

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Síntesis de nanopartículas luminiscentes/magnéticas para
su aplicación como bioetiquetadores**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:
Carlos Muñoz Bustos

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Carlos Muñoz Bustos

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora

Miembros del Comité

Dr. Manuel Herrera Zaldívar

Dr. Israel Rocha Mendoza



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Carlos Muñoz Bustos** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Síntesis de nanopartículas luminiscentes/magnéticas para su aplicación como bioetiquetadores

Resumen aprobado por:

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores

Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Codirectora

Las propiedades luminiscentes y magnéticas de las nanopartículas (NPs) de granate de aluminato de gadolinio dopadas con cerio (GAG:Ce³⁺) y funcionalizadas con ácido fólico para bioetiquetadores de células de cáncer son descritas en este trabajo. Las NPs fueron sintetizadas por el método de síntesis por combustión usando como combustible carbohidrazida, con un tratamiento térmico a 1100 °C por 3 h para permitir un adecuado crecimiento de los nanocristales. Después, la superficie de estas NPs de GAG:Ce³⁺ fueron funcionalizadas con 3-aminopropil-trietoxisilano (APTMS) y entonces seguido por ácido fólico con EDS y NHS como agentes de acoplamiento. Las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de las NPs fueron caracterizadas por TEM, XDR, FTIR, fluorescencia y espectroscopia de UV-Vis. Los estudios de fotoluminiscencia mostraron que bajo excitación con luz azul de 468 nm, las NPs de GAG:Ce³⁺ emiten luz amarilla con un máximo de intensidad a 600 nm. Además, el efecto de la concentración de dopaje sobre las propiedades de las NPs fue estudiado. Se encontró que con una concentración de dopaje del 2% se produce los más altos valores de rendimiento cuántico y de intensidad de luminiscencia. La caracterización magnética se realizó usando un dispositivo de interferencia cuántica superconductor (SQUID, por sus siglas en inglés), lo cual confirmó la naturaleza paramagnética de las NPs de GAG:Ce³⁺ (Ce=2%), con un valor de susceptibilidad magnética de 1.04×10^{-4} emu/gOe. Adicionalmente, se evaluó la citotoxicidad por ensayos colorimétricos de las NPs desnudas y funcionalizadas en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Finalmente, la internalización de las NPs de GAG:Ce³⁺ funcionalizadas con ácido fólico en las células de cáncer de mama fue demostrada por microscopia confocal, obteniéndose imágenes que muestran la internalización citoplasmática de las NPs en las células de cáncer de mama, confirmando así, que estas NPs funcionan como bioetiquetadores de células de cáncer.

Palabras clave: Nanopartículas, bioetiquetador, paramagnético, ácido fólico.

Abstract of the thesis presented by Carlos Muñoz Bustos as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Synthesis of luminescent/magnetic nanoparticles to their application as biolabels

Abstract approved by:

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores

Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Codirectora

The luminescent and magnetic properties of gadolinium aluminate garnet nanoparticles doped with cerium (GAG:Ce³⁺) and functionalized with folic acid for biolabeling cancer cells are described in this work. The nanoparticles were fabricated by carbohydrazide combustion synthesis and annealed at 1100 °C for 3 h to allow proper crystal growth. Afterwards, the surface of these GAG:Ce³⁺ nanoparticles was functionalized with 3-Aminopropyl-tri-methoxy silane (APTMS) and then followed by folic acid using EDS and NHS coupling. Physicochemical properties of surface functionalized GAG:Ce³⁺ nanoparticles were characterized by TEM, XRD, FTIR, fluorescence and UV-Vis spectroscopy studies. Photoluminescence studies showed that upon excitation with blue light of 450 nm the GAG:Ce³⁺ nanoparticles emit yellow light with maximum intensity at 550 nm. Moreover, the effect of Ce doping concentration on the luminescent properties of GAG nanoparticles was studied. It was found that 2% doping of cerium produced highest emission intensity and quantum yield. Magnetic characterization using superconducting quantum interference device (SQUID) confirmed the paramagnetic nature of GAG:Ce³⁺ (Ce = 2%) with a magnetic mass susceptibility of 1.04x10⁻⁴ emu/gOe. Additionally, the cytotoxicity of bare and functionalized GAG:Ce³⁺ nanoparticles in MDA-MB-231 breast cancer cells was evaluated by MTT assay. Finally, the internalization of folic acid-functionalized GAG:Ce³⁺ was evaluated by colorimetric assays in MDA-MB-231 breast cancer cells. Thus, it was possible to obtain images that demonstrate the cytoplasmic internalization of nanoparticles in breast cancer cells. Confirming with this that these nanoparticles can function as effective biolabels of breast cancer cells.

Keywords: Nanoparticles, biolabels, paramagnetic, folic acid.

Dedicatoria

A mis padres
Carlos Muñoz Vázquez y María Angélica Bustos Cortés

Agradecimientos

A mis directores de tesis **Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores** y la **Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno** por el apoyo y tiempo dedicado para la realización del proyecto.

A los miembros del comité de tesis, el **Dr. Israel Rocha Mendoza** y el **Dr. Manuel Herrera Zaldívar** por sus observaciones en el manuscrito de tesis.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (**CNyN**) de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) por permitirme realizar el proyecto en sus instalaciones, además de facilitarme los recursos necesarios para el desarrollo del mismo en tiempo y forma. Al personal que labora en el CNyN, especialmente a **M. Eloisa Aparicio, Dra. Katrin Quester, Laura A. Rosales Vázquez y Jaime Mendoza**.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (**CICESE**) por permitirme realizar la maestría en ciencias en nanociencias. He de destacar que la calidad y el conocimiento del personal administrativo facilitan en gran manera la basta cantidad de procedimientos administrativos, lo cual se agradece en gran manera.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el financiamiento total de mi proyecto de investigación, al proyecto de infraestructura No. 269071, al proyecto DGAPA-UNAM No. IN-111017 y al proyecto CONACyT No. 284548.

A **Akhil Jain** por la basta cantidad de conocimientos compartidos hacia mi persona y por permitirme colaborar con él para la realización de un proyecto de investigación científica.

Un especial agradecimiento a **Gloria Salinas Lucero** por su tiempo y dedicación al ayudarme en todos los experimentos de viabilidad celular.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Nanopartículas de granate de aluminato de tierras raras	1
1.1.1 Nanopartículas de YAG.....	2
1.1.2 Nanopartículas de GAG	2
1.2 Nanopartículas luminiscentes como bioetiquetadores de células	3
1.2.1 Nanopartícula funcionalizadas con ácido fólico para la unión a células de cáncer	5
1.3 Cáncer.....	6
1.3.1 Cáncer de mama.....	6
1.4 Hipótesis y objetivos	7
1.5 Hipótesis.....	7
1.6 Objetivo general.....	7
1.7 Objetivos particulares	7
Capítulo 2. Metodología	8
2.1 Síntesis de las nanopartículas de GAG	8
2.1.1 Síntesis de las nanopartículas de $Gd_{(3-x)}Ce_xAl_5O_{12}$ por el método de combustión.....	8
2.1.2 Síntesis de las nanopartículas de $Gd_{(3-x)}Ce_xAl_5O_{12}$ por el método de sol-gel	9
2.2 Recubrimiento de las nanopartículas de GAG con SiO_2 mesoporoso	9
2.3 Funcionalización de $GAG@SiO_2$ con APTMS	10
2.4 Funcionalización de $GAG@SiO_2@APTMS$ con ácido fólico	10
2.5 Caracterización de las NPs	11
2.5.1 Estudio estructural	11
2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución	12
2.5.3 Análisis de potencial Z.....	12
2.5.4 Espectroscopia de infrarrojo	12

2.5.5 Estudios de fotoluminiscencia y rendimiento cuántico	12
2.5.6 Estudios magnéticos.....	13
2.6 Cultivo celular.....	13
2.6.1 Tripsinización de las células de cáncer de mama MDA-MB-231.....	13
2.7 Ensayo de viabilidad celular por la reducción de MTT.....	14
2.8 Ensayo de internalización de nanopartículas.....	16
2.8.1 Medición de la internalización de NPs por citometría de flujo.....	16
2.8.2 Visualización de la internalización de las NPs mediante microscopia confocal.....	16
Capítulo 3. Resultados	18
3.1 Síntesis de nanopartículas de GAG	18
3.2 Características estructurales	18
3.3 Estudio de la morfología de las NPs.....	19
3.4 Espectroscopia de infrarrojo	21
3.5 Espectroscopia de UV visible.....	23
3.6 Potencial Z.....	24
3.7 Estudios de fotoluminiscencia.....	24
3.7.1 Nanopartículas de YAG, YAGG y GAG.....	24
3.7.2 Nanopartículas de GAG sintetizadas por diferentes métodos.....	25
3.7.3 Concentración optima de dopaje.....	26
3.7.4 Cambio en la intensidad de luminiscencia por funcionalización	27
3.8 Estudio de las propiedades magnéticas de las NPs.....	28
3.9 Estudios de viabilidad celular	29
3.10 Internalización intracelular de las NPs de GAG.....	30
3.11 Estudios de internalización de NPs por microscopia confocal.....	31
Capítulo 4. Discusión	33
4.1 Síntesis de nanopartículas de GAG	33
4.2 Caracterización estructural y morfológicas de las nanopartículas de GAG	34
4.3 Análisis de microscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	35
4.4 Análisis de espectroscopia de UV visible.....	35
4.5 Potencial Z.....	36
4.6 Estudio de las propiedades luminiscentes de las nanopartículas de GAG.....	36
4.7 Estudio de las propiedades magnéticas de las NPs de GAG	38
4.8 Estudios biológicos.....	38

4.8.1 Estudios de viabilidad celular38

4.8.2 Análisis de la citotoxicidad de las NPs de GAG funcionalizadas.....39

4.8.3 Internalización de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico40

Capítulo 5. Conclusiones.....41

Litertura citada.....42

Anexos45

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de energía que muestra el efecto de la red hospedera en la división del campo cristalino del nivel energético 5d del ion Ce^{3+}	4
Figura 2. Representación de la unión de los receptores de ácido fólico e internalización de las NPs luminiscentes en células de cáncer cervicouterino (HeLa).	5
Figura 3. Síntesis de NPs de GAG por el método de combustión.	8
Figura 4. Síntesis de NPs de GAG por el método de combustión.	9
Figura 5. Representación de las diferentes etapas del recubrimiento y funcionalización de las NPs de GAG.	11
Figura 6. Placa de 96 pozos con 10,000 células aproximadamente por pozo. Células de cáncer tratadas con NPs a diferentes concentraciones. Adicionalmente se indican 3 pozos destinados a un control positivo y 3 pozos para un control negativo.	15
Figura 7. Pozos con células y NPs tratadas con MTT disueltas en iso-propanol. En las 3 columnas (de derecha a izquierda) el MTT ha sido apropiadamente disuelto, las demás contienen MTT pero no está disuelto apropiadamente.	16
Figura 8. Patrón de difracción de rayos-X de las NPs de GAG sintetizadas por diferentes métodos.	18
Figura 9. a-d) Micrografías de TEM de las NPs de GAG con diferentes aumentos.	19
Figura 10. Distribución de tamaños en función del diámetro de las NPs.	20
Figura 11. Imágenes de TEM de las NPs de $GAG@SiO_2$	20
Figura 12. Imágenes de TEM de las NPs de $GAG@SiO_2@APTMS@A.F.$	21
Figura 13. Espectros de infrarrojo de las NPs de GAG con diferentes superficies químicas.	22
Figura 14. Espectros de absorción de las NPs de GAG y del ácido fólico en solución acuosa.	23
Figura 15. Potencial Z de diferentes NPs de GAG en solución acuosa.	24

Figura 16. a) Espectros de excitación y de emisión de $Y(2.92-x)Gd_xAl_5O_{12}:Ce_{0.08}$ y b) espectros de emisión normalizada de YAG, YAGG y GAG con un 2% de cerio.	25
Figura 17. a) Espectros de excitación y de emisión de NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión y de sol-gel, b) y c) imágenes de TEM de NPs de GAG sintetizadas por sol gel, d) y e) NPs de GAG sintetizadas por combustión.	26
Figura 18. a) Intensidad de luminiscencia normalizada de NPs de GAG en función de la concentración de dopaje de cerio y b) rendimientos cuánticos de NPs de GAG.	27
Figura 19. Cambios en la intensidad de luminiscencia de las NPs de GAG después de las diferentes funcionalizaciones.	27
Figura 20. Curva de magnetización (M)- campo magnético (H) de las NPs de GAG.....	28
Figura 21. Valores de la susceptibilidad magnética dependientes de la cantidad de cerio.	28
Figura 22. Viabilidad celular de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de GAG.	29
Figura 23. a) Curva de citometría de flujo de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 tratadas con NPs de GAG. La curva de color negro representa el control y la curva de color verde es la intensidad de luminiscencia de las células de cáncer de mama incubadas con las NPs de GAG con ácido fólico y b) histogramas de citometría de flujo de las células de cáncer de mama sin y con NPs de GAG que indican la intensidad relativa de la luminiscencia de cada grupo.	30
Figura 24. Se observan las imágenes del microscopio confocal de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, con diferentes moléculas y materiales luminiscentes, señalados en la parte superior de cada imagen.	31
Figura 25. Se observa la formación de vesículas en el interior de las células de cáncer MDA-MB-231, como se indica con los círculos y flechas color rojo.	32
Figura 27. Curva de calibración del ácido fólico en solución acuosa.	45

Lista de tablas

Tabla 1. Diluciones sucesivas de NPs en medio de cultivo.	14
Tabla 2. Tabla de asignación de grupos funcionales de las NPs.	22
Tabla 3. Volores de susceptibilidad magnéticas de NPs de GAG.	29

Capítulo 1. Introducción

1.1 Nanopartículas de granate de aluminato de tierras raras

El desarrollo tecnológico de nanopartículas (NPs) luminiscentes/magnéticas basadas en metales de tierras raras se ha ido incrementando en los últimos años en el campo de la biomedicina, debido a la necesidad de nuevas herramientas para el tratamiento y la detección de enfermedades como el cáncer (Bouzigues *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016; Sengar *et al.*, 2016). Los materiales cerámicos de granate de aluminato de tierras raras, cuya fórmula química general es $\text{Ln}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (LnAG, donde Ln es un lantánido o el itrio), son los más empleados para este propósito.

El estudio de las NPs de granate de aluminato de tierras raras como $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (YAG) y $\text{Gd}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (GAG) son de gran interés debido a sus excelentes propiedades fisicoquímicas y a sus potenciales aplicaciones en diversas áreas de la ciencia. Las NPs de YAG dopadas con diferentes metales de tierras raras son uno de los materiales más usados como bioetiquetador para la generación de imágenes celulares debido a su alta estabilidad química, baja toxicidad, altos rendimientos cuánticos, entre otras características (Dong *et al.*, 2012). Sin embargo, su aplicación en la generación de imágenes luminiscentes de células de cáncer en tejidos profundos es limitado, debido a que la luminiscencia de las NPs puede ser percibida a menos de 1 cm de la superficie de la piel (van Leeuwen *et al.*, 2015).

El GAG es un material similar al YAG, sin embargo, en vez del átomo Y^{3+} contiene Gd^{3+} en la estructura cristalina granate, el cual tiene un tamaño atómico más grande que el Y^{3+} y posee propiedades fisicoquímicas diferentes por su configuración electrónica (Li *et al.*, 2016). Así, el GAG tiene propiedades magnéticas (Jayanthi y Manorama, 2014) que podrían ser empleadas para la generación de imágenes de resonancia magnética (MIR, por sus siglas en inglés), la cual cuenta con un poder de penetración en tejido más profundo que las imágenes generadas por el principio físico de luminiscencia en sistemas biológicos.

1.1.1 Nanopartículas de YAG

Entre los diferentes metales de tierras raras empleados para dopar a las NPs de YAG los iones cerio son uno de los más empleados, esto debido a las altas intensidades de luminiscencia que presenta, además de no desestabilizar a la estructura cristalina de granate por su tamaño atómico similar al itrio (Asakura *et al.*, 2007). Las NPs de YAG dopadas con cerio (YAG:Ce) tienen una longitud de onda de emisión alrededor de 530 nm (color amarillo), debido a la transición de fotones excitados del orbital $5d(^2A_{1g})$ a $4f(^2F_J)$ del ion cerio dentro de la red cristalina de YAG (Asakura *et al.*, 2007).

