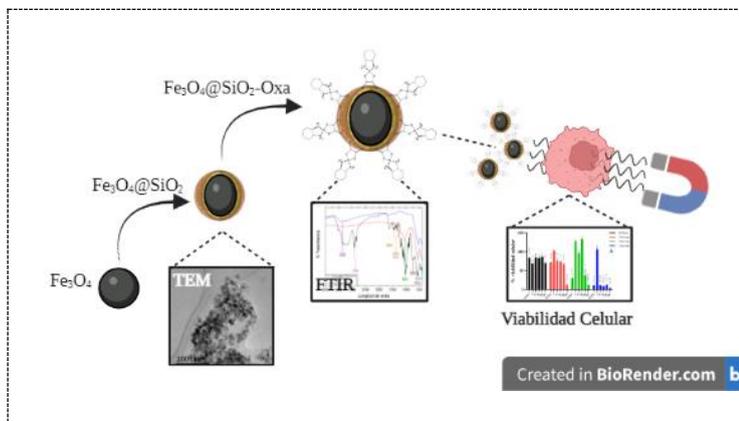


**DESARROLLO DE UN NANOCOMPUESTO  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  COMO POTENCIAL  
NANOTRASPORTADOR DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL  
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

**Graphical Abstract (GA)**



**Síntesis de nanopartículas de hierro recubiertas por sílice, como nanotransportador de oxaliplatino**

***DESARROLLO DE UN NANOCOMPUESTO  $Fe_3O_4@SiO_2$  COMO POTENCIAL  
NANOTRASPORTADOR DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL  
GLIOBLASTOMA MULTIFORME***

***José Miguel Montero Vásquez***

*Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por:*

*Dr. Daniel Llamosa Pérez*

*Dra. Mónica Losada Barragán*

*Dr. Javier Rincón Ortiz*

## **Resumen**

Entre todos los tratamientos para el glioblastoma multiforme, la quimioterapia es el más extendido debido a los medicamentos contra el cáncer, que ayudan a reducir el tamaño del tumor.

Desafortunadamente, estos medicamentos presentan varios problemas, como la resistencia de las células cancerosas y su baja especificidad. El uso de nanoportadores de estos fármacos es una estrategia novedosa que puede reducir los efectos secundarios asociados a la quimioterapia y así obtener un tratamiento con una menor carga para el organismo. Se prepararon nanoportadores basados en nanopartículas de hierro superparamagnéticas recubiertas con óxido de silicio.

Finalmente, la superficie del nanocompuesto se funcionalizó con el fármaco oxaliplatino, generalmente utilizado en quimioterapia. Las propiedades estructurales, morfológicas y magnéticas se caracterizaron utilizando técnicas microscópicas y espectroscópicas como la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la difracción de rayos X (XRD), la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la magnetometría de muestra vibrante (VSM). La viabilidad celular se evaluó mediante ensayos MTT, utilizando células sanas (fibroblastos) y células cancerosas (glioblastoma) en presencia de nanopartículas de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), nanopartículas de hierro recubiertas con óxido de silicio ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) y nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  funcionalizadas con oxaliplatino ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - \text{Oxa}$ ).

## **Abstract**

Among all the treatments for glioblastoma multiforme, chemotherapy is the most widespread because of anticancer drugs, which help shrink the tumor. Unfortunately, these drugs present several problems, such as the resistance of cancer cells and their low specificity. Using nanocarriers of these drugs is a novel strategy that can reduce the side effects associated with chemotherapy and thus

obtain treatment with a lower burden on the body. Nanocarriers based on superparamagnetic iron nanoparticles coated with silicon oxide were prepared. Finally, the surface of the nanocomposite was functionalized with the drug oxaliplatin, usually used in chemotherapy. The structural, morphological, and magnetic properties were characterized using microscopic and spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and vibrating sample magnetometry (VSM). Cell viability was assessed by MTT assays, using healthy cells (fibroblasts) and cancer cells (glioblastoma) in the presence of iron nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), iron nanoparticles coated with silicon oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  nanoparticles functionalized with oxaliplatin ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  - Oxa).

