



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

**Síntesis de materiales nanoestructurados Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para su
evaluación celular *in vitro***

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Ingeniero en Biomédica

Presenta:

Montserrat Ochoa Elías

Dirigido por:

Dra. Karen Esquivel Escalante



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

**Síntesis de materiales nanoestructurados Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para su
evaluación celular *in vitro***

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Ingeniero en Biomédica

Presenta:

Montserrat Ochoa Elias

Dirigido por:

Dra. Karen Esquivel Escalante

Dra. Karen Esquivel Escalante
Presidente


Firma

M. en C. Arturo Hernández Medina
Secretario


Firma

Dr. Rafael Hernández Rangel
Vocal

Rafael Hernández R.
Firma

M. en C. Francisco Josué López Martínez
Suplente


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2022
México

Resumen

Las nanopartículas de magnetita han formado parte de la aplicación de nanomateriales en el área de la biomedicina, específicamente en el uso de tratamiento y detección de enfermedades, debido a que su propiedad ferromagnética facilita su manipulación *in vivo* con la aplicación de campos magnéticos externos. Sin embargo, uno de los principales problemas a los que se enfrentan es el tiempo medio de circulación de dichas partículas en el organismo, por lo cual se busca aumentar la biocompatibilidad de dichas partículas con el uso de recubrimientos que aumenten el tiempo medio del material dentro del organismo y a su vez disminuyan los efectos adversos en los tejidos. Para evaluar la respuesta toxicológica de la magnetita y compararla con la obtenida con el mismo material pero modificado con un recubrimiento de óxido de silicio se realizó un ensayo celular *in vitro* en la línea HT29. Las partículas de magnetita se obtuvieron mediante el método de co-precipitación química asistido con baño ultrasónico y se modificaron mediante el método de Stöber para conseguir el recubrimiento de óxido de silicio. Como resultado se arrojaron que las dosis de 80 ppm y 160 ppm de magnetita presentaron la mayor muerte celular dentro de la curva de dosis respuesta y que el material modificado con silicio en las dosis de 20 ppm y 160 ppm fueron las que generaron el mayor daño. A pesar de que ambos materiales en la dosis de 160 ppm tienen la menor viabilidad, el material modificado fue el que obtuvo mayor biocompatibilidad con las células durante toda la curva de dosis respuesta, lo cual se le atribuye al recubrimiento que redujo las zonas de los átomos de hierro que pudieran llegar a generar estrés a los cultivos o lixiviación de especies reactivas de hierro que generan una alteración en el crecimiento celular.

Palabras clave: Magnetita; recubrimientos biocompatibles; ensayos *in vitro*; dosis-respuesta.

Abstract

Magnetite nanoparticles have been part of the application of nanomaterials in the area of biomedicine, specifically in the use of treatment and detection of diseases, due to its ferromagnetic properties, which facilitates their manipulation *in vivo* with the application of external magnetic fields. However, one of the main problems that arise is the average time of circulation of magnetic particles in the body, which is why it is sought to increase the biocompatibility of these particles with the use of coatings that increase the average time of the material inside the body and at the same time reduces the adverse effects on the tissues. To evaluate the toxicological response of magnetite and compare it with that obtained with the same material but modified with a silicon oxide coating, an *in vitro* cell assay was performed on the HT29 cell line. The magnetite particles were obtained by the ultrasonic bath-assisted chemical co-precipitation method and modified by the Stöber method to obtain the silicon oxide coating. As a result, it was found that the doses of 80 ppm and 160 ppm of magnetite presented the highest cell death within the dose-response curve and that the material modified with silicon in the doses of 20 ppm and 160 ppm were the ones that generated the greatest damage. Although both materials at a dose of 160 ppm have the lowest cell viability, the modified material was the one that obtained the highest biocompatibility with the cells throughout the entire dose-response curve, which is attributed to the coating that reduced the areas of the iron atoms that could generate stress to the crops or leaching of reactive iron species that could generate an alteration in cell growth.

Keywords: Magnetite; biocompatible coatings; *in vitro* tests; dose-response.

Agradecimientos

A mis padres, Gabriel y Diana que siempre han sido mi impulso y que me enseñaron a no rendirme nunca, sin su apoyo nada de lo que soy ahora sería posible ni académicamente ni personalmente. Los amo por toda la eternidad.

Al Laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales, y por apoyarme en esta investigación. Al igual que todos los centros en los que se realizaron las pruebas fisicoquímicas.

Al profesor Arturo Medina que siempre creyó en mí y busco la manera de apoyarme cuando creí que estaba en la carrera equivocada.

Al maestro Josué que sin él y el apoyo del Laboratorio de biología celular de la Facultad de Ciencias Naturales no hubiera sido posible parte fundamental de esta investigación.

Al Dr. Rafael por su apoyo en la revisión de este trabajo y por formar parte del sínodo.

A mis hermanos y sobrinos que siempre han sido mis cómplices de vida, a pesar de las altas y bajas, los amo con todo mi corazón.

A mis amigos de toda la vida (4Locos) que siempre me apoyaron y estuvieron ahí cuando más lo necesite y mis amigas (Diana, Bren, Moni y Karly) que siempre me hacen seguir adelante. A Quique que siempre ha sido mi cómplice de aventuras en las buenas y en las malas. Gracias Jesús.

Mis colegas y amigos de laboratorio que siempre tuvieron comentarios que aportaron a esta investigación y que al mismo tiempo hacían que todo fuera más divertido y llevadero.

Pienso, luego existo.

-René Descartes

Indice

Resumen	3
Abstract.....	4
Agradecimientos	5
Indice	7
Indice de Figuras	10
CAPITULO 1	12
1. Introducción.....	13
CAPITULO 2.....	16
2. Justificación.....	17
CAPITULO 3.....	18
3. Planteamiento del problema	19
CAPITULO 4.....	20
4. Marco teórico.....	21
4.1 Nanopartículas magnéticas.....	21
4.2 Partículas súper paramagnéticas	22
4.3 Recubrimientos biocompatibles.....	24
4.4 Aplicaciones en biomedicina	25
4.5 Aplicaciones <i>in vitro</i>	26
4.6 Aplicaciones <i>in vivo</i>	27
4.7 Agentes de contraste	29
4.8 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) y nanopartículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro (USPION)	31

CAPITULO 5.....	33
5. Hipótesis y objetivos.....	34
5.1 Hipótesis.....	34
5.2 Objetivo general.....	34
5.3 Objetivos específicos.....	34
CAPITULO 6.....	35
6. Metodología.....	36
6.1 Síntesis de los materiales nanoestructrados.....	36
6.2 Ensayos in vitro.....	38
CAPITULO 7.....	40
7. Resultados.....	41
7.1 SEM.....	41
7.2 Análisis elemental (EDS).....	42
7.3 Potencial Z.....	45
7.4 XRD.....	47
7.5 Viabilidad celular.....	49
CAPITULO 8.....	53
8. Conclusiones.....	54
8.1 Perspectivas.....	55
9. Referencias.....	57
ANEXOS.....	67
10. Anexos.....	68
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	68
Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	69
Potencial Z.....	70

XRD.....	71
Conteo celular mediante cámara de Neubauer.....	72

Indice de Figuras

Figura 1 Estructura cristalina de la magnetita [33].....	21
Figura 2 Ferromagnetismo en material magnetita [35]	21
Figura 3 Orientación de las partículas con campo magnético externo [40].....	23
Figura 4 Relación entre tamaño de partículas y estructura de dominios magnéticos [43].....	23
Figura 5 Relaxaciones presentes en Magneto-reloximetría [54].....	27
Figura 6 Aplicaciones in vivo de nanopartículas magnéticas en hipertermia y liberación de fármacos [58]	28
Figura 7 Resonancia Magnetica Nuclear de un tumor cerebral con de contraste de Gadolinio (izq) y empleando un agente de contraste a base de magnetita (derecha) [14].....	29
Figura 8 Tiempo de permanencia en la sangre respecto al tamaño de las nanopartículas [54].....	32
Figura 9 Material Fe ₃ O ₄ obtenido	36
Figura 10 Material Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ obtenido	37
Figura 11 Caja de pozos de cultivos celulares de la linea HT29.....	39
Figura 12 Micrografia del material Fe ₃ O ₄ (A) x500 aumentos y (B) x2500 aumentos	41
Figura 13 Micrografia de Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (A) 500 aumentos y (B) 2500 aumentos..	42
Figura 14 Mapeo superficial del material Fe ₃ O ₄ (A), elementos de Fe en la superficie (B) y elementos de oxigeno (c)	43
Figura 15 Analisis elemental del material Fe ₃ O ₄	43
Figura 17 Mapeo superficial del material Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (D), elementos de Fe en la superficie (A), elemento O (B) y elemento Si en la superficie (C).....	44
Figura 16 Analisis elemental del materia Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	45
Figura 19 Potencial Z obtenido al analizar el material Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	46
Figura 20 Difractograma obtenido del material Fe ₃ O ₄	47
Figura 21 Difractograma obtenido del material Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	48
Figura 22 Vialidad celular obtenida de los ensayos celulares en línea HT29	51

Figura 23 Composición del microscopio electrónico de barrido [80]	68
Figura 24 Rayos x característicos emitidos de una muestra.....	69
Figura 25 Relación entre carga superficial y potencial Z	70
Figura 26 Angulo de Bragg [85]	71
Figura 27 Graficas obtenidas mediante el método Hilliamson-Hall.....	72
Figura 28 Cámara de Neubauer, cubre objetos (A) y porta objeto reticulado (B) [88]	73
Figura 29 Zonas modificadas para lograr un volumen fijo [89]	73
Figura 30 Cuadrantes empleados al realizar conteo celular en cámara de Neubauer [89].....	73

CAPITULO 1

1. Introducción

El campo de la biomedicina se ha visto ampliamente beneficiada por el gran aporte que ofrecen las aplicaciones de nanomateriales en el campo de diagnóstico de enfermedades, terapia y liberación de fármacos, enfocándose principalmente en el área oncológica [1]-[3].

Dentro de los nanomateriales, las nanopartículas son aquellas que se encuentran en un rango de tamaño entre 1nm- 100nm en cualquiera de sus 3 dimensiones, generalmente son obtenidas a base de carbono, silicatos y metales. Una de sus principales características es que en el tamaño nanométrico presentan diferentes propiedades que en un tamaño macroscópico [4]. Siendo estas propiedades por las cuales la nanotecnología le da nuevas herramientas y alternativas a la biomedicina para enfrentar y detectar enfermedades a niveles celulares y/o moleculares [5]-[7].

Los óxidos de hierro son la manera más común en la que podemos encontrar al elemento hierro en la naturaleza por lo cual su uso es muy común en muchas áreas de la vida cotidiana y en su contacto con el ser humano, ya sea en su estado férrico o ferroso. Los principales óxidos de hierro encontrados en la naturaleza son hematita, magnetita, maghemita, goethita y akaganeíta, siendo la magnetita el material natural más magnético del mundo, siendo esta propiedad por la cual en los últimos años su aplicación en medicina se ha visto en aumento en especial en el área biomédica [8]-[10].

La magnetita presenta propiedades que son de gran interés para aplicaciones relacionadas con Resonancia Magnética Nuclear (RMN), como su núcleo magnético, su relación superficie/tamaño y también la facilidad con la cual se pueden modificar su superficie con sustancias biológicas (proteínas, anticuerpos, antígenos, etc.) [11]-[14].

Se han reportado ya algunos datos sobre la acción de las nanopartículas en pruebas in vitro, en células neuronales debido a que su mayor aplicación se enfoca como marcador en estudios de RMN para tumores cerebrales, dichos estudios hablan de

su baja citotoxicidad, de su capacidad para liberar iones de hierro en su ambiente y las alteraciones que dichos iones causan en las células [15]. Las pruebas *in vitro* son de suma importancia para las pruebas de materiales que se pretenden usar en seres vivos, la información que nos dan es del comportamiento que tienen dichos materiales en contacto con materia biológica ya sea buena o mala, esto dependerá de varios factores como el tiempo de contacto, las condiciones en las que se mantienen las células, el tipo de células e incluso la esterilización previa de los materiales de contacto. La finalidad de dichos ensayos es la aprobación de que las reacciones obtenidas son las que se buscan y desean para así poder continuar con la investigación y proceder a los ensayos in vivo [16]-[19].

La necesidad de la aplicación de nanopartículas en el área biomédica, específicamente en el área oncológica, es que en los últimos años se han estado aplicando dichos materiales como agentes de contraste, acarreadores de medicamentos e incluso como catalizador para llevar a las células a la muerte controlada. La innovación que se ha estado dando a la aplicación de dichos materiales es para cubrir la necesidad de generar métodos menos invasivos y más eficientes para el ataque de enfermedades que van en aumento en la población [20]-[21]. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte solo por debajo de los problemas cardiovasculares y la diabetes. En el sexo masculino los principales tipos de cáncer más mortales son de próstata, de pulmón, colon rectal, de hígado y gástrico. En el sexo femenino son de mama, cervicouterino, de hígado, colon rectal y ovario.

En el año 2020 se registraron 195, 999 casos de cáncer y 90. 222 muertes a causa del cáncer. En mortalidad (para ambos géneros) el primer lugar lo ocupa el cáncer de próstata, seguido por el de mama y en tercer sitio el colon rectal. La principal problemática que hay al momento de tratar alguno de estos tipos de cáncer es la detección en estadios tempranos, ya que solo se detecta en estadios avanzados o metástasis en el organismo. Todo eso se debe a la desinformación que hay acerca de los síntomas o de las revisiones médicas que se tienen que realizar, además de

que las técnicas de detección en ocasiones llevan mucho tiempo y sesiones en las cuales en la mayoría de las ocasiones no se les da continuidad o cuando se encuentra el tumor ya pasó un lapso largo de tiempo y este ya se encuentra en etapas avanzadas y en esos casos los tratamientos son muy agresivos o en ocasiones no queda nada más que tratamientos paliativos [22]-[24].

Todo lo anterior se resume en que las propiedades magnéticas de la magnetita son importantes para considerar en las investigaciones de nuevos materiales para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades no infecciosas además de procurar la reacción que se pudiera producir dentro del organismo, por lo cual se propone estudiar la biocompatibilidad de los materiales nanoestructurados Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en ensayos in vitro para proponerlos como materiales en el uso de diagnóstico o tratamiento en el área oncológica.

