

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Síntesis y caracterización de nanopartículas luminiscentes
funcionalizadas como bioetiquetadores de células cancerosas**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Rodrigo Alberto Osorio Arciniega

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Rodrigo Alberto Osorio Arciniega
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Codirector de tesis

Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez

Dr. Humberto Lobato Morales

Dr. Bonifacio Alejandro Can Uc

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Rodrigo Alberto Osorio Arciniega** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Síntesis y caracterización de nanopartículas luminiscentes funcionalizadas como bioetiquetadores de células cancerosas.

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Codirector de tesis

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres y un importante problema de salud pública a nivel mundial. Las mamografías son las pruebas tradicionales para diagnosticar el cáncer de mama en etapas tempranas, sin embargo, a menudo se relacionan con resultados falsos negativos y positivos, disminuyendo las probabilidades de supervivencia de las mujeres. En este trabajo, desarrollamos nanopartículas luminiscentes del material $Y_3Al_5O_{12}:Ce^{3+}$ embebidas en el biopolímero natural quitosano (Ch) y funcionalizadas con ácido fólico (FA), con el fin de aumentar su especificidad en células de cáncer de mama. Las nanopartículas luminiscentes (LNP) se sintetizaron mediante el método sol-gel a baja temperatura ($<300^\circ C$). Posteriormente, se conjugó el polisacárido en la superficie de las LNPs. Para fungir como bioetiquetadores, se funcionalizaron las nanopartículas $Y_3Al_5O_{12}:Ce^{3+}/Ch$ a través de los grupos amino terminales del biopolímero. Las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de las LNPs fueron caracterizadas por TEM, XDR, FTIR, fluorescencia y espectroscopía de UV-Vis. El análisis de difracción de rayos-X de las LNPs mostró que los picos de difracción son similares y consistentes con la estructura indexada como YAG. Mediante el uso del espectrofluorómetro, las LNPs mostraron su excitación a 540 nm y una banda de emisión amarilla correspondiente a 540 nm. Se determinó estadísticamente el tamaño promedio de las LNPs el cual correspondió a 50 nm. Además, los resultados del potencial zeta demostraron que las LNP-Ch-FA son más estables que las LNPs desnudas. Adicionalmente, se evaluó la citotoxicidad a diferentes dosis de las LNPs desnudas, conjugadas y funcionalizadas en distintas líneas celulares MDA-MB-231, T47-D (células de cáncer de mama) y 293T (células normales). Las nanopartículas YAG: Ce^{3+} presentaron baja toxicidad a comparación de las nanopartículas conjugadas y funcionalizadas, demostrando el carácter positivo del quitosano, el cual puede influir en la viabilidad celular. Finalmente la internalización de las diferentes LNPs se evaluó mediante microscopía confocal en las líneas celulares MDA-MB-231 y T47-D. Se observó que las nanopartículas se internalizaron en las células mediante la invaginación en la membrana celular por acción de los receptores de ácido fólico. Las nanopartículas funcionalizadas se mantuvieron en el citoplasma, conservando su propiedad de luminiscencia, con lo cual se corrobora la hipótesis planteada de que las nanopartículas pueden fungir como bioetiquetadores de células de cáncer de mama.

Palabras clave: **bioetiquetadores; YAG: Ce^{3+} NPs; quitosano; funcionalizar.**

Abstract of the thesis presented by **Rodrigo Alberto Osorio Arciniega** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Synthesis and characterization of functionalized luminescent nanoparticles as biolabels of cancer cells.

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Thesis Codirector

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Thesis Codirector

Breast cancer is the second cause of death in women and a major public health problem worldwide. Mammograms are the traditional tests used to diagnose breast cancer in early stages, however, they are often associated with false negative and positive results, decreasing the chances of women's survival. In this work, we developed luminescent nanoparticles of $Y_3Al_5O_{12}:Ce^{3+}$ embedded in the natural biopolymer chitosan (Ch) and functionalized with folic acid (FA), in order to increase their specificity in breast cancer cells. Luminescent nanoparticles (LNP) were synthesized by sol-gel method at low temperature ($<300^\circ C$). Subsequently, the polysaccharide was conjugated on the surface of the luminescent nanoparticles (LNP). To function as biolabels, the nanoparticles $Y_3Al_5O_{12}:Ce^{3+}/Ch$ were functionalized through the terminal amino groups of the biopolymer. The physicochemical, morphological and structural properties of LNPs were characterized by TEM, XRD, FTIR, fluorescence and UV-Vis spectroscopy. The X-ray diffraction analysis of the LNPs showed that the diffraction peaks are similar and consistent with the structure indexed as YAG. Photoluminescence spectroscopy analysis revealed that the LNPs got their excitation at 540 nm and a yellow emission band corresponding to 540 nm. The average size of LNPs was determined statistically, corresponding to 50 nm. Zeta potential results showed that the LNP-Ch-FA are more stable than the bared LNPs. In addition, cytotoxicity was evaluated at different doses of bared, conjugated and functionalized LNPs in different cell lines, MDA-MB-231, T47-D (breast cancer cells) and 293T (normal cells). The $Y_3Al_5O_{12}:Ce^{3+}$: Ce^{3+} showed low toxicity compared to conjugated and functionalized nanoparticles, demonstrating the positive charge of chitosan, which can influence cell viability. Finally, the internalization of different nanoparticles was evaluated by confocal microscopy in the cell lines MDA-MB-231 and T47-D. It was observed that the nanoparticles internalized by invagination due to the folic acid receptors. The functionalized nanoparticles remained in the cell cytoplasm, retaining their luminescence property, which corroborates the hypothesis that nanoparticles can act as biolabels of breast cancer cells.

Keywords: **biolabels; YAG: Ce^{3+} NPs; chitosan; conjugated; functionalization.**

Dedicatoria

A mi hermosa madre Dra. Ma. Del Rosario Arciniega Prieto, la cual con su infinito amor, siempre me ha apoyado a realizar y concretar mis sueños. Por tener la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla. Por ser lo más preciado que tengo en esta vida.

A mi padre Dr. Carlos Alberto Osorio Aranda, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre cuidándome desde el cielo, y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. Siempre recordaré lo infinitamente feliz que te hacía presumirle a tus amigos que tu hijo estudiaría Nanotecnología.

A mi hermana Mta. Ma. Ariadne Osorio Arciniega, por todos esos momentos de reflexión y de templanza. Por ser mi confidente, por apoyarme en concluir mis metas sacrificando a veces las tuyas, te amo muchísimo.

A todos mis profesores en específico a mis directores de tesis, la Dra. Patricia Juárez C. y el Dr. Gustavo Hirata F., gracias por haber confiado en mí; el día de hoy deseo honrar su vida a través de esta tesis, agradeciéndoles por desempeñar con excelencia su labor.

A mis amigos, los cuales permanecieron durante todo este proceso brindándome su apoyo, convirtiéndose en pilares de confianza, integridad y seguridad en mi camino hacia el éxito.

Agradecimientos

A mis directores de tesis **Dra. Patricia Juárez Camacho** y al **Dr. Gustavo Alfonso Hirata Flores** por el apoyo y tiempo dedicado para la realización del proyecto.

A los miembros del comité de tesis, el **Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier**, **Dr. Bonifacio Alejandro Can Uc**, **Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez** y el **Dr. Humberto Lobato Morales** 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 al **Dr. Rafael Vázquez Duhalt** .

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. De igual forma a los proyectos CONACYT PDCPN 2014-247892 y CICESE-685-105 Además de brindarme apoyo económico para continuar mis estudios de posgrado teniendo como registro **CVU** la matrícula **745379**.

A la **Dra. Rina Koyani** por la basta cantidad de conocimientos compartidos hacia mi persona y por permitirme colaborar con ella para la realización de un proyecto de investigación científica.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 El cáncer de mama	1
1.2 Técnicas actuales de detección.....	2
1.3 La nanotecnología y su uso en imágenes diagnósticas clínicas	3
1.4 Nanopartículas luminiscentes.....	4
1.5 El quitosano.....	5
1.6 Antecedentes.....	6
1.7 Justificación.....	8
1.8 Hipótesis.....	9
1.9 Objetivos.....	9
1.9.1 Objetivo general.....	9
1.9.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes YAG:Ce ³⁺ por el método de Sol-Gel.....	10
2.1.1 Sonicación de las NPs YAG:Ce ³⁺	11
2.1.2 Preparación de la solución de quitosano.....	11
2.1.3 Recubrimiento de las nanopartículas YAG:Ce ³⁺ con quitosano.....	12
2.1.4 Funcionalización de las nanopartículas YAG:Ce ³⁺ /Ch con ácido fólico.....	12
2.2 Técnicas de caracterización de las nanopartículas.....	13
2.2.1 Difracción de rayos-X (XRD).....	13
2.2.2 Estudios de fotoluminiscencia y rendimiento cuántico (PL).....	13

2.2.3	Microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	14
2.2.4	Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	14
2.2.5	Espectroscopía de energía dispersiva (EDS).....	14
2.2.6	Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	14
2.2.7	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	15
2.2.8	Espectroscopía Ultravioleta visible (Uv-vis).....	15
2.2.9	Potencial Zeta y Dispersión de luz dinámica (Z).....	15
2.3	Ensayos de viabilidad celular.....	15
2.3.1	Cultivo celular.....	16
2.3.2	Conteo celular.....	16
2.3.3	Sembrado de diferentes líneas celulares.....	16
2.3.4	Tratamiento de células con nanopartículas.....	17
2.3.5	Ensayo MTT.....	17
2.3.6	Microscopía Confocal.....	17
Capítulo 3.	Resultados y discusión.....	18
3.1	Análisis de YAG:Ce ³⁺	18
3.1.1	Difracción de rayos-X.....	18
3.1.2	Estudio morfológico por microscopía electrónica de barrido.....	19
3.1.3	Composición química encontrada por espectroscopia de energía dispersiva.....	20
3.1.4	Evaluación morfológica por microscopía electrónica de transmisión.....	21
3.1.5	Análisis por microscopía de fuerza atómica.....	22
3.1.6	Estudios de fotoluminiscencia.....	23
3.1.7	Rendimiento cuántico.....	24
3.2	Análisis de la conjugación de YAG:Ce ³⁺ /quitosano.....	25
3.2.1	Evaluación morfológica por microscopía electrónica de barrido.....	25
3.2.2	Ensayo de espectroscopia de energía dispersiva.....	26
3.2.3	Comparación morfológica por TEM de NPs de YAG: Ce ³⁺ y NPs de YAG: Ce ³⁺ /Ch.....	28
3.2.4	Exploración a diferentes concentraciones por TEM de LNPs de YAG:Ce ³⁺ /Ch.....	29
3.2.5	Rugosidad superficial de LNPs YAG:Ce ³⁺ /Ch por microscopía de fuerza atómica.....	30
3.2.6	Fotoluminiscencia de las LNPs de YAG: Ce ³⁺ /Ch.....	31
3.2.7	Rendimiento cuántico del conjugado.....	32
3.3	Análisis de la funcionalización de YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	33

3.3.1	Exploración comparativa de las LNPs de YAG: Ce ³⁺ /Ch y YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA por SEM.....	33
3.3.2	Composición química de las LNPs YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	34
3.3.3	Comparación morfológica por TEM de las LNPs de YAG:Ce ³⁺ /Ch y YAG:Ce ³⁺ /Ch-FA.....	35
3.3.4	Rugosidad superficial de LNPs YAG:Ce ³⁺ /Ch-FA por AFM.....	35
3.3.5	Evaluación por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.....	36
3.3.6	Absorbancias obtenidas por espectroscopia UV-vis de las LNPs.....	37
3.3.7	Estabilidad de las LNPs en medio acuoso caracterizadas por Potencial Zeta.....	38
3.3.8	Reporte de dispersión de luz dinámica y tamaño de partícula.....	39
3.4	Caracterización <i>in vitro</i>	40
3.4.1	Ensayo de viabilidad celular.....	40
3.4.2	Internalización de las LNPs caracterizada por microscopía confocal	43
Capítulo 4. Conclusiones.....		45
Literatura citada.....		46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Principales características del cáncer durante su desarrollo.....	1
2	Principales técnicas de detección del cáncer de mama.....	3
3	Modalidades sonda de intervención "en profundidad" (<10 cm) y "superficiales" (<1 cm)	4
4	Esquema representativo de excitación y emisión.....	5
5	Estructura química de (a) quitina y (b) quitosano, (c) quitina deacetilada.....	5
6	Poliedros de coordinación en la estructura granate presentados como elipsoides de desplazamiento atómico tridimensional en Yb: cristal YAG (Dobrzycki <i>et al.</i> , 2004)	6
7	Esquema método de nanoprecipitación. Condiciones fisicoquímicas para la obtención de agregados nanométricos (Fessi <i>et al.</i> , 1989)	8
8	Diagrama de flujo del método de síntesis por Sol-Gel.....	11
9	Representación de las diferentes etapas del recubrimiento y funcionalización de las LNPs.....	12
10	Patrones de difracción de rayos-X. Comparación de las LNPs YAG: Ce ³⁺ respecto a la fase YAG pura (archivo cristalográfico JCPDS 33-0040)	19
11	Micrografía SEM del material YAG:Ce ³⁺ . Los diferentes paneles muestran magnificaciones correspondientes a 20 μm (superior izquierdo), 5 μm (superior derecho), 5 μm (inferior izquierdo) y 2 μm (inferior derecho)	20
12	Elementos presentes en la red cristalina del material sintetizado YAG: Ce ³⁺ . Los elementos existentes fueron: aluminio en mayor proporción seguido de itrio y oxígeno en menor proporción.....	21
13	a) Micrografías TEM del nanofósforo YAG: Ce ³⁺ a diferentes magnificaciones (50, 20, 10 y 5 nm), b) distribución de tamaño de NPs de YAG: Ce ³⁺	22
14	Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce ³⁺ . a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D 15 X 15 μm ²	23
15	Espectros de excitación y emisión de fotoluminiscencia de la muestra YAG: Ce ³⁺ . LNPs dopadas a diferentes concentraciones del ion activador Ce ³⁺ .con diferentes concentraciones de Ce ³⁺	24
16	Análisis normalizado del rendimiento cuántico de la muestra YAG:Ce ³⁺	25

17	Micrografía SEM de las LNPs YAG: Ce ³⁺ / Ch. Los diferentes paneles muestran magnificaciones correspondientes a 10 μm (superior izquierdo), 5 μm (superior derecho), 5 μm (inferior izquierdo) y 5 μm (inferior derecho).....	26
18	Elementos presentes en la red cristalina del material sintetizado YAG: Ce ³⁺ /Ch. Los elementos existentes fueron: aluminio, itrio, oxígeno y carbono.....	27
19	Micrografías TEM, magnificación de 10 nm . a) LNP desnuda YAG: Ce ³⁺ y b) LNP de YAG: Ce ³⁺ embebida en quitosano.....	28
20	Micrografía TEM, magnificación de 5 nm. a) LNP de YAG: Ce ³⁺ /Ch, región marcada por un cuadro, b) Perfil de intensidad y Transformada de Fourier a lo largo de la región marcada, (c) espaciado interplanar de la red cristalina.....	29
21	Análisis del grosor del embebido. Micrografías TEM 5 nm y evaluación estadística del grosor de YAG: Ce ³⁺ /Ch a) 1% b) 2% y, c) 4%.....	30
22	Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce ³⁺ /Ch. a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D, rugosidad superficial del biopolímero 15 X 15 μm ²	31
23	Análisis cualitativo y cuantitativo de fotoluminiscencia de la muestra YAG: Ce ³⁺ /Ch a diferentes concentraciones de Ch. Panel izquierdo, muestra la emisión amarilla característica de la LNPs, panel derecho se muestra el espectro de emisión de YAG: Ce ³⁺ /Ch.....	32
24	Análisis normalizado del rendimiento cuántico de YAG: Ce ³⁺ /Ch a diferentes concentraciones de Ch.....	33
25	Micrografía SEM de las LNPs YAG: Ce ³⁺ / Ch-FA. Diferentes paneles con magnificaciones correspondientes a 10 μm (superior izquierdo), 5 μm (superior derecho), 5 μm (inferior izquierdo) y 5 μm (inferior derecho).....	33
26	Análisis de los elementos en la muestra de YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	34
27	Comparación morfológica de a) YAG: Ce ³⁺ /Ch y b) YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	35
28	Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA. a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D, rugosidad superficial de las LNPs funcionalizadas, 15 X 15 μm ²	36
29	Espectros FTIR de los diferentes tipos de LNPs y compuestos químicos. a) Ácido fólico, b) Quitosano, c) YAG: Ce ³⁺ -Ch-FA, d) YAG: Ce ³⁺ -Ch, e) YAG: Ce ³⁺	37
30	Espectros Uv-vis de las diferentes LNPs y compuestos químicos. a) YAG: Ce ³⁺ y b) Quitosano c) YAG: Ce ³⁺ /Ch d) ácido fólico e) YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	38
31	Potencial Zeta de las diferentes LNPs sintetizadas. a) YAG: Ce ³⁺ b) YAG: Ce ³⁺ /Ch c) YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA.....	39
32	Espectros del tamaño de distribución del volumen. a) YAG: Ce ³⁺ b) YAG: Ce ³⁺ /Ch c) YAG:Ce ³⁺ /Ch-FA.....	40

- 33** Efecto de la viabilidad celular de las NPs de YAG: Ce³⁺, YAG: Ce³⁺/Ch, YAG: Ce³⁺/Ch-FA. Los resultados se expresan como la media ± SEM * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; y **** P <0.0001 obtenido usando ANOVA de 2 vías con una prueba posterior de Tukey..... 42
- 34** Formación de endosomas o vesículas en el interior celular. Campo claro, campo oscuro e imágenes superpuestas (5 µm) de células MDA-MB-231 tratadas con YAG: Ce³⁺/Ch-FA (25 µg/ml) a 6 h. Las imágenes son falsas coloreadas donde se indica la formación de vesículas con flechas rojas..... 43
- 35** Captación de las LNPs. Campo claro, campo oscuro e imágenes superpuestas (5 µm) de células MDA-MB-231 y T47-D tratadas con YAG: Ce³⁺, YAG: Ce³⁺/Ch y YAG: Ce³⁺/Ch-FA (25 µg/ml) a 6 h. Las imágenes son falsas coloreadas, mostrando la internalización de las LNPs..... 44
- 36** a) Comparación del porcentaje de la señal de intensidad de las diferentes NPs en líneas celulares cancerosas, b) Cantidad de NPs internalizadas en líneas celulares MDA-MB-231 y T47-D celular células..... 44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Porcentajes atómicos de las nanopartículas YAG: Ce ³⁺	21
2	Porcentajes atómicos de las nanopartículas YAG: Ce ³⁺ / Ch	27
3	Porcentajes atómicos de las nanopartículas YAG: Ce ³⁺ / Ch-FA.....	34
4	Evaluación de porcentajes dispersión de luz dinámica	40

Capítulo 1. Introducción

1.1 El cáncer de mama

El cáncer se ha convertido en un serio problema que más aqueja a la humanidad en el siglo XXI. Estimaciones realizadas por la Organización Mundial de Salud (OMS) en 2015, demostraron que es una de las principales causas de muerte antes de los 70 años. El cáncer se caracteriza por el crecimiento incontrolable de células, las cuales pierden su dependencia de los factores de crecimiento y adquieren autonomía del medio para proliferar sin el control de señales externas, replicándose a una mayor velocidad que las células normales. Esto provoca un desequilibrio en el suministro de nutrientes y en la eliminación de productos de desecho metabólico (World Health Organization, 2018).



Fig. 1 Principales características del cáncer durante su desarrollo. Evasión supresores de crecimiento, mutación e inestabilidad genómica, inmortalidad replicativa, invasión-metástasis y evasión de apoptosis (Hanahan *et al.*, 2000).

Estadísticas elaboradas por GLOBOCAN en 2018 en colaboración con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), reportaron que el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer que se da con mayor frecuencia a nivel mundial, siendo el sexo femenino con mayor tendencia de esta enfermedad. Se estimó una incidencia mundial de 2.1 millones de casos diagnosticados y 626 mil decesos en 154 países.

(Ferlay *et al.*, 2018). Estadísticas realizadas en México por el INEGI en 2014, reportaron que el cáncer de mama ocupó la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos (INEGI, 2014). El cáncer de mama está estrechamente relacionado a factores hormonales. Cuando las células cancerosas albergadas en los conductos mamarios se internalizan por los vasos capilares y se propagan por el sistema sanguíneo se denomina metástasis (Siegel *et al.*, 2018).

1.2 Técnicas actuales de detección

El método de detección más común del cáncer de mama es la mamografía, este involucra el uso de fotones de rayos-X de alta energía permitiendo la detección de cánceres que son impalpables. En contraste, se han reportado mamografías falsas positivas las cuales conducen a biopsias innecesarias (Kollias, 1998). El ultrasonido puede detectar lesiones no detectadas en la mamografía. Algunas de sus ventajas son: no utiliza radiación ionizante, y no se conocen efectos dañinos de la energía empleada (Agnese, 2005). Las imágenes por resonancia magnética (MRI) poseen una mayor sensibilidad, pero una especificidad tan baja del 30%. (Lawrence, 1998), (Brennan, 2009). La gammamografía utiliza marcadores o radionúclidos para detectar neoplasias mamarias, su desventaja radica en la bioacumulación en órganos del cuerpo (Dehdashti, 2009). Por otro lado, la tomografía por emisión de positrones (PET), depende de la alta tasa metabólica de los tumores. Otras técnicas, como la tomografía óptica y la termografía, se basan en la angiogénesis y el calor generado para identificar cánceres (Agnese, 2005).