**Palabras clave:** Nanocompuesto, Superparamagnetico, Ultrasonidos, Glioblastoma multiforme, Citotoxicidad

## **Introducción**

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. Solo en el año 2020 se le atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de muertes y esto depende del tipo de cáncer (*Cáncer*, n.d.) y en Colombia las cifras anuales de fallecidos son de 33 mil colombianos al año (*Ministerio de Salud y Protección Social*, n.d.). Entre los tipos de cáncer más comunes a nivel global encontramos el cáncer de mama, de pulmón, colon y recto, próstata, de piel y gástrico (National Cancer Institute, 2022). En Colombia los cánceres más comunes son el cáncer de mama, próstata, colon y recto, estómago y pulmón (*Minsalud Se Unió a Conmemoración Del Día Mundial Contra El Cáncer*, n.d.).

Adicionalmente se encuentran cánceres poco comunes pero con altas tasas de mortalidad, como lo es el glioblastoma multiforme (GBM) el cual tiene una incidencia entre 2 y 19 casos por 100.000 habitantes/año en Colombia y tasas de supervivencia menores a un año después de diagnosticado el cáncer (Páez et al., 2013), debido a que se le atribuyen limitaciones en el tratamiento por la locación del tumor, limitaciones con la edad de los pacientes (Batash et al., 2017) y la escases de estudios adecuados que evidencien un beneficio significativo de otras terapias (Valenzuela, 2017).

Adicionalmente, el GBM está compuesto principalmente por astrocitos y una proporción de células madre, las cuales le brindan al tumor un suministro de nuevas células cancerosas, esto hace que aparezcan células tumorales más resistentes a los tratamientos (Stoyanov et al., 2018), lo que hace que el tumor sea difícil de tratar.

Existen diversos tipos de tratamientos contra el cáncer, como puede ser la cirugía, las inmunoterapias, terapias hormonales, radio terapia y quimioterapia, pero éstas presentan diversas desventajas dependiendo el tipo de tratamiento y la zona en la que se encuentre ubicado el GBM, ya que en estos se prioriza el suprimir de forma rápida el tumor para evitar la proliferación celular. Sin embargo, la quimioterapia sigue siendo uno de los mayores referentes en el tratamiento contra el cáncer, esto debido a la diversidad de alternativas que ofrece, frente a los distintos tipos de cánceres, además de los

diferentes tipos de terapias (C. Y. Yang et al., 2023).

En la actualidad existen tres tipos de estrategias para el uso de fármacos anticancerígenos, la primera es la combinación de diferentes fármacos para así potenciar su uso y mejorar el tratamiento, la segunda es aumentar la dosis de los medicamentos y la última es usar los medicamentos anticancerígenos junto a otras técnicas como lo es la cirugía o la radiación (Parnell & Woll, 2005). Sin embargo, dichas metodologías no disminuirían el impacto al organismo, generando así problemas adversos ya que afectan también a los tejidos sanos. Adicionalmente los pacientes que sobreviven al tratamiento tienden a presentar metástasis, lo cual es un problema importante. Si el tumor reaparece la quimioterapia presentará limitaciones como la resistencia, la toxicidad potencial y los múltiples efectos secundarios (Riedl et al., 2011)

La industria bioquímica ha venido evaluando el empleo de nanomateriales como nanotransportadores debido a sus ventajas frente a los productos farmacéuticos sin funcionalizar, empleados en terapéuticas tradicionales. Esto se debe a que las nanopartículas presentan propiedades físicas distintas, a causa de su tamaño reducido, ofreciendo una muy buena relación área superficial / volumen ((McNeil, 2005). Los materiales nanoestructurados adicionalmente nos permiten el empleo de posologías inferiores, una toxicidad reducida, son biodegradables (Kandasamy & Maity, 2015), su síntesis es económica y de fácil incorporación en la industria farmacéutica, específicamente para la administración de fármacos dirigidos. La aplicación de nanopartículas de hierro, dadas sus propiedades superparamagnéticas, al no exhibir ningún tipo de histéresis (Mdlovu et al., 2019), es decir que las nanopartículas no mantienen alineación de los espines una vez la interacción con un campo magnético externo ha cesado (Munnier et al., 2008), hace de éstas un material interesante debido a su baja toxicidad y facilidad para ser direccionadas / focalizadas a través del empleo de campos magnéticos externos. Por esto se ha evidenciado un aumento en el empleo de los productos nanotecnológicos (Harris, 2019), en la industria.