CAPITULO 2

2. Justificación

La modificación de nanopartículas de magnetita con materiales cerámicos o poliméricos ha demostrado una mejoría en el uso como agentes de contraste o como acarreadores de fármacos en comparación con las nanopartículas sin modificaciones superficiales [25]. Además, dichos recubrimientos aumentan el tiempo de circulación dentro del organismo antes de ser desechado [26]. Por lo cual la innovación en el uso de dichas nanopartículas se expande rápidamente y evoluciona de la misma manera, generando partículas que contengan una matriz de dicho material con el fin de mantener la propiedad magnética y con su aprovechamiento poder adentrarse más en el organismo manipulando la dirección y velocidad con la que las nanopartículas viajan a través del torrente sanguíneo [27]-[28].

Investigaciones más recientes en el área de marcadores nos muestran que se está enfocando la ciencia de materiales en generar partículas que presenten otras propiedades aparte de la magnética para la mejora de los materiales ya empleados y a su vez poder realizar dos funciones a la vez como en el caso de las partículas híbridas fotoluminiscentes y magnéticas que se usan como acarreadores de medicamentos para la detección y tratamiento de cáncer [29]. Por lo cual el estudio de las partículas magnéticas está representando una gran oportunidad de enfoque para el área de la salud y así contribuir con materiales que sean mucho más biocompatible y eficientes para la detección de enfermedades [30].

Debido a lo anterior, la ventaja de usar un agente de contraste para la detección en etapas tempranas aumentaría drásticamente las posibilidades de llevar tratamientos no agresivos o extracciones menos invasivas de dichas masas. Además de que si dichos agentes de contraste presenta una biocompatibilidad óptima reducirían los efectos adversos al ser introducidos al organismo [31]-[32].

CAPITULO 3

3. Planteamiento del problema

En el año 2020 México presentó 195, 500 nuevos casos de cáncer para ambos sexos, siendo el principal el de mama, próstata y colorrectal, además de que se tuvieron 90, 222 decesos por dicha enfermedad encabezando el cáncer de mama, seguido por el de próstata e hígado. Una de las principales causas de dichas muertes es que en el país el 50% de los casos de cáncer se detectan en etapas III o IV, lo que dificulta su tratamiento, lo que es causante de las cirugías para extirpar los tumores o incluso solo presentar tratamientos para cuidados paliativos de la enfermedad [31]-[32].

CAPITULO 4

4. Marco teórico

4.1 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas empleadas en aplicaciones biomédicas son compuestos que generalmente están constituidos por Co, Ni, Fe, Ti, óxidos de hierro y ferritas. Tradicionalmente se clasifican en óxidos metálicos, metales puros y nanocompuestos metálicos.

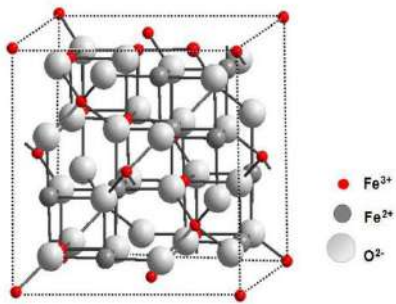


Figura 1 Estructura cristalina de la magnetita [33]

La más empleada está formada por un tipo de óxido de hierro llamado magnetita, su composición estequiometría de cationes es $\text{Fe}^{+3}(\text{Fe}^{+2} \text{Fe}^{+3})\text{O}_4$ que forman un sistema cúbico centrado en las caras (FCC) con estructura de espinela inversa observada en la Figura 1. Los iones de hierro se encargan de formar la celda unitaria de FCC y los

iones de hierro se encuentran en los espacios intersticiales que se forman. Dicho material posee propiedades superparamagnéticas cuando se presentan en tamaño nanométrico las cuales se emplean para poder ser dirigidas o detectadas por campos magnéticos externos, dando así una buena opción para una manipulación externa cuando se introducen en algún ser vivo [33]-[34].

Sus características magnéticas son dadas debido a que la estructura de la magnetita pertenece a las espinelas el cual conforma a cristales inorgánicos que presentan la fórmula XY_2O_4 , donde X presenta 8 cationes que ocupan cada uno la posición tetraédrica y los cationes Y ocupan 16 posiciones octaédricas dentro de la celda unitaria. Específicamente la magnetita presenta la estructura de espinela inversa en la cual 8 de las 16 posiciones octaédricas pasan a ocupar posiciones tetraédricas, dando lugar a la fórmula $\text{Y}(\text{XY})\text{O}_4$ presentando óxidos mixtos de iones, en la cual el ion divalente Fe^{2+} se presenta en los huecos

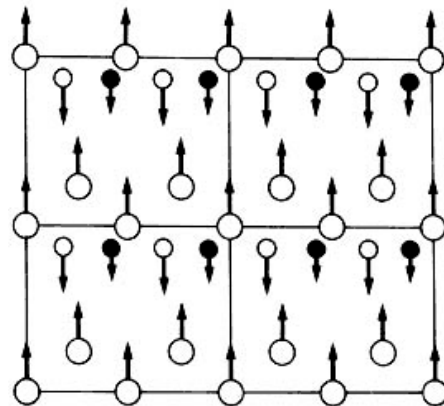


Figura 2 Ferromagnetismo en material magnetita [35]

octaédricos y el ion trivalente Fe^{3+} ocupa huecos octaédricos y tetraédricos por la estructura característica de la magnetita. Todo lo anterior justifica el ferromagnetismo que presenta dicho material, este fenómeno se da debido a que se presenta un momento magnético neto a partir de dos tipos de átomos con momentos magnéticos de diferente magnitud que se disponen de forma antiparalela [35]. Los momentos del espín de los iones de Fe^{3+} en posición octaédrica están posicionados paralelamente entre sí, pero los que tiene la posición tetraédrica están también paralelamente, pero en sentido opuesto, por lo cual se anulan entre sí y no contribuyen a la magnetización del material, dejándolo así en los iones de Fe^{2+} ya que estos tienen sus momentos magnéticos alineados en el mismo sentido y dirección siendo entonces ellos los responsables de la magnetización neta del material como se observa en la Figura 2 [36]-[37].

La propiedad magnética que presentan estas partículas son la característica principal por la cual su uso en el área de diagnóstico y tratamiento de enfermedades, dicha propiedad es por la cual se pueden introducir al organismo y dirigirse de manera externa por campos magnéticos a zonas específicas donde se desea que actúen. Además, presentan una alta biocompatibilidad en comparación con otras nanopartículas de óxidos metálicos y una fácil biodegradación, en ciertas dosis, dentro del organismo que se ve promovido por la absorción del hierro en los depósitos que se encuentran en los seres humanos y que posteriormente serán empleados por los eritrocitos y formarán parte de la hemoglobina [38]-[39].

4.2 Partículas súper paramagnéticas

El efecto súper paramagnético se ve presente en nanopartículas ya que estas son muy susceptibles a orientarse paralelamente a un campo magnético externo al cual se exponen tendiendo así a una magnetización cero y a la baja probabilidad de generar aglomerados [40]. En ausencia de un campo magnético externo tienden a alinearse aleatoriamente lo cual genera que estas tiendan a aglomerarse y atraerse entre sí debido a que las interacciones magnéticas entre ellas son demasiado débiles para poder transmitir las por todo el sistema. Este fenómeno se genera por el

tamaño de las partículas y el número de átomos presentes en su superficie, cuando se llega a tamaños nanométricos, se presenta lo que se denomina monodominio que es cuando la energía necesaria para poder rotar los espines es mayor que la requerida para poder desplazar la pared del dominio que genera en los diferentes momentos magnéticos en las partículas por ejemplos los materiales en Bulk [41].

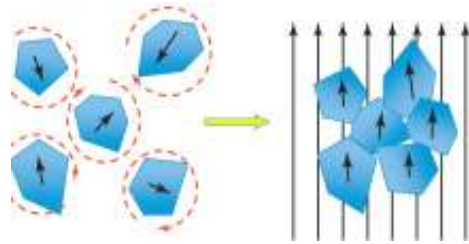


Figura 3 Orientación de las partículas con campo magnético externo [40]

Específicamente en la magnetita, la energía de anisotropía es mayor que la energía magnética lo cual ocasiona que los dominios magnéticos desaparezcan y todos los spines se alineen en un solo dominio y generando así nanopartículas magnéticas con monodominio y así pueda suceder el fenómeno de súper paramagnetismo. Esta propiedad es por la cual las partículas se alinean paralelamente al campo magnético al cual se exponen (Figura 3) y pueden ser dirigidas a zonas específicas [42]. Además de que en ausencia del campo magnético externo no presentan una magnetización neta debido a que por el tamaño y los monodominios reducen el momento magnético rápidamente. En el caso de las partículas ferromagnéticas cuando se exponen a un campo externo también se alinean paralelamente al sentido de dicho campo pero la diferencia es que mantienen la energía de remanencia obtenida y cuando el campo externo es retirado dichas partículas mantienen su magnetización neta (Figura 4) [43].

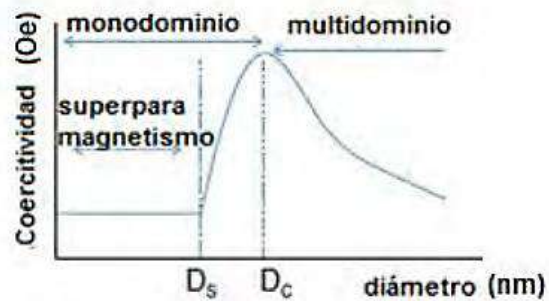


Figura 4 Relación entre tamaño de partículas y estructura de dominios magnéticos [43]

4.3 Recubrimientos biocompatibles

Cuando se introduce un biomaterial al cuerpo humano, lo primero que sucede es que la superficie de éste se encuentra directamente en contacto con tejido celular o fluidos corporales y la interacción con ellos genera una respuesta biológica dentro del cuerpo que puede ser trombosis, inflamación o adsorción de proteínas; todo esto va a depender de la composición de la superficie del material. Dependiendo del efecto que genere nuestro material, este también se puede ver modificado por la respuesta biológica que se dé en el organismo y afectar de manera grave la función del material o acelerar su degradación [44]. Principalmente se busca que los biomateriales causen el menor de los efectos nocivos en el organismo, es decir, que sean bioinertes pero en los últimos años se han enfocado en que los materiales propicien el crecimiento celular alrededor de ellos (biofuncionales) por lo cual la superficie de contacto aumenta su importancia para obtener el resultado deseado [45].

Casi todos los materiales que presentan propiedades idóneas para su aplicación in vivo (magnetismo, fotoluminiscencia, termoestables, etc.) presentan superficies no idóneas para el contacto con tejido vivo por lo cual se recurre a su modificación superficial con recubrimientos biocompatibles [46].

Las propiedades del núcleo magnético y la superficie de las nanopartículas de magnetita las hacen propicias para las modificación de su superficie con biopolímeros o algunas sustancias químicas o biológicas para la finalidad de generar una mayor biocompatibilidad y poder hacerlas más específicas para su función. Gracias a la gran energía que tiene en la superficie el material tiende a aglomerarse y cuando sucede esto tienda a ser eliminada más rápido por los macrófagos cuando el material es introducido por vía intravenosa [47].

Debido a esto también cuando se realiza la modificación de la superficie para buscar una mayor biocompatibilidad, se busca a su vez, que el material sea estable en solución y no se aglomeren o que no formen aglomerados de gran tamaño para que con esto no se reduzca el tiempo que permanecen en funcionamiento sin activar los sistemas de detección de extraños del cuerpo humano. Los recubrimientos que se

emplean son aquellos que le dan propiedades hidrofílicas a las partículas debido a que ya se ha comprobado que con dichas propiedades se aumenta el tiempo del material en flujo sanguíneo y evita la adsorción de proteínas [48]-[49].

4.4 Aplicaciones en biomedicina

Por sus propiedades superficiales de las partículas de magnetita y por las modificaciones de superficie que se les realiza para que tengan características óptimas para el contacto con tejido vivo, las nanopartículas de magnetita se clasifican en dos grupos por su función que son para terapia y para detección, siendo la primera exclusivamente de manera in vivo que puede ser para acarreador de fármacos, hipertermia o termo ablación, anemia crónica, enfermedades de riñón y radio terapia. En el caso de uso para diagnóstico se dividen en in vivo estando aquí solo como agente de contraste para resonancia magnética nuclear (RMN) y en métodos in vitro se encuentran para bioseparación, inmovilización enzimática, inmunoensayos, purificación, entre otros. En casi todos los casos anteriores las nanopartículas son biofuncionalizadas para aumentar su tiempo en el sistema sanguíneo o para que su especificidad sea mayor [50].

La magnetita es la empleada en el área biomédica debido a que presenta una baja toxicidad en el organismo en comparación con otros óxidos metálicos, además de que su interacción con campos magnéticos externos facilita su manipulación para dirigir algunos fármacos a zonas específicas dentro del organismo, es principalmente empleada para tratamientos oncológicos [51]. Además, su interacción con campos magnéticos externos nos proporciona la capacidad de dirigir externamente a una zona específica a dichas partículas y que con los diferentes tamaños de nanopartículas que se pueden generar en la magnetita, proporcionará la interacción en diferentes órganos. Los rangos recomendados para aplicaciones biológicas son de 10 a 100 nm, ya que menores de este rango pueden significar problemas celulares o alteraciones en las estructuras internas de las células y mayores a este rango pueden correr peligro de producirse una embolia [52].

4.5 Aplicaciones *in vitro*

Los ensayos *in vitro* son aquellos que se realizan en cultivos celulares bajo condiciones muy controladas y proporcionan información de un comportamiento aproximado del que se tendrá dentro de organismo al introducir dichos materiales. La separación de sustancias biológicas a través del uso de adsorbentes magnéticos o magnetizables tiene una aplicación para las extracciones de sustancias en soluciones liquido-liquido. Se emplean nanopartículas que dan lugar a un fenómeno llamado extracción en fase sólida magnética en la cual se procede a añadir un adsorbente magnético a la disolución o suspensión que contiene la sustancia a separar. Cuando dicho adsorbente ya está adherido a la sustancia se procede a ser recuperado de la fase líquida empleando un separador magnético apropiado. El principal motivo por el cual se usan nanopartículas magnéticas y no macropartículas magnéticas es que, porque el tamaño influye en que la suspensión sea estable o no, y así evitar la sedimentación que se podría generar en ausencia de un campo magnético externo si las partículas son de mayor tamaño [53].