Las auditorías en las prácticas de detección se han clasificado alrededor de los intervalos del 25%-45% como falsos negativos pudiendo ser influenciados por muchos factores, tales como, la interpretación de los resultados obtenidos de la detección y la experiencia del técnico evaluador de imágenes, siendo una limitación inherente a cualquier método de detección (Houssami, 2006). Los esfuerzos para mejorar los resultados de la detección se han centrado principalmente en tecnologías avanzadas para la obtención de imágenes tumorales certeras y detección temprana. Herramientas tecnológicas complementarias de detección mejorarían la oncología predictiva (Ferrari, 2005).

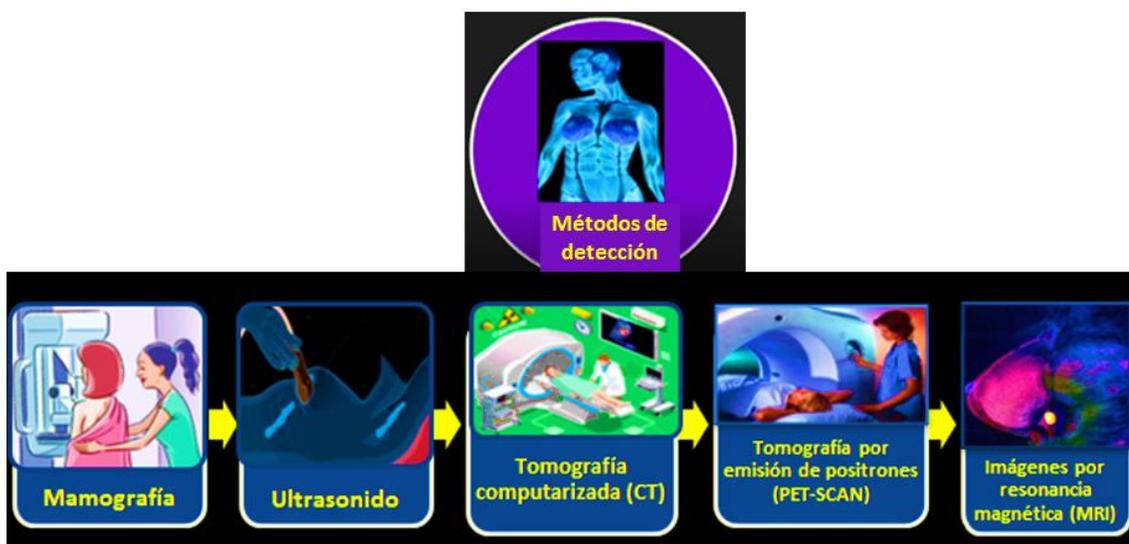


Fig. 2 Principales técnicas de detección del cáncer de mama. Primera instancia: mamografía y ultrasonido. Segundo acercamiento: CT, PET-SCAN y MRI, estas dependen de la etapa y agresividad tumoral

1.3 La nanotecnología y su uso en imágenes diagnósticas clínicas

Las tecnologías de imágenes son cada vez más utilizadas para mejorar la visibilidad de estructuras específicas como células y tejidos. Así mismo, proporcionar contraste fluorescente necesario entre tejido sano o tumoral para poder orientar antes y durante intervenciones radiológicas o quirúrgicas. Su principal motivación es mejorar y complementar la identificación en tiempo real (microscópica) y la delineación de lesiones que no pueden definirse con precisión mediante otras técnicas de detección.

La nanotecnología estudia materiales en dimensiones desde un nanómetro (mil millonésima parte de un milímetro) hasta 100 nanómetros, permitiendo la interacción con sistemas biológicos a nivel atómico y supramolecular; facilitando la detección, el diagnóstico y tratamiento de cánceres (Nagarajan, 2008). Las ventajas del uso de nanopartículas luminiscentes (LNPs) como puntos cuánticos y NPs dopadas con iones de tierras raras son: espectros de fotoluminiscencia ajustables, tamaño controlable y resistencia al ambiente (Van Leeuwen *et al.*, 2015). Además, las LNPs funcionalizadas con ligandos específicos pueden ser utilizadas en la identificación dirigida de imágenes tumorales en estadios tempranos. Algunos cánceres de mama sobre expresan proteínas o genes específicos (p. Ej., receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de ácido fólico y ERBB2) en los cuales decisiones de pre-intervención pueden ser tomadas (Yezheyev *et al.*, 2006).

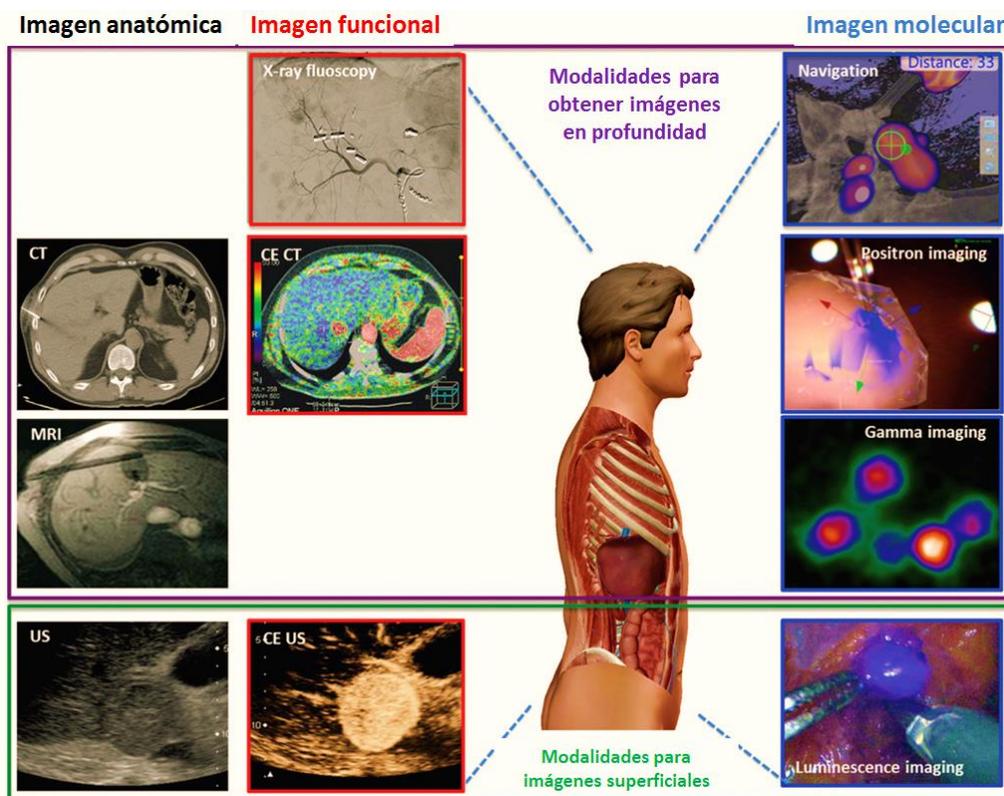


Fig. 3 Modalidades sonda de intervención "en profundidad" (<10 cm) y "superficiales" (<1 cm). Imágenes a la izquierda muestran pre-intervención (diagnóstico), a la derecha imágenes para guiar durante la intervención (Van Leeuwen *et al.*, 2015).

1.4 Nanopartículas luminiscentes

La propiedad más importante de las LNP dopadas con iones de tierras raras es el brillo que exhiben cuando se excita el material. Las nanopartículas de conversión descendente (DC), presentan una emisión desplazada tipo *Stokes*, de un ion lantánido excitado incrustado en la matriz huésped, la cual influye en las propiedades de luminiscencia finales. Un ion lantánido o activador, absorbe la radiación y ocasiona un estado excitado desde el estado fundamental G al estado E_2 . Puede relajarse de manera no radiactiva al nivel E_1 desde el que se produce una emisión de DC. La relajación no radiativa desde el estado E_2 a E_1 es un proceso de múltiples etapas que se rige por la dinámica de fonones del nanofósforo (Chen *et al.*, 2013). La fase tipo granate YAG en el sistema de óxido de itrio-aluminio es un material huésped adecuado para los fósforos de estado sólido cuando se dopa con iones de tierras raras.

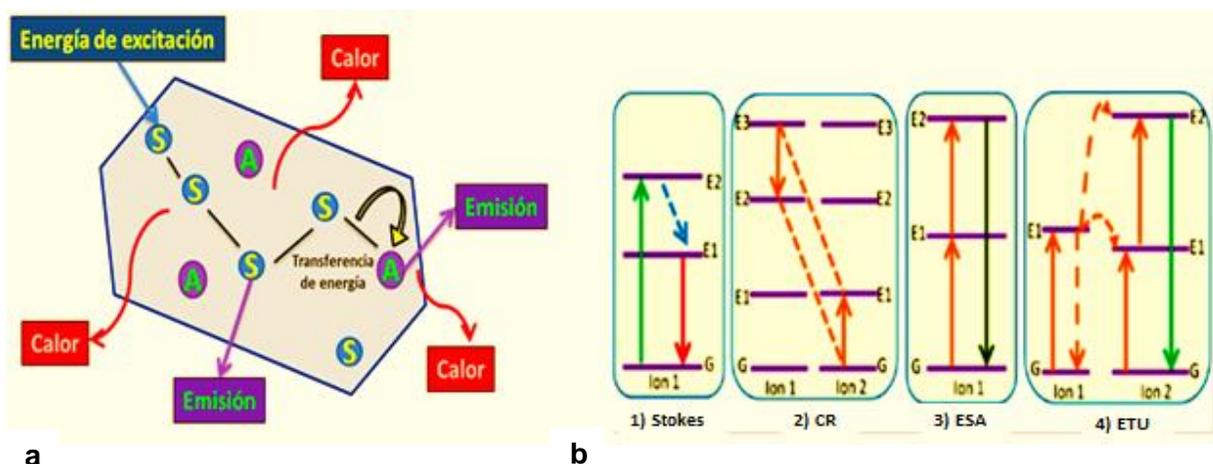


Fig. 4 Esquema representativo de excitación y emisión. a) Iones activadores A, iones S sensibilizadores b) (1) conversión descendente, (2) relajación cruzada, (3) absorción del estado excitado, y (4) conversión ascendente de la transferencia de energía (Chen *et al.*, 2013).

1.5 El quitosano

El quitosano (Ch) es un biopolímero policatiónico con estructura y propiedades específicas (Bautista, 2006). Se extrae principalmente de las conchas de crustáceos como el cangrejo y camarón (Peniche, 2003). Ha sido estudiado en aplicaciones con gran potencial industrial, como son: alimentaria, agrónoma, farmacéutica (Aranaz, 2009). Además, presenta propiedades de inmunestimulación, mucoadhesivas y terapéuticas, incrementando el tiempo y estabilidad del biopolímero en el cuerpo fungiendo como vector (Aljebory *et al.*, 2017).

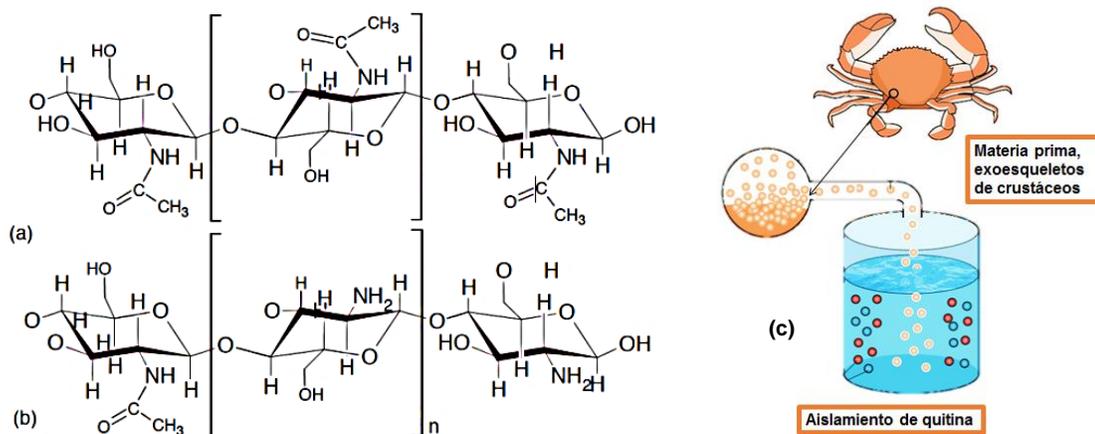


Fig. 5 Estructura química de (a) quitina y (b) quitosano, (c) quitina deacetilada.

Las nanopartículas de quitosano con estructura *core-shell* que incorporan ligandos en su estructura han sido estudiadas como vectores selectivos (Gao *et al.*, 2012). El ligando más estudiado es el ácido fólico, debido a la significativa sobreexpresión de los receptores de folato (FR) en el tejido tumoral (Lukashev, 2006). Por lo tanto, conjugados de Ch y folatos han demostrado una unión significativamente mejorada a FRs de células tumorales. Posteriormente los conjugados funcionalizados son internalizados a compartimientos intracelulares para formar endosomas. Finalmente, en ambientes ácidos (pH= 5) los FR regresan a la superficie celular y los conjugados Ch y folatos son degradados por lisosomas o liberados en el citosol (Song *et al.*, 2013).

1.6 Antecedentes

El fósforo cristalino, óxido de aluminio e itrio de tipo granate (YAG), es un material huésped adecuado para fósforos dopados con iones de tierras raras. Se denomina granate a los minerales pertenecientes al grupo de ortosilicatos. Los granates cristalizan en el grupo espacial Ia3d, del sistema cúbico cristalino, el cual comprende mayor simetría (Dobrzycki *et al.*, 2004).

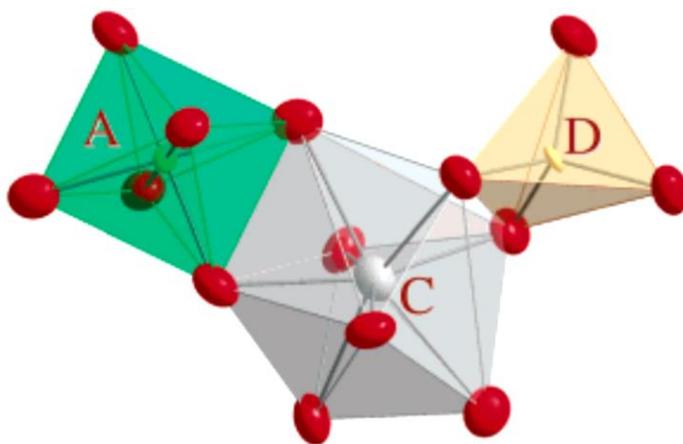


Fig. 6 Poliedros de coordinación en la estructura granate presentados como elipsoides de desplazamiento atómico tridimensional en Yb: cristal YAG (Dobrzycki *et al.*, 2004).

Blasse y Brill (1967) fueron los primeros en reportar el dopaje de la matriz YAG con iones Ce^{3+} para su uso en tubos de rayos catódicos. YAG: Ce^{3+} emite eficientemente en la región verde-amarilla correspondiente

a la longitud de onda en 460 nm (excitación), su emisión alcanza su punto máximo alrededor de 540 nm. Esto ocurre debido a las transiciones electrónicas dentro del ion Ce^{3+} entre los estados $[\text{Xe}] 4f^1 5d^0 6s^0$ ($^2F_{5/2}$, $^2F_{7/2}$) y $[\text{Xe}] 4f^0 5d^1 6s^0$ ($^2D_{3/2}$) (Jang, 2007). La brecha de energía entre estos dos estados se reduce significativamente de lo que se conoce para un ion Ce^{3+} aislado, debido a la gran división del campo cristalino de los estados $\text{Ce}^{3+} 5d$, que surgen cuando un ion Ce^{3+} reemplaza un ion Y^{3+} más pequeño en la estructura YAG (George, 2013).

Las nanopartículas de YAG: Ce^{3+} poseen alta eficiencia cuántica, alto índice refractivo, buena estabilidad térmica y química. Se han reportado diversos métodos para la síntesis de nanofósforos de YAG: Ce^{3+} , estos incluyen: spray-pirolisis, rutas de fases líquidas, combustión y sol-gel. Se ha reportado que la intensidad de emisión de fotoluminiscencia del nanofósforo mejoró con el aumento de la temperatura de calcinación en el rango de 830-1030°C, mientras que disminuyó drásticamente con el aumento de la concentración dopada con Ce^{3+} (He *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha proporcionado una descripción detallada de los métodos empleados para producir nanovehículos de quitosano, permitiendo la encapsulación de moléculas hidrófobas o hidrófilas, simples o complejas (Grenha *et al.*, 2012). En particular, se han desarrollado distintos métodos, que incluyen principalmente emulsiones de diferentes tipos de coacervados, o incluso métodos de coalescencia, como pueden ser: de emulsión-gota (Tokumitsu *et al.*, 1999), de difusión de solvente en emulsión, método micelar inverso, gelificación iónica (Kiil *et al.*, 2017), complejación de polielectrolitos, y desolvatación (Takeuchi, 2001).

(Fessi *et al.*, 1989), desarrolló por primera vez la técnica de nanoprecipitación. El principio de este método consiste en la obtención de la suspensión coloidal cuando la fase oleosa se agrega lentamente a la fase acuosa con agitación moderada. La formación de las nanopartículas es instantánea y solo necesita un paso, por lo que tiene la ventaja de una operación rápida y fácil. Los parámetros clave en esta síntesis pueden ser: la velocidad de inyección de fase orgánica, la velocidad de agitación de fase acuosa y la relación fase aceite / fase acuosa (Wang *et al.*, 2016).

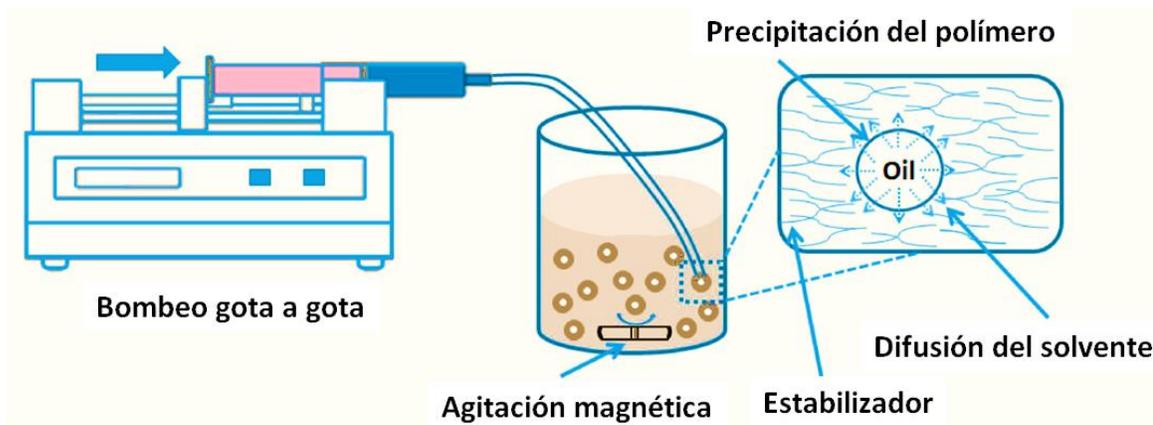


Fig. 7 Esquema método de nanoprecipitación. Condiciones físicoquímicas para la obtención de agregados nanométricos (Fessi *et al.*, 1989).

Por otro lado, se han diseñado LNPs a través del autoensamblaje iónico del derivado de antraceno y quitosano, monitoreando en tiempo real el proceso de internalización (Cui *et al.*, 2011). Shen, (2012) sintetizó nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano. Logró aprovechar la abundancia de grupos amino expuestos en la superficie del quitosano, sirviendo como andamio para la conjugación con fármacos por medio de enlaces hidrógeno. Más aún, se ha aprovechado la sobre expresión del receptor folato en células cancerosas, logrando fabricar nanopartículas conjugadas de quitosano con ácido fólico, evaluando su especificidad de direccionamiento (Song *et al.*, 2013). Jain *et al.*, (2018) realizaron pruebas *in vitro* de las LNPs, demostrando que las nanopartículas tenían un efecto citotóxico insignificante. Además, reportaron una mayor internalización de las LNPs funcionalizadas con ácido fólico en células T-47D (Folr^{hi}) en comparación con células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Folr^{lo}), debido a la cantidad de receptores de folatos.

1.7 Justificación

Desarrollar bioetiquetadores nanométricos selectivos de células de cáncer de mama las cuales permitan su localización por luminiscencia.

1.8 Hipótesis

Las nanopartículas luminiscentes dopadas con iones de tierras raras embebidas en quitosano y funcionalizadas con ácido fólico funcionan como bioetiquetadores de células de cáncer.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas luminiscentes de YAG: Ce³⁺ embebidas en quitosano y funcionalizadas con ácido fólico para su uso en aplicaciones biomédicas.