Para conseguir que el nanocompuesto a producir englobe estas propiedades, su síntesis juega un rol fundamental. Entre las diversas tipologías de síntesis, se encuentra la síntesis biológica, misma que emplea materiales naturales y por ende un uso mínimo de reactivos nocivos para el ambiente, sin embargo, los tiempos de síntesis son extensos (Xu et al., 2022; Ying et al., 2022). También, encontramos las síntesis físicas, las cuales se caracterizan por el bajo rendimiento y sus procesos amigables, pero su principal problemática recae en la liberación de grandes cantidades de energía y sus tiempos de síntesis (Abid et al., 2022; S. Liu et al., 2020) Para finalizar, se encuentran las síntesis químicas las cuales emplean metodologías simples pero una gran cantidad de productos químicos tóxicos (Abdul Razak et al., 2022).

Entre las metodologías químicas en años recientes se ha visto el aumento del interés por la cavitación ultrasónica. Esta metodología de síntesis emplea ondas acústicas para la producción de materiales a escala nanométrica. La cavitación generada, en términos generales es el crecimiento y colapso de burbujas en el seno del líquido. Las ventajas de esta metodología de síntesis respecto a las descritas anteriormente son, su eficiencia energética, el aumento de la velocidad de reacción, así como el aumento en el rendimiento (Jamkhande et al., 2019a) sin dejar de lado su viabilidad económica (Bhat et al., 2022). La optimización de las propiedades de las nanopartículas, al modificar los parámetros de la síntesis es otro aspecto por destacar (Fuentes-García et al., 2021), El empleo de rutas de síntesis asistidas por ultrasonidos brinda mejoras en las propiedades magnéticas de las nanopartículas producidas debido a que mejora los tamaños y distribución de las nanopartículas al evitar la formación de agregados, lo cual incide directamente en el desarrollo de propiedades magnéticas o superparamagnéticas con base en el tamaño del dominio (Cairós et al., 2020).

Se ha evidenciado la implementación de las nanopartículas como agente de transporte de fármacos contra el cáncer, debido al aumento en la carga útil del fármaco (Dinakar et al., 2022), y en

consecuencia, impactando en un aumento en la tasa de supervivencia. Los nanotransportadores varían entre tamaños y morfología favoreciendo la adsorción del fármaco si son más grandes y una mejor penetración del fármaco al tumor si son más pequeñas (Mdlovu et al., 2019). Adicionalmente las morfologías esféricas (H. W. Yang et al., 2011), mejoran la internalización de los nanotransportadores (Mdlovu et al., 2019). Además de las propiedades específicas que presentan las nanopartículas, las nanopartículas con propiedades magnéticas favorecen propiedades como la penetración y retención de los fármacos, para evitar que estos se estanquen en los diversos tejidos presentes (Movileanu et al., 2022).

Entre las nanopartículas mencionadas anteriormente como nanotransportadores, las nanopartículas de óxido de hierro, conocidas como SPION por sus siglas en inglés *Super Para-magnetic Iron-Oxide Nanoparticles* exhiben superparamagnetismo, lo cual da a los nanocompuestos la capacidad de tener una respuesta rápida frente a un campo magnético externo aplicado (Pillai et al., 2022), para así mejorar los tiempos que tardan los fármacos actuales en llegar al tumor diana. Este efecto es de gran interés en la medicina, ya que permite la destrucción de las células cancerosas con mayor facilidad, transportando fármacos al tumor diana impidiendo la proliferación celular mediante la interacción del fármaco con el ADN celular.