Otra aplicación *in vitro* es la magneto-reloximetría que es un método de evaluación empleado en los inmunoensayos en el cual se mide la viscosidad magnética, es decir, la relajación del momento magnético neto de un sistema de nanopartículas magnético después de retirar un campo magnético externo. Dentro de este método existen dos diferentes tipos de relajación que se presentan. La primera es en muestras totalmente secas de nanopartículas magnéticas de monodominio donde se presenta la relajación de Néel que es el tiempo que le toma en volver al equilibrio de la magnetización posterior a una perturbación. La segunda es la que caracteriza la rotación viscosa de las partículas en su conjunto, es llamada relajación de Brown (Figura 5) [54].

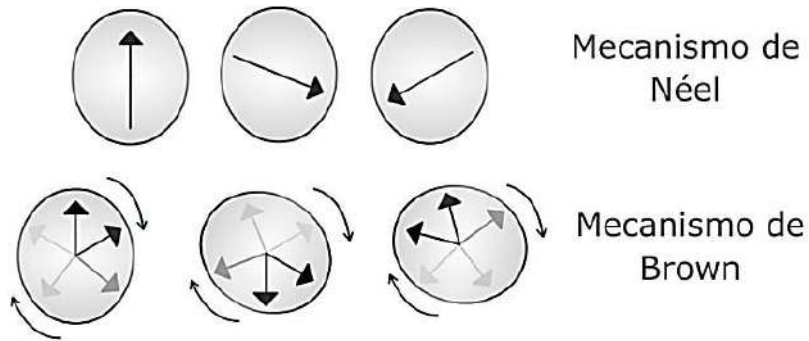


Figura 5 Relaxaciones presentes en Magneto-reloximetría [54]

4.6 Aplicaciones *in vivo*

Las aplicaciones de los nanomateriales *in vivo* son importantes ya que presentan comportamientos diversos a los que se tienen en materiales en bulto, además de que son de fácil acceso al ser introducidos al cuerpo humano [41]. La hipertermia o ablación magnética es el fenómeno físico que se genera como respuesta a la interacción de una zona específica en la cual se encuentran nanopartículas magnéticas, previamente introducidas, con ondas electromagnéticas que se encuentran en frecuencias de varios centenares de MHz la cual se percibe como calor en dicha zona por disipación de energía. Este efecto permite que por un periodo de aproximadamente 30 minutos se alcancen temperaturas entre 42 y 45 °C lo cual produce que las células dañadas que se encuentran alrededor de las nanopartículas mueran debido a que éstas son más susceptibles a los cambios de temperaturas en comparación con las células sanas [55]. La principal ventaja de este método es que la zona en la que se aumenta la temperatura es delimitada para la del tumor y así no se expone a un daño celular mayor en otras zonas. La única precaución que tomar es que no debe de llevar es el control adecuado de la temperatura ya que si se llega a 50 °C se puede generar necrosis [56].

La liberación de fármacos empleando nanopartículas magnéticas puede ser empleada al utilizar un campo magnético externos que dirija dichas partículas o con biofuncionalización de ellas a través de moléculas que sean capaces de detectarse por dianas específicas. Los campos magnéticos pueden ser estáticos o alternos con

el fin de que las nanopartículas adquieran una velocidad específica y así puedan ser dirigidas a zonas de interés para reducir así los efectos secundarios sean menores o no se presenten en tejidos sanos y focalizar la zona de acción del fármaco (Figura 6) [57]-[58].

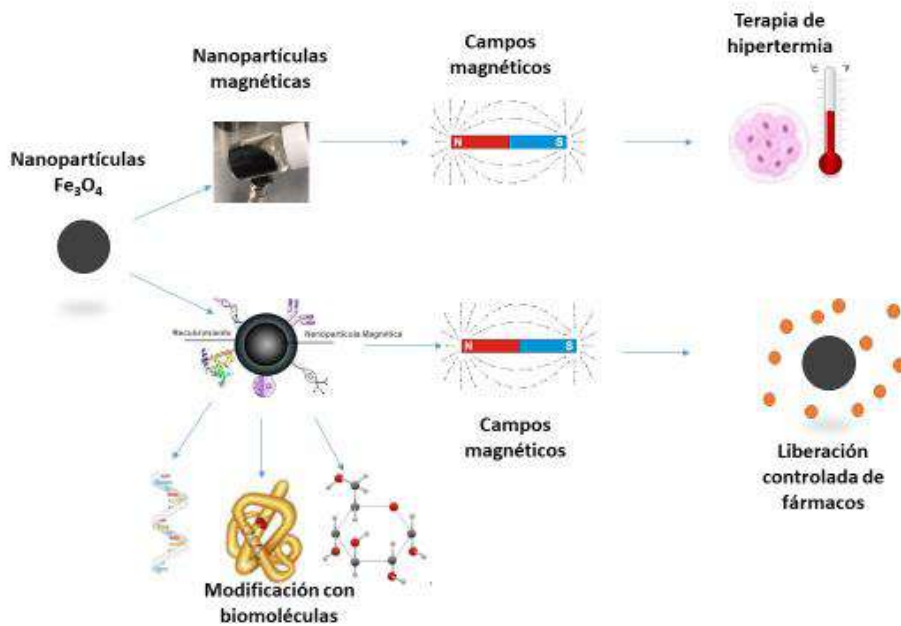


Figura 6 Aplicaciones *in vivo* de nanopartículas magnéticas en hipertermia y liberación de fármacos [58]

En el área de diagnóstico el uso de nanopartículas magnéticas en la técnica de resonancia magnética nuclear se basa en el hecho de que los agentes de contraste modifican la velocidad de relajación magnética de los protones de su entorno y cambia el contraste de la señal, debido a que el principio básico de la técnica es la diferencia de las relajaciones magnéticas que se presentan en los protones del agua entre tejidos y fluidos biológicos dentro del organismo. El uso de las nanopartículas magnéticas como agentes de contraste se aplica para aumentar el contraste de la imagen entre tejidos sanos y los que estén dañados, y analizar si el fluido sanguíneo o los órganos funcionan adecuadamente [14]. Además, las nanopartículas magnéticas tienden a acumularse en tejidos donde existe una alteración vascular, específicamente en tumores. Su interacción en el estudio de RMN durante la T2

generan negativos en las imágenes como se observa en la Figura 7 que se observa un cambio considerable al usar la magnetita como agente de contraste. Otra aplicación que se ha está empleando en los últimos años son en enfermedades inflamatorias como aterosclerosis o artritis reumatoide donde el sistema de fagocitosis es el que actúa como marcador ya que empieza a llamar a los macrófagos los cuales actúan con las nanopartículas magnéticas para empezar a eliminarlas [59].

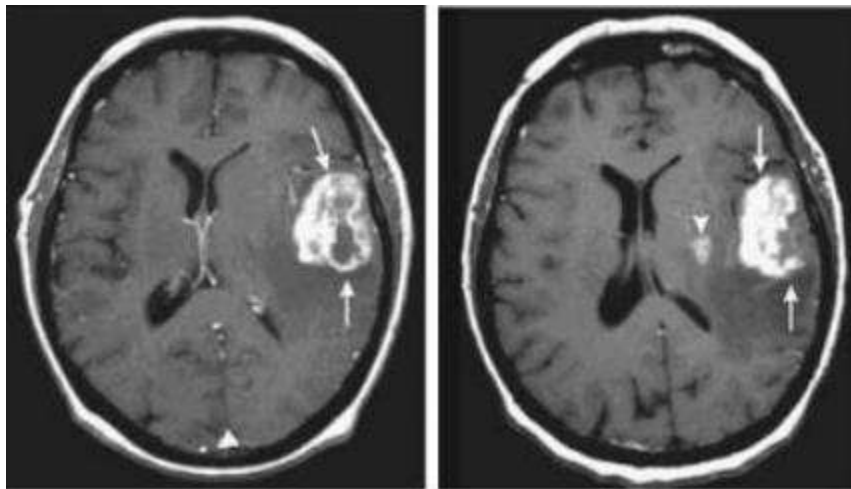


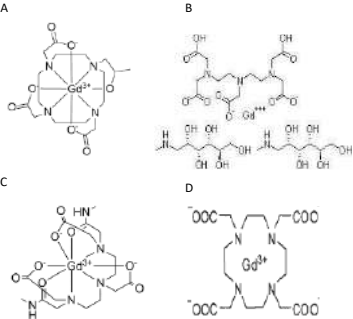
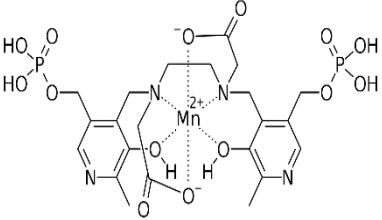
Figura 7 Resonancia Magnética Nuclear de un tumor cerebral con de contraste de Gadolinio (izq) y empleando un agente de contraste a base de magnetita (derecha) [14]

4.7 Agentes de contraste

Se conocen como agentes de contraste a la sustancia o sustancias que se emplean para resaltar u opacar estructuras anatómicas patológicas o normales por medio de su introducción en el organismo por cualquier vía de administración (oral, rectal, vaginal, endovenoso, intraarteriales, intraarticulares, intracanaliculares). Otro uso de los agentes de contraste es el estudio de la perfusión arterial y la diferenciación de densidad entre tejidos en estudios de imagen en tiempo real. Para clasificarlos, existen diferentes categorías que van desde su composición química, el tipo de modificación en la imagen que genera, vía de administración o el método de estudio empleado [60]. En la resonancia magnética se encuentran los paramagnéticos y los superparamagnéticos dentro de los cuales existen 6 grandes tipos de agentes de

contraste comerciales actualmente utilizados, los cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 Agentes de contraste empleados en Resonancia magnética nuclear [62]

Agentes de contraste comerciales para RMN	Tipos	Imagen
Quelatos de Gadolinio	<ul style="list-style-type: none"> • Gadoteridol • Gadopentetato de dimeglumina • Gadodiamida • Gadoterato de meglumina 	
Quelato de Magnesio	<ul style="list-style-type: none"> • Mangafodipir trisódico 	
Partículas de hierro	<ul style="list-style-type: none"> • SPION • USPIO 	

Además de que estas sustancias se pueden clasificar dependiendo de la zona de contraste en la que se emplea debido a las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los compuestos como por ejemplo la osmolaridad, ionicidad, viscosidad. Las SPION se emplean principalmente para valorar patologías hepáticas, las USPIO para evaluar tejidos linfáticos. El quelato de magnesio se emplea debido que se introduce de manera indirecta en los hepatocitos. Los quelatos de gadolinio se utilizan en casi todas las zonas anatómicas [63].

Las reacciones adversas que se generan en el organismo cuando los agentes de contraste se introducen se clasifican en leves (calor, picazón generalizada, erupciones cutánea, náuseas, vómitos, escalofríos, temblores, etc.), moderados (broncoespasmo, hipotensión y un grado más elevado de los síntomas leves) y

severos (convulsiones, angioedema, edema laríngeo, desmayos, arritmias cardiacas, colapso cardiorrespiratorio y la agravación de los moderados). Los tratamientos para los afectos adversos dependen de la gravedad de dicha reacción, puede ir desde reposo en cama hasta la observación clínica en un hospital [64]-[66].

4.8 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) y nanopartículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro (USPION)

La principal diferencia entre las partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) y las partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro (USPION) es el tamaño aproximado de su diámetro las primeras se encuentran entre los 50-200 nm y las segundas presentan diámetros menores a 50 nm. La diferencia de tamaño es una característica muy importante ya que define el tiempo *in vivo* de estos materiales. Las SPION tiene un tiempo medio de vida en la sangre de aproximadamente 15 minutos debido a que son fagocitadas por células reticuloendoteliales del hígado y del bazo. Las USPION tienen un tiempo de vida más prolongado en el torrente sanguíneo debido a su tamaño, llegando durar en circulación por más una hora, llegando posteriormente al sistema endocrino y siendo desechadas después por medio de la orina [67]-[68].

El tamaño que presentan las USPION tiene la característica de presentar una estabilidad coloidal buena en comparación con las SPION, por lo cual los ferrofluidos que contienen USPION presentan una permanencia en la sangre por aproximadamente hasta 2 horas en su tiempo medio. Además de que presenta la ventaja de que para su eliminación del cuerpo humano se acumula en los ganglios linfáticos y son excretados por la orina y heces. Lo único que se debe de cuidar es que sean mayores de 5 nm para evitar que sean filtrados directamente por los riñones, esta relación entre tamaño de partícula y permanencia se explica en la Figura 8 [54].

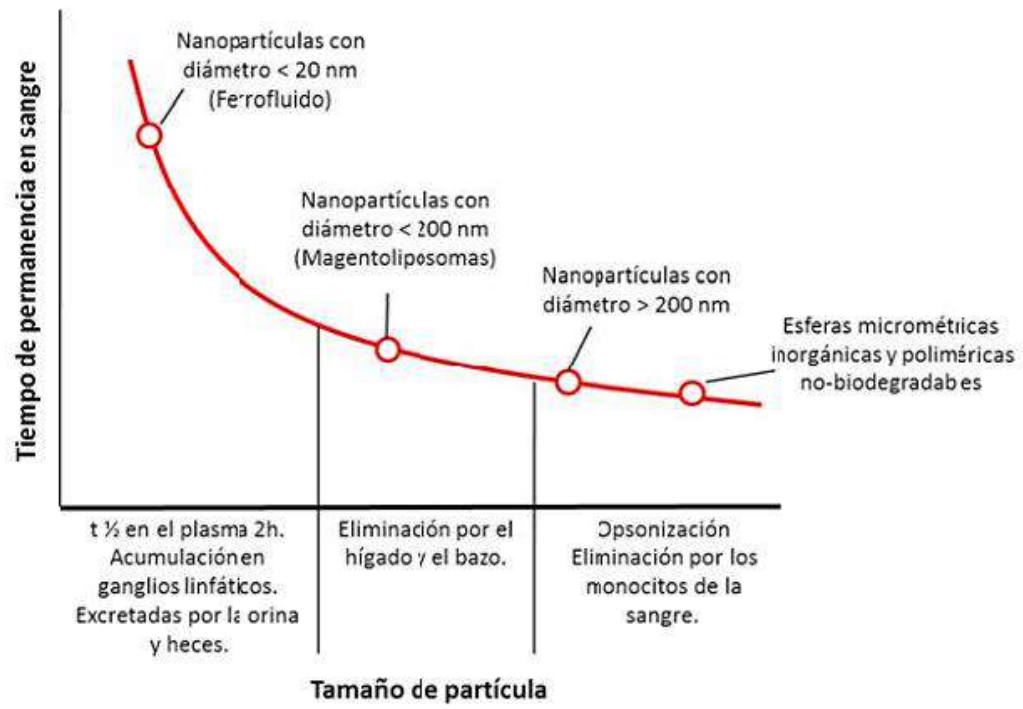


Figura 8 Tiempo de permanencia en la sangre respecto al tamaño de las nanopartículas [54]

CAPITULO 5

5. Hipótesis y objetivos

5.1 Hipótesis

La modificación del composito Fe_3O_4 con SiO_2 generará una mayor biocompatibilidad comparada con la presentada por las nanoestructuras de Fe_3O_4 en ensayos *in vitro* con células de cáncer.