Los materiales de granate de aluminato de tierras raras, tales como el YAG y GAG, tienen una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo (*bcc*, por sus siglas en inglés) cuyo grupo espacial es $Ia\bar{3}d$ (J.-G. Li y Sakka, 2015). La cristalinidad es un factor crucial para emplear las NPs de YAG:Ce en aplicaciones ópticas, pues se sabe que la intensidad de luminiscencia está fuertemente relacionada con monofases puras. La alta cristalinidad, así como la existencia o no, de fases secundarias tales como el $Y_4Al_{12}O_9$ (YAM) o $YAlO_3$ (YAP), dependen del método de síntesis y la temperatura del tratamiento térmico. Con respecto a la temperatura de síntesis, se ha encontrado por ejemplo, que con tratamientos térmicos con temperaturas superiores o iguales a 800 °C aparece el pico principal de la estructura cúbica del YAG:Ce, el cual está centrado en $2\theta=33.4^\circ$ (Hassanzadeh-Tabrizi, 2012).

Las NPs de YAG:Ce han sido sintetizadas con éxito a través de diferentes métodos, entre los cuales están: solvotermal (Abdelhay *et al.*, 2012), microondas (Jain *et al.*, 2018), precipitación (Ji *et al.*, 2015), entre otros. Se sabe que las propiedades y características de las NPs dependen en parte del método de síntesis, con lo cual se puede controlar, por ejemplo, el tamaño de partícula, morfología de la superficie, concentración de abatimiento (*concentration quenching*) y cristalinidad (Lee *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible diseñar a las NPs de YAG:Ce para una aplicación óptica particular.

1.1.2 Nanopartículas de GAG

Metales de tierras raras como el Eu, Ce, Tb y Dy han sido empleados como activadores dopantes de NPs luminiscentes de GAG con potenciales aplicaciones en la generación de imágenes biomédicas, LEDs para iluminación cálida y como cerámicos centelladores (J.-G. Li y Sakka, 2015).

Por otro lado, en la literatura hay un número mayor de estudios de $(Y_{1-x}Gd_x)_{3-y}Al_5O_{12}:RE_y$ en comparación con GAG:RE (RE: *rare earths*, por sus siglas en inglés), donde los átomos de Y^{3+} y Gd^{3+} compiten por los sitios $24c$ (simetría puntual D_2) dentro de la estructura cristalina granate. El mayor número de estudios de materiales como $(Y_{1-x}Gd_x)_{3-y}Al_5O_{12}:RE_y$ y $(Gd_{1-x}Lu_x)_{3-y}Al_5O_{12}:RE_y$ sobre GAG:RE se debe a que son termodinámicamente más estables, permitiendo tratamientos térmicos a temperaturas elevadas (mayores a $1300^\circ C$) y aplicaciones como la fabricación de LEDs. Sin embargo, el material (NPs de GAG) puede recibir tratamientos térmicos con temperaturas de alrededor de unos $1100^\circ C$ y tener una estructura altamente cristalina con una baja cantidad de fases secundarias (J.-G. Li y Sakka, 2015; Bartosiewicz *et al.*, 2017).

Las NPs o materiales en bulto de YAG:Ce o LuAG:Ce se dopan de forma parcial o total con gadolinio y como consecuencia se desplaza la longitud de onda de emisión a mayores longitudes de onda, lo cual tiene aplicaciones en la generación de luz blanca. El desplazamiento en la longitud de onda de emisión se debe a una mayor separación del campo cristalino del ion cerio (figura 1) en la redes hospederas que contengan total o parcialmente gadolinio en estructuras cristalinas de granate (George *et al.*, 2013).

1.2 Nanopartículas luminiscentes como bioetiquetadores de células

Las NPs luminiscentes empleadas como bioetiquetadores son aquellos nanomateriales que son selectivos a biomoléculas o moléculas orgánicas que están sobre-expresados o son exclusivos a un sistema biológico particular, cuyo fin es generar imágenes luminiscentes cuando son sometidas a radiación UV, visible o infrarrojo (o una combinación de estos). Así pues, identificar por ejemplo la ubicación de células de cáncer de forma selectiva dentro de un organismo es importante, pues de esta forma se puede diagnosticar o tratar para una cirugía.

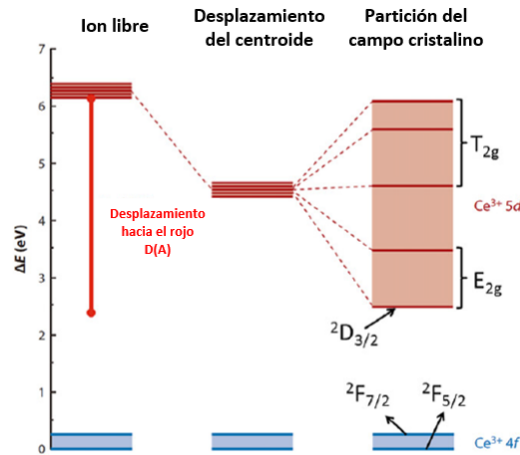


Figura 1. Diagrama de energía que muestra el efecto de la red hospedera en la división del campo cristalino del nivel energético 5d del ion Ce^{3+} .

Entre los nanomateriales luminiscentes empleados como bioetiquetadores están los nanocúmulos (*nanoclusters*) basados en metales nobles, pues han demostrado tener una alta especificidad en diversos sistemas biológicos (Wood, 2004). Otro nanomaterial son los puntos cuánticos, que pueden ser funcionalizados con diversas moléculas orgánicas, sin embargo, se ha encontrado que son altamente citotóxicos (Cho *et al.*, 2008). Existen también las NPs dopadas con metales de tierras raras, que recientemente han llamado la atención por su baja o nula toxicidad, fácil funcionalización y altos rendimientos cuánticos (relación entre el número de fotones que emite un material con respecto al número total de fotones empleados para excitar al material) (Zhang *et al.*, 2013).

Entre algunas de las características fisicoquímicas que deben tener los bioetiquetadores están: solubles o capaces de formar suspensiones homogéneas en medios acuosos, no ser citotóxicos y ser fotoestables (J.-M. Shen *et al.*, 2012; Tagaya *et al.*, 2014). Estas características permiten generar de manera óptima imágenes luminiscentes con gran claridad del sistema biológico bajo estudio, que son frecuentemente células y en particular de cáncer.

Por otro lado, la funcionalización de NPs con diferentes compuestos químicos y biológicos es la estrategia mayormente empleada para dirigir de forma selectiva los nanomateriales a las células mediante la unión a los receptores ubicados en la membrana celular. La interacción entre NPs funcionalizadas y la célula se basa en la unión específica entre el recubrimiento (funcionalización) de las NPs y las biomoléculas que están en la superficie de la célula, cuya naturaleza de interacción es frecuentemente supramolecular (Grobmyer *et al.*, 2010).

1.2.1 Nanopartícula funcionalizadas con ácido fólico para la unión a células de cáncer

Diversas moléculas orgánicas y biológicas tales como proteínas, aminoácidos, vitaminas y carbohidratos han sido empleados para funcionalizar NPs con el fin de interactuar selectivamente con ciertos tipos de células de cáncer (Khosravian *et al.*, 2016), uno de los más estudiados en la actualidad es el ácido fólico, que es una vitamina soluble en agua. El empleo de esta vitamina es porque, los receptores de ácido fólico están sobre-expresados en varios tipos de células de cáncer, como el cáncer epitelial, de ovario, glándula mamaria, colon, pulmón, próstata, nariz, garganta y cerebro (Saltan *et al.*, 2011). Entonces, los estudios de interacción entre NPs funcionalizadas con ácido fólico y células de cáncer es de especial relevancia, pues permiten diferenciar en cierto grado las células de cáncer de las células sanas que rodean al tumor.

Tagaya (2014) describe que las NPs de sílice luminiscentes funcionalizadas con ácido fólico se unen a los receptores de ácido fólico en la superficie de las células de cáncer cervicouterino (*HeLa*) y entonces son internalizadas por las mismas (figura 2). Con ello, se permitió monitorear en tiempo real a las células de cáncer tratadas con NPs en un sistema *in vitro* a través de imágenes luminiscentes. Estudios adicionales demostraron que estas NPs tenían una buena dispersión en el medio de cultivo celular, exhibían una alta citocompatibilidad hacia las células de cáncer y tenían una luminiscencia detectable.

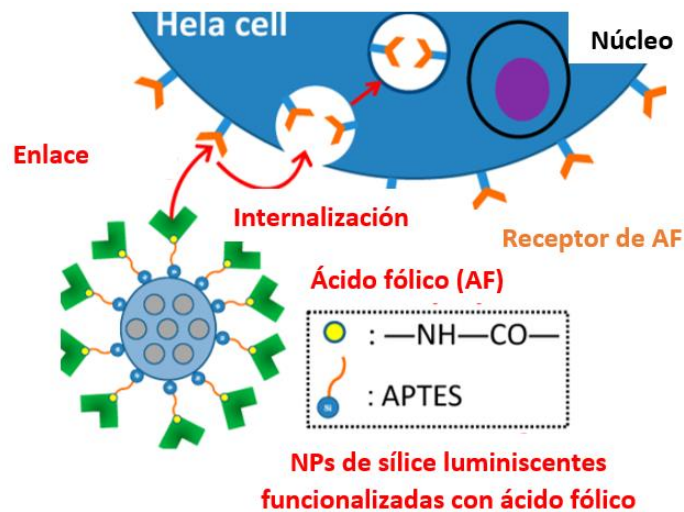


Figura 2. Representación de la unión de los receptores de ácido fólico e internalización de las NPs luminiscentes en células de cáncer cervicouterino (*HeLa*).

1.3 Cáncer

Las células crecen y se dividen a fin de cumplir un ciclo para una función determinada. Cuando las células cumplen su ciclo celular o se dañan, estas mueren y son reemplazadas por nuevas células (excepto las células neuronales). Sin embargo, es posible que este proceso ordenado se descontrola y dé lugar a células anormales (cancerosas), lo cual lleva al cáncer (Alberts y Bray, 2006).

El cáncer se refiere a todas aquellas enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden formar cúmulos de células llamados tumores. Existen dos tipos de tumores: los tumores malignos y los tumores benignos. En los tumores malignos las células cancerosas se desprenden de éstos y se mueven a través del sistema linfático y/o del sistema circulatorio a distintas partes del cuerpo humano, las cuales pueden formar nuevos tumores en un proceso conocido como metástasis. En el caso de los tumores benignos, no se extienden a tejidos lejanos o cercanos (Alberts y Bray, 2006).

1.3.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama (también conocido como cáncer de seno) se origina cuando las células del seno se convierten en células anormales comenzando a crecer y dividirse sin control. Las células de cáncer de mama usualmente forman protuberancias que son identificadas al palpar el seno, de esta forma su detección es fácil. Sin embargo, es posible que no se formen protuberancias, y por lo tanto su detección necesita de otras técnicas para un correcto diagnóstico, entre las más utilizadas están: el ultrasonido mamario, mamografía de diagnóstico, imágenes de resonancia magnética y biopsias. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas para la detección oportuna tiene algunos problemas y desventajas, como, por ejemplo: alto costo, sistemas dolorosos y principalmente la falta de precisión del sistema de detección. Por ello es importante desarrollar nuevas y más eficientes herramientas de detección del cáncer de mama. Entre los materiales que recientemente se han empleado para la detección del cáncer de mama (incluso en etapas tempranas) son las NPs magnetoluminiscentes (Grobmyer *et al.*, 2010).

En este trabajo se propone el uso de NPs de GAG luminiscentes/magnéticas funcionalizadas con ácido fólico para la detección selectiva de células de cáncer de mama. Ya que las células MDA-MB-231 tienen sobre-expresado el receptor de ácido fólico en su superficie, se propone que al funcionalizar las NPs de GAG con ácido fólico, habrá una interacción específica entre las células y las NPs.

1.4 Hipótesis y objetivos

1.5 Hipótesis

Las NPs de GAG luminiscentes/magnéticas funcionalizados con ácido fólico funcionan como bioetiquetadores selectivos de células de cáncer de mama MDA-MB-231 que permiten su localización por luminiscencia e imágenes de resonancia magnética.

1.6 Objetivo general

Sintetizar NPs de GAG para probar su efectividad como bioetiquetador frente a células de cáncer de mama MDA-MB-231.

1.7 Objetivos particulares

1. Sintetizar NPs de GAG por el método de combustión con carbohidrazida.
2. Recubrir a las NPs con sílice (GAG@SiO₂)
3. Funcionalizar la superficie de las NPs con APTMS y con ácido fólico.
4. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las NPs de GAG.
5. Determinar la citotoxicidad de las NPs *in vitro* mediante ensayos de colorimetría
6. Evaluar *in vitro* la internalización de las NPs mediante microscopía confocal en células de cáncer de mama MDA-MD-231 y citometría de flujo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de las nanopartículas de GAG

2.1.1 Síntesis de las nanopartículas de $Gd_{(3-x)}Ce_xAl_5O_{12}$ por el método de combustión

Las NPs de GAG fueron sintetizadas por el método de combustión con carbohidrazida como combustible, como se puede ver en la figura 3. Los precursores $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (99.9%, Aldrich), $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (98%, Aldrich) y $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (99%, Alfa Aesar) fueron usados en una cantidad estequiométrica apropiada (reacción 1) para obtener 1 g de polvo. La concentración de dopaje de cerio fue variada de valores de $x=1\%$, 2% , 3% , 4% , 5% y 8% para identificar la concentración óptima con la más alta intensidad de luminiscencia. La carbohidrazida (Aldrich) fue añadida en un 50% de exceso acorde a la estequiometría de la ecuación 1 para mejorar el rendimiento de la reacción. Entonces, después de preparar la solución acuosa por la mezcla de nitratos, esta fue agitada por 25 min y después puesta en un horno precalentado a $550^\circ C$ por 25 min. Enseguida, la espuma obtenida fue molida y el polvo resultante puesto en un crisol. Entonces, el polvo fue puesto en el horno a $1100^\circ C$ por 3 h. Finalmente, el material fue almacenado para futuras aplicaciones.

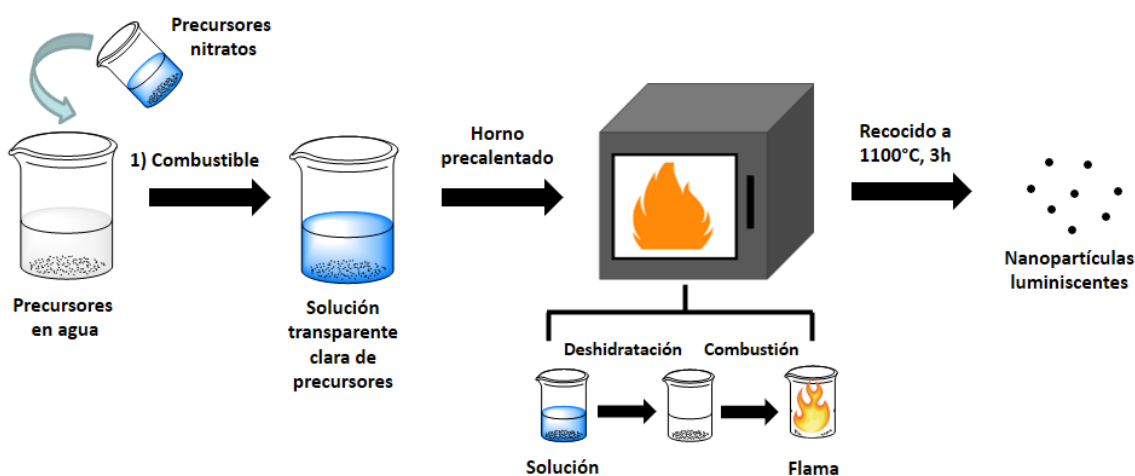
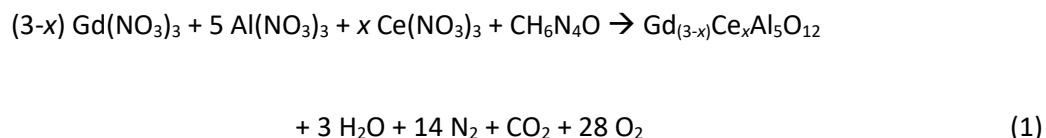


Figura 3. Síntesis de NPs de GAG por el método de combustión.

2.1.2 Síntesis de las nanopartículas de $Gd_{(3-x)}Ce_xAl_5O_{12}$ por el método de sol-gel

Las NPs de GAG fueron sintetizadas por el método de sol-gel con ácido tartárico como agente quelante, como se puede ver en la figura 4. Los precursores $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (99.9%, Aldrich), $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (98%, Aldrich), $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (99%, Alfa Aesar) y el ácido tartárico (99.5%, Aldrich) fueron usados en una cantidad estequiométrica apropiada (reacción 2) para obtener 1 g de polvo. Respecto al procedimiento experimental: la mezcla fue continuamente agitada durante 24 h para que los nitratos se disuelvan completamente. Durante el siguiente paso, la temperatura de reacción fue elevada a $80^\circ C$ por 2 h para la formación del gel. El polvo fue molido con un mortero durante 8 min hasta obtener un polvo fino. Finalmente, el recocido se realizó a $1100^\circ C$ por 3 h.

