensión en las interfaces, de modo que la estructura del material se agrieta (Thiel, 2001). Inicialmente, los esfuerzos de compresión y tensión juegan un papel primordial en la ruptura de los cálculos renales. Sin embargo, cuando el tamaño de los fragmentos residuales es aproximadamente menor que la mitad de la longitud de onda de compresión, las ondas de tensión pierden su eficiencia y los efectos como la cavitación son responsables de pulverizar los fragmentos que aún prevalecen (Zhu et al., 2002).

La cavitación, es decir, el crecimiento y colapso de burbujas diminutas, depende del tamaño inicial de las burbujas. En agua simple sin tratar, el radio típico de una burbuja es de 3  $\mu\text{m}$  (Loske, 2007). Al paso del pulso positivo de una onda de choque, la burbuja es comprimida súbitamente. Con ello aumenta la presión en su interior (Figura 5). Posteriormente incrementa su tamaño cientos de veces. Esto sucede por la disminución de la presión en el exterior y el exceso de presión en su interior. El volumen de la burbuja aumenta significativamente y después de cientos de microsegundos la burbuja sufre un colapso violento. Por las condiciones externas a la burbuja, el colapso generalmente es asimétrico, formándose un toroide. El toroide es atravesado por un chorro microscópico de fluido, denominado microjet, con una velocidad de 400 a 800 m/s (Zhong et al, 1993). La colisión entre el microjet y la pared interior de la burbuja genera una onda de choque secundaria de alta presión (hasta 300 MPa) (Brujan, 2008). La dirección del microjet generalmente se da en el sentido de desplazamiento de la onda de choque ya que cuando la micro burbuja



colapsa comienza a deformarse más lento en el extremo distal (Loske, 2017b). El radio de un microjet es aproximadamente una décima parte del radio de la burbuja inicial (Kodama & Takayama, 1998). Estos chorros de fluido de alta velocidad pueden producir daños significativos en la superficie de los materiales que se encuentran en la cercanía (Zhou et al., 2004). En la Figura 5, se muestra un esquema de la formación de un microjet después del paso de una onda de choque.

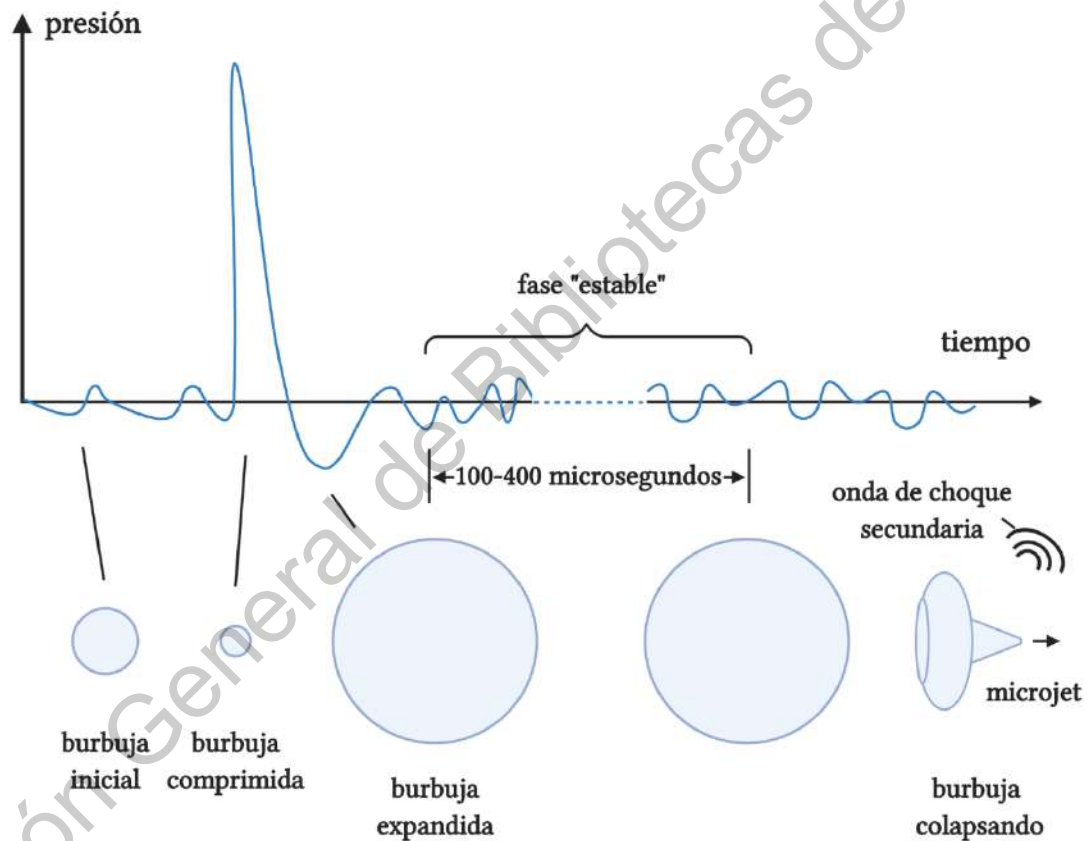


Figura 5. Esquema de la dinámica de una burbuja de cavitación antes y después del paso de una onda de choque (figura adaptada de Loske, 2007).

Generalmente los esfuerzos de tensión inducen fracturas en los cálculos renales durante la etapa inicial del tratamiento, mientras que la cavitación es responsable de erosionar el material, produciendo fragmentos finos (polvo).

#### **2.4.4. Ondas de choque tándem**

En el Laboratorio de Ondas de Choque del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, se realizaron ensayos con cálculos artificiales y se llegó a la conclusión de que, aplicando dos ondas de choque con un retraso de entre 50 y 950  $\mu$ s, dependiendo de la composición y forma de los cálculos, es posible aumentar significativamente el coeficiente de fragmentación en comparación con el tratamiento estándar (monopulso), lo que reduce el número de ondas aplicadas. Aun cuando la segunda onda tiene una presión menor a la primera, se obtiene un aumento en la energía de colapso de las burbujas de cavitación (Fernández et al., 2005). En la Figura 6a se muestra un esquema de la variación de presión medida en el punto focal de un generador de ondas de choque al incidir una onda tándem.

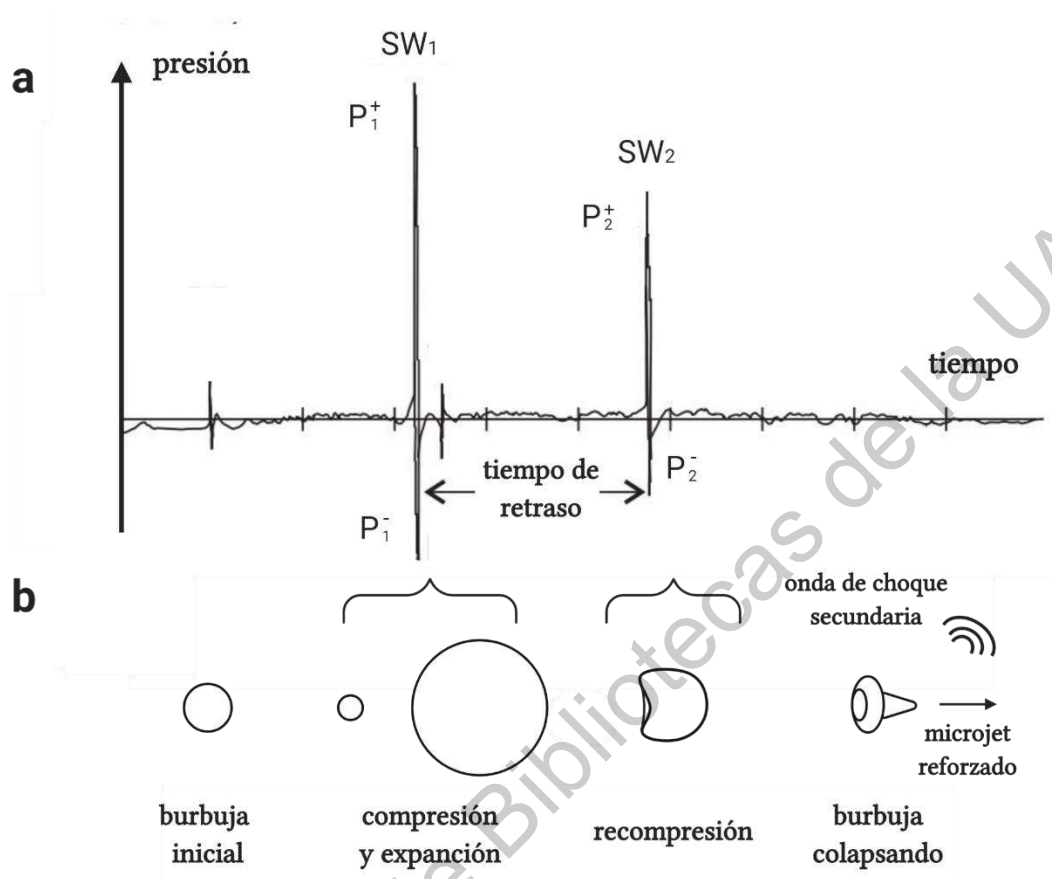


Figura 6. a) Variación de presión al paso de una onda tándem. P<sup>+</sup> y P<sup>-</sup> corresponden a los pulsos de compresión y descompresión, respectivamente (SW<sub>1</sub>: primera onda de choque; SW<sub>2</sub>: segunda onda de choque). b) Representación de la cavitación reforzada por una segunda onda SW<sub>2</sub> (figura adaptada de Fernández et al., 2005).

En el caso de las ondas de choque tándem, se hace llegar una segunda onda de choque justamente en el instante en el que las burbujas generadas por la acción de la primera onda inician su colapso. Esto aumenta la energía del colapso y, consecuentemente, de los microjets y ondas de choque secundarias emitidas.

## 2.5. Membrana celular y mecanismos de internalización

Una célula eucariota está rodeada por una membrana que controla la entrada y salida de iones y moléculas, incluidos los materiales nanoestructurados. La membrana celular se compone de una bicapa lipídica, con sus colas hidrófobas en la parte interna y las cabezas hidrófilas hacia el exterior, y contiene diferentes biomoléculas, en su mayoría proteínas (Curtis et al., 2008).

La barrera más importante que se debe superar para los portadores intracelulares es la membrana celular. Se han descubierto varias rutas en las células de mamíferos para la internalización de material externo; incluida la fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y endocitosis mediada por no clatrina y no caveolina (Rauch et al, 2012) (Figura 7). Dependiendo del tamaño de las partículas a engullir, las células pueden usar cualquiera de estos procesos de internalización. Las células especializadas, como los macrófagos, usan la fagocitosis para engullir partículas de microescala ( $> 1 \mu\text{m}$ ). Por otro lado, la absorción celular de partículas pequeñas ( $< 200\text{--}300 \text{ nm}$ ) implica algún tipo de endocitosis (Conner & Schmid, 2003)(Leclerc et al., 2012)(Prokop & Davidson, 2007).

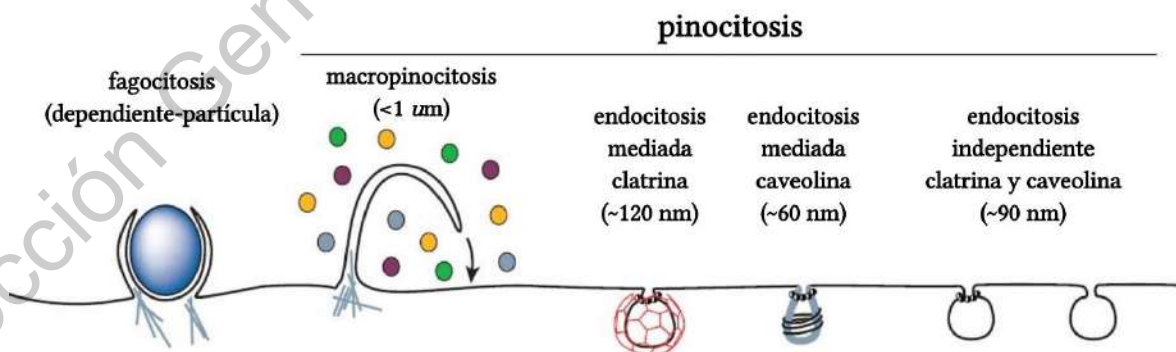


Figura 7. Múltiples vías de entrada a una célula de mamífero. Las vías endocíticas difieren con respecto al tamaño, la naturaleza de la carga y el mecanismo de formación de vesículas (Conner & Schmid, 2003).

### **2.5.1. Internalización de nanopartículas en células de mamífero**

Como se mencionó anteriormente, el proceso de endocitosis está mediado por varios mecanismos que pueden transportar las MSN a diferentes lugares dentro del citoplasma. En algunos casos se ha visto que estos mecanismos dependen del tipo de célula (Vicente et al., 2017), de la fase de su ciclo celular (Hsiao et al., 2014), así como del tamaño de la partícula, su morfología y su carga superficial (Ma et al., 2013)(Shang et al., 2014). La membrana celular está predominantemente cargada negativamente. En consecuencia, las partículas cargadas positivamente se adsorben más eficientemente en la membrana celular que las partículas con carga negativa o neutrales (Graf et al., 2012). Varios grupos también han examinado el efecto de la forma de las nanopartículas en las interacciones con membranas celulares. Se ha reportado que la cantidad de captación celular de nanopartículas esféricas por endocitosis fue cinco veces mayor que la de las nanopartículas con forma de bastón (N. Ma et al., 2013).

De acuerdo con una revisión de la literatura, las nanopartículas esféricas de hasta 500 nm de tamaño fueron absorbidas por células no fagocíticas (Doherty & McMahon, 2009)(Kettler et al., 2014) y describen que un diámetro alrededor de 50 nm puede ser ideal, ya que presenta una mayor velocidad y número de partículas en la internalización celular (Lu et al., 2009). En 2015 se observó para tres tipos de células (células epiteliales A549 y HepG2 y fibroblastos NIH / 3T3), que las MSN de 60 nm fueron preferentemente endocitadas por las células, sin embargo, este tamaño de partícula mostró una mayor reducción en la viabilidad celular en comparación con partículas de 100 y 200 nm (In-Yong et al., 2015). Esto sugiere que partículas menores a 100 nm y de forma esférica parecen ser ideales para atravesar la membrana celular.

## 2.6. Fluorocromos

La luminiscencia describe la aparición de efectos luminosos causados por el cambio de un electrón de un estado excitado a un estado con menor energía. Los electrones pueden existir en diferentes estados de energía. El estado fundamental es un estado muy estable para un electrón y tiene el nivel de energía más bajo. Si los electrones absorben energía, pueden elevarse a un nivel desocupado de energía más alto, es decir, un estado excitado. Como el estado excitado es de mayor energía que el estado fundamental y un estado fuera del equilibrio químico, el sistema tiende a regresar a su estado basal; en este proceso se puede liberar la energía absorbida en forma de calor o fotón. (Ockenga, 2011).

La forma de excitación del sistema puede ser a través de fotones. Se le denomina fotoluminiscencia y se divide en fluorescencia y fosforescencia. La principal diferencia entre estas dos es la duración de la emisión. En el caso de la fluorescencia la emisión de fotones termina inmediatamente cuando se detiene la excitación. En contraste, en la fosforescencia la emisión de fotones puede durar horas después de que la excitación ha terminado (Shapiro, 2003).

Los fluorocromos son materiales que absorben energía de una longitud de onda específica y que la emiten en otra de mayor longitud de onda, dependiendo del grupo funcional de la molécula en cuestión. Generalmente, son moléculas que contienen grupos funcionales aromáticos, los cuales tienen orbitales moleculares deslocalizados y presentan una mayor absorción en el espectro ultravioleta-visible (200 a 800 nm aproximadamente) (Chang, 2010). La longitud de onda depende del espectro de absorción del fluorocromo y se debe garantizar que se suministre una cantidad adecuada de energía para elevar los electrones al estado excitado. Después de que los electrones están excitados, pueden estar en este estado de alta energía sólo por un tiempo muy corto. Cuando los electrones se relajan a su estado fundamental u otro estado con un nivel de energía más bajo, la energía se libera como un fotón. (Haugland, 2002).

### 2.6.1. Isotiocianato de fluoresceína, FITC

El isotiocianato de fluoresceína FITC se usa ampliamente para marcar proteínas, incluidos anticuerpos y lectinas a través del grupo amino. El grupo isotiocianato reacciona con aminas y grupos hidroxilo (Neumann et al, 2016) por lo que se ha llevado a etiquetar las MSN funcionalizada con amina (Rashidi et al, 2017). Existen dos tipos de isómeros: el isómero I tiene el grupo tiocianato en el carbono 4 del anillo de benceno, mientras que el isómero II tiene el tiocianato en el carbono 5 (Figura 8). El FITC tiene un máximo de absorción en 495 nm y un máximo de emisión en 525nm, lo que da un color verde (Sigma-Aldrich).

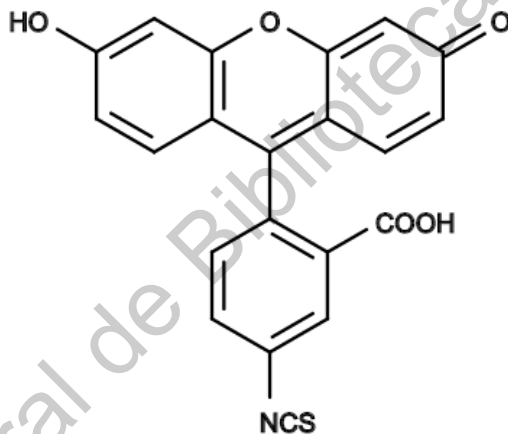


Figura 8. Estructura química de fluorescein 5-isothiocyanate.

### 2.6.2. 4', 6'-diamidino-2-fenilindol, DAPI

El 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Figura 9) es una molécula que se usa para formar un complejo con una molécula o superficie interactuante. El complejo formado toma una coloración azul fluorescente y se utiliza para marcar a regiones ricas en adenina-timina, por ejemplo, en el ADN (Kapuscinski, 1995). Es una tinción nuclear popular para la identificación del ciclo celular y específicamente tiñe los núcleos, pero no el citoplasma. Es excitado por la línea láser violeta de 360 nm y tiene un máximo de emisión de 460 nm (Lakowicz, 2006).

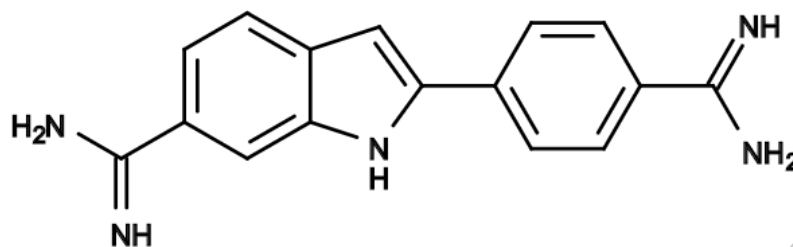


Figura 9. Estructura química de 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

### 2.6.3. Isotiocianato de tetrametil rodamina, TRITC

El isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC), consiste de una molécula de tetrametilrodamina base funcionalizada con un grupo reactivo de isotiocianato en el anillo superior de la estructura (Figura 10). Es un conjugado fluorescente de la faloidina. La faloidina se une a la actina filamentosa no nanométrica (Strickland et al., 2004), en consecuencia; al conjugar la faloidina con análogos fluorescentes se puede ver la distribución de actina en las células en microscopía óptica. TRITC tiene un máximo de excitación en 552 nm y un máximo de emisión en 575 nm.



