



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL TIPO DE AMINOÁCIDO EN LA PERMEACIÓN CELULAR DE  
PARTÍCULAS DE MAGNETITA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGICA**

**PRESENTA**

**CLAUDIA GONZÁLEZ VEGA**

**Ciudad Universitaria, CDMX. 2017.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JESUS GRACIA MORA  
**VOCAL:** JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON  
**SECRETARIO:** VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS  
**1er. SUPLENTE:** LUIS GUILLERMO MORENO ALCANTAR  
**2° SUPLENTE:** MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

ESTA TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 100 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR EN LA UNIDAD DE POSGRADO, EDIFICIO B, LABORATORIO 001 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EN EL EDIFICIO F-1, EN LAS INSTALACIONES DE LA UNIPREC UBICADA EN EL BIOTERIO DEL EDIFICIO E, TODAS LAS INSTALACIONES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. JESUS GRACIA MORA

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Dra. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

## **SUSTENTANTE (S):**

---

CLAUDIA GONZÁLEZ VEGA

## INDÍCE GENERAL

1.- Resumen.....	10
2.- Introducción.....	11
3.-Antecedentes.....	13
3.1.- Sistemas de liberación modificada.....	13
3.2.- Nanociencia y nanotecnología.....	13
3.3.- Características de los materiales magnéticos.....	14
3.3.1.- Clasificación.....	14
3.3.2.- Nanopartículas magnéticas.....	15
3.3.3.- Magnetita.....	16
3.3.3.1.- Métodos de síntesis.....	18
3.3.3.2.- Aplicaciones de magnetita.....	19
3.3.3.3.- Funcionalización superficial y estabilización de la magnetita.....	20
3.3.3.4.- Toxicidad.....	22
3.4.- Aminoácidos.....	25
3.4.1.- Características de los aminoácidos utilizados en la funcionalización de magnetita.....	27
3.4.2.- Aplicación de los aminoácidos en la nanotecnología.....	28
3.5.- Ensayos <i>in vitro</i> en células utilizando magnetita funcionalizada con aminoácidos.....	29
3.6.- Magnetita recubierta con aminoácidos.....	30
3.7.- Magnetita recubierta utilizada en la eficiencia celular.....	32
4.- Planteamiento del problema.....	34
5.- Objetivos.....	35
5.1.- Objetivo particular.....	35
5.2.- Objetivos particulares.....	35

6.- Hipótesis.....	35
7.- Desarrollo experimental.....	36
7.1.- Materiales.....	36
7.2.- Metodología.....	36
7.2.1.- Elaboración de magnetita hidrofílica.....	36
7.2.2.- Síntesis de magnetita con aminoácidos.....	37
7.2.3.- Síntesis de magnetita con aminoácidos y fluoresceína.....	37
7.2.4.- Caracterización.....	39
7.2.4.1.- Espectroscopía de infrarrojo.....	39
7.2.4.2.- Potencial Z.....	39
7.2.4.3.- Difracción de rayos X de polvos.....	39
7.2.4.4.- Microscopía electrónica de transmisión.....	39
7.2.5.- Ensayo <i>in vitro</i> .....	40
7.2.5.1.- Materiales para el ensayo <i>in vitro</i> .....	40
7.2.6.- Proliferación celular.....	40
7.2.6.1.- Conteo de células.....	40
7.2.7.- Realización de ensayo <i>in vitro</i> con los lotes de la magnetita-aminoácido-fluoresceína.....	42
8.- Resultados y discusión.....	45
8.1.- Síntesis y caracterización de magnetita y magnetita con aminoácidos.....	45
8.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	47
8.3.- Potencial Z de la magnetita modificada superficialmente con aminoácidos..	50
8.4.- Calorimetría diferencial de barrido.....	52
8.5.- Difracción de rayos X de polvos.....	56
8.6.- Tamaño de partícula.....	57

8.7.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	60
8.8.- Síntesis y caracterización de magnetita con aminoácidos y fluoresceína....	65
8.9.- Espectroscopía de infrarrojo de la magnetita recubierta con aminoácidos y fluoresceína.....	65
8.10.- Potencial Z de la magnetita modificada superficialmente con aminoácidos y marcados con fluoresceína.....	68
8.11.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	68
8.12.- Ensayo <i>in vitro</i> de células HeLa y células NCT clone 929 en contacto con magnetita modificada superficialmente con aminoácidos y fluoresceína.....	70
9.- Conclusiones.....	91
10.- Perspectivas.....	92
11.- Referencias.....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la magnetita de espinela en donde A y B son los iones metálicos y los círculos grandes son la coordinación del oxígeno.....	17
Figura 2. Las dos formas estructurales de la magnetita Fe <sup>3+</sup> tetraédrica y Fe <sup>2+</sup> octaédrico.....	17
Figura 3. Representación de la magnetita y sus posibles mecanismos de adsorción en donde Me <sup>+</sup> es cualquier adsorbente.....	21
Figura 4. Diferentes tipos de recubrimiento de nanopartículas magnéticas a)Nanopartícula desnuda, b) PEG, c) Vector plásmidico para la liberación génica, d)Polímeros, e)Anticuerpos para aplicación específica.....	22
Figura 5. Sitios donde principalmente viajan las nanopartículas después de una inyección intravenosa.....	24
Figura 6. Degradación de las nanopartículas en medio de cultivo lisosomal.....	25
Figura 7. Fotografía tomada en el microscopio de células HeLa antes del estudio.....	29
Figura 8. Fotografía tomada en el microscopio de células L-929 antes del estudio.....	30
Figura 9. Método de coprecipitación para la síntesis de magnetita.....	37
Figura 10. Escalas micrométricas comúnmente usadas. A Ocular micrométrico: con una escala en el interior del ocular. B Portaobjetos micrométrico: la imagen muestra una cámara de Neubauer que permite la medición de longitudes, áreas y volúmenes con gran precisión.....	41
Figura 11. Forma de conteo de células en la cámara de Neubauer.....	42
Figura 12. Material durante el proceso de ensayo <i>in vitro</i> .....	43
Figura 13. Placa con medio de cultivo, células y la muestra por triplicado cada concentración correspondiente como lo indica la tabla de al lado.....	44
Figura 14. Posibles estructuras químicas de la magnetita y la lisina.....	46
Figura 15. Posibles estructuras químicas de la magnetita y la histidina.....	46
Figura 16. Posibles estructuras químicas de la magnetita y la fenilalanina.....	47
Figura 17. Espectro de infrarrojo de la magnetita.....	48

Figura 18. Espectros de Infrarrojo de la Mag-Phe, magnetita recubierta con fenilalanina, Mag-Hist, magnetita recubierta con histidina, y Mag-Lys, magnetita recubierta con lisina.....	50
Figura 19. Análisis de calorimetría diferencial de barrido de la magnetita A), y los sistemas de magnetita con la superficie modificada con aminoácidos magnetita histidina B), magnetita lisina C) y magnetita fenilalanina D).....	56
Figura 20. Difractograma de la magnetita sin recubrimiento, magnetita recubierta con lisina, magnetita recubierta con histidina y magnetita recubierta con fenilalanina.....	57
Figura 21. Esquemas que ilustran como se obtuvieron los resultados de tamaño de partícula con el difractograma de rayos X de polvos.....	59
Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita sin recubrimiento.....	61
Figura 23. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con lisina.....	62
Figura 24. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con histidina.....	63
Figura 25. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con fenilalanina.....	64
Figura 26. Espectro de infrarrojo de la fluoresceína.....	66
Figura 27. Espectros de Infrarrojo de la Mag-Phe-F magnetita recubierta con fenilalanina y fluoresceína, Mag-Hist-F magnetita recubierta con histidina y fluoresceína) y Mag-Lys-F magnetita recubierta con lisina y fluoresceína).....	67
Figura 28. Microscopia electrónica de transmisión de a) magnetita-lisina-fluoresceína(10:1), b) magnetita-fenilalanina-fluoresceína (10:1) y c) magnetita-histidina-fluoresceína (10:1).....	69
Figura 29. Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 100 µg/mL (A, B, C).....	72
Figura 30. Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 250 µg/mL. (D, E, F).....	74
Figura 31. Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 500 µg/mL. (G, H, I).....	76

Figura 32. Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 750 µg/mL (J, K, L).....	78
Figura 33. Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 1000 µg/mL (M, N, O, 1).....	80
Figura 34. Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 100 µg/mL (P, Q, R).....	83
Figura 35. Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 250 µg/mL (S, T, V).....	85
Figura 36. Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 500 µg/mL (W, X, Y).....	87
Figura 37. Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 1000 µg/mL (Z, AZ, BZ).....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Importancia, estructura y propiedades de la lisina.....	27
Tabla 2. Importancia, estructura y propiedades de la histidina.....	27
Tabla 3. Importancia, estructura y propiedades de la fenilalanina.....	28
Tabla 4. Referencias más importantes de los últimos años en los que se realizaron ensayos en células con magnetita funcionalizada.....	33
Tabla 5. Relación molar del aminoácido y fluoresceína para cada lote sintetizado.....	37
Tabla 6. Potencial Z de la magnetita sin recubrimiento, magnetita recubierta con lisina, magnetita recubierta con histidina y magnetita recubierta con fenilalanina.....	52
Tabla 7. Tamaño de partícula real de la magnetita sin recubrimiento y con recubrimiento de aminoácido.....	60
Tabla 8. Potencial Z de la magnetita modificada su superficie con aminoácido y fluoresceína.....	68

## ÍNDICE DE ESQUEMA

Esquema 1. Aminoácidos.....	26
-----------------------------	----

## ABREVIATURAS

Mag-Lys	Magnetita recubierta con Lisina
Mag-Hist	Magnetita recubierta con Histidina
Mag-Phe	Magnetita recubierta con Fenilalanina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
mg	Miligramos
g	Gramos
M	Molaridad (mol/Litro)
nm	Nanómetros
T	Temperatura
°C	Grados Centígrados
RES	Sistema Reticuloendotelial
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto
Å	Angstrom
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
Flur /F	Fluoresceína
Mag	Magnetita
Phe	Fenilalanina
Hist	Histidina
Lys	Lisina
IR	Técnica analítica de Espectroscopia de Infrarrojo

## 1.- RESUMEN

Los sistemas de liberación modificada buscan reducir efectos secundarios mediante el tratamiento dirigido, es decir, administrando el fármaco preferencialmente en la zona tumoral y no de forma general. Para lograr esto, se han investigado diversas alternativas, una de las cuales incluye el uso de partículas con alta magnetización (que son además biocompatibles) a las que se puede unir un fármaco. Las partículas son inyectadas en torrente sanguíneo y una vez dentro, se aplica un campo magnético externo con el propósito de dirigitas a un sitio específico del cuerpo, lugar donde el fármaco puede ser liberado por medio de enzimas, cambios en condiciones fisiológicas, o bien por variación de temperatura y absorberse por el órgano o células afectadas.

Dentro de los materiales con propiedades magnéticas destaca la magnetita ya que puede ser sintetizadas en tamaño nanométrico, lo cual facilita su aplicación a sistemas vivos. Sin embargo, la gran mayoría de estudios hechos con estos materiales se han limitado a estudios in vitro y en pocos casos in vivo, donde se presupone que la partícula no interactúa con la célula. Sin embargo, cabe la posibilidad de que estos sistemas permeen dentro de la célula. Esto puede traer grandes ventajas, ya que se pueden modificar sustancialmente efectos como, liberación controlada de fármacos, liberación de genes, diseño de teragnósticos etc.

El paso de una nanopartícula magnética a través de la membrana celular depende de muchos factores y uno muy importante es la superficie de la nanopartícula, el tipo de sustancia, carga, etc. Por esta razón es muy importante estudiar la permeación celular de estos materiales. Ya que si consigue que estos materiales puedan pasar a través de una membrana la eficiencia como sistemas acarreadores de fármacos puede verse muy favorecida. En el presente proyecto se pretende sintetizar nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y modificar la superficie con diferentes aminoácidos para variar el tipo de interacción con la membrana celular y determinar cómo afecta a la permeación celular, además dependiendo del aminoácido y las condiciones de pH también se podrá modificar la carga

superficial de la partícula y ver estos efectos en el paso de estas hacia el interior de la célula.

## 2.- INTRODUCCIÓN

Se han realizado muchos estudios recubriendo la magnetita con diversos polímeros tanto naturales como sintéticos, sin embargo, se ha observado que por el tamaño del polímero el diámetro de las nanopartículas recubiertas aumenta.

El control del diámetro de la magnetita es muy importante para las aplicaciones biomédicas pues se prefiere que sean de 5nm a 20nm aproximadamente para que sus propiedades superparamagnéticas no se modifiquen y al ser funcionalizada la superficie de la magnetita no aumente su diámetro a mayor de 100 nm ya que para la biomedicina este diámetro es considerado grande. Una alternativa para la funcionalización de la superficie de la magnetita han sido las moléculas pequeñas como los aminoácidos pues podría asegurar la unión complementaria con las biomoléculas funcionales del organismo y la estabilización de las nanopartículas en la suspensión.<sup>1</sup>

Las propiedades físicas y químicas de estos nanocristales dependerá del método de síntesis.<sup>2</sup> La síntesis exitosa de las partículas magnéticas modificadas requiere dos pasos importantes:<sup>2,3</sup>

- La síntesis controlada por tamaños de nanopartículas de magnetita.
- La modificación química de la superficie de las partículas magnéticas.

En esta tesis se presenta un método de síntesis de co-precipitación en dos pasos ya que fue el método más factible para mis experimentos, la caracterización de la magnetita desnuda, la magnetita recubierta con tres aminoácidos diferentes, histidina, lisina y fenilalanina, con propiedades diferentes, los dos primeros básicos y el ultimo neutro aromático; y finalmente la magnetita recubierta con los tres aminoácidos marcada con fluoresceína con la cual se realizaron ensayos *in vitro* con células HeLa y Fibroblastos de ratón.

### 3.- ANTECEDENTES

#### 3.1.- Sistemas de liberación modificada.

Desde hace varios años se han realizado investigaciones para el diseño de medicamentos en la cual se reduzcan las oscilaciones de las concentraciones plasmáticas observadas en la liberación de medicamentos convencionales.

Dichos sistemas de medicamentos de liberación modificada pueden clasificarse de la siguiente manera:<sup>4-7</sup>

- 1) *Liberación preprogramada*: La liberación del fármaco se da por difusión molecular a través de una barrera. Se describe mediante la segunda ley de Fick. Algunos ejemplos son:
  - a) Permeación a través de una membrana polimérica.
  - b) Difusión a través de una membrana polimérica
  - c) Microreservorio
- 2) *Activación modulada de la liberación*: La liberación del fármaco se facilita por el suministro de energía mediante diferentes medios.
  - a) Mecanismos físicos: presión osmótica, presión hidrodinámica, activación mecánica, activación magnética, sonoforesis, iontoforesis, hidratación.
  - b) Mecanismos químicos: activación de pH e iónica.
  - c) Mecanismos bioquímicos: Activación enzimática, regulación por retroalimentación, bioerosión, biorespuesta, autoregulación.
- 3) *Liberación dirigida*: El desarrollo de estos sistemas es liberar el fármaco en un sitio específico para disminuir la toxicidad de los fármacos inespecíficos, su diseño busca la incorporación en el sistema de elementos de reconocimiento como anticuerpos para que se una selectivamente a las células o tejido blanco.

#### 3.2.- Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia y la nanotecnología como su nombre lo indica es ciencia y tecnología a tamaño de nanómetros, es decir, es la manipulación de átomos y/o

moléculas individuales para crear sistemas que sean funcionales en tamaños nanométricos.<sup>8</sup>

La nanociencia es un término muy prometedor en las investigaciones científicas en todas las áreas, pues al tener sistemas tan pequeños se pueden descubrir propiedades funcionales nuevas de las moléculas y así poder mejorar un sistema ya conocido y aplicarlo tecnológicamente.

De esta manera se ha recurrido a la investigación de sistemas de liberación modificada de fármacos en tamaños nanométricos, pues las aplicaciones pueden traer beneficios, como ejemplo tenemos la disminución de efectos secundarios no deseados ocasionados por algunos tipos de medicamentos como los antineoplásicos permitiendo una terapia más cómoda en su administración y tiempo de hospitalización y eficaz al obtener un efecto terapéutico deseado solo en la zona de la enfermedad.

### **3.3.- Características de materiales magnéticos.**

#### **3.3.1.- Clasificación**

Una de las formas más comunes de clasificar a los materiales magnéticos es de acuerdo a su respuesta que tienen estos materiales cuando se les aplica un campo magnético dando lugar a la siguiente clasificación:<sup>9,10</sup>

- Diamagnetismo: Esta propiedad consiste en la repulsión del material al campo magnético externo aplicado. Por lo que la magnetización es negativa. No tienen momentos magnéticos netos (no tiene electrones desapareados), es independiente de la temperatura.
- Paramagnetismo: Tienen momento magnético neto. En presencia de un campo magnético los dipolos magnéticos se alinean en dirección paralela a los campos, por lo que da una magnetización positiva. Al remover el campo magnético la magnetización es cero inmediatamente.

- Ferromagnético: Tienen electrones desapareados y el momento magnético total es la suma del acoplamiento de los centros con electrones desapareados, se encuentran en un arreglo en secciones llamadas dominios magnéticos y dentro de cada dominio los momentos magnéticos se encuentran alineados en una dirección esto hace que muestren una magnetización neta grande.
- Ferrimagnéticos: Los dominios magnéticos se encuentran alineados de forma antiparalela y como consecuencia algunos dipolos se oponen y otros se alinean mostrando pequeñas magnetizaciones.
- Antiferrimagnético: Los momentos magnéticos que son producidos por dipolos vecinos hacen que se alineen en sentidos opuestos lo que provoca una muy pequeña magnetización o cero.
- Superparamagnetismo: Cuando el tamaño de las partículas de origen ferromagnético hasta que tengan un diámetro menor a los 25 nm, se convierten en superparamagnéticas, es decir, ausencia de campo magnético y  $T > 0K$  la magnetización es cero. Esto se debe a la formación de monodominios magnéticos, entonces la energía térmica de la partícula será suficiente para superar la energía de anisotropía a energía de isotropía, es decir la susceptibilidad magnética de la partícula será homogénea en cualquier dirección. Sin embargo, en presencia de un campo magnético la magnetización es muy alta debido a la alineación de los monodominios magnéticos, siendo esta similar a la de un ferromagnético.

### **3.3.2.- Nanopartículas magnéticas**

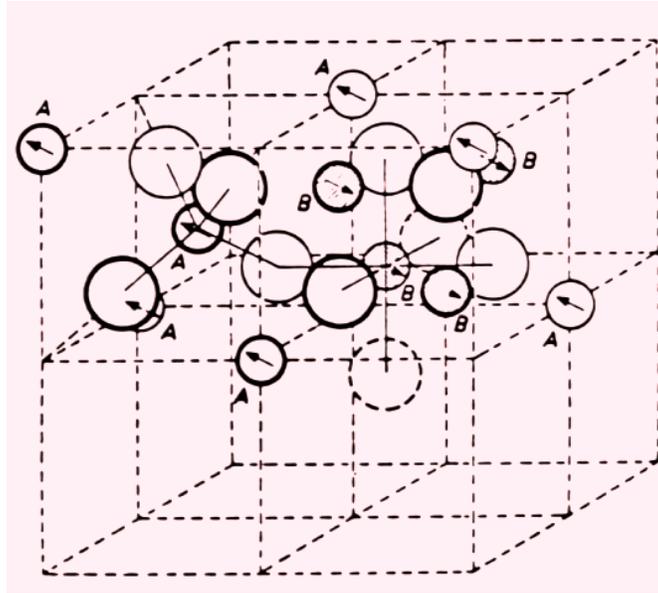
Las partículas magnéticas tienen muchas aplicaciones en el área biomédica, en particular en tamaño nanométrico, se pueden manipular de tal manera que se obtenga un sistema de administración dirigida de fármacos al sitio de la enfermedad, el tratamiento de la hipertermia de tumores, resonancia magnética de imagen (MRI) y diagnóstico *in vitro* de bajo costo.<sup>11</sup>

El tamaño de las nanopartículas son de gran importancia pues es la principal determinante de la cinética de biodistribución y la bioeliminación<sup>12</sup>.

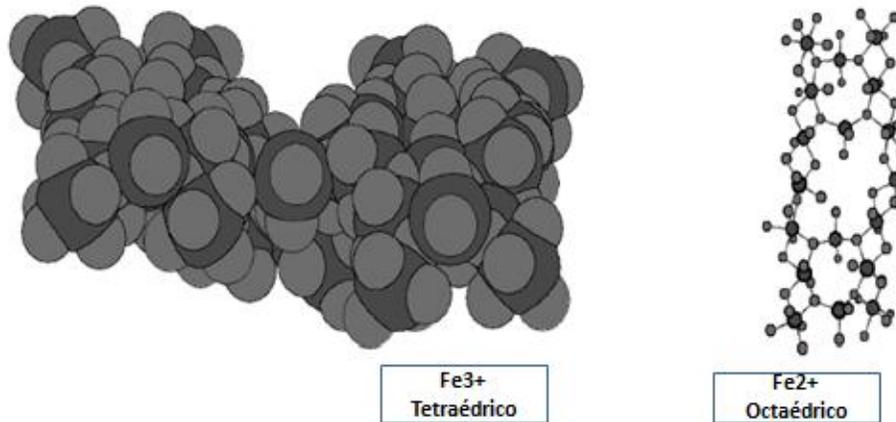
### 3.3.3.- Magnetita

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (MNPs) tienen una característica particular debido a su comportamiento ferrimagnético, tamaño pequeño y gran relación entre superficie-volumen, naturaleza superparamagnética, tamaño de partícula de un solo dominio y biocompatibilidad. Estas características las hace adecuadas para que puedan aplicarse en diversos campos como: ciencia del suelo, ciencia de la corrosión, industrias (arcilla, cerámica, catalizador) y más recientemente en biología (biosensor, administración de fármacos, etc.).<sup>13</sup>

La magnetita tiene una estructura de espinela inversa en la que el oxígeno forma una disposición cúbica de gran volumen. La mitad de los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  ocupan sitios tetraédricos, mientras que la otra mitad y los cationes  $\text{Fe}^{2+}$  ocupan los sitios octaédricos (como lo muestra la figura 3 y figura 4). Dado que el número de  $\text{Fe}^{3+}$  en cada sitio de red (tetraédrico y octaédrico) es el mismo, los momentos magnéticos de los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  se anulan entre sí, y como resultado, la magnetización neta total se debe únicamente a los cationes  $\text{Fe}^{2+}$ . Se ha encontrado que a menor tamaño tendrá un dominio magnético único.<sup>14</sup>



**Figura 1.** Estructura de la magnetita de espinela en donde A y B son los iones metálicos y los círculos grandes son la coordinación del oxígeno.<sup>15,16</sup>



**Figura 2.** Las dos formas estructurales de la magnetita  $\text{Fe}^{3+}$  tetraédrica y  $\text{Fe}^{2+}$  octaédrica.<sup>14</sup>

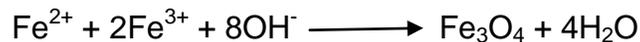
La capacidad de la magnetita para actuar como adsorbentes eficientes se ha relacionado con características tales como tamaño pequeño, área superficial grande, separación fácil y gran número de sitios activos.

En la magnetita desnuda se pueden absorber fácil y constantemente los grupos oxhidrilo, carboxilo y aminos abundantes, pues se coordinan con los átomos de hierro.

### 3.3.3.1.- Métodos de síntesis

Las propiedades físicas y químicas de la magnetita van a depender de la síntesis con las que se prepararon. Existen varios métodos de síntesis descritos a continuación:<sup>9,10,14,17</sup>

\* Método de co-precipitación: Es el método más simple y eficiente para la síntesis de magnetita. Se utilizan sales férricas y ferrosas en una relación estequiometría 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ ), en medio acuoso, en una atmosfera inerte, con un pH básico y una temperatura de 80°C.



Los parámetros importantes de cuidar en este método de síntesis es la temperatura, la atmosfera inerte y el pH.

\* Método hidrotérmico:

Es la reducción hidrotérmica del cloruro férrico con reductores tales como, acetato de sodio se ha estudiado principalmente en disolventes como etilenglicol y polietilenglicol, estos se hace para evitar la aglomeración de la magnetita y tener un tamaño más uniforme.

En este método existe una transferencia de fases y separación de interfaces entre el líquido, el sólido y las disoluciones presentes en dicha síntesis. Se realiza a altas temperaturas aproximadamente 200°C y a un tiempo de 8 horas hasta las 72 horas. En esta síntesis la temperatura, los disolventes y el tiempo de reacción serán determinantes para la síntesis de magnetita.

\* Método de microemulsión:

Este método consta de dos fases una acuosa, en donde se tienen las sales férricas y ferrosas ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), y una fase orgánica (disolvente), con un estabilizador como el n-butanol el cual va a proteger las gotas de las sales de hierro formando los óxidos de hierro para dar lugar a la magnetita.

Este método tiene una gran variedad de dispersión en el tamaño y la forma de la magnetita. Por otra parte, casi no es utilizado por su requerimiento de grandes cantidades de disolvente.

\*Método Sol-Gel:

Es un procedimiento por vía húmeda que se basa en la hidroxilación y condensación de los precursores en una disolución. Es un método que se realiza a temperatura ambiente por lo que es necesario tratamientos adicionales para la formación de los cristales finales.

\* Método de Sonoquímico:

El objetivo de este método es sintetizar magnetita por medio de una descomposición (sonólisis) por medio de precursores organometálicos, por ejemplo acetilacetonato  $\text{Fe}(\text{acac})_2$  y pentacarbonilo de hierro  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ , en la cual se usan polímeros como encapsuladores para modular el tamaño de la partícula sintetizada<sup>10</sup>.