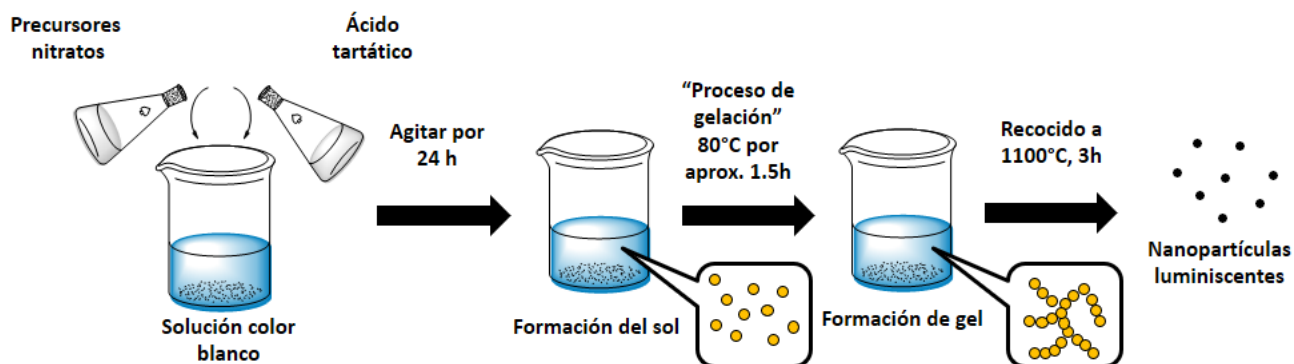
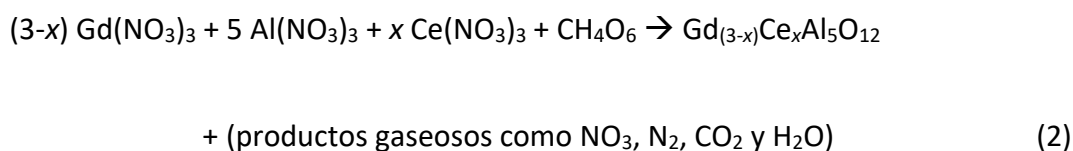


Figura 4. Síntesis de NPs de GAG por el método de combustión.

2.2 Recubrimiento de las nanopartículas de GAG con SiO_2 mesoporoso

El recubrimiento de las NPs de GAG con SiO_2 fue llevado a cabo con el proceso Stöber, con el fin de disminuir la citotoxicidad de las NPs. Primero, las NPs fueron dispersadas ultrasónicamente con una punta ultrasónica por 40 min en una solución de 50 mL de una mezcla de agua destilada/ etanol (1:4 v/v). Mientras tanto, 0.2 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fueron disueltos y agitados (500 rpm)

durante 40 min en una solución de 70 mL de una mezcla de agua destilada/ etanol (1:4 v/v). Luego, ambas soluciones fueron mezcladas y agitadas (500 rpm) por 30 min seguido por una dispersión ultrasónica durante 30 min. Entonces, 110 μ L de tetraetil ortosilicato (TEOS) fue añadido gota a gota lentamente y fue agitado por 4 h (500 rpm), seguido por un proceso de centrifugación (5500 rpm) y lavado con etanol en 3 ocasiones. Posteriormente el material fue secado toda la noche a 90 °C. El material fue calentado a 550 °C para eliminar las especies orgánicas que pudiesen estar en la superficie.

2.3 Funcionalización de GAG@SiO₂ con APTMS

La funcionalización de las NPs de GAG@SiO₂ con (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS) se realizó para tener grupos amino primarios en la superficie de las NPs. Primeramente, las NPs de GAG@SiO₂ fueron dispersadas ultrasónicamente por 10 min en una solución de 60 mL de una mezcla de agua destilada/etanol (1:4 v/v). En seguida, 90 μ L de APTMS fueron añadidas gota a gota cuidadosamente a la solución de las NPs, seguido por una agitación de 24 h. Después se lavó la solución resultante con etanol en 4 ocasiones. Para retirar el solvente, las NPs fueron puestas en un horno a 90°C.

2.4 Funcionalización de GAG@SiO₂@APTMS con ácido fólico

La funcionalización de las NPs de GAG@SiO₂@APTMS con ácido fólico fue llevada a cabo con la activación de los grupos aminos del APTMS con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccimida (NHS). Primero, 0.165 g de ácido fólico fueron disueltos en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y agitados por 30 min en condiciones de oscuridad. Mientras tanto, una solución de EDC (50 mM) y NHS (100 mM) en 1 mL de DMSO fueron preparados en recipientes separados. Ambas soluciones fueron rápidamente añadidas a la solución de ácido fólico y agitadas por 4 h. Después de ese tiempo, una solución de 0.25 g de NPs de GAG@SiO₂@APTMS en 50 mL de PBS fue añadido a la solución de ácido fólico y entonces mezcladas apropiadamente por 24 h en condiciones de oscuridad. La solución obtenida fue lavada y centrifugada con agua destilada 4 veces y una quinta ocasión con etanol. En la figura 5 se muestra el recubrimiento y funcionalización de las NPs de GAG es mostrado a continuación.

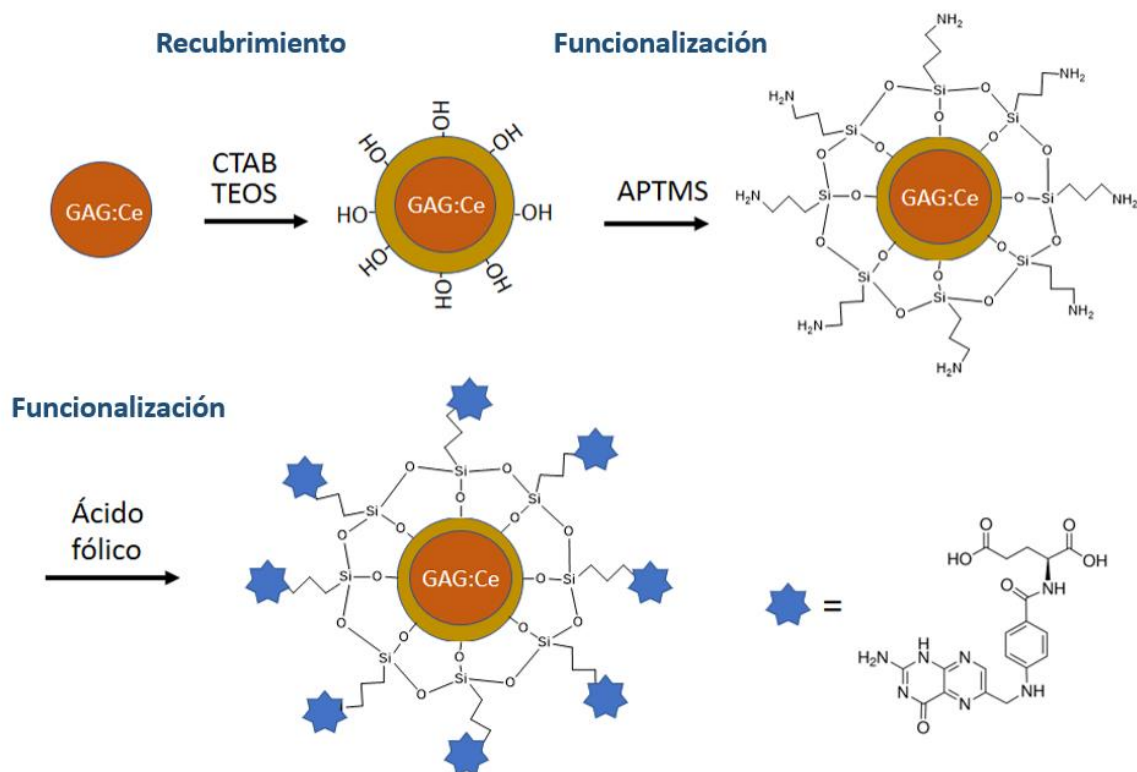


Figura 5. Representación de las diferentes etapas del recubrimiento y funcionalización de las NPs de GAG.

2.5 Caracterización de las NPs

2.5.1 Estudio estructural

La estructura cristalina de las NPs de GAG fue analizada usando un equipo de Philips X'pert, con una sonda de Cu y con radiación K α en 0.15406 nm. Escaneado sobre un rango de 2 θ de 20-80°. El tamaño de los nanocristales fue calculado con la ecuación de Scherrer (ecuación 3), usando la anchura a media altura (FWHM).

$$D = \frac{0.9 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3)$$

Donde D = tamaño del cristal, λ = longitud de onda de la radiación ionizante, θ = ángulo de difracción y β = FWHM de la difracción del pico.

2.5.2 Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución

La morfología y la distribución de los tamaños de las NPs de GAG fue analizado con un microscopio electrónico de transmisión, operando a un voltaje de aceleración de 200 kV. Las muestras fueron dispersadas en isopropanol durante 10 minutos con una punta ultrasónica y puestas pocas gotas en una gradilla de cobre.

2.5.3 Análisis de potencial Z

El potencial Z de las NPs de GAG fue llevado a cabo con un equipo Microtrac Nanotrak Wave II en medio acuoso. Las NPs previo al análisis fueron sometidas a ultrasonido durante 10 min a una concentración de 0.6 mg/mL.

2.5.4 Espectroscopia de infrarrojo

El análisis de espectroscopia de infrarrojo de las NPs con diferentes grupos funcionales en su superficie fue llevado a cabo con un espectroscopio de infrarrojo Thermo Scientific, Nicolet 6700.

2.5.5 Estudios de fotoluminiscencia y rendimiento cuántico

Los espectros de emisión y de excitación de las NPs fue estudiado con un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi F-7000) usando una lámpara de arco de Xenón. El rendimiento cuántico fue medido usando una esfera de integración con silicato de sodio (con un rendimiento cuántico de 44 %) como referencia estándar.

2.5.6 Estudios magnéticos

Las mediciones de magnetización fueron llevadas a cabo usando un dispositivo de interferencia cuántica superconductor (SQUIT, 3T) a temperatura ambiente.

2.6 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231), la cual fue adquirida de *American Type Culture Collection* (ATCC). El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), 1% de penicilina streptomycin, 1% de aminoácido L-glutamina y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio.

Para asegurar el adecuado crecimiento celular se verificó que las cajas Petri estuviesen cerradas, la temperatura de incubación fuese de 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

2.6.1 Tripsinización de las células de cáncer de mama MDA-MB-231

La tripsinización es el proceso utilizado en cultivos celulares para separar las células que están adheridas a la caja Petri usando tripsina, una enzima proteolítica que degrada las proteínas de adhesión. Lo primero que se hace es retirar el medio de cultivo y lavar las células con un buffer de fosfato salino (PBS). Enseguida se agrega tripsina a la caja Petri con células y de inmediato se meten en una incubadora durante unos 5 minutos. Entonces se agrega PBS y medio de cultivo para centrifugar las células a 1250 rpm. En este punto se realiza un conteo celular para asegurar que en cada pozo halla aproximadamente 10,000 células. Para realizar el conteo celular, se utiliza una cámara de Neubauer y la ecuación 4.

Finalmente, se re-suspenden las células en medio de cultivo y se colocan en una caja de 96 pozos durante 24 horas en una incubadora.

$$\# \text{ células} = (\text{promedio de células por cuadrante}) * (\text{dilución}) * (10,000) * (\text{vol. total}) \quad (4)$$

2.7 Ensayo de viabilidad celular por la reducción de MTT

El estudio de la citotoxicidad de las NPs en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico). Se evaluó la citotoxicidad de las NPs de GAG, NPs de GAG@SiO₂, NPs de GAG@SiO₂@APTMS y las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F.

Se prepararon soluciones de cada una de las NPs arriba mencionadas, a una concentración de 1 mg/mL, a partir de la cual se realizan diluciones sucesivas en tubos de 1.5 mL de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Diluciones sucesivas de NPs en medio de cultivo.

Tubo	NPs [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Vol. de la sol. Previa [μL]	Vol. de medio de cultivo [μL]	Masa ($\mu\text{g}/\text{tubo}$)
1	100	10	90	10
2	10	10	90	1
3	1	10	90	0.1
4	0.1	10	90	0.01
5	0.001	10	90	0.001

Posteriormente se preparó una solución con un volumen total de 350 μL , donde 35 μL son de la solución de NPs previamente preparadas y 315 μL del medio de cultivo. En seguida, se agregaron 100 μL de estas soluciones a 3 pozos con 10,000 células de cáncer de mama MDA-MB-231 (100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$), con el fin de tener un triplicado de cada dato. Las células se incubaron con las NPs durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Además, se tomó un control positivo en medio de cultivo y un control negativo en DMSO (figura 6).

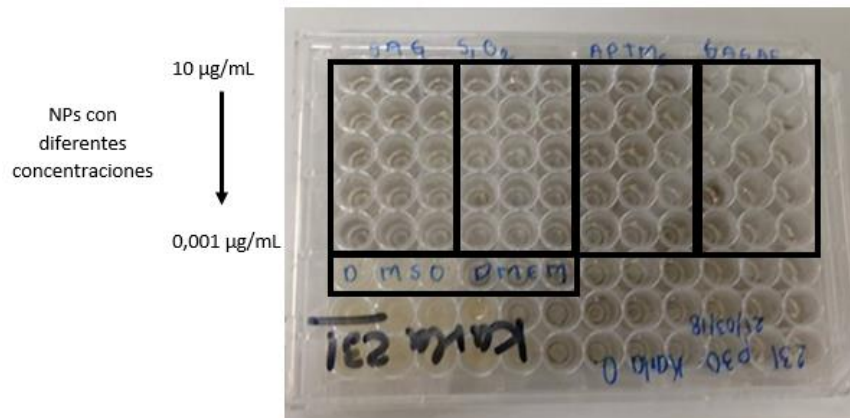


Figura 6. Placa de 96 pozos con 10,000 células aproximadamente por pozo. Células de cáncer tratadas con NPs a diferentes concentraciones. Adicionalmente se indican 3 pozos destinados a un control positivo y 3 pozos para un control negativo.

Transcurridas las 24 h, las células se lavaron con buffer de PBS con un pH de 7.4, 3 veces con el fin de eliminar las NPs que no se unieron a las células. Después, se agregan 90 µL de medio RPMI-1640 y 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) y se incubó la placa por 4 h a 37 °C y 5% de CO₂.

Después del proceso previamente descrito, el reactivo MTT es internalizado por las células y en caso de que las células estén vivas, el reactivo es reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a formazan, el cual forma cristales insolubles de color morado. Posteriormente se agregan 100 µL de isopropanol a cada pozo de la caja de cultivo, para solubilizar los cristales de formazan y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez que los cristales se han solubilizado, estas soluciones absorben entre 500 y 600 nm. De esta forma se puede cuantificar la cantidad de formazan en un sistema y por ende relacionarlo proporcionalmente con el número de células vivas. En la figura 7 muestra una placa con 96 pozos que han sido tratados con MTT, sin embargo, solo las columnas que tienen un color morado fuerte, el MTT ha sido transformado a formazan en iso-propanol. Adicionalmente el color morado intenso indica que las células están vivas en una alta proporción. Finalmente, la citotoxicidad de las NPs se evaluó midiendo la absorbancia con un lector de placas ELISA (*Thermo Scientific*, E.U.A.) a 570 nm y 690 nm.

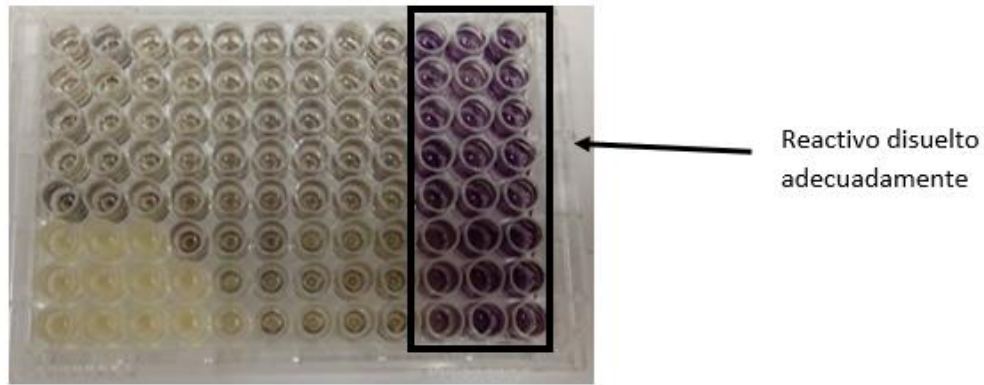


Figura 7. Pozos con células y NPs tratadas con MTT disueltas en iso-propanol. En las 3 columnas (de derecha a izquierda) el MTT ha sido apropiadamente disuelto, las demás contienen MTT pero no está disuelto apropiadamente.