Para mejorar la biocompatibilidad y reducir la agregación de las nanopartículas en sistemas biológicos (Madhubala et al., 2023) es necesario la modificación superficial de la nanopartícula con materiales orgánicos o inorgánicos como puede ser un recubrimiento de sílice. La sílice ostenta diversas propiedades relevantes para este contexto como biocompatibilidad, ausencia de toxicidad, y además, de que su área superficial es muy alta (Sadeghi et al., 2023), lo que le permitiría la implementación del nanocompuesto como vehículo transportador de fármacos, esto al ponerlo en contacto con el fármaco específico y así aumentar la respuesta del fármaco frente al tumor diana y por ende, reducir las concentraciones empleadas en las metodologías tradicionales (Hincapié-Rojas et al., 2020).

Por los anteriores problemas presentes en los fármacos y las ventajas del uso de la nanotecnología, el presente trabajo de investigación se plantea desarrollar un nanocompuesto con un núcleo superparamagnético de óxido de hierro recubierto con sílice, como potencial nanotransportador de fármacos para el tratamiento de GBM a través una terapia dirigida. Para lograr dicho objetivo, Se inicia por la síntesis de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con  $\text{SiO}_2$  a través de la coprecipitación de sales de hierro asistida por cavitación ultrasónica, posteriormente el nanocompuesto ya sintetizado se funcionalizó con el fármaco quimioterapéutico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-Oxa}$ ), para la caracterización estructural, morfológica y magnética, mediante técnicas microscópicas, espectroscópicas y magnéticas. Para finalizar se establece la viabilidad celular de células de fibroblastos de riñón (BHK-21) en presencia del nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  mediante pruebas MTT; así como evaluar la viabilidad celular del complejo nanocompuesto-fármaco en células eucariotas de glioblastoma (T98G) mediante pruebas MTT.

## 1. Materiales y Métodos

### ❖ 1.1 Materiales

Los reactivos que se emplearon para la síntesis de nanopartículas son: Cloruro de hierro (II) tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES), Dodecilsulfato sódico (SDS), Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3\text{OH}$ ) y durante todo el proceso de síntesis se empleó agua tipo I como disolvente / suspensionante. El fármaco anticancerígeno utilizado fue oxaliplatino ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$ ) (OXA)

Para la evaluación mediante MTT (bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio), se emplearon los siguientes reactivos: medio de cultivo celular DMEM (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium, BioWhittaker), suero fetal bovino (Biowest) para los cultivos celulares, solución salina tamponada con fosfato (PBS, BioWhittaker), tripsina (Veisene), MTT (Trevigen) y DMSO (Dimetilsulfóxido, BioBasic). El cultivo celular corresponde a la línea celular cancerosa glioblastoma multiforme (T98G) y la línea celular sana corresponde a fibroblastos de riñón (BHK-21).

### ❖ 1.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

La síntesis de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se llevará a cabo mediante el método de coprecipitación asistida por ultrasonidos directos empleando el equipo ultrasonicador Hielscher UP400ST (400W, 24 kHz), trabajando en un ciclo de pulsado de 0,9s encendido y 0,1s apagado y ajustado a una potencia ultrasónica del 60% de la potencia máxima (400W). Las sales de hierro ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) se emplean en disolución con una proporción molar 1:2 respectivamente, a continuación, se describe brevemente la metodología empleada. Se disuelven 516,88 mg de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 1408,04 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua tipo 1. Una vez la disolución de las sales de hierro se encuentran debidamente homogenizadas, estas se coprecipitan con una disolución de 100 ml de  $\text{NH}_3\text{OH}$  al 25%, este proceso se realiza por goteo hasta la completa adición de los 100ml de la disolución reductora, controlado éste mediante una bomba peristáltica BT101F. Todo el proceso de síntesis se irradia con ultrasonidos (US),

además de realizarse dentro de un baño de agua – hielo cuya finalidad es controlar la temperatura del medio de reacción, mismo que alcanza una temperatura máxima de 35°C. La dispersión coloidal final se precipita magnéticamente mediante imanes de neodimio, lavando el sólido obtenido por triplicado empleando agua Tipo I y descartando el sobrenadante. Las SPION son resuspendidas en 100 ml de agua Tipo I y se dividen en dos fracciones. La primera fracción de 33,3 ml se emplea para la caracterización de las nanopartículas sin recubrir y por ende se pasan a un horno de secado (Thermo Scientific) a 40°C por un lapso de 48 horas. La segunda fracción de 66,6 ml se recubre con APTES, para así obtener el nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .

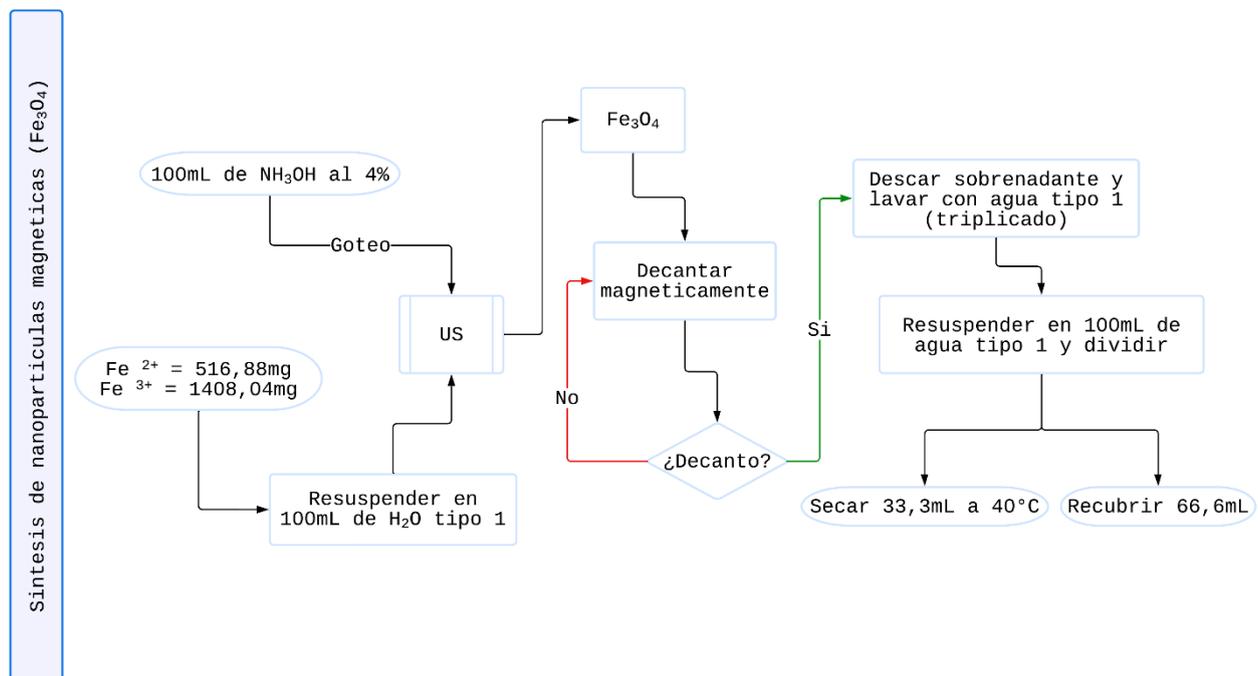


Fig.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas

### ❖ 1.3 Recubrimiento de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4$ con $\text{SiO}_2$ (APTES)

Para el recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , primero se prepara una disolución de 720 mg de SDS en 100 ml de agua tipo I, lo cual ayuda a la dispersión de las SPION obtenidas en el paso anterior y así evitar la agregación de estas. Se homogeniza empleando un baño de ultrasonidos indirectos. Una vez homogenizada se agregan súbitamente los 66,6 ml de SPION, este proceso se adelanta empleando ultrasonidos directos durante 3 minutos, posteriormente mediante un goteo se le

adicionan 3,2 ml de nuestro precursor de SiO<sub>2</sub> (APTES) y se procede con lavados del nanocompuesto producido, los cuales se realizan tres veces. Para finalizar, el nanocompuesto es secado a 40°C durante dos días.