### **3.3.3.2.- Aplicaciones de la magnetita**

Entre las aplicaciones más destacadas de la magnetita se encuentran: la empleada para hipertermia, radioterapia, contraste de imágenes de resonancia magnética nuclear, acarreador de fármacos y desintoxicación de fluidos biológicos.<sup>10,18-20</sup>

La principal ventaja de las nanopartículas que tienen una alta afinidad por el agua es que pueden interactuar con especies biológicas como enzimas, proteínas, aminoácidos y ADN, haciéndolos atractivos para su uso en biomedicina.<sup>12</sup> Otra de

las ventajas es que estas nanopartículas por sus propiedades magnéticas pueden dirigirse hacia los tejidos u órganos dañados aplicando un campo magnético .<sup>21</sup>

### **3.3.3.3.- Funcionalización superficial y estabilización de la magnetita**

Las nanopartículas de magnetita tienen una gran tendencia a la aglomeración intrínseca y exhiben coalescencia en el medio de dispersión debido a la interpolación dipolar magnética entre partículas. Por este aspecto es que se ha buscado un recubrimiento para mejorar sus aplicaciones biomédicas.<sup>13</sup>

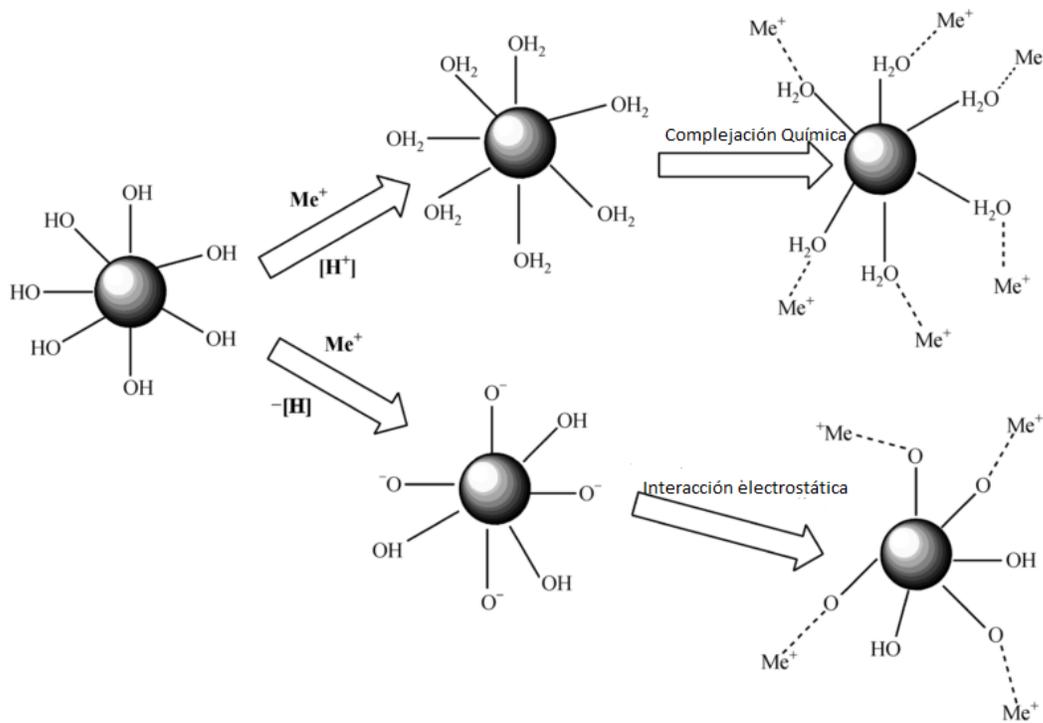
Un avance importante de las nanopartículas es la funcionalización de su superficie la cual permite obtener una estabilización en los fluidos biológicos. Para tener una superficie químicamente funcional de la magnetita se requieren ciertas características como valores altos de magnetización, un tamaño menor a 100nm (las propiedades de los nanocristales dependen fuertemente de la dimensión de la nanopartícula) y una distribución de tamaño de partícula estrecha.<sup>9</sup>

Los oxidrilos son los grupos funcionales superficiales de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . La particularidad de estos grupos oxidrilos ( $\text{OH}^-$ ) es que son anfóteros y reactivos. Dependiendo del pH de la solución, el óxido superficial puede actuar como ácido o base y sufrir protonación o desprotonación (figura 3).

La superficie de la magnetita se puede funcionalizar con el fin de favorecer las interacciones en su superficie, en general se modifican para obtener dos tipos de magnetita, la hidrofílica y la hidrofóbica. La magnetita hidrofílica tiene gran afinidad por el agua, mientras que la magnetita hidrofóbica tiene afinidad por los disolventes no polares. La diferencia entre estos dos tipos de magnetita es que en las hidrofílicas solo tienen el núcleo que es hidrofílico dejando los grupos oxidrilos funcionales y la magnetita hidrofóbica tiene el núcleo hidrofílico, pero en su superficie tiene adsorbido un ácido graso como el ácido oleico, que es el más utilizado. (Jadhav, et al. <sup>22</sup>)

Para la estabilización y funcionalización superficial se han logrado adsorber en la magnetita polímeros, aminoácidos y ácidos grasos, para después poder adicionar la adsorción de algún fármaco y tener un efecto terapéutico.

Se han realizado varios estudios en donde se funcionaliza la superficie de la magnetita con polímeros, siendo los más efectivos los polímeros hidrofílicos, gracias a sus siguientes características: inertes, capacidad de ser solvatados y compatibles con el disolvente de la formulación y con una polarización próxima al agua.<sup>23</sup>

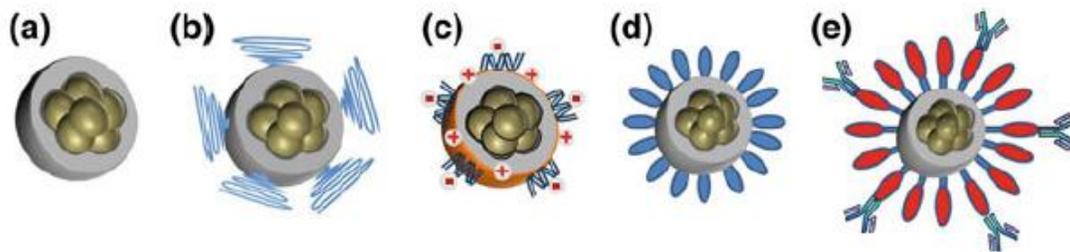


**Figura 3.** Representación de la magnetita y sus posibles mecanismos de adsorción en donde  $\text{Me}^+$  es cualquier adsorbente.<sup>14</sup>

La estabilización de las partículas magnéticas puede lograrse al modificar el pH del medio dando como resultado una o ambas fuerzas repulsivas: repulsión electrostática e impedimento estérico.

La repulsión electrostática, como se muestra en la figura 3, se da cuando dos partículas en dispersión forman una doble capa de signos contrarios, es decir la partícula es negativa y atrae iones positivos, en donde cada partícula en dispersión tiene la misma carga, dando como resultado una repulsión entre partículas y de esta manera lograr que las partículas se estabilicen en el medio de dispersión la cual puede estar muy próximo al potencial zeta.

El impedimento estérico se tiene más estudiado en los polímeros, la cual depende de la densidad, el peso molecular del polímero. En la figura 4 se muestra algunos materiales que se han empleado para la funcionalización de magnetita, en la gran mayoría de los casos estas partículas se han cubierto de polímeros, sin embargo, se han estudiado numerosas posibilidades.



**Figura 4.** Diferentes tipos de recubrimiento de nanopartículas magnéticas  
a) Nanopartícula desnuda, b) PEG, c) Vector plásmidico para la liberación génica,  
d) Polímeros, e) Anticuerpos para aplicación específica.<sup>17</sup>

#### 3.3.3.4.- Toxicidad

Entre los diversos nanomateriales superparamagnéticos existentes, la magnetita es particularmente interesante por sus propiedades magnéticas y su funcionalización superficial, además de su baja toxicidad y bajo costo. En el área biomédica es en donde la magnetita se ha investigado más debido a su baja toxicidad.<sup>12</sup>

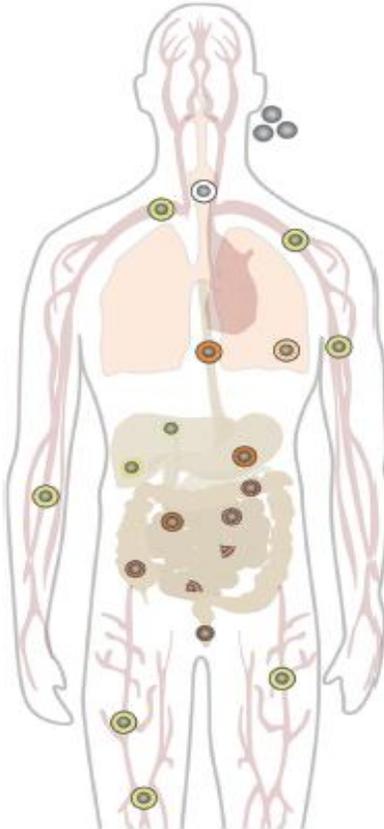
La vía de administración preferida para los sistemas nanométricos es la intravenosa (I.V). Si un sistema nanométrico como la magnetita se administra por

vía intravenosa, el flujo sanguíneo llevaría a las nanopartículas primeramente hacia el ventrículo derecho del corazón, a través de los capilares pulmonares posteriormente hacia el ventrículo izquierdo y finalmente hacia el sistema arterial suministrando a cada órgano con las respectivas nanopartículas, la principal fracción de sangre entrará en el hígado y el bazo por ser órganos muy irrigados de venas<sup>24</sup> y tienen una enorme capacidad para eliminar nanopartículas como xenobióticos del torrente sanguíneo por esta razón se pretende que las partículas con un tamaño menor a 100 nm terminarán en estos órganos en donde el sistema retículo endotelial (RES) por endocitosis las empezará a degradar con ayuda de enzimas hidrolizantes y el hierro liberado por el retículo endotelial formará glóbulos rojos<sup>25,26</sup>.

Para poder retardar o evitar la endocitosis inmediata de la magnetita por el sistema retículo endotelial el material de funcionalización de la superficie de la magnetita tiene que ser altamente biocompatible con el organismo ya que también asegurará viabilidad celular, adhesión celular y una vida más larga del sistema en el organismo.<sup>11</sup> Sin embargo, no es el único problema al que se enfrenta el sistema al entrar al organismo pues, al entrar inmediatamente al torrente sanguíneo se exponen a un entorno biológico altamente complejo por la cantidad de iones y biomoléculas, tales como, lípidos, metabolitos, azúcares y especialmente proteínas que se pueden adsorber fácilmente en la superficie de la magnetita mediadas por fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofílicas y/o hidrofóbicas.<sup>24</sup>

Se mencionó anteriormente que la vía de administración preferida para estos sistemas nanométricos es la intravenosa sin embargo, no es la única pues, se han realizado estudios (Ana Espinosa<sup>24</sup>) en donde se administran intraperitoneal o directamente en alguna lesión tumoral en donde se supone siguen otra ruta las nanopartículas en el organismo. De esta información se dispone muy poca información sobre la eficacia en el procesamiento celular después de la administración *in vivo*.<sup>25</sup>

En la figura 5, se pueden distinguir los lugares principales en donde se las nanopartículas viajan después de una administración intravenosa.

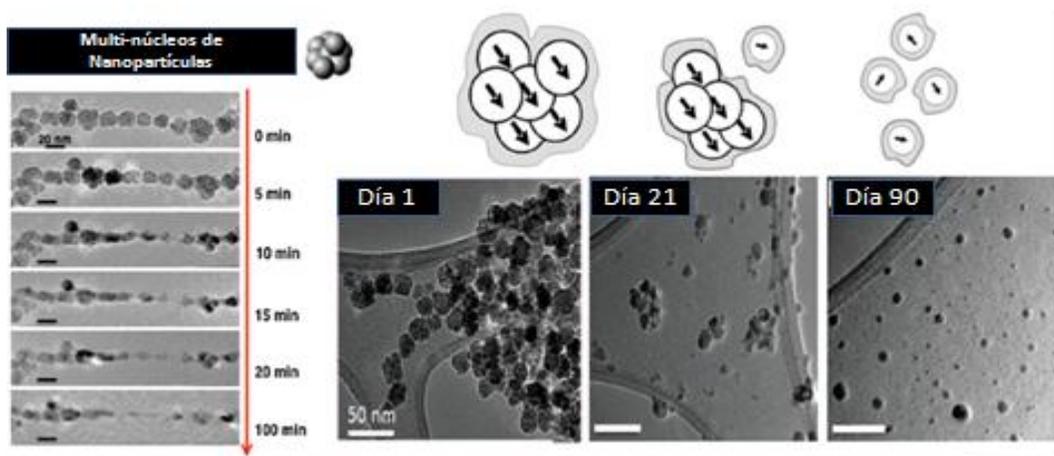


**Figura 5.** Sitios donde principalmente viajan las nanopartículas después de una inyección intravenosa, la corona alrededor de la nanopartícula simula la corona de biomoléculas que se adsorben rápidamente en la nanopartícula.<sup>25</sup>

Se tiene conocimiento de que el organismo elimina con mayor rapidez las partículas hidrofóbicas, mientras que las partículas hidrofílicas pueden permanecer más tiempo en el torrente sanguíneo esto pasa por la conformación de nuestro organismo al estar constituido mayoritariamente por agua.<sup>23</sup>

En la figura 6, muestra la degradación *in vitro* de las nanopartículas magnéticas conforme al tiempo que pasa en medio lisosomal, 1 día, 21 días y 90 días,

simulando el sistema retículo endotelial en donde se realiza el proceso de endocitosis antes mencionado observando una gran cantidad de nanopartículas aglomeradas al día 1 mientras que al día 21 se degradaron más del 50% de las nanopartículas a los 90 días solo son nanopartículas aisladas.



**Figura 6.** Degradación de las nanopartículas en medio de cultivo lisosomal.<sup>25</sup>

Tener en exceso de algún compuesto en el organismo aunque sea esencial para nuestro adecuado metabolismo llega a ser tóxico, es por eso que al administrar magnetita se está elevando la concentración de hierro en el organismo y se tiene que considerar que cantidad el organismo puede llegar a tolerar de hierro para evitar una intoxicación. Es por eso que (Kim, et al. <sup>26</sup>) reporta que la cantidad de hierro total estrictamente en el organismo es de 20-60mg/kg, por lo que si esto es excedido puede causar daños a nivel de DNA ocasionando mutaciones y como consecuencia enfermedades genéticas graves.<sup>26</sup>

### 3.4.- Aminoácidos

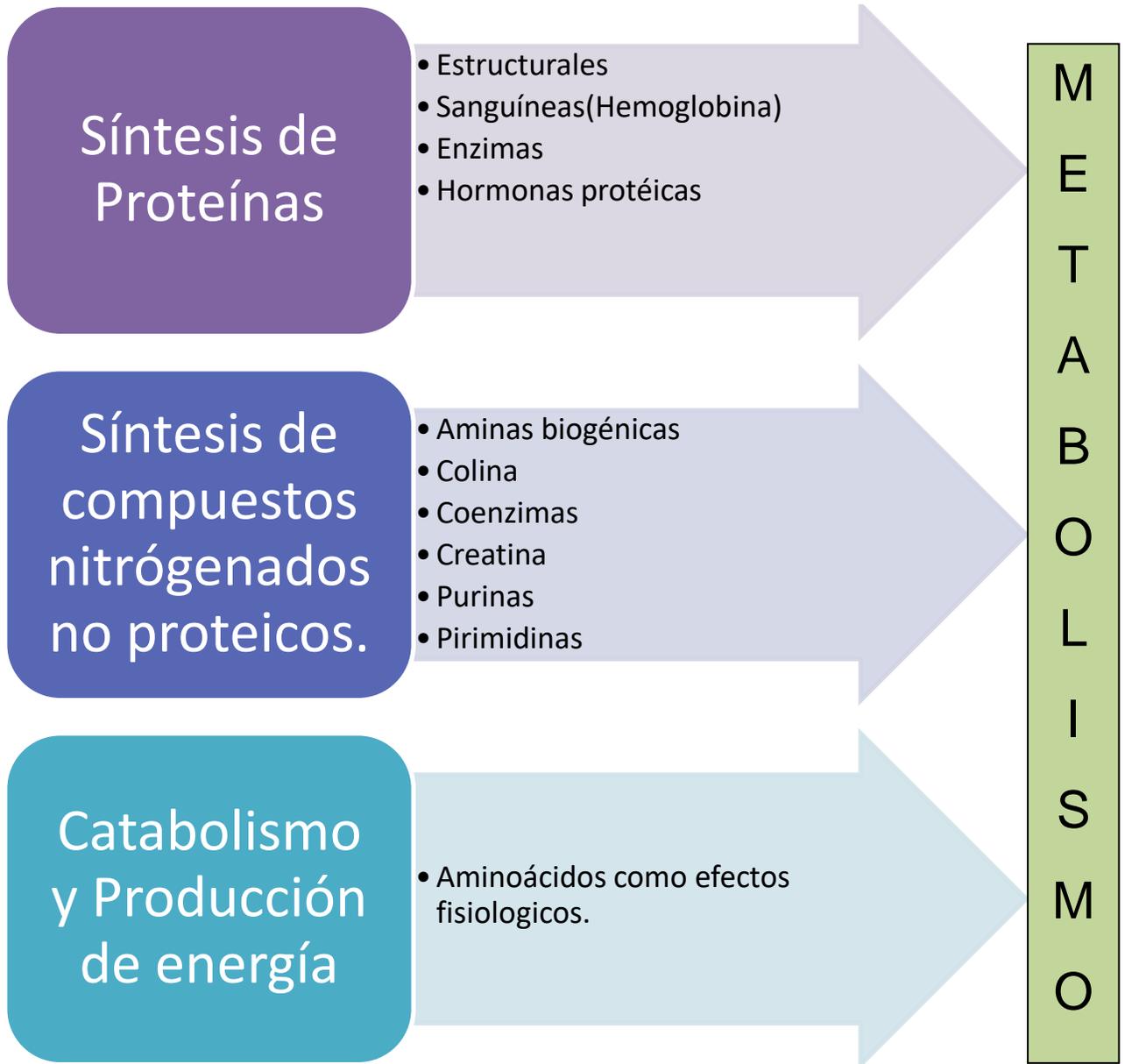
Los aminoácidos son fundamentales para la integridad funcional y estructural de las células por lo cual son muy importantes para el organismo.

Algunas fuentes de la obtención de aminoácidos son:

- Proteínas de la dieta: digestión y absorción de los aminoácidos.

- Degradación de las proteínas corporales.
- Síntesis de los aminoácidos en el organismo.

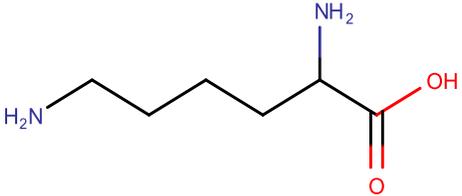
Los aminoácidos tienen diferentes funciones en organismo como las descritas a continuación:



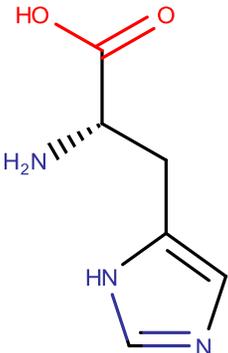
**Esquema 1.** Funciones de los aminoácidos en el organismo para tener un metabolismo adecuado.

### 3.4.1.- Características de los aminoácidos utilizados en la funcionalización de magnetita.

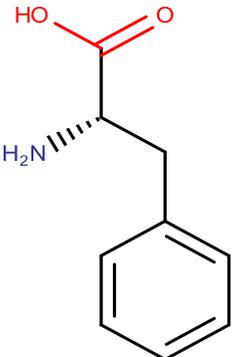
Una de las maneras de clasificar a los aminoácidos es por su estructura química la cual les confiere propiedades químicas distintas. Tenemos aminoácidos polares neutros (serina, treonina, cisteína, prolina, asparagina y glutamina), aminoácidos no polares alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, metionina e isoleucina), aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina), aminoácidos ácidos (aspartato y glutamato) y finalmente aminoácidos aromáticos neutros (fenilalanina, tirosina y triptófano).<sup>27</sup> A continuación se muestran las características de los aminoácidos utilizados en este trabajo. (tabla 1, tabla 2 y tabla 3)

LISINA: La lisina juega un papel importante para la cura del virus del herpes simple. <sup>13</sup>	 <p>The image shows the chemical structure of Lysine. It consists of a central alpha-carbon bonded to a hydrogen atom, an amino group (NH<sub>2</sub>), a carboxyl group (COOH), and a side chain consisting of four methylene groups ending in a primary amino group (H<sub>2</sub>N).</p>	Aminoácido básico. pKa <sub>1</sub> 2.18 pKa <sub>2</sub> 8.95 pKa <sub>3</sub> 10.53 masa molar 146.19 g/mol
---	---	--

**Tabla 1.** Importancia, estructura y propiedades de la lisina.

HISTIDINA: El cuerpo lo utiliza para producir histaminas, causante de algunos procesos fisiológicos, como la disminución de la presión sanguínea y disminución de problemas cardíacos. <sup>28</sup>	 <p>The image shows the chemical structure of Histidine. It features a central alpha-carbon bonded to a hydrogen atom, an amino group (H<sub>2</sub>N), a carboxyl group (COOH), and a side chain consisting of two methylene groups attached to an imidazole ring.</p>	Aminoácido básico  pKa <sub>1</sub> 1.82  pKa <sub>2</sub> 9.17  Masa molar  155.16 g/mol
--	--	---

**Tabla 2.** Importancia, estructura y propiedades de la histidina.

<p>FENILALANINA: Es un aminoácido el cual es de suma importancia para la construcción de unidades proteicas y hormonales para que el metabolismo del cuerpo humano tenga buen funcionamiento.<sup>29</sup></p>	 <p>The image shows the chemical structure of Phenylalanine. It consists of a central alpha-carbon atom bonded to a hydrogen atom (not explicitly shown), an amino group (H<sub>2</sub>N) shown with a dashed bond, a carboxyl group (HO-C=O) shown in red, and a side chain consisting of a methylene group (-CH<sub>2</sub>-) attached to a phenyl ring (a hexagon with an inscribed circle).</p>	<p>Aminoácido neutro aromático.</p> <p>pKa<sub>1</sub> 1.83 pKa<sub>2</sub> 9.29 masa molar 165.19 g/mol</p>
--	--	--

**Tabla 3.** Importancia, estructura y propiedades de la fenilalanina.

### 3.4.2.- Aplicación de los aminoácidos en la nanotecnología

Entre los productos químicos que pueden utilizarse para un recubrimiento de la magnetita se encuentran los aminoácidos por su gran importancia en el organismo y por supuesto biocompatibilidad.

Los aminoácidos (aa) y poliaminoácidos (paa) tienen grupos funcionales laterales en su estructura incluyendo grupos oxidrilo, carboxilo, amina y alifáticos, carbonilo, tiol, azufre, oxígeno y nitrógeno. Estos grupos permiten que estos compuestos interactúen no sólo con la superficie de magnetita, sino también con contaminantes en el agua y fármacos para una terapia.

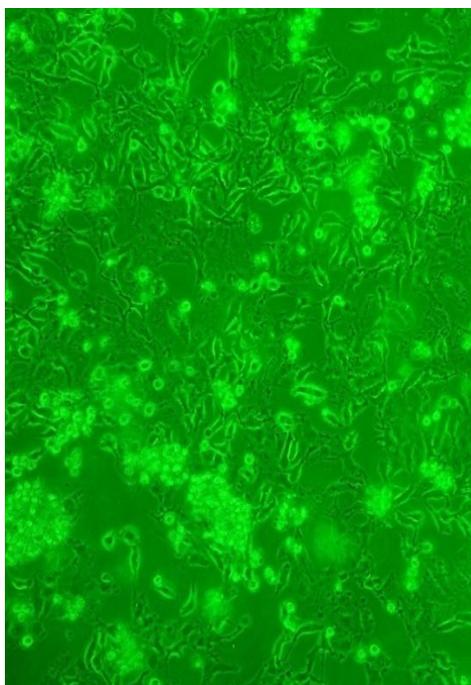
Se ha observado que los grupos NH<sub>2</sub> de los aminoácidos son prometedores para tener una internalización más eficiente en las células pues al protonarse el grupo amino a NH<sub>3</sub><sup>+</sup> quedando con carga positiva se va a atraer por cargas hacia la membrana permitiendo una internalización ocupando menos energía de parte de la célula.<sup>14,19</sup>

### 3.5.- Ensayos *in vitro* en células utilizando magnetita funcionalizada con aminoácidos

Entre las actividades involucradas en el diagnóstico e investigación básica y aplicada el cultivo celular es una herramienta primordial para el estudio de diferentes entidades de tipo viral, bacteriano o parasitario, de la misma manera procesos intercelulares e intracelulares.<sup>30</sup>

El cultivo celular es una metodología que permite que células procariontas o eucariotas se puedan mantener y proliferar en condiciones controladas.

A continuación, se muestra la fotografía de las células empleadas en este trabajo antes de estar en contacto con los sistemas de magnetita, así como sus principales características descritas en las hojas de especificaciones e instructivo de manejo de células del proveedor.



#### Células HeLa (TCC<sup>R</sup> CCL-2)

##### DESCRIPCIÓN

Organismo: Homo sapiens, humano.

Tejido: cérvix

Enfermedad: Adenocarcinoma

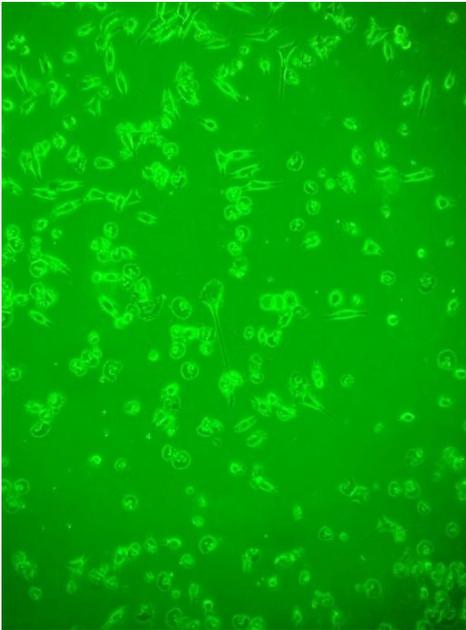
Tipo celular: Epitelial

Edad: Adulto de 31 años

Genero: Femenino

Morfología: Epitelial

**Figura 7.** Fotografía tomada en el microscopio de células HeLa antes del estudio.



### Células NCTC clone 929 [ L-cell, L-929] (ATCC<sup>R</sup> CCL-1)

#### DESCRIPCIÓN

Organismo: *Mus musculus*, ratón

Tejido: Tejido conectivo subcutáneo; areolar y adiposo

Edad: 100 días

Género: Masculino

Morfología: Fibroblastos

**Figura 8.** Fotografía tomada en el microscopio de células L-929 antes del estudio.

### 3.6.- Magnetita recubierta con aminoácidos

La funcionalización de la magnetita con aminoácidos, no se ha estudiado mucho, Uno de los trabajos más importantes es el realizado por Culita, et al. <sup>28</sup> en el cual utilizaron el método de calcinación o descomposición térmica para la síntesis de magnetita recubierta con histidina con un rendimiento de adsorción de 9.29% y tirosina con un rendimiento de adsorción de 6.2%, ambos aminoácidos con propiedades básicas. Cuando se caracterizaron estos dos sistemas comprobaron por medio de espectroscopía infrarroja, la adsorción de los aminoácidos es la superficie de la magnetita, también realizaron pruebas de magnetización en donde observaron que había una disminución en la saturación de la magnetita recubierta que la magnetita sin recubrir atribuida a la existencia de una capa orgánica que no tiene propiedades magnéticas, pero si contribuye a la masa total del sistema.

Otro de los estudios de magnetita recubierta con aminoácidos es el realizado por Farzaneh, et al. <sup>31</sup> el cual primero funcionaliza la superficie con sílice seguido de aminopropilmetoxisilano para después adsorber un aminoácido, ya sea la L-histidina con propiedades básicas o L-triptófano con propiedades ácidas finalmente se complementó el sistema con ligandos de oxovanadio para

posteriormente utilizar estos dos sistemas como catalizadores para la epoxidación de geraniol, norborneno y ciclo-octeno obteniendo una selectividad del 100% en cada uno de ellos, una de las mejores ventajas de estos sistemas es su reciclaje.