2.8 Ensayo de internalización de nanopartículas

2.8.1 Medición de la internalización de NPs por citometría de flujo

Para determinar si las NPs eran internalizadas por las células de cáncer de mama MDA-MB-231, se midió la fluorescencia emitida por las NPs mediante citometría de flujo. Se incubaron 400,000 células MDA-MB-231 en presencia de 1 mg/mL de las NPs con FA por 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron tripzinizadas y resuspendidas en 1 mL de PBS para ser evaluadas por citometría de flujo en un citómetro Attune NxT con los siguientes parámetros FSC= 470, SSC=425, BL1, Ex/Em =492/517 nm. Y capturando un mínimo de 30,000 eventos por muestra. Se utilizó como control negativo células MDA-MB-231 sin tratamiento.

2.8.2 Visualización de la internalización de las NPs mediante microscopia confocal

La visualización de la internalización de las NPs, se realizó cultivando 400,000 células MDA-MB-231 por 24 h a 37 °C y 5% de CO₂ en una caja de Petri sensibilizada con Poly-D-lisina (MatTek Co.). Posteriormente, se incubaron las células de cáncer de mama con 1 mg/mL de las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F. por 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Una vez concluido este tiempo se lavaron las células y se fijaron por 10 minutos a 4 °C con 10 mL de solución de fijación (4% de formaldehído en PBS), para después permeabilizadas por 10

minutos a 4 °C con 10 mL de solución de permeabilización (0.5% Triton X-100 en PBS). El material nuclear fue teñido con DAPI (0.5 ng/mL) por 10 minutos en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron 10 veces con 1 mL de PBS y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización.

Las células se visualizaron con un microscopio confocal invertido (Olympus FluoView, FV1000, Japón), equipado con una láser de argón. Se visualizó el ADN del núcleo celular, utilizando un filtro 405 con una longitud de onda de excitación de 365 nm y con un detector de emisión de 390-400 nm. Para visualizar la membrana plasmática se utilizó un filtro 488 con una longitud de onda de excitación de 515 nm y con un detector de emisión en 640 nm. Las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico fueron visualizadas con un filtro 488 con una longitud de onda de excitación de 450 nm y con un detector de emisión en 550 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión acromático 60x/1.48 N.A. La intensidad del láser se mantuvo al 20% para reducir el fotoblanqueo. Un fotomultiplicador permite la visualización simultánea de la fluorescencia en la célula entera. Las imágenes obtenidas fueron capturadas con el programa FV-10 ASW y analizadas con el programa FV-10ASW en la versión 04.02.03.06.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis de nanopartículas de GAG

Las NPs de GAG fueron sintetizadas por el método de sol-gel y combustión. Se encontró que las NPs sintetizadas por el método de combustión tienen una morfología definida, mientras que las NPs sintetizadas por el método de sol-gel no la tienen. Los estudios de la morfología y de la estructura de las NPs fueron llevados a cabo con difracción de rayos x de polvos y con TEM.

3.2 Características estructurales

Para estudiar la estructura cristalina de las NPs se empleó un análisis de DRX. Se encontró que los picos obtenidos de las NPs, los cuales corresponden a planos cristalográficos de la estructura cristalina de las NPs GAG, están de acuerdo con el patrón de difracción estándar de polvos de GAG, el documento JCPDS-32-0383 (figura 8). Entonces, la relación entre los patrones de difracción revela la presencia de una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo. Adicionalmente, se observan picos que corresponden a la fase secundaria $GdAlO_3$ (indicados con un *). Por otro lado, el valor calculado de la longitud axial de la celda primitiva de las NPs de $Gd_{2.98}Al_5O_{12} \cdot Ce_{0.02}$ fue $a = 4.28 \text{ \AA}$ y el tamaño de cristal calculado con la ecuación de Scherrer es de 25.93 nm.

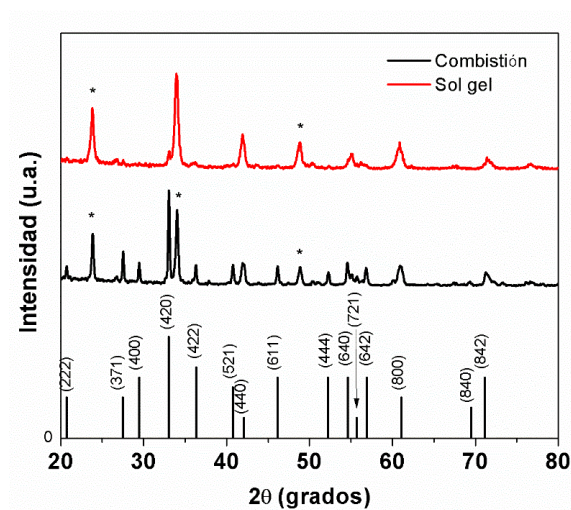


Figura 8. Patrón de difracción de rayos-X de las NPs de GAG sintetizadas por diferentes métodos.

3.3 Estudio de la morfología de las NPs

La microscopía electrónica de transmisión (*TEM*, por sus siglas en inglés) permitió estudiar la morfología, el tamaño promedio de las NPs y el grosor de la superficie modificada con SiO_2 de las NPs de $\text{GAG}:\text{Ce}^{3+}$. En las figuras 9 a-d se muestran las micrografías de TEM de las NPs de GAG desnudas (sin ninguna modificación), cuya morfología es irregular, lo cual es característico del método de síntesis por combustión. El tamaño promedio de las NPs es de alrededor 70 nm como se puede ver en el histograma de la figura 10, la cual se obtuvo al analizar 80 imágenes y más de 180 NPs.

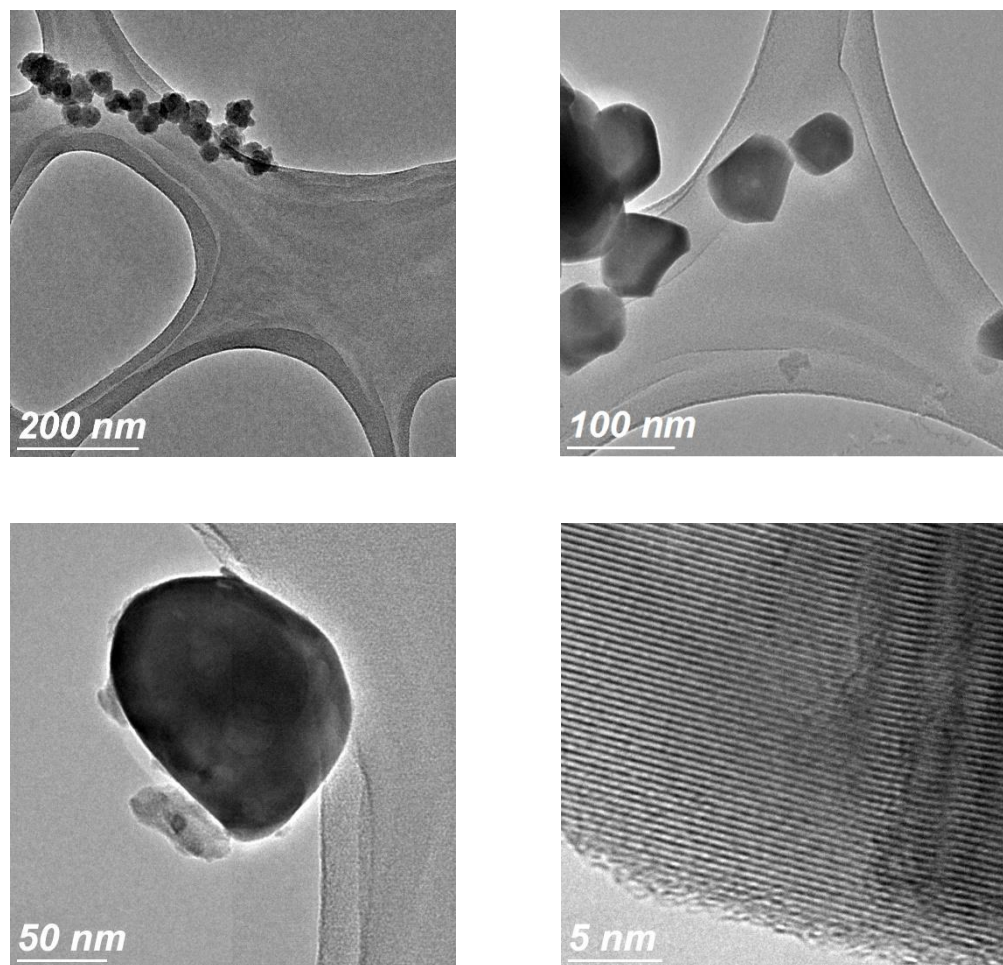


Figura 9. a-d) Micrografías de TEM de las NPs de GAG con diferentes aumentos.

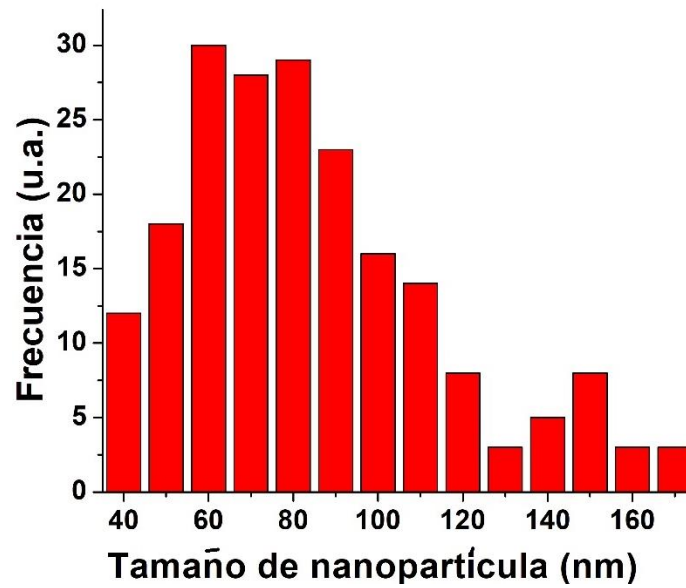


Figura 10. Distribución de tamaños en función del diámetro de las NPs.

En la figura 11 se puede observar el recubrimiento de las NPs con SiO_2 , la cual muestra un recubrimiento uniforme. El grosor promedio del recubrimiento de SiO_2 es de 12 nm, resultado que fue obtenido al analizar 50 imágenes y más de 150 NPs.

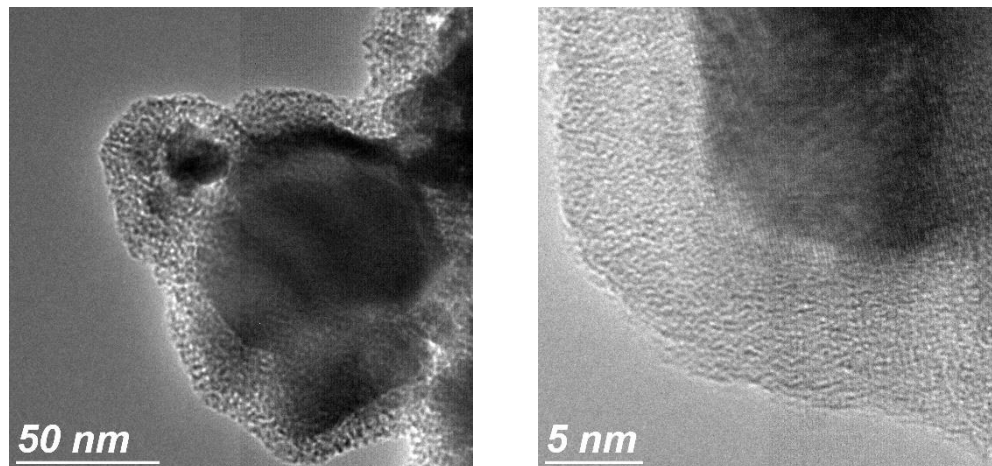


Figura 11. Imágenes de TEM de las NPs de GAG@SiO₂.

Adicionalmente, las micrografías electrónicas de transmisión de las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F. muestran un ligero aumento en aglomeración consecuencia de la funcionalización con especies orgánicas (figura 12), teniendo aglomerados con un tamaño de promedio de 150 nm.

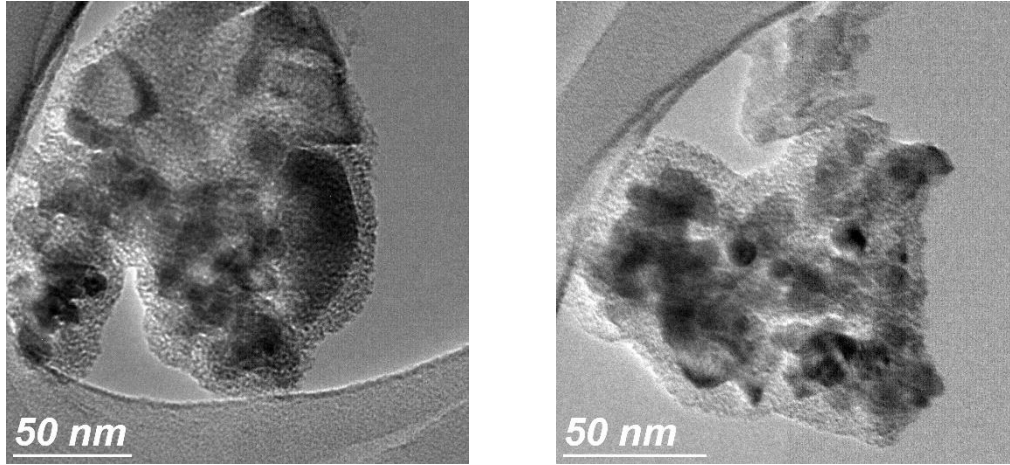


Figura 12. Imágenes de TEM de las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F.

3.4 Espectroscopia de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo (figura 13) permiten identificar los grupos funcionales y enlaces entre átomos en la superficie de materiales. En la tabla 2 se indican las señales asociados a grupos característicos dentro de las NPs. Así pues, para las NPs de GAG (y en este caso, todas las muestras) las señales alrededor de 555 cm⁻¹ y 690 cm⁻¹ confirman la presencia de enlaces entre los átomos de Gd y Al con los átomos de Oxígeno dentro de la estructura granate. Con respecto a las NPs de GAG@SiO₂, el pico de absorción alrededor de 1060 cm⁻¹ demuestra la formación de enlaces tipo Si-O-X (X = Al, Gd, Ce y C). La presencia de grupos amino primarios en las NPs de GAG@SiO₂@APTMS se comprueba con la presencia de los picos centrados en 1640 cm⁻¹ y 1981 cm⁻¹. Finalmente, las señales alrededor de 1513 cm⁻¹ y 1609 cm⁻¹ son características de grupos aromáticos, los cuales solo están presentes en las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F. pues el ácido fólico tiene grupos aromáticos en su estructura química.

Tabla 2. Tabla de asignación de grupos funcionales de las NPs.