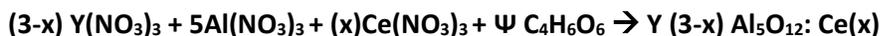
1.9.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar nanopartículas de YAG:Ce³⁺ por el método Sol-Gel.
2. Caracterizar las LNPs mediante su análisis de fotoluminiscencia, transferencia de energía, morfología, interacciones moleculares, estructura cristalográfica y potencial electrostático.
3. Sintetizar NPs de YAG:Ce³⁺ embebidas en quitosano y funcionalizarlas con ácido fólico.
4. Verificar la funcionalización y tamaño de las nanopartículas mediante espectroscopía FTIR, microscopía de transmisión (TEM), análisis Uv-vis y potencial zeta.
5. Determinar la citotoxicidad de las NPs mediante ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.
6. Evaluar *in vitro* la internalización de las NPs mediante microscopía confocal.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas luminiscentes YAG:Ce³⁺ por el método de Sol-Gel.

El método de síntesis por sol-gel fue el utilizado para la síntesis de nanocristales de granate de aluminio-itrinio dopado con el ión Ce³⁺ (YAG: Ce³⁺). La estequiometría de la reacción fue la siguiente:



Donde los reactivos principales son: Y (NO₃)₃ · 6H₂O , Al (NO₃)₃ · 6H₂O, Ce (NO₃)₃ · 6H₂O y C₄H₆O₆ siendo de Sigma- Aldrich® al 99.99% de pureza. La cantidad empleada del agente precursor ácido tartárico (C₄H₆O₆) se mantuvo en una proporción Ψ =1:2. La variable x correspondiente al porcentaje de concentración del ion Ce³⁺ el cual fue de 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.06, y 0.08%.

Los reactivos fueron dispersados en agua desionizada previamente filtrada en una membrana de nylon con un diámetro de poro de 0.2 μm; durante 20 a 24 h se mantuvo en agitación magnética rigurosa. Al transcurrir el proceso de homogenización la solución tornó a un color blanquecino y de consistencia gelatinosa. Posteriormente se aumentó la temperatura de la solución a 80°C durante 2 h, manteniéndola en agitación constante.

En un mortero de ágata se recolectó el agregado final seguido de un tratamiento por molienda. Posteriormente la muestra de YAG: Ce³⁺ fue colocada en un crisol donde se aplicó un tratamiento térmico o “*annealing*”. El tratamiento térmico se realizó en un horno Felisa FE-290, elevando la temperatura a 1100°C por 3 h.

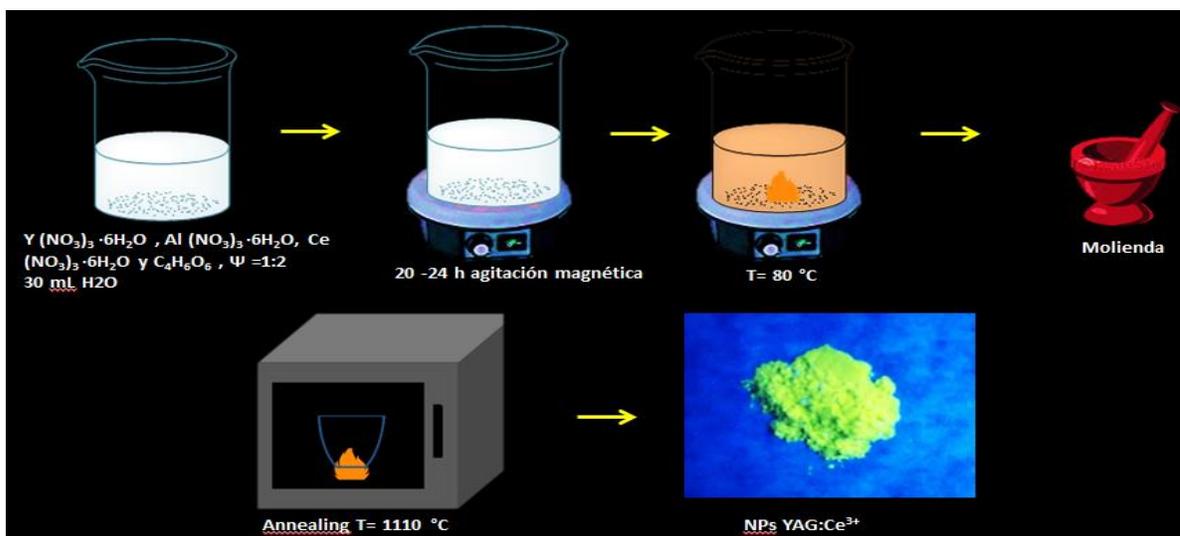


Fig. 8 Diagrama de flujo del método de síntesis por Sol-Gel.

2.1.1 Sonicación de las nanopartículas YAG:Ce³⁺

Con el fin de evitar agregados, las LNPs previamente sintetizadas se resuspendieron en agua Milli-Q®, a 1 mg/mL. Posteriormente fueron ultasonicadas durante 15 min con un ultrasonificador de marca Sonics & Materials, Inc. Para los procesos de recubrimiento con quitosano y funcionalización con ácido fólico, las nanopartículas fueron sonicadas en el dispositivo Branson, Serie CPXH, MOD. 3800.

2.1.2 Preparación de la solución de quitosano

Se estudiaron las nanopartículas de YAG: Ce³⁺ embebidas a diferentes concentraciones de quitosano al 1%, 2%, 3% y 4%. Los reactivos empleados fueron quitosano de bajo peso molecular de la marca Sigma–Aldrich con peso molecular de 50,000–190,000 Da, y una viscosidad de 20-300 cP. Ácido acético glacial marca Sigma- Aldrich >99.85% a 25°C. Para la preparación de la solución de quitosano, se disolvieron 0.30 g de quitosano en 98 mL de agua Milli-Q® previamente filtrada. Posteriormente se adicionó ácido acético glacial (2%), manteniendo el pH entre 5-6, en caso contrario se procedió a ajustar la solución con NaOH 1M. La solución se agitó rigurosamente por 12 h, finalmente la solución fue filtrada.

2.1.3 Recubrimiento de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ con quitosano

El material luminiscente YAG: Ce³⁺ (1mg/ mL) previamente ultrasonificado se agitó durante 10 minutos. En una segunda reacción se mezclaron H₂O destilada y quitosano en una proporción 1:1. Empleando el método de nanoprecipitación, se fue adicionando la solución de quitosano a las nanopartículas ultrasonificadas. La solución final permaneció en agitación rigurosa por 1 h. Posteriormente, se realizaron 7 lavados con agua Milli-Q®. Este proceso consistió en centrifugar a 2,000 rcf durante 15 min nuestra solución final de nanopartículas luminiscentes y quitosano. En un horno Felisa FE-290 se secaron los agregados correspondientes a la conjugación de YAG: Ce³⁺ y quitosano. La temperatura se elevó a 80°C durante 2 h, posteriormente el material sintetizado se refrigeró a 5°C para su análisis.

2.1.4 Funcionalización de las nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch con ácido fólico

La adición de ácido fólico se llevó a cabo mediante un sistema Schlenk bajo agitación magnética rigurosa. Se preparó una solución de 4.5 mg/mL de ácido fólico en di-metilsulfóxido (DMSO). Esta solución se mantuvo en oscuridad a 35°C durante 4 h. Al transcurrir este tiempo y continuando la agitación se adicionaron 4 mg/mL de N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en DMSO seguido de 2.50 mg/mL de N-hidroxisuccinimida (NHS) en DMSO. La mezcla se agitó en oscuridad por un lapso de 12 h a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas se centrifugaron a 2,000 rcf durante 15 min.

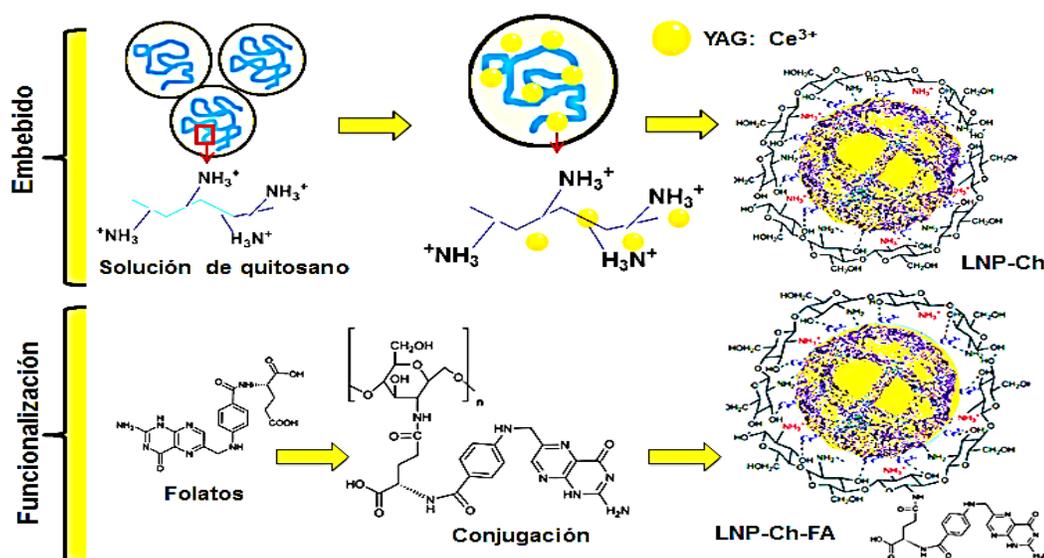


Fig. 9 Representación de las diferentes etapas del recubrimiento y funcionalización de las LNP.

2.2 Técnicas de caracterización de nanopartículas

Las múltiples propiedades tanto físicas como químicas que presentan las LNPs sintetizadas, fueron evaluadas con diversos, entre los cuales se encuentran:

2.2.1 Difracción de rayos-X (XRD)

La estructura cristalina de las NPs de YAG: Ce³⁺ fue analizada usando un equipo de Philips X`pert, con una sonda de Cu y con radiación K_{α1} de λ= 0.154 nm; se escaneó en un rango de 2θ de 20-80°. El tamaño promedio de los cristalitos se estimó a partir del ensanchamiento de los picos XRD según la ecuación de Scherrer:

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

Donde **0.9** es una constante que depende de la forma del cristalito (0.9 × 57.3), **λ** es la longitud de onda XRD, **β** es la mitad del ancho corregido del pico de difracción más fuerte y **θ** es el ángulo de difracción (Del Rosario *et al.*, 2004).

2.2.2 Estudios de fotoluminiscencia y rendimiento cuántico (PL)

Los espectros de emisión y de excitación de las NPs fueron estudiados con un espectrofluorómetro marca Hitachi F-7000, usando una lámpara de arco de Xenón. El rendimiento cuántico fue medido usando una esfera de integración con silicato de sodio como referencia estándar.

2.2.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

La morfología, distribución de los tamaños, distancias interplanares, y defectos de las LNPs, fueron analizadas mediante el equipo JEOL JEM-2010 con 200 kV de voltaje acelerado. Las muestras fueron resuspendidas en etanol y ultrasonificadas por 5 min. Posteriormente se añadieron 50 μL de la muestra en una rejilla de cobre 200 mesh recubiertas por film-soporte marca Pelco. Se utilizó el software ImageJ para analizar 100 micrografías de diferentes LNP. Se realizó estudio comparativo entre ellas pudiendo determinar las características antes mencionadas.

2.2.4 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Con el fin de complementar la caracterización morfológica de las LNPs. Las muestras fueron depositadas en cinta conductora de carbono. Posteriormente, se incidió sobre ellas utilizando electrones acelerados para barrer la superficie del espécimen. Los electrones fueron generados empleando el equipo JEOL JSM-5300, los cuales proporcionaron imágenes de la muestra.

2.2.5 Espectroscopia de energía dispersiva (EDS)

Se bombardearon las muestras en alto vacío con el haz de electrones (densidad de energía del láser $=3.7\text{J}/\text{cm}^2$) del microscopio de barrido estándar. El análisis de esta técnica proporcionó información química mediante la detección de rayos-X liberados de las muestras bombardeadas.

2.2.6 Microscopio de fuerza atómica (AFM)

Las muestras fueron diluidas en agua Milli-Q® y puestas sobre una oblea de sílice. Para conocer la rugosidad existente de las diferentes LNPs, este estudio consistió en el uso del modo alternativo de contacto *tapping* del AFM. El tapping se realizó con una punta de Si (Mikromasch, NSC36 / Cr-AuBS, $k = 0.6 \text{ N m}^{-1}$). La

muestra fue escaneada a 256×256 píxeles con una frecuencia de píxeles de 2000 Hz con un tiempo de grabación de la señal óptica de 0.5 ms por píxel. Las imágenes fueron analizadas con el software SPIP 6.4.7.

2.2.7 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los estudios se realizaron en el equipo Nicolet 6700-IR, de Thermo Scientific®. Para obtener las vibraciones moleculares correspondientes a las LNPs, se preparó el KBr con un tratamiento térmico de 500°C durante un tiempo de 20 h. Posteriormente se elaboró una mezcla de KBr y NPs para introducir al detector.

2.2.8 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)

Se diluyeron 5 mg/mL de las diferentes LNPs sintetizadas en agua destilada. Posteriormente se determinó la absorción cualitativa de radiación electromagnética de las LNPs en un espectrofotómetro marca UV-Vis 6405 JENWAY, causando un barrido de 200 a 800 nm.

2.2.9 Potencial Zeta y Dispersión de luz dinámica (Z)

Con el fin de conocer la estabilidad de formulación y la vida útil en medio acuoso, las LNPs previo al análisis fueron sometidas a ultrasonificación durante 5 min a una concentración de 1 mg/mL. Ambos análisis se llevaron a cabo en el equipo Microtac Nanotrac Wave II.

2.3 Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular son utilizados para determinar si moléculas o compuestos prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos.

2.3.1 Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares humanas de cáncer de mama (MDA- MB-231 y T47-D) para validar la citotoxicidad e internalización de las LNPs sintetizadas, así mismo, fue empleada la línea celular 293T de células normales de riñón embrionario como control negativo. Todas las líneas celulares fueron adquiridas de *American Type Culture Collection* (ATCC).

Las líneas celulares MDA- MB-231 y 293T se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) marca Gibco con 2 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. La línea celular T47-D se cultivó en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) marca Biowest con 2 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico e incubada a 37°C con 5% de CO₂. Ambos medios de cultivo se cambiaron cada tercer día.

2.3.2 conteo celular

Se tripsinizó durante 5 min con 1 mL de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich), posteriormente se adicionaron 4 mL de medio de cultivo. Se adicionaron 20 µL de suspensión celular en 20 µL de azul tripano; finalmente se depositaron 20 µL de la solución final en cada canal de la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer fue colocada al microscopio y se procedió a contar células. Finalmente se obtuvo un promedio de células por mL para su uso en la cantidad de células a sembrar para cada experimento requerido.

2.3.3 Sembrado de diferentes líneas celulares

Se utilizó una placa de 96 pozos con 10,000 células para cada pozo y con una base de medio suplementado RPMI o DMEM dependiendo del tipo celular (10,000 células/100µL/pozo). Estas células estuvieron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h antes del tratamiento con los diferentes tipos de LNPs. Toda la manipulación celular se realizó en una cámara de flujo laminar marca Aura HZ, con elementos estériles.

2.3.4 Tratamiento de células con nanopartículas

Se resuspendieron las LNPs sintetizadas en medio suplementado. Las concentraciones de las LNPs fueron: 1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así mismo, como control negativo se sembraron células sin tratamiento y se obtuvo la lectura del fondo de placa la cual incluía únicamente medio de cultivo. Se adicionaron estas concentraciones por cuadruplicado a cada pozo de la caja de 96 pozos y se volvieron a incubar las células durante 24 h.

2.3.5 Ensayo MTT

Este ensayo mide la reducción del 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT; Sigma) a formazan que ocurre en células metabólicamente activas. Después de adicionar el reactivo MTT, las células fueron incubadas por 5 h. Para detener la formación de MTT-formazan se agregaron 100 μL de HCl 0.01 M que contenía SDS al 10%. Posteriormente se incubó la placa durante 16-20 h. Finalmente la placa se leyó en un lector de placas de ELISA, Thermo Scientific a una longitud de 570 nm.

2.3.6 Microscopía confocal

Las células T47D, MDA-231-MB, fueron tripsinizadas y sembradas a una cantidad celular de 2.5×10^5 en cajas Petri tipo MatTek y se cultivaron por 24 h. Posteriormente se adicionó 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las LNPs (YAG: Ce^{3+} , YAG: Ce^{3+}/Ch , YAG: $\text{Ce}^{3+}/\text{Ch-FA}$), dejándose a incubar por 6 h, seguido de dos lavados con PBS 1X para eliminar LNPs no internalizadas. Se fijaron las células con paraformaldehído (4%) durante 5 min, seguido de un lavado con PBS. Se añadió 1 ml PBS y se refrigeraron a 4°C para su posterior análisis. Las muestras previamente descritas, mostraron señales luminiscentes de 500-600 nm (canal verde) bajo excitación a 457 nm con un microscopio confocal marca Olympus FV 1000. 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 permitió 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 y discusión

3.1 Análisis de YAG: Ce³⁺

3.1.1 Difracción de rayos-X

Se sintetizaron las nanopartículas luminiscentes por el método sol-gel, donde se obtuvo la fase YAG en ausencia de fases secundarias, en comparación con tratamientos térmicos de 700 a 800°C reportados, los cuales presentaron estructura amorfa (Fadlalla, 2008). Se encontraron los tres picos característicos de difracción de la fase Y₃Al₅O₁₂, correspondientes a las direcciones cristalográficas [211], [400] y [420], los cuales fueron consistentes con la estructura cúbica estándar indexada como fase Y₃Al₅O₁₂ (archivo cristalográfico JCPDS 33-0040) perteneciente al grupo espacial Ia-3d [230] (Kang *et al.*, 2016). El pico principal de la estructura cúbica de YAG está centrado en $2\theta = 33.304^\circ$ y corresponde al plano cristalino con índices de Miller de [420]. No se observó ninguna fase secundaria de impurezas como pueden ser Y₄Al₁₂O₉ (YAM) o YAlO₃ (YAP) en la muestra sintetizada.

El tamaño del nanocrystal, se determinó mediante la ecuación de Scherrer, donde el valor obtenido para el tamaño de cristalito fue de 43.27 nm (± 2 nm). El análisis XRD reveló que los iones de Ce³⁺ incorporados no cambian la estructura cristalina de la fase YAG. Los parámetros dimensionales de la celda unitaria de la muestra sintetizada de YAG: Ce³⁺ fueron 12.007 (± 2 Å), una distancia interplanar estimada de las franjas de la celda $d_{211}=0.492$ nm, y un volumen de celda de 1723.914 (± 0.3 Å³). Los parámetros dimensionales de la celda unitaria de la estructura de la fase pura de YAG según el archivo cristalográfico es de 11.994 (± 0.0014 Å), una distancia interplanar de las franjas de la celda $d_{211}=0.4905$ nm, y un volumen de celda de 1723.746 (± 0.3 Å³) (Dobrzycki *et al.*, 2004).

La presencia de dopantes no altera la estructura cristalina de las muestras, pero ciertamente modifica los parámetros de la red debido a la diferencia en los radios iónicos entre el dopante Ce³⁺ (1.07 Å) y el ion sustituido Y³⁺ (0.92 Å). Se sugiere que los parámetros de la celda unitaria del nanocrystal formado de YAG: Ce³⁺ podrían expandirse al aumentar gradualmente la cantidad de iones de Ce³⁺, por otro lado, la distribución en la red cristalina se vuelve más homogénea a concentraciones más bajas de ion Ce³⁺ (Fadlalla *et al.*, 2018).

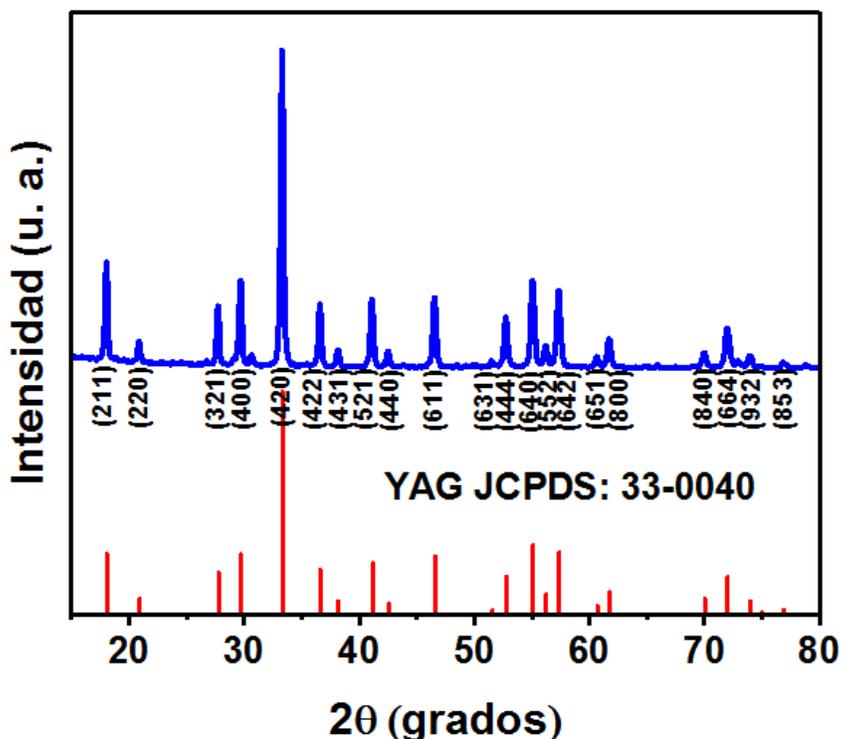


Fig. 10 Patrones de difracción de rayos-X. Comparación de las LNPs YAG: Ce³⁺ respecto a la fase YAG pura (archivo cristalográfico JCPDS 33-0040).