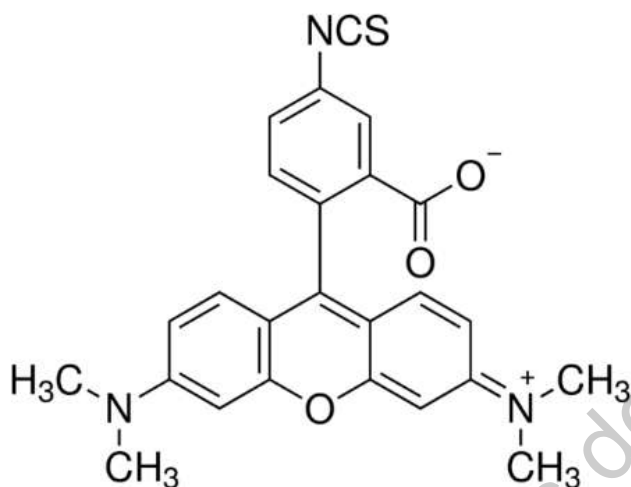


Figura 10. Estructura química del isotiocianato de tetrametil rodamina.

### 2.7. Microscopía confocal

La microscopía confocal forma parte de las técnicas de microscopía de luz fluorescente, ampliamente utilizada por su alta resolución espacial. La posibilidad de obtener una imagen confocal, se debe a que el haz de luz entrante se enfoca a través del objetivo en un pequeño punto del tejido. El mismo objetivo recolecta la luz fluorescente proveniente de la muestra. La luz que emerge pasa por una apertura focal o "pinhole". La apertura focal se ajusta para delimitar el plano focal y eliminar la luz fuera del foco (Figura 11). Esto da como resultado que el observador pueda recibir la luz proveniente de una región de sólo 500 nanómetros de profundidad (Nwaneshiudu et al., 2012), lo que permite realizar varios cortes ópticos finos y además efectuar reconstrucciones tridimensionales a partir de varios cortes ópticos continuos.

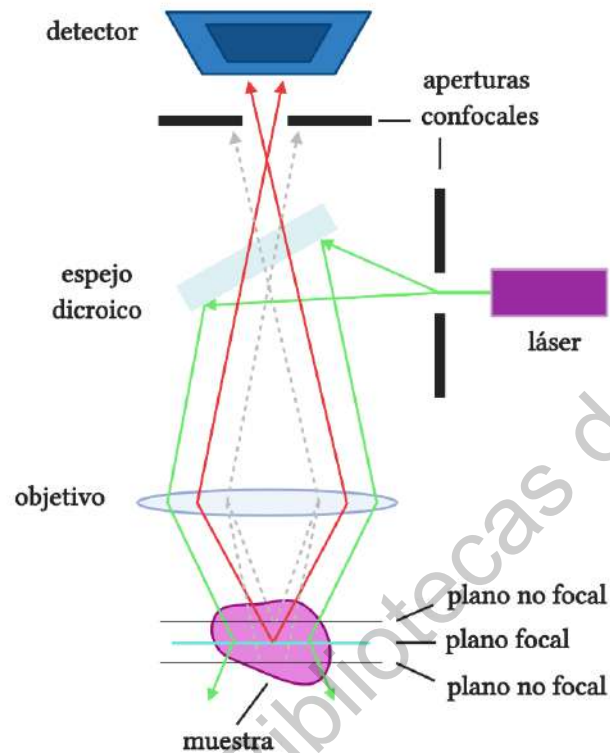


Figura 11. Configuración óptica de un microscopio confocal de escaneo láser (Stancovski & Badilescu, 2014).

Algunas de las aplicaciones de la microscopía confocal en la investigación en biomedicina abarcan el análisis de colocación de biomoléculas membranales o intracelulares; cambios en la expresión y distribución de moléculas en organelos y el análisis 3D de componentes y organelos celulares.

## 2.8. Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés dynamic light scattering) es una técnica para caracterizar el tamaño de partícula en suspensión en un líquido, en el rango submicrométrico. Durante la medición, la suspensión se expone a un haz de luz atenuada de acuerdo con la muestra. Se ha visto que las partículas en un medio

fluido experimentan un movimiento browniano aleatorio y esto hace que la dirección e intensidad del haz se disperse (Hoo et al., 2008). Los cambios de intensidad de luz dispersa dependientes del tiempo que se producen son detectados utilizando una disposición óptica adecuada para determinar la función de autocorrelación de la señal, y a través de ella y varios algoritmos obtener el tamaño de partícula (Figura 12).

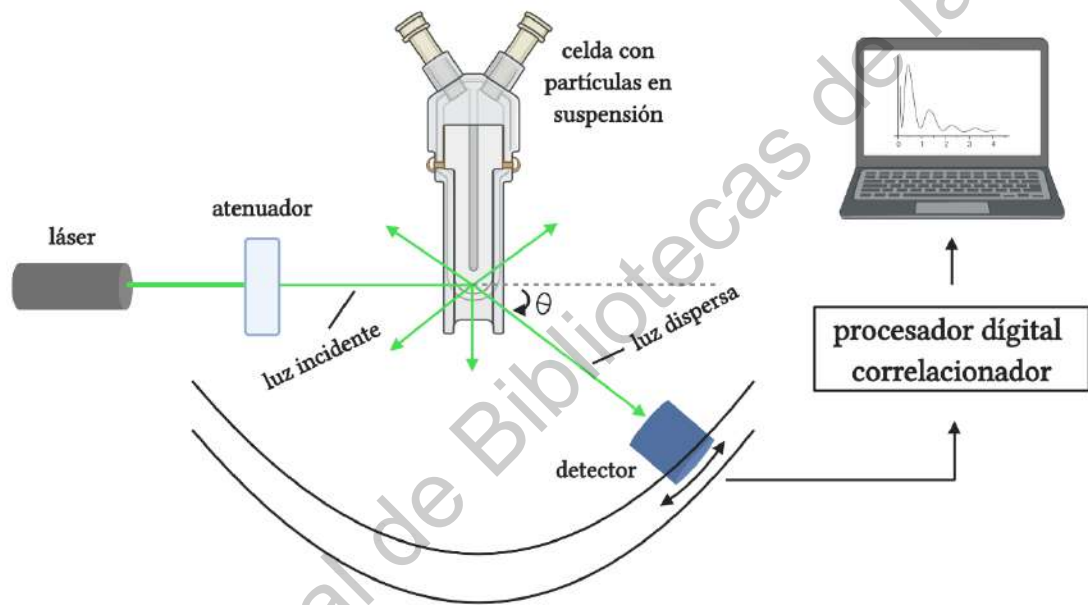


Figura 12. Configuración óptica para mediciones de dispersión dinámica de luz (figura adaptada de Jitkang et al., 2013).

El diámetro que se obtiene mediante esta técnica es el denominado diámetro hidrodinámico, es decir, el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la molécula que se está midiendo (Kaszuba et al., 2008). Dicho coeficiente dependerá tanto del tamaño del núcleo de partículas, como cualquier estructura superficial que afecte la velocidad de difusión, así como de la concentración y del tipo de iones en el medio, que cambiaría el grosor de la doble

capa eléctrica o longitud de Debye. Un índice de polidispersidad superior a 0.3 indica una distribución amplia (Jitkang et al., 2013).

### **2.9. Microscopía electrónica de barrido**

El microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés scanning electron microscope) es un sistema de caracterización superficial no destructiva que brinda información sobre formas, texturas y composición química. Consta de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10<sup>-5</sup> mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía, entre 5 a 30 kV (Ipohorski & Bozzano, 2013). Este haz es colimado por una serie de lentes electrónicas y un sistema de bobinas para hacer un barrido fino sobre la muestra. Los detectores registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, para ser procesadas y visualizadas en función del sistema final de observación.

El microscopio SEM se basa en el principio de que los electrones primarios liberados de la fuente proporcionan energía a los electrones atómicos del espécimen, que luego se pueden liberar como electrones secundarios y formar una imagen recolectando estos electrones secundarios de cada punto de la muestra y dar información sobre su morfología y topografía (Akhtar et al., 2018).

### **2.10. Microscopía electrónica de transmisión**

Un microscopio electrónico de transmisión (TEM, del inglés transmission electron microscopy) permite un examen microestructural detallado de objetos sólidos a través de imágenes bidimensionales de alta resolución. Funciona bajo el mismo principio básico de un microscopio óptico, pero utilizando un haz de electrones.

El haz de electrones de alto voltaje viaja a través del tubo de vacío del microscopio. Por medio de una lente electromagnética se enfocan los electrones en un haz muy

fino. Este haz pasa a través de la muestra, que es muy delgada, y los electrones son dispersados y captados en una pantalla fluorescente en la parte inferior del microscopio. En la pantalla aparece una imagen del espécimen con sus diversas partes que se muestran en diferentes tonos según su densidad. En las regiones donde los electrones no pasan a través de la muestra la imagen es oscura (De Graef, 2003; Williams & Carter, 1996).

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los avances logrados hasta el momento, persiste un problema en los sistemas de liberación de principios activos disponibles en el mercado, debido a que se limitan a la focalización de tejidos, en lugar de células individuales. Esto se ha tratado de resolver con la aplicación de nanoacarreadores (Guel et al, 2013).

Muchas de las nanopartículas actuales se ven restringidas en ciertas aplicaciones, ya sea por el área superficial, biocompatibilidad, funcionalización de la superficie y su carga, porosidad, estricto control de tamaño y forma de la partícula, entre otros. Además, una importante barrera física debe ser superada por las nanopartículas, la membrana plasmática, para lo cual tallas superiores a 500 nm resultan inapropiadas. Es por ello que controlar el tamaño y la forma de las partículas es importante para el desarrollo de un nanoacarreador eficiente.

Una metodología con potencial aplicación para fragmentar materiales es el uso de las ondas de choque. Se ha reportado mucho sobre la fragmentación de cálculos renales en tamaños que van desde milímetros hasta cientos de micras por efecto de las ondas de choque, pero poco se ha investigado sobre su efecto en el rango nanométrico. Estudios en curso en el laboratorio muestran que las ondas de choque son capaces de generar la ruptura de liposomas multilaminares en vesículas subnanométricas (Sánchez, 2020). De acuerdo con todos estos datos, las ondas de choque son capaces de fragmentar materiales de distinta dureza y composición química, por lo que su aplicación para la fragmentación de partículas de sílice micrométricas resulta interesante.

#### **4. HIPÓTESIS**

La energía entregada a las partículas de sílice mesocelular a través de la aplicación de ondas de choque provocará su fragmentación y, en consecuencia, generará partículas de sílice de talla submicrométrica compatible para su internalización en células eucariontes.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

- Aplicar ondas de choque a partículas micrométricas de sílice mesocelular para su fragmentación y generar partículas de sílice de talla compatible para el uso en biomedicina.

##### **5.2. Objetivo particular**

- Sintetizar sílice mesocelular de acuerdo con metodologías previamente desarrolladas.
- Funcionalizar partículas de sílice con la molécula APTES para internalizarla en células eucariotas.
- Aplicar ondas de choque para la fragmentación de sílice mesocelular y generar partículas de tallas submicrométricas.
- Caracterizar las muestras tratadas por ondas de choque por DLS y microscopía electrónica.
- Adecuación de partículas resultantes de ondas de choque para ensayos con células.

## 6. METODOLOGÍA

De manera resumida, el trabajo se desarrolló siguiendo el diseño experimental mostrado en la Figura 13.

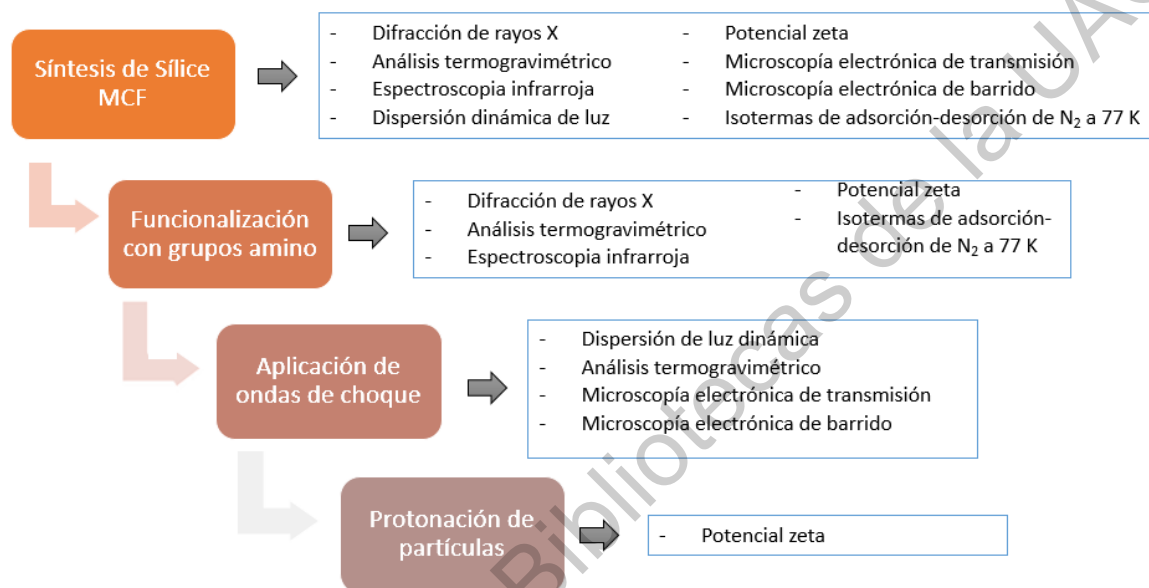


Figura 13. Diagrama experimental del proyecto.

### 6.1. Síntesis de la espuma mesocelular de sílice (MCF)

La síntesis de la espuma mesocelular de sílice MCF se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Ramírez et al. (2018), utilizando el surfactante neutro Pluronic P123 como dirigente de la estructura, tetraetil ortosilicato (TEOS) como precursor de la sílice y mesitileno (1,3,5-Trimetilbenceno) como agente de hinchamiento.

En la síntesis, 4.8 g de surfactante neutro Pluronic P123 se disolvió en una solución de ácido clorhídrico 4 M y agua destilada (75 mL y 112.5 mL respectivamente) con agitación constante a una temperatura de 35°C. Una vez que el surfactante P123 se disolvió completamente en la solución anterior, se adicionó 5.8 mL de mesitileno y a continuación 8 mL de TEOS de manera gradual. La reacción se mantuvo por 24



h en agitación constante a 35 °C. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a un bote de polipropileno; tapado, se colocó en mufla a 80 °C durante 24 h. Después de la síntesis, el sólido obtenido se recuperó por filtración, se lavó varias veces con agua destilada, se secó a temperatura ambiente y posteriormente a 110 °C por 18 h. Finalmente se calcinó a 550 °C durante 4 h.

## **6.2. Funcionalización de la partícula de MCF con el grupo amino –NH<sub>2</sub>**

La funcionalización superficial de la MCF se realizó por el método de post-síntesis (ex-situ), a partir de la MCF previamente sintetizada, descrito por Hernández et al., 2012. Se pesó 2.3 g de MCF y se dispersaron en una solución con 2.9 mL de 3-aminopropil trietóxisilano (APTES) (precursor de los grupos funcionales NH<sub>2</sub>) y 31 mL de etanol.

La cantidad de APTES se calculó para obtener 0.3 moles de APTES por cada mol de TEOS.

La reacción se realizó a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de N<sub>2</sub> por 60 min. Posteriormente, se adicionó 44 mL de agua desionizada y se continuó en agitación por 60 min. Se recuperó el sólido por filtración, se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente hacer un secado a 110 °C por 18 horas. Denominamos esta muestra como MCF-NH<sub>2</sub>.

## **6.3. Aplicación de ondas de choque (SW)**

Las muestras MCF y MCF-NH<sub>2</sub> fueron tratadas con ondas de choque utilizando dos generadores piezoeléctricos. Los generadores de ondas de choque utilizados fueron el generador piezoeléctrico Piezoson 100 Plus y el generador de ondas de choque Multifuncional, ambos basados en generadores de la empresa Richard Wolf GmbH (Knittlingen, Alemania). Se trata de dos generadores experimentales ubicados en el laboratorio de ondas en choque del CFATA de la UNAM.

### 6.3.1. Generador Piezoson 100 Plus

El generador piezoeléctrico Piezoson 100 Plus (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania) está equipado con una fuente de ondas de choque FB10G4, que consta de dos capas de varios cientos de cristales piezocerámicos, montados en un soporte esférico metálico con forma de cascarón esférico, recubierto con un polímero (Figura 14). El arreglo se encuentra dentro de una cavidad de acoplamiento llena de gel, sellada con una membrana de silicona. La fuente de ondas de choque se encuentra en el fondo de una tina de acrílico (base 297 mm × 297 mm, altura 260 mm). Los cristales son sometidos a una descarga de 2.5 a 6.1 kV. La capa posterior se excita un tiempo antes que la capa frontal, de modo que los pulsos de presión generados por ambas capas se superponen, propagándose a través del fluido hacia el foco ( $F$ ). El sistema está equipado con un posicionador xyz (modelo A4000, Velmex, Inc., Bloomfield, NY, E.U.A) en la parte superior del tanque.

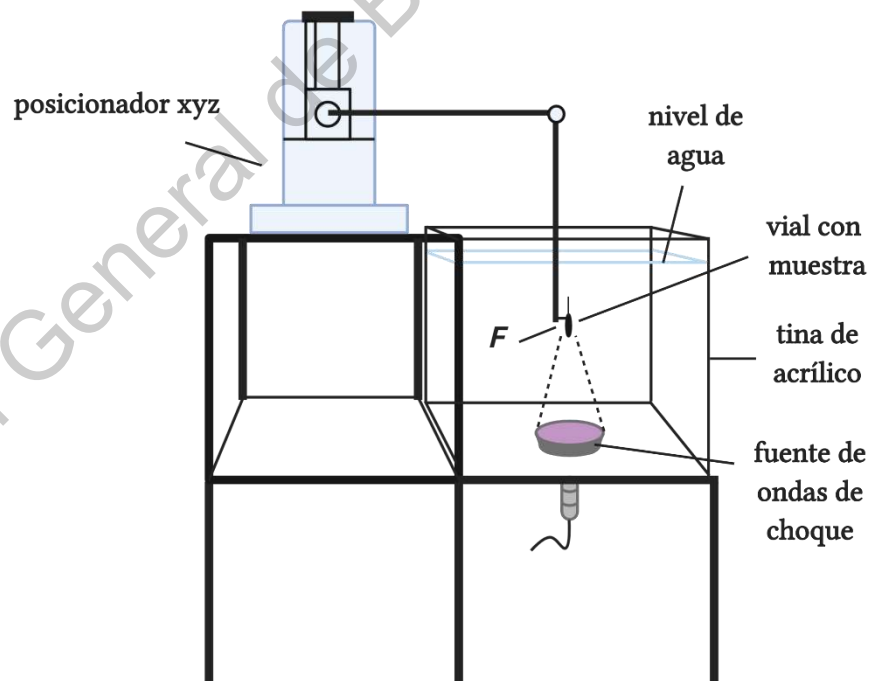


Figura 14. Esquema simplificado del generador piezoeléctrico Piezoson 100 Plus.  
(figura adaptada de Loske, 2017).