En el estudio realizado por Krishna, et al. <sup>13</sup> sintetizó magnetita y maghemita (estado oxidado de la magnetita) recubriéndolas con L-lisina, comprobando que en la caracterización tienen pequeñas diferencias en la técnica de IR en la intensidad de la banda característica del enlace Fe-O, en la técnica de rayos X la maghemita tiene dos bandas más intensas antes de la difracción de 220 y finalmente la saturación de magnetización mostrando una disminución en la maghemita, también se demostró que la adsorción de los aminoácidos en la superficie de la magnetita y maghemita se puede saber gracias al potencial Z obtenido a un pH de 7 debido a la protonación del grupo amino  $\text{NH}_2$  a  $\text{NH}_3^+$  haciendo más estable la dispersión de los sistemas sólidos en agua. La funcionalidad de la amina terminal del aminoácido L-lisina en la superficie de los MNP's de óxido de hierro ofrece una vía definitiva para la modificación superficial adicional con colorantes fluorescentes, enzimas, residuos peptídicos, enlazadores de hormonas, moléculas de fármacos, etc. para una posible unión celular, bioimagen, rastreo, focalización, diagnóstico celular y administración de fármacos.

Marinescu, et al. <sup>1</sup> Sintetizó nanopartículas de magnetita modificando su superficie con ácido L(+)-aspártico, ácido L(+)-glutámico, clorhidrato de arginina, L-prolina, y L-triptófano. Utilizaron la ruta de un solo paso la cual consiste en una solución de agua con el aminoácido disuelto y las sales de hierro disueltas agregar la solución básica para la formación de la magnetita, en donde comprobaron que esta ruta de síntesis si adsorbe los diferentes aminoácidos y no modifica sus propiedades de magnetización y propiedades superparamagnéticas.

### 3.7.- Magnetita recubierta utilizada en la eficacia celular

Las partículas de magnetita se están utilizando en la actualidad como agentes de contraste en dirigidos órganos como hígado y/o bazo y en ocasiones en ganglios linfáticos (Sophie Laurent and Robert N. Muller\* <sup>9</sup>), sin embargo, nuevos desarrollos para las terapias se están centrando en su seguimiento a través de las células.<sup>9</sup> En uno de los estudios realizados recientemente utilizan nanopartículas magnéticas con el objetivo de permear la célula al generar nanoporos en la célula. El experimento constó en generar un potencial eléctrico negativo sobre la superficie de la nanopartícula y una vez generado este potencial y ponerlas en contacto con las células en presencia de un campo magnético el grupo fosfato de la bicapa fosfolípida de la célula se polariza y se repelen los grupos fosfato por carga generando nanoporos y permitiendo la internalización de las nanopartículas..(Betal, et al. <sup>8</sup>).

En la siguiente tabla se muestran los trabajos más importantes desde el 2002 al 2017 donde ocuparon nanopartículas de magnetita, en cada uno de los trabajos funcionalizan la superficie de la magnetita con distintos materiales de baja toxicidad y en todos realizan estudios in vitro para comprobar la citotoxicidad de las nanopartículas, sin embargo Sadhukha, et al. <sup>32</sup> es la única referencia en la que se ocupó L-Lisina como uno de los materiales de recubrimiento y en el cual realizaron estudios in vitro.

REFERENCIA	MATERIAL DE RECUBRIMIENTO	¿ESTUDIO CON CÉLULAS?
<b>Gil, et al.</b> <sup>33</sup>	(3-aminopropil) trietoxisilano y Rodomina.	Sí, Citotoxicidad
<b>Lotfi, et al.</b> <sup>34</sup>	Chitosan	Sí, Citotoxicidad
<b>Mancarella, et al.</b> <sup>35</sup>	Dextrano y L-Lisina; Curcumina	Sí, Eficiencia de la Curcumina con nanopartículas
<b>Sadhukha, et al.</b> <sup>32</sup>	Ácido mirístico estabilizado con ácido plurónico	Sí, Eficiencia terapéutica de las nanopartículas para hipertermia.
<b>Wang, et al.</b> <sup>36</sup>	3-aminopropiltriethoxisilano y Protamina/Péptido	Sí, Eficiencia terapéutica de las nanopartículas para hipertermia.
<b>Zhang, et al.</b> <sup>37</sup>	3-aminopropiltriethoxisilano, PEG y Ácido fólico	Sí, efectividad de la internalización de nanopartículas magnéticas
<b>Zhang and Zhang</b> <sup>38</sup>	3-aminopropiltriethoxisilano, PEG y Ácido fólico	Sí, efectividad en células cancerígenas.

**Tabla 4.** Referencias más importantes de los últimos años en los que se realizaron ensayos en células con magnetita funcionalizada.

#### **4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La forma de administración de fármacos muy invasivos, por ejemplo, antineoplásicos, no tiene una liberación selectiva y dirigida por lo que mata tanto a células enfermas como las células sanas. Debido a este problema se busca una forma de dirigir estos fármacos directamente al sitio de la enfermedad. Una manera prometedora es la síntesis de la magnetita que por sus propiedades magnéticas se puede dirigir a un sitio en específico. Por esta razón las nanopartículas magnéticas han representado una gran oportunidad para preparar sistemas de liberación inteligentes, sin embargo, la permeación de estas dentro de la célula ha sido pobremente estudiada y la funcionalización superficial con aminoácidos, tampoco se ha estudiado ampliamente y aún no se conoce el efecto de la funcionalización de las nanopartículas con aminoácidos para modificar su capacidad de internalización celular.

## 5.- OBJETIVOS

### 5.1.- Objetivo General

Sintetizar nanopartículas de magnetita superparamagnética recubiertas de tres diferentes aminoácidos con propiedades distintas en su estructura química marcadas con fluoresceína y verificar *in vitro* la internalización de las partículas dentro de la célula.

### 5.2.- Objetivos particulares

- \* Sintetizar nanopartículas magnéticas de magnetita por el método de coprecipitación.
- \* Recubrir las nanopartículas de magnetita con aminoácidos de diferente naturaleza química. Histidina y lisina (aminoácidos básicos) y fenilalanina (aminoácido aromático no polar).
- \* Marcar con fluoresceína los sistemas de magnetita-aminoácidos.
- \* Caracterizar mediante las técnicas de espectroscopía de infrarrojo, Potencial Z, Difracción de Rayos X y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) los diferentes sistemas de magnetita, magnetita-aminoácidos y para el complejo de magnetita-aminoácidos-fluoresceína.
- \* Realizar ensayo *in vitro* con líneas celulares para determinar si nanopartículas marcadas se internalizan dentro de la célula.

## 6.- HIPÓTESIS

El recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con aminoácidos modificará la permeación de éstas a través de la célula.

## 7.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 7.1.- Materiales

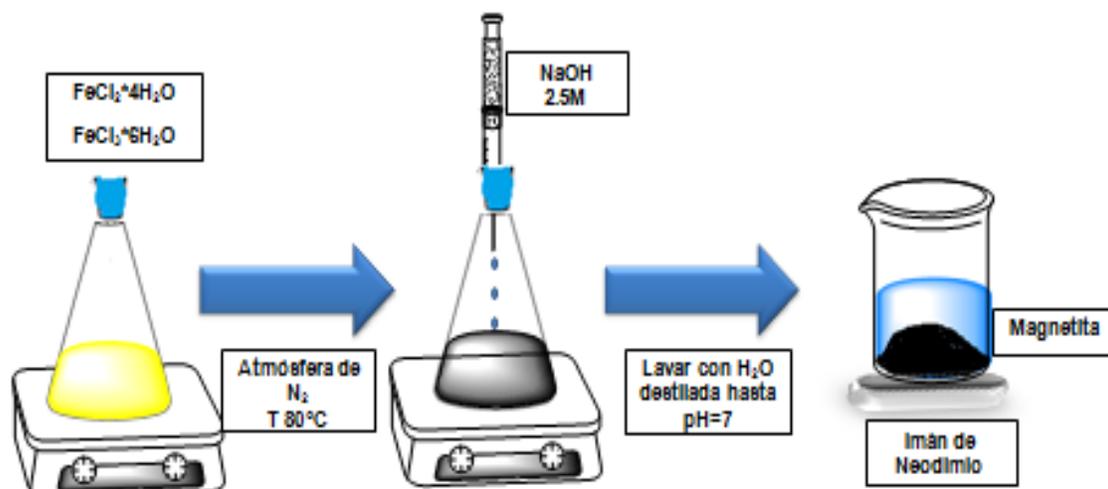
- \* Cloruro de hierro II tetrahidratado  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  con una pureza de > 99.0% y Cloruro de hierro III hexahidratado  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  con una pureza de 97% ambos marca Sigma-Aldrich, USA.
- \* L(+)-lisina monohidrato marca MERCK, Alemania.
- \* L-histidina y L-fenilalanina marca SIGMA, USA.
- \* Fluoresceína de sodio marca SIGMA-ALDRICH F-6377-100G
- \* Campana de Flujo, Nuaire, LabGard C-II, T-A2..
- \* Incubadora, ShellLab, 3552.
- \* Centrifuga, Hettich Zentrifugen, Rotina 380 R.
- \* Molecular Devices, ImageXpress Micro.

### 7.2.- Metodología

#### 7.2.1.- Elaboración de magnetita hidrofílica

Se pesaron las sales de hierro con una relación estequiometría 2:1  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.552 g) y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1.5 g). Se disolvieron las sales de hierro en 30 mL de agua destilada, posteriormente se inyectó  $\text{N}_2$  (g) a la disolución para la obtención de una atmósfera inerte. Después se calentó la disolución de las sales de hierro en un baño de aceite a una temperatura de 80°C durante 15 minutos; una vez homogenizada la temperatura se le adicionó 12 mL de NaOH 2.5 M agitando vigorosamente para homogenizar la mezcla, inmediatamente se logró la formación de un precipitado negro (magnetita). El esquema de reacción se ilustra en la figura 9. La magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se lavó con agua destilada decantando con ayuda de un imán de neodimio de 14000 Gauss hasta un pH de 7 y finalmente se dejó secar a temperatura ambiente.

Se sintetizaron 3 gramos de magnetita



**Figura 9.** Método de coprecipitación para la síntesis de magnetita.

### 7.2.2.- Síntesis de magnetita con aminoácidos

Se pesaron 300 mg de magnetita seca para cada lote. Se pesó 122 mg de lisina, 136 mg de fenilalanina y 128 mg de histidina para cada lote correspondiente.

Se le agregaron 50 mL de agua desionizada, posteriormente se inyectó nitrógeno para tener atmosfera inerte y se agitó mecánicamente a 200 rpm con una temperatura de 60°C durante 24 horas. Finalmente se lavaron las nanopartículas con agua desionizada y se dejan secar a temperatura ambiente.

### 7.2.3.- Síntesis de magnetita con aminoácidos y fluoresceína

Se sintetizaron tres lotes con concentraciones diferentes de fluoresceína con cada aminoácido. Las concentraciones se realizaron de acuerdo a una relación mol de la siguiente manera:

LOTE	AMINOÁCIDO	FLUORESCÉINA
1	10	1
2	10	5
3	0	10

**Tabla 5.** Relación molar del aminoácido y fluoresceína para cada lote sintetizado.

Se pesaron 150 mg de magnetita seca, para cada síntesis.

En el caso de las dos síntesis de magnetita-lisina-fluoresceína para el lote1 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 61 mg de lisina y 13.8 mg de fluoresceína. Para el lote 2 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 61 mg de lisina y 69 mg de fluoresceína. Se colocaron los polvos en un matraz erlenmeyer de 50 mL con 30 mL de agua desionizada cubriendo los matraces con papel aluminio para evitar una degradación de la fluoresceína, se agitó a 200 rpm con agitación mecánica a una temperatura de 60°C durante 24horas, finalmente se lavó la magnetita resultante con agua desionizada hasta la pérdida completa de fluoresceína en el medio.

En el caso de las dos síntesis de magnetita-histidina-fluoresceína para el lote 1 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 64 mg de histidina y 13.8 mg de fluoresceína. Para el lote 2 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 64 mg de histidina y 69 mg de fluoresceína. Se colocaron los polvos en un matraz erlenmeyer de 50 mL con 30 mL de agua desionizada cubriendo los matraces con papel aluminio para evitar una degradación de la fluoresceína, se agitó a 200 rpm con agitación mecánica a una temperatura de 60°C durante 24 horas, finalmente se lavó la magnetita final con agua desionizada hasta la perdida completa de fluoresceína en el medio.

En el caso de las dos síntesis de magnetita-lisina-fluoresceína para el lote 1 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 68 mg de fenilalanina y 13.8 mg de fluoresceína. Para el lote 2 se pesaron 150 mg de magnetita seca, 68 mg de fenilalanina y 69 mg de fluoresceína. Se colocaron los polvos en un matraz erlenmeyer de 50 mL con 30 mL de agua desionizada cubriendo los matraces con papel aluminio para evitar una degradación de la fluoresceína, se agitó a 200 rpm con agitación mecánica a una temperatura de 60°C durante 24 horas, finalmente se lavaron las muestras finales con agua desionizada hasta la perdida completa de fluoresceína en el medio.

En el caso del lote 3 se pesó 150 mg de magnetita seca y 138 mg de fluoresceína. Se colocaron los polvos en un matraz erlenmeyer de 50 mL con 30 mL de agua desionizada cubriendo el matraz con papel aluminio para evitar una degradación de la fluoresceína, se agitó a 200 rpm con agitación mecánica a una temperatura de 60°C durante 24 horas, finalmente se lavó el lote con agua desionizada hasta la pérdida completa de fluoresceína en el medio.

#### **7.2.4.- Caracterización**

##### **7.2.4.1.- Espectroscopía de infrarrojo**

La espectroscopía infrarroja se realizó en un espectrofotómetro de FTIR/FIR modelo Spectrum 400 de Perkin-Elmer, la muestra se trabajó en polvo.

##### **7.2.4.2.- Potencial Z**

El potencial Z se obtuvo mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz, (DLS por sus siglas en inglés), en el equipo Zetasizer Nano Zen 3600, en una dispersión acuosa con una concentración de 0.01 mg/mL a una temperatura de 25°C y un pH de 7.

##### **7.2.4.3.- Difracción de rayos X de polvos**

Para la caracterización con esta técnica se ocuparon 200 mg de cada sistema magnetita, magnetita-lisina, magnetita-fenilalanina, magnetita-histidina; secas y en polvo fino. Se utilizó un difractor de rayos X de la marca Bruker, modelo D2 Phaser con fuente de cobre, detector Lynxeye y una longitud de onda de 1.54184Å.

##### **7.2.4.4.- Microscopia electrónica de transmisión**

Se realizó TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) en el Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 2010. Se trabajó un voltaje de aceleración de 200kV, resolución 0.19nm.

### **7.2.5.- Ensayo *in vitro***

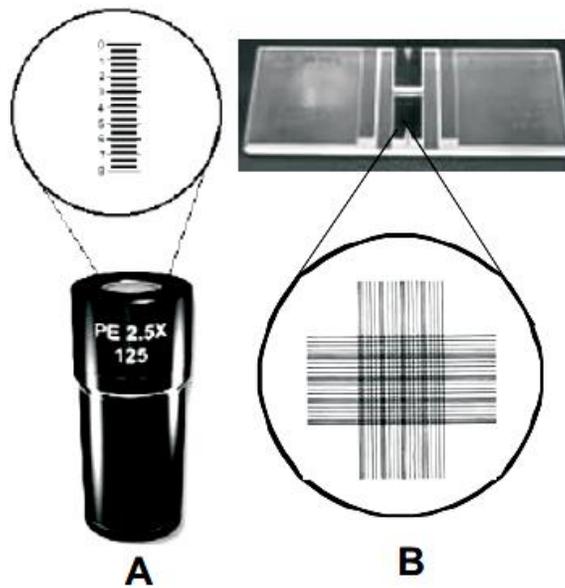
Estos ensayos se realizaron en las instalaciones de la UNIPREC con la ayuda de los investigadores

### **7.2.6.- Proliferación Celular**

Las células se descongelaron en un baño María a 37°C aproximadamente 2 minutos. Se trasvasaron a un tubo falcón y se lavan con medio de cultivo para eliminar el DMSO y el agua. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantaron y se resuspendieron en el medio de cultivo EMEM 5 mL (MEDIO BASAL DE EAGLE), después se trasvasaron a una caja con filtro estéril y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Posteriormente a que las células se adhirieron a la caja se cambió el medio de cultivo y se volvió a incubar a 37°C durante 3 días. Se revisó la caja en microscopio para ver si ya estaba llena de células, una vez llena la caja se le agregó tripsina para despegar las células de la caja se incubaron 5 minutos, luego se inhibió la tripsina con un inhibidor enzimático y se centrifugo a 1500 rpm 5 minutos. Se decantó y el botón se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo finalmente se colocó en una caja de filtro grande hasta que se llenó completamente de células.

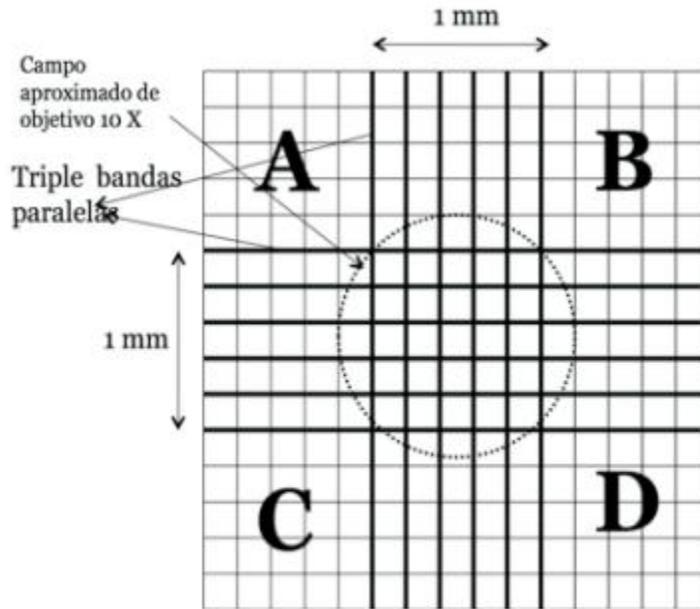
#### **7.2.6.1.- Conteo de células**

Se despegaron las células de la caja con filtro nuevamente con tripsina, posteriormente se inhibe la reacción de la tripsina y se cambia el medio de cultivo. Una vez teniendo el medio de cultivo nuevo se procede a la cuenta de células con ayuda de la cámara de Neubauer (Figura 10).



**Figura 10.** Escalas micrométricas comúnmente usadas. A Ocular micrométrico: con una escala en el interior del ocular. B Portaobjetos micrométrico: la imagen muestra una cámara de Neubauer que permite la medición de longitudes, áreas y volúmenes con gran precisión.<sup>30</sup>

El recuento celular se realizó en la cámara de Neubauer: Para ello se añadió una pequeña cantidad de muestra, 10  $\mu\text{l}$  de la muestra de las células y azul de tripán en la cámara. Una vez enfocadas las cuadrículas se cuentan las células que hay en los recuadros divididos en 16 cuadrículas. Ver esquema de recuadro A, B, C y D de la Figura 11.



Conjunto de 16 cuadrículas.

Volumen de recuento= 1mm x 1mm x 0.1mm;  $V= 0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3$

Factor de la cámara=  $10^4$

**Figura 11.** Forma de conteo de células en la cámara de Neubauer. <sup>30</sup>

### 7.2.7.- Realización de ensayo *in vitro* con los lotes de magnetita-aminoácido-fluoresceína

Los ensayos se realizaron con dos líneas celulares HeLa y NCTC clone 929 las cuales se sembraron en dos microplacas de 96 pozos cada placa con una línea celular, las cuales contenían 20000 células por pozo, se incubaron a 37°C durante 24horas. Posteriormente se quitó el medio y se colocaron los lotes sintetizados de la magnetita-aminoácido-fluoresceína a diferentes concentraciones con los tres aminoácidos distintos (Figura 13).

En el ensayo *in vitro* de la línea celular HeLa se utilizaron concentraciones de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL y 1000 µg/mL, con cada uno de los siete lotes diferentes.

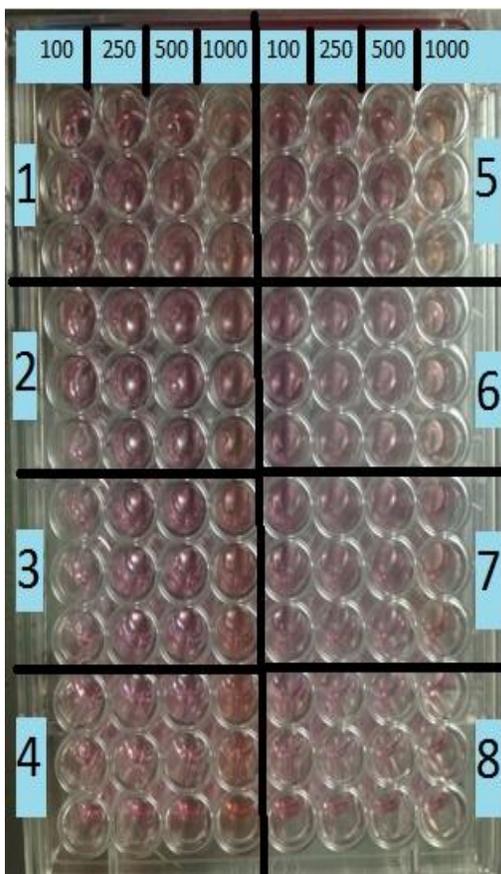
Para el ensayo *in vitro* de la línea celular NCT clone 929 se utilizaron concentraciones de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL, con cada uno de los siete lotes diferentes.

Se agregó 90 µL de cada lote al pozo de la microplaca con 10µL de medio de cultivo. Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Al término de la incubación se fijaron las células con 100 µL de ácido tricloroacético al 10% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se lavan 5 veces con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez fijadas se les agregó 10 µL de DAPI dejándolo reaccionar 30 minutos.



**Figura 12.** Material durante el proceso del ensayo *in vitro*.

Finalmente se leyó la placa en el microscopio confocal.



1	Magnetita-Fenilalanina-Fluoresceína (10:1)
2	Magnetita-Fenilalanina-Fluoresceína (10:5)
3	Magnetita-Histidina-Fluoresceína (10:1)
4	Magnetita-Histidina-Fluoresceína (10:5)
5	Magnetita-Lisina-Fluoresceína (10:1)
6	Magnetita-Lisina-Fluoresceína (10:5)
7	Magnetita-Fluoresceína (1:1)
8	Blanco

**Figura 13.** Placa con medio de cultivo, células y la muestra por triplicado cada concentración correspondiente como lo indica la tabla de al lado.

## 8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

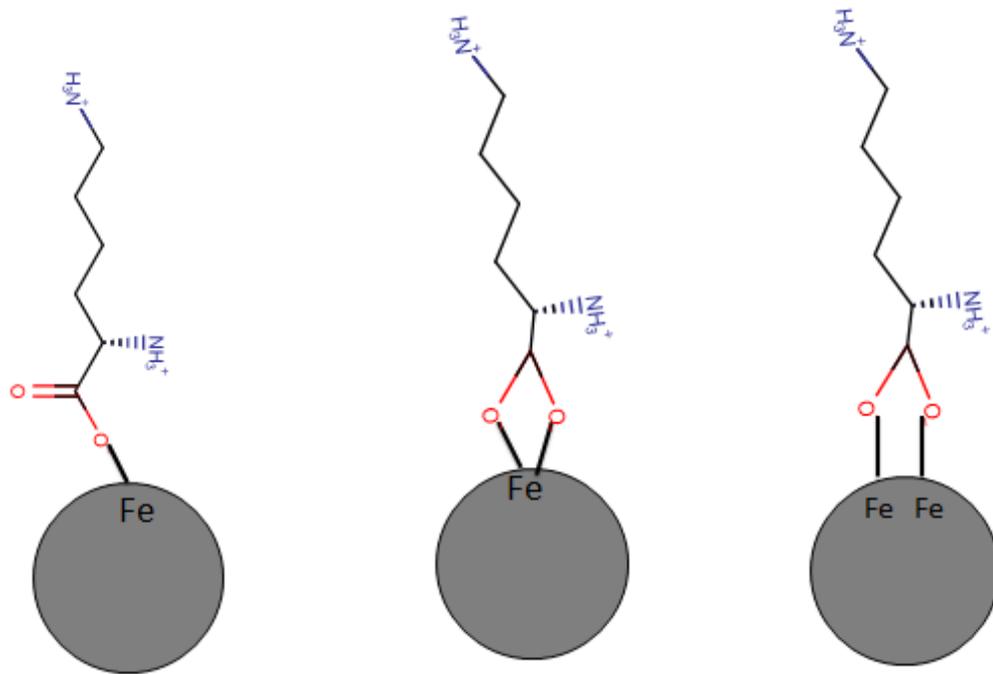
### 8.1.- Síntesis y caracterización de magnetita y magnetita con aminoácidos

Inicialmente se sintetizó la magnetita por el método de coprecipitación en donde se disolvieron los cloruros de hierro II y hierro III en agua destilada para homogenizar el medio, cuando se le inyectó nitrógeno fue para obtener una atmósfera inerte y de este modo evitar que se oxidaran las nanopartículas de magnetita al adicionar el NaOH, la temperatura es un factor importante de mantener ya que si la temperatura varía demasiado, las características de los nanocristales obtenidos cambiaría principalmente en su tamaño. La reacción presentada a continuación es la que se llevó a cabo.

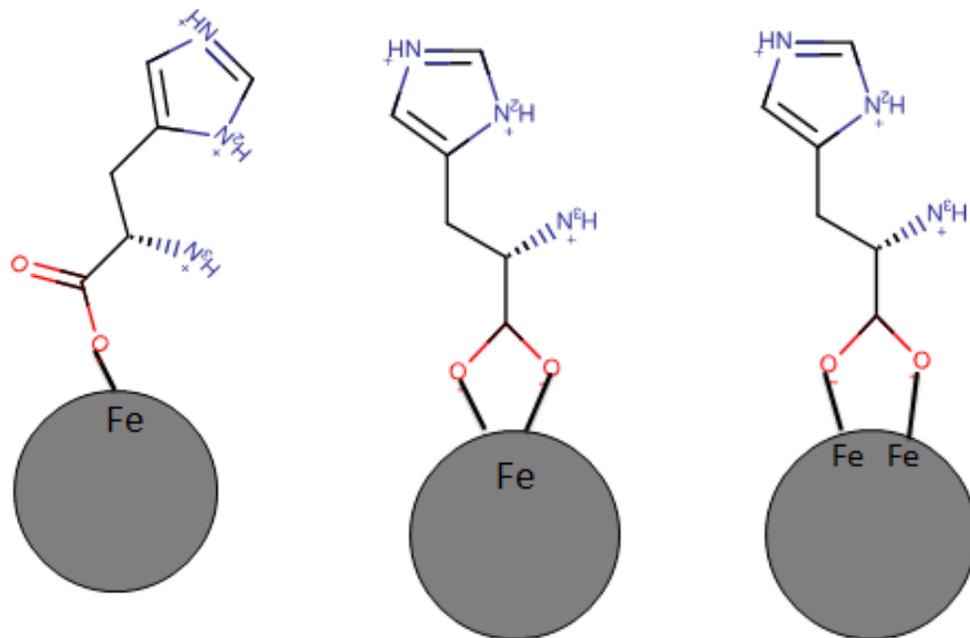


La magnetita obtenida posteriormente se caracterizó mediante las técnicas analíticas descritas posteriormente.