3.1.2 Estudio morfológico por microscopía electrónica de barrido

La eficacia de la luminiscencia de las LNPs depende de la morfología de las partículas por ejemplo, el tamaño, la forma, límites del grano. El efecto de la temperatura aplicada en la morfología y distribución de tamaño de partículas fue estudiado por SEM (Fig. 11). Las micrografías obtenidas de las muestras de YAG: Ce³⁺ a diferentes magnificaciones (10, 5 y 2 μm), presentaron una forma irregular en su superficie y una distribución de tamaño estrecha. La formación de esta textura superficial y cierta porosidad se atribuye al crecimiento de nanocristales durante el proceso de cristalinización a partir de precursores amorfos (Xhaxhiu, 2015). Se concluye que la muestra obtenida posee una mejor uniformidad en su estructura cristalina la cual puede ser aprovechada para aplicaciones de recubrimiento. Así mismo, cabe resaltar la importancia de tener un método para ubicar la misma área en cada etapa del estudio, con el fin de poder evidenciar de forma efectiva el análisis de cada muestra.

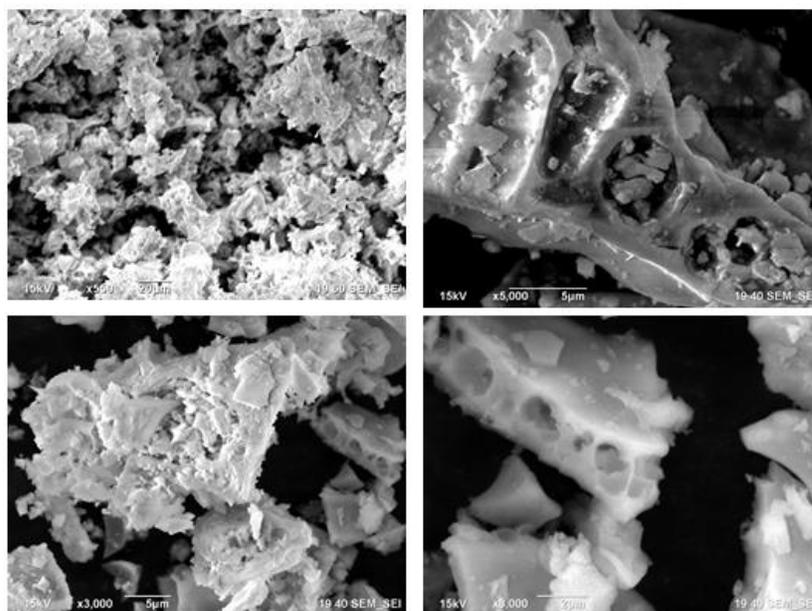


Fig. 11 Micrografía SEM del material YAG:Ce³⁺. Los diferentes paneles muestran magnificaciones correspondientes a 20 μm (superior izquierdo), 5 μm (superior derecho), 5 μm (inferior izquierdo) y 2 μm (inferior derecho).

3.1.3 Composición química encontrada por espectroscopia de energía dispersiva

Los resultados de EDS para las LNPs sugieren la formación de nanopartículas YAG: Ce³⁺. Los picos observados en el espectrograma (Fig. 12) corresponden a los elementos de YAG. El análisis EDS de la superficie de la muestra de YAG:Ce³⁺ mostró que, dependiendo del régimen de irradiación, se detectaron elementos tales como oxígeno (O), aluminio (Al) e itrio (Y); por otra parte, el cerio (Ce) no fue detectado debido al bajo porcentaje atómico (Vlasova *et al.*, 2015). La composición (porcentajes atómicos) de las nanopartículas (Tabla 1) se calculó sobre la base de los picos EDS. El porcentaje atómico del Al fue ligeramente más alto que el de Y. Este resultado tiene tres posibles explicaciones: (1) la evaporación de algunos elementos por la alta temperatura durante la síntesis; (2) la existencia de cantidades menores de fases metaestables; (3) un cambio estequiométrico en la composición del ion Ce (III) a Ce (IV) (Tsuruoka *et al.*, 2016). Se sugiere que a medida que se sintetizaba la muestra en presencia de oxígeno, algunas especies de cerio (III) pudieron ser oxidadas a especies de cerio (IV) en su superficie (He *et al.*, 2016).

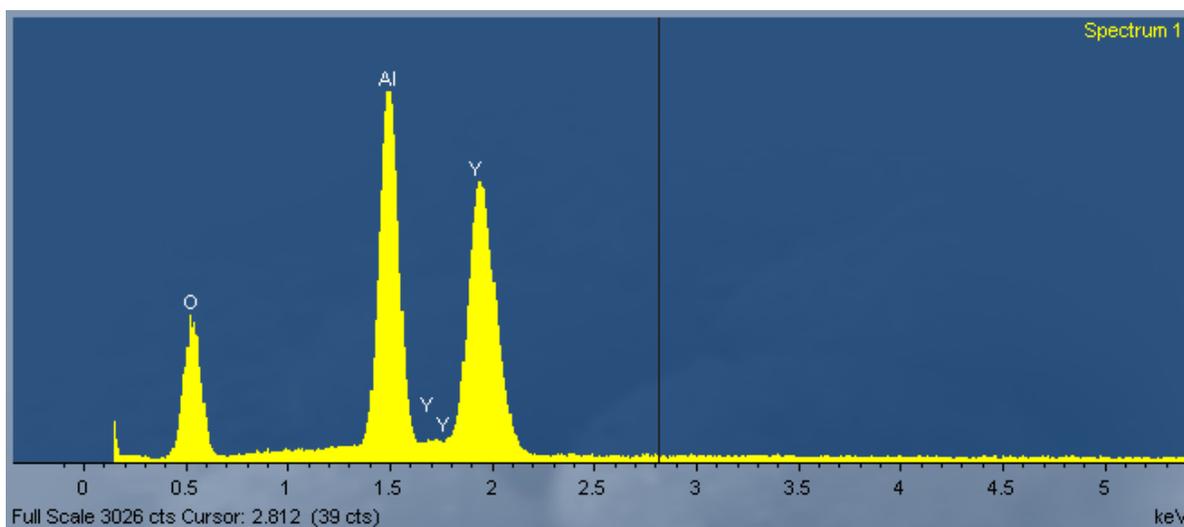


Fig. 12 Elementos presentes en la red cristalina del material sintetizado YAG: Ce³⁺. Los elementos existentes fueron: aluminio en mayor proporción seguido de itrio y oxígeno en menor proporción.

Tabla 1. Porcentajes atómicos de las nanopartículas (densidades de energía: 3.7 J / cm²).

Elemento	Concentración	Porcentaje atómico (at. %)
O (K)	9.49	64.41
Al (K)	6.88	20.96
Y (L)	11.13	14.64

Se concluye que debido al método de síntesis y al tratamiento térmico antes descrito, es posible modificar la cristalinidad con el aumento de temperatura y eliminar compuestos volátiles por simple descomposición de nitratos.

3.1.4 Evaluación morfológica por microscopía electrónica de transmisión

La morfología detallada, la microestructura y la estructura del material YAG: Ce³⁺ se analizó mediante TEM. Se obtuvieron diferentes micrografías correspondientes a escalas de 5, 10, 20, y 50 nm, donde el tamaño promedio de la mayoría de las nanopartículas fueron inferiores a 60 nm. Este estudio reveló pequeñas partículas agregadas las cuales se encontraban definidas de modo homogéneo y con una morfología uniforme cuasiesférica; estas mostraron pocas dislocaciones en la estructura cristalina del material.

Aunque los tamaños de las nanopartículas fueron ligeramente más grandes que los obtenidos mediante la ecuación de Scherrer, estos tamaños correspondieron bajo el mismo orden de magnitud (Del Rosario *et al.*, 2004).

Se demostró la formación de agregados de partículas primarias, considerando que debido al posible aumento de la temperatura al calcinar la muestra, se podría producir la coalescencia entre partículas, produciendo agregados con un mayor tamaño. Además, las mediciones TEM confirmaron claramente que el tamaño del cristalito de las muestras de YAG: Ce³⁺ es independiente de la concentración de dopante.

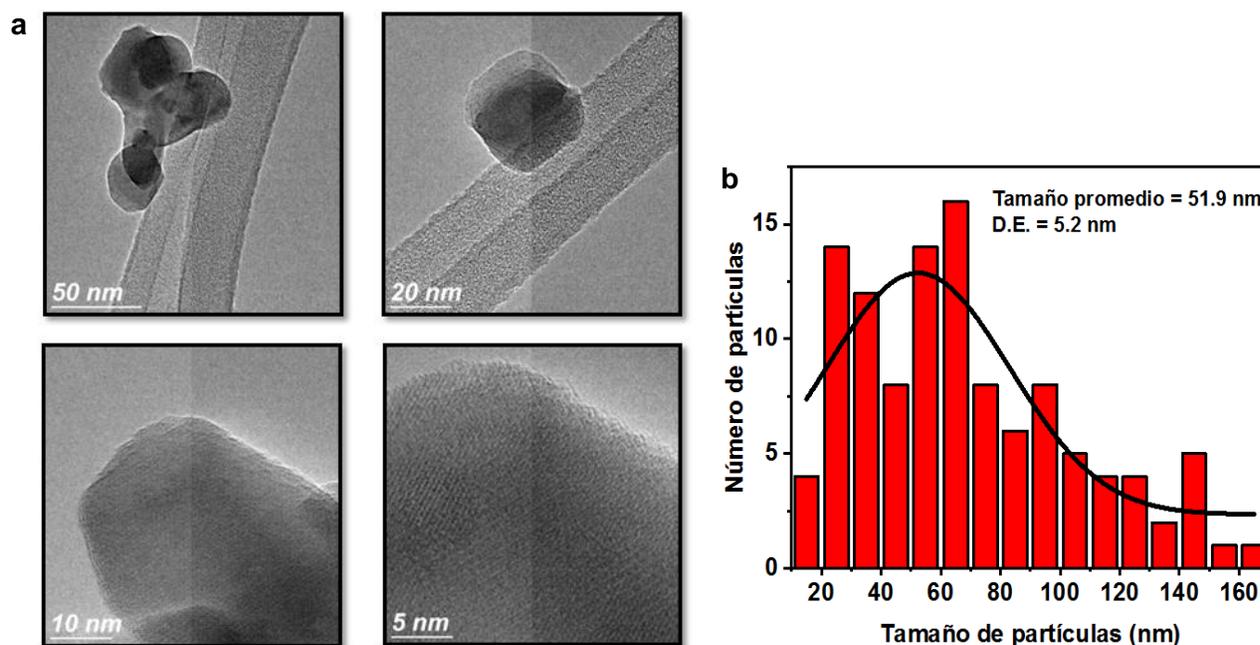


Fig. 13 a) Micrografías TEM del nanofósforo YAG: Ce³⁺ a diferentes magnificaciones (50, 20, 10 y 5 nm), b) distribución de tamaño de NPs de YAG: Ce³⁺.

3.1.5 Análisis por microscopía de fuerza atómica

En este estudio se observaron aglomerados con longitudes de varios micrómetros y un ancho de hasta ~1 μm . Los cristales presentaron ~100 nm de altura y una rugosidad promedio de 89.54 nm. El análisis mostró un evidente apilamiento del material YAG: Ce³⁺. Las características topográficas más altas en los cristales corresponden a una gran amplitud de la emisión de fluorescencia, lo que indica que hay una segunda capa de cristal en lugar de la existencia de alguna impureza (Rodríguez *et al.*, 2011). Este estudio reveló la existencia y el comportamiento de las nanopartículas de YAG: Ce³⁺ sin ser modificadas en su superficie.

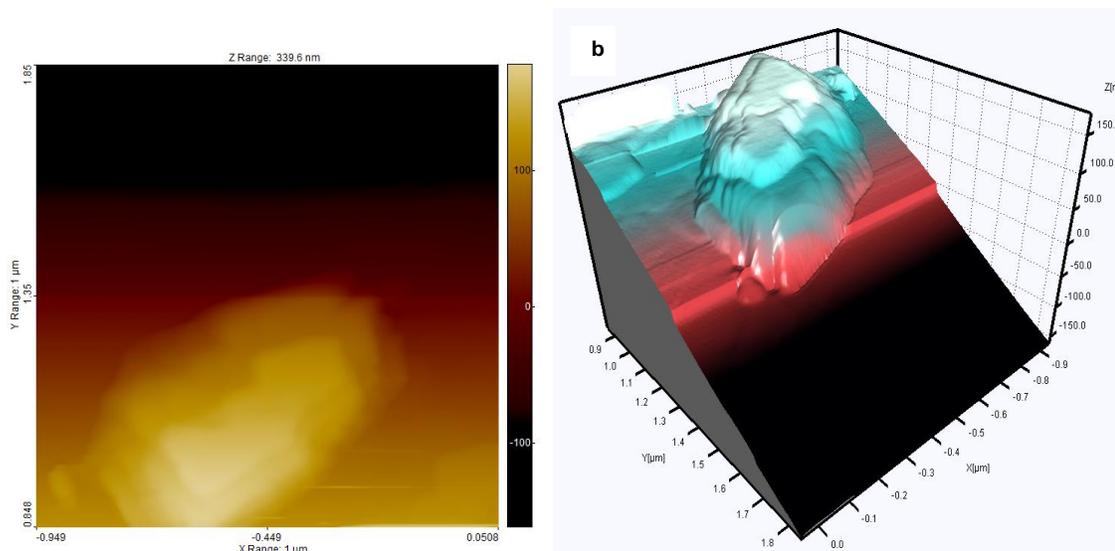


Fig. 14 Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce³⁺. a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D 15 X 15 μm².

3.1.6 Estudios de fotoluminiscencia

Las muestras de YAG: Ce³⁺ se excitaron con una longitud de onda de 450 nm, correspondiente a la excitación de los niveles más bajos de energía del ion Ce³⁺. Las curvas reportadas a diferentes concentraciones del ion Ce³⁺ presentaron amplias emisiones en el rango de 480 a 800 nm. Así mismo, se presentó una banda pequeña en la región ubicada a 345 nm, la cual es atribuida a la división del campo cristalino (Fadlalla *et al.*, 2008). El espectro de fotoluminiscencia obtenido consistió en un máximo luminiscente localizado a 540 nm. Ambos picos son asignados a las transiciones típicas del ion Ce (III), las cuales corresponden a las transiciones $5d (^2A_1g) \rightarrow 4f (^2F_{5/2} \text{ y } ^2F_{7/2})$, (He *et al.*, 2016).

La intensidad de emisión de fotoluminiscencia disminuyó drásticamente a medida que la concentración del ion Ce³⁺ aumentó, de 0.5 a 0.14% mol, deduciendo que, la concentración ideal para alcanzar un máximo de emisión correspondió a la concentración de 0.4% mol del ion Ce. Se sugiere que la alta concentración de dopaje dificulta la sustitución de iones Ce³⁺ por iones Y³⁺, aumentando la probabilidad de transiciones no radiativas. De esta forma se induce así el efecto *quenching*, este se refiere a la reducción o limitación de una población de estado excitado, principalmente por efectos no deseados, volviéndose una reducción en el tiempo de decaimiento y la intensidad general de la fluorescencia de estados electrónicos de la concentración de iones Ce³⁺ (George *et al.*, 2013).

La oxidación de los iones de cerio ($\text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+}$) ocurridos cerca de la superficie y la absorción parcial de los fotones de excitación de la red cristalina, pudieron ocasionar la reducción de la intensidad de fotoluminiscencia, efecto que ocurre a concentraciones muy bajas de dopaje (0.2% mol de Ce^{3+}).

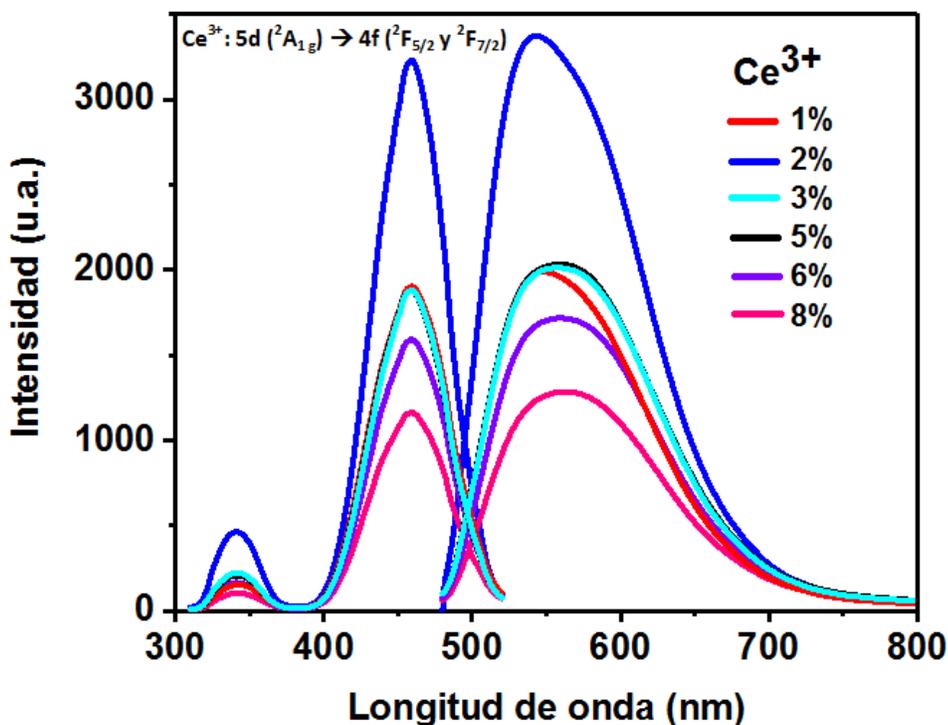


Fig. 15 Espectros de excitación y emisión de fotoluminiscencia de la muestra YAG: Ce^{3+} . LNPs dopadas a diferentes concentraciones del ion activador Ce^{3+} .

3.1.7 Rendimiento cuántico

Los resultados obtenidos mostraron que para las muestras altamente concentradas por el dopante Ce^{3+} , (0.5 a 0.14% mol), el rendimiento cuántico obtenido es más bajo que el medido con muestras concentradas al 0.4% mol. Se obtuvo un rendimiento cuántico del 31.04% para muestras concentradas al 0.55% mol del ion Ce^{3+} , en comparación con el 35.04% de las muestras concentradas al 0.4% mol del ion Ce^{3+} . La reabsorción de longitudes de onda de alta energía de los espectros de emisión y la transferencia de energía no radiante a iones Ce^{3+} que emiten a una energía ligeramente menor, puede explicar la disminución en el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia.

La luminiscencia, y por ende, el rendimiento cuántico de los nanofósforos puede verse afectado por el tratamiento térmico aplicado en la síntesis (Keppens *et al.*, 2011). Se puede concluir que a concentraciones

más altas del ion Ce^{3+} , la luz amarilla transmitida disminuye debido a un aumento en la desestabilización de la estructura cristalina, aumentando el número de partículas del nanocrystal. Además, con la sustitución parcial o total del Y por iones Ce^{3+} , los sitios dodecaédricos son expandidos y distorsionados, provocando una partición del campo cristalino de la configuración electrónica 5d de los iones de Ce^{3+} .

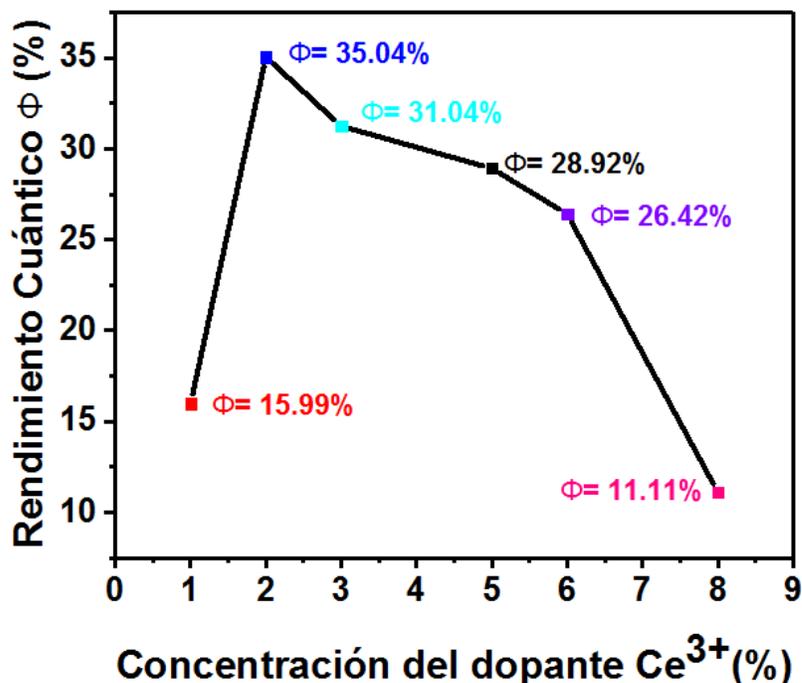


Fig. 16 Análisis normalizado del rendimiento cuántico de la muestra YAG: Ce^{3+} .