5.2 Objetivo general

- Comparar la respuesta toxicológica *in vitro* de los materiales nanoestructurados Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en células cancerígenas para evaluar su biocompatibilidad.

5.3 Objetivos específicos

- 1) Sintetizar los materiales nanoestructurados con base en magnetita y magnetita con óxido de silicio mediante el proceso de co-precipitación química asistido con baño ultrasónico.
- 2) Caracterizar los materiales nanoestructurados mediante técnicas fisicoquímicas (SEM, XRD, Potencial Z y EDS) para determinación de sus características morfológicas y cristalinas.
- 3) Evaluar los compositos Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, en pruebas *in vitro* en células de la línea HT29 para determinar su viabilidad celular.

CAPITULO 6

6. Metodología

6.1 Síntesis de los materiales nanoestructrados

6.1.1 Síntesis de Fe_3O_4

La síntesis del material magnetita (Fe_3O_4) se realizó mediante la técnica de coprecipitación química asistida por baño ultrasónico. Se partió de las sales de Cloruro de hierro (III) y Sulfato de hierro (II), ambas sales se disolvieron en agua destilada en proporción 1.175:1 en volumen respectivamente. Posteriormente se agregaron dichas disoluciones en un matraz de tres bocas en baño ultrasónico con nitrógeno para generar una atmosfera inerte por 15 minutos. Después se agregó 7 ml de Hidróxido de Amonio al 30% para la relación antes mencionada, manteniendo la atmosfera inerte por otros 15 minutos. Al finalizar todo el proceso anterior, se realizaron lavados con agua destilada al precipitado obtenido hasta conseguir un pH de 7 y finalmente se colocaron en suspensión en alcohol etílico para ser llevado al horno de convección a 50°C por 4 horas. El producto final se molió para obtener el polvo de las nanopartículas como se observan en la Figura 9 [69]-[70].



Figura 9 Material Fe_3O_4 obtenido

6.1.2 Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Para la obtención del material magnetita (Fe_3O_4) modificado con óxido de silicio (SiO_2) por el método de Stöber. Se partió de 0.1g de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) suspendidas en una solución de alcohol etílico, agua destilada e hidróxido de amonio al 30% (NH_4OH). Dicha solución se llevó baño ultrasónico por 15 minutos para poder suspender al material. Después se procede a agregar una solución de 1% en volumen de TEOS (orto silicato de tetraetilo) en 25 ml de alcohol etílico. Posteriormente la solución de TEOS con alcohol etílico a 1% volumen se vertió a la solución que se encontraba suspendida con la magnetita y se deja en baño ultrasónico por 20 minutos más. Finalmente se obtuvo un precipitado al cual se le realizaron 2 lavados con alcohol etílico y se dejaron en suspensión en alcohol etílico para meterlas al horno de convección a 50°C por 12 horas obteniendo el material como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** [71]-



Figura 10 Material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ obtenido

72].

Ambos materiales se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis elemental (EDS), adquiriendo la información a través de un espectrómetro JEOL JSM-6510LV acoplado a un analizador XRF-1800 a 500x y 2500x con un voltaje de aceleración de 15 kV . Los patrones de difracción de rayos

X (XRD) se obtuvieron utilizando un difractómetro avanzado Bruker D8 que emplea un tubo de Cu para generar la radiación de $Cu\alpha$ con una $\lambda=0.154$ nm dentro del rango de los ángulos de Bragg $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ en pasos de 0.03° . Para Potencial Z se adquirieron los datos a través de un ZETASIZER ULTRA MADLS a condición de pH 7.

6.2 Ensayos in vitro

Los cultivos celulares que se emplearon fue la línea celular HT29 que corresponde a cáncer de colon. Las células se colocaron en una placa para cultivos de 24 pozos de fondo plano para crecerlos por 7 días con sustancia nutricional, como el mostrado en la Figura 11, hasta que estuvieron en condiciones fisiológicas humanas normales para la experimentación. Se mantuvieron dentro de una incubadora en condiciones idóneas biológicas a 37° C, 5% de dióxido de carbono (CO_2) y el resto con oxígeno (O_2). Se seleccionaron las dosis de 320, 160, 80, 40 y 20 ppm de concentración de nanopartículas debido a lo mostrado en la literatura [71] Se partió desde una solución madre la cual se hizo pasar por un filtro con poros de $2 \mu m$ de diámetro para evitar que algún organismo extraño entre con contacto con nuestro cultivo celular. El medio con el que se prepara la solución es albumina de suero bovino (ASB) al 5%. La primera disolución es de $320 \mu g/ml$ y de ahí se inicia para obtener las demás. Se realizaron las diluciones para cada uno de los materiales que se compararon en los cultivos (magnetita Fe_3O_4 y magnetita modificada con oxido de silicio $Fe_3O_4@SiO_2$). Se prepararon 5 pozos por material para las dosis y 1 pozo extra para tener un control para ser referencia del conteo celular. En cada pozo se colocó 1 ml de la disolución para dejarlos que interactuaran por 24 horas y el cultivo se regresó de nuevo en la incubadora. Pasado ese tiempo se retiró la solución de ASB de los cultivos y se procedió a colocar tripsina para que las células se liberaran de la matriz celular y así se llevaron a centrifugar a una velocidad de 3000 rpm para asegurar que en el conteo las células estén separadas entre sí. Posteriormente se realizó el conteo celular de cada uno de los pozos por medio de un microscopio y una placa de Neubauer [73]-[74].



Figura 11 Caja de pozos de cultivos celulares de la línea HT29

CAPITULO 7

7. Resultados

7.1 SEM

El análisis morfológico del material se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 12 en la imagen (A) se observa que el material presenta aglomerados que no tienen formas ni tamaños uniformes. Además de que se presenta una variación aparente de los tamaños de aglomerados del material presentando así un comportamiento homogéneo del efecto de aglomeración. La imagen de la Figura 12 la imagen (B) del lado derecho, la cual tiene un acercamiento mayor, nos sigue mostrando que se tiene presencia de aglomerados de gran tamaño y que no se logra distinguir partículas sueltas. Se alcanza a visualizar lo que aparentemente son partículas esféricas señaladas en la imagen (B) de la Figura 12. Se realizó una medición aproximada a través de las micrografías obtenidas, se realizó el software ImageJ y se realizó un promedio de los valores obtenidos dándonos así el valor aproximado de 269 nm, recordemos que la técnica de SEM no se emplea para esto, pero se decidió usarla como una manera indirecta de obtener dicho dato.

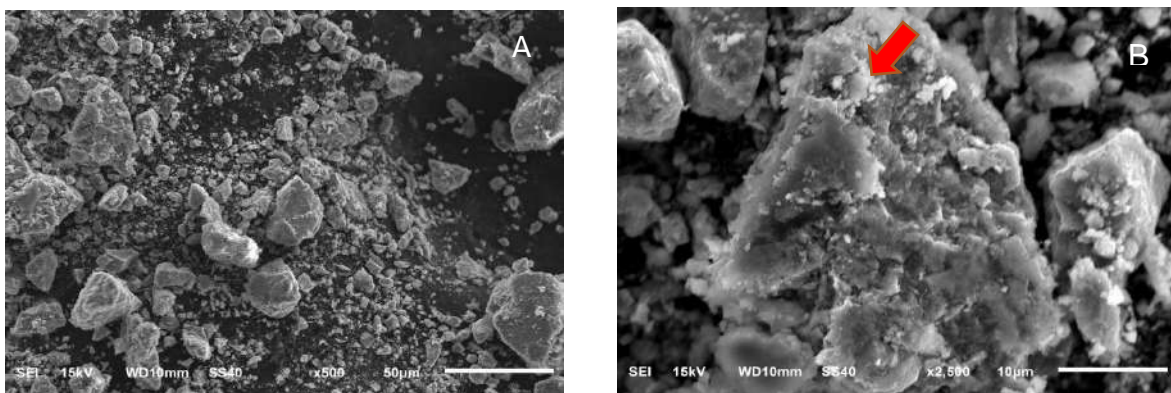


Figura 12 Micrografía del material Fe_3O_4 (A) x500 aumentos y (B) x2500 aumentos

En la Figura 13 se observa al material de magnetita modificado con dióxido de silicio $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, en dicha figura en la imagen (A) se observa un aglomerado de gran tamaño con algunos más pequeños a su alrededor. También se logra percibir que

dichos aglomerados llegan a medir algunas micras por lo cual aparentemente no tenemos presencia de nanopartículas, pero con la posibilidad de que se contengan nanoestructuras en los aglomerados.

Además de que la modificación con óxido de silicio se observa que aparentemente se tiende a generar conglomerados más grandes lo cual se le puede atribuir por la interacción que hay entre las partículas de magnetita y el material que se le añade. Se le realizó un acercamiento de 2500 veces (Figura 13, imagen (B)) en la se observa que la superficie del material donde se observa un poco más homogénea la distribución [75]. Se realizó una medición indirecta aproximada a través del analices de las micrografías de las partículas en el software ImageJ obteniendo un tamaño promedio de 364 nm.

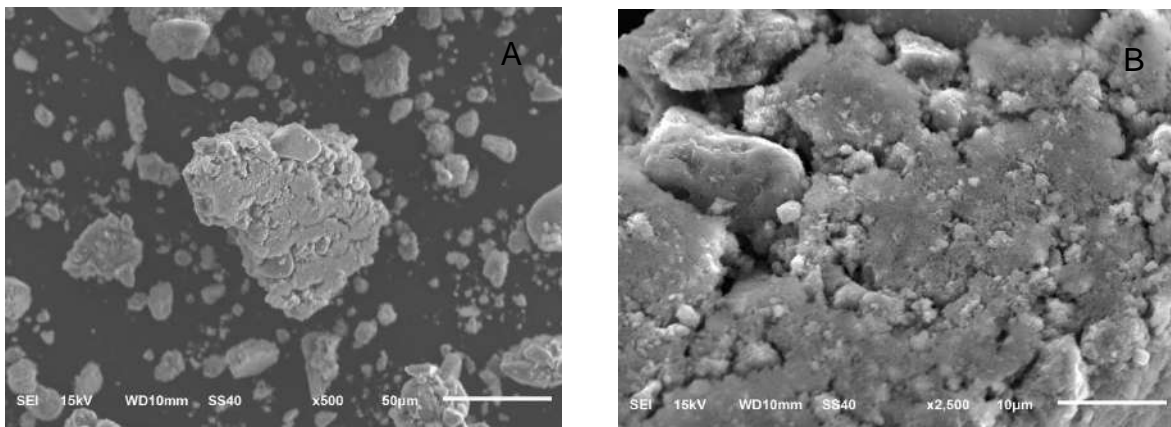


Figura 13 Micrografia de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ (A) 500 aumentos y (B) 2500 aumentos

7.2 Análisis elemental (EDS)

Como caracterización superficial complementaria se realizó un mapeo elemental de los materiales Fe_3O_4 con un voltaje de aceleración de 15 kV. En la Figura 14 se observa en la imagen (B) la presencia de los átomos de hierro presentes en la superficie de la muestra y la imagen (C) la de los átomos de oxígeno en la superficie, que son los elementos que conforman a la magnetita. Se percibe en la imagen (A) que en la zona más superficial (al menos en los primeros 2 μm) de dicho material tenemos zonas donde se encuentran mayor número de átomos de oxígeno o átomos

de hierro, recordemos que es en las zonas más superficiales y son las que estarán en contacto con el exterior, aun así, en su mayor parte tenemos la combinación de ambos iones en la mayor parte de la superficie del material. La presencia de ambos elementos nos habla que estamos en presencia de un óxido hierro y para confirmar que efectivamente el material es magnetita se realizó un análisis elemental obteniendo la gráfica de la Figura 15 donde se muestra la señal correspondiente a los átomos de hierro y el de oxígeno y el porcentaje de ambos materiales es de hierro al 78% y de oxígeno al 21% indicándonos que efectivamente estamos en presencia de magnetita.