### 6.3.2. Generador de Ondas de Choque Multifuncional

El generador de ondas de choque Multifuncional utilizado en este proyecto es un equipo experimental basado en el generador de un litotritor Piezolith 2500 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania) que cuenta con aproximadamente 3000 cristales piezoeléctricos montados sobre la parte cóncava de una superficie de aluminio esférica, situada en el fondo de una tina de acrílico (base 675 mm × 675 mm, altura 450 mm) con agua (Figura 15). Los elementos piezoeléctricos están aislados del agua por una membrana polimérica. El radio focal, es decir, la distancia de cada cristal piezoeléctrico al foco  $F$ , es de 345 mm. El tiempo estimado que tarda en llegar el pulso de compresión de cada cristal al punto focal es de aproximadamente 230  $\mu$ s. El equipo generalmente se opera con voltajes entre 2 y 6 kV y una frecuencia de emisión de ondas monopulso o tándem máximo de 2.0 Hz. Su uso en modo manual también es posible. El equipo cuenta con un posicionador xyz en la parte superior de la fuente de ondas de choque.

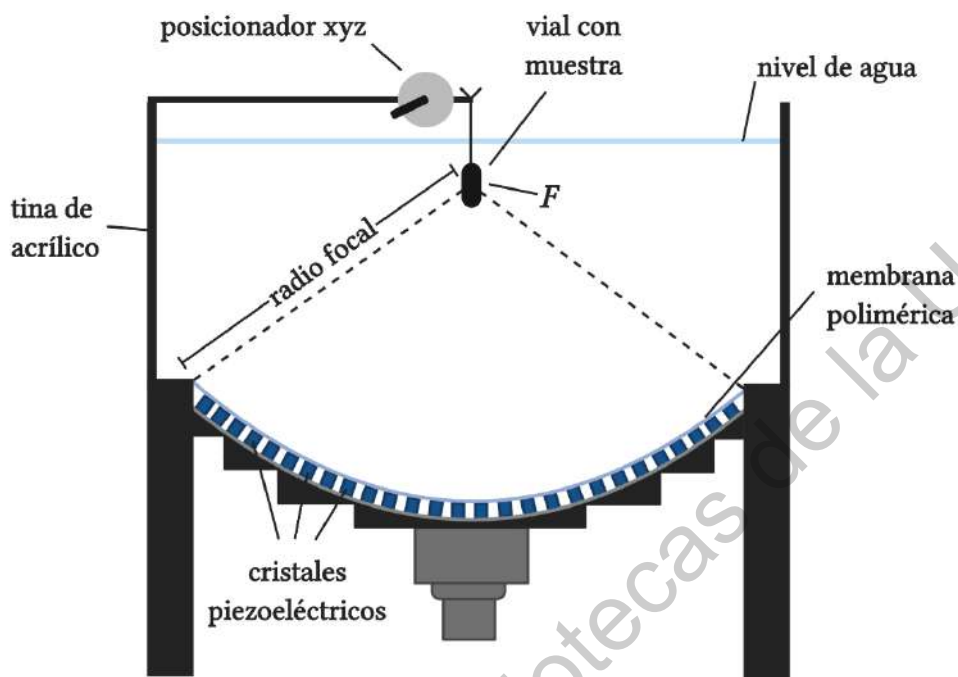


Figura 15. Esquema simplificado del Generador de Ondas de Choque Multifuncional. (figura adaptada de Loske et al., 2014).

### 6.3.3. Preparación de muestras para aplicación de ondas de choque

Se siguió la siguiente metodología de preparación de muestras para ambos generadores y ambas muestras, MCF y MCF-NH<sub>2</sub>.

Se preparó una suspensión de MCF en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL. Se incrementó la dispersión colocando la muestra en baño de ultrasonido por 30 seg. Inmediatamente se tomó 1 mL de la suspensión y se colocó en tubo de microcentrífuga. El contenido fue colocado en pipetas de transferencia de polipropileno estériles, las cuales fueron selladas con fuego para evitar contaminación durante el tratamiento. El tiempo óptimo de separación entre la primera y segunda onda en modo tándem fue entre 450 y 600  $\mu$ seg.

### 6.3.4. Aplicación de ondas de choque (SW)

El experimento consistió en colocar una suspensión de MCF y MCF-NH<sub>2</sub> en el punto focal  $F$  de los generadores Piezason y Multifuncional respectivamente. Se cambiaron variables de presión máxima ( $P^+$ ), número de ondas ( $n$ ) y frecuencia ( $\nu$ ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se realizaron siete experimentos aplicando ondas de choque con diferentes parámetros (Tabla 1) además de un control no tratado con ondas de choque.

Tabla 1: Condiciones utilizadas en la aplicación de ondas de choque.

Experimento	Generador	Modo	Presión máxima ( $p^+$ )	Número de ondas ( $n$ )	Frecuencia ( $\nu$ )	Muestra
1	Piezason 100 Plus	Monopulso	17.8 MPa	500 SW	1 Hz	MCF
2	Piezason 100 Plus	Monopulso	17.8 MPa	1000 SW	1 Hz	MCF
3	Piezason 100 Plus	Monopulso	17.8 MPa	2000 SW	1 Hz	MCF
4	Multifuncional	Monopulso	19.5 MPa	1000 SW	0.5 Hz	MCF-NH <sub>2</sub>
5	Multifuncional	Monopulso	43.6 MPa	1000 SW	0.5 Hz	MCF-NH <sub>2</sub>
6	Multifuncional	Monopulso	72.6 MPa	1000 SW	0.5 Hz	MCF-NH <sub>2</sub>
7	Multifuncional	Tándem	72.6 MPa	500 tándem	0.5 Hz	MCF-NH <sub>2</sub>

#### **6.4. Tamizaje de partículas tratadas con ondas de choque (MCF-NH<sub>2</sub>-SW)**

Inmediatamente después de finalizar el tratamiento con ondas de choque, se colocó la muestra del vial a un tubo de microcentrífuga. Se tomó la muestra con una jeringa estéril de 5 mL y se le colocó un filtro de 0.8 µm. Se desecharon las primeras dos gotas. La suspensión filtrada se colocó en un tubo falcón. La muestra resultante se denominó MCFTSW.

#### **6.5. Liofilización de MCF-NH<sub>2</sub>-SW filtradas (MCFTSW)**

La liofilización se realizó para separar el agua de la disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. La muestra en suspensión se distribuyó a volúmenes iguales en tubos de ensayo de poliestireno. El equipo utilizado fue un sistema centrífugo de concentrador al vacío SVC 100H (Savant, NY, NY, E.U.A). Se colocaron los tubos de ensayo en la centrifuga a 1725 rpm. La muestra se mantuvo en el equipo hasta que estuviera completamente deshidratada.

#### **6.6. Protonación de partículas de MCFTSW**

Se preparó una solución de hidróxido de amonio 4% y peróxido de hidrogeno 4%. Se colocó 1 mL de la solución anterior por cada 2 mg de MCF-NH<sub>2</sub>-SW filtrada en un tubo de microcentrífuga y se incubó por 10 min a 80°C en baño maría. Se mantuvo el tubo ligeramente abierto para la salida de vapor. La suspensión se centrifugo por 20 min a 13 000 rpm para inmediatamente descartar el sobrenadante y realizar lavados con agua destilada. Posteriormente se volvió a centrifugar con las condiciones mencionadas anteriormente y se retiró el sobrenadante. Se volvió a tratar las partículas con un 1 mL de una solución de HCl 0.4 M y peróxido de hidrogeno 4%. Se centrifugó y se retiró el sobrenadante para finalmente realizar el lavado con agua destilada. Se deshidrató llevando la muestra a liofilizar (ver metodología 6.5).

## **6.7. Caracterización**

A continuación, se describen los métodos de caracterización más importantes para el presente proyecto.

### **6.7.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DLS) se usó para determinar la distribución del tamaño de partícula y su patrón de dispersión de las muestras tratadas con ondas de choque, a una concentración de 0.1 mg/mL para control, y 1 mg/mL de los experimentos 1-7 (Tabla 1). La concentración fue seleccionada de acuerdo a los tamaños de partícula esperados para cada experimento.

Se realizaron tres mediciones para cada muestra en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Westborough, Malvern, Reino Unido), a los siguientes parámetros. Absorción de 0.001 e índice de refracción (RI) de 1.457 para sílice amorfa (Hans & Krause, 2003). A una temperatura de 25 °C y con el detector a 173°. Se utilizó la celda capilar DTS1070 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Un índice de polidispersidad superior a 0.3 indica una distribución amplia.

### **6.7.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Los pasos a seguir para las muestras control fueron: se realizó una dilución de 1:5 de cada muestra en agua destilada. Se colocó en baño ultrasónico por 30 seg y se colocaron 7  $\mu$ L sobre la rejilla de cobre malla 200, con película de carbono, y se secaron a vacío. El equipo utilizado fue el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol Co., Peabody, Massachusetts, E.U.A), ubicado en el CFATA, UNAM.

Las muestras MCFTSW (Figura 30) se expusieron por 1 min en baño ultrasónico e inmediatamente después se colocaron en la rejilla 2  $\mu$ L de la muestra, proceso que se repitió hasta sumar 8  $\mu$ L, y se secaron a vacío.

### **6.7.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se utilizó un microscopio JSM-6060LV (Jeol, Tokyo, Japón) para SEM y un equipo SU8230 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón) para SEM de alta definición, ambos ubicados en el CFATA, UNAM.

Los pasos a seguir fueron los siguientes: se realizó una dilución de 1:1 de la muestra a observar, se colocó en baño ultrasónico por 30 seg y con ayuda de un tubo capilar se tomó la muestra. Se colocaron dos gotas de la muestra sobre una de las superficies del portamuestras perfectamente limpio. Se dejó secar la muestra a vacío para su posterior observación.

### **6.7.4. Isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> a 77 K**

Las propiedades texturales (área superficial, diámetro y volumen de poro) de los materiales (MCF pura y funcionalizada NH<sub>2</sub>-MCF) se determinaron mediante las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (N<sub>2</sub>) a 77 K, utilizando un Autosorb iQ2 de la marca Quantachrome. Las muestras se desgasificaron previamente a 150 °C durante 18 h bajo vacío (10<sup>-4</sup> mbar), para garantizar una superficie limpia y seca, libre de cualquier especie adsorbida.

Las áreas específicas de las muestras se determinaron de acuerdo con el procedimiento BET estándar usando datos de la isoterma de adsorción de nitrógeno recopilados en el intervalo de presión relativa de equilibrio de 0.03 <P/P<sub>0</sub> <0.3. Las distribuciones de tamaño de poro se calcularán a partir de las isoterma de desorción de nitrógeno utilizando el método BJH.

El volumen total de poros (V<sub>p</sub>) se estimó a partir de la cantidad de nitrógeno adsorbido a una presión relativa de 0,98, y el volumen de microporos (V<sub>μ</sub>) y el área de microporos (S<sub>μ</sub>) se estimarán utilizando el método de t-plot.



## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1. Caracterización de MCF y MCF-NH<sub>2</sub>**

Se realizó la síntesis y caracterización de la MCF y la MCF-NH<sub>2</sub>, como se menciona en el procedimiento experimental. La funcionalización de la MCF se realizó para cambiar las propiedades fisicoquímicas de la superficie y con esto asegurar que la materia orgánica (lípidos y proteínas) se adherían a su superficie para formar partículas mimetizadas, esto de acuerdo a resultados previos obtenidos por el grupo de Valdemar y colaboradores (Valdemar et al., 2020). Así, se realizaron diferentes estudios para determinar las propiedades fisicoquímicas de la estructura de MCF de sílice y de igual manera, también se verificó si se había conseguido la funcionalización de la MCF con grupos amino. Los análisis se realizaron de acuerdo a las propiedades principales que buscamos en el material.

#### **7.1.1. Difracción de rayos X (XRD) a bajos ángulos**

El análisis por difracción de rayos X de la espuma de sílice mesocelular MCF en su forma de polvo, se realizó para comprobar la formación de la estructura mesoporosa tipo esponja en la MCF. Las mediciones de los difractogramas se registraron en un difractómetro Rigaku, modelo Ultra, utilizando radiación monocromática Cu K $\alpha$  en el rango  $2\theta$  de 0 ° a 3°.

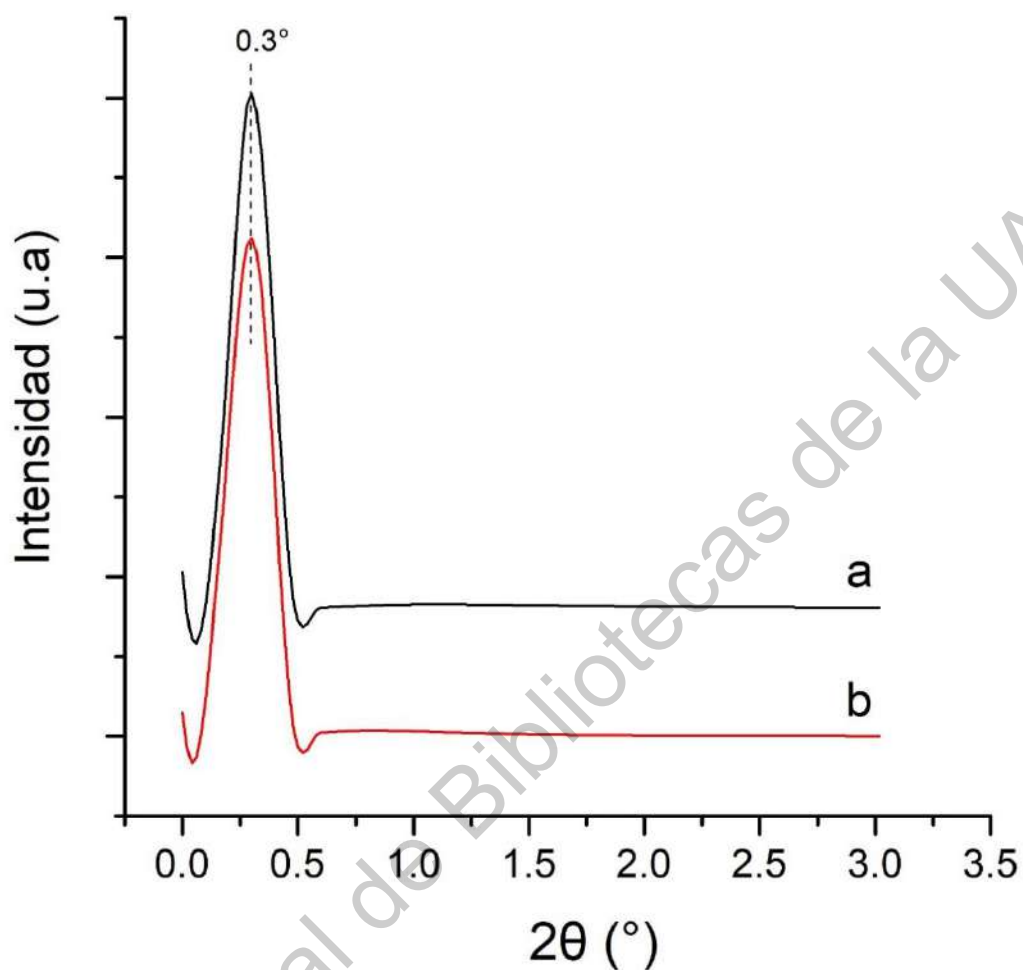


Figura 16. Patrones de difracción de rayos X a bajos ángulos de a) MCF y b) MCF-NH<sub>2</sub>.

La Figura 16 muestra los difractogramas obtenidos, con un pico único  $2\theta = 0.3^\circ$  para ambas muestras, esto debido a la presencia de mesoporos. Aunque no se distinguen planos cristalográficos de sílice MCF, la aparición de esta difracción en  $0.3^\circ$  es consistente con este tipo de una estructuras mesoporosas (Lee et al, 2001). El resultado anterior respalda la estructura característica de MCF de sílice y que la estructura mesocelular se mantiene aún después de la funcionalización.

### 7.1.2. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

La espectroscopia infrarroja detecta los modos vibracionales característicos de los grupos funcionales presentes en el material. Cuando se suministra energía luz infrarroja, los enlaces químicos vibran y se obtiene una señal en el rango de 400 a los 4000  $\text{cm}^{-1}$ , rango en el que aparecen señales específicas y en especial la de los grupos funcionales amino, que son la de nuestro especial interés. La Figura 17 muestra los espectros de MCF y MCF funcionalizada.