No. de pico	Absorción (cm ⁻¹)	Grupo	M1	M2	M3	M4	Referencia
1	555	Gd-O	+	+	+	+	Jain e Hirata, 2016
2	690	Al-O	+	+	+	+	Naik <i>et al.</i> , 2015
3	1060	Si-O-X (X=Al, Gd, Ce y C)	-	+	+	+	Asakura R. <i>et al.</i> , 2006
4	1392	(CO ₃) ²⁻	+	+	-	-	Jain <i>et al.</i> , 2016
5	1513	Anillos aromáticos	-	-	-	+	J. M. Shen <i>et al.</i> , 2012
6	1609	Anillos aromáticos	-	-	-	+	J. M. Shen <i>et al.</i> , 2012
7	1632	Delta-H ₂ O	+	+	-	-	Jain <i>et al.</i> , 2016
8	1640	-NH ₂	-	-	+	-	Asakura R., <i>et al.</i> 2006
9	1981	-NH ₂	-	-	+	-	Asakura R., <i>et al.</i> 2006
10	2353	-CO ₂	+	+	-	-	Jain <i>et al.</i> , 2016
11	2930	Delta-CH ₂	+	-	-	-	Jain <i>et al.</i> , 2016
12	3430	-OH	+	+	-	-	Jain <i>et al.</i> , 2016

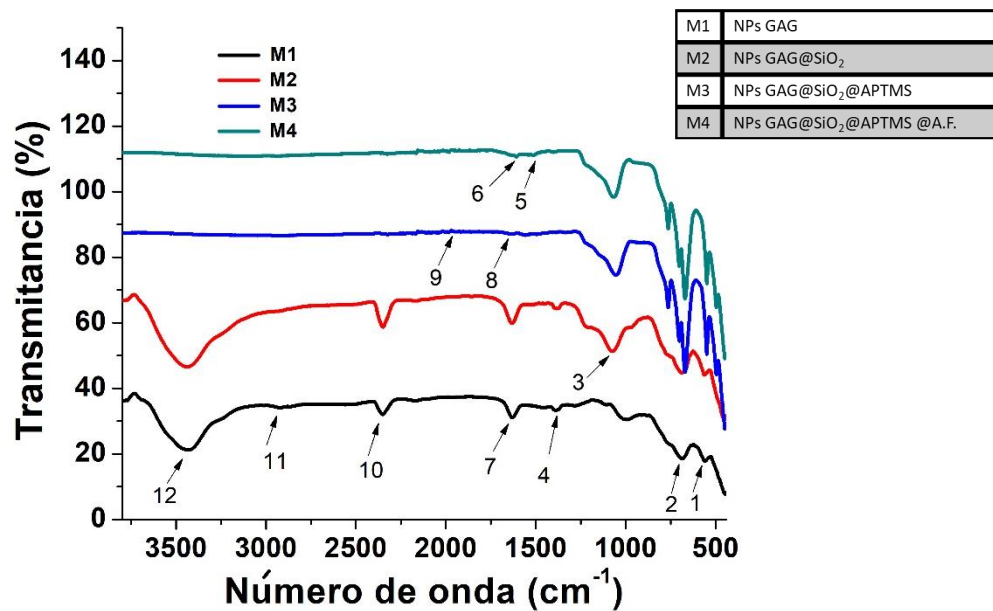


Figura 13. Espectros de infrarrojo de las NPs de GAG con diferentes superficies químicas.

3.5 Espectroscopia de UV visible

Con el objetivo de identificar la presencia de especies orgánicas en la superficie de las NPs de GAG a través de transiciones electrónicas se usó la técnica de espectroscopia de UV visible. El espectro de absorción de las NPs de GAG y el espectro de absorción del ácido fólico en solución acuosa se muestra en la figura 14. Los espectros de absorción de las NPs de GAG (M1), GAG@SiO₂ (M2) y GAG@SiO₂@APTMS (M3) no muestran ninguna transición electrónica en los espectros de UV visible en medio acuoso. Las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F. muestran dos picos de absorción, un pico bien definido a 279 nm y una curva centrada en 362 nm, mientras que el espectro de absorción del ácido fólico tiene una banda bien definido a 283 nm y una banda centrada a 364 nm. De esta forma se comprueba la presencia de ácido fólico en las NPs de GAG. Adicionalmente, con los estudios de espectroscopia de UV visible se determinó que hay 44.8 mg de ácido fólico por cada gramo de NPs.

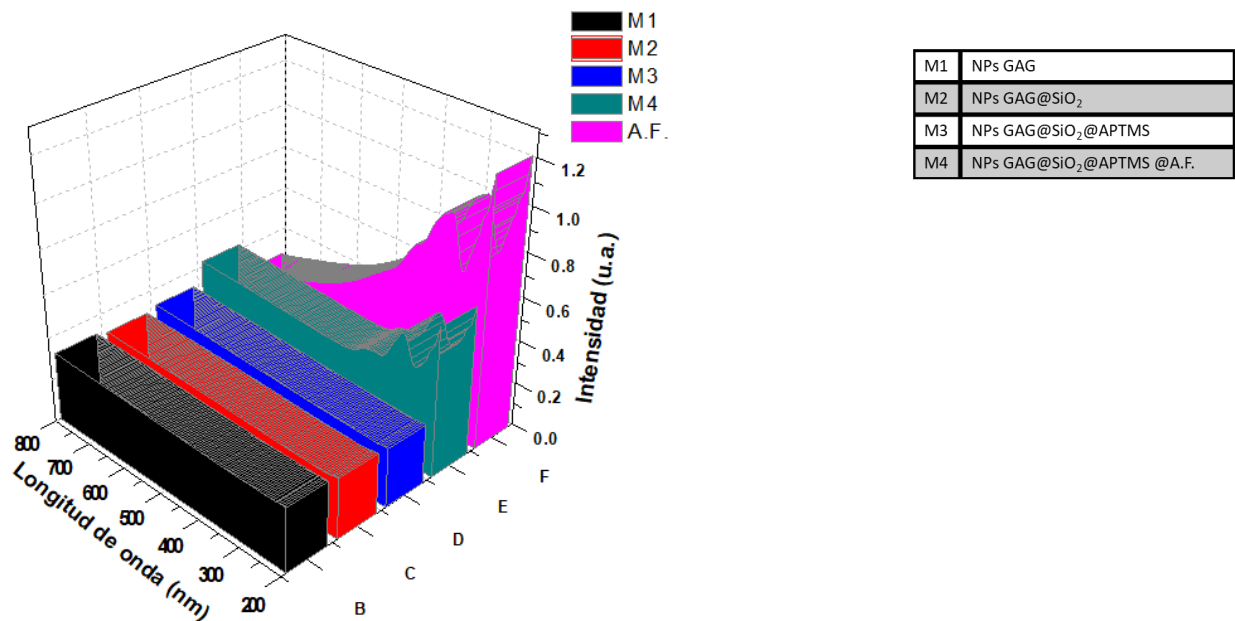


Figura 14. Espectros de absorción de las NPs de GAG y del ácido fólico en solución acuosa.

3.6 Potencial Z

Se investigó la estabilidad coloidal NPs de GAG a través de la técnica de potencial zeta. En la figura 15 se muestra la carga negativa superficial de las NPs, donde las de NPs de GAG desnudas tienen una potencial zeta promedio con un valor de -27.7 mV. El valor del potencial zeta promedio de las NPs de GAG@SiO₂, GAG@SiO₂@APTMS y GAG@SiO₂@APTMS@A.F. es -17.4 mV, -19.1 mV y -20.2 mV, respectivamente. El incremento del potencial zeta de las NPs una vez modificadas con sílice confirma la exitosa modificación de las NPs de GAG, pues mayores valores de potencial zeta describen que la intensidad de campo eléctrico estático de la capa de iones formados alrededor de las NPs es más estable.

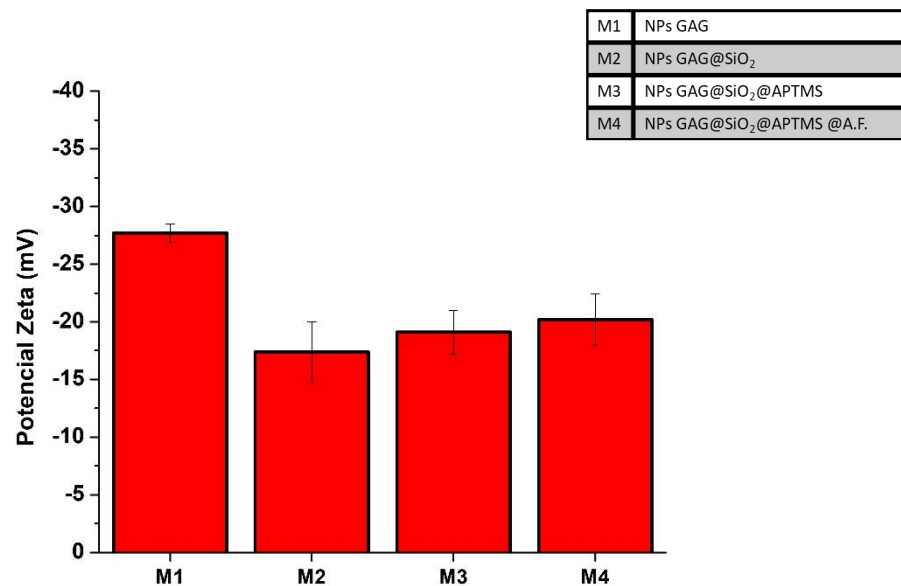


Figura 15. Potencial Z de diferentes NPs de GAG en solución acuosa.

3.7 Estudios de fotoluminiscencia

3.7.1 Nanopartículas de YAG, YAGG y GAG

Los estudios preliminares para la obtención de NPs luminiscentes/magnéticas se basaron en el incremento del contenido de Gd en las NPs de YAG sintetizadas por el método de combustión, y posteriormente, estudiando los efectos en las propiedades luminiscentes de las NPs. En la figura 16a se observa que al

aumentar el contenido de Gd en las NPs de $Y_{(2.92-x)}Gd_xAl_5O_{12}:Ce_{0.08}$ la intensidad de luminiscencia disminuye, además de que la longitud de onda de emisión se desplaza a mayores longitudes de onda. Los espectros de emisión normalizada de NPs de YAG, YAGG y GAG dopadas con cerio (figura 16b) muestran que al aumentar el contenido de Gd en la red hospedera de YAG de forma parcial o total, la longitud de onda de emisión se desplaza a mayores valores de longitud de onda (explicación en la discusión de resultados). Así hay un desplazamiento de 41 nm entre el pico máximo de emisión de las NPs de YAG y las NPs de GAG dopadas con cerio. Debido a las propiedades fisicoquímicas convenientes de las NPs de GAG para aplicaciones biológicas, estas fueron escogidas para realizar los estudios posteriores.

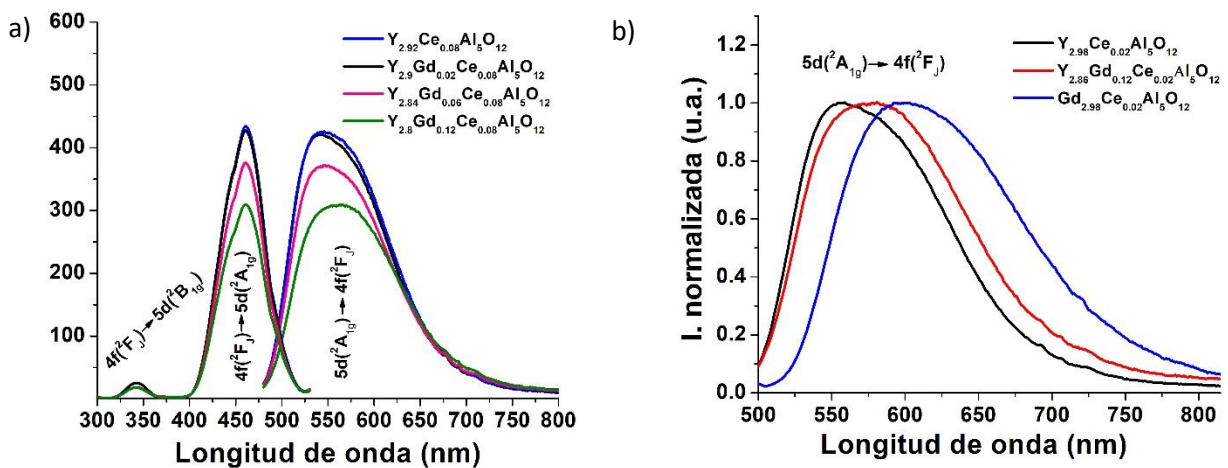


Figura 16. a) Espectros de excitación y de emisión de $Y_{(2.92-x)}Gd_xAl_5O_{12}:Ce_{0.08}$ y b) espectros de emisión normalizada de YAG, YAGG y GAG con un 2% de cerio.

3.7.2 Nanopartículas de GAG sintetizadas por diferentes métodos

Para elegir el método de síntesis más apropiado se estudiaron las propiedades luminiscentes y morfológicas de las NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión y sol-gel. Se encontró que la intensidad de luminiscencia de las NPs sintetizadas por el método combustión son un 28% superior respecto a la intensidad de las NPs sintetizadas por el método de sol-gel, probablemente por un mayor número de defectos en su superficie. Se encontró que el rendimiento cuántico de las NPs de GAG sintetizados por ambos métodos es de alrededor del 32%. Adicionalmente, la morfología de las NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión es definida, mientras que la morfología de las NPs sintetizadas por el método de sol-gel no la tienen y además tienen un grado alto de aglomeración (figura

17b-e). Por estos resultados, los estudios posteriores se realizaron con las NPs sintetizadas por el método de combustión.

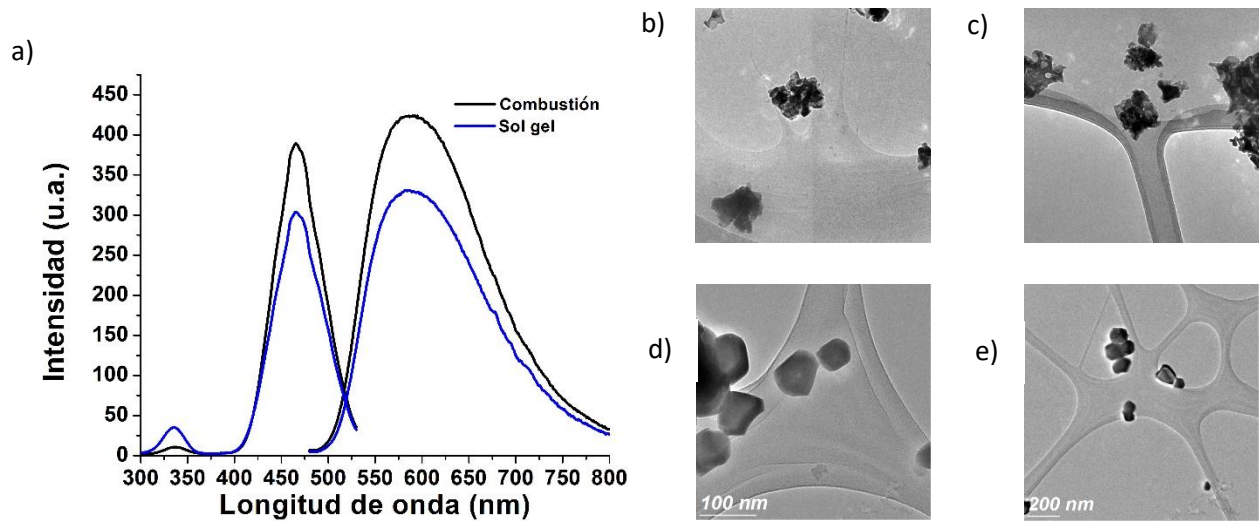


Figura 17. a) Espectros de excitación y de emisión de NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión y de sol-gel, b) y c) imágenes de TEM de NPs de GAG sintetizadas por sol gel, d) y e) NPs de GAG sintetizadas por combustión.

3.7.3 Concentración óptima de dopaje

La concentración de dopaje de cerio fue variada del 1% al 8% en las NPs de GAG con el fin de identificar la muestra con los más altos valores de intensidad de luminiscencia y rendimiento cuántico. En la figura 18a se muestra la intensidad de emisión de luminiscencia normalizada en función de la concentración de dopaje de cerio. La concentración del 2% de cerio muestra el más alto valor de intensidad de luminiscencia.

Por otro lado, el rendimiento cuántico de un material se refiere a la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos (ecuación 5). El rendimiento cuántico en las NPs de GAG es dependiente de la concentración de cerio. Así, la concentración óptima de dopaje de cerio en las NPs de GAG es de 2%, con un valor correspondiente al 32.81% como se puede ver en la figura 18b.

$$\Phi = \frac{\# \text{ de fotones emitidos}}{\# \text{ de fotones absorbidos}} \quad (5)$$

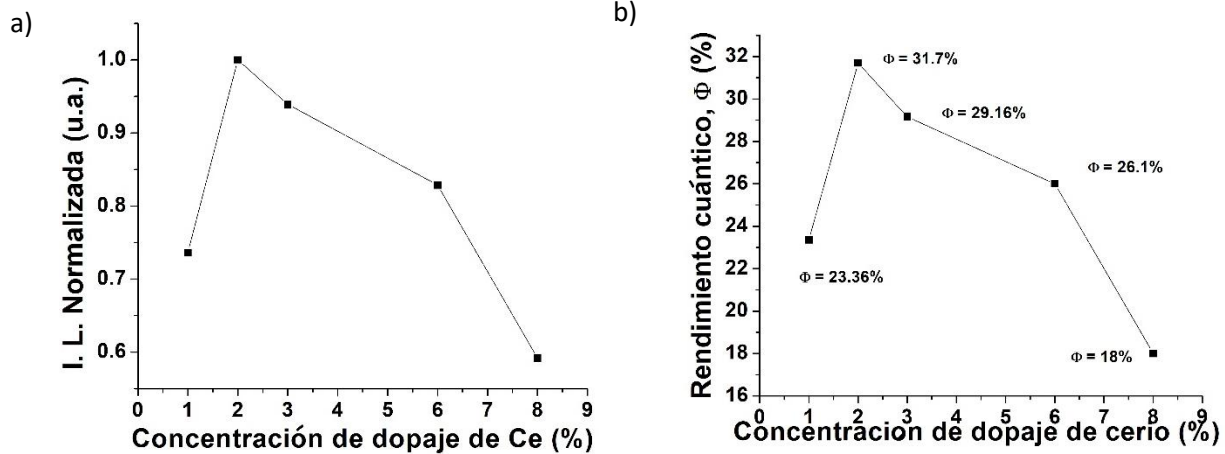


Figura 18. a) Intensidad de luminiscencia normalizada de NPs de GAG en función de la concentración de dopaje de cerio y b) rendimientos cuánticos de NPs de GAG.