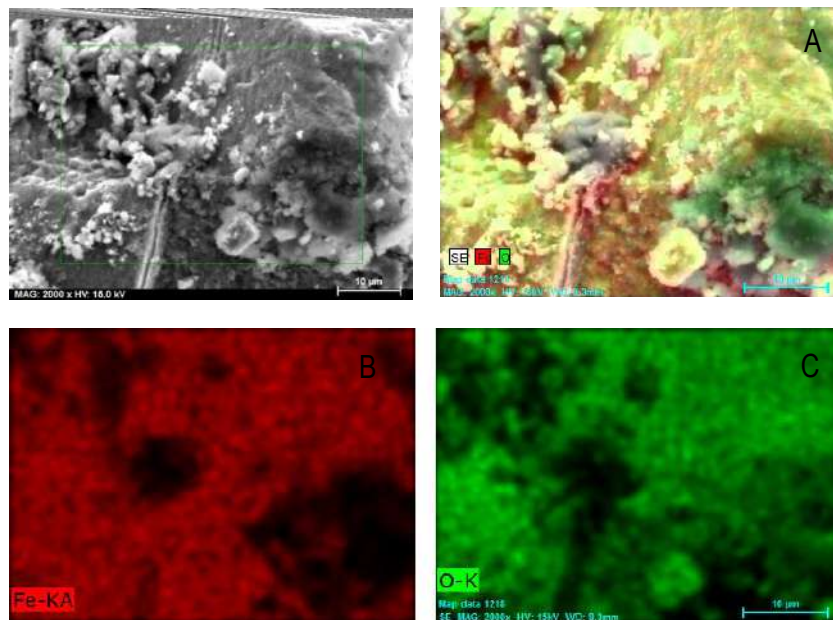


Figura 14 Mapeo superficial del material Fe_3O_4 (A), elementos de Fe en la superficie

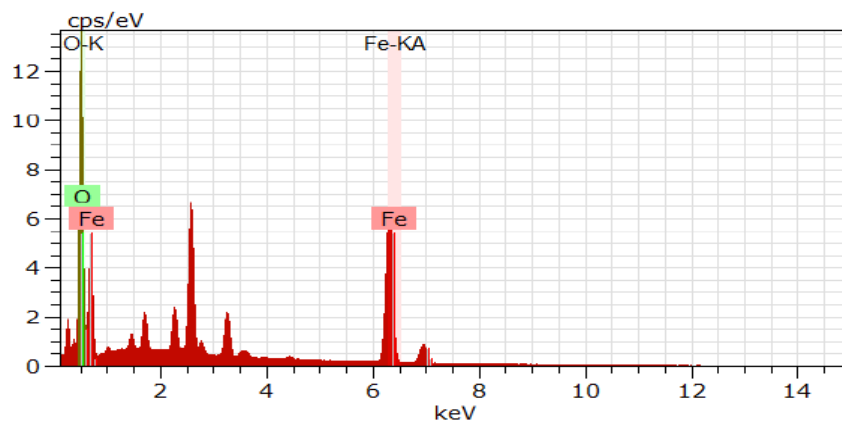


Figura 15 Analisis elemental del material Fe_3O_4

El análisis al material modificado con dióxido de silicio ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) arrojó las imágenes que se observan en la Figura 16 donde la imagen (A) pertenece a los átomos de hierro presentes, en la imagen (B) a los átomos de oxígeno y la imagen (C) los átomos de silicio sobre la parte más cercana a la superficie. La imagen (D) muestra hay zonas donde solo se encuentran átomos de hierro expuestos en la superficie, dejando inferir que el recubrimiento de óxido de silicio no abarca toda la zona superficial del material. Además de que con los resultados podemos confirmar que en la zona más superficial tenemos presencia del dióxido de silicio el cual está expuesto a estar en contacto con el exterior.

El análisis elemental que se realizó al material recubierto (Figura 17) muestra que a pesar del recubrimiento que se aplicó al material magnetita se sigue teniendo la presencia de átomos de hierro y los átomos de oxígeno del material magnetita, además el del silicio perteneciente a dicho recubrimiento.

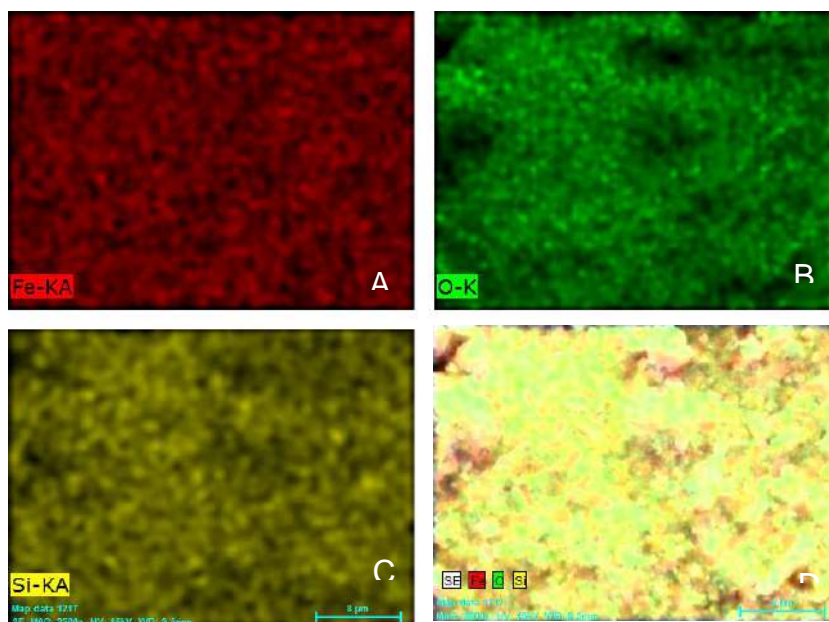


Figura 16 Mapeo superficial del material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (D), elementos de Fe en la superficie (A), elemento O (B) y elemento Si en la superficie (C)

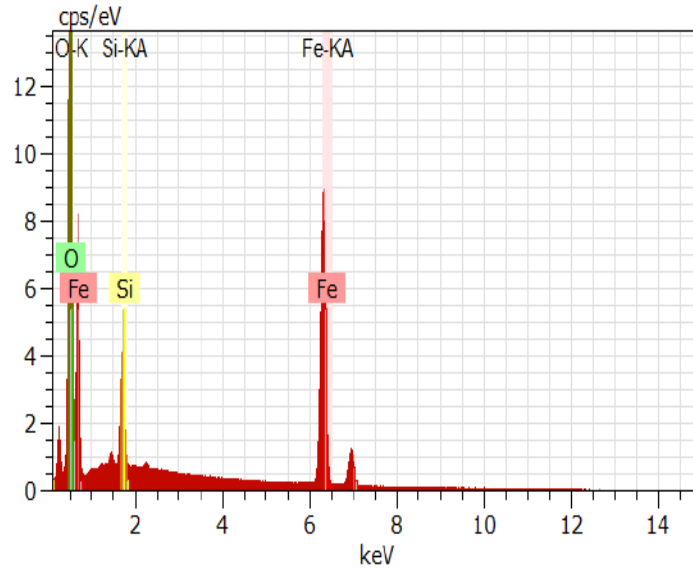


Figura 17 Analisis elemental del materia $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

7.3 Potencial Z

Se procedió a realizar el análisis de las partículas en suspensión a través de potencial Z lo cual nos proporciona información sobre la estabilidad de las partículas y la distribución del tamaño de estas. La grafica de la Figura muestra el valor obtenido de las partículas de Fe_3O_4 que fue de 19.1 mV, lo que indica que las partículas presentan una estabilidad baja según lo establecido por el método, que dice que los potenciales que se encuentren entre los valores de -30 mV y 30mV presentan baja estabilidad en solución, generando agregados que tienden a la sedimentación [76]. Además de que solo se observa un valor por lo cual se puede diferir que existe una monodispersión de las partículas a pesar de no conocer el tamaño de su radio hidrostático, con lo cual se afirmar que tenemos una distribución homogénea del tamaño de las partículas aparentemente o del tamaño de los agregados que se forman en suspensión.

Las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ presentaron el comportamiento observado en la gráfica de la Figura 18 muestran que el valor del potencial Z cambio de signo siendo de -11.96 mV, es decir, que las partículas presentan aún menor estabilidad que las

de Fe_3O_4 y que a su vez el recubrimiento de dióxido de silicio genera cambios en la superficie de dichas partículas [76]. Los valores obtenidos en ambos materiales tienen el símbolo contrario a la carga superficial de las partículas de dichos materiales y estas corresponden a lo reportado [76]. Además, indica que las partículas tienden a generar agregados y por ende se genera el efecto de sedimentación en las soluciones que se coloquen dichas partículas. También presentan mono dispersión, por lo cual se puede inferir que a pesar del recubrimiento agregado se sigue observando que hay una distribución homogénea del tamaño de los agregados o de las partículas generadas.

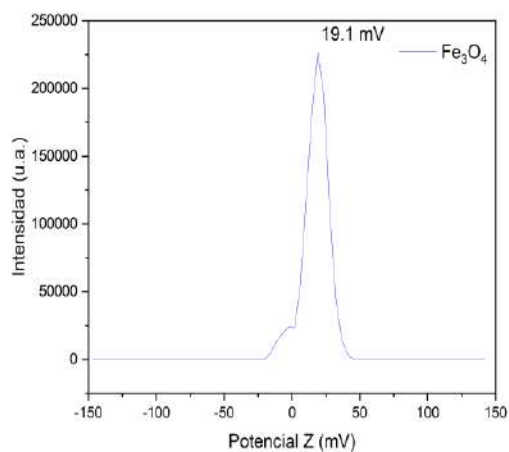


Figura 18 Potencial Z obtenido al analizar el material Fe_3O_4

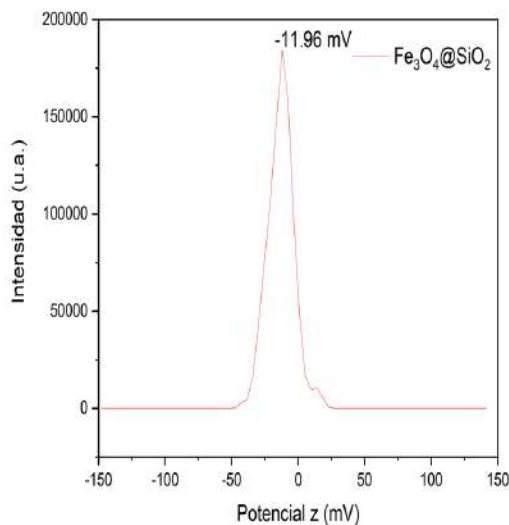


Figura 18 Potencial Z obtenido al analizar el material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

7.4 XRD

Para confirmar la presencia de la estructura cristalina correspondiente del material sintetizado Fe_3O_4 los difractogramas obtenidos (Figura 19) se compararon con los obtenidos de la base de datos RRUFF (RRUFF ID: R060191) [77], los cuales muestran las difracciones de Bragg correspondientes a la estructura de espinela inversa la cual es característica del material Fe_3O_4 en los ángulos 30.19° , 35.44° , 43.17° , 53.55° , 57.10° y 62.60° que corresponden a los planos (2 0 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0) respectivamente, siendo el más representativo de dichos planos el (3 1 1). Confirmando así la presencia de magnetita en la muestra y no se llega a observar otros óxidos de hierro como por ejemplo maghemita o hematita.

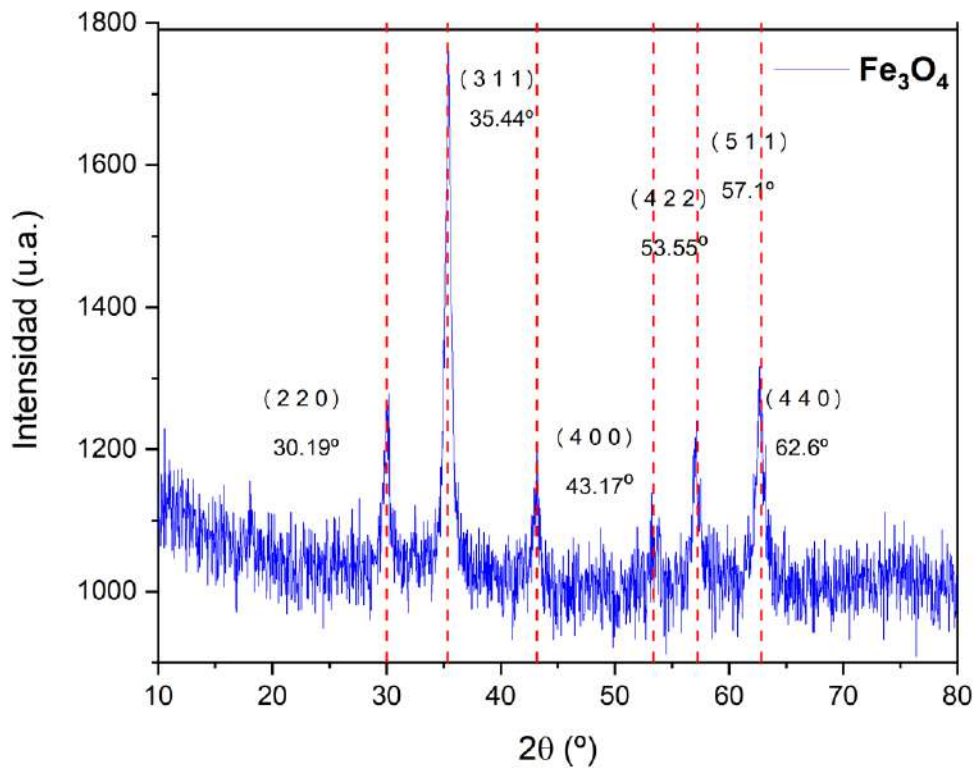


Figura 19 Difractograma obtenido del material Fe_3O_4

Para la muestra Fe₃O₄ modificada con SiO₂ mediante el método de Stöber se obtuvo el difractograma (Figura 20) en el que se observa que se mantienen los planos obtenidos en la muestra sin modificar, por lo que se confirma que el recubrimiento de silicio no modifica la estructura cristalina a pesar de verse un ligero corrimiento hacia la izquierda esto no llega a ser representativo. Se logra observar en la línea base una deformación convexa que según lo ya reportado [78] es el aporte del dióxido de silicio en el recubrimiento añadido ya que este material es amorfo y no aporta ningún dato a la información de la estructura.