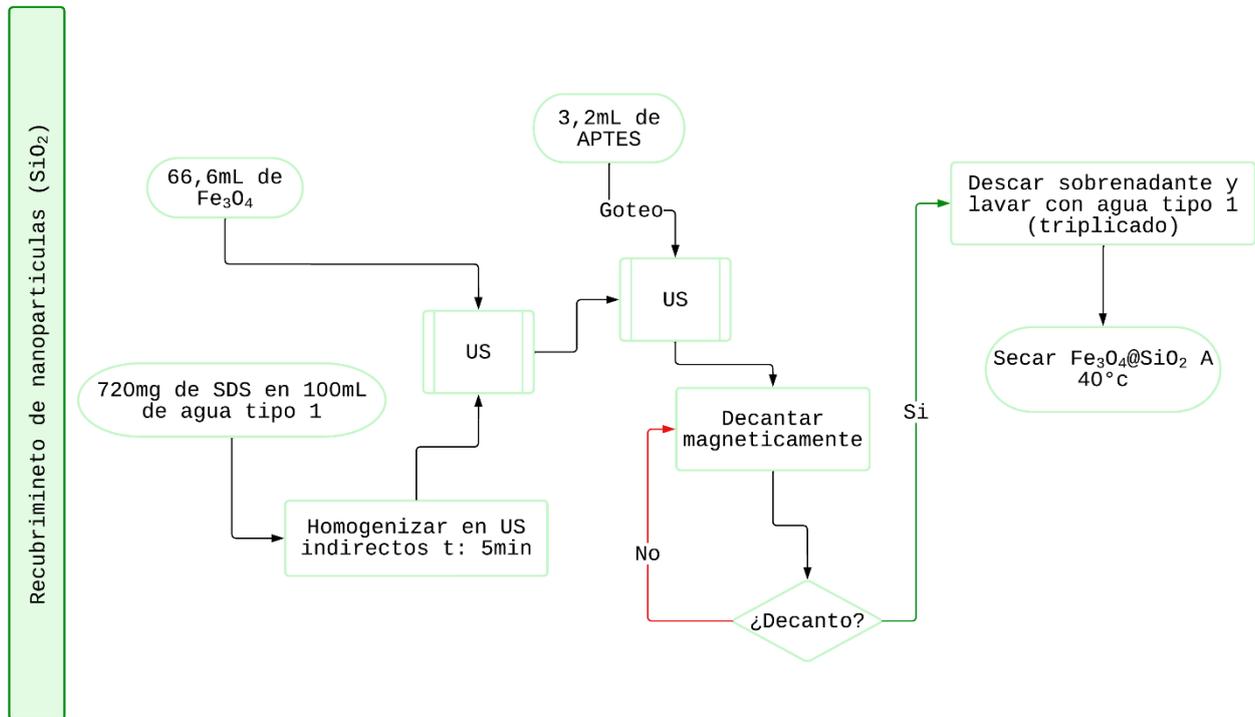


Fig.2 Recubrimiento de nanopartículas de hierro

#### ❖ 1.4 Funcionalización del nanocompuesto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> con el fármaco oxaliplatino (OXA) para la formación del sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@OXA.

La capacidad de adsorción de las nanopartículas frente al fármaco de interés se determinó a través de la fisisorción del oxaliplatino. Esta fisisorción se realiza para el montaje de los ensayos de viabilidad celular. Se toman 200 µg de nanopartículas y se resuspenden en 8 µl de la solución inicial de oxaliplatino (la cual contiene una concentración de 100 mg en 40 ml), estos contienen una concentración de 200 µg de oxaliplatino, esta disolución se homogeniza durante 20 min en un agitador vortex, posteriormente se seca la disolución a 25°C durante un día. Una vez terminado el proceso de secado se procede a la separación magnética de las nanopartículas, esto con el fin de solo obtener nuestro sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@OXA y descartar las trazas sobrantes de oxaliplatino que no se fisisorbió en la superficie

del nanocompuesto. El nanocompuesto con propiedades magnéticas se resuspende en DEMEM. El producto final se irradia con luz UV durante 20min para esterilizar la suspensión y proceder a emplear esta en los ensayos de viabilidad celular.