3.2 Análisis de la conjugación de YAG: Ce^{3+} /quitosano

3.2.1 Evaluación morfológica por microscopía electrónica de barrido

Se identificó que las LNPs de YAG: Ce^{3+} /Ch mostraron diferentes morfologías, principalmente se reportaron partículas alargadas y redondas que embebían al material cristalino YAG: Ce^{3+} , y partículas con superficie no porosa conjugadas. La morfología de las partículas revestidas con quitosano está estrechamente relacionada con la velocidad de goteo de la técnica de nanoprecipitación, los lavados brindados y el secado final involucrando la evaporación de solventes (Moreno *et al.*, 2018).

Mediante este análisis se puede concluir que la atracción electrostática ocurrió entre las dos especies con cargas opuestas en solución, causando que el biomaterial quitosano se adhiriera a la superficie de las nanopartículas de YAG: Ce³⁺. En este caso, el quitosano no solo estabilizó las LNPs de YAG: Ce³⁺, sino que también evitó su agregación, en comparación con las muestras analizadas de YAG: Ce³⁺ (Wu *et al.*, 2016).

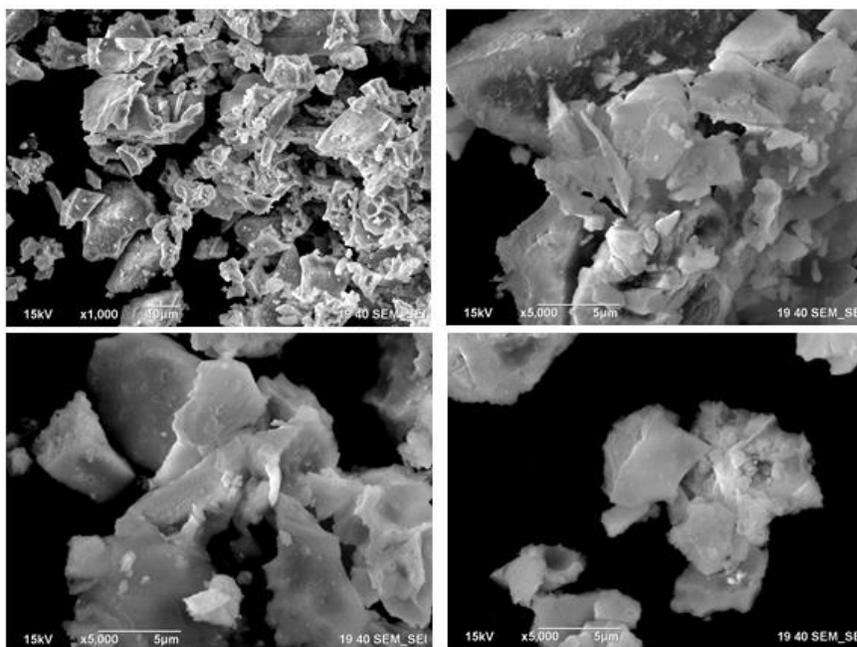


Fig. 17 Micrografía SEM de las LNPs YAG: Ce³⁺/ Ch. Los diferentes paneles muestran magnificaciones correspondientes a 10 μm (superior izquierdo), 5 μm (superior derecho), 5 μm (inferior izquierdo) y 5 μm (inferior derecho).

3.2.2 Ensayo de espectroscopia de energía dispersiva

El análisis EDS de la superficie de la muestra de YAG:Ce³⁺/ Ch detectó elementos tales como oxígeno (O), aluminio (Al) e itrio (Y) correspondientes a la fase tipo granate YAG, y carbono (C) correspondiente al quitosano. Se ha reportado que el quitosano posee elementos tales como oxígeno (O), nitrógeno (N), hidrógeno (H) y en un mayor porcentaje al elemento carbono (C) (Alvarenga *et al.*, 2011). Este análisis muestra que el quitosano ha sido transferido a la superficie de las nanopartículas de YAG: Ce³⁺. El porcentaje atómico del elemento Al fue ligeramente más alto que el de Y, coincidiendo con los porcentajes atómicos de YAG: Ce³⁺ antes descritos en la Tabla 1. En el caso del elemento itrio, se ve reflejado un porcentaje atómico inferior a comparación de los demás elementos, esto se debe a la correcta incrustación de iones Ce³⁺ en la red cristalina. Los elementos Ce, N e H no pudieron ser localizados debido al bajo porcentaje ocupado en el nanocrystal. Se sostiene que debido a que el nitrógeno se degrada al ser

totalmente deacetilado el quitosano, es muy probable encontrarlo en porcentajes bajos (Alvarenga *et al.*, 2011).

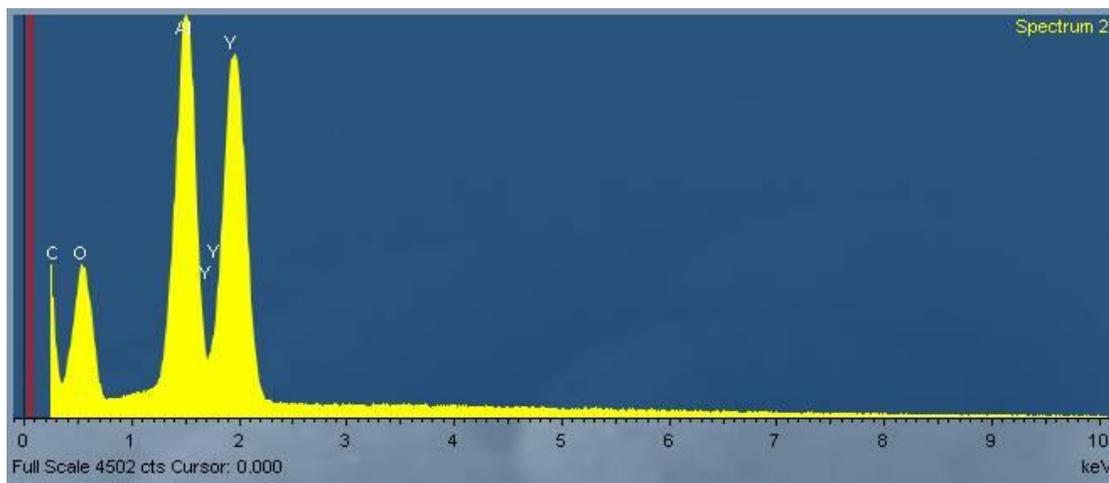


Fig. 18 Elementos presentes en la red cristalina del material sintetizado YAG: Ce³⁺/Ch. Los elementos existentes fueron: aluminio, itrio, oxígeno y carbono.

Tabla 2. Porcentajes atómicos de las nanopartículas YAG: Ce³⁺/ Ch.

Elemento	Concentración	Porcentaje atómico (at. %)
O (K)	9.54	41.95
Al (K)	7.27	12.85
Y (L)	12.12	9.12
C (K)	2.82	36.08

3.2.3 Comparación morfológica por TEM de NPs de YAG: Ce³⁺ y NPs de YAG: Ce³⁺/Ch

Las reacciones entre el nanofósforo YAG: Ce³⁺ y el biopolímero quitosano fueron estudiadas con ayuda de diversas micrografías TEM. La Fig. 19, muestra la comparación de las nanopartículas de YAG: Ce³⁺ (desnudas) y embebidas en quitosano, confirmando la formación de LNPs YAG: Ce³⁺/Ch con tipo de estructura *core-shell*. Se confirmó la conjugación de la estructura cristalina junto con la formación de la fase amorfa del quitosano. Esto se debe a la reprecipitación y reestructuración del quitosano después de la disolución en medio ácido (Tee, 2005). Las macromoléculas de quitosano pueden formar diversas configuraciones de forma en soluciones específicas. Estas formaciones pueden ser estudiadas por viscosimetría (α).

Este análisis reveló que a una concentración de quitosano al 1%, el tamaño promedio de partícula aumentó de 51.7 nm a 58.2 nm. De este modo, el uso del disolvente ácido acético durante la síntesis de la solución de quitosano y las diferencias relacionadas en el potencial iónico y el pH de dicha solución, condujo a varias configuraciones de forma de tipo varillas rígidas enredadas de las macromoléculas de polisacáridos en el material nanocristalino de YAG: Ce³⁺.

Se reportó que pesos moleculares del quitosano (M_v) menores a 220,000 Da adoptan una conformación de embobinados aleatorios ($\alpha > 0.65$), debido a que poseen más enlaces intermoleculares de hidrógeno y una mejor distribución de carga (Struszczyk *et al.*, 2002). Así mismo, los grupos protonados estuvieron totalmente neutralizados por la fuerza iónica del nanofósforo YAG: Ce³⁺. Las fuerzas de repulsión electrostática desaparecieron; y la conformación del quitosano se convirtió en una red compacta (Wang *et al.*, 1991).

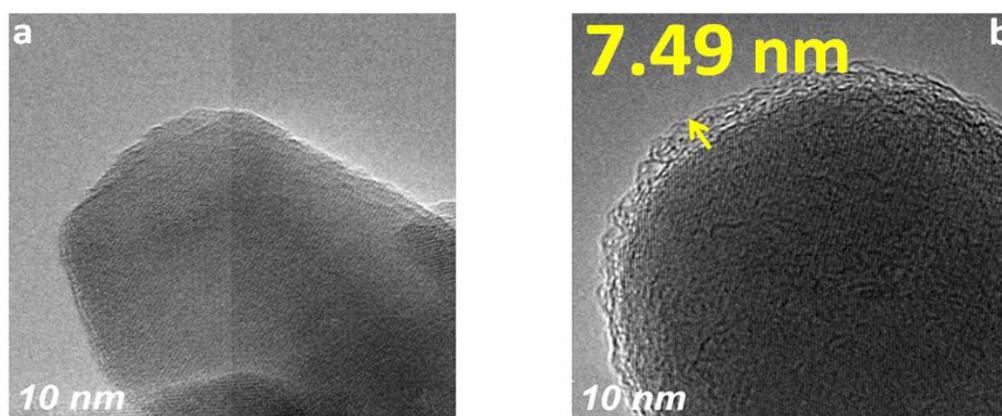


Fig. 19 Micrografías TEM, magnificación de 10 nm . a) LNP desnuda YAG: Ce³⁺ y b) LNP de YAG: Ce³⁺ embebida en quitosano.

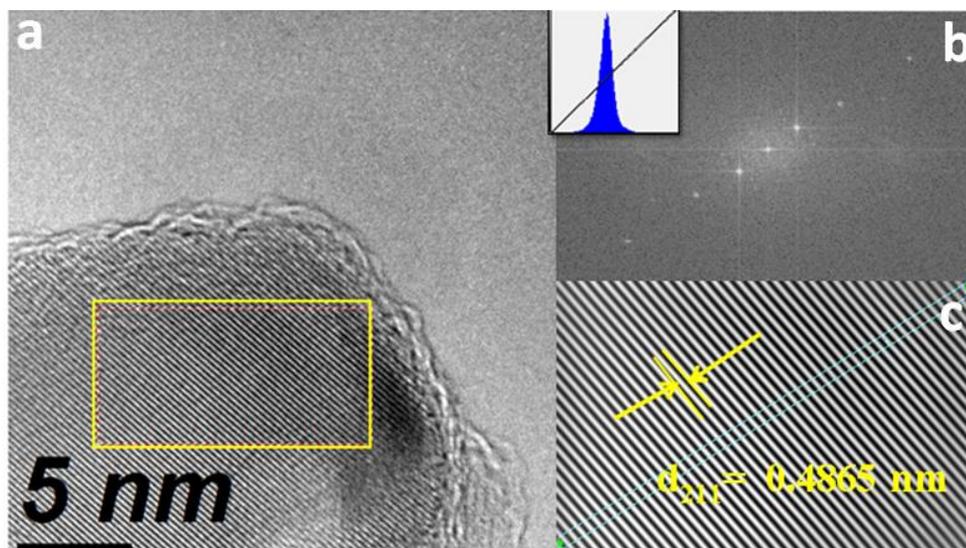


Fig. 20 Micrografía TEM, magnificación de 5 nm. a) LNP de YAG: Ce³⁺/Ch, región marcada por un cuadro, b) Perfil de intensidad y Transformada de Fourier a lo largo de la región marcada, (c) espaciado interplanar de la red cristalina.

El espaciado interplanar de las franjas de la red cristalina en el parámetro d_{211} , se estimó en 0.486 nm, siendo menor que el valor estándar del fósforo YAG ($d_{211} = 0.4905$ nm, JCPDS: 33-0040). El aumento del tamaño, la fracción de volumen y la alineación de los cristalitas, así como el espaciado interplanar reducido, dan como resultado un aumento significativo de las propiedades ópticas de la nanopartícula YAG: Ce³⁺/Ch (He *et al.*, 2016).

3.2.4 Exploración a diferentes concentraciones por TEM de LNPs de YAG:Ce³⁺/Ch

Con el fin de obtener un comportamiento luminiscente óptimo de las LNPs de YAG:Ce³⁺ sin perder las propiedades nobles del embebido de quitosano, se realizó el análisis a diferentes concentraciones de quitosano (1, 2, 3, y 4%). A partir de los resultados obtenidos, se demostró que todas las LNPs presentaron buena homogeneidad sin mostrar ninguna separación de fases (Alvarenga *et al.*, 2011). Se observó una excelente uniformidad del biopolímero en la superficie de las LNPs. Los resultados analizados mostraron que al 1 y 2% de quitosano, el grosor promedio de la nanopartícula fue de 10.7 nm, sin mostrar diferencias morfológicas significativas. Al analizar las LNPs embebidas a 4% de la concentración de quitosano, éstas mostraron un aumento del 10% en el tamaño de su grosor promedio.

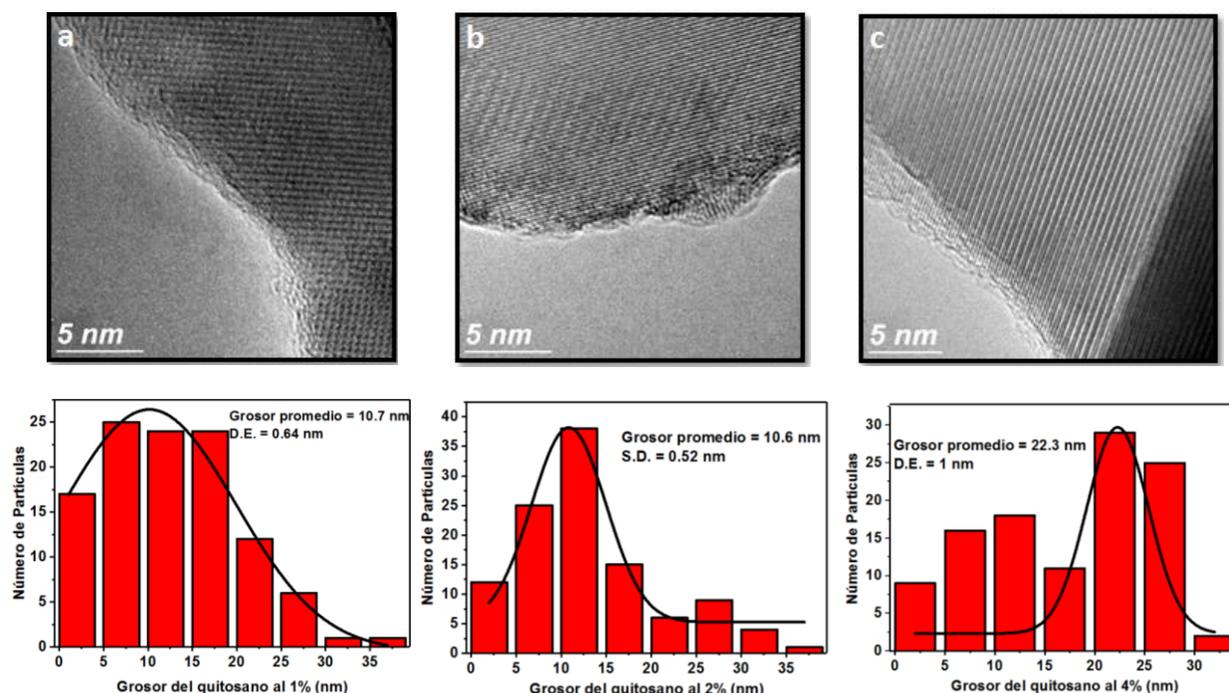


Fig. 21 Análisis del grosor del embebido. Micrográficas TEM 5 nm y evaluación estadística del grosor de YAG: Ce³⁺/Ch a) 1% b) 2% y, c) 4%.

3.2.5 Rugosidad superficial de LNPs YAG:Ce³⁺/Ch por microscopía de fuerza atómica

El análisis mostró que la capa superior de compuestos de la muestra YAG: Ce³⁺/Ch se encontraba organizada en un patrón característico de polímeros con varios indicios de rugosidad superficial irregular, encontrándose segregadas en microfases para formar nanoestructuras periódicas amorfas (Cárdenas *et al*, 2010). Los cristales presentaron ~10 nm de altura y una rugosidad promedio de 0.22 nm. Por otro lado, los resultados indicaron que al aumentar el volumen del biopolímero se mostró menos uniformidad en su superficie, así mismo, se sugiere que el tiempo y temperatura de secado de la muestra YAG: Ce³⁺/Ch puede influir de manera directa en su morfología.

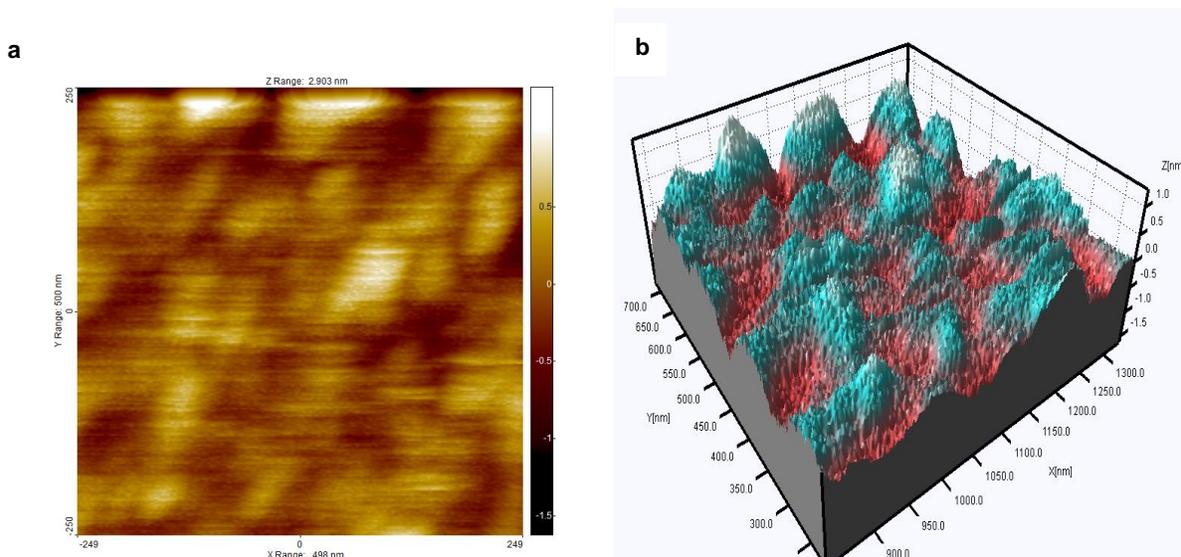


Fig. 22 Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce³⁺ /Ch. a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D, rugosidad superficial del biopolímero 15 X 15 μm².

3.2.6 Fotoluminiscencia de las LNPs de YAG: Ce³⁺ /Ch

Las LNPs a distintas concentraciones de quitosano al ser irradiadas con luz azul presentaron la emisión de fluorescencia en color amarillo. A pesar de la simplicidad de este estudio, se observó que la conjugación de las LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch presentaban gran dispersabilidad y buena fotoestabilidad en agua (Cárdenas *et al*, 2010).