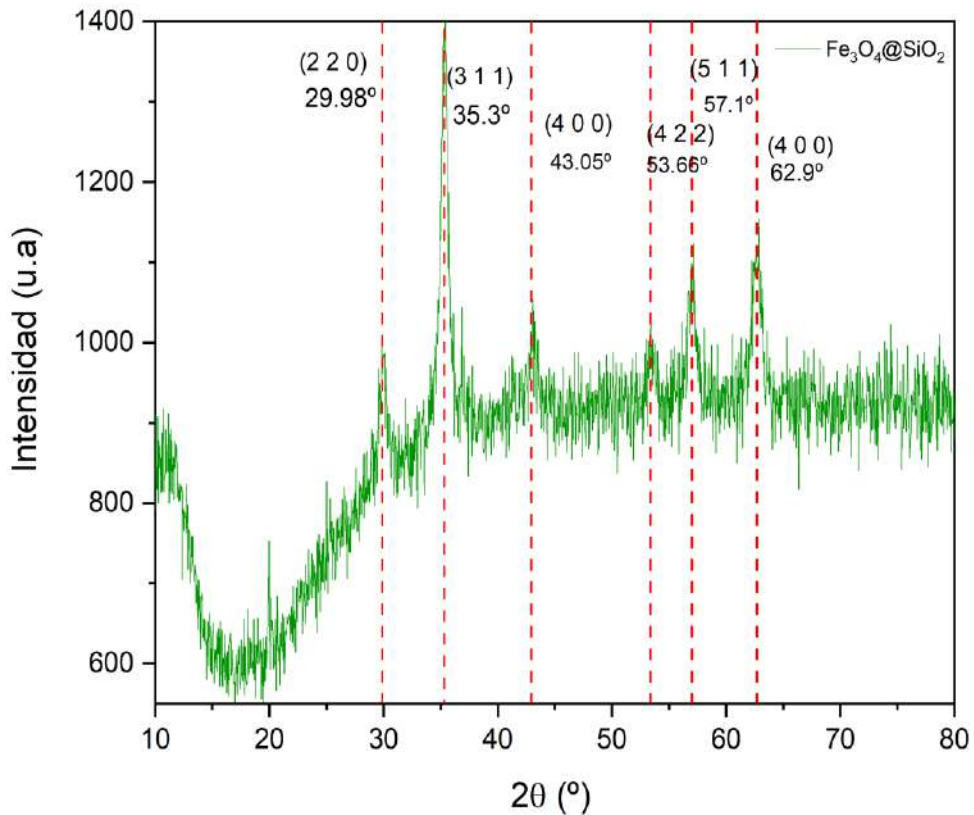


Figura 20 Difractograma obtenido del material Fe₃O₄@SiO₂

Mediante el método de Williamson-Hall que emplea las difracciones de Bragg se procedió a calcular el tamaño de cristalito mediante la ecuación 1.

$$\beta_{total} = \beta_{tamaño} + \beta_{esfuerzo} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde

$$B_{total} = \frac{0.9\lambda}{L\cos\theta} + 4\epsilon\tan\theta \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde en la ecuación 2 se despeja y se realiza una regresión lineal de los datos obtenidos que corresponde a cada uno de los picos que son las distancias interlineares de cada uno de los planos presentes en la estructura. Obteniendo el tamaño de 5.83 nm correspondiente a Fe₃O₄ y de 7.01 nm para Fe₃O₄@SiO₂ (Anexo).

También se procedió a emplear el método Debye Scherrer para determinar el tamaño de cristalito y compararlo con el obtenido para esto se usó la ecuación 3 correspondiente a este método para la distancia de cada uno de los planos y obtener el tamaño de cristalito según cada uno de los picos para finalmente promediarlos para poder compararlos con el método de Williamson-Hall. Obteniendo los valores correspondientes a el material magnetita de 28.48 nm y para el material modificado fue de 29.21 nm.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Ec. (3)}$$

La diferencia que se observa al calcular los tamaños de cristalito en ambos métodos se debe a que el método de Hilliamson-Hall emplea la relación que existe entre el tamaño de cristalito y el estrés generado en la estructura o modificaciones que se puede generar en la red cristalina, como por ejemplo en los materiales dopados. Mientras Debye Scherrer no contempla estos cambios que se pudieran generar por el estrés que se genera en la celda unitaria o en la red cristalina.

7.5 Viabilidad celular

Se procedió a realizar un ensayo celular *in vitro* en celular HT29 que pertenecen a la línea de cáncer de colon con dosis ya establecidas en la bibliografía, siendo la curva de concentraciones la siguiente: 20 ppm, 40 ppm. 80 ppm, 160 ppm y 320 ppm [71]. Posterior a la experimentación se procedió a realizar la contabilización de las células a través de la cámara de Neubauer empleando la ecuación 4.

$$Células/mm^3 = (No. de células contadas)(Factor de dilucion)\left(\frac{1}{Factor de volumen}\right) \quad Ec. (4)$$

Se obtuvo una concentración de 85,000 células/mm³ del cultivo de control y los valores correspondientes a cada una de las concentraciones que se muestran en la grafica de la Figura 21, en la cual se observa que la concentración del material Fe₃O₄ 80 ppm y 160 ppm presentan la viabilidad celular mas bajas con respecto a las otras concentraciones, siendo respectivamente de 86.77% y 83.09 %, y que para el material modificado Fe₃O₄@SiO₂ las concentraciones que presentan la menor viabilidad celular son 20 ppm y 160 ppm, siendo de 90.45 % para ambas. Se realizaron dos repeticiones del ensayo celular obteniendo las mismas respuestas de las concentraciones. La viabilidad celular se calculó a partir de la ecuacion 5.

$$Viabilidad celular = \frac{n^{\circ} de células vivas}{n^{\circ} de células adquiridad} \times 100 \quad Ec. (5)$$

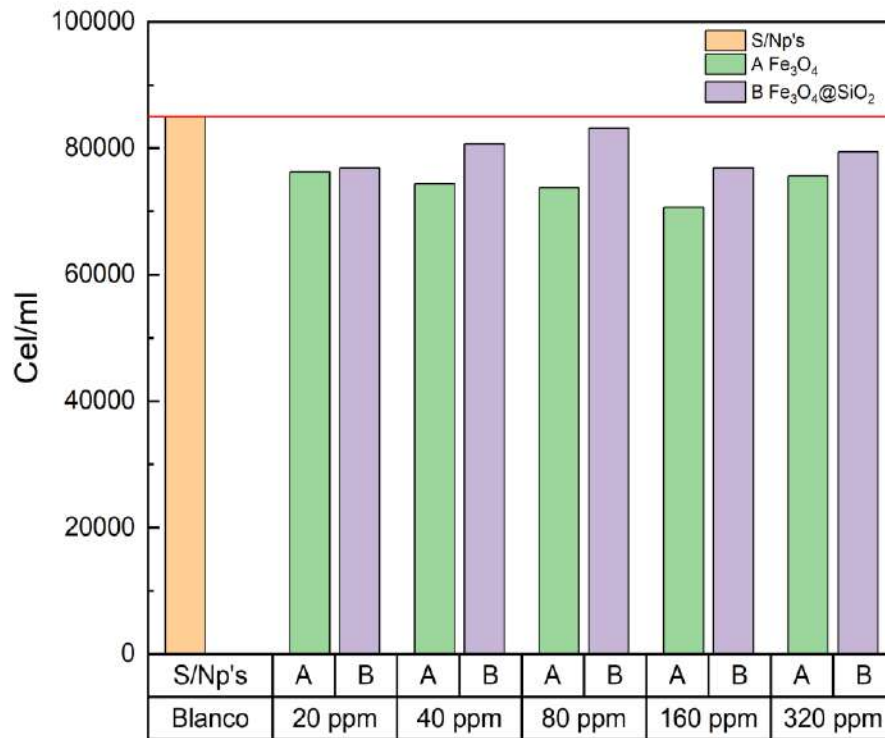


Figura 21 Vialidad celular obtenida de los ensayos celulares en línea HT29

La muerte celular que se presentó en el material de magnetita se atribuye a los átomos de hierro que están expuestos en la superficie del material, que son observados según los resultados de EDS y que probablemente lixiviaron iones que causaron un estrés a las células generando así que muriesen y que al estar aumentando las dosis generaron aglomerados de mayor tamaño, además de que al presentar una baja estabilidad coloidal se llegaron a sedimentar en el fondo del pozo logrando interactuar con un mayor número de células.

Obteniendo una curva de dosis respuesta convexa en la cual va decayendo conforme se aumenta en la dosis llegando al punto menor en la dosis de 160 ppm, pero aparentemente recuperándose en la de 320 ppm. El comportamiento que se obtuvo en el material recubierto con silicio fue completamente diferente ya que

según lo obtenido en las caracterizaciones fisicoquímicas las zonas de las partículas que tienen presencia de átomos de hierro disminuyeron al ser modificadas y de la misma manera la lixiviación causada por estas partículas tuvo que disminuir generando una menor muerte celular en los pozos. Además, la estabilidad coloidal era menor que en las partículas de magnetita, por lo cual la interacción entre las células tuvo que ser mayor desde el principio. El comportamiento de la curva dosis-respuesta fue una curva cóncava que aumentaba la viabilidad celular conforme a la dosis llegando a su punto máximo en la dosis de 80 ppm y que empezó a disminuir posterior a esto.

CAPITULO 8

8. Conclusiones

Mediante el método de co-precipitación química se obtuvo un material magnético correspondiente a Fe_3O_4 el cual fue modificado en su superficie por el método de Stöber con SiO_2 . Además de que gracias a la baja energía térmica aplicada al sistema de síntesis no se altera la estructura cristalina del material ni sus propiedades magnéticas que pueden presentarse cuando se obtiene maghemita o hematita.

La interacción de las partículas de Fe_3O_4 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ en los cultivos celulares *in vitro* demostró que la modificación de la superficie de las partículas de Fe_3O_4 aumenta su biocompatibilidad en comparación con las partículas sin modificar.

Ambos materiales son considerados como viables para ser biomateriales según lo marcado por la ISO 10993 que indica que un material tiene que presentar al menos un 80% de viabilidad celular para ser considerado un biomaterial.

Sin embargo, el que mostró las mejores propiedades para seguir siendo modificado o para recubrirlo por otro método es el de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$. Este en comparación con el material sin modificar, tiene una diferencia del 10%.

También se debería de tener en cuenta su tamaño aproximado de partícula que ronda entre los 364 nm por lo cual tenemos presencia de lo que aparenta ser un material que se sedimenta en el fondo del pozo del cultivo y no interfiere en el crecimiento celular dentro de dichos pozos, esto se puede fundamentar con los resultados obtenidos en potencial Z, ya que en ellos se puede observar que el material modificado presenta menos estabilidad coloidal en comparación con el material sin la modificación.

Como conclusión, la hipótesis que se planteó en el trabajo fue acertada. Debido a que el material modificado presenta mayor biocompatibilidad que el material sin modificar.

8.1 Perspectivas

Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que la investigación debería de continuar y cubrir los siguientes objetivos:

- Mejorar el método de recubrimiento de las partículas de magnetita con óxido de silicio para obtener un core-shell para asegurar que los átomos de hierro no queden expuestos para evitar la lixiviación de iones de dichos átomos.
- Encontrar otra curva de dosis-respuesta a partir de la probada en esta investigación para comprobar que el comportamiento de las partículas sigue siendo el mismo.
- Aumentar el número de pruebas in vitro para poder realizar un análisis estadístico para determinar el error y confirmar si la investigación es repetible y reproducible.

CAPITULO 9

9. Referencias

- [1] J. Kim, Y. Piao, T. Hyeon, Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy, *Chemical Society Reviews* 38 (2) (2009) 372–390
- [2] L L Aremov, A V Panov *Ostatoch'naya Namagnichennost' Ul'tradispersnykh Magnetikov (Residual Magnetization of Superdispersed Magnetic)* (Vladivostok: Far Eastern University, 2004)
- [3] Colombo M, Carregal-Romero S, Casula M, Gutiérrez L, Morales M, Böhm I et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2012; 41(11):4306.
- [4] Leon, L., Chung, E. J., & Rinaldi, C. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. *Nanoparticles for Biomedical Applications*, 1–4. (2020) doi:10.1016/b978-0-12-816662-8.00001-1
- [5] Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(11):1252-1265.
- [6] Gomes, M. E., & Reis, R. L. (2004b). Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 2: systems for temporary replacement and advanced tissue regeneration. *International Materials Reviews*, 49, 274e285.
- [7] Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1471–1504
- [8] Roco MC. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *J Nanoparticle Res* 2011;13:427e45
- [9] Gubala V, Johnston LJ, Liu Z, Krug H, Moore CJ, Ober CK, Schwenk M, Vert M. Engineered nanomaterials and human health: part 1. Preparation, functionalization and characterization (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2018;90:1283e324.

- [10] Coral, D. F., & Mera, J. A. (2017). A Guide to Study Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Biomedical Applications. Part I. *Ingeniería Y Ciencia*, 13(25), 229–249. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.25.10>
- [11] Neuwelt, E. A., Hamilton, B. E., Varallyay, C. G., Rooney, W. R., Edelman, R. D., Jacobs, P. M., & Watnick, S. G. (2009). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney International*, 75(5), 465–474.
- [12] Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, et al. Capacity of human monocytes to phagocytose approved ironoxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol* 2004;14:1851–1858. [PubMed: 15249981]
- [13] Murillo T, Sandquist C, Jacobs PM, et al. Imaging brain tumors with ferumoxtran-10, a nanoparticlemagnetic resonance contrast agent. *Therapy* 2005;2:871–882.
- [14] Neuwelt EA, Varallyay CG, Manninger S, et al. The potential of ferumoxytol nanoparticle magneticresonance imaging, perfusion, and angiography in central nervous system malignancy: a pilot study.*Neurosurgery* 2007;60:601–611. [PubMed: 17415196]discussion 611–602
- [15] Vellinga MM, Oude Engberink RD, Seewann A, et al. Pluriformity of inflammation in multiplesclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain* 2008;131:800–807. [PubMed:18245785]
- [16] Souza, D. M., Andrade, A. L., Fabris, J. D., Valério, P., Góes, A. M., Leite, M. F., & Domingues, R. Z. (2008). Synthesis and in vitro evaluation of toxicity of silica-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354(42-44), 4894–4897.
- [17] Minaei, S. E., Khoei, S., Khoei, S., Vafashoar, F., & Mahabadi, V. P. (2019). In vitro anti-cancer efficacy of multi-functionalized magnetite nanoparticles combining alternating magnetic hyperthermia in glioblastoma cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*.

- [18] ohammad G, Gazestani A, Khoei S, Khoee S, Emamgholizadeh Minaei S, Motevalian M. In vivo evaluation of the combination effect of near-infrared laser and 5-fluorouracil-loaded PLGA-coated magnetite nanographene oxide. *Artificial cells, nano-medicine, and biotechnology*. 2018:1–9.
- [19] R.G. Sivakumar Balasubramanian, Y. Nagaoka, S. Iwai, M. Suzuki, V. Kizhikkil, Y. Yoshida, et al., Curcumin and 5-fluorouracil-loaded, folate- and transferrin-decorated polymeric magnetic nanoformulation: a synergistic cancer therapeutic approach, accelerated by magnetic hyperthermia, *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 437.
- [20] Grajales P. E. G., Cazares F. C., Díaz A. L., y De Alba R, V. (2014). Factores de riesgo para el cáncer de mama en México: revisión de estudios en poblaciones mexicanas y México-americanas. *Revista CES Salud Pública*, 5(1), 50-58..
- [21] Collà Ruvolo, C., Stolzenbach, L. F., Nocera, L., Deuker, M., Mistretta, F. A., Luzzago, S., ... Karakiewicz, P. I. (2020). *Comparison of Mexican-American vs Caucasian prostate cancer active surveillance candidates. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*.
- [22] Svetlana V. Doubova, Ricardo Pérez-Cuevas. (2020). Supportive care needs and quality of care of patients with lung cancer in Mexico: A cross-sectional study, *European Journal of Oncology Nursing*, Volume 49, 101857, ISSN 1462-3889
- [23] Arrieta O. Ramírez-Tirado L.A. Báez-Saldaña R. Peña-Curiel O. Soca-Chafre G. Macedo-Perez E.O. Different mutation profiles and clinical characteristics among Hispanic patients with non-small cell lung cancer could explain the Hispanic paradox. *Lung Canc*. 2015; 90: 161-166
- [24] Doubova S.V. Aguirre-Hernandez R. Gutiérrez-de la Barrera M. Infante-Castañeda C. Pérez-Cuevas R. Supportive care needs of Mexican adult cancer patients: validation of the Mexican version of the Short-Form Supportive Care Needs Questionnaire (SCNS-SFM). *Support. Care Canc*. 2015; 23: 2711-2719
- [25] Hamidreza Mohammadi, Elahe Nekobahr, Javad Akhtari, Majid Saeedi, Jafar Akbari, Fereshteh Fathi, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles by co-precipitation method coated with biocompatible compounds and evaluation of

in-vitro cytotoxicity, *Toxicology Reports*, Volume 8, 2021, Pages 331-336, ISSN 2214-7500, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.01.012>.