3.7.4 Cambio en la intensidad de luminiscencia por funcionalización

Se investigaron los cambios en la intensidad de luminiscencia de las NP de GAG con diferentes superficies químicas con las mismas cantidades de material. La intensidad de luminiscencia disminuye cada vez que las NPs de GAG son recubiertas o funcionalizadas (figura 19). A pesar de que la intensidad de luminiscencia de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico es menor que las NPs de GAG, ésta fue suficiente para ser detectada por microscopía confocal.

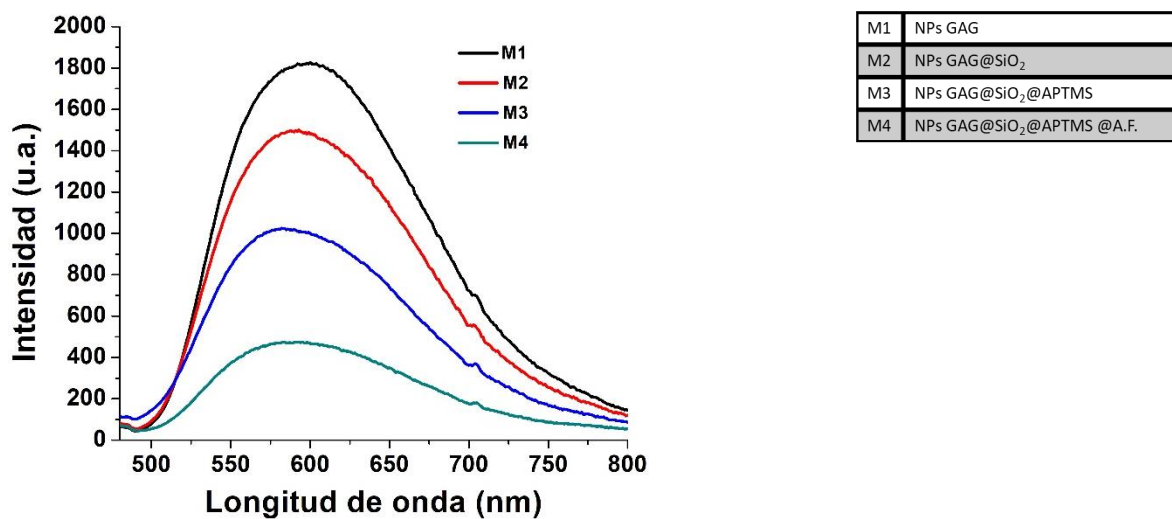


Figura 19. Cambios en la intensidad de luminiscencia de las NPs de GAG después de las diferentes funcionalizaciones.

3.8 Estudio de las propiedades magnéticas de las NPs

Las gráficas del magnetómetro de muestra vibrante (*VSM*, por sus siglas en inglés) permiten estudiar el comportamiento magnético de los materiales. Las gráficas *VSM* de las NPs de GAG analizadas a temperatura ambiente se muestran en la figura 20.

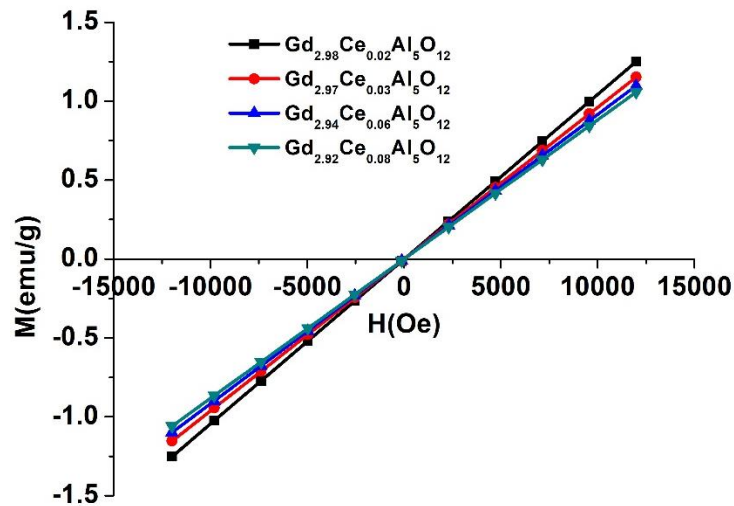


Figura 20. Curva de magnetización (M)- campo magnético (H) de las NPs de GAG.

Adicionalmente, en la figura 21, se observa que el valor de la susceptibilidad magnética de las NPs de GAG disminuye cuando son recubiertas con SiO_2 . Sin embargo, el valor de la susceptibilidad magnética aumenta cuando las NPs son funcionalizadas con ácido fólico. Los valores de susceptibilidad magnética se muestran en la tabla 4.

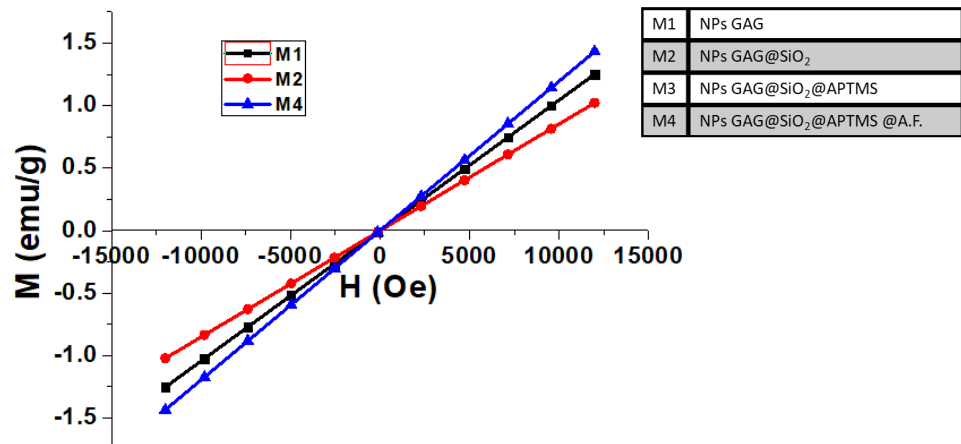


Figura 21. Valores de la susceptibilidad magnética dependientes de la cantidad de cerio.

Tabla 3. Volores de susceptibilidad magnéticas de NPs de GAG.

NP	M1	M2	M4
χ_m (emu/gOe)	8.78×10^{-5}	1.04×10^{-4}	9.61×10^{-5}

3.9 Estudios de viabilidad celular

Los estudios colorimétricos de viabilidad celular se realizaron a través de la reducción del reactivo MTT a formazan. Cuando las células están muertas, no son capaces de reducir químicamente al MTT debido a que metabólicamente no son activas, por lo que la coloración del sistema bajo estudio no cambia (como consecuencia su absorbancia es baja). Bajo este principio, se realizaron los estudios de viabilidad en células de cáncer de mama (MDA-MD-231) con NPs de GAG a diferentes concentraciones (figura 22). Demostrando que las NPs de GAG no son citotóxicas incluso a concentraciones altas (a excepción de las NPs de GAG desnudas que son ligeramente citotóxicas).

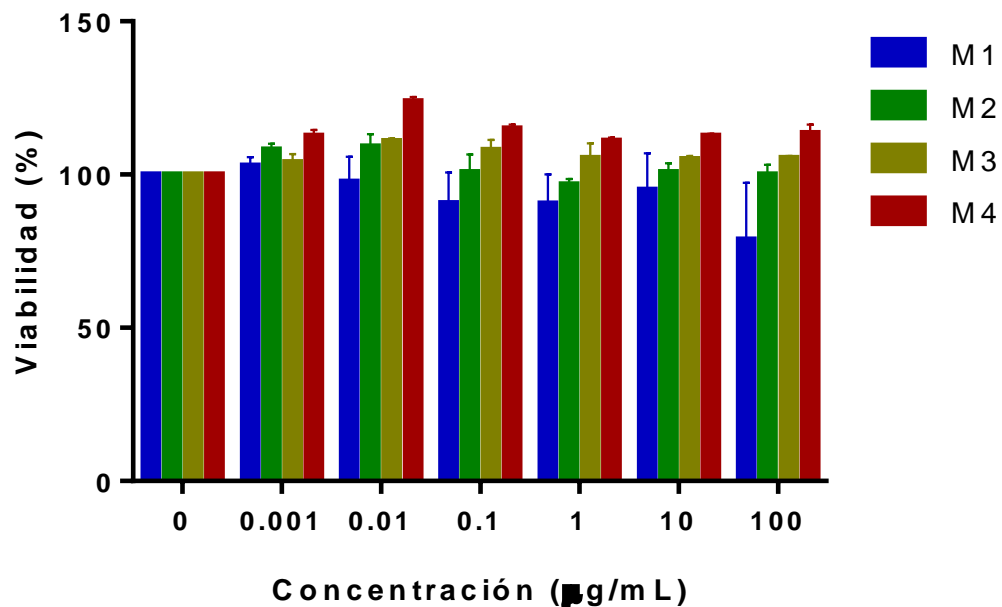


Figura 22. Viabilidad celular de células de cáncer de mama MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de NPs de GAG.

3.10 Internalización intracelular de las NPs de GAG

La captación celular de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico en las células de cáncer MDA-MB-231 se determinó mediante citometría de flujo (figura 23). Comparado la intensidad de fluorescencia del control y de las células de cáncer de mama con las NPs de GAG, se observa un remarcado incremento en la intensidad de fluorescencia.

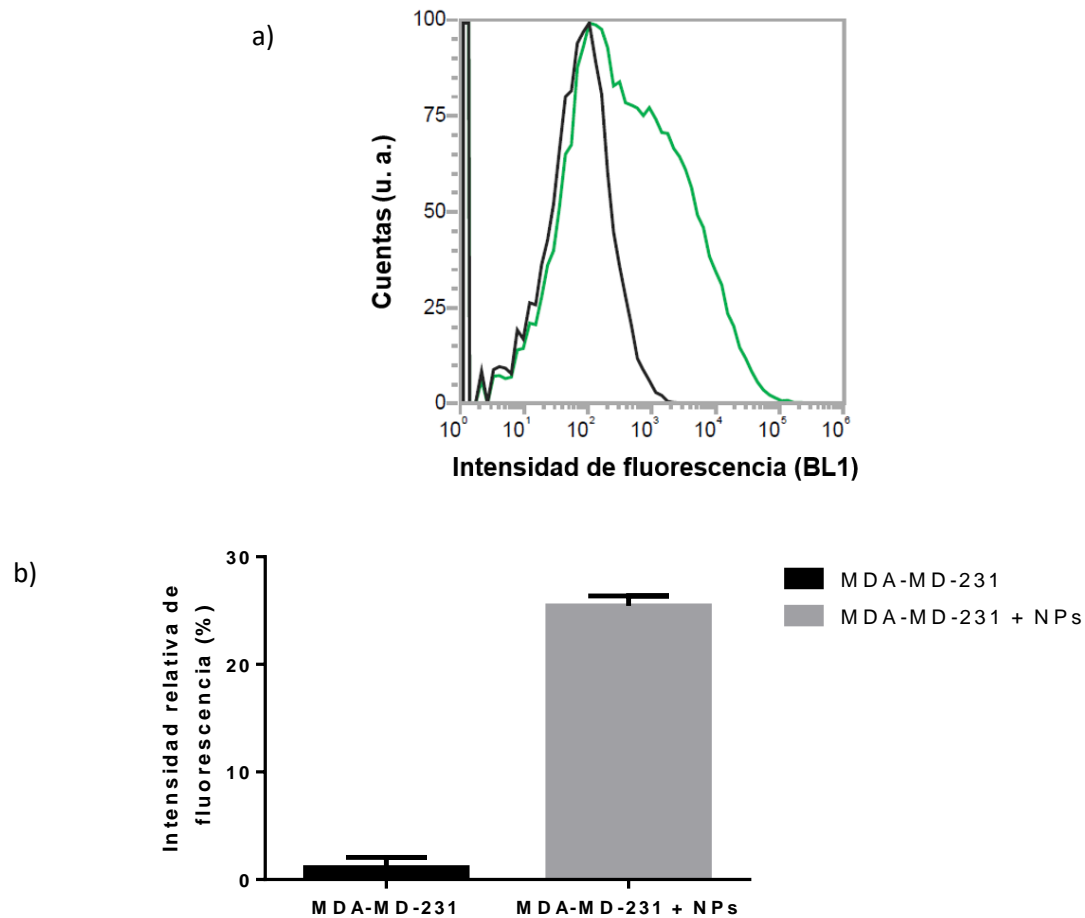


Figura 23. a) Curva de citometría de flujo de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 tratadas con NPs de GAG. La curva de color negro representa el control y la curva de color verde es la intensidad de luminiscencia de las células de cáncer de mama incubadas con las NPs de GAG con ácido fólico y b) histogramas de citometría de flujo de las células de cáncer de mama sin y con NPs de GAG que indican la intensidad relativa de la luminiscencia de cada grupo.

3.11 Estudios de internalización de NPs por microscopia confocal

Los estudios de microscopia confocal pueden identificar materiales luminiscentes en el citoplasma o en la membrana de un determinado tipo de célula. De esta forma se puede estudiar la morfología de algún componente celular (como los organelos), así como estudiar fenómenos como la internalización de materiales luminiscentes. Así pues, en las imágenes de microscopia confocal de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 de la figura 24, se observa el núcleo marcado con DAPI ($C_{16}H_{15}N_5$), el cual atraviesa la membrana celular e interacciona con regiones ricas en adenina y timina del ADN en el núcleo celular. También se observa la luminiscencia de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico que emiten en verde.

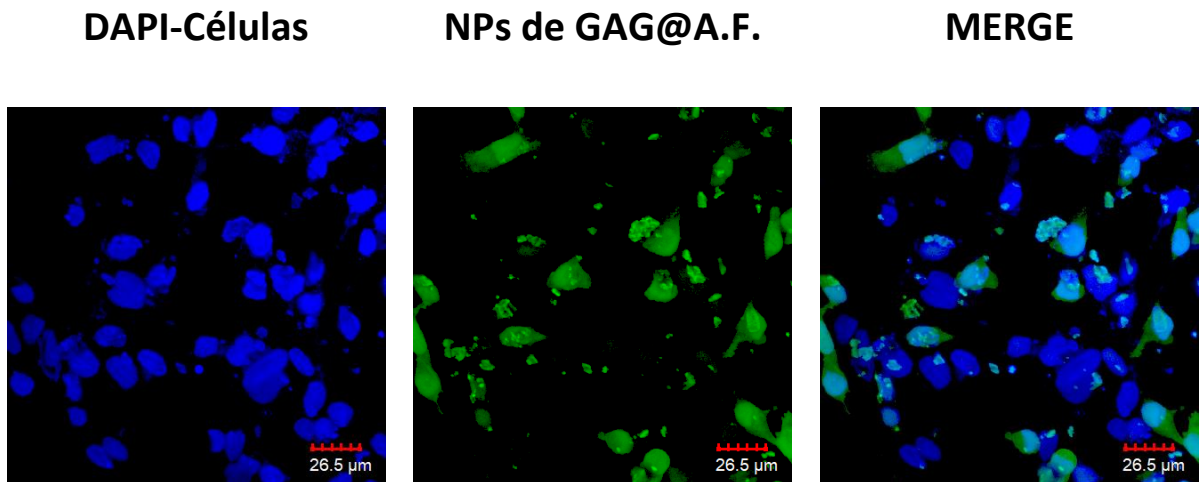


Figura 24. Se observan las imágenes del microscopio confocal de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, con diferentes moléculas y materiales luminiscentes, señalados en la parte superior de cada imagen.

Adicionalmente, con el análisis de otro campo, se observó la formación de vesículas de diferentes tamaños en el interior de las células de cáncer debido a la internalización de las NPs a través de endocitosis mediada por receptores, la formación de vesículas de gran tamaño se debe probablemente a que las NPs estaban aglomeradas (con tamaños de alrededor de 150 nm, determinado por TEM), como se puede ver en la figura 25.