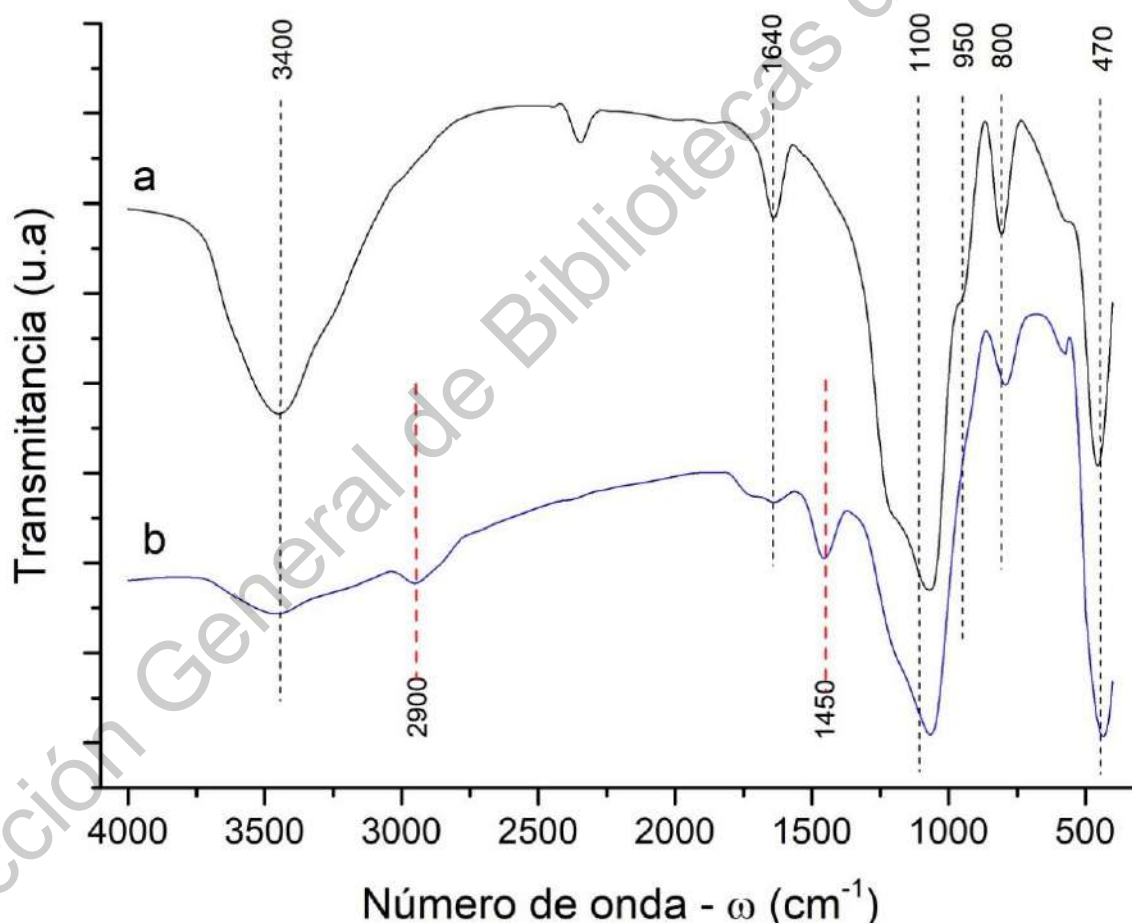


Figura 17. Espectros IR de a) sílice MCF y b) MCF-NH<sub>2</sub>.

En ambos espectros se puede observar las bandas características de los grupos -OH, silanoles Si-OH y siloxanos Si-O-Si. La presencia de bandas asociados con grupos Si-OH aparecen en el rango de  $3400\text{ cm}^{-1}$  y uno más débil en  $950\text{ cm}^{-1}$ . Mientras, las bandas asociadas a los grupos Si-O-Si se observan alrededor de  $1000\text{--}1250$ ,  $800$  y  $470\text{ cm}^{-1}$ , asociadas con la formación de la red de sílice. En el caso de las bandas que aparecen alrededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$  proviene principalmente de la vibración de flexión del  $\text{H}_2\text{O}$  adsorbida. En el caso del espectro señalado como (b), corresponde a la MCF funcionalizada con grupos aminos (MCF-NH<sub>2</sub>). Una banda ancha a  $2900\text{ cm}^{-1}$  y una banda débil a alrededor de  $1450\text{ cm}^{-1}$  se observan y se atribuyen a la vibración de -NH<sub>2</sub>, lo que indica la incorporación del grupo funcional al material.

Comparando ambos espectros se puede observar que las bandas correspondientes a  $3400$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a la vibración Si-OH y -OH del agua, se ve disminuida para el material funcionalizado. En MCF-NH<sub>2</sub>, la primera banda disminuye drásticamente, mientras la segunda casi desaparece. Este cambio en el espectro (b), se puede asociar a la interacción entre los grupos amino y los grupos silanoles a través de los enlaces de hidrógeno, como ya ha sido reportado previamente (Hernández et al., 2012; Wang et al., 2005).

De acuerdo a lo anterior, se confirma que el material MCF se logró funcionalizar con grupos amino, sin afectar el arreglo estructural de la espuma mesoporosa, de acuerdo a los resultados obtenidos por las técnicas de IR y XRD.

### **7.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Los análisis de termogravimetría permitieron determinar la variación de masa que experimentaron las muestras durante el calentamiento en atmosfera controlada.

Los resultados arrojan una pérdida de peso del 4% para MCF durante el calentamiento desde la temperatura ambiente hasta  $425\text{ }^\circ\text{C}$ , la muestra MCF-NH<sub>2</sub> exhibe pérdida de peso del 8% (Figura 18). Para ambas muestras, presentan una

pendiente pronunciada al aumentar la temperatura de 33 °C a 90 °C, lo que se atribuye a deshidratación del material.

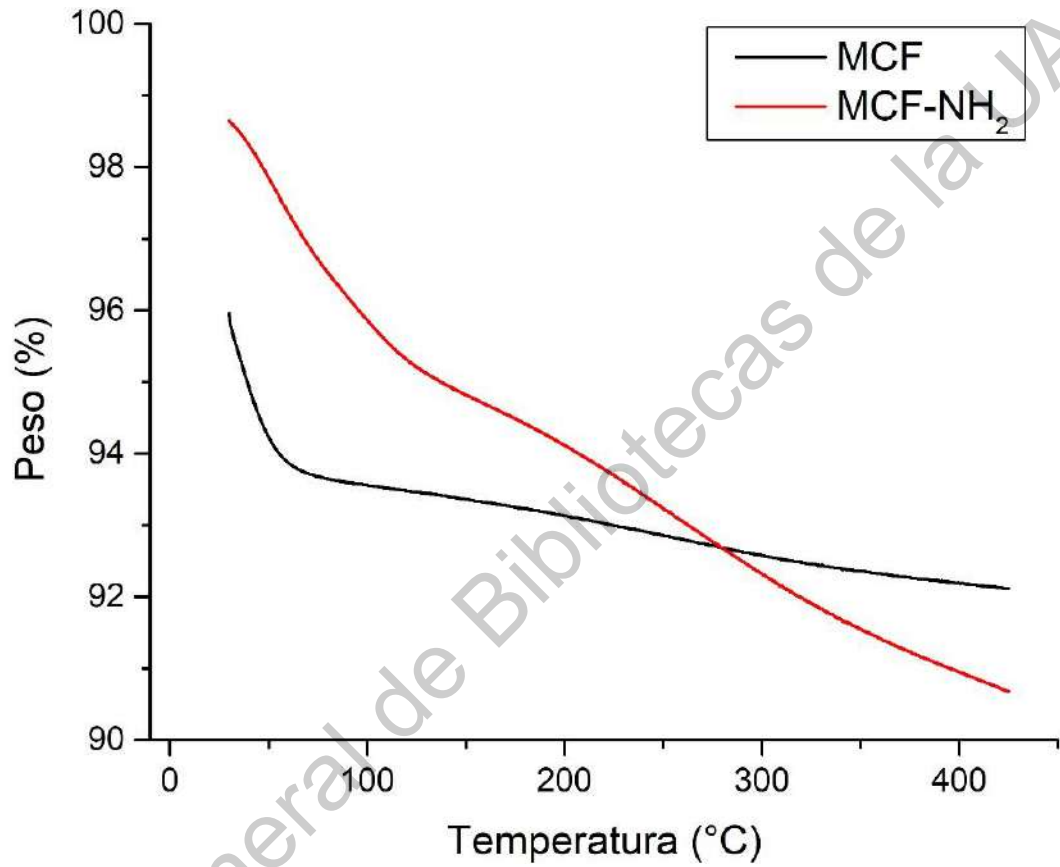


Figura 18. Curvas de peso de TGA para MCF y MCF-NH<sub>2</sub>.

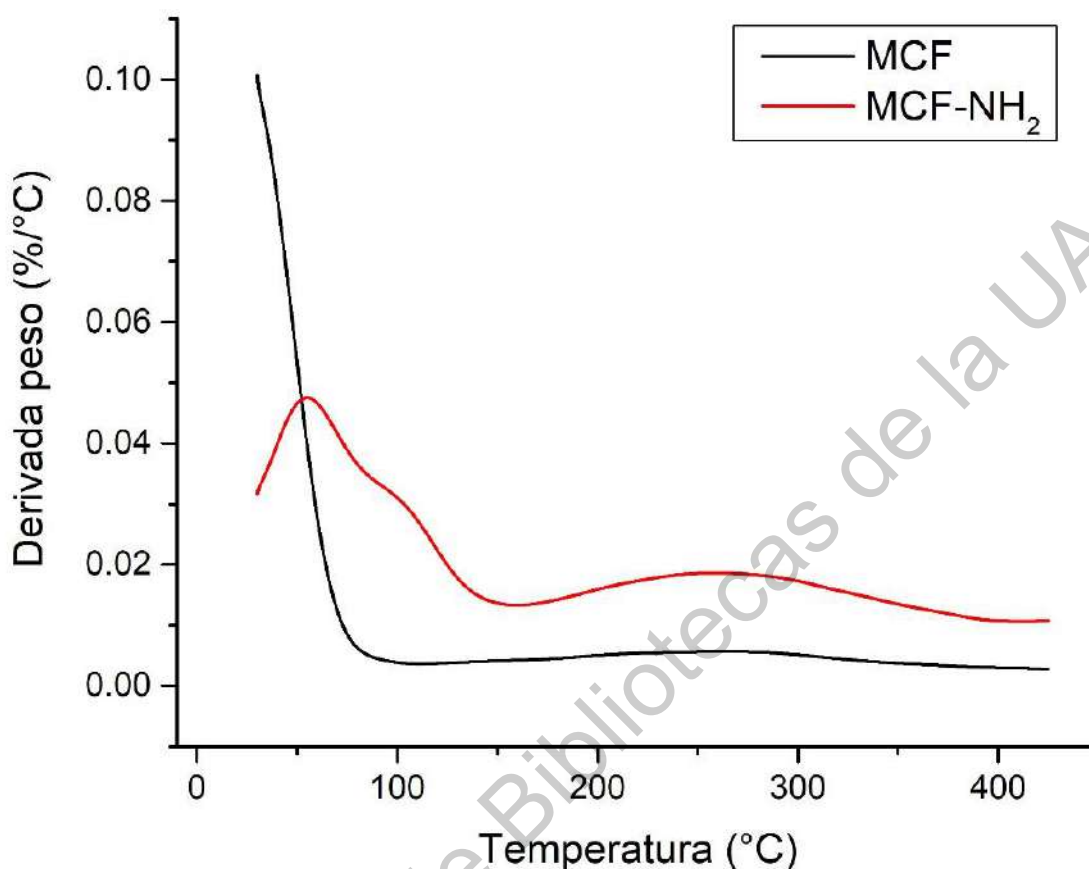


Figura 19. Curvas de derivada de peso de TGA para MCF y MCF-NH<sub>2</sub>.

El tratamiento térmico de la muestra funcionalizada hace que los grupos amino se descompongan, como lo demuestran los resultados obtenidos por esta técnica. El peso de la muestra sufre una disminución en el rango de 150-400 °C, ocurriendo una tasa máxima de pérdida de peso de alrededor de 260 °C (Figura 19). Esta pérdida de peso puede atribuirse a la descomposición de los grupos amino y etileno.

Por lo tanto, los resultados de TGA confirman la estabilidad térmica por arriba de los 180 °C para los grupos funcionales sobre la superficie, y una estabilidad aún mayor para la sílice; confirmando nuevamente la funcionalización de la MCF con los grupos amino.

#### 7.1.4. Isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> a 77 K

En la Figura 20 se presentan las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de la espuma de sílice mesocelular MCF pura y funcionalizada con grupos amino MCF-NH<sub>2</sub>. La MCF y la MCF funcionalizada MCF-NH<sub>2</sub> exhiben una isoterma de adsorción del tipo IV con una curva de histéresis H1 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC y que corresponde con los materiales mesoporosos (Sing et al., 1985).

Las isothermas muestran una región amplia en el rango de presiones relativas ( $0.45 < P/P_0 < 0.95$ ) que representa el llenado espontáneo de los mesoporos debido a la condensación capilar, indicando la presencia de mesoporos con una distribución relativamente amplia en diámetro y sin arreglo en los mismos. La curva de adsorción-desorción de nitrógeno de nuestro material es similar a la reportada en la literatura para un material de esponja de sílice mesoporoso derivado de una SBA-15 (Ma et al., 2015).

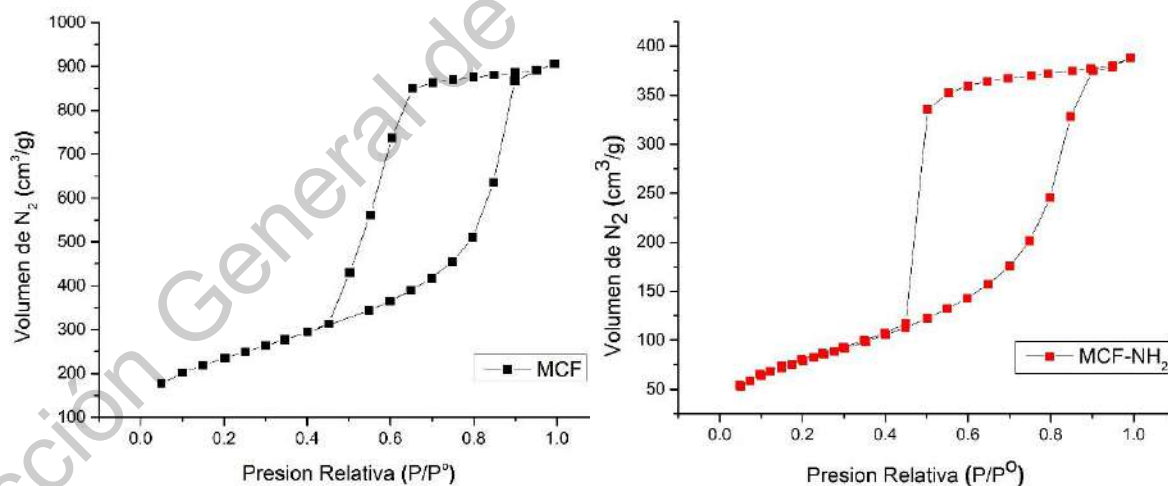


Figura 20. Isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> de las muestras MCF (izquierda) y MCF-NH<sub>2</sub> (derecha).

La Figura 21 presenta la distribución del tamaño de poro de la espuma de sílice mesocelular MCF pura y funcionalizada con grupos amino MCF-NH<sub>2</sub>. La distribución se calculó con los datos de la isoterma de desorción mediante el método B.J.H.

La espuma de sílice mesocelular de sílice MCF muestra una distribución relativamente amplia (de 40 a 70 nm) en el tamaño de poro centrado aproximadamente en 50 nm.

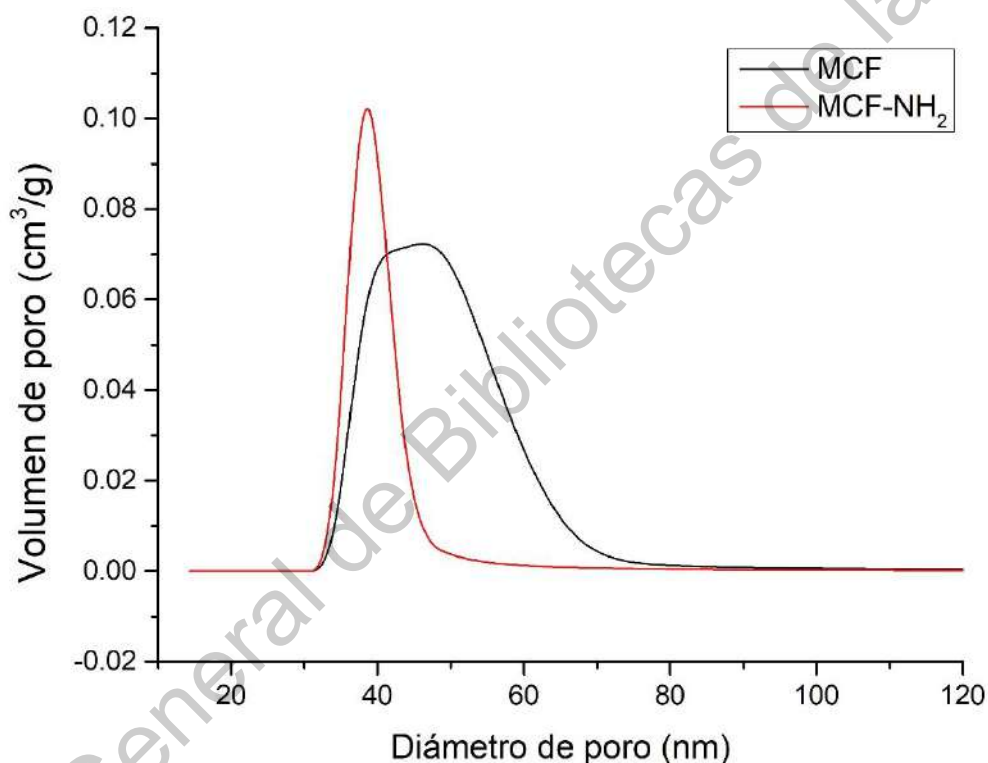


Figura 21. Distribución del diámetro de poro de los materiales MCF y MCF-NH<sub>2</sub>.

La espuma de sílice mesocelular funcionalizada con grupos amino MCF-NH<sub>2</sub>, presenta una distribución más uniforme en el diámetro de poro, centrado alrededor de 40 nm, en comparación a la MCF sin funcionalizar. Este resultado indica que los grupos amino se han incorporado (han decorado) de manera uniforme a la superficie interna de los poros de la MCF.



En la Tabla 2 se presenta un resumen de las propiedades texturales (área superficial, volumen promedio de poro y diámetro de poro) de la MCF y funcionalizada con grupos amino MCF-NH<sub>2</sub>.

En ella se observa que nuestro material MCF presenta una alta área superficial de 816.2 m<sup>2</sup>/g y un alto volumen de poro de 1.4 cm<sup>3</sup>/g.

La incorporación de los grupos funcionales amino en la superficie interna de los poros de la MCF provoca una importante disminución tanto en el área superficial como en el volumen de poro. Esta situación se puede atribuir a un posible decorado y bloqueo menor de poros por el precursor de los grupos aminos. Sin embargo, el grande diámetro de poro y la alta área superficial y volumen de poro de la MCF-NH<sub>2</sub>, le proporcionará al material una alta capacidad de adsorción.

Tabla 2. Propiedades texturales de MCF y MCF- NH<sub>2</sub>

Material	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)
MCF	816.20	1.40
MCF- NH <sub>2</sub>	472.6.0	0.73

#### 7.1.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías de TEM permitieron confirmar la estructura de la MCF sintetizada. En la muestra de MCF se encontraron espumas irregulares con variaciones en densidad a lo largo de toda la partícula y con presencia de poros (Figura 22a). Los poros se presentan desordenados e interconectados, con tamaño del orden de los mesoporos, entre 10 a 30 nm.