Los espectros de emisión de todas las soluciones de YAG: Ce³⁺ / Ch mostraron la emisión del monómero. Las longitudes de onda de emisión 535 a 540 nm se modificaron ligeramente con el aumento de la concentración de Ch. Se observó que la intensidad de fluorescencia de las LNPs permaneció muy débil a concentraciones bajas de quitosano al 1%. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia aumentó significativamente con el incremento de la concentración de quitosano al 2%. Sin embargo, las concentraciones al 3% no produjeron ningún aumento de la intensidad de fluorescencia. Del modo contrario, la intensidad de fluorescencia de las LNPs embebidas YAG: Ce³⁺/Ch disminuyó en comparación con el análisis del espectro de emisión de fotoluminiscencia de las LNPs de YAG: Ce³⁺. Una posible explicación es que la fluorescencia del material YAG: Ce³⁺/Ch se ve afectada principalmente por el tamaño de las LNPs *core-shell* y por la transferencia de energía entre los iones del nanocrystal con los de su

conjugado. También puede deberse al mayor número de nanocapas entrelazadas en la superficie de las LNPs, ocasionando un mayor cambio en los índices refractivos y efectos pantalla (Alves, 2016).

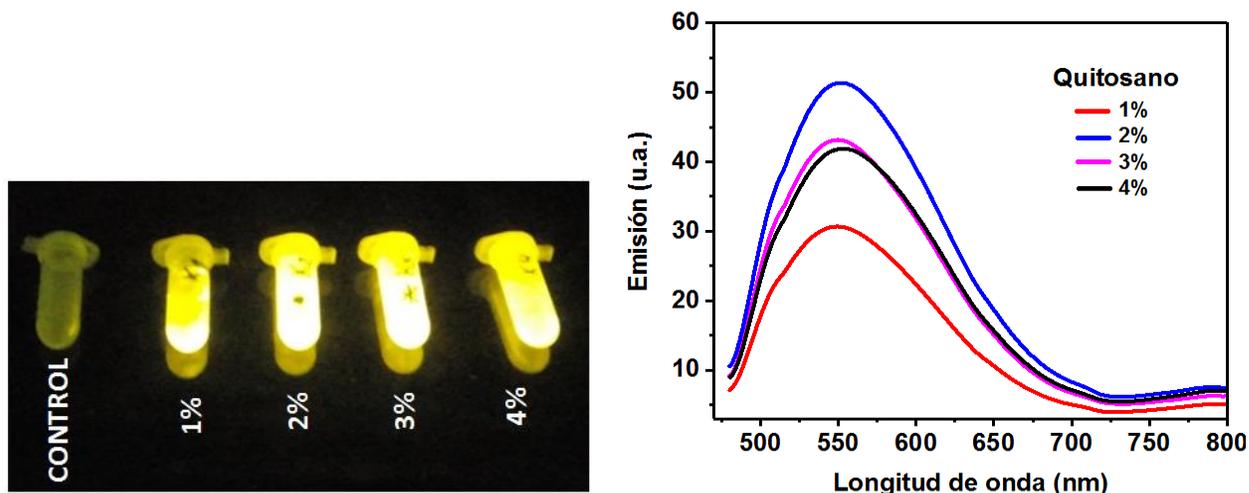


Fig. 23 Análisis cualitativo y cuantitativo de fotoluminiscencia de la muestra YAG: Ce³⁺/Ch a diferentes concentraciones de Ch. Panel izquierdo, muestra la emisión amarilla característica de la LNPs, panel derecho se muestra el espectro de emisión de YAG: Ce³⁺/Ch.

3.2.7 Rendimiento cuántico del conjugado

Los rendimientos cuánticos de luminiscencia (QY) de las muestras de YAG: Ce³⁺/Ch a diferentes concentraciones de quitosano, con un porcentaje de 2% del ion activador en todas las muestras, fueron estudiados a una longitud de onda de excitación correspondiente a 450 nm. Los rendimientos cuánticos más altos fueron observados en las muestras de YAG: Ce³⁺/Ch a una concentración de 2% de quitosano, con un rendimiento cuántico ~30%. Para la muestra conjugada al 1%, el rendimiento cuántico decreció de modo considerable (~11%). Mientras que para las muestras al 3 y 4%, el rendimiento cuántico se mantuvo de 24 a 21%. Se confirmó que, para las muestras embebidas a concentraciones más bajas del biopolímero, la precisión del rendimiento cuántico es menor debido a la reflectividad relativamente alta. Así mismo, la fluorescencia del nanofósforo YAG: Ce³⁺ pudo ser evaluada cuantitativamente, la cual fue considerada buena y estable a pesar de su conjugación (Bachmann *et al.*, 2009).

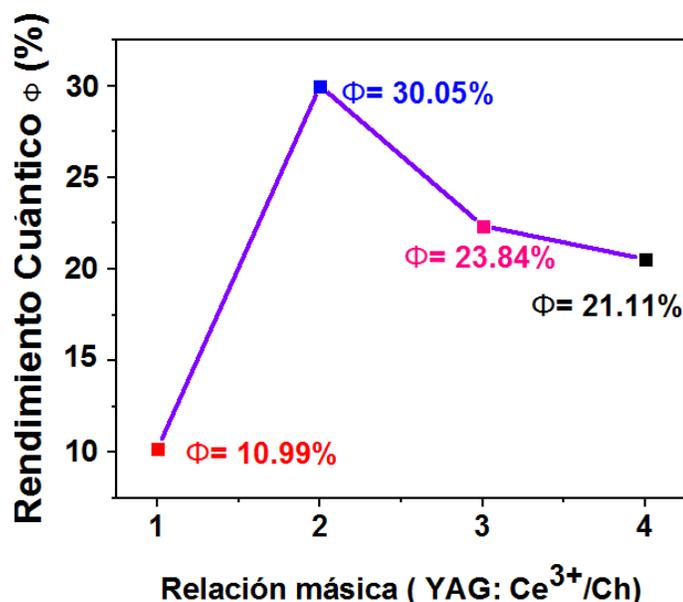


Fig. 24 Análisis normalizado del rendimiento cuántico de YAG: Ce³⁺/Ch a diferentes concentraciones de Ch.

3.3 Análisis de la funcionalización de YAG: Ce³⁺/Ch-FA

3.3.1 Exploración comparativa de las LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch y YAG: Ce³⁺/Ch-FA por SEM

Las LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch y YAG: Ce³⁺/Ch-FA mostraron misma morfología que las antes descritas en el apartado 3.2.1. La funcionalización se relacionó con la velocidad de reacción, entre los conjugados y la amina libre del Ch en la superficie del embebido a través de la reacción química EDC/NHS (Kim, 2017).

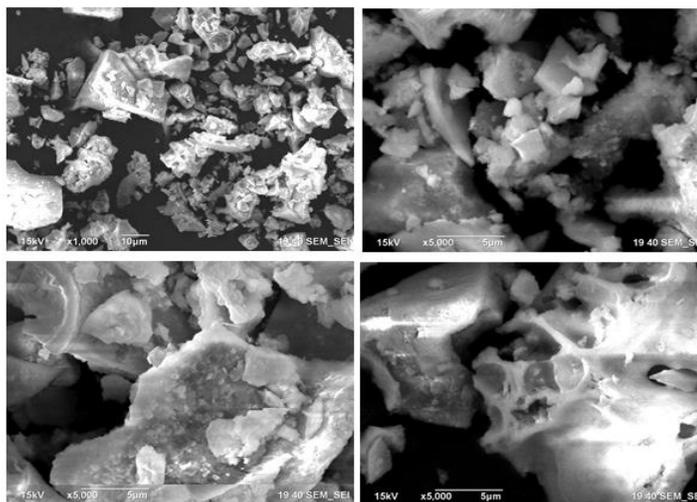


Fig. 25 Micrografía SEM de las LNPs YAG: Ce³⁺/Ch-FA. Diferentes paneles con magnificaciones correspondientes a 10 µm (superior izquierdo), 5 µm (superior derecho), 5 µm (inferior izquierdo) y 5 µm (inferior derecho).

3.3.2 Composición química de las LNPs YAG: Ce³⁺/Ch-FA

El análisis EDS de la superficie de la muestra de YAG: Ce³⁺/ Ch-FA detectó los elementos: oxígeno (O), aluminio (Al) e itrio (Y) correspondientes a la fase tipo granate YAG. También se ubicó al elemento carbono (C) correspondiente al quitosano en un menor porcentaje atómico (24%) comparado con la Tabla 2. Concluimos que este decremento en el porcentaje del biopolímero es debido al método empleado para funcionalizar la nanopartícula con ácido fólico (Tabla 3).

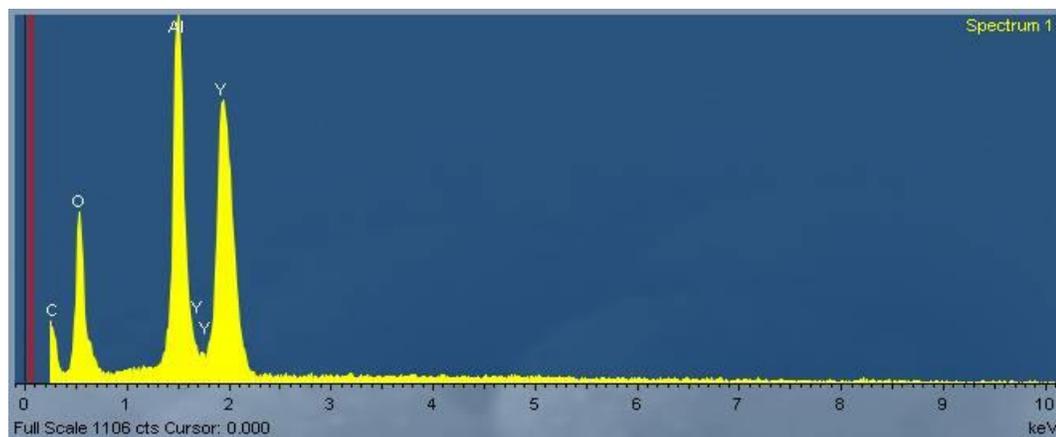


Fig. 26 Elementos presentes en la red cristalina del material sintetizado YAG: Ce³⁺/Ch-FA. Los elementos existentes fueron: aluminio, itrio, oxígeno y carbono.

Tabla 3. Porcentajes atómicos de las nanopartículas YAG: Ce³⁺/ Ch-FA

Elemento	Concentración	Porcentaje atómico (at. %)
O (K)	10.54	38.95
Al (K)	7.23	11.75
Y (L)	12.12	7.23
C (K)	2.20	24.5

3.3.3 Comparación morfológica por TEM de las LNP de YAG:Ce³⁺/Ch y YAG:Ce³⁺/Ch-FA

Utilizando el método comparativo descrito en el capítulo anterior se pudo demostrar que morfológicamente no se presentó cambio significativo entre las LNP. La imagen correspondiente a YAG:Ce³⁺/Ch presenta una conjugación uniforme con el nanofósforo, misma que se observó en las LNP funcionalizadas. El análisis indicó que el promedio del grosor del biopolímero correspondió a 7.5 nm. El objetivo de este estudio fue verificar y determinar la estabilidad morfológica de las nanopartículas funcionalizadas.

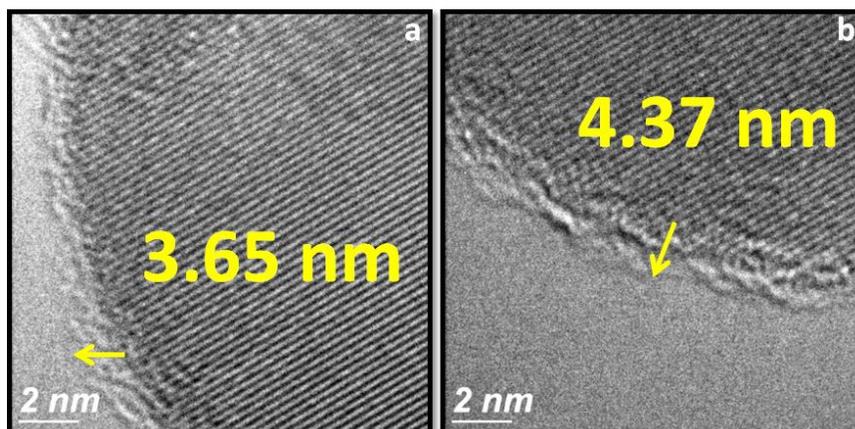


Fig. 27 Comparación morfológica de a) YAG: Ce³⁺/Ch y b) YAG: Ce³⁺/Ch-FA.

3.3.4 Rugosidad superficial de LNP YAG:Ce³⁺/Ch-FA por AFM

La micrografía mostro que la capa superior de compuestos de la muestra YAG: Ce³⁺/Ch-FA se encontraba organizada de forma definida mostrando morfología regular en comparación con la morfología de superficie mostrada en las NPs YAG: Ce³⁺ desnudas y embebidas. Se ubicaron poblaciones heterogéneas de LNP de YAG: Ce³⁺/Ch-FA. Esto podría deberse a reactivos residuales del éster de NHS formado a partir de la reacción de EDC/NHS con grupos carboxílicos el cual es propenso a hidrólisis. Dicha reacción no eliminada por completo mediante lavados y secados, es favorecida a distintos pH (ácido-básico) alterando los contornos de las nanopartículas de YAG: Ce³⁺/Ch-FA (Ruozi *et al.*, 2014). Los cristales presentaron ~10 nm de altura, una rugosidad promedio de 0.21 nm.

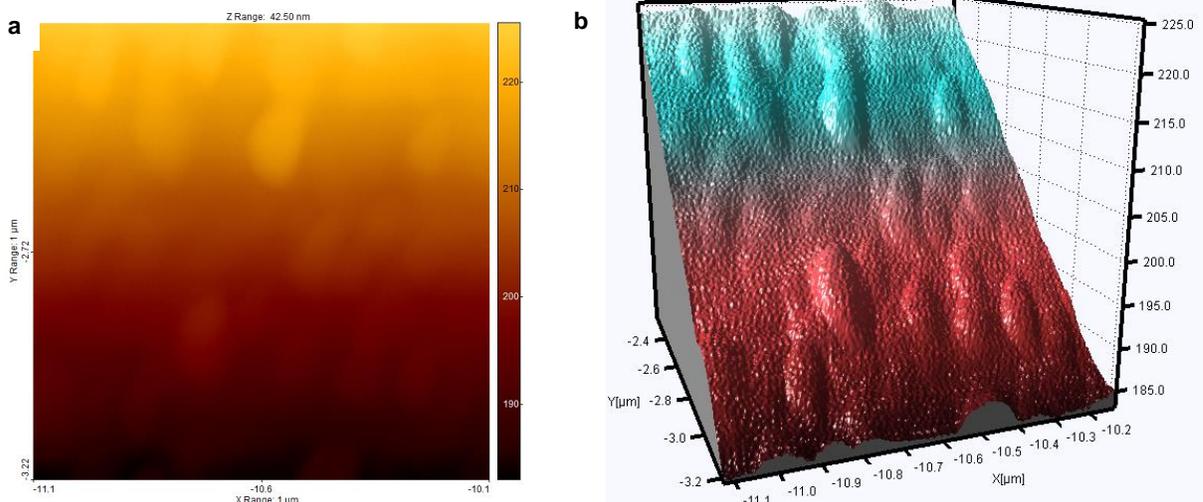


Fig. 28 Micrografía en modo tapping de AFM YAG: Ce^{3+} /Ch-FA. a) Modo de vista superior, b) Figura 3-D, rugosidad superficial de las LNPs funcionalizadas, $15 \times 15 \mu m^2$.

3.3.5 Evaluación por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

Las diferentes LNPs sintetizadas presentaron los picos característicos $788, 691 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las vibraciones características de Al-O, mientras que los picos, 723 y 628 cm^{-1} corresponden a las vibraciones características Y-O, sugiriendo la existencia de la fase YAG. Las nanopartículas de YAG: Ce^{3+} /Ch mostraron el pico característico en 1325 cm^{-1} asignado a las vibraciones tipo *stretching* o estiramiento asociado a los grupos amino del Ch. El pico a 1028 cm^{-1} se volvió menos intenso en la nanopartícula de YAG: Ce^{3+} /Ch, lo que muestra que las vibraciones de estiramiento C-O se redujeron. La banda de vibración a 3361 y 3291 cm^{-1} característica del Ch no se presentó en la LNP, dicha banda confirmaría la existencia de vibraciones de N-H. La banda característica a 2877 cm^{-1} se atribuyó a la presencia de glutaraldehído en el compuesto. Esto se debe al enlace típico $-CH$ alrededor de 2900 cm^{-1} , por lo tanto, en el nanocrystal se confirmó el entrelazamiento del biopolímero (Dennis *et al*, 2016). Por otra parte, las nanopartículas de YAG: Ce^{3+} /Ch-FA presentaron el pico característico del FA correspondiente a 1693 cm^{-1} , mostrando las vibraciones moleculares tipo *stretching*, carboxílicas C=O. Las bandas entre 1338 - 1194 cm^{-1} son atribuidas a absorciones de banda características del anillo de fenilo y pterina, confirmando su correcta funcionalización (Raouf & Mahdi, 2014) (Hammud *et al*, 2010).

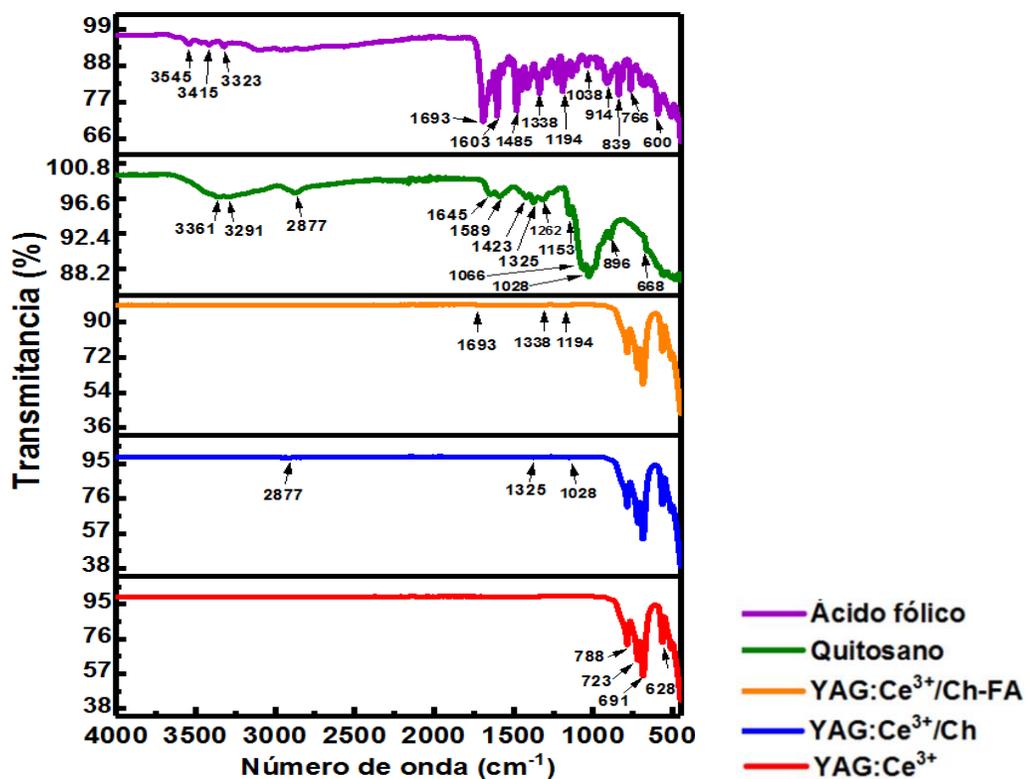


Fig. 29 Espectros FTIR de los diferentes tipos de LNPs y compuestos químicos. a) Ácido fólico, b) Quitosano, c) YAG: Ce³⁺-Ch-FA, d) YAG: Ce³⁺-Ch, e) YAG: Ce³⁺.

3.3.6 Absorbancias obtenidas por espectroscopia UV-vis de las LNPs

Se observó un inicio de absorbancia a aproximadamente $\lambda = 800$ nm. En general, los espectros UV-vis de las LNPs de YAG: Ce³⁺ no presentaron picos excitónicos claramente definidos, las cuales pueden asociarse con la dispersión relativa. Por otro lado, los grupos funcionales en la superficie de estas LNPs no presentan transiciones electrónicas de 200 nm a 800 nm (Ramanery *et al.*, 2016). El espectro UV-Vis del Ch puro es complejo y aparece como una banda de absorción continua, esto debido a la superposición de transiciones rotacionales y vibratorias en las transiciones electrónicas dando como resultado final una combinación de líneas superpuestas. Se presentó la absorción característica de quitosano por debajo de 220 nm, la cual revela su presencia. Un pequeño pico observado en el rango de 320-340 nm es atribuido a las oxidaciones independientes del quitosano (Kumirska *et al.*, 2010). El material YAG: Ce³⁺/Ch mostró los mismos picos correspondientes a dicha oxidación. En estas condiciones, el espectro de la solución de ácido fólico mostró tres bandas bien definidas de máxima absorción, en longitudes de onda correspondientes a 255.5, 283.0 y 365.5 nm. Los espectros UV mostraron que el ácido fólico tiene una absorción fuerte alrededor de 283

nm para las transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ del anillo de pterina a pH 7.4, se puede observar que no se presentó ninguna banda nueva, pudiendo ser atribuida a la alteración del estado complejo en la transición $\pi\text{-}\pi^*$ del sistema π conjugado, por lo que la capacidad de aceptación de protones aumenta (Hammud *et al.*, 2013). Los mismos picos correspondientes al ácido fólico, en específico los correspondientes a 283.0 y 365.5 fueron observados en la muestra de YAG: Ce^{3+} /Ch-FA, por lo tanto, podemos concluir que el material fue funcionalizado.