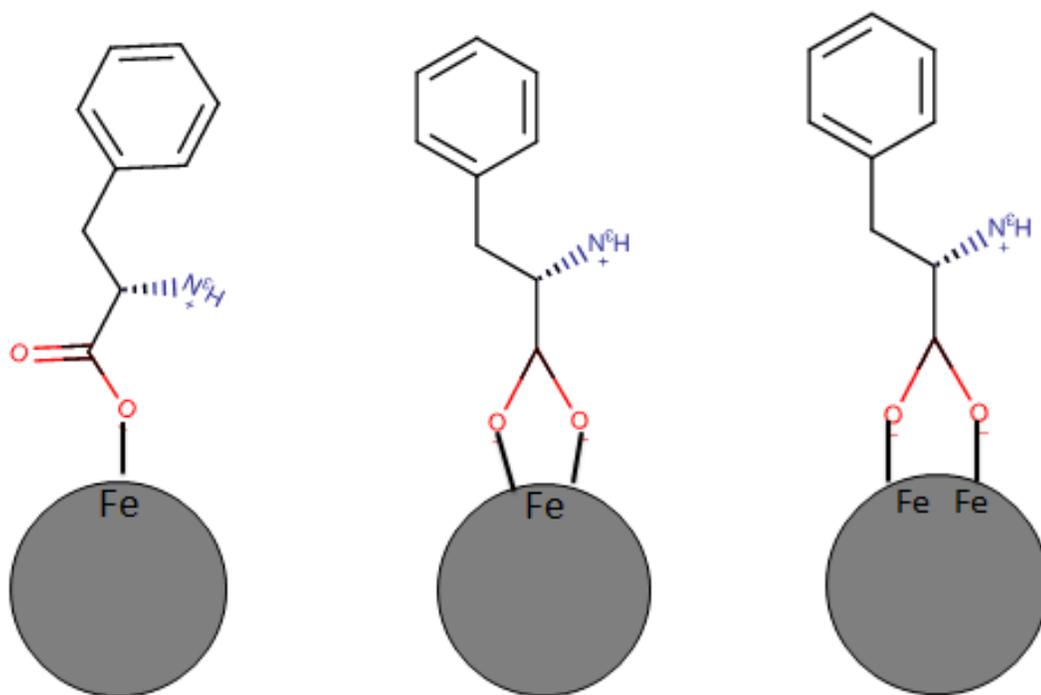
Una vez sintetizado el lote de magnetita se procedió a la modificación superficial con tres aminoácidos de estructuras químicas diferentes, la lisina, histidina y fenilalanina, por lo que se proponen tres formas diferente de adsorberse cada aminoácido en la superficie de la magnetita como lo muestra la figura 14, para el caso de la lisina, la figura 15 para el caso de la histidina y finalmente la figura 16, para el caso de la fenilalanina. Se puede observar que en todas las figuras el grupo carboxilato de los aminoácidos es el que se coordina con la superficie de la magnetita dejando el grupo amino libre que se protonará en presencia de medio neutro o ligeramente ácido<sup>3</sup> Estos tres sistemas diferentes también se caracterizaron mediante técnicas analíticas.



**Figura 14.** Posibles estructuras químicas entre la magnetita y la lisina<sup>1</sup>.



**Figura 15.** Posibles estructuras químicas entre la magnetita y la histidina



**Figura 16.** Posibles estructuras químicas entre la magnetita y la fenilalanina.

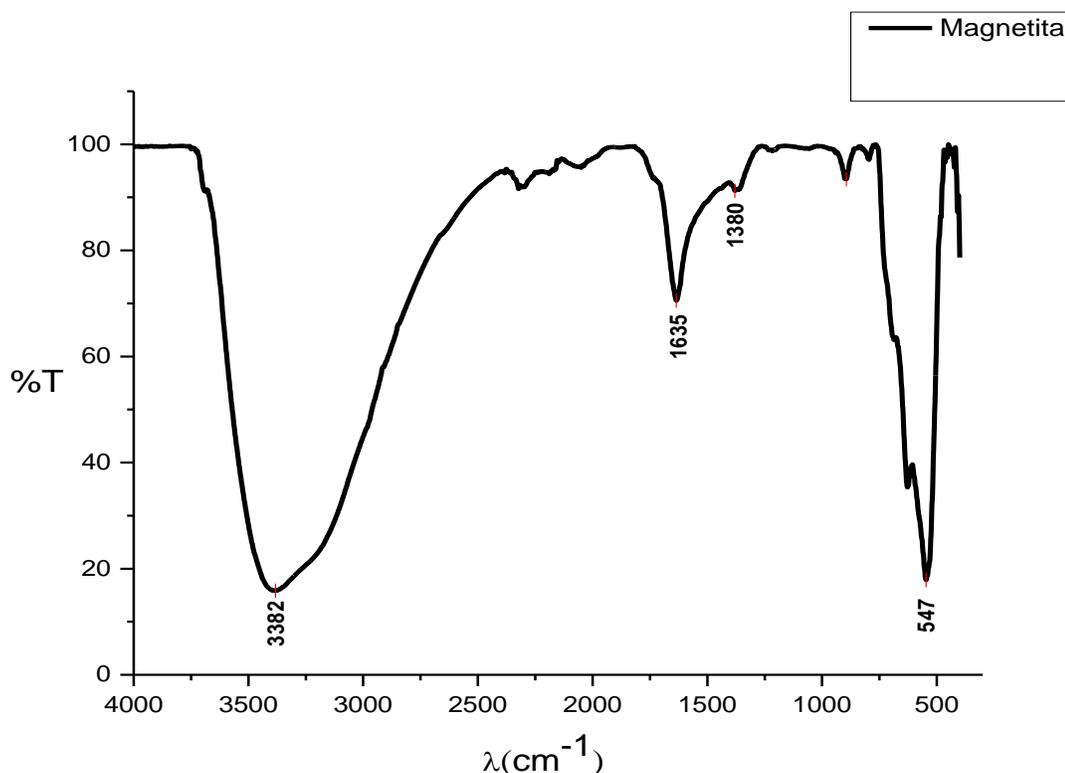
Las tres posibles coordinaciones de la magnetita con los aminoácidos son igual de probables<sup>1</sup> por lo que se pretende que en el mismo lote se encuentre cada aminoácido coordinado con la magnetita de las tres maneras diferentes, sin embargo, lo más importante de este trabajo es el grupo amino que quedó libre.

## 8.2.- Espectroscopía de Infrarrojo

Es importante verificar que los aminoácidos se unen a la nanopartícula de magnetita, para esto se puede utilizar espectroscopia de infrarrojo y determinar las bandas asociadas a los modos normales de vibración de los aminoácidos o los de la magnetita en el espectro.

En el espectro infrarrojo de la magnetita encontramos en la banda de  $1635\text{ cm}^{-1}$  la señal del estiramiento del carboxilato del ácido carboxílico mientras que en la banda intensa y ancha de  $3382\text{ cm}^{-1}$  se caracteriza por el estiramiento del grupo

O-H finalmente la banda de  $547\text{ cm}^{-1}$  característico del estiramiento Fe-O.<sup>39</sup> Estas bandas se observan en la figura 17.



**Figura 17.** Espectro infrarrojo de la magnetita.

Por otro lado al modificar la superficie de la magnetita también se realizó un espectro de infrarrojo de cada una de las muestras de magnetita modificada superficialmente para comprobar que efectivamente la modificación superficial se llevó a cabo.

A continuación se comentan los espectros de infrarrojo de la magnetita recubiertas con fenilalanina, histidina y lisina.

Como se pueden observar en la figura 18, las bandas localizadas en  $3359\text{ cm}^{-1}$ ,  $3351\text{ cm}^{-1}$  y  $3372\text{ cm}^{-1}$  representan el alargamiento N-H enlazamiento de hidrógeno de la amina primaria; las bandas en  $1604\text{ cm}^{-1}$ ,  $1607\text{ cm}^{-1}$  y  $1609\text{ cm}^{-1}$  corresponden a estiramiento simétrico N-H ( $-\text{NH}_3^+$ ) en los espectros Mag-Phe, Mag-Hist y Mag-Lys respectivamente.<sup>40,41</sup>

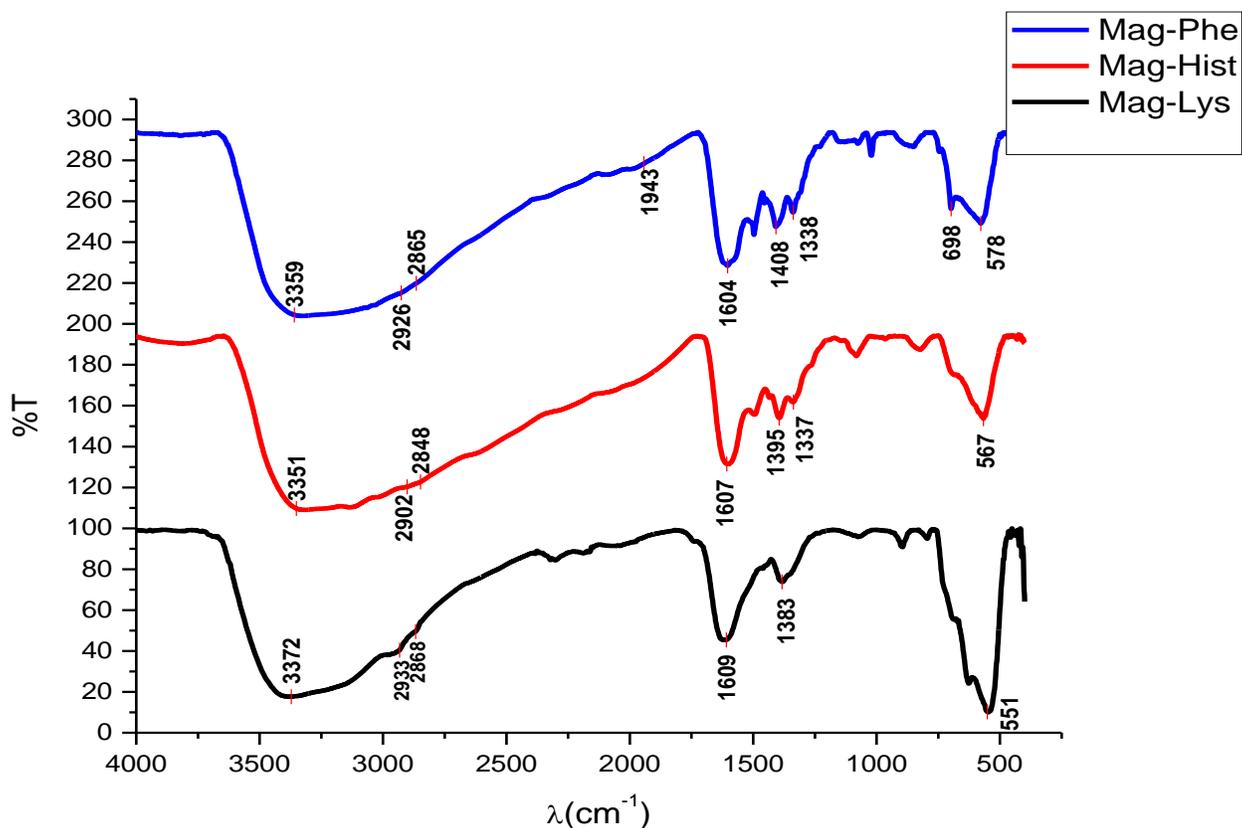
En el caso del espectro Mag-Phe la banda que caracteriza el grupo aromático de la fenilalanina se localiza en  $1943\text{ cm}^{-1}$  representado en la figura 18.<sup>29</sup>

Después del recubrimiento es de suma importancia comprobar que en nuestro sistema sigue presente la magnetita por lo que se observa en la figura 18 las bandas características de la vibración de Fe-O en  $578\text{ cm}^{-1}$ ,  $567\text{ cm}^{-1}$  y  $551\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a Mag-Phe, Mag-Hist y Mag-Lys respectivamente.<sup>13</sup>

El recubrimiento de la magnetita con fenilalanina lo comprueban las bandas en  $2926\text{ cm}^{-1}$  y  $2865\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a grupos  $-\text{CH}_2$  asimétricos y simétricos respectivamente en la banda de  $1408\text{ cm}^{-1}$  absorben los  $-\text{CH}_2$  enlazados con grupo carbonilo, mientras que en la banda de  $1338\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces de hidrogeno intramoleculares(figura 18).<sup>3,13</sup>

El recubrimiento de la magnetita con histidina lo comprueban las bandas en  $2902\text{ cm}^{-1}$  y  $2848\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a grupos  $-\text{CH}_2$  asimétricos y simétricos respectivamente en la banda de  $1395\text{ cm}^{-1}$  absorben los  $-\text{CH}_2$  enlazados con grupo carbonilo, mientras que en la banda de  $1337\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los enlaces de hidrógeno intramoleculares(figura 18).<sup>41</sup>

El recubrimiento de la magnetita con lisina lo comprueban las bandas en  $2933\text{ cm}^{-1}$  y  $2868\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a grupos  $-\text{CH}_2$  asimétricos y simétricos respectivamente en la banda de  $1383\text{ cm}^{-1}$  absorben los  $-\text{CH}_2$  enlazados con grupo carbonilo(figura 18).<sup>41</sup>



**Figura 18.** Espectros de Infrarrojo de la Mag-Phe, magnetita recubierta con fenilalanina, Mag-Hist, magnetita recubierta con histidina, y Mag-Lys, magnetita recubierta con lisina

En cada uno de los espectros se lograron distinguir las vibraciones normales de cada aminoácido coordinado con la magnetita unida a través del grupo carboxilato como era de esperarse y de acuerdo a lo informado en la literatura para funcionalizaciones similares<sup>1,13</sup> y las vibraciones normales de la magnetita desnuda lo que nos indica que efectivamente tenemos en nuestros sistemas magnetita recubierta con aminoácido.

### 8.3.- Potencial Z de la magnetita modificada superficialmente con aminoácidos

Las partículas de magnetita y las que se modificaron con aminoácido se colocaron en suspensión de agua y se midió el potencial Z a través de un equipo de dispersión dinámica de luz, la concentración utilizada fue de 0.01 mg/mL.

El potencial Z nos permite saber la estabilidad de una dispersión, en este caso de la magnetita en agua y magnetita modificada su superficie con aminoácidos en agua, debido a que las fuerzas de atracción entre las partículas y los contraiones atraídos son inversamente proporcionales a la distancia entre ellas, es decir, en el caso de la magnetita sin modificación superficial presenta un potencial Z de -18.6mV (tabla 6) por lo que va a atraer iones positivos fuertemente ligados, lo que se conoce como la capa de Stern como consecuencia estas cargas atraerán contraiones para estabilizar sus cargas, formando la llamada doble capa difusa, de esta manera aumentando la distancia entre partículas que como consecuencia se generará un potencial eléctrico por la distribución de cargas de la doble capa eléctrica. En general, cuando los valores de potencial zeta aumentan, también aumenta la interacción con el disolvente (agua) y la repulsión entre partículas, por lo que estas tienden a permanecer en dispersión y no precipitar o agregarse.

Cuando se realizó el recubrimiento con los aminoácidos se logró aumentar el potencial Z de las partículas, es decir que este sistema de magnetita con aminoácidos aumentó la interacción con el agua que es nuestro disolvente dando como resultado una distancia mayor entre partículas, pero no suficientemente grande como para no atraerse y sedimentarse.

De la misma manera se analizan los resultados de potencial Z para la magnetita modificada en su superficie por los diferentes aminoácidos solo que en estos casos se toma en cuenta la carga que se encuentra al final del sistema, es decir la carga generada por los aminoácidos de su grupo libre terminal que en este caso al ser el grupo amino protonado  $\text{NH}_3^+$  libre la carga de nuestros sistemas es positivo en donde la capa de Stern estará conformada por iones negativos fuertemente ligados y la capa difusa conformada por los contraiones positivos que nos generaron un potencial eléctrico positivo. Sin embargo, ninguno de nuestros sistemas es lo suficientemente estable pues están dentro del intervalo de -30 mV a 30 mV, en donde una dispersión no es completamente estable.

NOMBRE DE LA MUESTRA	POTENCIAL Z (mV)
<b>Magnetita</b>	-18.4
<b>Magnetita-Lisina</b>	22.3
<b>Magnetita-Histidina</b>	21.7
<b>Magnetita-Fenilalanina</b>	21.1

**Tabla 6.** Potencial Z de la magnetita sin recubrimiento, magnetita recubierta con lisina, magnetita recubierta con histidina y magnetita recubierta con fenilalanina.

El potencial Z de la magnetita sin modificación superficial es negativo, mientras que la magnetita modificada superficialmente con los aminoácidos tiene un potencial Z positivo debido a su grupo amino protonado lo que nos indica que efectivamente la adsorción de los aminoácidos se llevó de la manera esperada a un pH de 7.2+/-0.2.

#### 8.4.- Calorimetría Diferencial de Barrido

Esta técnica de caracterización nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada la sustancia a velocidad constante, en un intervalo de temperaturas<sup>42</sup>. En este caso se calentaron las muestras a una velocidad constante en un intervalo de temperatura de 25 °C a 450°C para observar las transiciones que presenta los diferentes sistemas mostrados en la figura 19.

La magnetita sin modificar ilustrada en el DSC de A) en atmósfera de oxígeno (O) y en atmósfera de nitrógeno (N). En atmósferas, de oxígeno y nitrógeno, se observa un proceso endotérmico en 107.5°C el que se atribuye a la evaporación del agua en las muestras al igual que el proceso endotérmico en 97°C en la magnetita con atmósfera de nitrógeno, también se puede observar que a partir de los 300°C en atmósfera de oxígeno la magnetita se empieza a oxidar, mientras que en atmósfera de nitrógeno no se observa ninguna transición hasta 350°C.

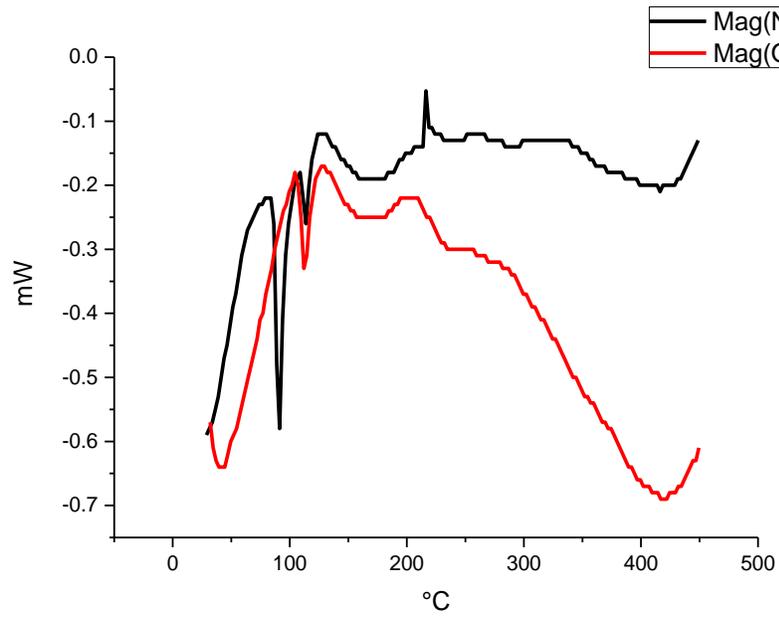
El DSC ilustrado en la figura 19 B, corresponde a las nanopartículas con histidina en atmósfera inerte de nitrógeno, ahí el pico endotérmico en 50°C se asigna posiblemente a la evaporación de agua, mientras que en atmósfera de oxígeno se

presenta a 107.5°C, se observa una temperatura de posible reacomodo molecular de la histidina o un posible desprendimiento del aminoácido de la magnetita en ambas atmosferas entre los 190°C y 200°C para finalmente a partir de 350°C descomponerse y oxidarse.

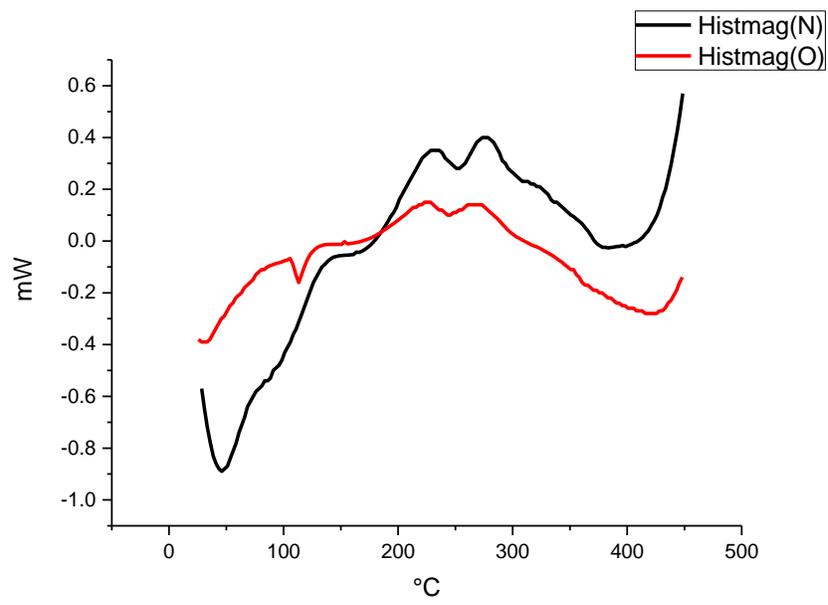
En la figura 19 C se encuentran los DSC de lisina, se observa que en 100°C y 107°C se pierde posiblemente agua en la muestra de magnetita recubierta con lisina en atmosfera de nitrógeno y oxígeno respectivamente, existe una temperatura en donde la lisina se pretende haya un reacomodo estructural entre los 180°C y 190°C, en 225°C se fusiona, finalmente a partir de 340°C se degrada y oxida la muestra.

Por último en la figura 19 D la magnetita se ilustran los experimentos de calorimetría diferencial de barrido de las nanopartículas de magnetita recubiertas con fenilalanina en donde la perdida de agua se encuentra posiblemente en 100 y 105°C en atmosfera de nitrógeno y oxígeno respectivamente, la fusión la fenilalanina se encuentra en 225°C y su degradación de la fenilalanina y la oxidación de la magnetita se lleva a partir de los 350°C.

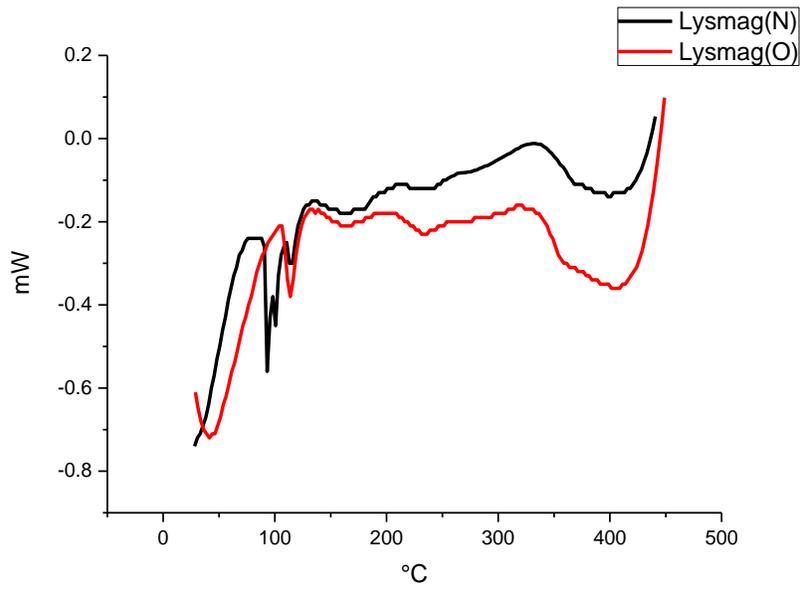
A)



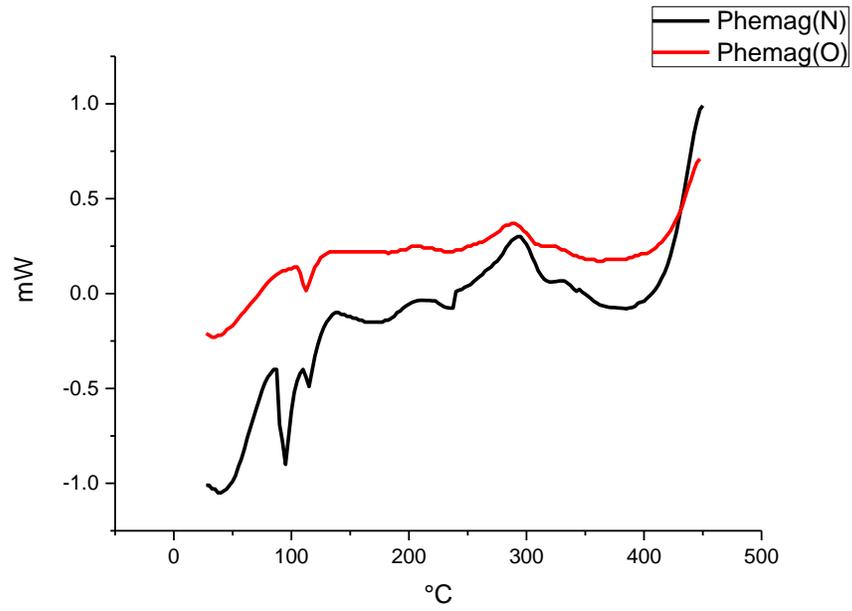
B)



C)



D)

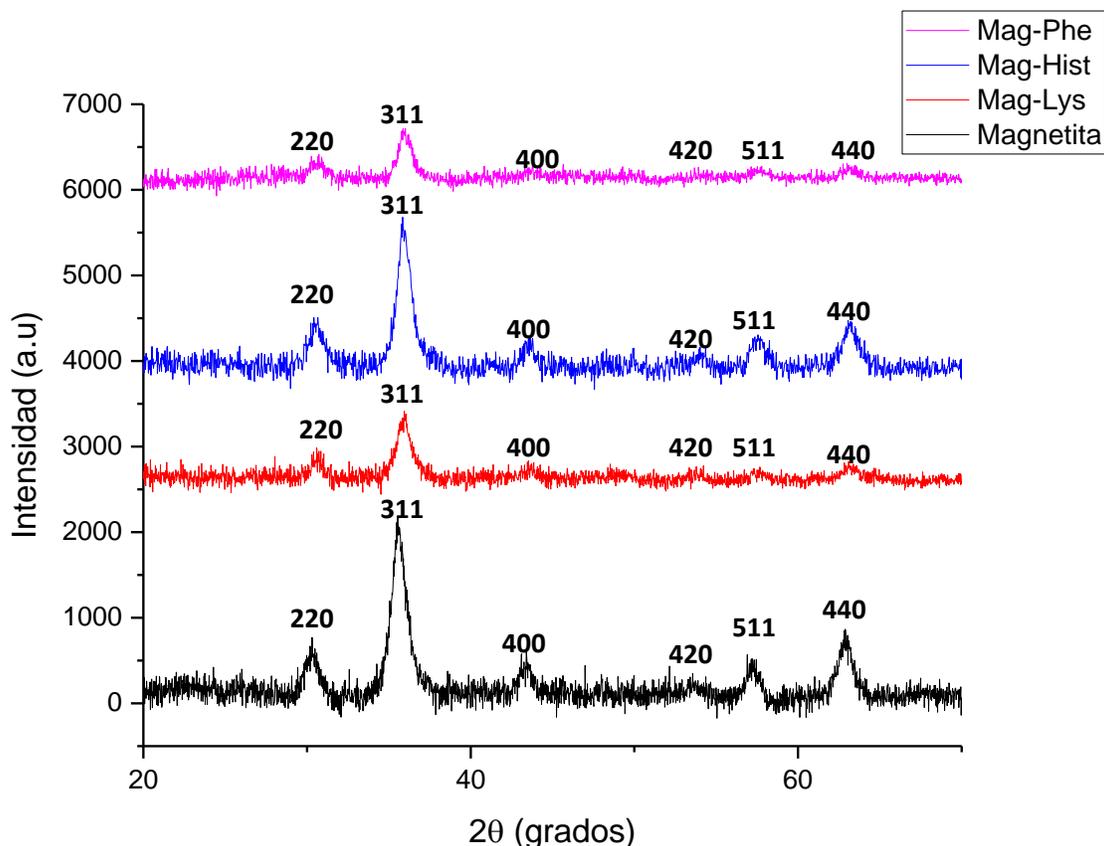


**Figura 19.** Análisis de calorimetría diferencial de barrido de la magnetita A), y los sistemas de magnetita con la superficie modificada con aminoácidos magnetita histidina B), magnetita lisina C) y magnetita fenilalanina D).