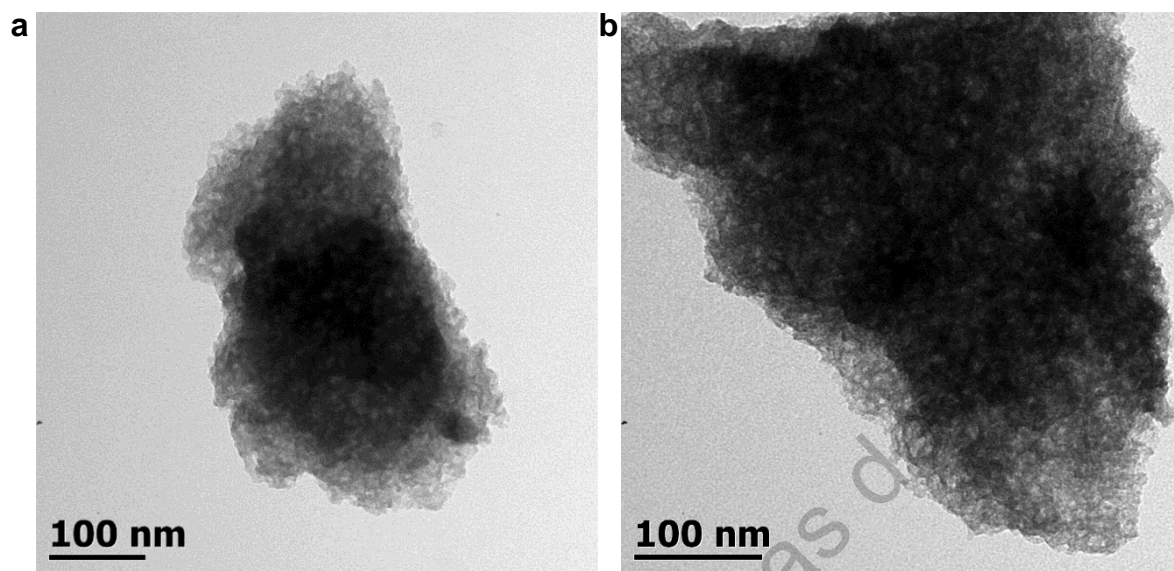


Figura 22. Imágenes de TEM de MFC de sílice.

Una vez incorporados los grupos amino en la superficie de la MCF, las partículas siguen mostrando una morfología similar. Las micrografías de las partículas de MCF-NH<sub>2</sub> (Figura 23) muestran partículas irregulares con mayor densidad en su centro y presencia de mesoporos no uniformes.

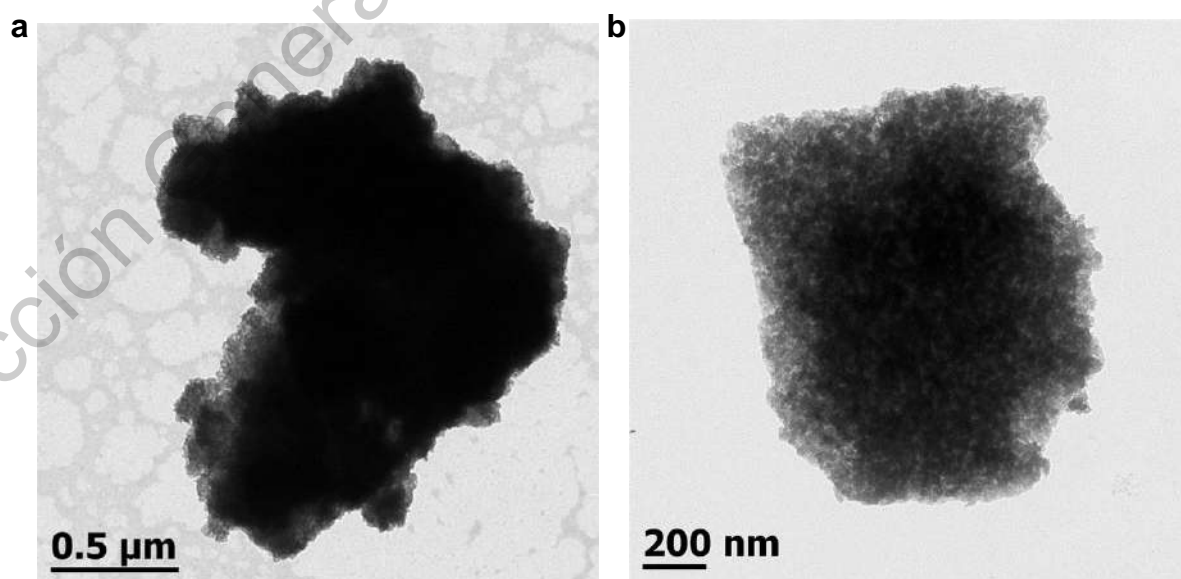


Figura 23. Imágenes de TEM de MFC-NH<sub>2</sub> de sílice.

Estos resultados hacen suponer que los grupos amino no tienen un cambio considerable en la morfología de la MCF, aún se conservan una estructura porosa tridimensional no arreglada, antes y después de la funcionalización.

#### **7.1.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Se continuó con los análisis morfológicos, ahora por SEM para la muestra MCF-NH<sub>2</sub>. En la Figura 24a y 24b podemos observar partículas irregulares de decenas de micras, formadas por microestructuras más pequeñas ensambladas entre sí.

De acuerdo a los resultados observados por TEM y SEM, las partículas obtenidas de la MCF y MCF-NH<sub>2</sub> son de talla micrométrica, los tamaños de las partículas, en su mayoría van desde 10 a 30  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se sabe que no todo el material se encuentra aglomerado y que también hay algunas partículas no agregadas, como se observó en TEM (Figura 23), aunque parecen ser una cantidad menor (Figura 24a).

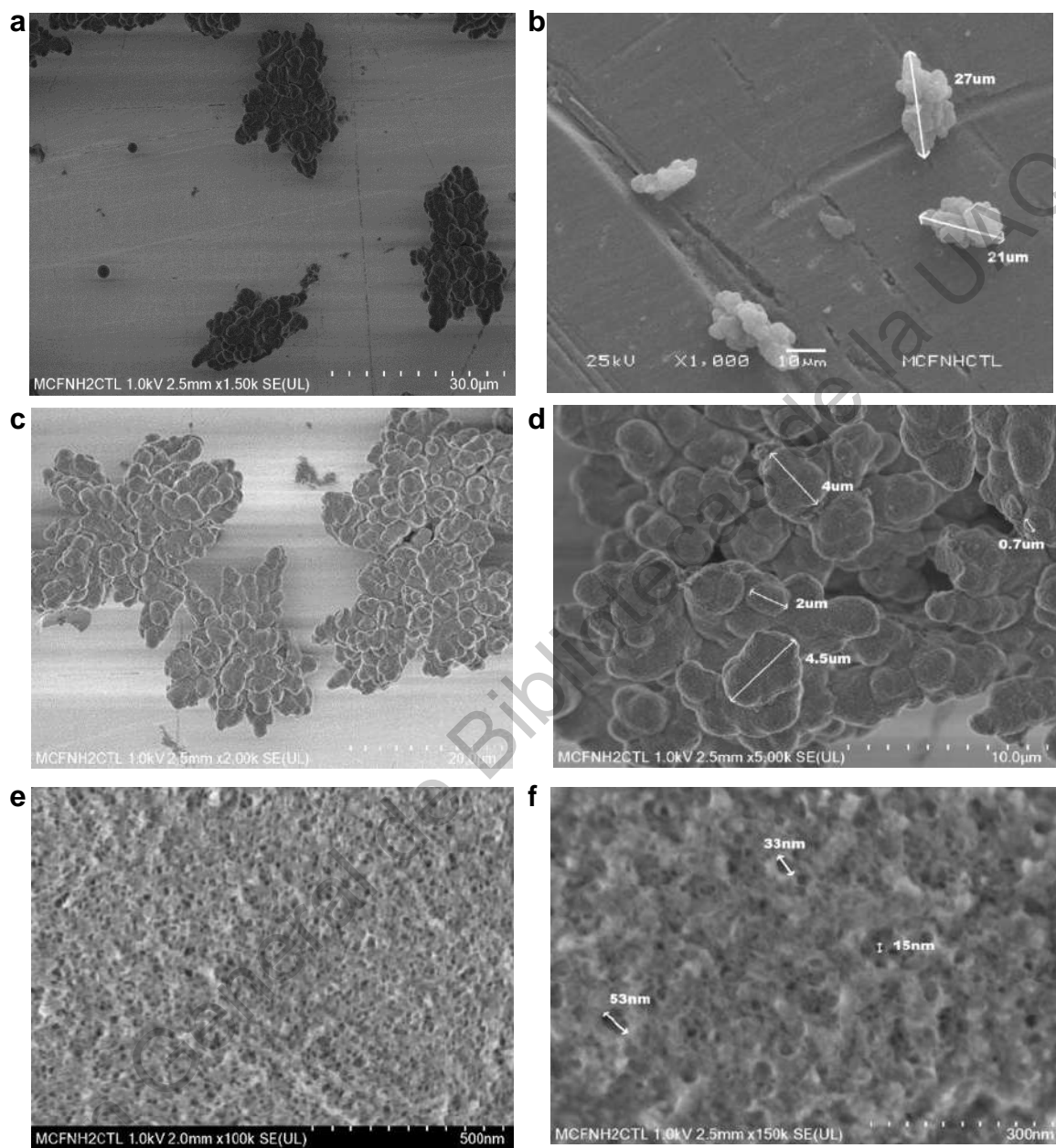


Figura 24. Imágenes de SEM de MCF-NH<sub>2</sub> en distintas escalas.

Las imágenes de SEM también muestran la presencia de mesoporos tridimensionales (Figura 24e) interconectados y de borde definido. En la Figura 24f se observan las estructuras de celdas y ventanas asociadas a la MCF (Figura 1).

Hay presencia de celdas con un tamaño de hasta 50 nm, formadas por ventanas de 15 nm aproximadamente.

De acuerdo a las micrografías, se puede suponer que el material no es compacto y que podría ser fácil su fractura, lo que llevó a explorar la técnica de ondas de choque para fragmentar la espuma mesocelular de sílice funcionalizada con grupos amino (MCF-NH<sub>2</sub>) y generar partículas de sílice de talla compatible para el uso en biomedicina.

## **7.2. Aplicación de ondas de choque (SW)**

### **7.2.1. Caracterización de MCF-SW expuestas a ondas de choque en el generador Piezoson 100 Plus**

Las partículas tratadas con ondas de choque, principalmente se caracterizaron con DLS. Esta técnica permitió obtener las tallas promedio de un conjunto de partículas, por lo que fue determinante para ver si el tamaño de partícula promedio se iba reduciendo conforme el aumento en el número de ondas de choque. En el equipo Piezoson 100 Plus se trabajó con la muestra de MCF sin funcionalizar. Se aplicaron 500, 1000 y 2000 ondas monopulso (MP) a cada muestra. Estos resultados fueron los que determinaron los ajustes necesarios para los experimentos restantes y los respectivos análisis complementarios.

### 7.2.1.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

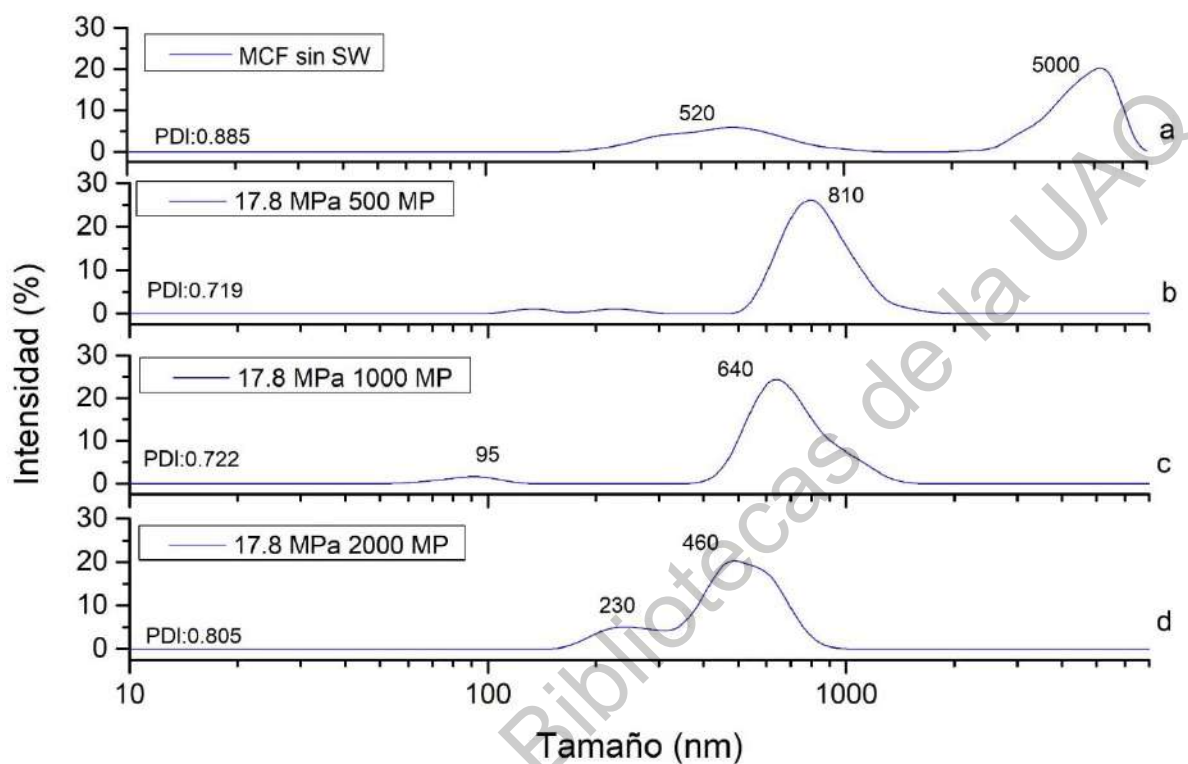


Figura 25. DLS de MCF tratada con SW en el generador Piezoson 100 Plus. MP: monopolso. PDI: índice de polidispersidad.

Con la técnica DLS se obtuvo un rango medible entre 0.01 y 6  $\mu\text{m}$  para todas las partículas. Primero se midió el radio hidrodinámico promedio para la muestra sin tratamiento con ondas de choque, que se utilizó como referencia (Figura 25a). El diámetro promedio de MCF sin SW, muestra dos poblaciones, una de mayor intensidad en 5  $\mu\text{m}$  y una menor en 0.5  $\mu\text{m}$ . Lo que sugiere que hay, en menor cantidad, partículas por debajo a una micra como se observaron en imágenes de TEM (Figura 22).

En la Figura 25b se observa el resultado del primer experimento aplicando SW, utilizando el generador Piezoson. Aparece una población promedio de 810 nm con una intensidad de 25% medible. Como se observa en la Figura 25c y 25d, el tamaño

se va reduciendo al incrementar el número de SW monopolso. Para el caso de 1000 ondas MP se obtuvo una población promedio de 640 nm, mientras que para 2000 ondas MP se observan poblaciones por debajo de 500 nm para más del 10%. Estos experimentos indican que el tratamiento con 2000 ondas de choque MP es el que mejor fragmentó a las partículas con este generador. El índice de polidispersidad resultó estar por arriba de 0.7 en todos los tratamientos, valor que revela un alto nivel de agregación y variación de tamaño de las partículas.

### **7.2.2. Caracterización de MCF-NH<sub>2</sub>-SW expuestas a ondas de choque en el Generador Multifuncional**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el generador Piezoson 100 Plus, se utilizó un generador que podía alcanzar mayores presiones y experimentar con el modo tándem. Los experimentos se realizaron a P<sup>+</sup> de 19.52, 43.61 y 72.68 MPa, este último en modalidad monopolso y tándem. La muestra tratada para estos experimentos fue MCF-NH<sub>2</sub>.

### 7.2.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

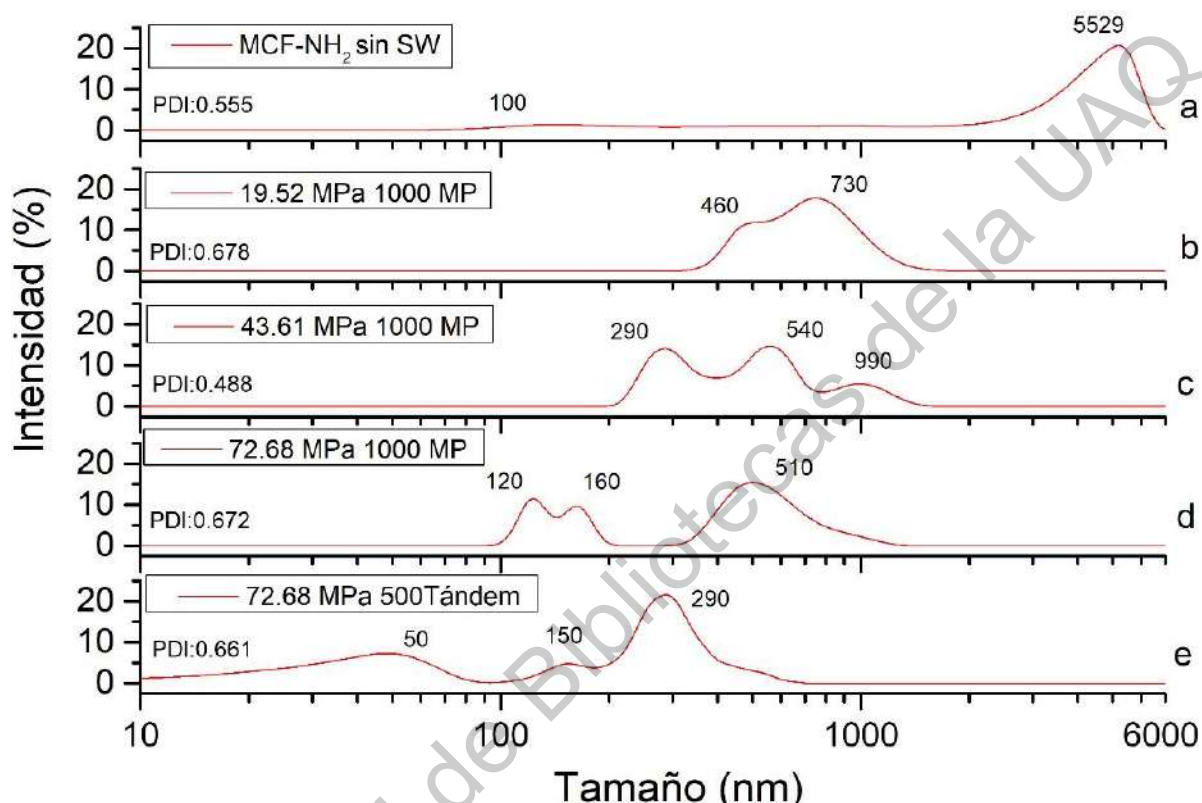


Figura 26. DLS de MCF-NH<sub>2</sub> tratada con SW en el generador Multifuncional.

Los diámetros hidrodinámicos de MCF-NH<sub>2</sub> para la muestra control pueden observarse en la Figura 26a. El estudio arroja un resultado muy similar a MCF sin grupos amino (Figura 25a). Con dos poblaciones, la primera que va de los 100 nm a 1  $\mu$ m que alcanza una intensidad máxima de 5%, y una segunda población de 20% de intensidad alrededor de 5  $\mu$ m.