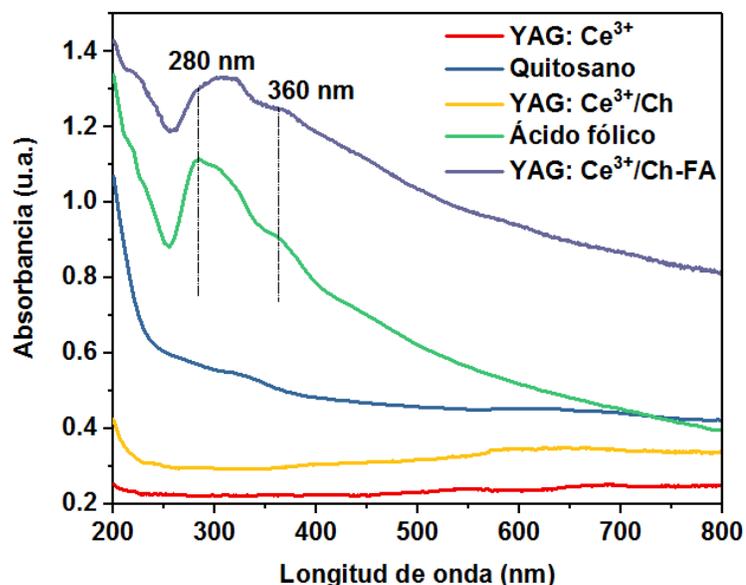


Fig. 30 Espectros Uv-vis de las diferentes LNPs y compuestos químicos. a) YAG: Ce^{3+} y b) Quitosano c) YAG: Ce^{3+} /Ch d) ácido fólico e) YAG: Ce^{3+} /Ch-FA.

3.3.7 Estabilidad de las LNPs en medio acuoso caracterizadas por Potencial Zeta

El valor promedio del potencial Zeta de las LNPs de YAG: Ce^{3+} fue de -23.5, las cuales son eléctricamente estables en medio acuoso. En contraste, las LNPs de YAG: Ce^{3+} /Ch presentaron un valor promedio de potencial Zeta menor de -19.0, ocasionando floculaciones y estabilidad física empobrecida. Las LNPs de YAG: Ce^{3+} /Ch-FA presentaron un potencial Zeta de -24.5. Las fuerzas de repulsión excedieron las fuerzas atractivas, resultando en un sistema estable monodisperso (Greenwood *et al.*, 2003). Se puede concluir que el potencial Zeta estuvo fuertemente influenciado por las impurezas de las nanopartículas luminiscentes, tamaño de nanopartícula, el medio estudiado, y el pH. Cuando las nanopartículas luminiscentes se dispersan en agua, el potencial zeta depende estrechamente de las fuerzas de repulsión

altas de la especie molecular y de la condición de la superficie. El alto potencial negativo de las LNPs YAG: Ce³⁺/Ch-FA sugiere una óptima estabilidad coloidal en solución acuosa.

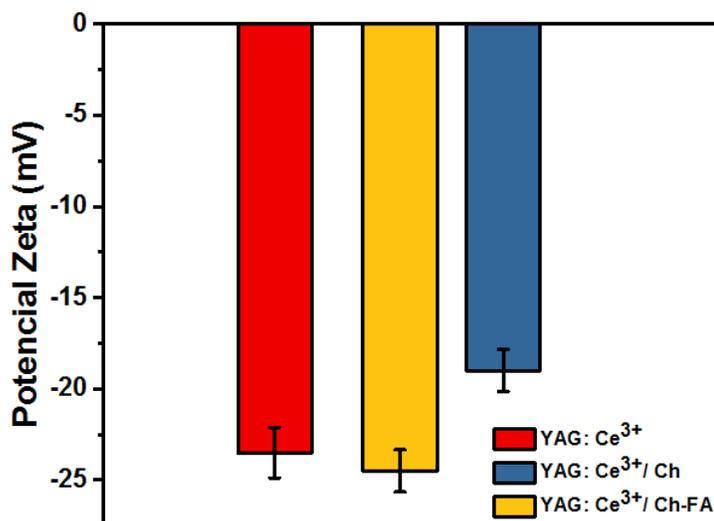


Fig. 31 Potencial Zeta de las diferentes LNPs sintetizadas. a) YAG: Ce³⁺ b) YAG: Ce³⁺/Ch c) YAG: Ce³⁺/Ch-FA.

3.3.8 Reporte de dispersión de luz dinámica y tamaño de partícula

Se analizó el tamaño de partícula y la distribución del radio hidrodinámico en volumen derivado de los perfiles de intensidad para los diferentes tipos de LNPs (YAG: Ce³⁺, YAG: Ce³⁺/Ch, YAG: Ce³⁺/Ch-FA). El análisis demostró que la distribución del volumen no es lo suficientemente sensible como para detectar una cantidad escasa de agregados. Sin embargo, los picos de múltiples ejecuciones no coinciden entre sí, lo que indica que esencialmente es un reflejo de muestra heterogénea. Se observó que las LNPs tienden a precipitarse muy rápidamente, sugiriendo la presencia de especies de alto peso molecular. La dispersión excesiva también enmascara la luz dispersada de baja intensidad de partículas más pequeñas. Así mismo, pueden aparecer picos de intensidad en tamaños más pequeños (0-10 nm) debido a la difusión rotacional de partículas (Stetefeld *et al.*, 2016). En comparación con el análisis realizado por TEM, las nanopartículas mostraron tener un mayor tamaño. Esto debido a la posible opsonización o adsorción de iones en la capa difusa de la nanopartícula.

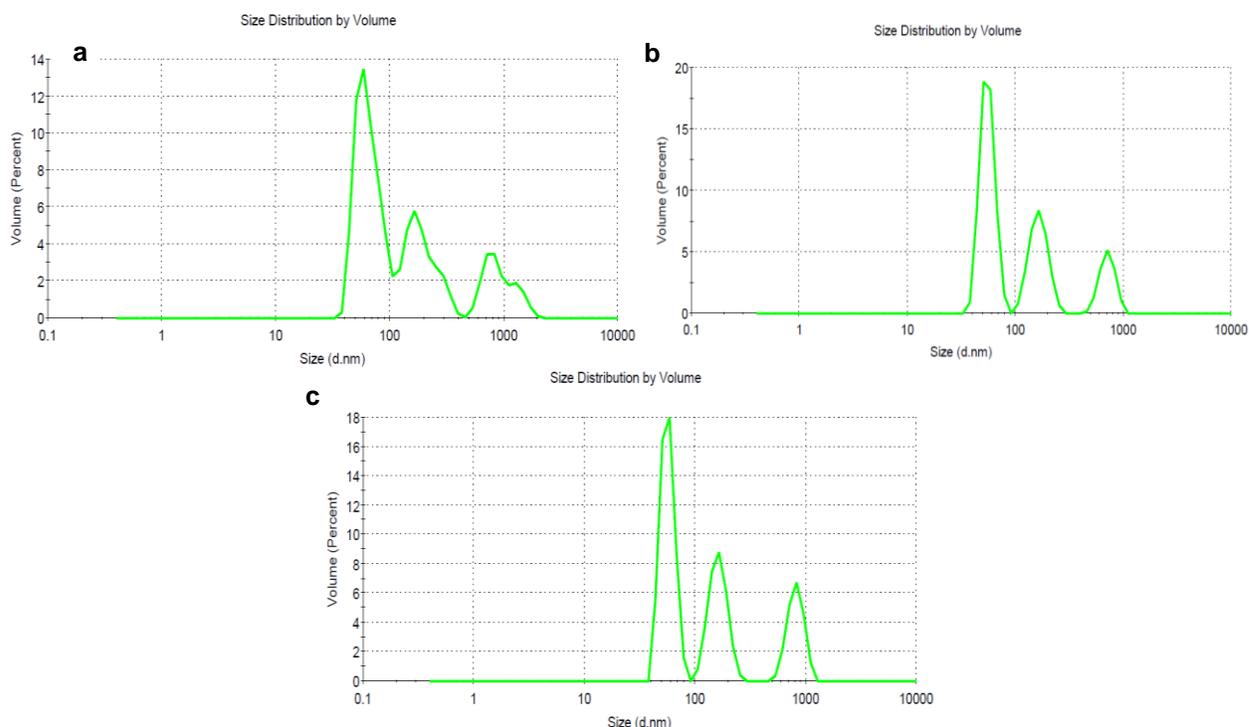


Fig. 32 Espectros del tamaño de distribución del volumen. a) YAG: Ce³⁺ b) YAG: Ce³⁺/Ch c) YAG:Ce³⁺/Ch-FA

Tabla 4. Evaluación de porcentajes dispersión de luz dinámica.

3.4	Nanopartículas	DLS	% Volumen	D. S
	YAG: Ce ³⁺	55.41 ± 8.5	55.1	38.95
	YAG: Ce ³⁺ /Ch	56.7 ± 8.3	50.1	11.75
	YAG: Ce ³⁺ /Ch-FA	64.84 ± 15.7	52.6	7.23

Caracterización *in vitro*

3.4.1 Ensayo de viabilidad celular

La citotoxicidad de las LNPs en células se debe a factores tales como la naturaleza química de la superficie del material, su composición química y estabilidad coloidal en un medio en específico. El efecto citotóxico de las LNPs (YAG: Ce³⁺, YAG: Ce³⁺/Ch, YAG: Ce³⁺/Ch-FA) en la actividad mitocondrial celular aumentó en relación con el aumento de la concentración de los nanocrisales. Se reportó que las LNPs de YAG: Ce³⁺; tanto para las líneas celulares 293T y MDA-MB-231, a 24 y 48 h de la incubación a concentraciones altas de 100 µg/mL; las células sobrevivieron a más del 90%. En comparación con las células T47-D, las cuales a una concentración de 100 µg/mL de YAG: Ce³⁺ (48 h), mostraron una viabilidad superior al 80%. Al

administrar las LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch y YAG: Ce³⁺/Ch-FA en las líneas celulares 293T y MDA-MB-231 (24 h), mostraron grado de citotoxicidad por encima de 12.5 µg/mL, siendo el porcentaje de células viables limitado en un 25%. Los resultados del ensayo MTT para estos dos tipos de LNPs, mostraron una disminución dependiente de la concentración en la actividad mitocondrial para las células incubadas durante 24 h.

La incubación a 48 h con LNPs conjugadas y funcionalizadas en células 293T, MDA-MB-231 y T47-D, aumentó la viabilidad celular al 15%. Este resultado concuerda muy bien con las propiedades reportadas del quitosano (Gao *et al.*, 2012). Se ha demostrado que al analizar la citotoxicidad del quitosano nativo a 24, 48 y 72 h, las células estudiadas proliferaron de modo gradual, obteniendo una viabilidad celular mayor al 95% a las 72 h, en comparación con el bajo porcentaje de viabilidad celular de 85% observado a las 24 h (Mitra *et al.*, 2013).

Existieron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de LNPs con la línea celular T47-D (24 y 48 h). Se sugiere que la disminución de la viabilidad celular (40%, 25 µg/ml) se debió a una mejor internalización de las nanopartículas funcionalizadas. Adicionalmente, se sugiere que factores como área superficial, el tamaño y la forma, afectan en gran medida la citotoxicidad de las LNPs. De cualquier modo, al realizar modificaciones químicas en la estructura del quitosano, estas pueden influenciar significativamente al perfil citotóxico (Lewandowska *et al.*, 2014). Por lo tanto, la citotoxicidad de las nanopartículas conjugadas y funcionalizadas deben ser analizadas de modo particular. Se reportó que las LNPs conjugadas poseen cargas positivas en su estructura (52-55 mV), siendo este responsable de su actividad citotóxica debido a su adsorción en la membrana celular cargada negativamente, seguido de un proceso de estabilización gradual de cargas entre ellas. Se sabe que los grupos amino, así como los grupos carboxílicos en altas concentraciones, no son favorables para la proliferación celular (Qi *et al.*, 2013). Por otro lado, se sugiere considerar el grado de desacetilación y la variación de pesos moleculares ya que son dos factores determinantes en los efectos del quitosano en el crecimiento celular.

Finalmente, se comprobó que distintos tipos de líneas celulares se comportan de manera muy particular con las diferentes LNPs sintetizadas, principalmente LNPs embebidas con quitosano debido a la diferencia en los grados de desacetilación ocasionados durante las diferentes etapas de síntesis. Como resultado se sugiere su potencial aplicación como bioetiquetadores para células tumorales, ya que puede ser eliminado por diversas enzimas como lisosomas y glucosamidasa. (Gao *et al.*, 2012).

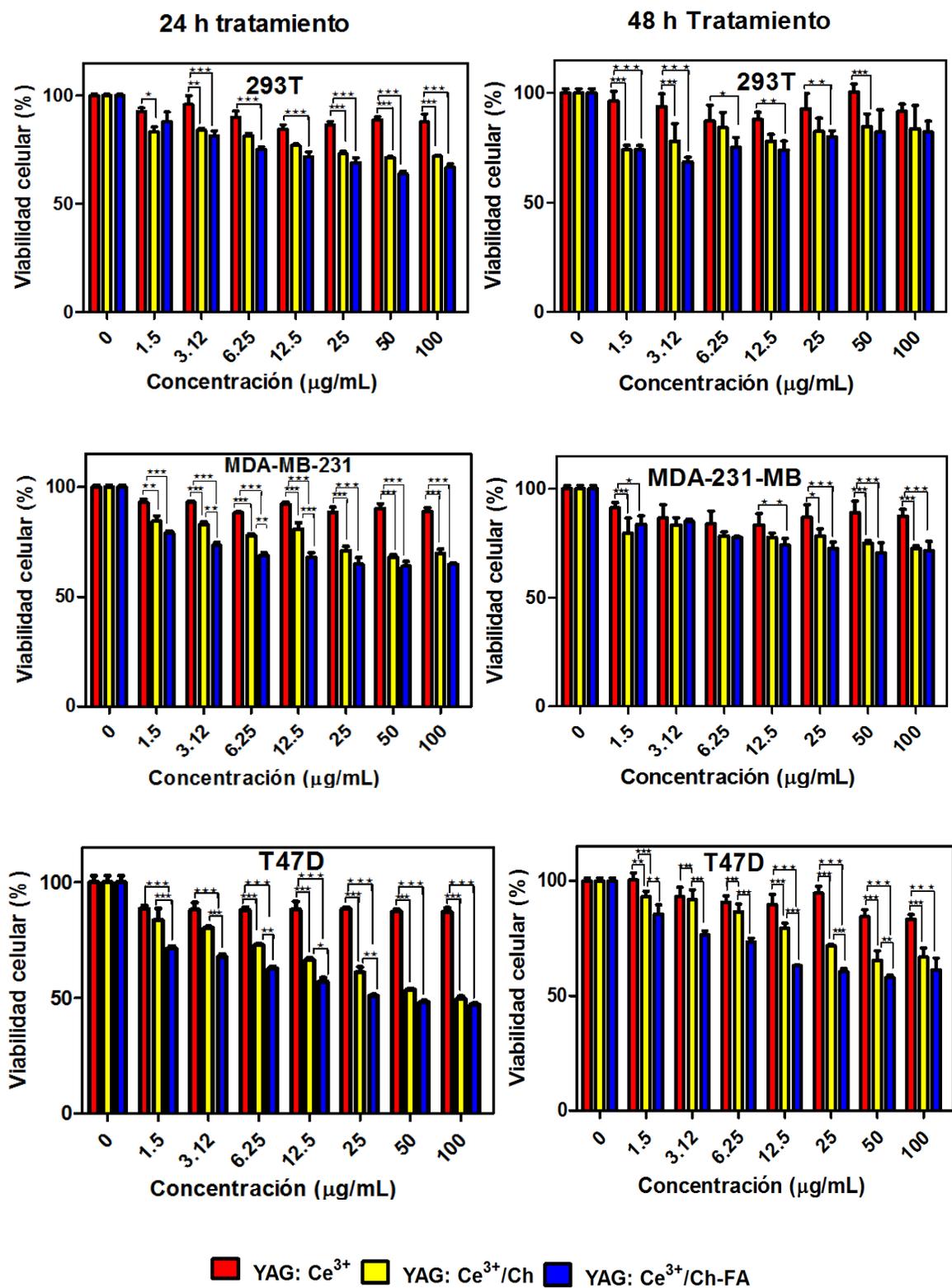


Fig. 33 Efecto de la viabilidad celular de las NPs de YAG: Ce³⁺, YAG: Ce³⁺/Ch, YAG: Ce³⁺/Ch-FA. Los resultados se expresan como la media ± SEM * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; y **** P < 0.0001 obtenido usando ANOVA de 2 vías con una prueba posterior de Tukey.

3.4.2 Internalización de las LNPs caracterizadas por microscopía confocal

Las LNPs de YAG: Ce³⁺ fueron localizadas en un mayor porcentaje en la membrana celular. Sin embargo, para los casos de YAG: Ce³⁺/Ch y YAG: Ce³⁺/Ch-FA, se encontraron localizadas en un mayor porcentaje (75%) en el citoplasma. Por otro lado, las LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch-FA mostraron una captación más alta que las de YAG: Ce³⁺/Ch. Las células T47-D internalizaron mayor cantidad de LNPs de YAG: Ce³⁺/Ch-FA (~90%), en comparación con las células MDA-MB-231 (~80%). Esto se atribuye a la cantidad sobreexpresada de receptores de folato en células T47-D, en consecuencia, a la endocitosis mediada por receptores folato (Fig.36). Adicionalmente, se observó la formación de vesículas de diferentes tamaños en el interior de las diferentes células estudiadas. La formación de vesículas de gran tamaño se debe probablemente a que las LNPs se encontraban aglomeradas (Fig. 34).

Los resultados fueron consistentes a los antes descritos en los ensayos de viabilidad celular, indicando: (1) formación de agregados de endosomas con gran cantidad de LNPs, (2) las LNPs dentro de las vesículas formadas no se unieron al núcleo celular, permaneciendo en la región citoplasmática, y (3) la integridad de la membrana celular no se mostró comprometida a una concentración de 25 µg/mL durante 6 h. Se concluye que la captación celular del sistema presentado puede mejorarse utilizando ácido fólico como ligando de direccionamiento.

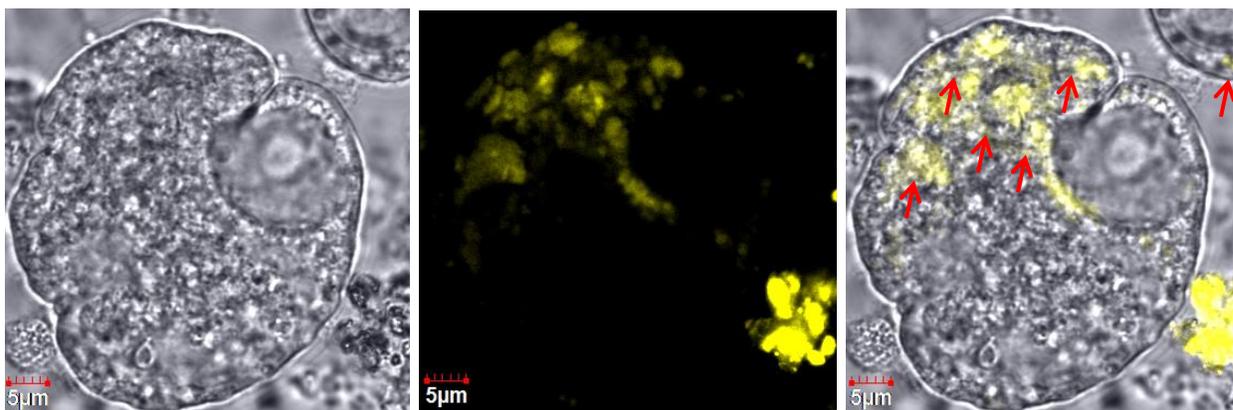


Fig. 34 Formación de endosomas o vesículas en el interior celular. Campo claro, campo oscuro e imágenes superpuestas (5 µm) de células MDA-MB-231 tratadas con YAG: Ce³⁺/Ch-FA (25 µg/ml) a 6 h. Las imágenes son falsas coloreadas donde se indica la formación de vesículas con flechas rojas.