[26] Ricci, M., Miola, M., Multari, C., Borroni, E., Canuto, R. A., Congiusta, N., ... & Muzio, G. (2018). PPARs are mediators of anti-cancer properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) functionalized with conjugated linoleic acid. *Chemico-Biological Interactions*, 292, 9-14.

[27] Karimzadeh, I., Aghazadeh, M., & Shirvani-Arani, S. (2016). Preparation of polymer coated superparamagnetic Iron oxide (Fe). *Int. J. Bio-Inorg. Hybr. Nanomater*, 5(1), 33-41.

[28] Laha, S. S., Thorat, N. D., Singh, G., Sathish, C. I., Yi, J., Dixit, A., & Vinu, A. (2021). Rare-Earth Doped Iron Oxide Nanostructures for Cancer Theranostics: Magnetic Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging. *Small*, 2104855.

[29] Ramírez-García, G., Panikar, S. S., López-Luke, T., Piazza, V., Honorato-Colin, M. A., Camacho-Villegas, T., ... & De la Rosa, E. (2018). An immunoconjugated up-conversion nanocomplex for selective imaging and photodynamic therapy against HER2-positive breast cancer. *Nanoscale*, 10(21), 10154-10165.

[30] Meneses-Brassea, B. P., Cyr, C. M., Martinez, I., Botez, C. E., & El-Gendy, A. A. (2020). Facile synthesis of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles at therapeutic temperature range for magnetic hyperthermia therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(11), 1-6.

[31] Soria, JH; Sosa, EJ; Losardo, RJ: Reconstrucción mamaria post-mastectomía: contribución de cirujanos plásticos argentinos. *Revista Asociación Médica Argentina* (2015), Vol. 128, Num. 2, Pág. 19-28

[32] Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Prospective validation of a 21-gene expression assay in breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2015; First published online September 28, 2015

[33] NovalD V: ú:T OchoaOPuentesD F:T FarriazoD J: G: Magnetita VFe₈O₈GIR Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisisheterogénea *Rev. Colomb. Quim.* 2017,D46VjID G7OJU: ñOIR <httpR//dx:doi.org/j6:jGGA/rev:colomb:quim:vjnj:A7é8j>:

- [34] Margarethe Hofmann-Antenbrink, Brigitte von Rechenberg and Heinrich Hofmann, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications, Nanostructured Materials for Biomedical Applications, 209 ISBN: 978-81-7895-7. Editor M.C. Tan
- [35] Vallet-Regi M, Arcos Navarrete D. Magnetic Nanoceramics for Biomedical Applications. In: Vallet-Regi M, Arcos Navarrete D, ed. by. Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications, 2nd Edition. Madrid: RSC Nanoscience & Nanotechnology; 2016. p. 275-312.
- [36] García Jimeno S. Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas [Tesis Doctoral]. Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia; 2012.
- [37] Pérez-Garnes, M., Morales, V., Sanz, R., & García-Muñoz, R. A. (2021). Cytostatic and cytotoxic effects of hollow-shell mesoporous silica nanoparticles containing magnetic iron oxide. *Nanomaterials*, 11(9), 2455.
- [38] Gutierrez, F. V., De Falco, A., Yokoyama, E., Mendoza, L. A., Luz-Lima, C., Perez, G., ... & Araujo, J. F. (2021). Magnetic Characterization by Scanning Microscopy of Functionalized Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, 11(9), 2197.
- [39] Arias-Ramos, N., Ibarra, L. E., Serrano-Torres, M., Yagüe, B., Caverzán, M. D., Chesta, C. A., ... & López-Larrubia, P. (2021). Iron oxide incorporated conjugated polymer nanoparticles for simultaneous use in magnetic resonance and fluorescent imaging of brain tumors. *Pharmaceutics*, 13(8), 1258.
- [40] Singh, J., Tiwary, A., & Sehgal, S. S. (2021, May). A review on hybrid materials based polysaccharide systems for the applications in the field of biomedical. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2341, No. 1, p. 040023). AIP Publishing LLC.
- [41] M. Santana, Tesis Licenciatura, Facultad de Química UNAM, 2012
- [42] Young W. Jun. Jung W. Seo and Jinwoo Cheon, Nanoscaling Laws of Magnetic Nanoparticles and Their Applicabilities in Biomedical Sciences. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH* Vol. 41 (2008) 89
- [43] Shivang R. Dave and Xiaohu Gao, Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Nanomedicine and Nanobiotechnology, Wires* (2009) 1-27

- [44] Racoviceanu, R., Mioc, M., Soica, C., Caizer, C., & Caizer, I. S. COBALT DOPED Fe₃O₄ NANOPARTICLES–SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND MAGNETIC HYPERTHERMIA APPLICATION.
- [45] Hadjipanayis C, Machaidze R, Kaluzova M, Wang L, Schuette A, Chen H et al. EGFRvIII AntibodyConjugated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging-Guided Convection-Enhanced Delivery and Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Res.* 2010; 70(15):6303-6312.
- [46] Imam S, Lantz-McPeak S, Cuevas E, Rosas-Hernandez H, Liachenko S, Zhang Y et al. Iron Oxide Nanoparticles Induce Dopaminergic Damage: In vitro Pathways and In Vivo Imaging Reveals Mechanism of Neuronal Damage [Abstract]. *Mol Neurobiol.* 2015; 52(2):913-926.
- [47] García Jimeno S. Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas [Tesis Doctoral]. Universitat de Barcelona, Facultat de Fàrmacia; 2012.
- [48] Gupta A, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26(18):3995-4021.
- [49] Wankhede M, Bouras A, Kaluzova M, Hadjipanayis C. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2012; 5(2):173-18
- [50] Rezanezhad, A., Hajalilou, A., Eslami, F., Parvini, E., Abouzari-Lotf, E., & Aslibeiki, B. (2021). Superparamagnetic magnetite nanoparticles for cancer cells treatment via magnetic hyperthermia: effect of natural capping agent, particle size and concentration. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 32(19), 24026-24040.
- [51] S. Mirshahghassemi, A. D. Ebner, B. Cai, and J. R. Lead, "Application of high gradient magnetic separation for oil remediation using polymer-coated magnetic nanoparticles," *Separation and Purification Technology*, vol. 179, pp. 328 – 334, 2017.
- [52] V.K. Varadan, L. Chen, J. Xie, *Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems*, 1st edition, Wiley, United Kingdom, 2008.

- [53] Hergt R., Dutz S., Röder M., 2008. Effects of size distribution on hysteresis losses of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *J Phys Condens Matter*, 20, 385214.
- [54] Arruebo M., Fernández-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaría J., 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, 22-32.
- [55] Gebreel, D. T., Yousef, Y. S., Shalay, T. A., Mohammed, M. M., & Badwy, H. A. (2021). The use of iron oxide nanoparticles in hyperthermia of Ehrlich tumor: Thesis abstract. *International Journal of Cancer and Biomedical Research*, 5, 7-7.
- [56] Ho D., Sun X., Sun S., 2011. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Rev* 44, 875-882.
- [57] Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical reviews*, 112(11), 5818-5878.
- [58] Torres Molina, T. (2008). Nanopartículas magnéticas para Hipertermia Y MRI pp16-20. [Trabajo Fin de Máster] Zaragoza.
- [59] Jarrett B.R., Frenzo M., Vogon J., 2007. Size controlled synthesis of dextran sulfate coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*, 18:35603.
- [60] Sartori, Pablo, Rizzo, Franco, Taborda, Norberto, Anaya, Verónica, Caraballo, Armando, Saleme, Clara, Carrizo, Rocío, Cayo, Mabel, Peña, Andrea Medios de contraste en imágenes. *Revista Argentina de Radiología [en línea]*. 2013, 77(1), 49-62[fecha de Consulta 29 de Enero de 2022]. ISSN: 1852-9992.
- [62] Thomsen HS. European Society of Urogenital Radiology guidelines on contrast media application. *Curr Opin Urol* 2007; 17:70-6.
- [63] Goldenberg I, Matetzky S. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ* 2005; 172:1461-71
- [64] Bellizzi, G., Bucci, O. M., & Catapano, I. (2011). Microwave cancer imaging exploiting magnetic nanoparticles as contrast agent. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(9), 2528-2536.

- [65] Jedlovszky-Hajdú, A., Tombácz, E., Bányai, I., Babos, M., & Palkó, A. (2012). Carboxylated magnetic nanoparticles as MRI contrast agents: Relaxation measurements at different field strengths. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(19), 3173-3180.
- [66] Avasthi, A., Caro, C., Pozo-Torres, E., Leal, M. P., & García-Martín, M. L. (2020). Magnetic nanoparticles as MRI contrast agents. *Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications*, 49-91.
- [67] Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., & Sen, T. (2011). *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1-2), 24–46.
- [68] Tietze, R., & Alexiou, C. (2017). Improving cancer imaging with magnetic nanoparticles: where are we now?. *Nanomedicine*, 12(3), 167-170.
- [69] Niculescu, A.-G., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2021). Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods*. doi:10.1016/j.ymeth.2021.04.018
- [70] Tomohiro Iwasaki , Naoya Mizutani , Satoru Watano , Takeshi Yanagida & Tomoji Kawai (2010) Size control of magnetite nanoparticles by organic solvent-free chemical coprecipitation at room temperature, *Journal of Experimental Nanoscience*, 5:3, 251-262, DOI: 10.1080/17458080903490731
- [71] Mohammadi, H., Nekobahr, E., Akhtari, J., Saeedi, M., Akbari, J., & Fathi, F. (2021). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles by coprecipitation method coated with biocompatible compounds and evaluation of in-vitro cytotoxicity. *Toxicology Reports*, 8, 331–336. doi:10.1016/j.toxrep.2021.01.012
- [72] Sun, H., Zeng, X., Liu, M., Elingarami, S., Li, G., Shen, B., & He, N. (2012). Synthesis of size-controlled Fe₃O₄@ SiO₂ magnetic nanoparticles for nucleic acid analysis. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12(1), 267-273.
- [73] Koga, T., Kobayashi, Y., Tomizawa, K., Suda, K., Kosaka, T., Sesumi, Y., ... Mitsudomi, T. (2018). Activity of a novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon

20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: an in vitro study. Lung Cancer. doi:10.1016/j.lungcan.2018.10.019

[74] Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal Transmission of Clonal Cancer Cells Causes Leukemia in Soft-Shell Clams. *Cell*, 161(2), 255–263. doi:10.1016/j.cell.2015.02.042

[75] AHMED, S. A., & SOLIMAN, E. M. (2014). Effect of Aliphatic Diamine Length Functionalized Silica Coated Iron Magnetic Nanoparticles on Metal Capacity and Speed of Cu(II) Uptake from Aqueous Media. *Analytical Sciences*, 30(8), 823–831. doi:10.2116/analsci.30.823

[76] Xi, Z., Zheng, B., & Wang, C. (2016). Synthesis, surface modification, and biolabeling with aptamer of Fe₃O₄@ SiO₂ magnetic nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 8(12), 1061-1066.

[77] Anthony J W, Bideaux R A, Bladh K W, and Nichols M C (1990) Handbook of Mineralogy, Mineral Data Publishing, Tucson Arizona, USA, by permission of the Mineralogical Society of America.

[78] Ning, J., Wang, M., Luo, X., Hu, Q., Hou, R., Chen, W., ... & Liu, J. (2018). SiO₂ stabilized magnetic nanoparticles as a highly effective catalyst for the degradation of basic fuchsin in industrial dye wastewaters. *Molecules*, 23(10), 2573.

[79] Penagos, J. I. C. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3), 133-146.

[80] Chacón, J. A. R., Monroy, J. C. G., Rodríguez, H. E. D., Gallo, C. A. P., Garzon, B. S., Mendoza, J. F. A., & Soto, J. D. C. (2016). Propuesta de diseño de un simulador de un microscopio electrónico de barrido para el desarrollo de aprendizaje significativo en nanotecnología. *Elementos*, 6(6), 135-146.

[81] Torres, T. L.; Mora, C. E. Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la evaluación de dos materias primas cosméticas como restauradoras de la cutícula capilar. *Revista Colombiana de ciencias químico farmacéuticas*. Vol. 39 (I), 5-20. 2010.

[82] S. J. B. Reed, *Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology* (Cambridge University Press, 2005).

- [83] Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. 2016 Gregory V. Lowry, Reghan J. Hill, Stacey Harper, Alan F. Rawle, Christine Ogilvie Hendren, Fred Klaessig, Ulf Nobbmann, Philip Sayre, John Rumble
- [84] Taha, H., Mohamed Hossam, M., Mohamed Kamaly, M., & Khaled, M. (2020). Artificial Neural Network and Response Surface Methodology as Tools of Quality by Design Approach for the Enhancement of the Solubility a Poorly Soluble Drug Using Albumin Nanoparticles.
- [85] Epp, J. (2016). X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. In *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods* (pp. 81-124). Woodhead Publishing.
- [86] Uvarov, V. L. A. D. I. M. I. R., & Popov, I. (2007). Metrological characterization of X-ray diffraction methods for determination of crystallite size in nano-scale materials. *Materials characterization*, 58(10), 883-891.
- [87] Chauhan, A., & Chauhan, P. (2014). Powder XRD technique and its applications in science and technology. *J Anal Bioanal Tech*, 5(5), 1-5.
- [88] Sánchez, M. C., Vergara, V., Polo, L. D., & Álvarez Aldana, A. (2017). Primer acercamiento del estudiante de Microbiología a las técnicas de recuento en superficie, profundidad y cámara De Neubauer.
- [89] Meneses Marcel, A., Rojas, L., Sifontes Rodríguez, S., López, Y., & Sariego Ramos, I. (2001). Aplicación de un método alternativo al conteo en cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(3), 180-188.]