Conforme se aumenta la P<sup>+</sup>, de 19.52 a 72.68 MPa, se presentaban poblaciones de menor tamaño, con una distribución muy amplia. Las gráficas a 19.5 y 43.6 MPa (Figura 26d y 26c) muestran poblaciones aun por arriba de los 500 nm. Mientras que para las gráficas a 72.68 MPa, en su modalidad de monopolso y tándem, son



casi nulas las partículas a una talla mayor a 500 nm. Si se aumenta el número de ondas de choque, se reduce el tamaño de las partículas, aunque no de manera uniforme en talla. En la modalidad tándem hubo un 10% de partículas de 50 nm, talla que no se había visto en los experimentos anteriores, revelando ser el tratamiento más eficiente para fragmentar las partículas de sílice.

Los PDI están por arriba de 0.3 para todos los casos, lo que indica una gran variedad de tamaños en la muestra.

### **7.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

En la Figura 27a se muestra la micrografía de una partícula expuesta a ondas de choque con una  $P^+$  de 19.5 MPa. Puede observarse que mantiene la estructura de MCF, con un tamaño de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ . Se logran ver orificios de 100 a 200 nm que son ajenos a una porosidad normal de MCF y que pueden ser el resultado de la acción de microjets formados por la cavitación dentro de la suspensión.

En la micrografía de la Figura 27b pueden observarse diferentes partículas. La primera y tercera, de izquierda a derecha, podrían ser el resultado del desprendimiento de una partícula mayor. La tercera partícula tiene dos rostros, uno liso (izquierda) y una zona rugosa (derecha). La zona rugosa podría ser el costado por el cual estaba unida a otra partícula. La partícula de en medio, presenta varias depresiones, de hasta 300 nm de ancho, de un posible efecto de los microjets, no vistas en el control (Figura 24). Estas partículas son casi esféricas y con respecto a su tamaño están por arriba de una micra. Esta forma esférica no apareció en las micrografías control.

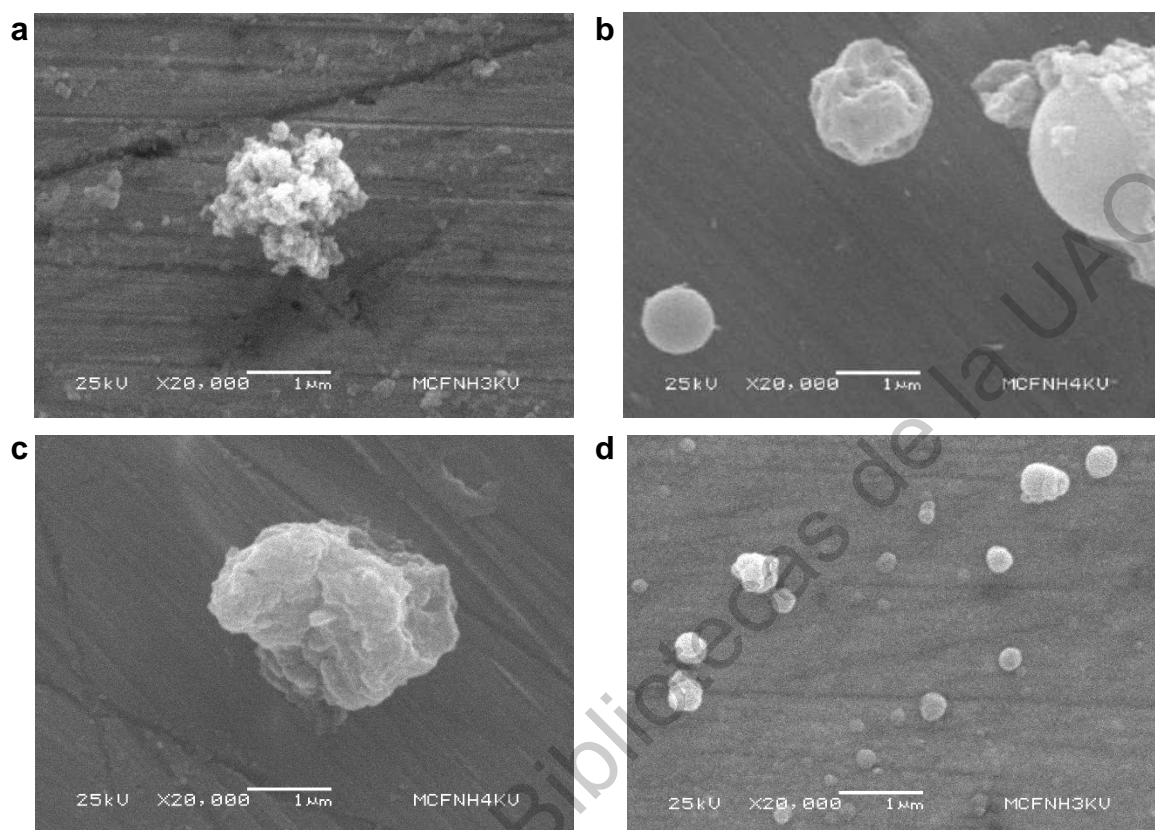


Figura 27. Imágenes de SEM de MCF-NH<sub>2</sub>-SW tratadas por ondas de choque.

La partícula que se muestra en la Figura 27c fue expuesta a ondas de choque con una  $P^+$  de 43.61 MPa. Presenta depresiones en su cara derecha y superior, con algunos orificios de 300 nm, dados posiblemente por una erosión de material de esa zona. Este material erosionado podría ser el mostrado en la Figura 27d. Estas partículas tienen formas casi esféricas con diámetros menores a 500 nm.

### 7.3. Caracterización de MCFTSW

Se recuperaron las partículas menores a 0.8  $\mu\text{m}$  mediante un tamiz con ese tamaño de poro con la finalidad de tener tamaños de partícula más homogéneos para su análisis. La muestra utilizada fue la de experimentos a 72.6 MPa de la muestra MCF-NH<sub>2</sub>, tanto en modo monopolso como tándem.

### 7.3.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los experimentos con una  $P^+$  igual a 72.68 MPa fueron los más prometedoras, por el tamaño de partícula medible de acuerdo al análisis en DLS (Figura 26). Es por ello que se continuó con el proceso de tamizaje para  $P^+$  igual a 72.68 MPa en modo monopolso y tándem, para obtener más información.

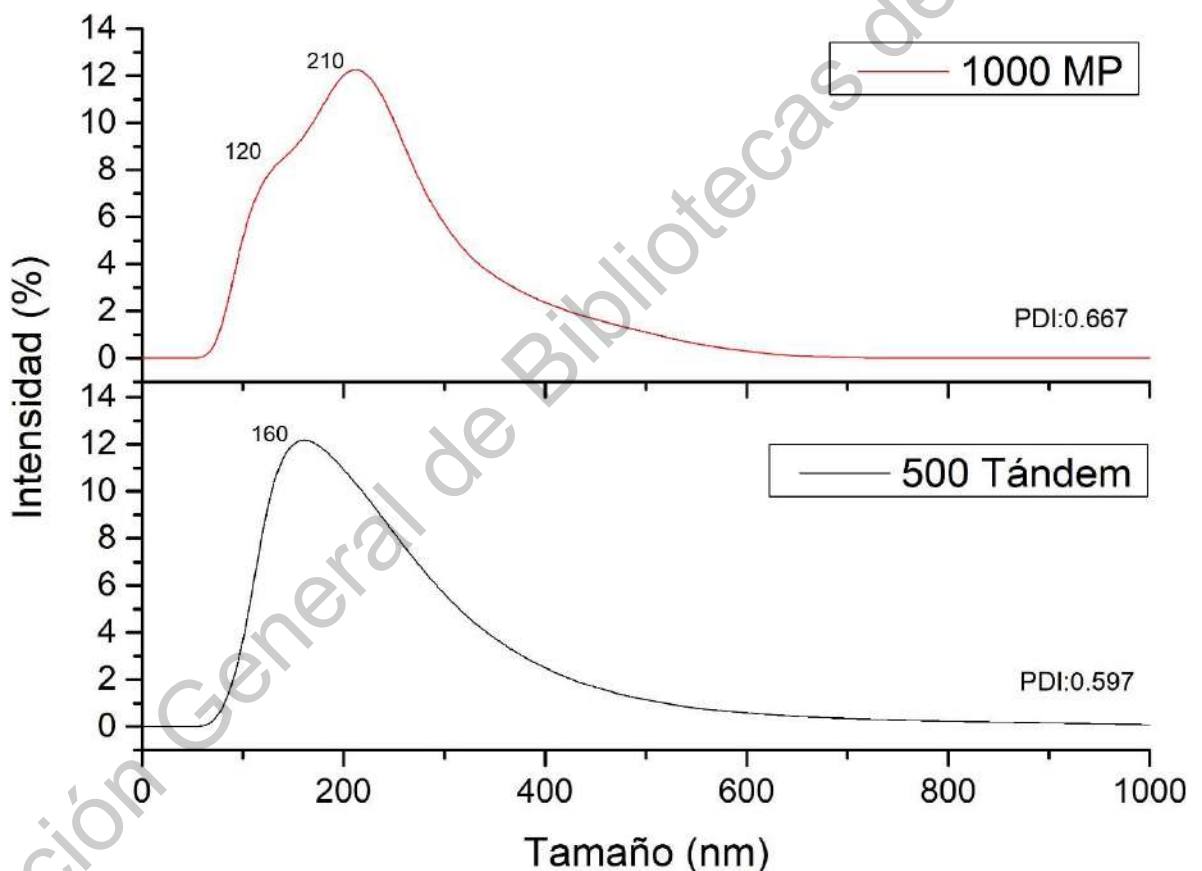


Figura 28. DLS de MCF-NH<sub>2</sub> tratada con SW y tamizada por filtro de 0.8  $\mu\text{m}$ .

Para verificar el tamaño de partícula resultante del tamizaje, se realizaron análisis de DLS a MCF-NH<sub>2</sub>-SW tamizada utilizando filtros de 0.8  $\mu\text{m}$  a los dos experimentos

que dieron partículas menores a 200 nm, esto es, 1000 ondas monopulso y 500 ondas tándem con una  $P^+$  de 72.68 MPa (Figura 26). La Figura 28 muestra el diámetro hidrodinámico correspondiente a 1000 SW monopulso y 500 SW tándem, respectivamente. Puede observarse que el tamizaje funcionó al no haber presencia de partículas superiores a 800 nm. Ambos diámetros fueron muy similares, sin embargo, la muestra expuesta a 500 ondas tándem mostró una distribución más homogénea, presentando las mejores características en talla para ser utilizadas en biomedicina. Por ello se decidió caracterizar a estas partículas por SEM y TEM. Denominamos como MCFTSW a la muestra expuesta a 500 SW tándem a  $P^+$  de 72.68 MPa y tamizada.

### 7.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

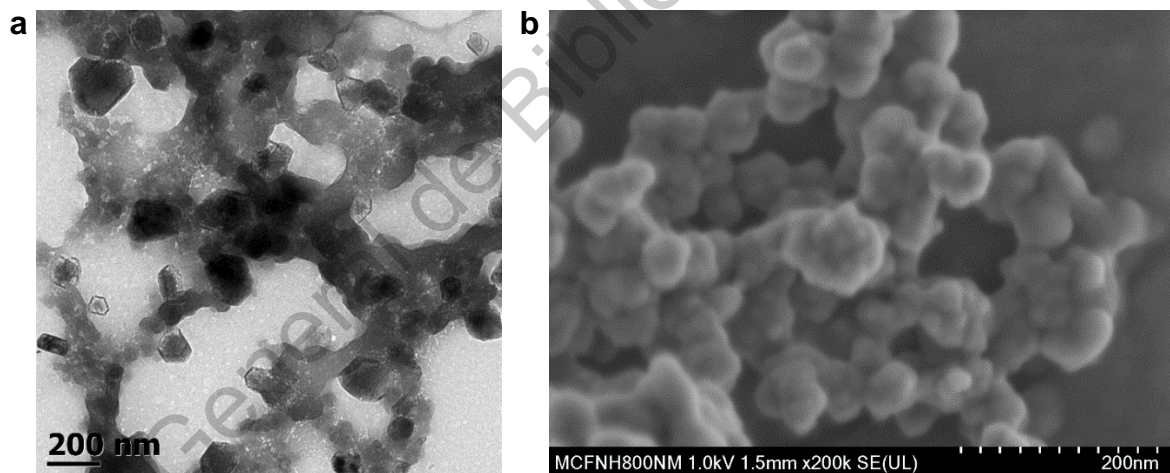


Figura 29. Imágenes de SEM de MCFTSW agregadas a) TEM b) SEM.

En la Figura 29 pueden observarse las micrografías tomadas por TEM y SEM de las partículas MCFTSW; en ellas se observa una agregación significativa de las partículas. El protocolo de preparación de muestras para micrografía no mantuvo a las partículas estables. El hecho de que se formaran aglomerados está relacionado con interacción, probablemente de carácter electrostático, entre estas partículas,

generando agregados en forma de malla. Por lo anterior se realizaron cambios en la preparación de las muestras (ver metodología 6.7.2), para analizar las partículas individualmente.

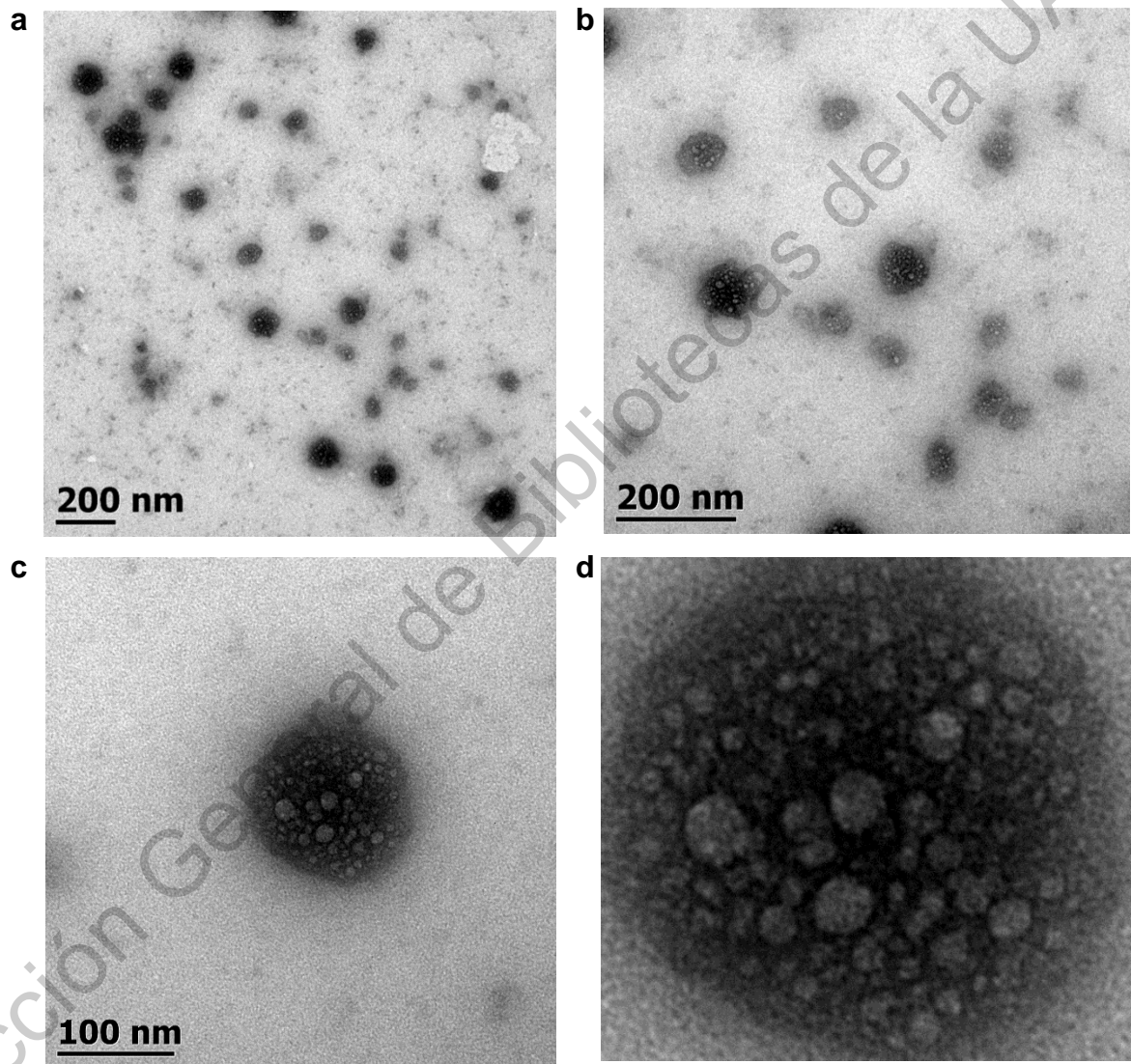


Figura 30. Imágenes SEM de MCFTSW.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.7.2, se tomaron nuevamente las micrografías por SEM de las partículas MCFTSW y mostradas en la Figura 30.

Analizando las micrografías, se observan partículas esféricas en su mayoría, sin presencia de aglomerados, con un diámetro de 30 a 200 nm. La partícula presentada en la Figura 30c tiene un diámetro de 150 nm, con presencia de mesoporos en el rango de 5 a 20 nm. Es una partícula con densidad volumétrica. El tamaño corresponde a los resultados obtenidos con DLS (Figura 28).

Las MCFTSW son partículas singulares que no se habían presentado en las micrografías de control, lo que lleva a la idea de que puede ser el resultado de erosión de partículas de mayor tamaño, por efecto de la cavitación. Es importante haber conservado el arreglo poroso para aumentar el área superficial. Las partículas MCFTSW cumplen con el tamaño de partícula y poro aceptable, para su internalización celular y para la carga de principios activos en su superficie. Partículas menores a 50 nm serían partículas con casi nula porosidad por el tamaño de poro que tienen las MCFTSW.

### **7.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se procedió a caracterizar la composición química de las partículas MCFTSW, provenientes de la muestra MCF-NH<sub>2</sub>. Lo anterior para comprobar si hubo variaciones en la composición del material, pero más importante, si los grupos amino superficiales siguen presentes en las partículas después de los tratamientos.