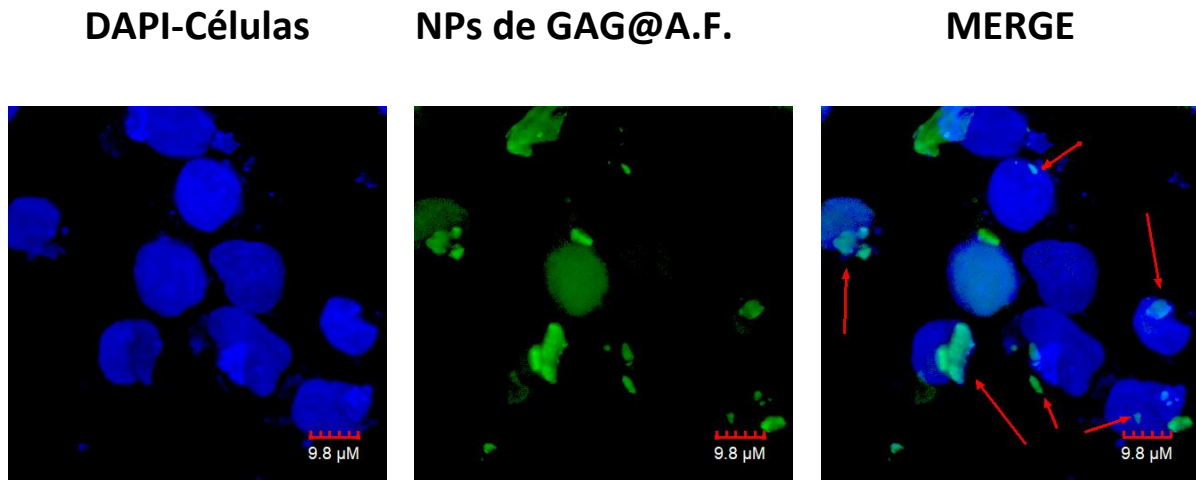


Figura 25. Se observa la formación de vesículas en el interior de las células de cáncer MDA-MB-231, como se indica con los círculos y flechas color rojo.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Síntesis de nanopartículas de GAG

Las NPs de GAG fueron sintetizadas por el método de combustión y sol-gel. En la síntesis por combustión, una vez que los nitratos en solución acuosa han sido mezclados adecuadamente, la solución se calienta en un horno industrial, donde las reacciones exotérmicas entre los diferentes nitratos metálicos y el combustible (carbohidrazida) comienzan a una temperatura de alrededor de 500 °C, temperatura a la cual se libera una gran cantidad de gases (Sengar *et al.*, 2016). Sin embargo, el material, resultado de este procedimiento, no es cristalino, por lo que se les da un tratamiento térmico a temperaturas elevadas. Se ha demostrado que para tener partículas cerámicas altamente cristalinas con una estructura cristalina tipo granate, son necesarios tratamientos térmicos con temperaturas superiores a 900 °C. Sin embargo, en el caso de las NPs de GAG, el tratamiento térmico debe tener algunas consideraciones antes de su realización, ya que los átomos de Gd^{3+} tienen un tamaño atómico que está al límite para obtener materiales tipo $Ln_3Al_5O_{12}$ termodinámicamente y estructuralmente estables (J.-G. Li y Sakka, 2015). Como consecuencia, temperaturas de tratamiento térmico superiores a 1100 °C provocarían el colapso de la estructura cristalina y, como resultado, pobres propiedades luminiscentes. Alternativamente, se pueden dopar los materiales de GAG con estabilizadores estructurales como el lutecio, sin embargo, este material es costoso y el aumento en las propiedades fisicoquímicas no es significativo. Por lo que a una temperatura de tratamiento térmico a 1100 °C es suficiente para obtener un material cristalino, como se comprobó en este trabajo.

Con respecto a la síntesis de las NPs de GAG por el método de sol-gel se usó ácido tartárico como agente quelante, donde las NPs recibieron un tratamiento térmico a 1100 °C por 3 h para mejorar la cristalinidad de las muestras. Sin embargo, las propiedades luminiscentes y estructurales son pobres, por lo que es necesario optimizar los parámetros de síntesis. De esta forma, las NPs sintetizadas por el método de combustión fueron elegidas para realizar los estudios fisicoquímicos y biológicos debido a que presentan una mejor estructura y propiedades luminiscentes que las NPs sintetizadas por el método de sol-gel.

4.2 Caracterización estructural y morfológicas de las nanopartículas de GAG

Las NPs de GAG cristalizan con una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo (*bcc*, por sus siglas en inglés) con el grupo espacial $Ia\bar{3}d$. La celda cúbica primitiva de la estructura *bcc* de las NPs de GAG contienen 160 átomos, donde los átomos de Gd^{3+} ocupan los sitios $24c$, los cuales tienen una simetría D_2 con un número de coordinación igual a 8 (el número de coordinación es el número de átomos que un átomo o ion central mantienen como sus vecinos cercanos en un cristal) y los átomos de oxígeno ocupan los sitios $96h$. Los átomos de Al ocupan dos posiciones no equivalentes: 1) el sitio $16a$ con una simetría puntual octaédrica con un número de coordinación igual a 6. 2) Los sitios $24d$ con una simetría puntual tetragonal con un número de coordinación igual a 4 (J.-G. Li y Sakka, 2015).

Los patrones de difracción obtenidos de las NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión y de sol-gel están de acuerdo con la información obtenida del patrón estándar de GAG, el documento JCPDS-32-0383. Con lo que se confirma una fase cristalina cúbica. Adicionalmente, algunas fases secundarias como $GdAlO_3$ son detectadas en los patrones obtenidos de las NPs sintetizadas. Sin embargo, la presencia de fases secundarias no presenta ningún cambio en los espectros de emisión y de excitación de materiales con una red cristalina de $Ln_3Al_5O_{12}$ (V.P. Dotsenko *et al.*, 2015).

Con respecto a la caracterización morfológica de las NPs sintetizadas por el método sol-gel no presentaron una morfología definida, por lo que, si se desea utilizar este método, será necesario optimizar los parámetros de síntesis para obtener mejores resultados. Por otro lado, las NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión tienen un alto grado de cristalinidad, lo cual fue confirmado con la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (*high-resolution TEM*, por sus siglas en inglés). Además, se revela que las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico tienen un tamaño promedio de 150 nm, que corresponden a aglomerados de NPs. Para aplicaciones de bio-imagen, el tamaño de las NPs define la habilidad para ser empleado como bioetiquetador. El resultado del tamaño promedio de los aglomerados de las NPs GAG funcionalizadas con ácido fólico sugiere que pueden ser empleadas como bioetiquetadores para células de cáncer (J.-M. Shen *et al.*, 2012; Tagaya *et al.*, 2014).

Las micrografías de las NPs de $GAG@SiO_2$ muestran un exitoso y uniforme recubrimiento. Sin embargo, a consecuencia del recubrimiento con sílice, hay un ligero aumento de aglomeración de las NPs. Las micrografías de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico muestran la formación de aglomerados de NPs de un tamaño aproximado de 150 nm.

4.3 Análisis de microscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La superficie química de las NPs desnudas y modificadas fue analizado con FTIR. Los picos de absorción con su correspondiente grupo funcional están listados en la tabla 2. La absorción característica de los óxidos de gadolinio y las interacciones aluminio-oxígeno fueron detectadas a 565 cm^{-1} y 690 cm^{-1} , respectivamente. El pico de absorción centrado en 1392 cm^{-1} corresponde al grupo funcional $(\text{CO}_3)^{2-}$, el cual puede ser debido a la descomposición incompleta de la carbohidrazida. Adicionalmente es posible que sea por la adsorción de especies carboneases (como CO_2 , el cual fue detectado en 2363 cm^{-1}) debido a que las NPs fueron sintetizadas en condiciones acuosas. También se observa la presencia de grupos hidroxilo en la superficie de las NPs desnudas y modificadas, las cuales se deben a las altas temperaturas de tratamiento térmico. El pico de absorción en 1060 cm^{-1} corresponde a la interacción entre los átomos Si-O-X (donde X=Al, Y, Ce y C), los cuales están presentes en M2, M3 y M4. Pues estas muestras tienen un gran contenido de sílice en su superficie. Las señales alrededor de 1640 cm^{-1} y 1981 cm^{-1} corresponden a grupos amino primarios, los cuales se encuentran únicamente en la M3 (debido a la presencia de APTMS). Finalmente, en 1609 cm^{-1} y 1513 cm^{-1} se detectan señales de grupos aromáticos, los cuales corresponden al sistema aromático de las moléculas de ácido fólico (solo presentes en la M4).

4.4 Análisis de espectroscopia de UV visible

El objetivo de usar el análisis de espectroscopía de UV visible fue el de identificar grupos funcionales en la superficie de las NPs para corroborar la información obtenida con las otras técnicas de caracterización superficial previamente descritas. Los espectros de absorción de las NPs de GAG, GAG@SiO₂, y GAG@SiO₂@APTMS no mostraron ninguna banda de absorción característica, pues los grupos funcionales en la superficie de estas NPs no presentan transiciones electrónicas de 200 nm a 600 nm o bien, es necesario otro medio para facilitar las transiciones electrónicas. Por otro lado, las NPs funcionalizadas con ácido fólico presentan una banda de absorción centrada en 279 nm, la cual es debido a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ debido al anillo pterina (Rana *et al.*, 2016). Sin embargo, un ligero desplazamiento es observado comparando los espectros de absorción de las NPs con ácido fólico y el ácido fólico puro en solución, lo cual indica una modificación del ambiente electrónico del ácido fólico unido a las NPs. Entonces, la presencia de las mismas bandas de absorción en los espectros del ácido fólico y las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico confirman la presencia de ácido fólico en la superficie de las NPs de GAG.

4.5 Potencial Z

La estabilidad coloidal de las NPs de GAG con diferentes superficies químicas fue estudiado a través de mediciones de potencia zeta. El análisis reveló que las NPs de GAG tienen un valor de potencial zeta promedio de -27.7 mV, lo cual indica una alta estabilidad coloidal en medio acuoso. El valor del potencial zeta promedio de las NPs de GAG@SiO₂ es de -17.4 mV, valor cambia a valores más negativos (y por ende más estables en solución) cuando estas NPs son funcionalizadas con APTMS a un valor de -19.1 mV. Así mismo, cuando las NPs que tienen APTMS en su superficie son funcionalizadas con ácido fólico, el valor del potencial zeta incrementa a -20.2 mV. El alto potencial negativo de las NPs sugiere una óptima estabilidad en solución acuosa.

4.6 Estudio de las propiedades luminiscentes de las nanopartículas de GAG

Se estudió las propiedades luminiscentes de las NPs de YAG, YAGG y GAG dopadas con cerio con el fin de encontrar el material con la mejor relación entre sus propiedades luminiscentes, magnéticas y morfológicas. En los tres materiales estudiados, en el espectro de excitación hay dos bandas, la banda de más alta energía corresponde a la transición electrónica $4f(^2F_J) \rightarrow 5d(^2B_{1g})$ y la otra banda corresponde a la transición electrónica $4f(^2F_J) \rightarrow 5d(^2A_{1g})$. El espectro de emisión, la transición electrónica correspondiente es $5d(^2A_{1g}) \rightarrow 4f(^2F_J)$. Adicionalmente, se observa una pequeña banda en el espectro de emisión alrededor de 706 nm en las NPs de GAG, y alrededor de 710 nm en las NPs de YAG y YAGG, la cual es atribuida a la impureza de iones de Cr³⁺ provenientes del precursor Al(NO₃)₃·9H₂O, cuya transición correspondiente es $^2E_g \rightarrow ^4A_{2g}$ (V.P. Dotsenko *et al.*, 2015).

Por otro lado, a pesar de que las propiedades luminiscentes de las NPs de YAG:Ce son muy buenas, pues poseen rendimientos cuánticos superiores al 32%, este material tiene pobres propiedades magnéticas. Entonces, con el fin de mejorar las propiedades magnéticas de las NPs de YAG, se dopó a este material con Gd, un material con propiedades paramagnéticas, el cual ocuparía el lugar del Y³⁺ dentro de la estructura garnet de las NPs. Sin embargo, las propiedades luminiscentes se vieron afectadas en este trabajo cuando el porcentaje de dopaje de Gd en las NPs de YAG fue superior al 2%. En otros trabajos, como el de Bartosiewicz (2017) se describe que el porcentaje óptimo de dopaje de Gd en YAG:Ce (para la obtención de YAGG) es del 1.75%, y con concentraciones superiores de dopaje de Gd, la intensidad de luminiscencia disminuye, debido a la desestabilización de la estructura cristalina. Además, con la sustitución parcial o

total de Y con Gd en YAG, el espectro de emisión se desplaza a mayores longitudes de onda, debido a que los sitios dodecaédricos son expandidos y distorsionados, provocando una partición del campo cristalino de la configuración electrónica 5d de los iones de Ce^{3+} . Debido a que desea tener un material con una buena relación entre las propiedades luminiscentes y magnéticas, se escogió a las NPs de GAG para realizar los estudios, ya que su alto contenido de Gd está directamente relacionado con las propiedades magnéticas. Además, la longitud de onda de emisión de las NPs de GAG están a mayores longitudes de onda con respecto a materiales como el YAG:Ce y el YAGG:Ce, lo hace un material ideal para aplicaciones biológicas.

Se prosiguió a escoger entre el método de síntesis de combustión con carbohidrazida y el método de sol-gel con ácido tartárico como agente quelante de las NPs de GAG en función de las propiedades luminiscentes y morfológicas. Así, se observó que tanto la intensidad de luminiscencia como las características morfológicas de las NPs de GAG sintetizadas por el método de combustión son mejores. Entonces las NPs sintetizadas por el método de combustión fueron elegidas para realizar los estudios posteriores.

Una vez seleccionado el método combustión para la síntesis de las NPs de GAG, se optimizó la concentración de dopaje de cerio para obtener la máxima intensidad de luminiscencia. Se encontró que con una concentración de dopaje del 2% de cerio, la intensidad de luminiscencia y el rendimiento cuántico son máximos (32.81%). A este porcentaje de dopaje, la distancia entre los iones de Ce dentro de la estructura cristalina granate es óptima. Con concentraciones de dopaje inferiores, la distancia entre los iones de Ce es de forma tal, que la excitación y emisión de los iones de Ce adyacentes no interfieren uno con el otro y así se pueden seguir agregando iones de Ce a la estructura garnet. Sin embargo, con una cantidad de iones de Ce superior a la óptima, ocurre un fenómeno llamado concentración de abatimiento (*quenching concentration*), con lo cual, las propiedades luminiscentes de los iones adyacentes interfieren entre sí.

Finalmente, se estudió el cambio en la intensidad de luminiscencia de las NPs de GAG después de recubrirlas con sílice y funcionalizarlas con APTMS y ácido fólico. Se observó que después de cada modificación química la intensidad de luminiscencia disminuyó. La intensidad de luminiscencia de las NPs de GAG@SiO₂ es aproximadamente un 18% inferior con respecto a las NPs de GAG, esto se debe a la presencia de grupos hidroxilos en la superficie de las NPs de GAG@SiO₂, pues los grupos hidroxilo unidos química o físicamente a la superficie de las NPs tienen energías vibracionales altas, lo cual abate la intensidad de luminiscencia de las NPs (Ansari, 2017). La disminución en la intensidad de luminiscencia

también es observada en las NPs de GAG@SiO₂@APTMS. Esto es debido a que las NPs son modificadas con especies orgánicas altamente polares, las cuales tienden a abatir la luminiscencia en un grado bajo (Huong *et al.*, 2016). Como consecuencia, se observa una disminución en la intensidad de luminiscencia. Con respecto a las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F. la intensidad de luminiscencia es inferior con respecto a las demás NPs, debido a la desactivación no radioactiva por las interacciones de apilamiento $\pi - \pi$ entre los anillos aromáticos de las moléculas de ácido fólico (Tagaya *et al.*, 2014). Además de este hecho, la presencia de grupos amino que se encuentran en los nanoporos y en la superficie de las NPs abate aún más la luminiscencia de las NPs de GAG@SiO₂@APTMS@A.F.

4.7 Estudio de las propiedades magnéticas de las NPs de GAG

Las propiedades magnéticas de las NPs de GAG fueron obtenidas mediante VSM, lo cual reveló que las NPs son paramagnéticas a temperatura ambiente. Los lantánidos, tales como el Gd, Tb, Dy y Ho tienen fuertes propiedades paramagnéticas y altos valores de susceptibilidad magnética. En el caso particular de los materiales que contienen Gd³⁺, tales como las NPs de GAG, los electrones del orbital 4f son los responsables de las propiedades paramagnéticas pues tienen 7 electrones desapareados. Los electrones del orbital 4f están apantallados por los electrones de los orbitales 5s y 5p, por lo que no contribuyen a la formación de enlaces químicos (Bulbul y Beyaz, 2016).