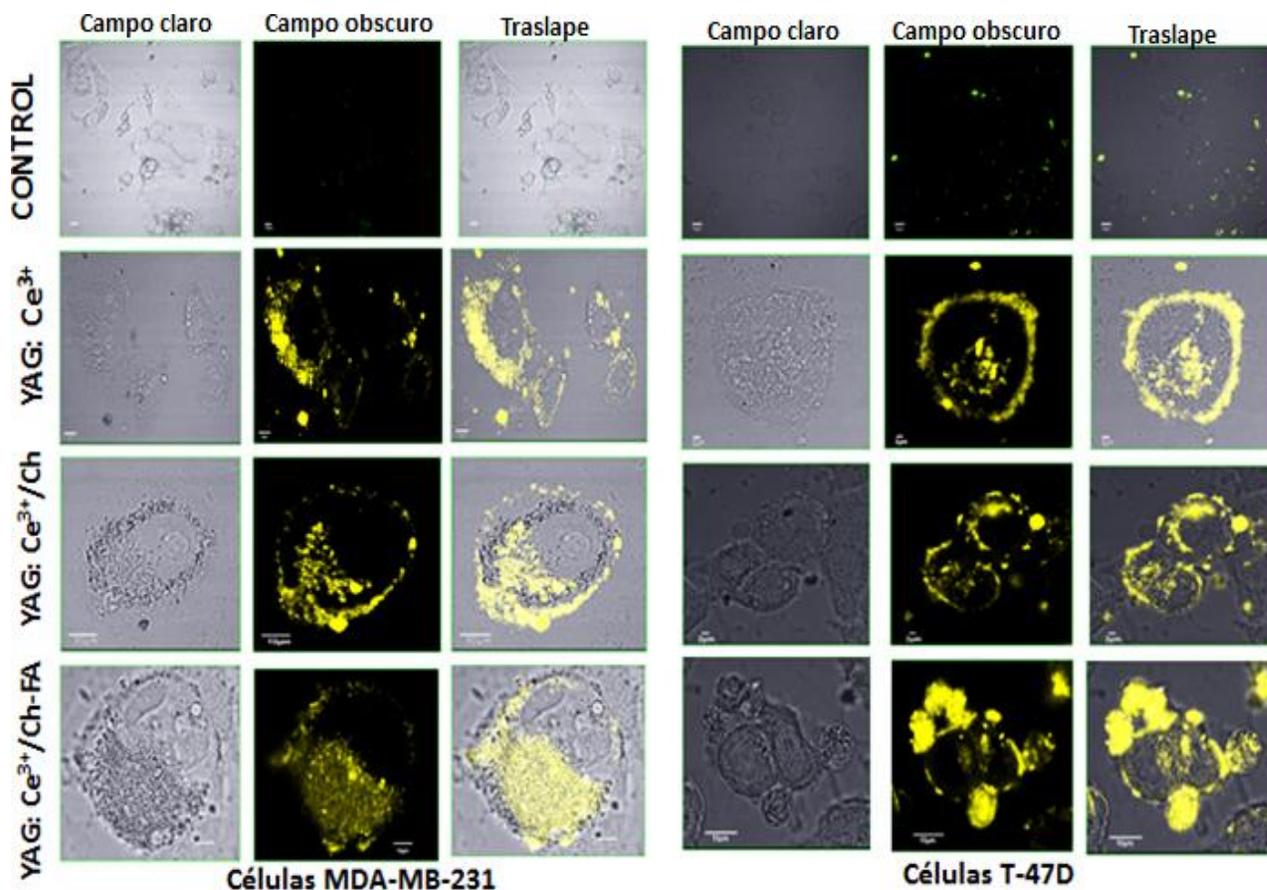


Fig. 35 Captación de las LNPs. Campo claro, campo oscuro e imágenes superpuestas (5 μm) de células MDA-MB-231 y T47-D tratadas con YAG: Ce^{3+} , YAG: Ce^{3+}/Ch y YAG: $\text{Ce}^{3+}/\text{Ch-FA}$ (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 6 h. Las imágenes son falsas coloreadas, mostrando la internalización de las LNPs.

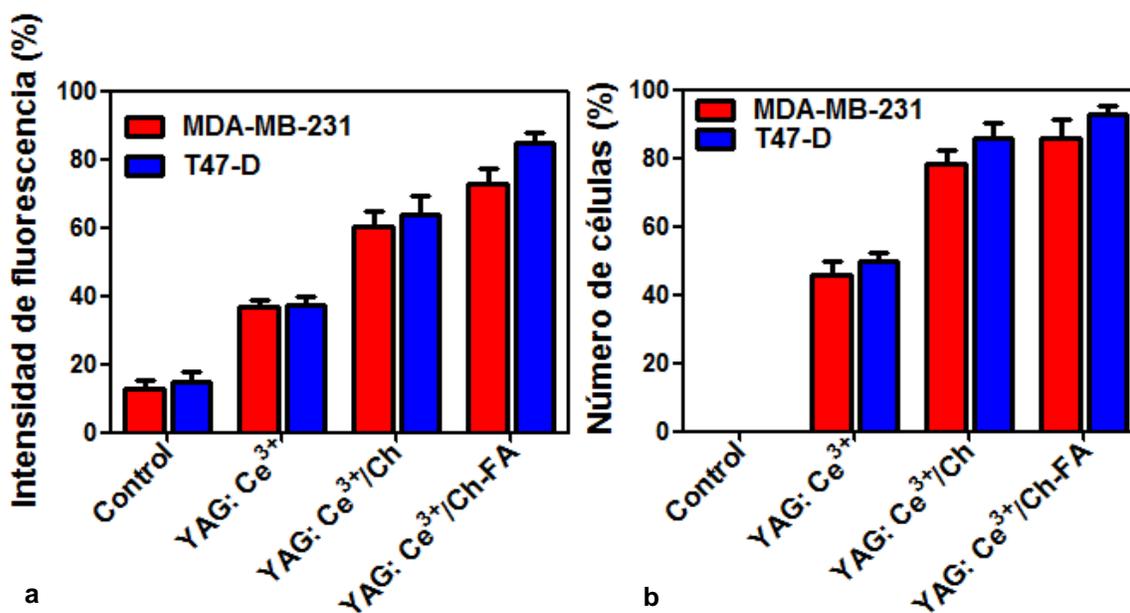


Fig. 36 a) Comparación del porcentaje de la señal de intensidad de las diferentes NPs en líneas celulares cancerosas, b) Cantidad de NPs internalizadas en líneas celulares MDA-MB-231 y T47-D celular células.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo, se estudiaron las propiedades luminiscentes y fisicoquímicas de las LNPs de YAG: Ce³⁺ funcionalizadas con ácido fólico para ser implementadas como bioetiquetadores de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y T47-D. Se encontró que el rendimiento cuántico de las LNPs de YAG:Ce³⁺ sintetizadas por el método de sol gel fue del 35%. Adicionalmente, con respecto a las propiedades luminiscentes, se encontró que hay una disminución de más, del 15% en la intensidad de luminiscencia cuando las LNPs son conjugadas con quitosano, sin embargo, la intensidad luminiscente fue lo suficientemente alta para estudiar su internalización en células tumorales. Los ensayos de citotoxicidad en las diferentes líneas celulares estudiadas mostraron que las LNPs YAG: Ce³⁺ funcionalizadas con ácido fólico pueden ser citotóxicas dependiendo de la captación mediada por receptores folato. Finalmente, los estudios de internalización de las LNPs visualizados por microscopia confocal, demostraron que pueden ser utilizados como bioetiquetadores al ser detectados por su luminiscencia. Adicionalmente se observó que las LNPs pueden ser endocitadas y localizarse en vesículas en la región citoplasmática de la célula. Algunos puntos que resaltan en la presente investigación son los siguientes:

- Se sintetizaron nanopartículas luminiscentes de YAG: Ce³⁺ por el método de sol-gel, las cuales pueden ser excitadas con luz azul (450 nm) y emitir en amarillo (540 nm).
- Se determinó que la concentración óptima del ion dopante es de 2%. Ya que otras variaciones en los porcentajes de dopaje presentaron poca o nula intensidad en la emisión.
- El tamaño de partícula obtenido de YAG: Ce³⁺ fue de 50 nm aproximadamente.
- Se logró embeber las LNPs de YAG: Ce³⁺ con quitosano obteniendo una eficiencia cuántica de 30%, las cuales fueron posteriormente funcionalizadas con ácido fólico.
- Con el fin de verificar su morfología cristalina y polimérica de los conjugados, las LNPs fueron caracterizadas mediante las microscopías TEM, SEM, AFM. Así mismo se determinó la composición química y estabilidad de las LNPs mediante EDS, UV vis, XRD y potencial Zeta.
- Se determinó el efecto citotóxico de las LNPs desnudas, conjugadas y funcionalizadas en diferentes líneas celulares de cáncer de mama y se compararon resultados con línea celular normal de riñón embrionario.
- Se comprobó una mejor captación celular al funcionalizar las LNPs y administrarlas a células con mayor contenido de receptores folatos.

Literatura citada

- Agnese D. M. (2005). Advances in breast imaging. *Surgical Technology International*, 14:51-56.
- Aljebory, A. M., & Alsalman, T. M. (2017). Chitosan Nanoparticles. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 3(7)10
- Alvarenga, E. S. (2011). Characterization and properties of chitosan. In *Biotechnology of biopolymers*. InTech.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3(2), 203-230.
- Bachmann, V., Ronda, C., & Meijerink, A. (2009). Temperature Quenching of Yellow Ce³⁺ Luminescence in YAG:Ce. *Chemistry of Materials*, 21(10), 2077–2084. <https://doi.org/10.1021/cm8030768>.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>.
- Blasse, G., & Bril, A. (1967). A New phosphor for flying-spot cathode-ray tubes for color television: yellow-emitting Y₃Al₅O₁₂-Ce³⁺. *Applied Physics Letters*, 11(2), 53–55. <https://doi.org/10.1063/1.1755025>.
- Brennan, M. E., Houssami, N., Lord, S., Macaskill, P., Irwig, L., Dixon, J. M., Ciatto, S. (2009). Magnetic Resonance Imaging Screening of the Contralateral Breast in Women With Newly Diagnosed Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis of Incremental Cancer Detection and Impact on Surgical Management. *Journal of Clinical Oncology*, 27(33), 5640–5649. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.5756>.
- Cárdenas, G., Anaya, P., Del Rio, R., Schrebler, R., von Plessing, C., & Schneider, M., (2010). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(3), 352–354. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072010000300017>.
- Chen, G., Yang, C., & Prasad, P. N. (2013). Nanophotonics and Nanochemistry: Controlling the Excitation Dynamics for Frequency Up- and Down-Conversion in Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 46(7), 1474–1486. <https://doi.org/10.1021/ar300270y>.
- Cui, W., Lu, X., Cui, K., Wu, J., Wei, Y., & Lu, Q. (2011). Fluorescent Nanoparticles of Chitosan Complex for Real-Time Monitoring Drug Release. *Langmuir*, 27(13), 8384–8390. <https://doi.org/10.1021/la200552k>.
- Dexter, D. L. & J. H. Schulman. (1954). Theory of concentration quenching in inorganic phosphors, *J. Chem. Phys.*, 22 (6), 1063.
- Dehdashti, F., Mortimer, J. E., Trinkaus, K., Naughton, M. J., Ellis, M., Katzenellenbogen, J. A., Siegel, B. A. (2009). PET-based estradiol challenge as a predictive biomarker of response to endocrine therapy in women with estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(3), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9953-0>.

- Del Rosario, G., Ohara, S., Mancic, L., & Milosevic, O. (2004). Characterisation of YAG:Ce powders thermal treated at different temperatures. *Applied Surface Science*, 238(1–4), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.05.253>.
- Dennis, G., Harrison, W., Agnes, K., & Erastus, G. (2016). Effect of Biological Control Antagonists Adsorbed on Chitosan Immobilized Silica Nanocomposite on *Ralstonia solanacearum* and Growth of Tomato Seedlings. *Advances in Research*, 6(3), 1–23. <https://doi.org/10.9734/AIR/2016/22742>.
- Dobrzycki, L., Bulska, E., Pawlak, D. A., Frukacz, Z., & Woźniak, K. (2004). Structure of YAG crystals doped/substituted with erbium and ytterbium. *Inorganic chemistry*, 43(24), 7656–7664.
- Fadlalla, H. M. H., Tang, C. C., Elssfah, E. M., Zhang, J., Ammar, E., Lin, J., & Ding, X. X. (2008). Synthesis and characterization of photoluminescent cerium-doped yttrium aluminum garnet. *Materials Research Bulletin*, 43, 3457–3462. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2008.01.024>.
- Ferlay J., Colombert M., Soerjomataram I. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).
- Gao, W., Lai, J. C. K., & Leung, S. W. (2012). Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Frontiers in Physiology*, 3(1). <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00321>.
- George, N. C., Pell, A. J., Dantelle, G., Page, K., Llobet, A., Balasubramanian, M. (2013). Local Environments of Dilute Activator Ions in the Solid-State Lighting Phosphor $Y_{3-x}Ce_x Al_5 O_{12}$. *Chemistry of Materials*, 25(20), 3979–3995. <https://doi.org/10.1021/cm401598n>.
- Greenwood, R. (2003). Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 106(1-3), 55-81.
- Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.654121>.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer, Hormone Research Institute. *Cell*, Vol. 100, 57-70.
- Hammud, K. K., Mohammed, J. M., Radif, M. M., Raouf, A. L. M., Mahmood, S. S., Neama, Abbas, S. J. (2013). Thermodynamic parameters for phenanthrene interaction with a biological π - acceptor (folic acid) by spectroscopic measurements, 5.
- Hammud, K. K. A., Neama, R. R., Latif, A. G. A. A., & Rahman, M. Z., (2010). Spectroscopic study of a typical polyaromatic hydrocarbon (naphthalene) and a biological π acceptor (Folic acid) complex. *Diyala Journal For Pure Science*, 6(1), 71-78. Recuperado en marzo de 2018 de: <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=30005>

- He, X., Liu, X., Li, R., Yang, B., Yu, K., Zeng, M., & Yu, R. (2016). Effects of local structure of Ce^{3+} ions on luminescent properties of $Y_3Al_5O_{12}:Ce$ nanoparticles. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep22238>.
- Houssami, N. (2017). Overdiagnosis of breast cancer in population screening: does it make breast screening worthless? *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 1–8. <http://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0050>
- INEGI. (2014). Estadísticas de mortalidad. Base de datos CONAPO. *Proyecciones de la población 2010-2050*, 1(14).
- Jain, A., Fournier, P. G. J., Mendoza-Lavaniegos, V., Sengar, P., Guerra-Olvera, F. M., Iñiguez, E., Juárez, P. (2018). Functionalized rare earth-doped nanoparticles for breast cancer nanodiagnostic using fluorescence and CT imaging. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0359-9>.
- Jang, H. S., & Jeon, D. Y. (2007). Yellow-emitting $Sr_3SiO_5:Ce^{3+},Li^+$ phosphor for white-light-emitting diodes and yellow-light-emitting diodes. *Applied Physics Letters*, 90(4), 041906. <https://doi.org/10.1063/1.2432947>.
- Kang, T., Park, C., Choi, J.-S., Cui, J.-H., & Lee, B.-J. (2016). Effects of shear stress on the cellular distribution of polystyrene nanoparticles in a biomimetic microfluidic system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 31, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.12.001>.
- Keppens, A., Zong, Y., Podobedov, V. B., Nadal, M. E., Hanselaer, P., & Ohno, Y. (2011). Fluorescence errors in integrating sphere measurements of remote phosphor type LED light sources. *Optical Measurement Systems for Industrial Inspection VII*, 808241. <https://doi.org/10.1117/12.889382>
- Kiilll, C. P., Barud, H. da S., Santagneli, S. H., Ribeiro, S. J. L., Silva, A. M., Tercjak, A., Gremião, M. P. D. (2017). Synthesis and factorial design applied to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1695–1702. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.053>.
- Kim, H., Jo, A., Baek, S., Lim, D., Park, S.-Y., Cho, S. K., Yoon, J. (2017). Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid-conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep41090>.
- Kollias, J., Sibbering, D. ., Blamey, R. ., Holland, P. A. ., Obuszko, Z., Wilson, A. R. ., Elston, C. (1998). Screening women aged less than 50 years with a family history of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 34(6), 878–883. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00365-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00365-1).
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>.
- Lawrence, W. F., Liang, W., Mandelblatt, J. S., Gold, K. F., Freedman, M., Ascher, S. M., Chang, P. (1998). Serendipity in Diagnostic Imaging: Magnetic Resonance Imaging of the Breast. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(23), 1792–1800. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.23.1792>.
- Lewandowska, K., Sionkowska, A., Kaczmarek, B., & Furtos, G. (2014). Mechanical and Morphological Studies of Chitosan/Clay Composites. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 590(1), 193–198. <https://doi.org/10.1080/15421406.2013.874718>.

- Lukashev, M., LePage, D., Wilson, C., Bailly, V., Garber, E., Lukashin, A., Browning, J. L. (2006). Targeting the Lymphotoxin- β Receptor with Agonist Antibodies as a Potential Cancer Therapy. *Cancer Research*, 66(19), 9617–9624. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0217>.
- Mitra, T., Sailakshmi, G., Gnanamani, A., & Mandal, A. B. (2013). Studies on Cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. *Materials Research*, 16(4), 755–765. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392013005000059>.
- Moreno, J. A. S., Mendes, A. C., Stephansen, K., Engwer, C., Goycoolea, F. M., Boisen, A., Chronakis, I. S. (2018). Development of electrospayed mucoadhesive chitosan microparticles. *Carbohydrate Polymers*, 190, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.062>.
- Nagarajan, R., & Hatton, T. A. (2008). Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization (Vol. 996). *Washington, DC: American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/bk-2008-0996>.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., & Acosta, N. (2003). Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 511–520. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300019>.
- Qi, L.-F., Xu, Z.-R., Li, Y., Jiang, X., & Han, X.-Y. (2013). In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells, *World Journal Gastroenterol*, 2005, 11(33), 5136-5141.
- Ramanery, F. P., Mansur, A. A. P., Mansur, H. S., Carvalho, S. M., & Fonseca, M. C. (2016). Biocompatible Fluorescent Core-Shell Nanoconjugates Based on Chitosan/Bi2S3 Quantum Dots. *Nanoscale Research Letters*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1417-6>.
- Raouf, A. L. M., & Mahdi, J. (2014). Qualitative and Quantitative Determination of Folic acid in Tablets by FTIR Spectroscopy, *IJAPBC*, 3, 8.
- Rodríguez-Vilchis, L. E., Contreras-Bulnes, R., Olea-Mejía, O. F., Sánchez-Flores, I., & Centeno-Pedraza, C. (2011). Morphological and Structural Changes on Human Dental Enamel After Er:YAG Laser Irradiation: AFM, SEM, and EDS Evaluation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29(7), 493–500. <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2925>.
- Ruozi, B., Belletti, D., Vandelli, M. A., Tonelli, M., Zapparoli, M., Pederzoli, F., & Tosi, G. (2014). AFM/TEM complementary structural analysis of surface-functionalized nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 4, 1-7.
- Shen, J.-M., Xu, L., Lu, Y., Cao, H.-M., Xu, Z.-G., Chen, T., & Zhang, H.-X. (2012). Chitosan-based luminescent/magnetic hybrid nanogels for insulin delivery, cell imaging, and antidiabetic research of dietary supplements. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(2), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.059>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2018), Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
- Song, H., Su, C., Cui, W., Zhu, B., Liu, L., Chen, Z., & Zhao, L. (2013). Folic Acid-Chitosan Conjugated Nanoparticles for Improving Tumor-Targeted Drug Delivery. *BioMed Research International*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/723158>.

- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- Struszczyk, H., Pośpieszny, H., & Gamzazade, A. (2002). Chitin and chitosan. *Polish-Russian monograph*, 1(2).
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., & Kawashima, Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 39–54. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00120-4).
- Tee, Y. H., & Bhattacharyya, D. (2005). Nanoparticles embedded membrane reactor for the reductive degradation of chlorinated organics: TCE and PCB studies. In *AIChE Annual Meeting*. OH, USA: Cincinnati.
- Tokumitsu, H., Hideki Ichikawa, & Yoshinobu Fukumori. (1999). Chitosan- gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharmaceutical Research*, Vol. 16(No.12).
- Tsuruoka, N., Sasagawa, T., Yodo, T., Yoshimoto, M., Odawara, O., & Wada, H. (2016). Facile preparation of YAG:Ce nanoparticles by laser irradiation in water and their optical properties. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1958-2>.
- Van Leeuwen, F. W., Hardwick, J. C., & 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>
- Vlasova, M., Márquez-Aguilar, P. A., Kakazey, M., Escobar-Martinez, A., & Guardian-Tapia, R. (2015). SEM-EDS Investigation of YAG Ceramic Surface After Laser Modification. *Journal of Advanced Microscopy Research*, 10(4), 303–313. <https://doi.org/10.1166/jamr.2015.1280>.
- Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90027-R).
- Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 26. <https://doi.org/10.3390/nano6020026>.
- World Health Organization. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; (2018). http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/
- Wu, Y., Wang, Y., Chen, H., Ge, S., Zhang, J., Mao, C., Shen, J. (2016). Preparation and Biocompatibility of Gold@Polypyrrole-Chitosan with Core-Shell Nanostructure. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(3), 2343–2349. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10955>.
- Xhaxhiu, K., & Adam, V. (2015). Particle size distribution analyses. Conference: Laboratory of Metallomics and Nanotechnologies, At Mendel University in Brno, LMaN, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic
- Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., & O'Regan, R. M. (2006). Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 7(8), 657–667. [doi:10.1016/s1470-2045\(06\)70793-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(06)70793-8).