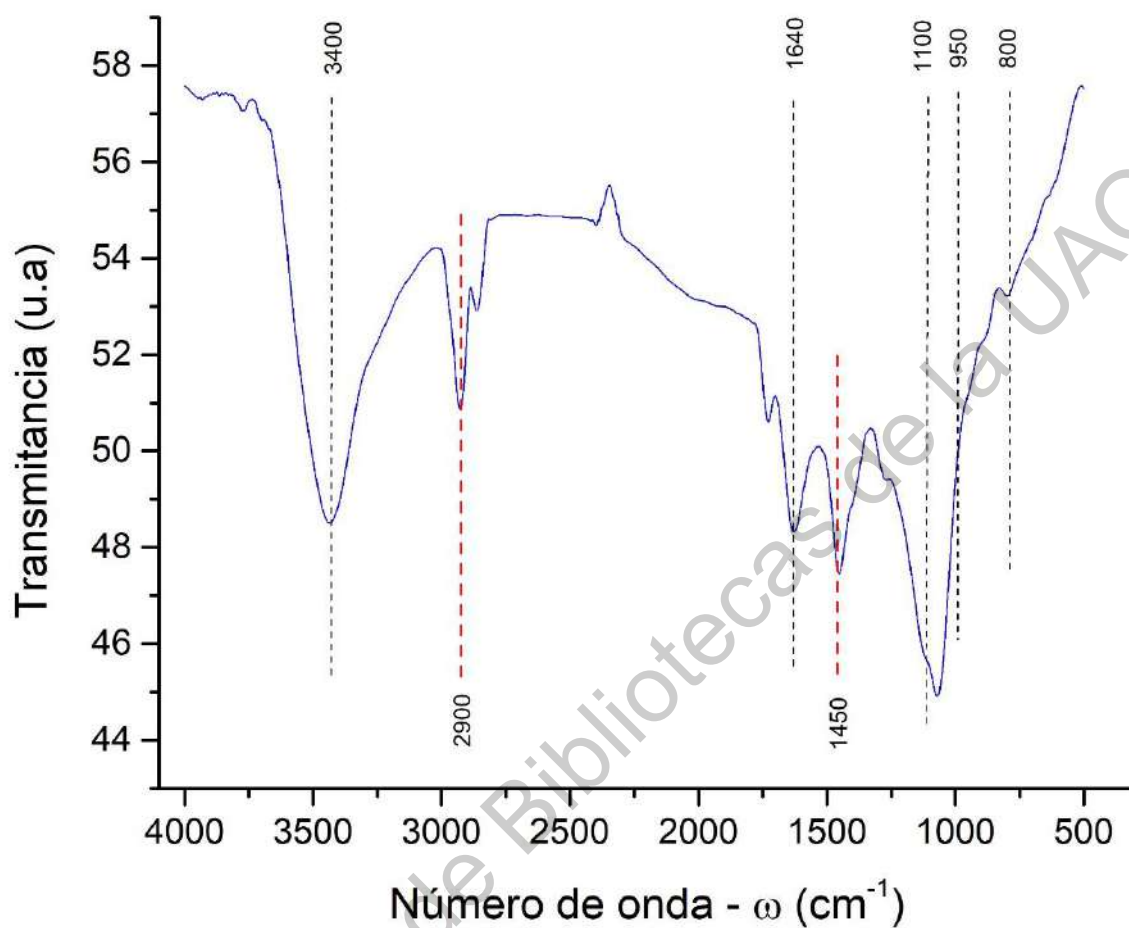


Figura 31. Espectros IR de MCFTSW.

El resultado de IR, demuestra que los grupos Si-OH ( $3400$  y  $950\text{ cm}^{-1}$ ) y Si-O-Si ( $800$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ) continúan presentes (Figura 31). Asimismo, las bandas en  $2900$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$  que representan las vibraciones de los grupos amino, por lo cual aún se encuentran presentes en las partículas MCFTSW.



### 7.3.4. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

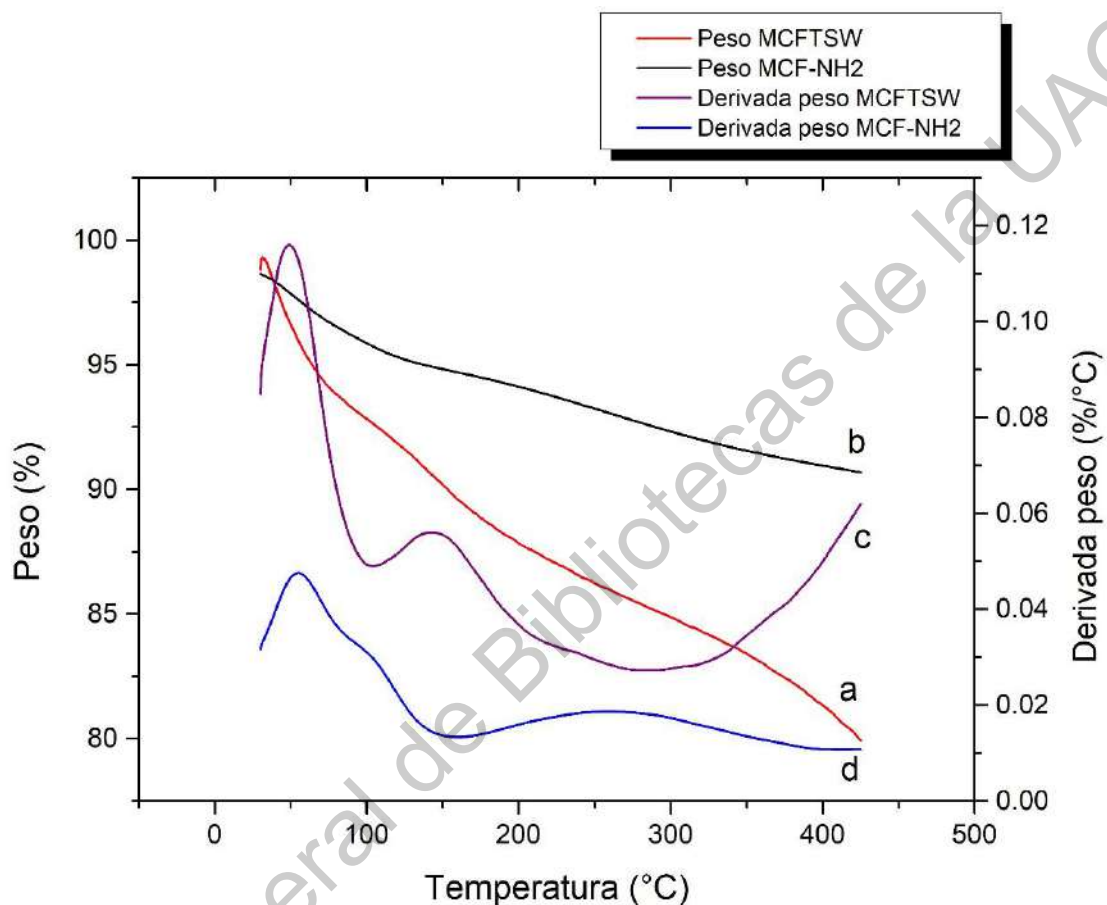


Figura 32. Curvas de TGA de MCF-NH<sub>2</sub> antes y después del tratamiento con SW y tamizaje.

En la Figura 32 puede observarse que la muestra MCFTSW tuvo una pérdida de peso mayor (20%) al alcanzar una temperatura de 400 °C (curva a) en comparación con la muestra MCF-NH<sub>2</sub> (curva b). El primer pico a 60 °C de la curva d representa la pérdida de agua; y la abducción entre 200 y 350 °C es la descomposición de grupos amino. La curva c, derivada de peso de las partículas MCFTSW, tiene una forma muy semejante a la curva de la muestra control (curva d), sin embargo, con



un desplazamiento de los puntos de inflexión a una temperatura menor. Lo anterior puede explicarse ya que al ser partículas de menor tamaño que las partículas de MCF, el calor distribuye la temperatura de manera uniforme, por lo que se necesita de menor temperatura para comenzar con la descomposición de los grupos amino (punto de inflexión a 150°C, curva c).

#### **7.3.5. Potencial zeta**

El potencial zeta describe la intensidad de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas, siendo un parámetro relacionado con su estabilidad. El potencial zeta depende de la concentración de iones en el medio de suspensión. Es por ello que, para las muestras de MCF y MCF-NH<sub>2</sub>, se midió el potencial zeta en dos medios: agua y medio PBS; este último por ser el medio de contacto con líneas celulares en pruebas in vitro. La muestra MCFTSW también fue suspendida en PBS para su medición.

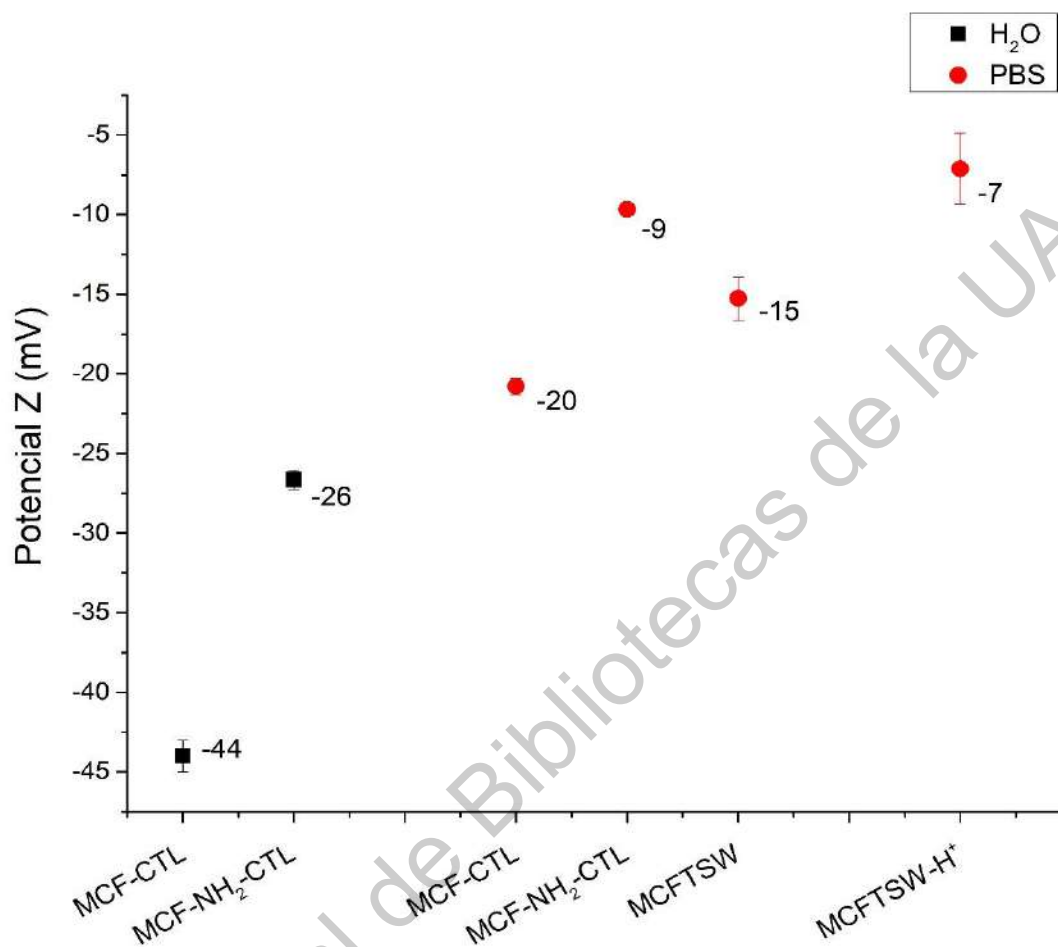


Figura 33. Valores de potencial zeta con diferentes tratamientos.

En la Figura 33, podemos observar los valores de potencial zeta para cada muestra. Las partículas de MCF dieron un valor de -44, y una vez funcionalizadas aumentaron su valor a -26. Se esperaba un valor positivo debido al catión de los grupos amino. Esto sugiere que no hay un acoplamiento amínico en toda la superficie, y todavía hay presencia de grupos silanoles. Para medio PBS, los valores bajaron a -20 para MCF y a -9 para la muestra MCF-NH<sub>2</sub>. A valores que se acercan a una partícula neutra pero inestable, un alto potencial zeta les confiere estabilidad, mientras que cuando un potencial es bajo, se reduce la repulsión de carga favoreciendo su agregación, como sucedió con las partículas MCFTSW aglomeradas (Figura 29). Las partículas

MCFTSW tienen un potencial zeta de -15. Comparando las muestras MCF-NH<sub>2</sub> y las muestras MCFTSW, tratadas por ondas de choque y tamizadas, las MCFTSW mostraron una disminución de 6 unidades, con respecto a MCF-NH<sub>2</sub>, lo que sugiere el aumento de partículas sin grupos amino o de partículas con zonas superficiales en donde no hay presencia de grupos amino. Estas zonas se pueden tratar de áreas por donde se encontraba unida a otra partícula antes del tratamiento con ondas de choque. Por los resultados anteriores, a las partículas MCFTSW se les realizó un proceso de protonación (ver metodología 6.6). La protonación de las MCFTSW (MCFTSW-H<sup>+</sup>) concedió una carga de -7, 8 unidades menos que su antecesora MCFTSW. Este valor de potencial zeta es bajo, por tanto, no intervendría desfavorablemente en la interacción de las nanopartículas con la membrana celular de carga negativa, sin embargo, se prevé una agregación de partículas si se encuentran en un medio en reposo.

## 8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron correctamente las partículas MCF, con la forma, composición y sistema de poros tridimensionales característicos de las espumas, con cavidades aleatorias de tamaño nanométrico. La incorporación de los grupos amino en las partículas MCF mostraron una disminución del tamaño de las cavidades reduciendo en un 48%. La funcionalización de las partículas MCF con grupos amino no dio un valor de potencial zeta positivo, y aunque se encontró una disminución del área superficial al estar funcionalizada con grupos amino, los resultados mostraron que la partícula MCF-NH<sub>2</sub> aún conserva un volumen de poro y área superficial con alta capacidad de adsorción.

Se presentan nuevas formas de partículas de sílice después del tratamiento de ondas de choque a la muestra MCF-NH<sub>2</sub>, denominadas MCFTSW, por lo que las ondas de choque sí pueden fragmentar las partículas MCF, producto de una erosión del material. Estas partículas tienen características físicas tales como forma esférica, tamaño de partícula menor a 200 nm y cavidades entre 5 a 20 nm. Las partículas MCFTSW aún conservan grupos amino de su antecesora, MCF-NH<sub>2</sub>, y cargas cercanas a 0. La conminución de las MCF de sílice por SW depende de la presión, número de ondas y técnicas utilizadas en el tratamiento.

En el presente trabajo, el modo tándem presentó las mejores condiciones de fragmentación. La técnica tándem arrojó fragmentos de tamaño muy similar al modo monopulso con la misma presión máxima, 72.68 MPa, pero con la mitad de tiempo requerido para el experimento. Es decir 500 ondas tándem dan resultados similares de fragmentación como 1000 ondas monopulso, requiriendo un tiempo de 17 min por tratamiento tándem. A reserva de hacer más ensayos, el sistema tándem fue más eficiente para erosionar las partículas MCF.

Las partículas MCFTSW poseen características muy prometedoras, ya que conservan las características estructurales originales de la partícula MCF y MCF-NH<sub>2</sub>, pero con una menor talla. Las partículas tienen un diámetro de

aproximadamente 150 nm que, de acuerdo a las revisiones bibliográficas, es adecuado para atravesar la membrana celular por la vía de endocitosis mediada por clatrina y una naturaleza química que no alteraría negativamente el proceso, sin embargo, habría que realizar nuevos ensayos para mejorar su estabilidad coloidal, y así, su potencial uso como nanoacarreador.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

## 9. TRABAJO A FUTURO

La estrategia a seguir como continuación de la investigación para la interacción con células es la siguiente: Se usarán fluorocromos para marcar las zonas de interés, tanto en la célula, como en las partículas que interaccionarán. En resumen, las partículas resultantes del tratamiento con ondas de choque, MCFTSW, serán marcadas con el fluorocromo FITC a través de los grupos amino, para después colocarlas en contacto con células HEK-293 (Figura 34). Los cultivos se mantendrán por 24, 48 y 72 h, al término de las cuales serán lavadas con PBS y fijadas con 4% de paraformaldehído, para ser marcadas con faloidina-TRITC, que interacciona con la actina del citoesqueleto, y DAPI para el ADN presente en el núcleo. Posteriormente serán observadas por microscopía confocal de fluorescencia. Con esta técnica confirmaría si las partículas MCFTSW se internalizan en las células.

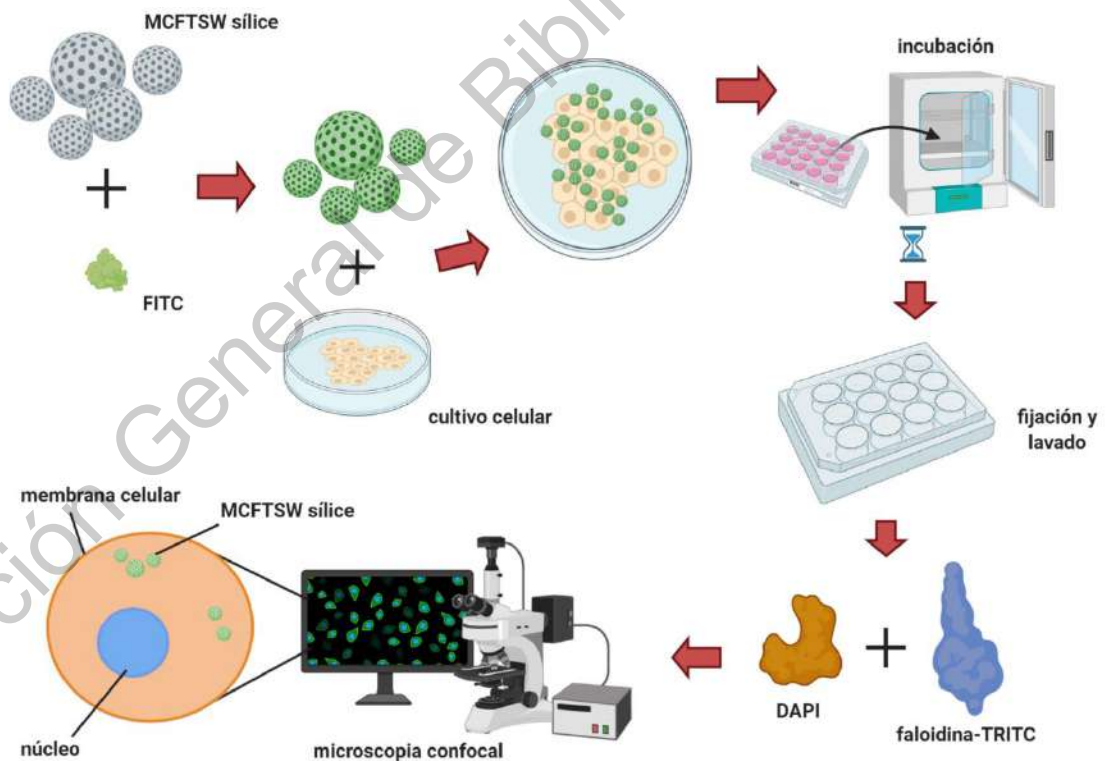


Figura 34. Esquema de experimentos a seguir para la interacción de las MCFTSW con células.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 10. REFERENCIAS