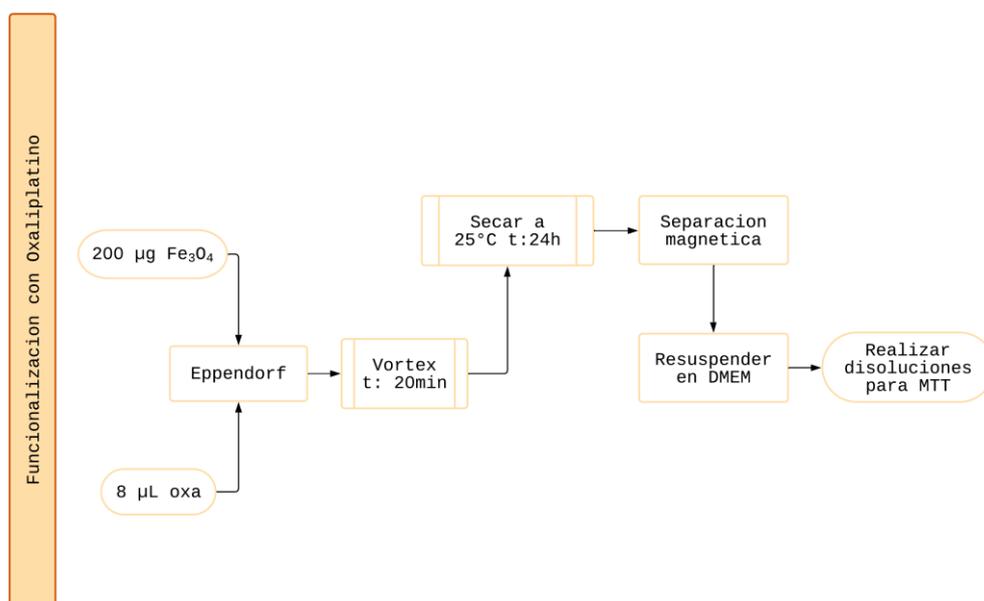


Fig.3 Funcionalización Oxaliplatino

### ❖ 1.5 Determinación de la concentración de oxaliplatino en el nanocompuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Para este ensayo se realizó primero una curva de calibrado con el fin de obtener la función de la recta correspondiente con la ecuación de Lambert - Beer, con una concentración inicial de 2,5 mg/ml de oxaliplatino para adelantar diluciones seriadas de la misma hasta obtener una concentración final de 0,039 mg/ml de oxaliplatino, posteriormente, se midieron suspensiones del nanocompuesto ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) en presencia del fármaco con intervalos que van desde 0 min, 15 min y 30 min, con una concentración de 1 mg de nanocompuesto y 2,5 mg de oxaliplatino (1ml). Para el tiempo de 0 min, se mide el espectro solo del fármaco, equivalente a una adsorción del fármaco cero, por parte del nanocompuesto. Para el intervalo de tiempo de 15min, se homogenizan el nanocompuesto en presencia del fármaco durante 15 min empleando un vortex, posteriormente se decantan las nanopartículas con ayuda de un campo magnético y se retira el sobrenadante, el cual se mide en un espectrofotómetro UV-Vis (Spectroquant® Prove 600). El nanocompuesto se resuspende nuevamente en 1ml de oxaliplatino

y se coloca en vortex durante 30 min, una vez terminados los 30 min, se decantan las nanopartículas y se mide nuevamente el sobrenadante de la muestra. Esto con el fin de establecer qué tiempo de interacción es el más adecuado para la fisisorción de oxaliplatino por parte del nanocompuesto. Todos los blancos empleados correspondían a agua Tipo I.