Estos gráficos son de gran ayuda para la caracterización, pues se puede observar nos da información acerca de las modificaciones que el sistema va sufriendo al aumentar la temperatura constantemente, pues hay diferencias entre la magnetita y cuando es modificada la superficie de la magnetita por los diferentes aminoácidos lo que indica que hay aminoácidos en la magnetita, sin embargo no hay referencias de cómo se comportan estos sistemas utilizando esta técnica por lo que realmente se relaciona a lo que posiblemente está sucediendo.

### **8.5.- Difracción de Rayos X de polvos**

En los estudios Difracción de Rayos X de polvos, se muestra una estructura cristalina de la magnetita y después de su modificación superficial con aminoácidos, en la cual no se observan cambios en el difractograma de ninguna de las muestras, esto indica claramente que la estructura de la magnetita queda intacta después de la modificación superficial, lo cual es un resultado esperado. Se observan los picos característicos de la magnetita en los siguientes valores  $2\theta$ ,  $30.4^\circ$ ,  $35.6^\circ$ ,  $43.1^\circ$ ,  $53.7^\circ$ ,  $57.4^\circ$  y  $62.8^\circ$  con los respectivos índices de refracción 220, 311, 400, 420, 511 y 440 identificando el pico más intenso en 311, <sup>12,18,39</sup> que corresponden a los planos de difracción de la magnetita observados en la figura 20.



**Figura 20.** Difractograma de la magnetita sin recubrimiento, magnetita recubierta con lisina, magnetita recubierta con histidina y magnetita recubierta con fenilalanina.

### 8.6.- Tamaño de partícula.

El patrón de difracción de rayos X en polvos de las partículas muy pequeñas, es dependiente del tamaño del monocristal, en particular la amplitud de la línea está directamente correlacionada con el diámetro según la ecuación de Scherrer (ecuación 1).

Para calcular el diámetro de las nanopartículas de magnetita y recubierta con aminoácidos; se ocupó el difractograma de cada uno de ellos tomando el pico más intenso del difractograma y con estos datos se hizo un ajuste no lineal a el modelo de distribución normal de Gauss, de ahí se obtuvo el parámetro de la amplitud de la línea como se muestra en la figura 21, posteriormente con ayuda del programa Tiny tools: XRD Crystallite Size Calculator basado en la ecuación de Scherrer se

obtuvo el diámetro de la magnetita, en donde solo se requiere introducir la amplitud y el máximo del pico.

$$D_p = \frac{0.94\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

Ecuación 1. Ecuación de Scherrer.

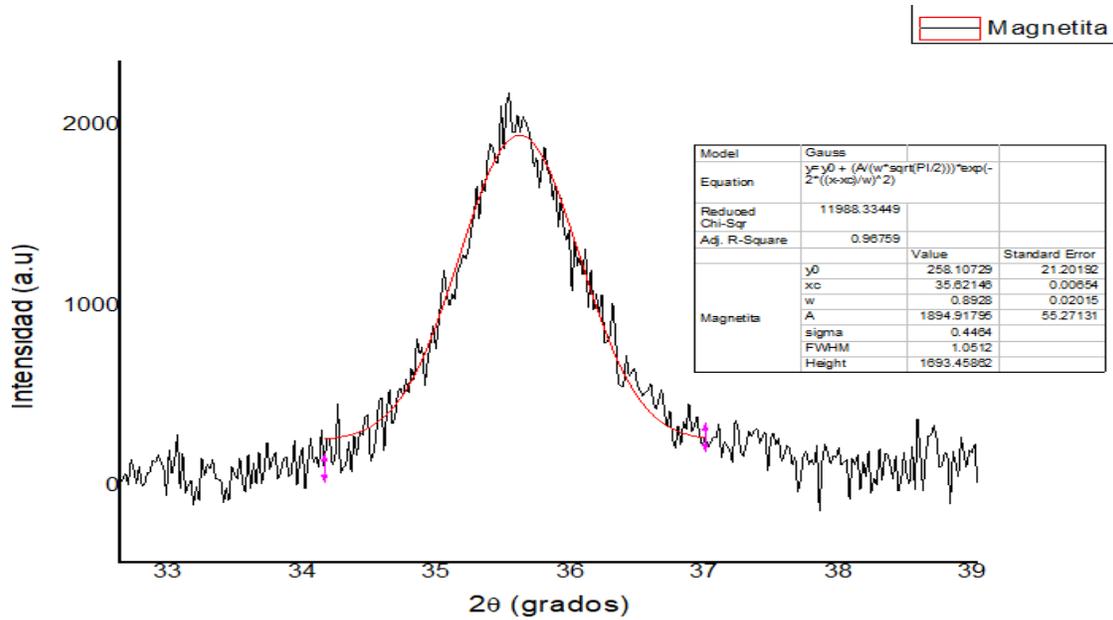
Donde:

$D_p$ : Tamaño promedio del cristal

$\beta$  : Ampliación de la línea en radianes

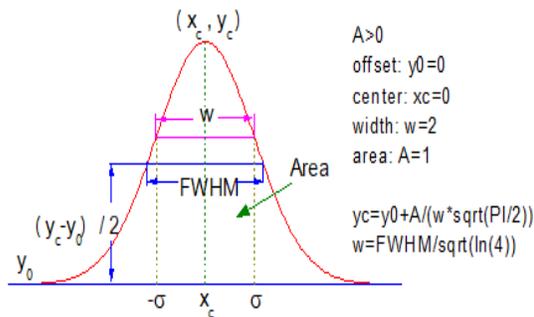
$\theta$  : Ángulo de Bragg

$\lambda$  : Longitud de onda de rayos X



Here is the online crystallite size calculator

### Dp Calculator : Using Scherrer formula



Wavelength:  Ang

Peak Width:  degrees

Peak Position:  degrees

Crystallite size:  nm

Lattice Strain:

**Figura 21.** Esquemas que ilustran como se obtuvieron los resultados de tamaño de partícula con el difractograma de rayos X de polvos.

Los resultados obtenidos del diámetro de la magnetita fueron los esperados al observar un tamaño alrededor de los 10 nm y 11 nm y el tamaño de magnetita desnuda menor de 8.790nm como se muestran en la tabla 7.

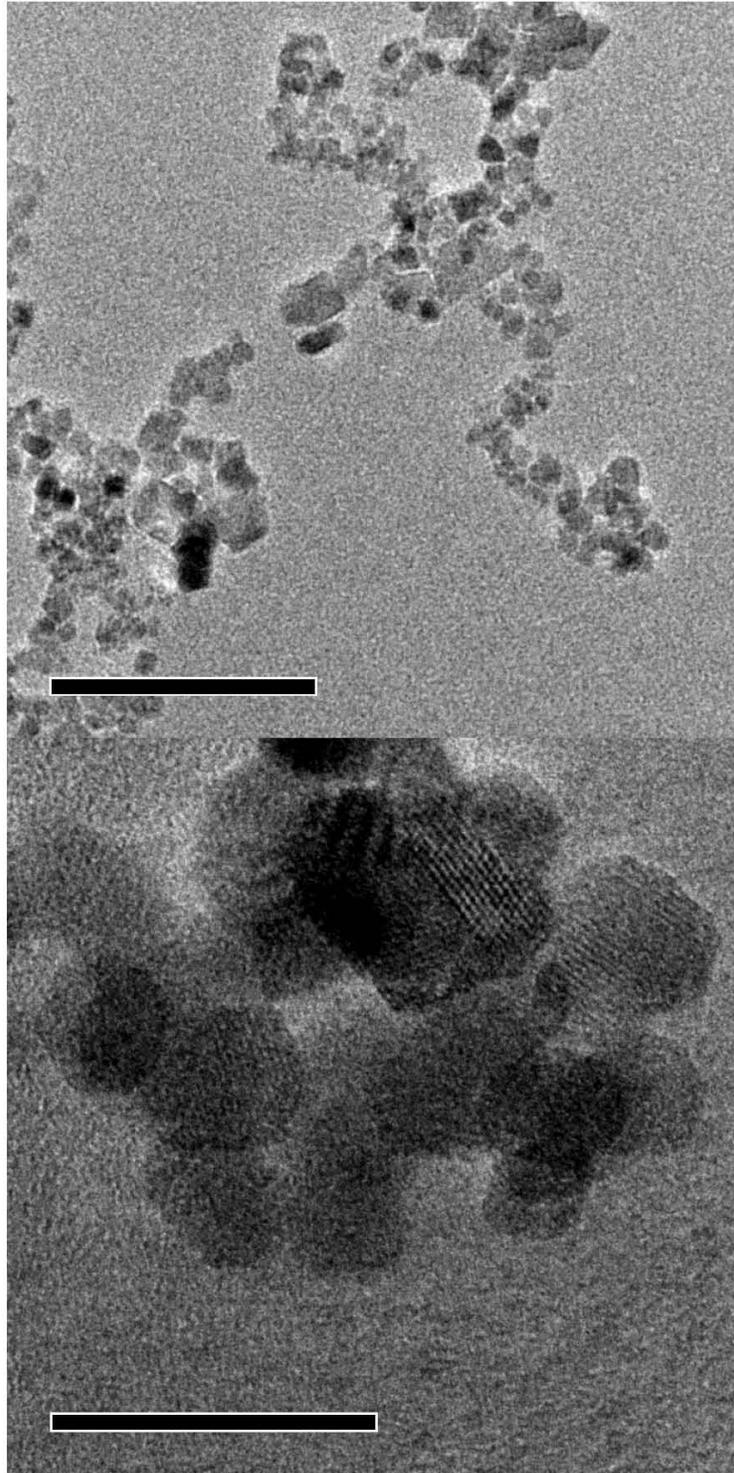
NOMBRE DE LA MUESTRA	TAMAÑO DE PARTÍCULA(nm)
<b>Magnetita</b>	8.790
<b>Magnetita-Lisina</b>	9.940
<b>Magnetita-Histidina</b>	10.080
<b>Magnetita-Fenilalanina</b>	10.510

**Tabla 7.** Tamaño de partícula real de la magnetita sin recubrimiento y con recubrimiento de aminoácido.

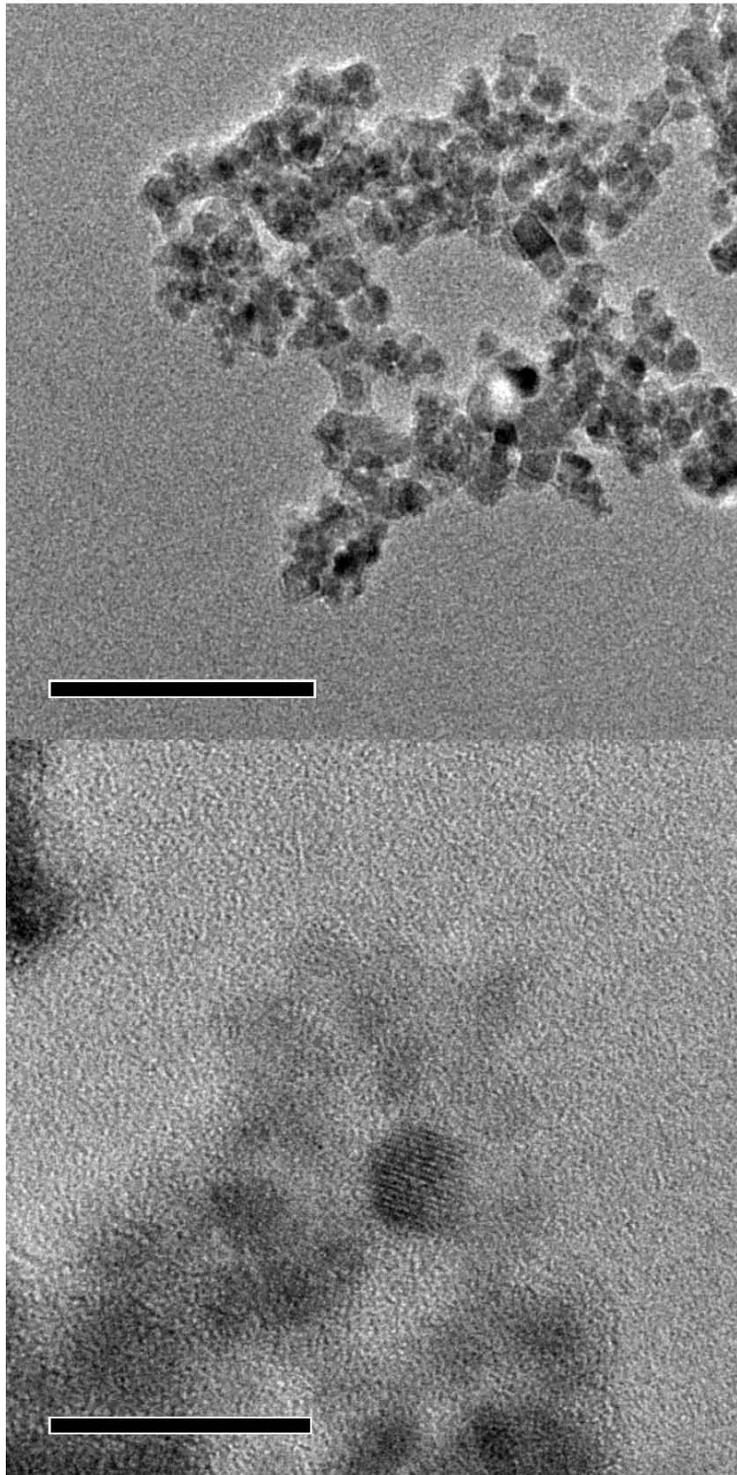
Estos tamaños de partícula son un poco más grandes que los reportados en la referencia Park, et al.<sup>3</sup> la cual reporta de un diámetro de 7.6 nm en el caso de magnetita-lisina, con histidina y fenilalanina, sin embargo, es consistente con la mayoría de los informes de nanopartículas de magnetita preparados vía coprecipitación.

### **8.7.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

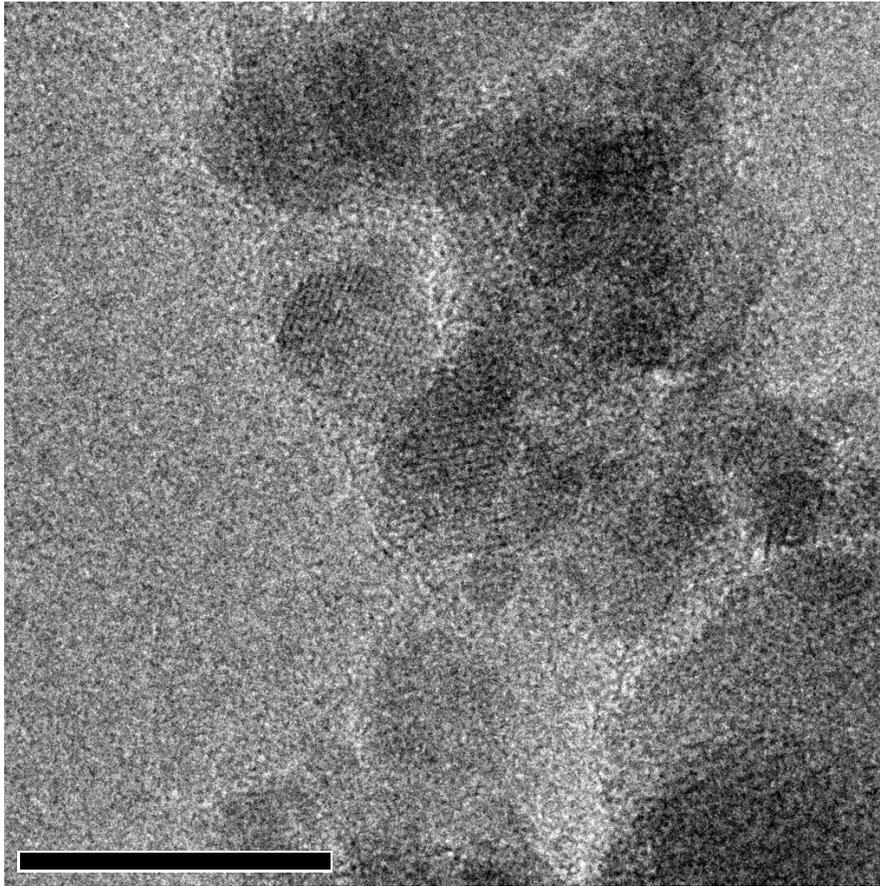
La microscopia electrónica de transmisión se realizó para ver físicamente las nanopartículas de magnetita sin recubrimiento y con recubrimiento de aminoácidos en donde se observa que en la figura 22, la magnetita sin recubrimiento, se distinguen las redes cristalinas y planos de la estructura, mientras que en las Figuras 23, 24 y 25 correspondientes a las muestras de magnetita recubiertas con aminoácidos, las imágenes están más difusas, esto se puede deber al recubrimiento orgánico que se puede descomponer durante el experimento TEM debido a la alta energía del haz de electrones, a pesar de esto es posible observar las nanopartículas y que su tamaño corresponde muy bien con la predicción hecha con difracción de rayos X.



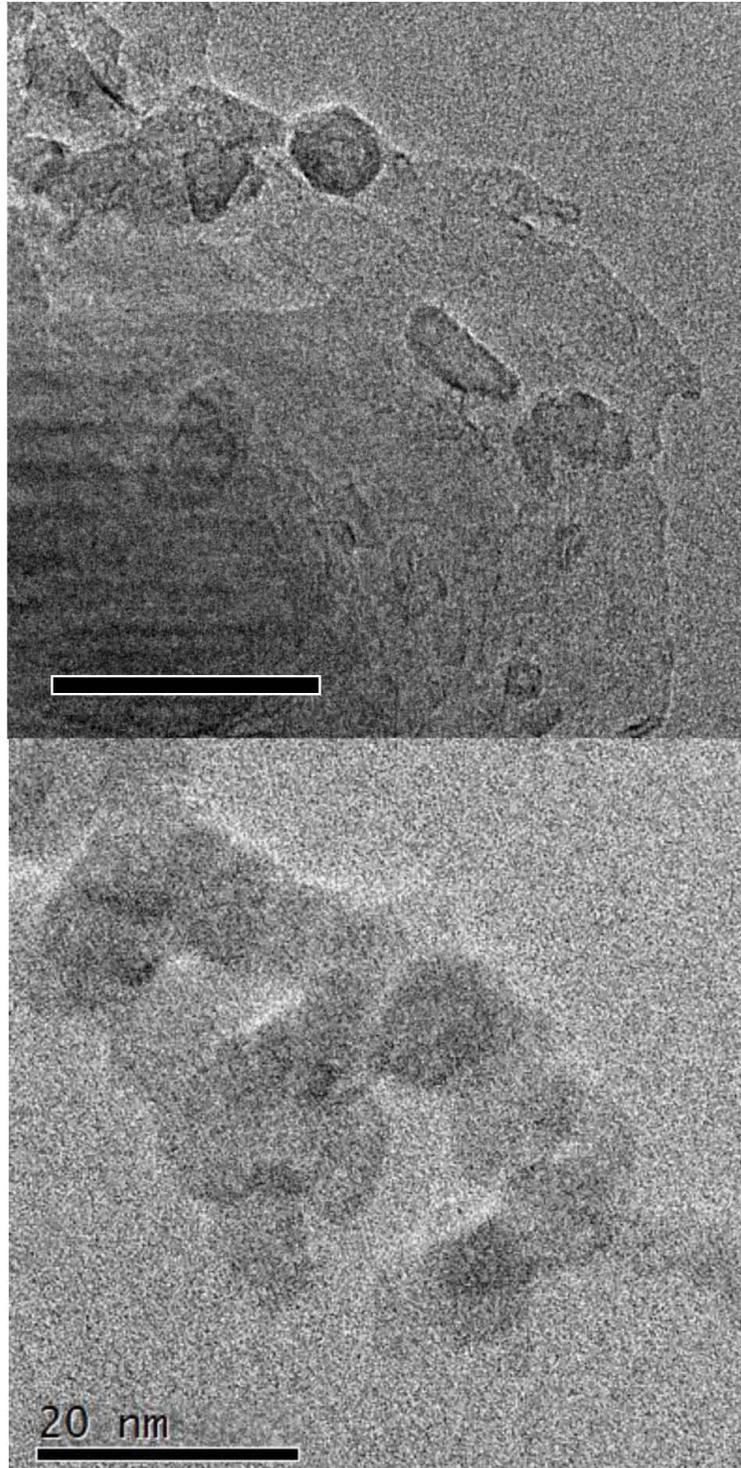
**Figura 22.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita sin recubrimiento.



**Figura 23.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con lisina.



**Figura 24.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con histidina.



**Figura 25.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la magnetita recubierta con fenilalanina.

En el caso de la muestra de magnetita recubierta con fenilalanina las nanopartículas están demasiado aglomeradas (figura 25) observando cristales

grandes y deformes por consecuencia del tipo de aminoácido que es aromático no polar que no logra la separación de nanopartículas de manera uniforme como los aminoácidos lisina e histidina (figuras 23 y 24)

### **8.8.- Síntesis y caracterización de magnetita con aminoácidos y fluoresceína**

Las síntesis de estos sistemas se realizaron con dos concentraciones de fluoresceína para determinar si la competencia entre el aminoácido y la fluoresceína era significativa, sin embargo, al obtener y analizar las técnicas de caracterización se prefirió trabajar solamente con la concentración en relación molar 10:1, es decir 10 veces más aminoácido que fluoresceína por que se podía visualizar mejor en la espectroscopía de infrarrojo la adsorción de los aminoácidos y la fluoresceína y los de relación molar 10:5 por la cantidad mayor de fluoresceína se veía muy sobresaturado el sistema.

Se marcaron con fluoresceína para poderlas seguir a través de las células en los estudios *in vitro*.

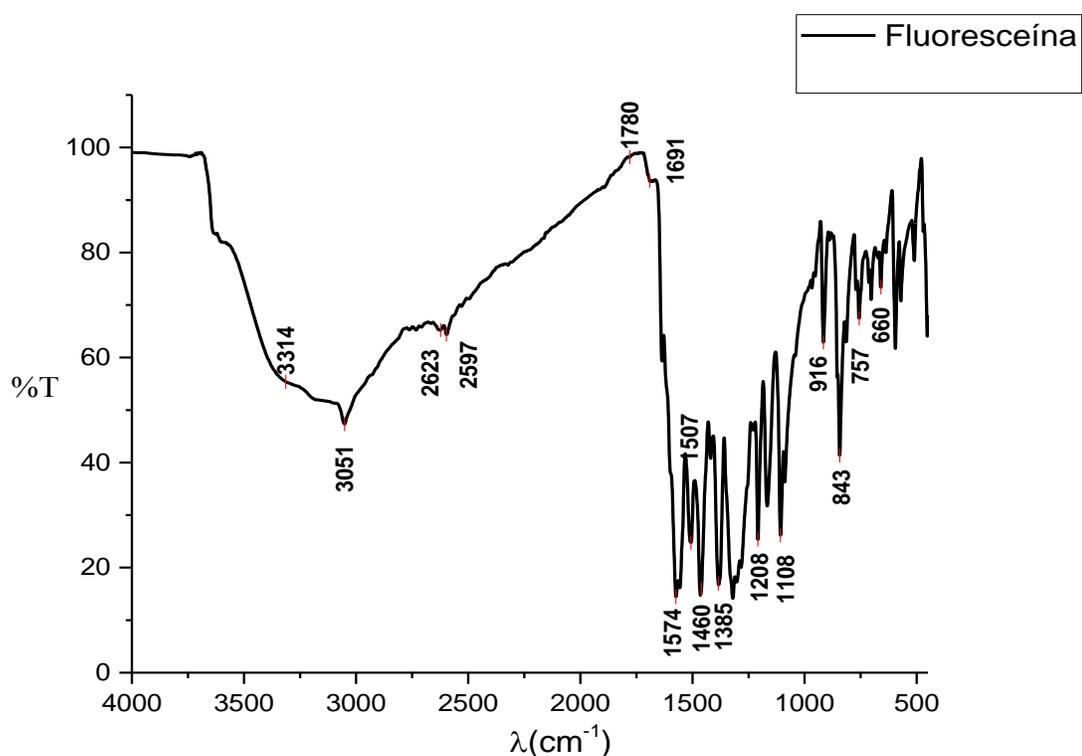
### **8.9.- Espectroscopia de Infrarrojo de la magnetita recubierta con aminoácidos y fluoresceína**

Se realizó espectroscopia de infrarrojo para comprobar mediante las vibraciones normales de los grupos funcionales la presencia de la magnetita, el aminoácido utilizado y la fluoresceína, por lo que se describen a continuación las bandas de vibración obtenidas.