Como era de esperarse, el valor de la susceptibilidad magnética depende del contenido de gadolinio dentro de las NPs de GAG. Se observó que incluso variaciones pequeñas en su concentración cambian los valores de susceptibilidad magnética. Adicionalmente, se observó que el valor de la susceptibilidad magnética aumentó cuando las NPs de GAG fueron funcionalizadas con ácido fólico.

4.8 Estudios biológicos

4.8.1 Estudios de viabilidad celular

Se estudió la citotoxicidad de las NPs de GAG con diferentes superficies químicas en las células de cáncer de mama MDA-MB-231. La citotoxicidad de NPs en células se debe a factores tales como la naturaleza

química de la superficie del nanomaterial, a la composición química del nanomaterial y a la estabilidad coloidal en un medio específico.

En los estudios de citotoxicidad *in vitro*, se considera que un material o sustancia es citotóxico cuando se tienen viabilidades celulares inferiores al 80%. Como se discutirá más adelante, se demostró que las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico no son citotóxicas.

4.8.2 Análisis de la citotoxicidad de las NPs de GAG funcionalizadas

La alta citotoxicidad de las NPs de GAG desnudas en altas concentraciones es probablemente debido a la difusión de las NPs en sus diferentes componentes atómicos, y como resultado la formación de iones tóxicos de Gd^{3+} . Esto se puede deber al pH del medio de cultivo y al tiempo de incubación. La toxicidad del Gd^{3+} como ion libre en el cuerpo humano no es conocida del todo, ya que puede formar complejos de coordinación con diferentes especies biológicas dentro del cuerpo humano y así ser eliminado rápidamente por excreción renal con un bajo efecto tóxico (Myrissa *et al.*, 2017).

La citotoxicidad de las NPs de $GAG@SiO_2$ mostraron que incluso en altas concentraciones, la viabilidad celular era de alrededor del 80%. No se sabe cuáles son los mecanismos exactos de la citotoxicidad de la sílice en nanomateriales, sin embargo, se ha demostrado que este material puede generar en baja medida especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede provocar la muerte celular. Adicionalmente, se sugiere que factores como área superficial BET, el tamaño y la forma, afectan en gran medida la citotoxicidad de nanomateriales recubiertos con sílice (Di Pasqua *et al.*, 2008). Sin embargo, en este caso, las NPs de $GAG@SiO_2$ no son citotóxicas para las células de cáncer de mama.

Con respecto a la citotoxicidad de las NPs de $GAG@SiO_2@APTMS$, se sabe que son ligeramente citotóxicas, debido a la influencia de los grupos amino activos presentes en la superficie de las NPs. Se sabe que los grupos amino (así como los grupos carboxílicos) no son favorables para la proliferación celular en altas concentraciones, esto es por la fuerte interacción electrostática entre la superficie negativa de las células y la carga positiva de las NPs (M. Shen *et al.*, 2012; Tagaya *et al.*, 2014).

Finalmente se encontró que las NPs modificadas con ácido fólico no son citotóxicas, lo que sugiere una adecuada funcionalización con ácido fólico. Como resultado se sugiere su potencial aplicación como bioetiquetadores para células.

4.8.3 Internalización de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico

Muchos estudios han demostrado que la acumulación de nanomateriales dentro de las células es uno de los principales factores que influyen en la citotoxicidad de estos. Por ello es de interés científico estudiar la acumulación de nanomateriales luminiscentes en las células a través de técnicas como la microscopia confocal citometría de flujo. Hay tres maneras principales para internalizar NPs en células: fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptores. Dado que las NPs están conjugadas con ácido fólico, se asume que la internalización de las NPs es a través de endocitosis mediada por receptores.

Los resultados por microscopia confocal demuestran la presencia de vesículas con NPs luminiscentes, donde en el interior de estas hay NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico. Con estos resultados se sugieren dos cosas: formación de agregados de endosomas con una gran cantidad de NPs y que las NPs dentro de estas vesículas no se unen al núcleo celular, sino que permanecen en la región citoplasmática. Además, la integridad de la membrana celular no se ve comprometida cuando las NPs y las células están en contacto durante más de 24 h.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo, nosotros estudiamos las propiedades luminiscentes y magnéticas de las NPs de GAG:Ce funcionalizadas con ácido fólico para ser usado como bioetiquetadores de células de cáncer de mama MDA-MB-231. Así, se encontró que el rendimiento cuántico de las NPs de GAG:Ce sintetizadas por el método de combustión fue del 32.81%. Adicionalmente, con respecto a las propiedades luminiscentes, se encontró que hay una disminución de más, del 50% en la intensidad de luminiscencia cuando las NPs se funcionalizan con ácido fólico, sin embargo, la intensidad de luminiscencia fue lo suficientemente alta para estudiar su internalización en células de cáncer. Por otro lado, los valores de susceptibilidad magnética de las NPs de GAG funcionalizadas con ácido fólico tienen un valor de 9.61×10^{-5} emu/gOe a una concentración de dopaje Ce del 2%. Este valor de susceptibilidad magnética es lo suficientemente alto para la generación de imágenes de resonancia magnética en tumores que contengan células de cáncer de mama.

Los ensayos de citotoxicidad de las NPs demuestran que las NPs de GAG:Ce funcionalizadas con ácido fólico no son citotóxicas. Finalmente, los estudios de internalización de las NPs, demostraron que pueden ser utilizados como bioetiquetadores al ser detectados por su luminiscencia mediante citometría de flujo. Adicionalmente la internalización de las NPs fue visualizada por microscopia confocal. Comprobando con ello que la internalización está mediada por los receptores de ácido fólico presentes en las células de cáncer de mama y que las NPs funcionalizadas con ácido fólico pueden ser endocitadas y localizarse en vesículas en la región citoplasmática de la célula.

Literatura citada

- Abdelhay Aboulaich, Jérôme Deschamps, Rodolphe Deloncle, Audrey Potdevin, Bertrand Devouard, G. C. and R. M. (2012). Rapid synthesis of Ce³⁺-doped YAG nanoparticles by a solvothermal method using metal carbonates as precursors - *New Journal of Chemistry* (RSC Publishing). *New J. Chem.*, *36*, 2493–2500. <https://doi.org/10.1039/C2NJ40429J>
- Alberts, B., & Bray, D. (2006). *Introducción a la biología celular*. (C. Silvia, Ed.) (2da ed.). Madrid: Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=qrrYZJhrRm4C>
- Ansari, A. A. (2017). Photochemical studies of monodispersed YPO₄:Eu microspheres: The role of surface modification on structural and luminescence properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *343*, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.04.021>
- Asakura, R., Isobe, T., Kurokawa, K., Takagi, T., Aizawa, H., & Ohkubo, M. (2007). Effects of citric acid additive on photoluminescence properties of YAG:Ce³⁺ nanoparticles synthesized by glycolthermal reaction. *Journal of Luminescence*, *127*(2), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.02.046>
- Asakura R., Isobe T., Kurokawa K., A. H. O. M. (2006). Tagging of avidin immobilized beads with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanocrystal phosphor | SpringerLink. *Send to Anal Bioanal Chem.*, *6*, 1641–1647. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-006-0814-6>
- Bartosiewicz, K., Babin, V., Kamada, K., Yoshikawa, A., Mares, J. A., Beitlerova, A., & Nikl, M. (2017). Luminescence quenching and scintillation response in the Ce³⁺ doped GdxY₃-xAl₅O₁₂ (x = 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2) single crystals. *Optical Materials*, *63*, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2016.05.041>
- Bouzigues, C., Gacoin, T., & Alexandrou, A. (2011). Biological Applications of Rare-Earth Based Nanoparticles. *ACS Nano*, *5*(11), 8488–8505. <https://doi.org/10.1021/nn202378b>
- Bulbul, B., & Beyaz, S. (2016). Strong paramagnetic crystalline LnVO₄ (Ln: Gd, Tb, Dy, Ho, Er) nanoparticles synthesized by a fabricating method. *Materials Chemistry and Physics*, *173*, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.02.005>
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(5), 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>
- Di Pasqua, A. J., Sharma, K. K., Shi, Y.-L., Toms, B. B., Ouellette, W., Dabrowiak, J. C., & Asefa, T. (2008). Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *102*(7), 1416–1423. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.028>
- Dong, B., Wang, J., Sun, J., Xu, S., Bai, X., Jiang, Z., ... Song, H. (2012). Non-photobleaching YAG:Ce nanoparticles for optical imaging with blue excitation. *RSC Advances*, *2*(9), 3897–3905. <https://doi.org/10.1039/C2RA01283A>
- George, N. C., Denault, K. A., & Seshadri, R. (2013). Phosphors for Solid-State White Lighting. *Annual Review of Materials Research*, *43*(1), 481–501. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-073012-125702>
- Grobmyer, Stephen R., Moudgil, B. M. (2010). *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*. (S. R.

- Grobmyer & B. M. Moudgil, Eds.) (1st ed.). Florida: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2>
- Guo, D., Ma, B., Zhao, L., Qiu, J., Liu, W., Sang, Y., ... Liu, H. (2016). Bright YAG:Ce Nanorod Phosphors Prepared via a Partial Wet Chemical Route and Biolabeling Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(19), 11990–11997. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01460>
- Hassanzadeh-Tabrizi, S. A. (2012). Synthesis and luminescence properties of YAG:Ce nanopowder prepared by the Pechini method. *Advanced Powder Technology*, 23(3), 324–327. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2011.04.006>
- Huong, T. T., Phuong, H. T., Vinh, L. T., Khuyen, H. T., Anh, T. K., & Minh, L. Q. (2016). Functionalized YVO₄:Eu³⁺ nanophosphors with desirable properties for biomedical applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 1(3), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2016.07.010>
- Jain, A., González, C. A. E., Tejeda, E. M., Durán, A., Contreras, O. E., & Hirata, G. A. (2018). Covering the optical spectrum through different rare-earth ion-doping of YAG nanospheres produced by rapid microwave synthesis. *Ceramics International*, 44(2), 1886–1893. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.10.127>
- Jain, A., & Hirata, G. A. (2016). Photoluminescence, size and morphology of red-emitting Gd₂O₃:Eu³⁺ nanophosphor synthesized by various methods. *Ceramics International*, 42(5), 6428–6435. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.053>
- Jain, A., Hirata, G. A., Fariás, M. H., & Castellón, F. F. (2016). Synthesis and characterization of (3-Aminopropyl)trimethoxy-silane (APTMS) functionalized Gd₂O₃:Eu³⁺ red phosphor with enhanced quantum yield. *Nanotechnology*, 27(6), 65601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/6/065601>
- Jayanthi, K., & Manorama, S. V. (2014). Lumino-magnetic YAG:Ce nanophosphors: novel synthesis routes for efficient luminescence and magnetic properties. *Journal of Materials Chemistry C*, 2(48), 10322–10330. <https://doi.org/10.1039/C4TC01960A>
- Ji, C., Ji, L., Lian, L., Shen, L., Zhang, X., Wang, Y., & Gupta, A. (2015). Low-temperature solution synthesis and characterization of Ce-doped YAG nanoparticles. *Journal of Rare Earths*, 33(6), 591–598. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(14\)60458-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(14)60458-0)
- Khosravian, P., Shafiee Ardestani, M., Khoobi, M., Ostad, S. N., Dorkoosh, F. A., Akbari Javar, H., & Amanlou, M. (2016). Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *OncoTargets and Therapy*, 9, 7315–7330. <https://doi.org/10.2147/OTT.S113815>
- Lee, J. S., Kumar, P., Gupta, S., Oh, M. H., Ranade, M. B., & Singh, R. K. (2010). Enhanced Luminescence Properties of YAG : Ce³⁺ Nanophosphor Prepared by Flame Spray Pyrolysis. *Journal of The Electrochemical Society*, 157(2), K25–K29. <https://doi.org/10.1149/1.3262609>
- Li, J.-G., & Sakka, Y. (2015). Recent progress in advanced optical materials based on gadolinium aluminate garnet (Gd₃Al₅O₁₂). *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(1), 14902. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/1/014902>
- Li, J., Li, J.-G., Li, X., & Sun, X. (2016). Up-conversion luminescence of new phosphors of Gd₃Al₅O₁₂:Yb/Er stabilized with Lu³⁺. *Ceramics International*, 42(2, Part B), 3268–3274.

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.10.118>

- Myrissa, A., Braeuer, S., Martinelli, E., Willumeit-Römer, R., Goessler, W., & Weinberg, A. M. (2017). Gadolinium accumulation in organs of Sprague–Dawley® rats after implantation of a biodegradable magnesium-gadolinium alloy. *Acta Biomaterialia*, *48*, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.024>
- Naik, S. R., Shripathi, T., & Salker, A. V. (2015). Preparation, characterization and photoluminescent studies of Cr and Nd co-doped Ce:YAG compounds. *Journal of Luminescence*, *161*, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.01.040>
- Rana, S., Shetake, N. G., Barick, K. C., Pandey, B. N., Salunke, H. G., & Hassan, P. A. (2016). Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalton Transactions*, *45*(43), 17401–17408. <https://doi.org/10.1039/C6DT03323G>
- Saltan, N., Kutlu, H. M., Hür, D., Işcan, A., & Say, R. (2011). Interaction of cancer cells with magnetic nanoparticles modified by methacrylamido-folic acid. *International Journal of Nanomedicine*, *6*, 477–484. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16803>
- Sengar, P., Hirata, G. A., Farias, M. H., & Castellón, F. (2016). Morphological optimization and (3-aminopropyl) trimethoxy silane surface modification of Y₃Al₅O₁₂:Pr nanoscintillator for biomedical applications. *Materials Research Bulletin*, *77*, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.01.045>
- Shen, J.-M., Guan, X.-M., Liu, X.-Y., Lan, J.-F., Cheng, T., & Zhang, H.-X. (2012). Luminescent/Magnetic Hybrid Nanoparticles with Folate-Conjugated Peptide Composites for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, *23*(5), 1010–1021. <https://doi.org/10.1021/bc300008k>
- Shen, M., Cai, H., Wang, X., Cao, X., Li, K., Wang, S. H., ... Shi, X. (2012). Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, *23*(10), 105601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/10/105601>
- Tagaya, M., Ikoma, T., Xu, Z., & Tanaka, J. (2014). Synthesis of Luminescent Nanoporous Silica Spheres Functionalized with Folic Acid for Targeting to Cancer Cells. *Inorganic Chemistry*, *53*(13), 6817–6827. <https://doi.org/10.1021/ic500609g>
- Dotsenko V.P., Berezovskaya I.V., Voloshinovskii A.S., Zadneprovski B.I. (2015). Luminescence properties and electronic structure of Ce³⁺-doped gadolinium aluminum garnet - ScienceDirect. *Materials Research Bulletin*, *64*, 151–155. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.12.056>
- Van Leeuwen, F. W. B., Hardwick, J. C. H., & van Erkel, A. R. (2015). Luminescence-based Imaging Approaches in the Field of Interventional Molecular Imaging. *Radiology*, *276*(1), 12–29. <https://doi.org/10.1148/radiol.2015132698>
- Wood, J. (2004). Au nanoclusters are promising biolabels. *Materials Today*, *7*(10), 18. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00440-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00440-7)
- Zhang, L., Tian, L., Ye, Z., Song, B., & Yuan, J. (2013). Preparation of visible-light-excited europium biolabels for time-resolved luminescence cell imaging application. *Talanta*, *108*, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.065>

Anexos

A. Curva de calibración de ácido fólico en solución

Curva de calibración del ácido fólico en solución acuosa con un rango lineal de 15.63 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$.

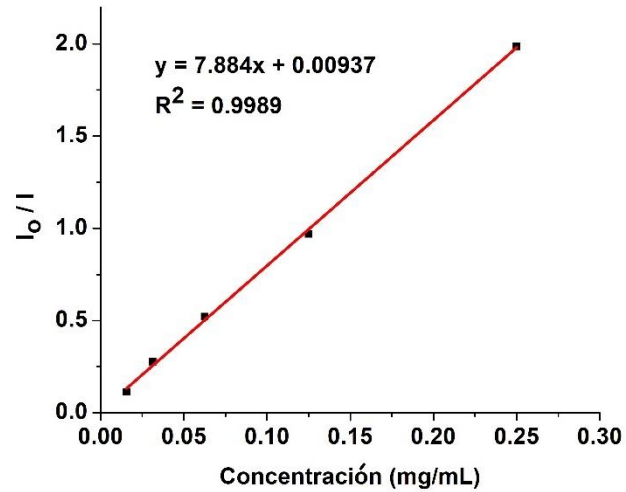


Figura 26. Curva de calibración del ácido fólico en solución acuosa.