- Akhtar, K., AliKhan, S., Bhadar, S., & Asiri, A. (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. In S. K. Sharma (Ed.), *Handbook of Materials Characterization* (pp. 113–144). Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2>
- Armenta, E., Varela, A., Martínez, G., & Loske, A. M. (2006). Transfección de células por medio de ondas de choque. *Revista Mexicana de Física*, 52(4), 352–358.
- Asefa, T., & Tao, Z. (2012). Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 25(11), 2265–2284. <https://doi.org/10.1021/tx300166u>
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., ... Schlenker, J. L. (1992). A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834–10843. <https://doi.org/10.1021/ja00053a020>
- Blechinger, J., Bauer, A. T., Torrano, A. A., Gorzelanny, C., Bräuchle, C., & Schneider, S. W. (2013). Uptake kinetics and nanotoxicity of silica nanoparticles are cell type dependent. *Small*, 9(23), 3970–3980. <https://doi.org/10.1002/sml.201301004>
- Bracho, D. G. (2013). *Estudio del Efecto del Tamaño y Funcionalidad Superficial de Nanopartículas de SiO<sub>2</sub> sobre las Propiedades de Nanocompuestos de Polipropileno*.
- Brujan, E. A. (2008). Shock wave emission from laser-induced cavitation bubbles in polymer solutions. *Ultrasonics*, 48(5), 423–426. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2008.02.001>
- Calleja, G., Grieken, R. Van, & Melero, J. A. (2003). Síntesis y aplicación de materiales mesoestructurados. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, 31–43.
- Canseco, G., De Icaza-Herrera, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2011). Modified shock waves for extracorporeal shock wave lithotripsy: A simulation based on the Gilmore formulation. *Ultrasonics*, 51(7), 803–810. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2011.03.008>
- Carrasco, G., López-Marín, L. M., Fernández, F., Salas, P., Loske, A. M., & Millán-Chiu, B. E. (2016). Biomimetic coat enables the use of sonoporation to assist delivery of silica nanoparticle-cargoes into human cells. *Biointerphases*, 11(4). <https://doi.org/10.1116/1.4965704>



- Cestari, A. R., Vieira, E. F. S., & Silva, E. S. (2006). Interactions of anionic dyes with silica-aminopropyl: 1. A quantitative multivariate analysis of equilibrium adsorption and adsorption Gibbs free energies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 297(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.10.003>
- Chang, R. (2010). *Química*. China: McGrawHill.
- Choi, Y., Lee, J., & Kim, J. (2015). Salt-assisted synthesis of mesostructured cellular foams consisting of small primary particles with enhanced hydrothermal stability. *Microporous and Mesoporous Materials*, 212, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.03.029>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- Curtis, H., Barnes, N. S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología*. (Panamericana, Ed.) (7th ed.). Madrid, España.
- De Graef, M. (2003). The transmission electron microscopy. In *Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy* (p. 136:234). Pennsylvania: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511615092.005>
- Decan, N., Wu, D., Williams, A., Bernatchez, S., Johnston, M., Hill, M., & Halappanavar, S. (2016). Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 796, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.011>
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Fantini, M. C. A., Matos, J. R., Da Silva, L. C. C., Mercuri, L. P., Chiereci, G. O., Celer, E. B., & Jaroniec, M. (2004). Ordered mesoporous silica: Microwave synthesis. *Materials Science and Engineering B*, 112(2–3), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2004.05.013>
- Fernández, F., Loske, A. ., Zendejas, H., Castaño, E., & Paredes, M. . (2005). Desarrollo de un litotriptor extracorporeal más eficiente. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 26(1), 7–15.
- Garnett, M. C., & Kallinteri, P. (2006). Nanomedicines and nanotoxicology: Some physiological principles. *Occupational Medicine*, 56(5), 307–311. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql052>
- Goldberg, M., Langer, R., & Jia, X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(3), 241–268. <https://doi.org/10.1163/156856207779996931>

- Graf, C., Gao, Q., Schütz, I., Noufele, C. N., Ruan, W., Posselt, U., ... Rühl, E. (2012). Surface functionalization of silica nanoparticles supports colloidal stability in physiological media and facilitates internalization in cells. *Langmuir*, 28(20), 7598–7613. <https://doi.org/10.1021/la204913t>
- Guel, M. L. A., Jiménez, L. D., & Hernández, D. C. (2013). Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos. *Avances En Química*, 8(3), 171–177.
- Han, Y., Lee, S. S., & Ying, J. Y. (2010). Siliceous mesocellular foam for high-performance liquid chromatography: Effect of morphology and pore structure. *Journal of Chromatography A*, 1217(26), 4337–4343. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.041>
- Hans, B., & Krause, D. (2003). *Thin films on glass* (2nd ed.). Mainz, Alemania: Springer.
- Haugland, R. (2002). *Handbook of fluorescent probes and research products*. (O. Eugene, Ed.) (9th ed.). Molecular Probes.
- Henstock, J. R., Canham, L. T., & Anderson, S. I. (2015). Silicon: The evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 11(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.025>
- Hermida, L., Agustian, J., Abdullah, A. Z., & Mohamed, A. R. (2019). Review of large-pore mesostructured cellular foam (MCF) silica and its applications. *Open Chemistry*, 17(1), 1000–1016. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0107>
- Hernández, M. V., Nava, R., Acosta, Y. J., Macías, S. A., Pérez, J. J., & Pawelec, B. (2012). Adsorption of lead (II) on SBA-15 mesoporous molecular sieve functionalized with -NH<sub>2</sub> groups. *Microporous and Mesoporous Materials*, 160, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.004>
- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 89–96. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>
- Hsiao, I.-L., Mareike, A. G., Joksimovic, R., Sokolowski, M., Gradzielski, M., & Haase, A. (2014). Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles. *Nanomedicine & Nanotechnology*, 5(6). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000248>
- Hwang, Y., Chang, J., Kwon, Y., & Park, S. (2004). Microwave synthesis of cubic mesoporous silica SBA-16. *Microporous and Mesoporous Materials*, 68, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2003.12.004>

- In-Yong, K., Elizabeth, J., Hyungsoo, C., & Kyekyoon, K. (2015). Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(6), 1407–1416. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.004>
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. b. (2013). *Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): en la Caracterización de Materiales*. *Ciencia e Investigacion* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1093/nq/s10-IV.96.358-a>
- Jitkang, L., Pin, Y. S., Xin, C. H., & Chun, L. S. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 308–381. Retrieved from [www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381](http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/381)
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823–829. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9317-4>
- Kettler, K., Veltman, K., van de Meent, D., van Wezel, A., & Hendriks, A. J. (2014). Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(3), 481–492. <https://doi.org/10.1002/etc.2470>
- Kodama, T., & Takayama, K. (1998). Dynamic behavior of bubbles during extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 24(5), 723–738. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(98\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(98)00022-2)
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., & Beck, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 359(6397), 710–712. <https://doi.org/10.1038/359710a0>
- Kumar, A., Mansour, H. M., Friedman, A., & Blough, E. R. (2013). *Nanomedicine in drug delivery* (1ra ed.). Estados Unidos: CRC Press.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3ra ed.). Estados Unidos: Springer.

- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., & Maestri, D. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica* (Primera). Argentina: Encuentro. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=dehU1IJRky8C&pg=PA98&lpg=PA98&dq=iones+alquiloxonio&source=bl&ots=cSmbIXtCAw&sig=ACfU3U2ikTPWRh7zdbH4StEz6U37NVCETg&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwiC7ODfuP3oAhVDWq0KHdn7CAUQ6AEwB3oECAgQAQ#v=onepage&q=ionesalquiloxonio&f=fa>
- Lechuga, L. (2005). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas Centro de Investigación En Nanociencia y Nanotecnología (CIN2) Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 15. Retrieved from [http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7\\_Nanomedicina.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf)
- Leclerc, L., Rima, W., Boudard, D., Pourchez, J., Forest, V., Bin, V., ... Cottier, M. (2012). Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages in vitro. *Inhalation Toxicology*, 24(9), 580–588. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.699984>
- Lee, J., Sohn, K., & Hyeon, T. (2001). Fabrication of novel mesocellular carbon foams with uniform ultralarge mesopores. *Journal of the American Chemical Society*, 123(21), 5146–5147. <https://doi.org/10.1021/ja015510n>
- Lin, Y. S., & Haynes, C. L. (2010). Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and Pore integrity on hemolytic activity. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13), 4834–4842. <https://doi.org/10.1021/ja910846q>
- Liu, Y., Dai, R., Wei, Q., Li, W., Zhu, G., Chi, H., ... Ma, K. (2019). Dual-functionalized janus mesoporous silica nanoparticles with active targeting and charge reversal for synergistic tumor-targeting therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b15434>
- Lokhandwalla, M., & Sturtevant, B. (2000). Fracture mechanics model of stone comminution in ESWL and implications for tissue damage Murtuza. *IOPscience*.
- Loske, A. M. (2007). *Shock Wave Physics for Urologists*. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México. Universidad del Valle de México.
- Loske, A. M. (2017a). Medical and Biomedical Applications of Shock Waves: The State of the Art and the Near Future, 29–34. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46213-4>
- Loske, A. M. (2017b). *Medical and Biomedical Applications of Shock Waves. Shock Wave and High Pressure Phenomena*. Querétaro: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47570-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47570-7_1)

- Loske, A. M., Fernández, F., Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vázquez, E., & Gómez-Lim, M. A. (2014). Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics*, *54*(6), 1656–1662. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.03.003>
- Lu, F., Wu, S. H., Hung, Y., & Mou, C. Y. (2009). Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, *5*(12), 1408–1413. <https://doi.org/10.1002/smll.200900005>
- Ma, J., Liu, Q., Chen, D., Wen, S., & Wang, T. (2015). Synthesis and characterisation of pore-expanded mesoporous silica materials. *Micro and Nano Letters*, *10*(2), 140–144. <https://doi.org/10.1049/mnl.2014.0413>
- Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang, T., Tang, Y., Wang, H., ... He, N. (2013). Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *13*(10), 6485–6498. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7525>
- Mardones, L. E., Legnoverde, M. S., Monzón, J. D., Bellotti, N., & Basaldella, E. I. (2019). Increasing the effectiveness of a liquid biocide component used in antifungal waterborne paints by its encapsulation in mesoporous silicas. *Progress in Organic Coatings*, *134*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.04.058>
- McCarthy, J., Inkielewicz, I., Corbalan, J. J., & Radomski, M. W. (2012). Mechanisms of toxicity of amorphous silica nanoparticles on human lung submucosal cells in vitro: Protective effects of fisetin. *Chemical Research in Toxicology*, *25*(10), 2227–2235. <https://doi.org/10.1021/tx3002884>
- Meoto, S., Kent, N., Nigra, M. M., & Coppens, M. O. (2017). Effect of stirring rate on the morphology of FDU-12 mesoporous silica particles. *Microporous and Mesoporous Materials*, *249*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.04.045>
- Montes, J. ., Cuevas, F. ., & Cintas, J. (2014). *Ciencia e ingeniería de los materiales* (1ra ed.). España: Paraninfo.
- Morales, C. (2007). *Nanotecnología en Medicina. UBO Health Journal* (Vol. 4). <https://doi.org/10.23854/07198698.20174morales44>
- Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, L., Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., ... Hoet, P. H. (2017). Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology*, *91*(9), 2967–3010. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1993-y>
- Neumann, K., Jain, S., Geng, J., & Bradley, M. (2016). Nanoparticle “switch-on” by tetrazine triggering. *Chemical Communications*, *52*(75), 11223–11226. <https://doi.org/10.1039/c6cc05118a>

- Nieto, A. P. (2011). *Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón*. Universidad Complutense de Madrid.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/09638280500534994>
- Niu, M., Zhong, H., Shao, H., Hong, D., Ma, T., Xu, K., ... Sun, J. (2016). Shape-dependent genotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and cellular mechanisms. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(3), 2313–2318.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10928>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1–5.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>
- Ockenga, W. (2011). An introduction to fluorescence. Retrieved from  
<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/an-introduction-to-fluorescence/>
- Palacios, P. R., Valladares, L. D. L. S., & Bustamante, A. (2012). Estudio de la deshidroxilación en el óxido férrico hidratado denominado limonita. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 78(3), 198–207.
- Passagne, I., Morille, M., Rousset, M., Pujalté, I., & L'Azou, B. (2012). Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*, 299(2–3), 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.010>
- Peña, J. D., Cardona, E. M., Marín, J. M., & Rios, L. A. (2009). Producción de sílice mesoporosa empleando monoestearato de glicerol como porógeno oleoquímico. *Informacion Tecnologica*, 20(6), 67–74.  
<https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4109cit.08>
- Pitchumani, R., Li, W., & Coppens, M. O. (2005). Tuning of nanostructured SBA-15 silica using phosphoric acid. *Catalysis Today*, 105(3–4), 618–622.  
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.06.002>
- Poole, C. P., & Owens, F. J. (2003). *Introduction to nanotechnology* (1ra ed.). Estados Unidos: Wiley-Interscience.
- Prokop, A., & Davidson, J. (2007). Nanovehicular intracellular delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(7), 2271–2280.  
<https://doi.org/10.1002/jps>
- Que, W., Sun, Z., Lam, Y. L., Chan, Y. C., & Kam, C. H. (2001). Effects of titanium content on properties of sol-gel silica-titania films via organically modified silane precursors. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 34(4), 471–476.  
<https://doi.org/10.1088/0022-3727/34/4/305>

- Rashidi, L., Ganji, F., & Vasheghani-Farahani, E. (2017). Fluorescein isothiocyanate-dyed mesoporous silica nanoparticles for tracking antioxidant delivery. *IET Nanobiotechnology*, 11(4), 454–462. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0120>
- Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., & Mahmoudi, M. (2012). Big Signals from Small Particles: Regulation of Cell Signaling Pathways by Nanoparticles. *American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/cr3002627>
- Riedlinger, R., Dreyer, T., & Krauss, W. (2001). Smallaperture piezo sources for lithotripsy. *Int. Congress on Acoustics*, 4.
- Salinas, A. J., & Vallet-Regí, M. (2007). Evolution of ceramics with medical applications. *InterScience*, 633(11), 1762–1773. <https://doi.org/10.1002/zaac.200700278>
- Schmidt-Winkel, P., Lukens, W. W., Yang, P., Margolese, D. I., Lettow, J. S., Ying, J. Y., & Stucky, G. D. (2000). Microemulsion templating of siliceous mesostructured cellular foams with well-defined ultralarge mesopores. *Chemistry of Materials*, 12(3), 686–696. <https://doi.org/10.1021/cm991097v>
- Schmidt-Winkel, P., Lukens, W. W., Zhao, D., Yang, P., Chmelka, B. F., & Stucky, G. D. (1999). Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows. *American Chemical Society*, 121(1), 254–255. <https://doi.org/10.1021/ja983218i>
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5>
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry* (4th ed.). New York: Wiley-Liss.
- Shrivastava, S. K., & Kailash. (2005). Shock wave treatment in medicine. *Journal of Biosciences*, 30(2), 269–275. <https://doi.org/10.1007/BF02703708>
- Silva, L. C. C. da, Santos, L. B. O. do., Abate, G., Cosentino, I. C., Fantini, M. C. A., Masini, J. C., & Matos, J. R. (2008). Adsorption of Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> in FDU-1 silica and FDU-1 silica modified with humic acid. *Microporous and Mesoporous Materials*, 110(2–3), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.06.008>
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., & Siemieniewska, T. (1985). Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57(4), 603–619. <https://doi.org/10.1351/pac198557040603>

- Song, S., Yang, X., Wang, B., Zhou, X., Duan, A., Chi, K., ... Li, J. (2017). Al-modified mesocellular silica foam as a superior catalyst support for dibenzothiophene hydrodesulfurization. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 38(8), 1347–1359. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(17\)62867-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(17)62867-5)
- Stancovski, V., & Badilescu, S. (2014). In situ Raman spectroscopic-electrochemical studies of lithium-ion battery materials: A historical overview. *ChemInform*, 45(8), no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.201408241>
- Strickland, L., Von Dassow, G., Ellenberg, J., Foe, V., Lenart, P., & Burgess, D. (2004). Light Microscopy of Echinoderm Embryos Laila: In Methods in cell biology. In *Methods in Cell Biology* (pp. 371–409). [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)74016-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)74016-9)
- Thiel, M. (2001). Applications of shock waves in medicine. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (387), 415–440. <https://doi.org/10.1016/b978-012086430-0/50028-2>
- Tovar Ledesma, D. C. (2020). *Uso potencial de sílices mesocelulares para encapsulamiento de fármacos macromoleculares*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Valdemar, C. M., Manisekaran, R., Avila, R., Compeán, V. D., Nava, R., & Lopez, L. M. (2020). Pathogen associated molecular pattern-decorated mesoporous silica – a colloidal model for studying bacterial-host cell interactions, *041003*, 1–22. <https://doi.org/10.1116/6.0000168>
- Valle, P. V. (2013). *Síntesis de materiales mesoporosos compuestos, sílice-carbono y su empleo como plataforma para la fabricación de materiales con propiedades avanzadas*. Universidad de Oviedo.
- Vicente, S., Moia, C., Zhu, H., & Vigé, X. (2017). In vitro evaluation of the internalization and toxicological profile of silica nanoparticles and submicroparticles for the design of dermal drug delivery strategies. *Journal of Applied Toxicology*, 37(12), 1396–1407. <https://doi.org/10.1002/jat.3507>
- Wang, X., Lin, K. S. K., Chan, J. C. C., & Cheng, S. (2005). Direct synthesis and catalytic applications of ordered large pore aminopropyl-functionalized SBA-15 mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(5), 1763–1769. <https://doi.org/10.1021/jp045798d>
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). The Transmission Electron Microscope. In *Transmission Electron Microscopy* (pp. 3–17). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2519-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2519-3_1)
- Zhang, Q., Xu, H., Zheng, S., Su, M., & Wang, J. (2015). Genotoxicity of mesoporous silica nanoparticles in human embryonic kidney 293 cells. *Drug Testing and Analysis*, 7(9), 787–796. <https://doi.org/10.1002/dta.1773>



- Zhao, D., Feng, J., Huo, Q., Melosh, N., Glenn, H., Chmelka, B. F., ... Stucky, G. D. (1998). Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*, 279(5350), 548–552.
- Zhong, P., Chuong, C. J., & Preminger, G. M. (1993). Propagation of shock waves in elastic solids caused by cavitation microjet impact. I: Theoretical formulation. *Journal of the Acoustical Society of America*, 94(1), 19–28.  
<https://doi.org/10.1121/1.407077>
- Zhou, Y., Cocks, F. H., Preminger, G. M., & Zhong, P. (2004). The effect of treatment strategy on stone comminution efficiency in shock wave lithotripsy. *Journal of Urology*, 172(1), 349–354.  
<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000132356.97888.8b>
- Zhu, S., Cocks, F. H., Preminger, G. M., & Zhong, P. (2002). The role of stress waves and cavitation in stone comminution in shock wave lithotripsy. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 28(5), 661–671.  
[https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(02\)00506-9](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(02)00506-9)

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