En primer lugar se analizó el espectro de la fluoresceína pura y posteriormente el sistema completo con aminoácidos

Observamos la banda en  $3314\text{ cm}^{-1}$  encontramos el estiramiento del grupo O-H y su respectiva torsión en  $660\text{ cm}^{-1}$ , el doblete en  $2623\text{ cm}^{-1}$  y  $2597\text{ cm}^{-1}$  son bandas características de un aromático sustituido al igual que lo confirma la banda en  $757\text{ cm}^{-1}$ , los estiramientos de los carbonos con doble enlace C=C están en  $1691\text{ cm}^{-1}$  y  $1385\text{ cm}^{-1}$ , la banda en  $3051\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del aromático con los hidrógenos unidos dentro del plano mientras que el estiramiento de los hidrógenos fuera del plano se encuentran en la banda de  $916\text{ cm}^{-1}$ , la banda de

1691  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la presencia de una cetona la cual sabemos que es aromática si se presencia la banda en 1108  $\text{cm}^{-1}$ , en la banda de 1780  $\text{cm}^{-1}$  se localiza el estiramiento de C=O y finalmente el éter se caracteriza en la banda 1208  $\text{cm}^{-1}$  como se muestra en la figura 26.<sup>41</sup>



**Figura 26.** Espectro infrarrojo de la fluoresceína

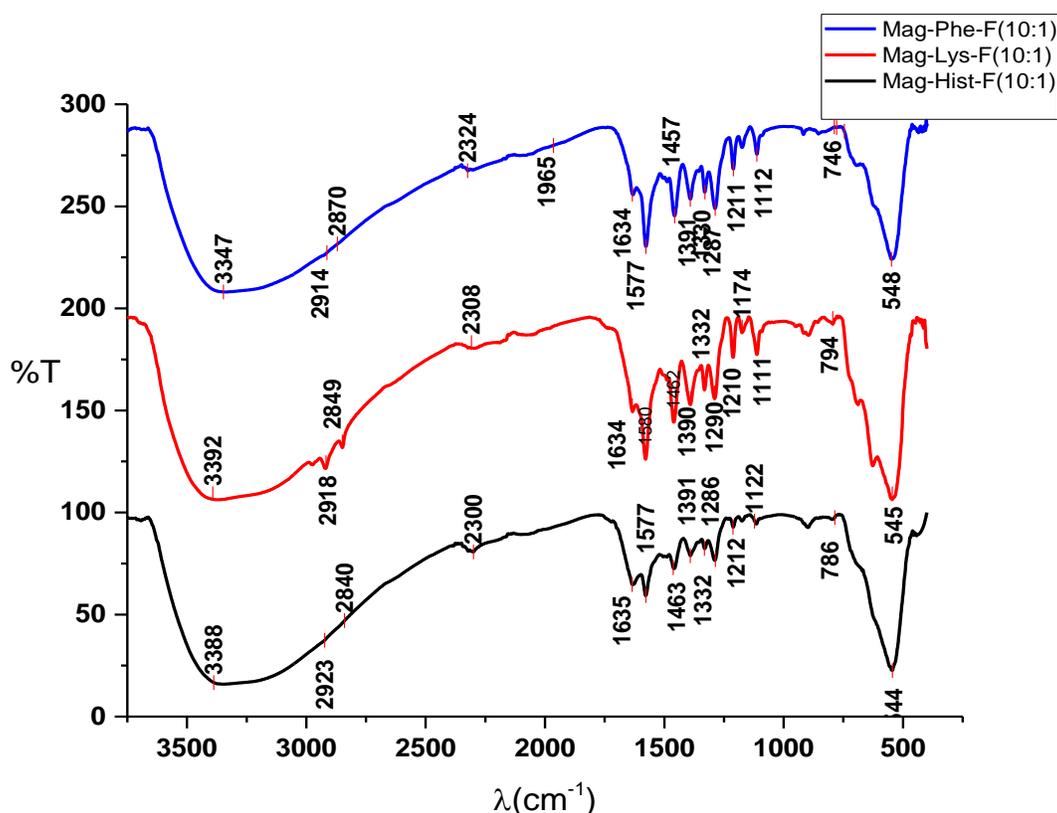
A continuación se analizarán los espectros de Infrarrojo de las muestras de magnetita recubiertas con aminoácido y fluoresceína, y con este análisis logramos la visualización de la adsorción de ambos compuestos químicos que a continuación se describen.

Vemos las bandas localizadas de 3347-3392  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los grupos amino, los picos entre 2840  $\text{cm}^{-1}$  y 2923  $\text{cm}^{-1}$  confirman la presencia de la cadena hidrocarbonada de los aminoácidos, las bandas entre 2300  $\text{cm}^{-1}$  y 2324  $\text{cm}^{-1}$  son vibraciones características de un compuesto aromático al igual que se confirma

con las bandas de 746-794  $\text{cm}^{-1}$ , las bandas en 1634-1635  $\text{cm}^{-1}$  son las vibraciones del grupo carboxilato, los estiramientos entre los carbonos con doble enlace y los hidrógenos se localizan en las bandas 1390  $\text{cm}^{-1}$  y 1391  $\text{cm}^{-1}$ , la banda para confirmar que es con magnetita se localiza entre 544-548  $\text{cm}^{-1}$ , estas vibraciones las observamos en la figura 27.

En el espectro Mag-Phe-F la banda característica para la comprobación de este aminoácido la observamos en 1965  $\text{cm}^{-1}$  observada en la figura 27.

En resumen se logró tener la magnetita recubierta con los aminoácidos y con la fluoresceína para poderlas seguir en los estudios celulares.



**Figura 27.** Espectros de Infrarrojo de la Mag-Phe-F magnetita recubierta con fenilalanina y fluoresceína, Mag-Hist-F magnetita recubierta con histidina y fluoresceína) y Mag-Lys-F magnetita recubierta con lisina y fluoresceína)

### 8.10.- Potencial Z de la magnetita modificada superficialmente con aminoácidos y marcados con fluoresceína.

Las partículas de magnetita modificadas con aminoácido y marcadas con fluoresceína se colocaron en suspensión de agua y se midió el potencial Z a través de un equipo de dispersión dinámica de luz, la concentración utilizada fue de 0.01 mg/mL.

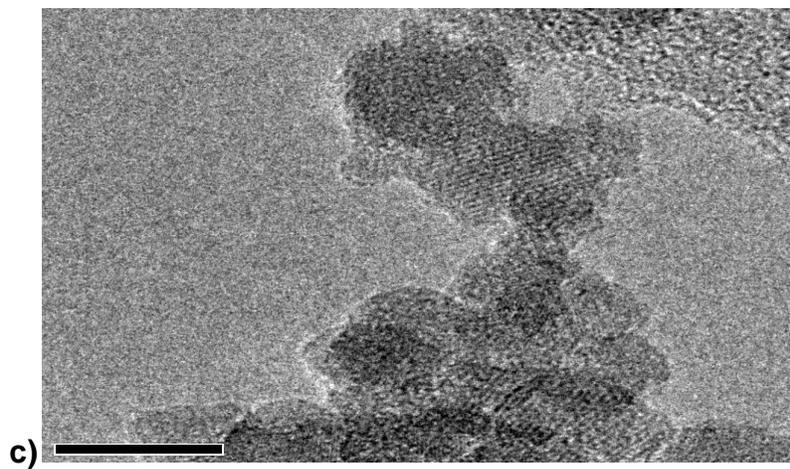
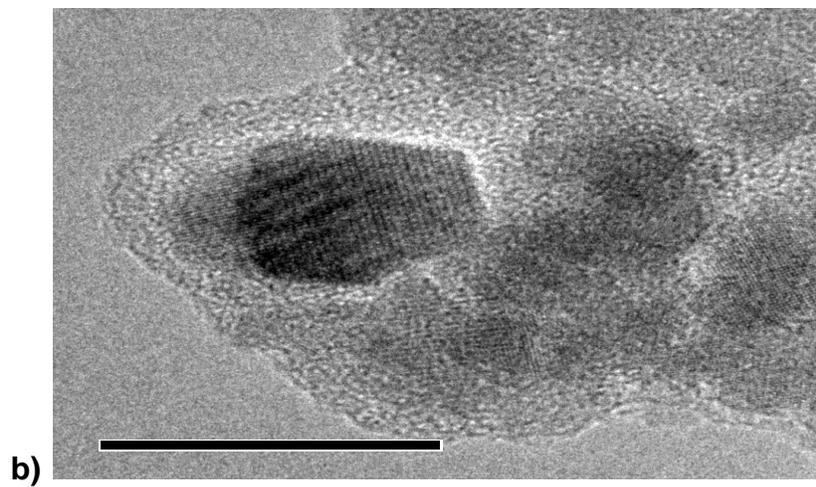
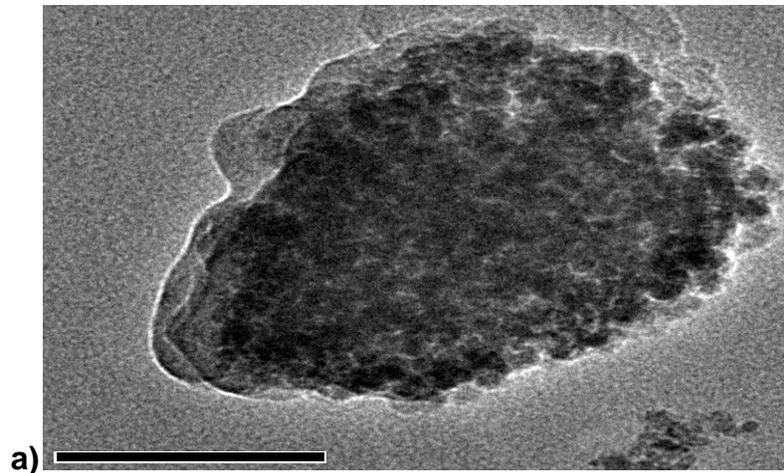
Estos sistemas son menos estables en dispersión como se observa en la tabla, pues como se había mencionado el intervalo de un potencial Z inestable es de -30 mV a 30 mV. Estos sistemas al tener adsorbido la fluoresceína que es una molécula aromática que tiene un grupo carboxilato, que posiblemente fue el que interaccionó con la superficie de la magnetita, tiene también un grupo oxidrilo de fácil desprotonación y protonación el cual tal vez competía con los grupos amino de los aminoácidos para estar estables por lo que desestabilizaba la partícula coloidal.

NOMBRE DE LA MUESTRA	POTENCIAL Z(mV)
Magnetita-Lisina-Fluoresceína	14.00
Magnetita-Histidina-Fluoresceína	6.01
Magnetita-Fenilalanina-Fluoresceína	8.49

**Tabla 8.** Potencial Z de la magnetita modificada su superficie con aminoácido y fluoresceína.

### 8.11.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras de magnetita recubiertas con aminoácido y fluoresceína presentan un recubrimiento a su alrededor igual que la magnetita con aminoácido solamente sin obtener diferencia entre el aminoácido y la fluoresceína como se observan en la figura 28.



**Figura 28.** Microscopía electrónica de transmisión de **a)** magnetita-lisina-fluoresceína(10:1), **b)** magnetita-fenilalanina-fluoresceína (10:1) y **c)** magnetita-histidina-fluoresceína (10:1)

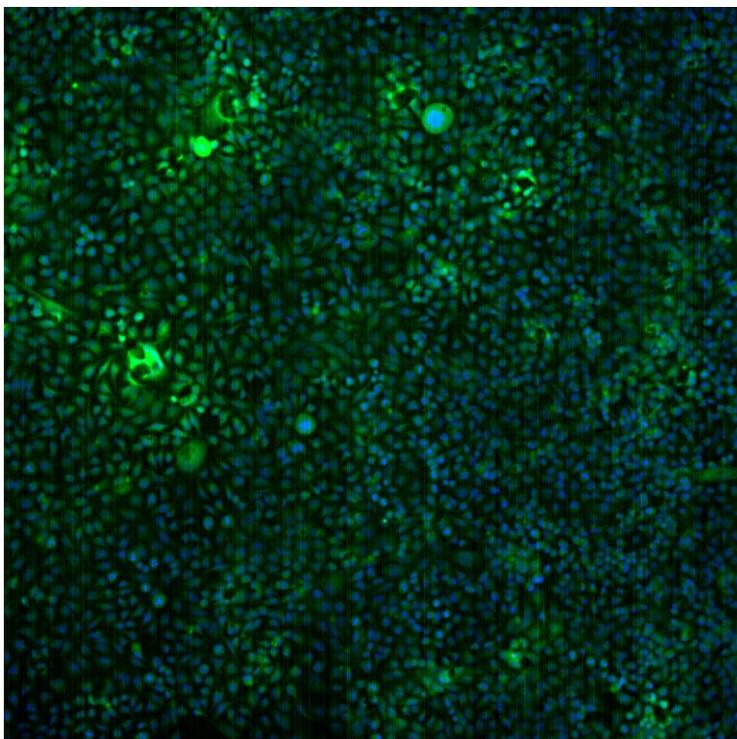
### **8.12.- Ensayo *in vitro* de células HeLa y células NCT clone 929 en contacto con magnetita modificada superficialmente con aminoácidos y fluoresceína**

Las imágenes de las células fueron analizadas por un microscopio confocal en el cual se colocó la microplaca y se le leyeron 3 espacios por pozo de la microplaca. Se sembraron en dos microplacas de 96 pozos cada placa con una línea celular, se utilizaron concentraciones de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL y 1000 µg/mL para células HeLa,

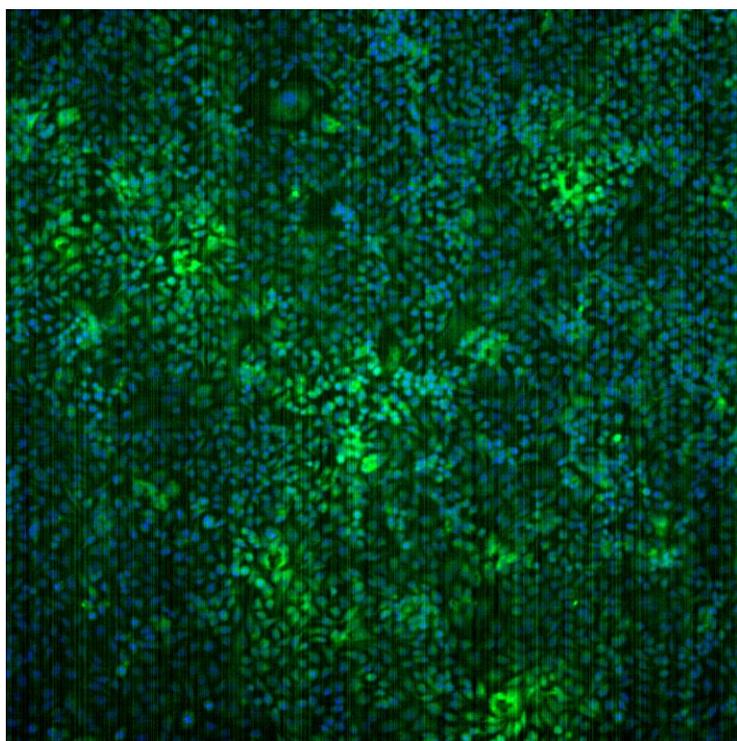
Para el caso de la línea celular NCT clone 929 se utilizaron concentraciones de 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL.

En cada pozo de la microplaca se le adicionó colorante DAPI el cual tiñe el núcleo azul de las células este colorante se adicionó para observar la comparación con la fluoresceína que se tiñe de verde y de pudiera observar en donde se alojaban las nanopartículas de magnetita al final de 24 horas.

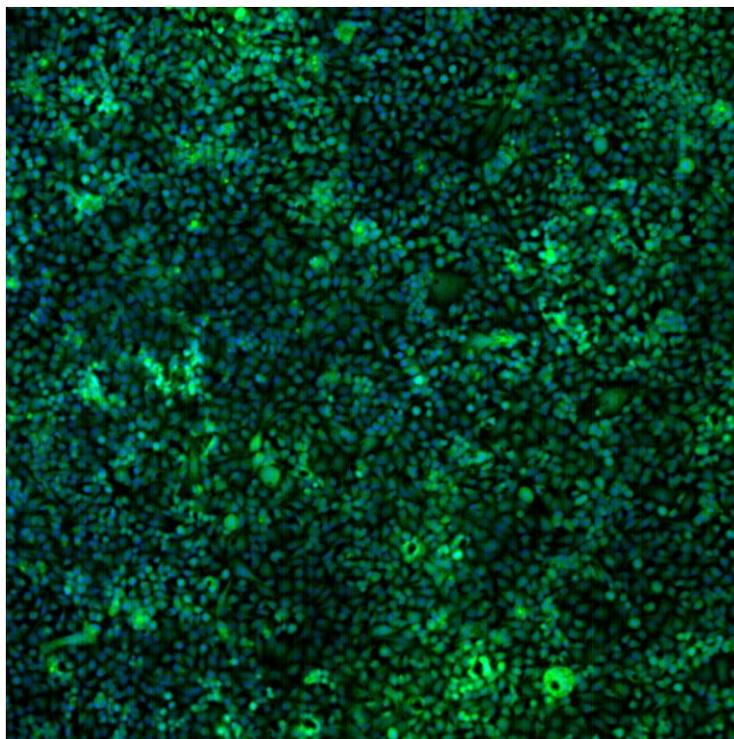
Las dos microplacas con ambas líneas celulares se trabajaron bajo las mismas condiciones, de esta manera se asegura que las únicas variantes en los estudios sean la magnetita recubierta con los diferentes aminoácidos.



A) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉINA (10Phe:1Flour)



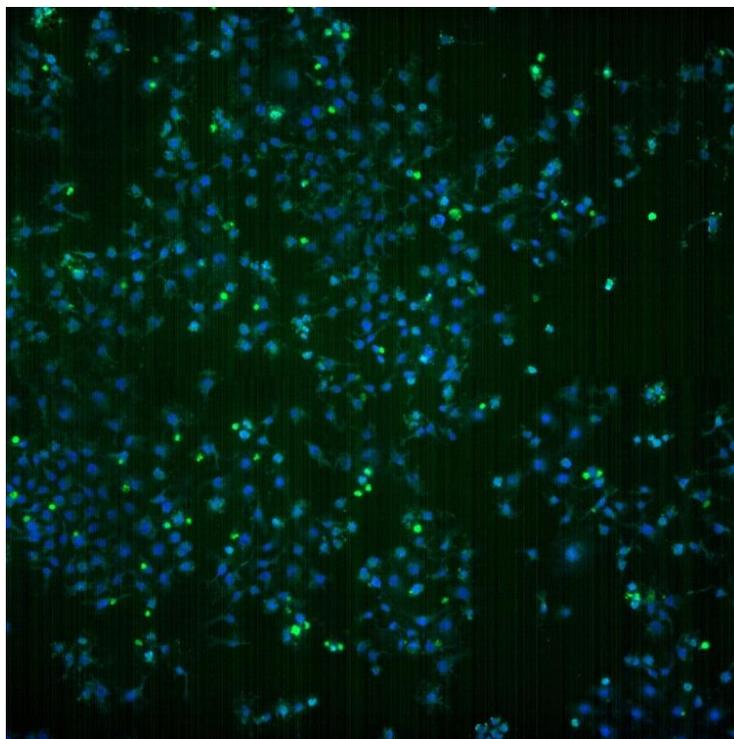
B) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉINA (10Hist:1Flour)



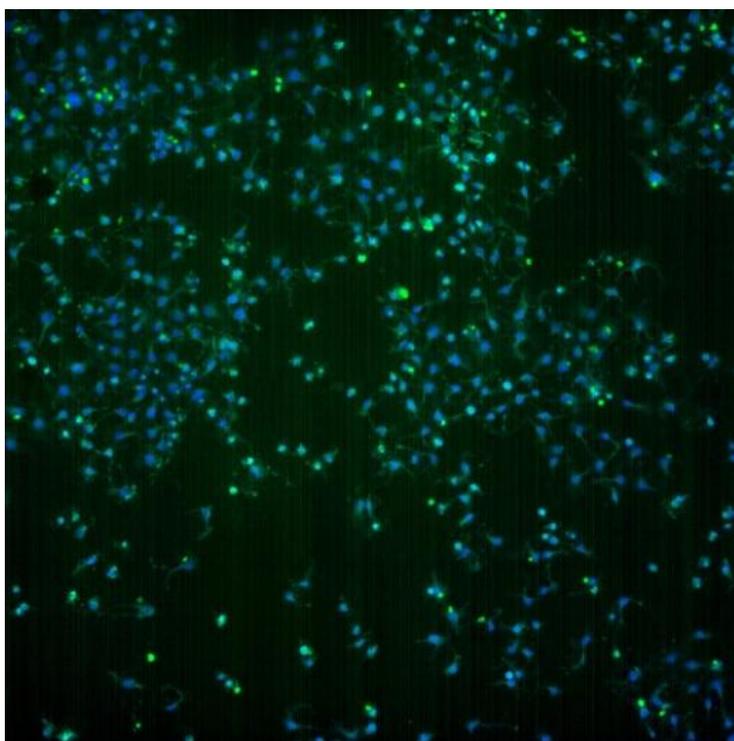
C) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 29.** Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  (A, B, C)

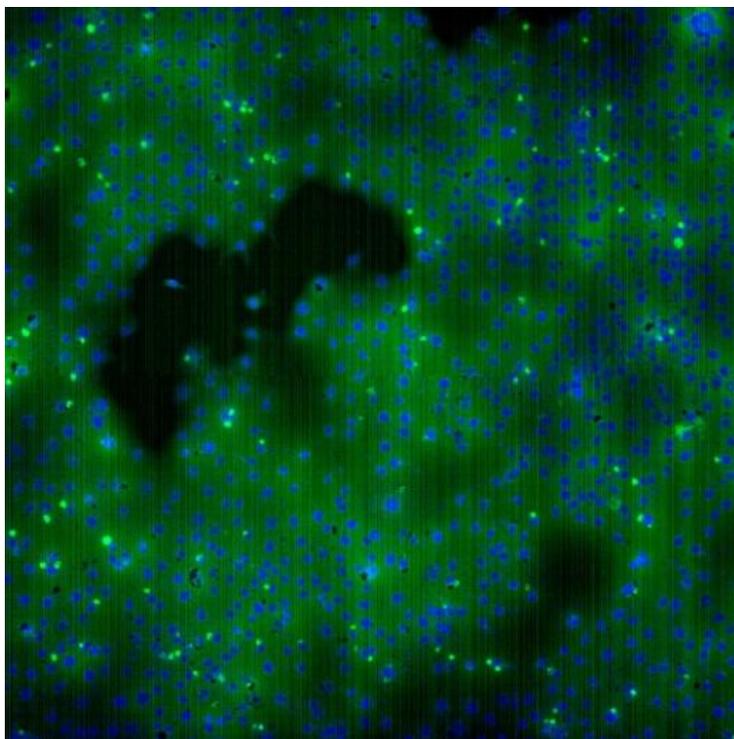
En la figura 29 se observan las imágenes de las concentraciones más pequeñas utilizadas con células HeLa en donde se observa que la magnetita recubierta con fenilalanina (A) permeó la célula en menor concentración, pues los puntos azules son mayoritarios a los puntos verdes observados.



D) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉINA (10Phe:1Flour)



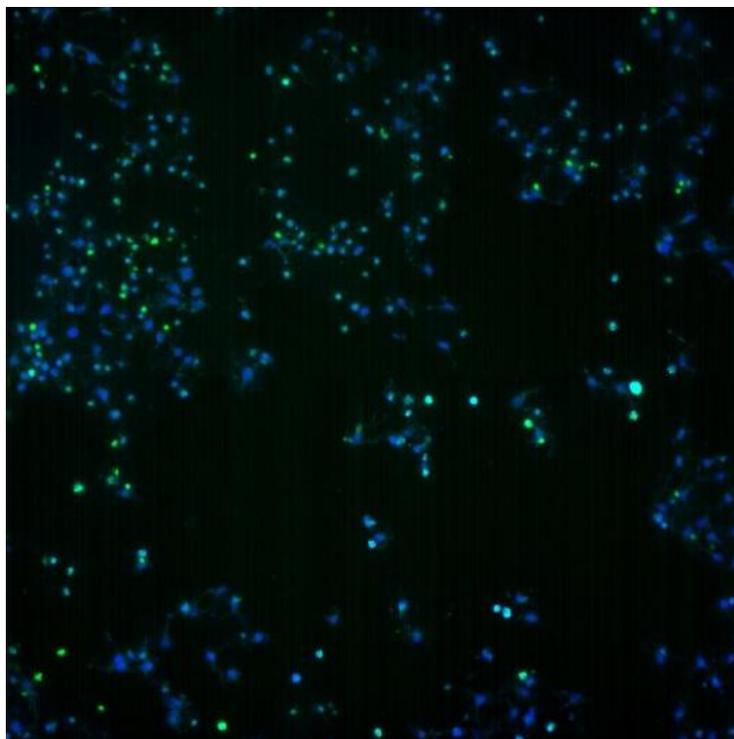
E) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉINA (10Hist:1Flour)



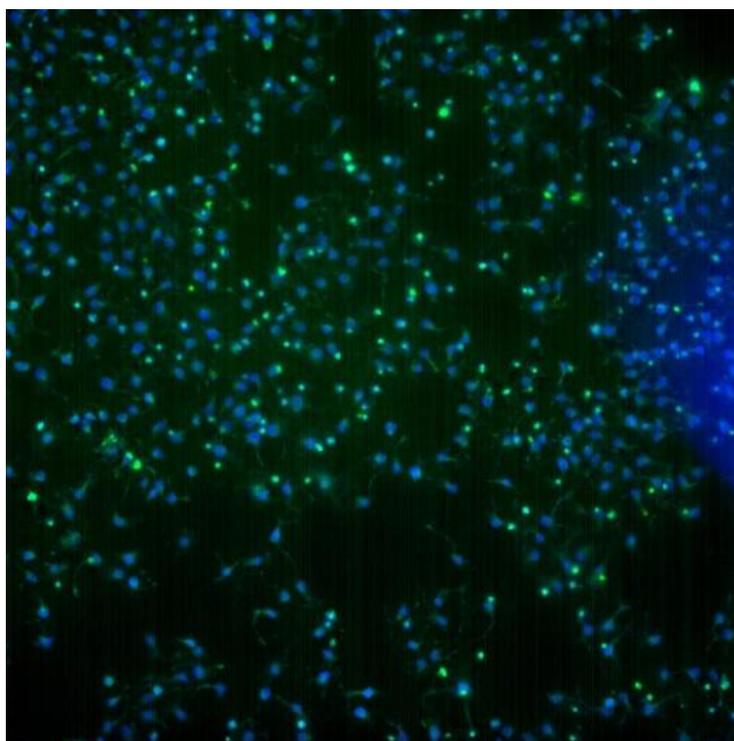
F) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour

**Figura 30.** Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ . (D, E, F)

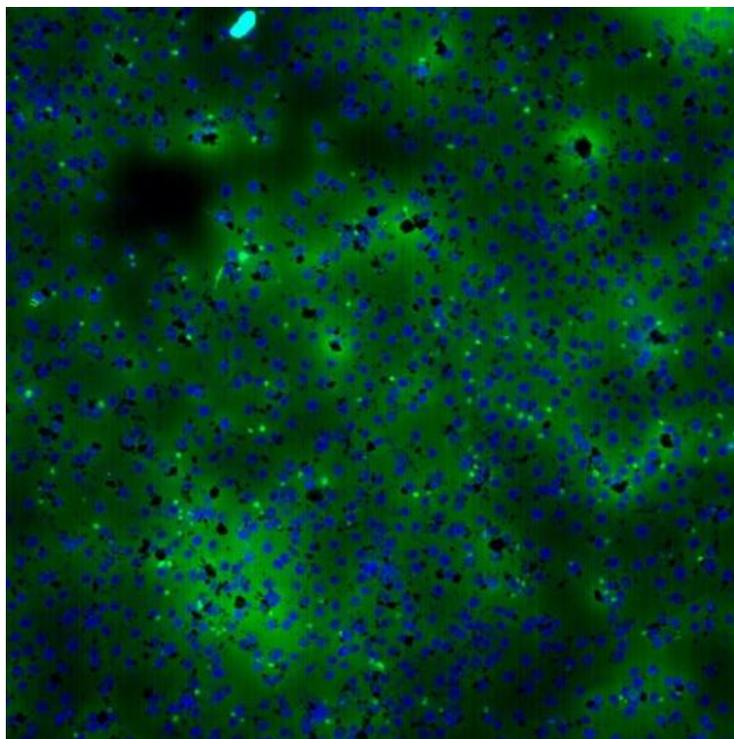
En la figura 30 donde se representan las imágenes de células HeLa en concentración de magnetita recubierta de 250  $\mu\text{g/mL}$  se empieza observar claramente como las magnetita muestra una permeación diferente dependiendo del aminoácido adsorbido en la superficie de la magnetita, en el caso de la fenilalanina (D) son muy pocos puntos verdes, mientras que en el caso de histidina (E) se ven más puntos verdes y hasta una capa alrededor de algunas células, sin embargo en el caso de la lisina (F) fue donde se permeó más concentración observando zonas verdes más abundantes.



G) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉÍNA (10Phe:1Flour)



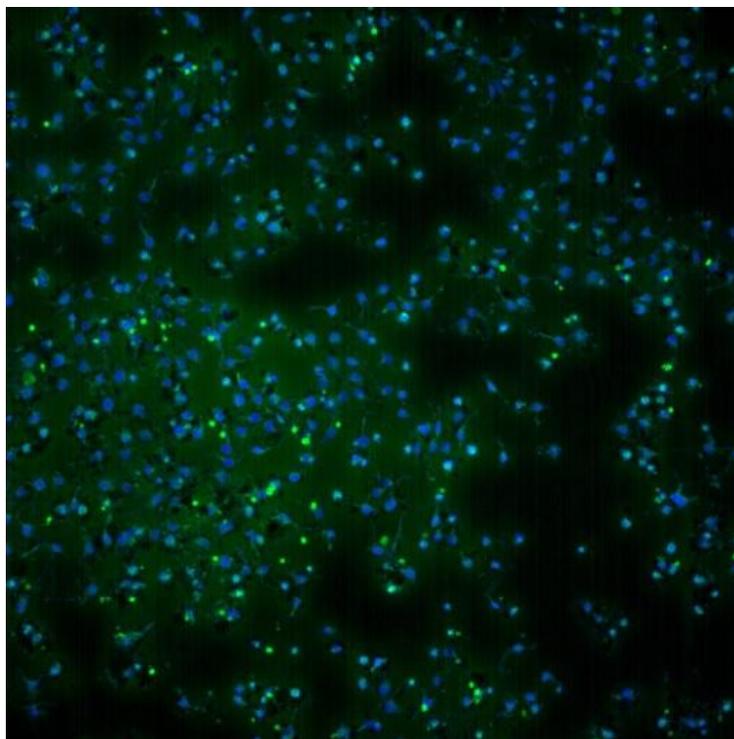
H) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉÍNA (10Hist:1Flour)



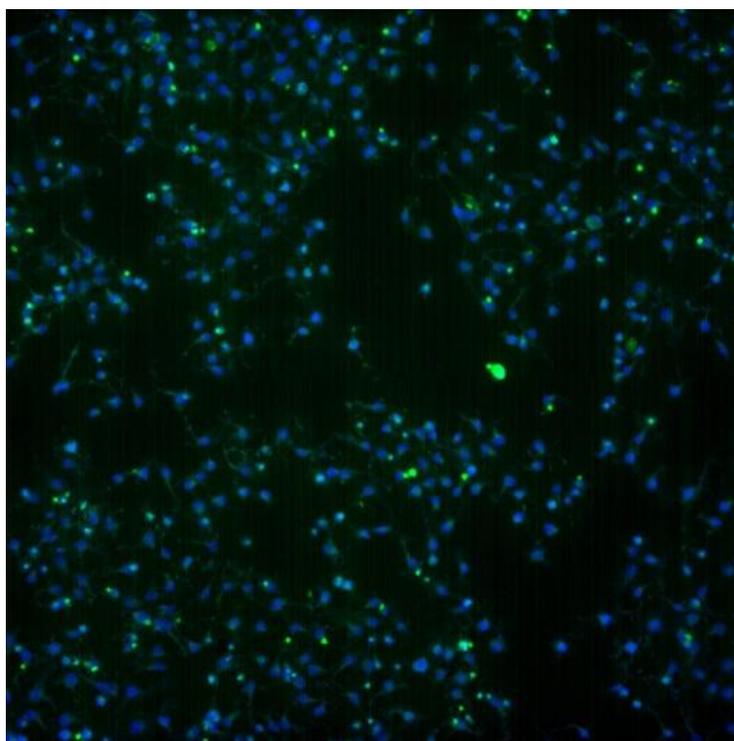
I) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 31.** Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$ . (G, H, I)

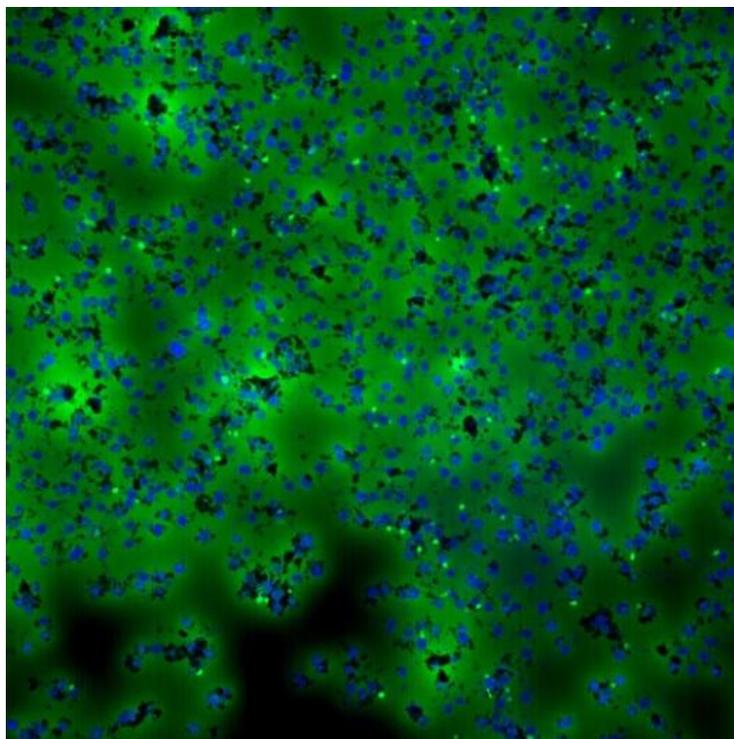
En la figura 31 también se observan las diferencias en la permeación de concentraciones con los diferentes sistemas observando una zona más grande de color verde en el caso de la magnetita recubierta con la lisina (I).



J) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉINA (10Phe:1Flour)



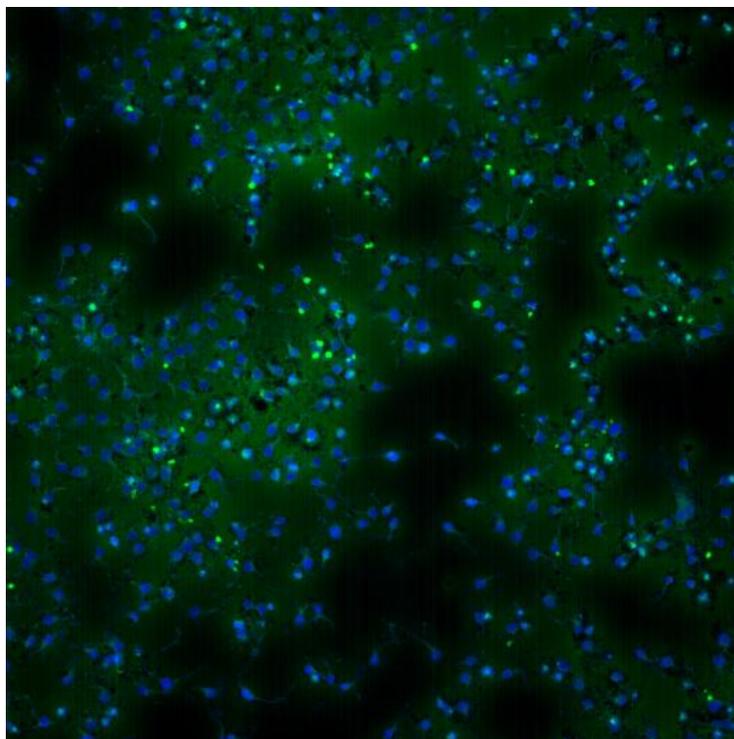
K) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉINA (10Hist:1Flour)



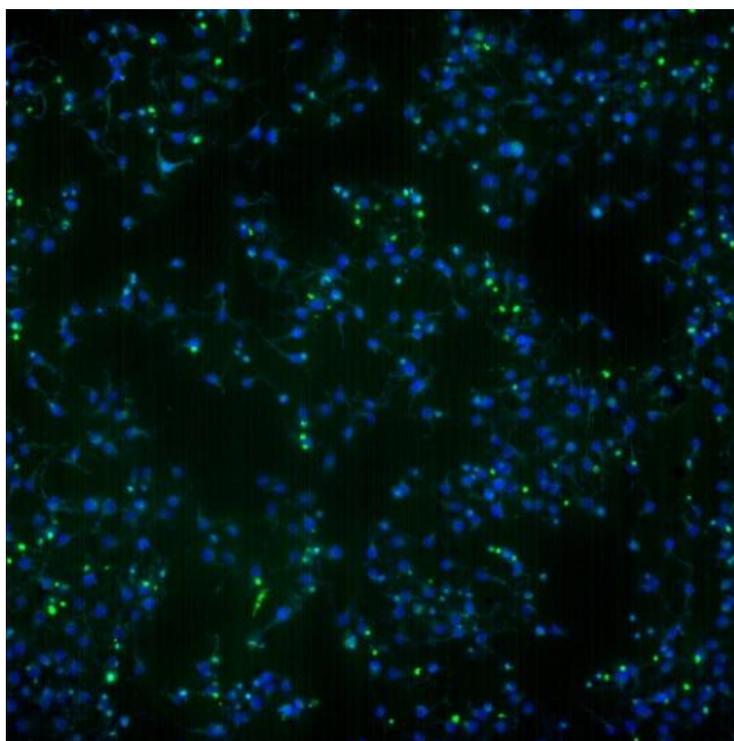
L) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 32.** Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 750  $\mu\text{g/mL}$  (J, K, L)

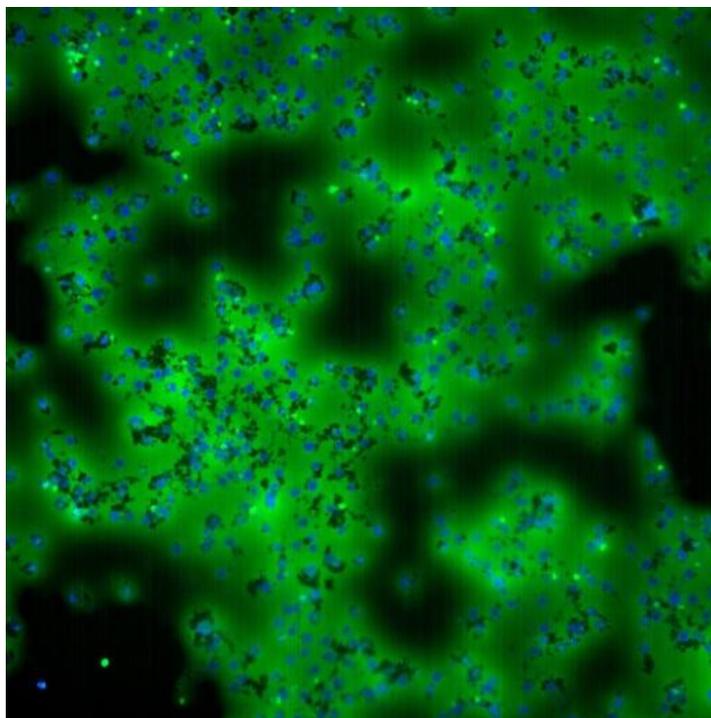
En la figura 32 se nota una diferencia muy significativa en la concentración de magnetita que permeó las células cuando se modificó la superficie de la magnetita con lisina (L) a comparación de los otros dos aminoácidos que las zonas verdes no son muy predominantes.



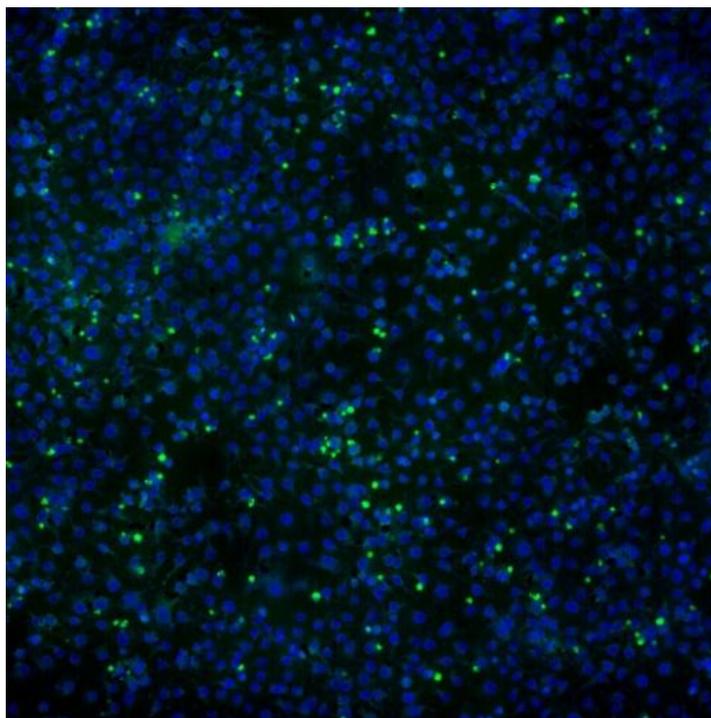
M) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉÍNA (10Phe:1Flour)



N) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉÍNA (10Hist:1Flour)



O) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

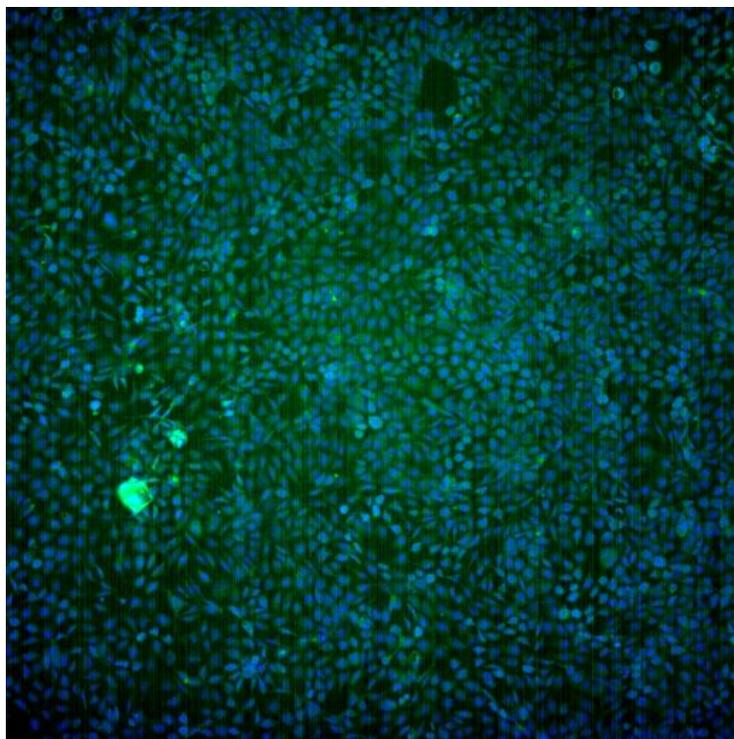


1) MAGNETITA-FLUORESCÉINA (1Mag:1Flour)

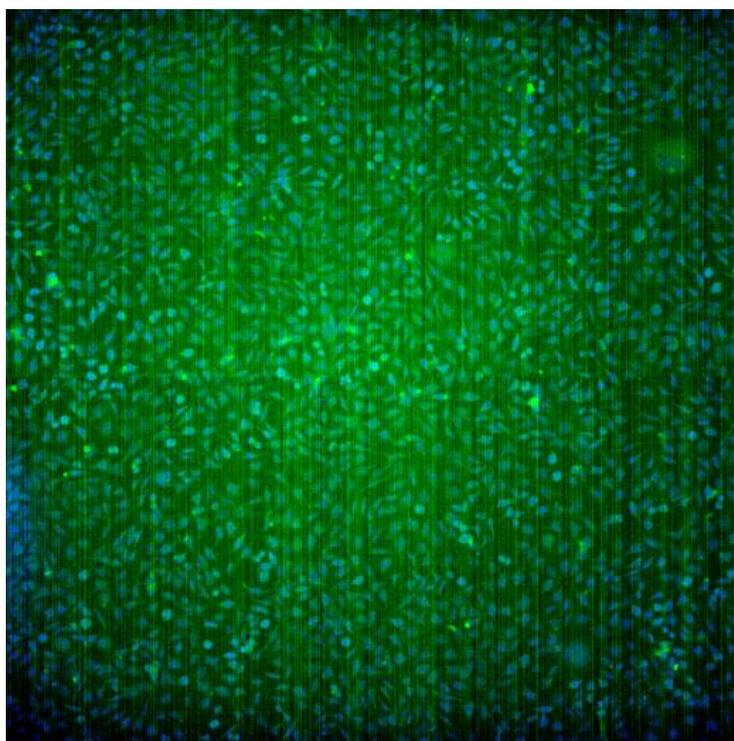
**Figura 33.** Estudio in vitro celular con células HeLa solo en concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (M, N, O, 1)

En la figura 33 es más evidente la concentración mayor de permeación de la magnetita recubierta con lisina (O) además de observar como cuando la magnetita solo esta marcada con fluoresceína, es decir que ningún aminoácido es adsorbido las zonas verdes son muy limitantes como la muestra la imagen 1.

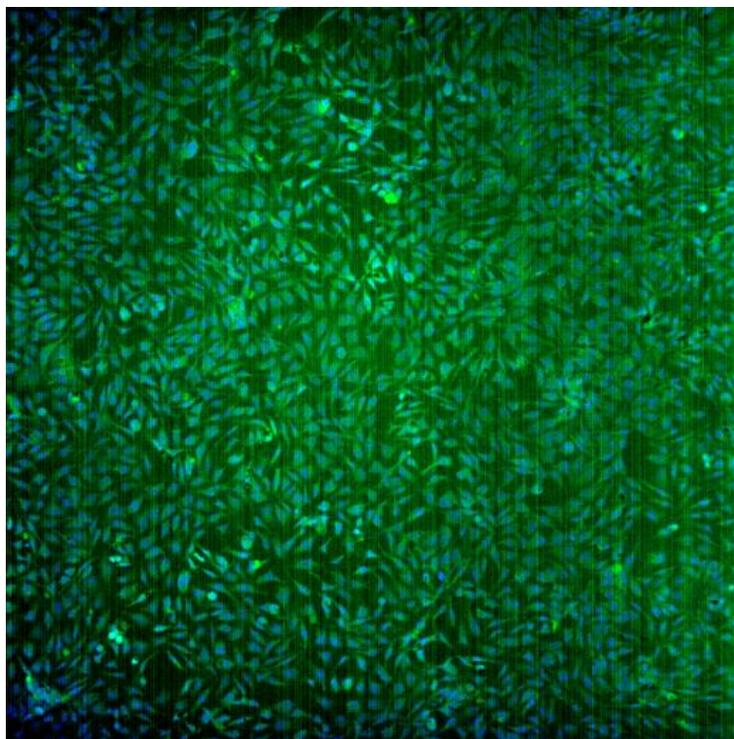
Las siguientes figuras son las correspondientes a la línea celular NCTC clone 929 que corresponden a los fibroblastos de ratón con las mismas concentraciones utilizadas anteriormente con las células HeLa.



P) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉÍNA (10Phe:1Flour)



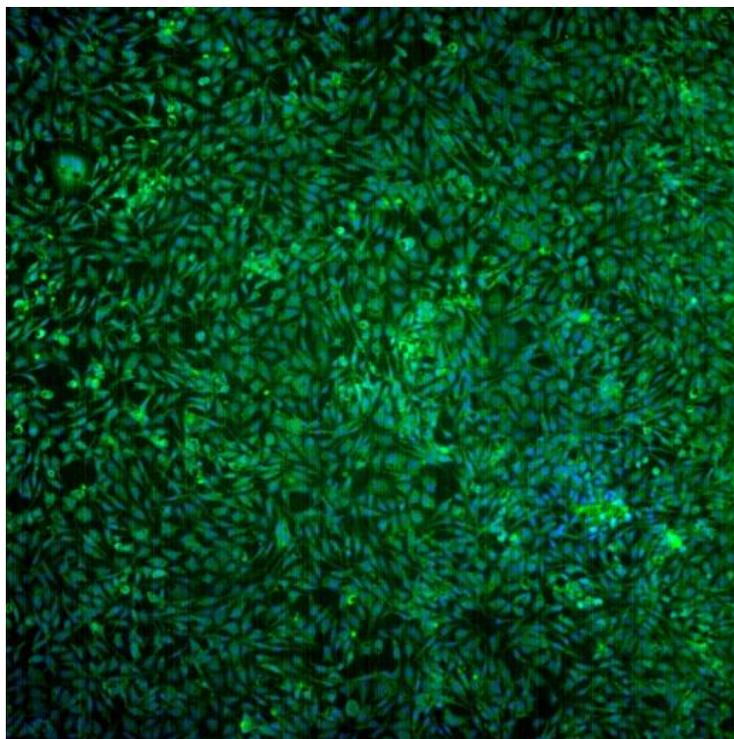
Q) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉÍNA (10Hist:1Flour)



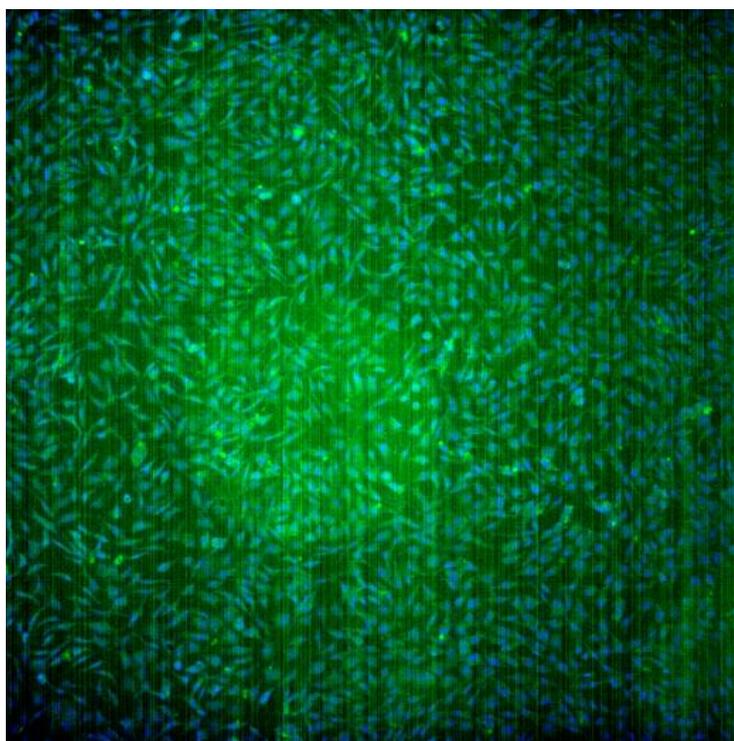
R) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 34.** Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P, Q, R)

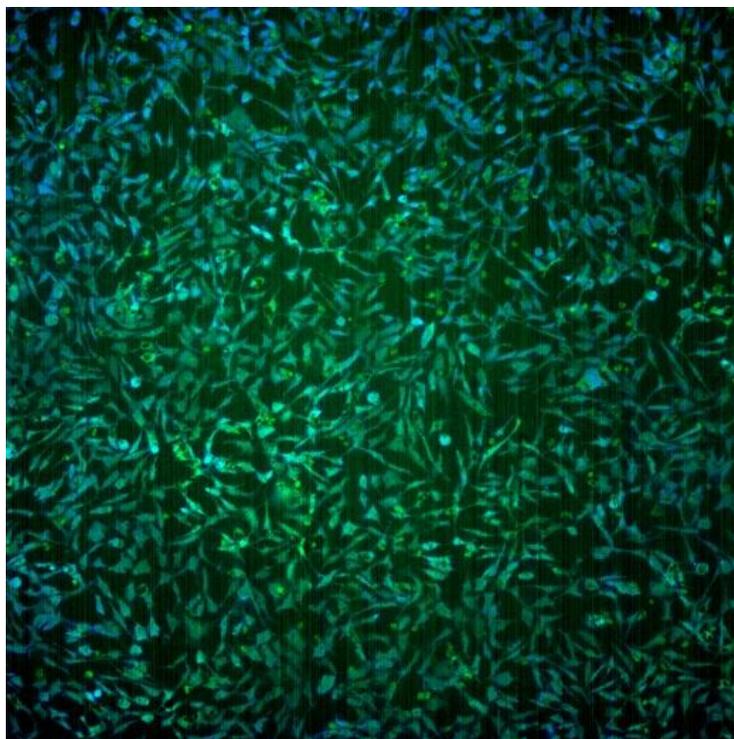
En la menor concentración de magnetita recubierta se observa que se permeó en los casos de la histidina (Q, R) y lisina en comparación de con las células HeLa.



S) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉINA (10Phe:1Flour)



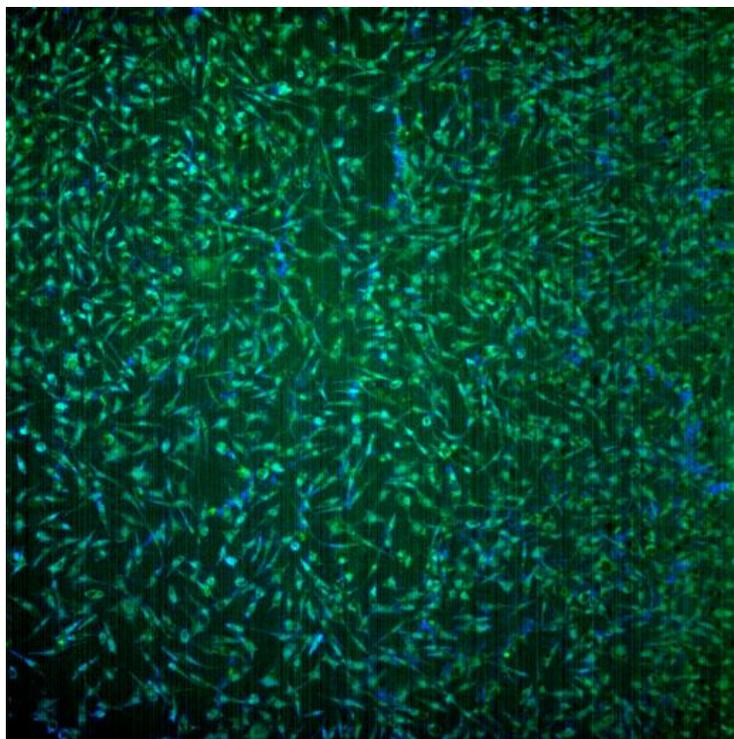
T) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉINA (10Hist:1Flour)



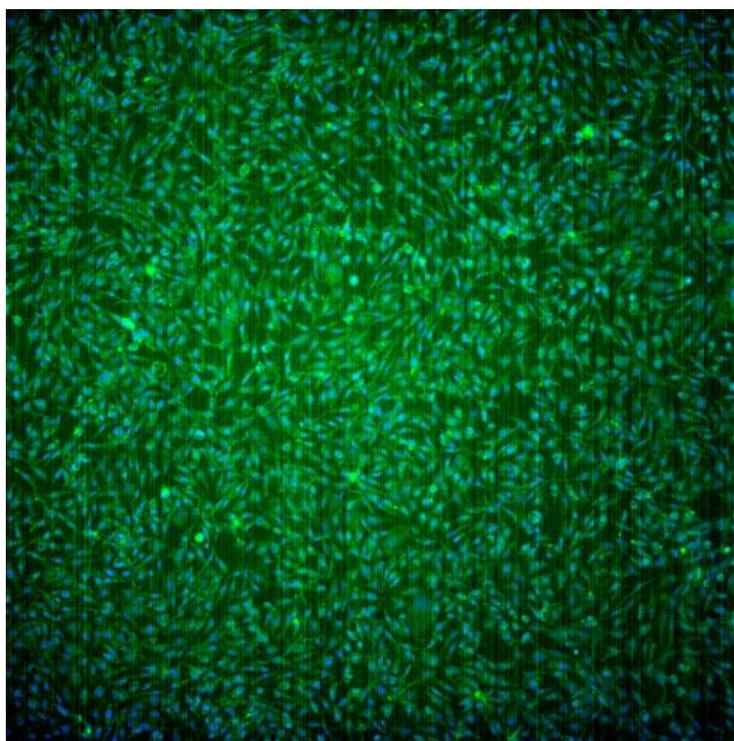
V) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 35.** Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (S, T, V)

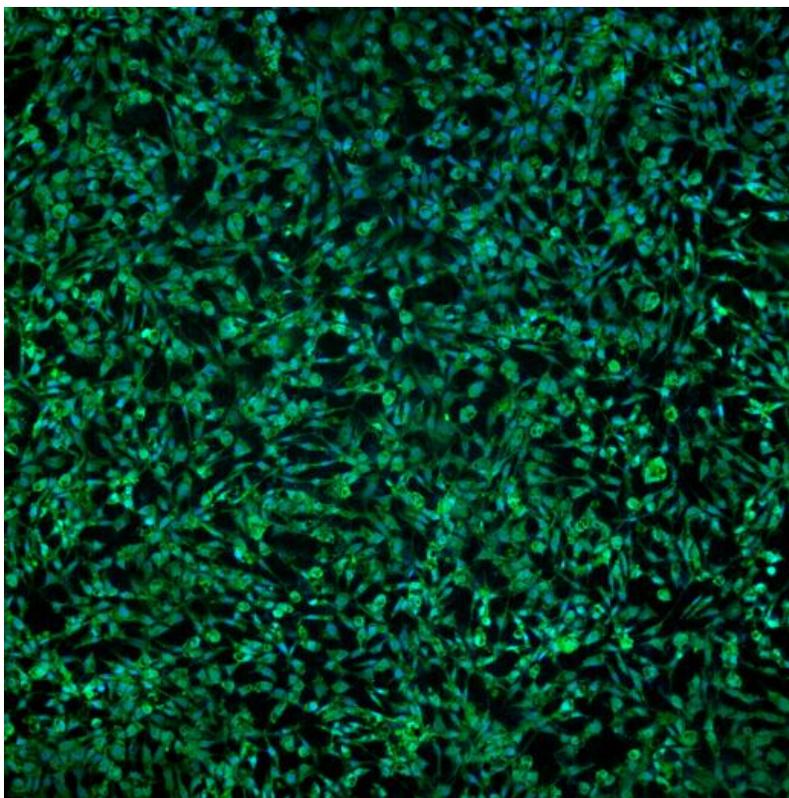
En la imagen 35 se observa que en la imagen (T) correspondiente a la magnetita recubierta con histidina tiene más zonas verdes, sin embargo no se debe a la concentración de magnetita dentro de la célula sino que el equipo no dio bien la imagen, pero la concentración más alta que se permeó fue en el caso de la magnetita con lisina (V).



W) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCÉINA (10Phe:1Flour)



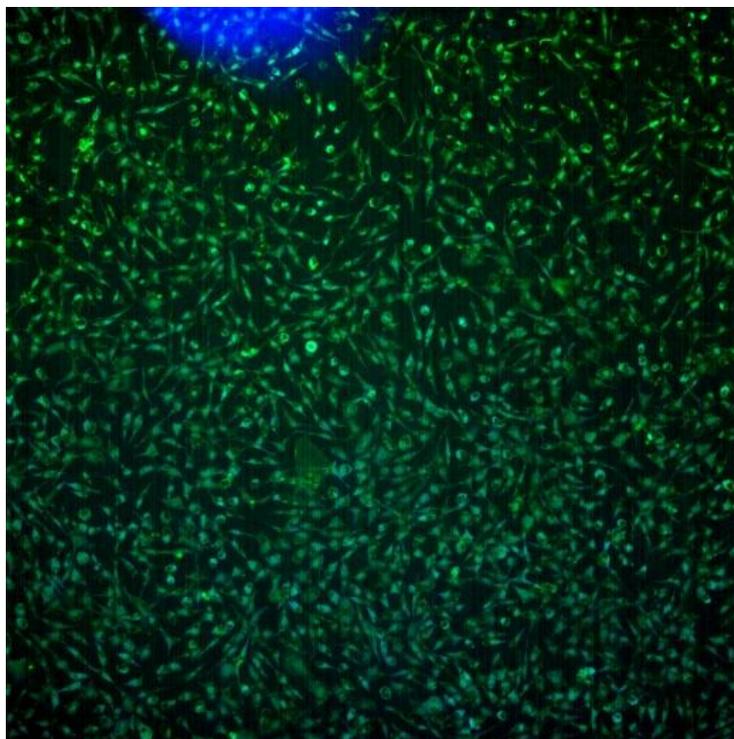
X) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCÉINA (10Hist:1Flour)



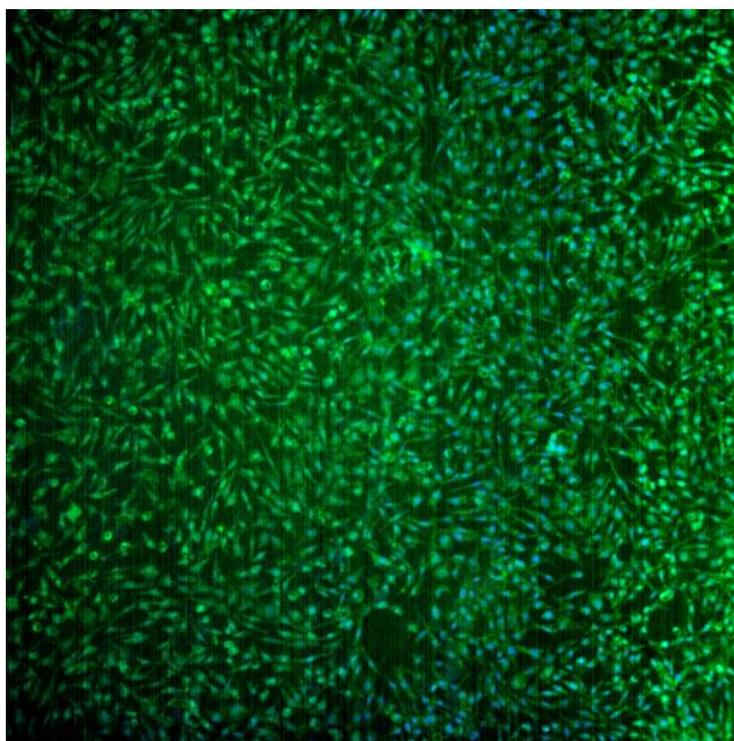
Y) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)

**Figura 36.** Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (W, X, Y)

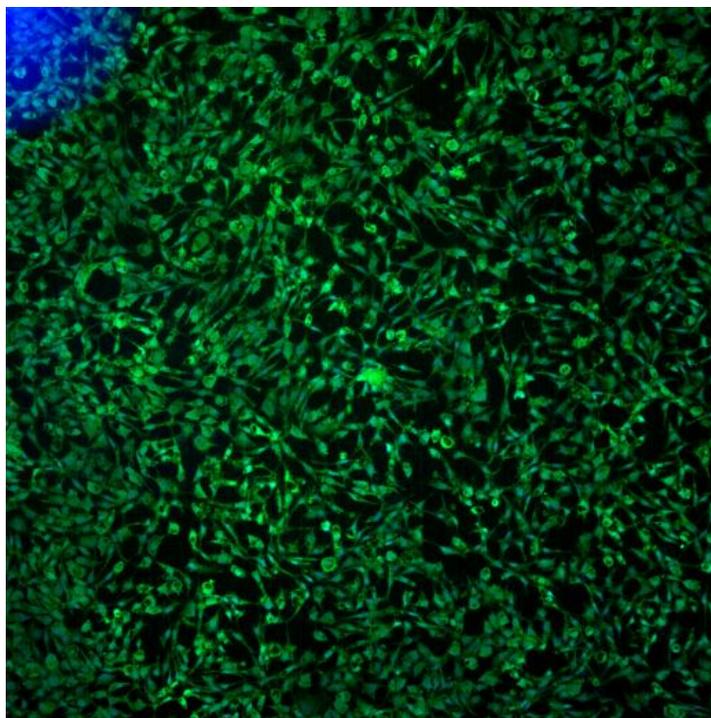
En la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa que la magnetita recubierta permea en una concentración abundante en el caso de los tres aminoácidos.



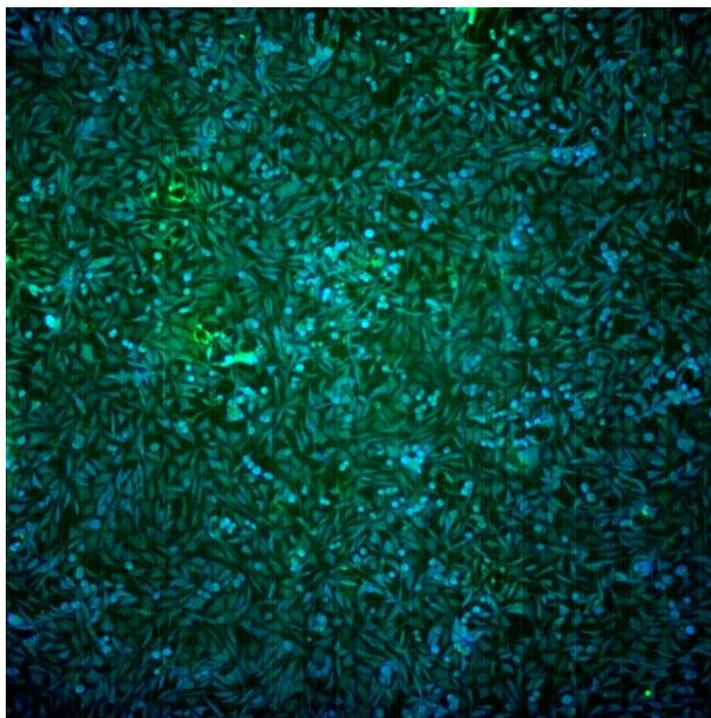
Z) MAGNETITA-FENILALANINA-FLUORESCEÍNA (10Phe:1Flour)



AZ) MAGNETITA-HISTIDINA-FLUORESCEÍNA (10Hist:1Flour)



BZ) MAGNETITA-LISINA-FLUORESCÉINA (10Lys:1Flour)



MAGNETITA-FLUORESCÉINA (1Mag:1Flour)

**Figura 37.** Estudio in vitro celular con células NCTC clone 929 solo en concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Z, AZ, BZ)

En la figura 37 se observa claramente que el aminoácido con más permeación es la lisina quedando todas las células de color verde lo que significa que se internalizó la magnetita hasta en el núcleo después de las 24 horas, en el caso de la histidina aun se observan puntos azules aunque la permeación se dio de manera eficiente, en el caso de la fenilalanina las zonas verdes son más deficientes y finalmente en las células que se expusieron a la magnetita solamente marcada con fluoresceína las zonas azules son predominantes lo que significa que la internalización casi no se llevó a cabo.

Se observó que en todas las concentraciones de magnetita con aminoácido y fluoresceína, las partículas de magnetita entraron al interior de las células las cuales se localizan alrededor del núcleo celular, teñido con DAPI de color azul. Se observa que el tipo de aminoácidos si influye en la internalización de las nanopartículas, pues en todas las concentraciones de magnetita con fenilalanina la permeación celular se da menos en comparación de la magnetita recubierta con histidina, sin embargo, la magnetita con histidina se internalizó menos que la magnetita recubierta con lisina. Esto se puede atribuir a que la fenilalanina es un aminoácido más grande y tiene propiedades aromáticas neutras con un solo grupo amino protonado, mientras que la histidina y la lisina son aminoácidos básicos y tienen tres grupos amino protonados y dos grupos aminos protonados respectivamente por lo que se internalizan más que la fenilalanina con la diferencia que la lisina es un aminoácido más pequeño con una cadena hidrocarbonada lineal y la histidina tiene presente un grupo imidazol, es por eso que la magnetita recubierta con lisina se logra internalizar más rápido. Se puede asegurar la internalización de las nanopartículas de magnetita marcadas con fluoresceína, pues cada una de las muestras se lavaron perfectamente antes de ser sometidas al estudio celular para eliminar la fluoresceína libre gracias a la espectroscopía de fluorescencia.

La muestra blanco fue magnetita con fluoresceína solamente a la concentración más alta, 1000  $\mu\text{g/mL}$ , en cual se observa que la permeación celular es mucho

menor que a la menor concentración utilizada de cualquier muestra de magnetita recubierta con aminoácido que fue de 100 µg/mL. (figuras de la 33 y figura 37).

En la concentración más baja ocupada experimentalmente fue de 100 µg/mL en la cual no se observa diferencia de concentración internalizada de magnetita recubierta, sin embargo, a partir de la concentración de 250 µg/mL se permea una concentración mayor de la magnetita con lisina y así se sigue observando hasta la concentración de 1000 µg/mL observadas en las figuras de la 29 a la 33 para el caso de las células HeLa y de la figura 34 a la 37 para el caso de las células L-929.

Los resultados fueron los esperados en la internalización celular de la magnetita recubierta con los diferentes aminoácidos, quedando como mejor aminoácido la lisina para la internalización celular: Este resultado probablemente se deba a que la lisina hace que la partícula tenga grupos  $\text{NH}^{3+}$  expuestos al medio y como se ha encontrado estos grupos favorecen la permeación celular, a diferencia de la fenil alanina que no favorece este proceso. De forma intermedia la histidina también lo favorece pero en menor magnitud. Las nanopartículas de magnetita únicamente con la fluoresceína no permean bien, posiblemente a la interacción de los grupos superficiales como Fe-OH ó -Fe con la membrana celular.

Una de las posibles causas por las que la magnetita recubierta tuvo más internalización en las células células NCTC clone 929 es que en comparación con las células HeLa tienen una reproducción organizada y las células son de forma regular, mientras que las células HeLa al ser de cancerígenas tienen una reproducción acelerada y su forma no es regular en todas las células.

## **9.- CONCLUSIONES**

Se lograron sintetizar nanopartículas de magnetita superparamagnéticas de un tamaño inferior a 11nm recubiertas con tres diferentes aminoácidos de los cuales dos de ellos son básicos (lisina e histidina) y uno aromático no polar (fenilalanina) caracterizadas por técnicas como IR, TEM, DSC, potencial Z, RX de polvos, en las

cuales los resultados obtenidos fueron los esperados pues la adsorción del aminoácido se realizó de forma satisfactoria.

De igual manera se logró marcar estas nanopartículas recubiertas con aminoácido con fluoresceína, esto se comprobó con las diferentes técnicas como IR, TEM, potencial Z en donde se obtuvieron resultados satisfactorios.

Los sistemas de magnetita modificada superficialmente con aminoácidos y fluoresceína fueron sometidos a ensayos in vitro con dos diferentes líneas celulares en los cuales comprobamos que el tamaño sintetizado de nanopartículas de magnetita recubierta es perfecto para que la permeación se lleve a cabo a través de la membrana celular y que el tipo de aminoácido si influye de manera significativa en esta permeación celular, concluyendo que el mejor aminoácido que permea la célula en cualquiera de las dos líneas celulares es la lisina debido a su naturaleza básica de protonarse el grupo amino libre quedando cargada positivamente y así atraerse más fácilmente a la membrana celular que tiene una carga negativa y su tamaño y estructura molecular le permiten pasar a través de la membrana con menor energía.

## **10.- PERSPECTIVAS**

En este trabajo se comprobó la permeación celular de la síntesis de magnetita recubierta con aminoácidos y fluoresceína por lo que un estudio importante sería que en vez de adsorber fluoresceína se adsorbiera algún fármaco para ver la capacidad terapéutica y citotoxicidad.

## 11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Marinescu, G. *et al.* Synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of aminoacids. *Journal of Nanoparticle Research* **8**, 1045-1051, doi:10.1007/s11051-006-9134-1 (2006).
- 2 Zeng, S. S. a. H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. (April 11, 2002).
- 3 Park, J. Y., Choi, E. S., Baek, M. J. & Lee, G. H. Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid. *Materials Letters* **63**, 379-381, doi:10.1016/j.matlet.2008.10.057 (2009).
- 4 Ludwig, S. N. J. D. *Pharmaceutical dosage forms parenteral medications*. . Third Edition edn, Vol. Volume 1, Formulation and packaging 424 (Informa Healthcare, 2010).
- 5 Chien, Y. W. *Novel Drug Delivery Systems*. (informa healthcare, 1991).
- 6 Aulton, M. E. *Pharmaceutics\_ The Science of Dosage Form Design* Second edition edn, 682 (Churchill Livingstone, 2005).
- 7 Banker, G. S. *ModernPharmaceutics 4 ed.* 4 ed edn, (Marcel Dekker, Inc., 2002).
- 8 Betal, S. *et al.* Cell permeation using core-shell magnetoelectric nanoparticles. *Integrated Ferroelectrics* **174**, 186-194, doi:10.1080/10584587.2016.1196332 (2016).
- 9 Sophie Laurent, D. F., † Marc Port, ‡ Alain Roch, † Caroline Robic, ‡ Luce Vander Elst, † and † Robert N. Muller\*. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Department of General, Organic, and Biomedical Chemistry,,* 2064–2110 (2008).
- 10 LÓPEZ, M. e. E. A. R. *Estudio de la síntesis y caracterización de magnetita por metodos electroquimicos.pdf*, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, (Noviembre 2012).
- 11 Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chemical Society reviews* **45**, 2440-2457, doi:10.1039/c5cs00699f (2016).
- 12 Mauricio, M. R. *et al.* Synthesis of highly hydrophilic magnetic nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for potential use in biologic systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **417**, 224-229, doi:10.1016/j.colsurfa.2012.11.014 (2013).
- 13 Krishna, R. *et al.* Wet-Chemical Green Synthesis of L-Lysine Amino Acid Stabilized Biocompatible Iron-Oxide Magnetic Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12**, 6645-6651, doi:10.1166/jnn.2012.4571 (2012).
- 14 Horst, M. F., Lassalle, V. & Ferreira, M. L. Nanosized magnetite in low cost materials for remediation of water polluted with toxic metals, azo- and antraquinonic dyes. *Frontiers of Environmental Science and Engineering* **9**, 746-769, doi:10.1007/s11783-015-0814-x (2015).
- 15 Magnetite Biomineralization.
- 16 BruceJ., J. L. K. D. S. J. *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms A New Biomagnetism* Vol. 1-5 (Plenum Press, 1985).
- 17 Buzea, C. & Pacheco, I. in *Advanced Structured Materials* Vol. 62 3-45 (2017).
- 18 Moscoso-Londoño, O. *et al.* Different approaches to analyze the dipolar interaction effects on diluted and concentrated granular superparamagnetic systems. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **428**, 105-118, doi:10.1016/j.jmmm.2016.12.019 (2017).
- 19 Mou, Y. *et al.* The Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface Charge on Antigen Cross-Presentation. *Nanoscale research letters* **12**, 52, doi:10.1186/s11671-017-1828-z (2017).
- 20 Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995-4021, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.012 (2005).

- 21 Tripathi, A. & Melo, J. S. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications*. Vol. Volumen 66 (Springer Nature, 2017).
- 22 Jadhav, N. V. *et al.* Synthesis of oleic acid functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **108**, 158-168, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.02.035 (2013).
- 23 Gert Storm<sup>\*\*\*</sup>, S. B., Toos Daemenb, Danilo D. Lasic<sup>”</sup>. Surface modification of nanoparticles to. *Advanced Drug Delivery Reviews* **17**, 31-48 (1995).
- 24 Ana Espinosa, R. D. C., Jelena Kolosnjaj-Tabi, Patrice Flaud, Teresa Pellegrino, and Claire Wilhelm. The Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano*, 1-35, doi:10.1161/circimaging.113.000607/-/dc1 (14 Jan 2016).
- 25 Caroline Jung, M. M. G. K., MS; Oliver T. Bruns, PhD; Tanja Dučić, PhD; Barbara Freund, PhD; Markus Heine, PhD; Rudolph Reimer, PhD; Alke Meents, PhD; Sunhild C. Salmen, MS; Horst Weller, PhD; Peter Nielsen, MD; Gerhard Adam, MD; Jörg Heeren, PhD; Harald Ittrich, MD. Intraperitoneal Injection Improves the Uptake of Nanoparticle-Labeled High-Density Lipoprotein to Atherosclerotic Plaques Compared With Intravenous Injection. *Molecular Imaging*, 303-311, doi:10.1161/circimaging.113.000607/-/dc1 ( November 27, 2013).
- 26 Kim, J. E., Shin, J. Y. & Cho, M. H. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of toxicology* **86**, 685-700, doi:10.1007/s00204-011-0773-3 (2012).
- 27 Musa E. Mohamed<sup>1</sup>, Abdelhafeez M. A. Mohammed<sup>2</sup>. Experimental and Computational Vibration Study of Amino Acids. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 1-17 (2013).
- 28 Culita, D. C. *et al.* Superparamagnetic nanomagnetites modified with histidine and tyrosine. *Materials Chemistry and Physics* **111**, 381-385, doi:10.1016/j.matchemphys.2008.04.033 (2008).
- 29 S. OLSZTYNSKA, M. K., L. VRIELYNCK, and N. DUPUY. Vibrational Spectroscopic Study of L-Phenylalanine:Effect of pH. *Institute of Physics, Wroclaw University of Technology*, **55**, 901-907 (2001).
- 30 Murguía, R. C. B. C. R. M. E. M. J. A. Á. M. J. V. F. M. C. A. V. y. *Cultivo in vitro de células animales y sus aplicaciones*. (CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN PARASITOLOGÍA VETERINARIA, DICIEMBRE 2011).
- 31 Farzaneh, F., Sadeghi, Y., Maghami, M. & Asgharpour, Z. Immobilized Vanadium Histidine and Tryptophan Schiff Base Complexes on Modified Magnetite Nanoparticles as Epoxidation Catalyst. *Journal of Cluster Science* **27**, 1701-1718, doi:10.1007/s10876-016-1034-7 (2016).
- 32 Sadhukha, T., Wiedmann, T. S. & Panyam, J. Inhalable magnetic nanoparticles for targeted hyperthermia in lung cancer therapy. *Biomaterials* **34**, 5163-5171, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.061 (2013).
- 33 Gil, S., Correia, C. R. & Mano, J. F. Magnetically labeled cells with surface-modified fe<sub>3</sub> o<sub>4</sub> spherical and rod-shaped magnetic nanoparticles for tissue engineering applications. *Advanced healthcare materials* **4**, 883-891, doi:10.1002/adhm.201400611 (2015).
- 34 Lotfi, S., Ghaderi, F., Bahari, A. & Mahjoub, S. Preparation and Characterization of Magnetite–Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Cytotoxicity Effects on MCF7

- and Fibroblast Cells. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, doi:10.1007/s10948-017-4094-5 (2017).
- 35 Mancarella, S. *et al.* Polymer-Coated Magnetic Nanoparticles for Curcumin Delivery to Cancer Cells. *Macromolecular bioscience* **15**, 1365-1374, doi:10.1002/mabi.201500142 (2015).
- 36 Wang, X. *et al.* Enhanced Intracellular Hyperthermia Efficiency by Magnetic Nanoparticles Modified with Nucleus and Mitochondria Targeting Peptides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **16**, 6560-6566, doi:10.1166/jnn.2016.10852 (2016).
- 37 Zhang, Y., Kohler, N. & Zhang, M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553-1561, doi:10.1016/S0142-9612(01)00267-8 (2002).
- 38 Zhang, Y. & Zhang, J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *Journal of colloid and interface science* **283**, 352-357, doi:10.1016/j.jcis.2004.09.042 (2005).
- 39 Chen, M. J., Shen, H., Li, X. & Liu, H. F. Facile synthesis of oil-soluble Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles based on a phase transfer mechanism. *Applied Surface Science* **307**, 306-310, doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.031 (2014).
- 40 Barth\*, A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **74**, 141–173 (2000).
- 41 Robert M. Silverstein, G. C. B., Terence C. Morrill. *Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos*. 2 edn, Vol. 1 85-170 (Editorial Diana, 1981).
- 42 S. SURIÑACH, M. D. B., S. BORDAS, N. CLAVAGUERA, M. T. CLAVAGUERA-MORA. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR.* **31**, 11-37 (1992).
- 43 Tsai, H., Lin, W., Chuang, M., Lu, Y. & Fuh, C. B. Multifunctional nanoparticles for protein detections in thin channels. *Biosensors & bioelectronics* **90**, 153-158, doi:10.1016/j.bios.2016.11.023 (2017).
- 44 Zhang, L., He, R. & Gu, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* **253**, 2611-2617, doi:10.1016/j.apsusc.2006.05.023 (2006).