ANEXOS

10. Anexos

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido o (SEM) se basa en el uso de un haz de electrones para generar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Puede emplearse en muestras orgánicas e inorgánicas. El proceso para la obtención de las imágenes es que un haz de electrones de alta energía escanea la superficie de la muestra con una alta resolución que da una apariencia tridimensional de la muestra que no se podría analizar mediante un microscopio óptico [79].

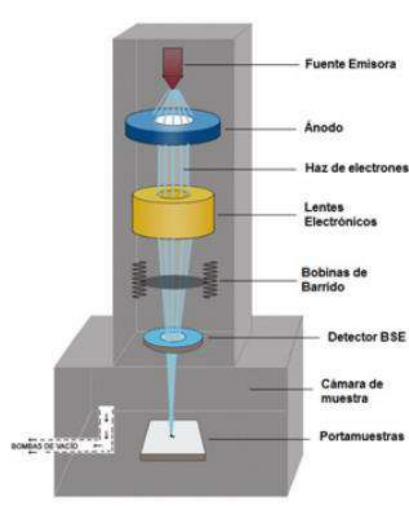


Figura 22 Composición del microscopio electrónico de barrido [80]

El haz de electrones (electrones incidentes) se hace pasar por diferentes lentes electromagnéticas y por sistema de deflexión para poder manipular dicho haz con el fin abarcar toda la superficie de la muestra, todo esto en un tubo que se encuentra en alto vacío (Figura 22). Cuando este haz interactúa con la muestra genera diferentes señales como por ejemplo electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, entre otros. Los electrones que se usan en la técnica

de SEM son los electrones retrodispersados y los electrones secundarios. La información que proporciona cada una de las señales que provienen de la interacción del haz con la muestra por diferentes tipos de detectores son los responsables de la información de la morfología y la composición química que se puede llegar a adquirir [80].

Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)

La espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS) detecta cualitativamente los rayos X característicos de los elementos que están presentes en la superficie de una muestra. Cuando a un material se le hace incidir un haz de electrones tiene que disipar cierta parte de la energía que es absorbida, haciéndolo al expulsar un electrón del núcleo (Figura 23). La diferencia de energía que se tiene que compensar en forma de un rayo X que tiene como espectro característico en su átomo de origen [81].

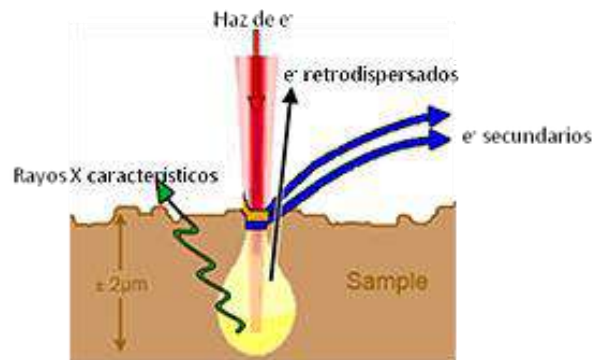


Figura 23 Rayos x característicos emitidos de una muestra

La información de los rayos x emitidos por la interacción del haz de electrones con la muestra se recolecta con un detector EDS que se coloca al microscopio electrónico de barrido. Cada espectro EDS que se obtiene se coloca en una posición específica de la muestra para cada elemento y la intensidad de la señal corresponde a la concentración de dicho elemento hay en la muestra [82].

Potencial Z

El potencial zeta (ζ) es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas en una solución. Esta propiedad eléctrica determina si una solución coloidal se aglomerará o seguirá siendo una suspensión estable. Cuando las partículas cargadas se dispersan en un líquido, una capa de iones de carga opuesta se liga fuertemente a la superficie formando así una capa delgada llamada capa de Stern. También se genera una región externa en la cuales los iones están ligados con menos fuerza y se llama Capa difusa (Figura 24) [83].

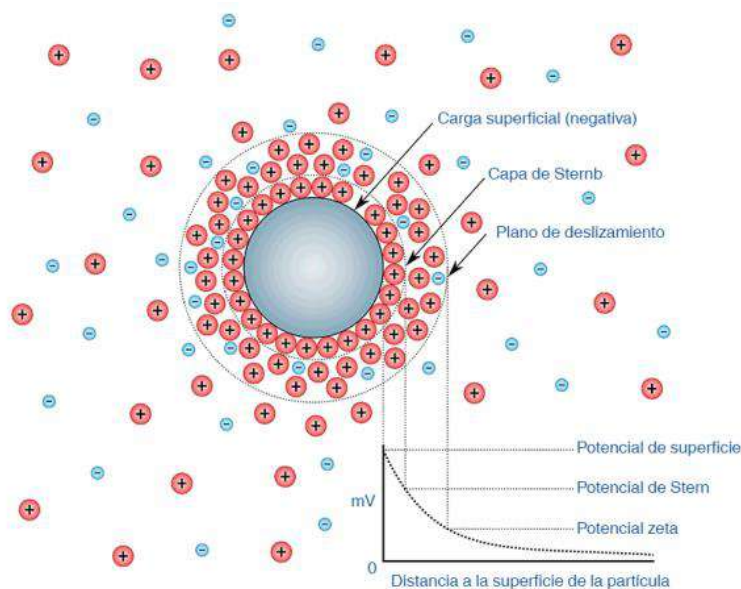


Figura 24 Relación entre carga superficial y potencial Z

La importancia que tiene el pH es debido a que la magnitud de la carga superficial depende de las resistencias ácidas o básicas de los grupos superficiales y del pH de la solución. Partículas con valores de potencial ζ arriba de -30 mV o +30 mV se consideran soluciones estables. Partículas con potenciales entre -10 mV +10 mV son consideradas partículas neutras y las soluciones se consideran inestables [84].

XRD

Difracción de rayos X es una técnica en la cual se emite un haz de rayos X sobre la muestra, como respuesta se genera una intensidad de dispersión. Dicha técnica de caracterización se basa en la ecuación 6 que se conoce como ecuación de Bragg. Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X incidentes, d la distancia entre los planos de la red cristalina y θ el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión (Figura 25). El patrón de difracción obtenido se considera como una huella química y compararse con las bases de datos de los materiales ya reportados [85].

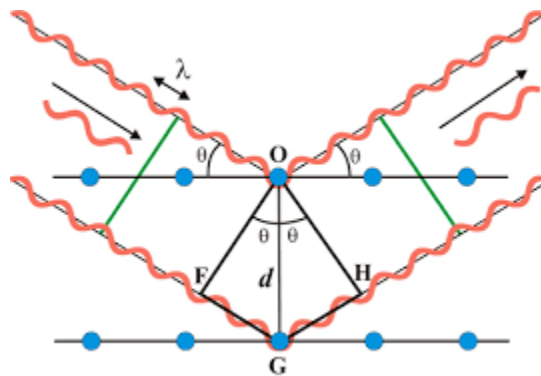


Figura 25 Angulo de Bragg [85]

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Ec.6

Esta técnica nos revela información estructural, de composición química, de estructura cristalina, del tamaño de los cristales, la deformación y la orientación preferencial de crecimiento del cristal.

De los difractogramas obtenidos se puede calcular lo que se conoce como tamaño de cristalito mediante los dos métodos más empleados que son Hilliamson-Hall y Debye Scherrer. El primer método considera que el tamaño de cristalito se ve alterado por el estrés de ensanchamiento que se genera en la red cristalina explicado en la ecuación 7. Este método implica un comportamiento lineal que se puede observar graficando $\beta\cos\theta$ contra $\sin\theta$, donde la pendiente que se genera en

esta recta es el término ε y el corte en el eje y es el tamaño de cristalito. Como las obtenidas en esta investigación que se muestran en Figura 26 [86].

$$B_{total} = \frac{K\lambda}{\cos\theta} + 4\varepsilon\tan\theta \quad \text{Ec. 7}$$

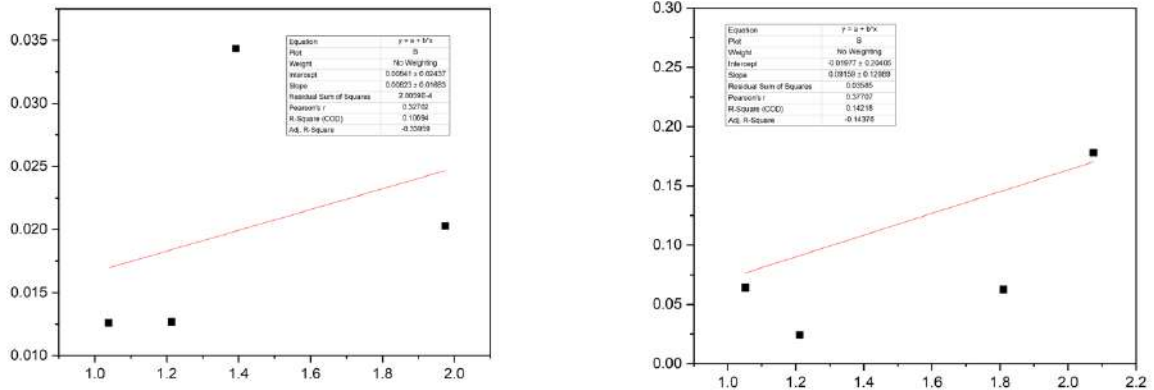


Figura 26 Graficas obtenidas mediante el método Hilliamson-Hall

El método Debye Scherrer relaciona que la anchura de los picos de difracción varia inversamente proporcional con el tamaño de cristalito de la muestra que se presenta en la ecuación 8. Donde λ es la longitud de onda, θ el ángulo de Bragg, k la constante Scherrer [87].

$$\beta = \frac{K\lambda}{\cos\theta} \quad \text{Ec. 8}$$

Conteo celular mediante cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento, es un dispositivo de material de vidrio óptico especial. Se emplea normalmente para contar células u otras partículas en suspensión con ayuda del microscopio. Dichas cámaras se emplean principalmente para el análisis de la sangre y observar sus células. También funciona para contar bacterias, esporas de hongos o espermatozoides. La cámara de Neuauer también se conocida como Hematocimetro, se constituye de un grueso portaobjetos de cristal dividido en tres partes de manera vertical, la parte de en

medio tiene un rayado fino formando cuadrículas de 3mm x 3mm que son observables bajo el microscopio (Figura 27) [88].

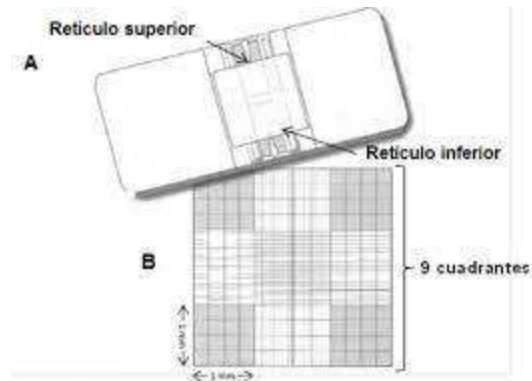


Figura 27 Cámara de Neubauer, cubre objetos (A) y porta objeto reticulado (B) [88]

Entre el portaobjetos y cubreobjetos hay un espacio de 0.1 mm ajo las secciones laterales y así fijando un volumen constante (Figura 28). Al observar bajo el microscopio se logra diferencias en la zona central un cuadrante dividido de tres por tres dando un área de 9 mm² (Figura 27 (B)) [88].

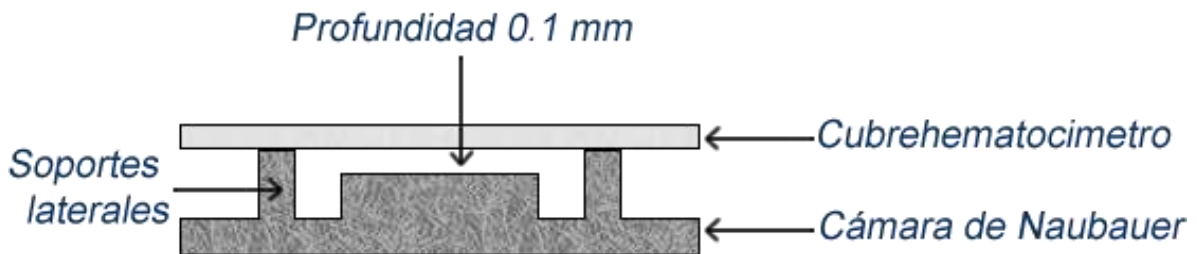


Figura 28 Zonas modificadas para lograr un volumen fijo [89]

De la división de cuadrantes los empleados para realizar el conteo celular son los mostrados en la Figura 29, que son definidos por las líneas prolongadas. Posterior al conteo celular se procede a realizar la ecuación 4, antes mencionada [89].

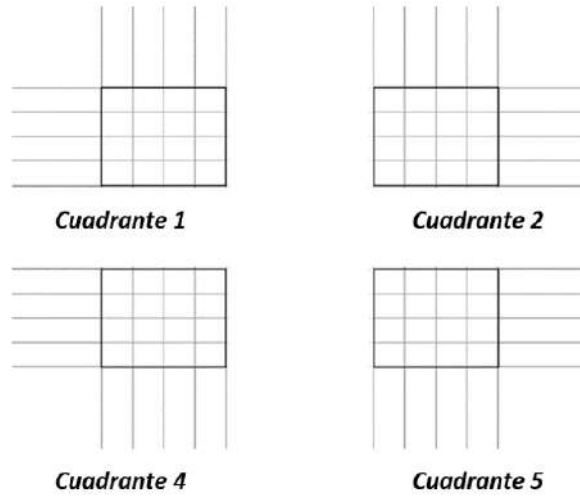


Figura 29 Cuadrantes empleados al realizar conteo celular en cámara de Neubauer [89]

$$Células/mm^3 = (No. de células contadas)(Factor de dilucion)\left(\frac{1}{Factor de volumen}\right) \quad \text{Ec. 4}$$