#### ❖ **1.6 Ensayo de viabilidad celular en glioblastoma multiforme y fibroblastos.**

Se adelantaron ensayos MTT para evaluar la citotoxicidad de las SPION y del nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ , además de evaluar la viabilidad celular del sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@OXA$  y de la acción, por si sólo del oxaliplatino, esto con el fin de estimar que porcentaje de viabilidad celular presentan todas nuestras nanoestructuras. Todo esto se realizó, empleando la línea celular T98G en una placa de 96 pozos en la cual se sembraron 10.000 células por pozo y se dejaron incubando durante 24 horas. Posteriormente se aplicaron nuestros estímulos y controles con las siguientes condiciones, medio de cultivo estándar, DMSO 5%,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2/OXA$ , OXA sola y células sin estímulos para el control negativo, para los blancos se colocó  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2/OXA$ , OXA sola, sin células, en un rango de concentraciones que van desde 5 ppm, 25ppm, 50ppm, 100 ppm y 200 ppm (mismas concentraciones puestas para los estímulos). Después de colocar los estímulos se realizaron mediciones a diversos tiempos, de 0h, 24h, 48h y 72h. Pasados los tiempos correspondientes se adicionaron 10 uL de reactivo MTT y se incubó la placa por 4 h. Se descartó el medio y se adicionaron 100 uL de DMSO, permitiendo la incubación de la placa por 20 minutos. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (FC Multiskan TM). Para el análisis de viabilidad celular en la línea T98G y BHK-21 sin oxaliplatino se estimó el mejor IC50 presente en las pruebas con células T98G (con oxaliplatino). El IC50 se calculó mediante una distribución log normal y posteriormente una regresión no lineal entre el logaritmo del inhibidor y la respuesta dada por los estímulos (en % de viabilidad), el cual fue de 15 ppm en el tiempo de 72h. Esta concentración se empleó para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ . Todos los ensayos fueron desarrollados por triplicado. Pasadas las 72h se evaluó la viabilidad celular en un lector de microplacas (FC Multiskan TM).

### ❖ 1.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en los programas ImageJ, OriginPro® 2021b y GraphPad Prism versión 8.0.1. Las diferencias entre las muestras y el control se evaluaron mediante la prueba t Student. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

### ❖ 1.8 Caracterización del nanocompuesto

#### • Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para este análisis se empleó un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 F20 operado a 200 kV para obtener imágenes a 145.000x. La preparación de las muestras consistió en diluir 1 ml de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2/\text{OXA}$  respectivamente en agua tipo I empleando irradiación ultrasónica, finalmente se depositó una gota sobre rejilla de cobre recubierta con una película de carbono tipo lacey.

#### • Difracción de rayos x (DRX)

Se utilizó un equipo de la marca Analytical de referencia Minipalm 2, dotado de una fuente de rayos X con ánodo de cobre, de alta estabilidad. Este difractómetro trabaja con una geometría Bragg-Brentano. Se analizaron muestras de 30 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2/\text{OXA}$  en polvo, previamente secadas y molturadas. Las mediciones fueron realizadas con un paso angular de  $2\theta^\circ$  e intervalo angular de  $15^\circ$  a  $80^\circ$  en  $2\theta$ .

#### • Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para establecer los enlaces presentes en las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ , se realiza una medición mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. Se empleó 30 mg en polvo por cada muestra de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2/\text{OXA}$ . El espectrofotómetro FTIR de serie Alpha Platinum de la marca Bruker registró la región IR de  $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ .

- **Magnetometría de muestras vibrante (VSM)**

La caracterización magnética de las nanopartículas se realizó mediante el análisis de la curva de histéresis magnética obtenida mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM), se empleó un magnetómetro Quantum Design (VersaLab TM), a temperatura 300 K, con un campo aplicado de -3T a 3T. Se empleó 30 mg en polvo por cada muestra de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$ .

## **2. Resultados y Discusión**

A continuación, se muestran los resultados de las propiedades morfológicas, estructurales, cristalinas, químicas y magnéticas de las  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$ , además de presentar los resultados de viabilidad celular en las líneas T98G y BHK-21.

- **2.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)**

Se realizó una caracterización morfológica de las nanopartículas mediante TEM, esto para determinar los tamaños de nanopartículas y para estudiar el efecto del APTES en la distribución de tamaños de las nanopartículas como se muestra en la Fig.4. A partir de la figura 4, determinamos el tamaño de los nanocompuestos  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$ , para el análisis de estas imágenes se empleó el software imageJ, con el cual fue posible la medición de los diámetros de las nanopartículas obtenidas. Mediante un ajuste log normal y un conteo de 100 nanopartículas de diversas imágenes dadas por el equipo, fue posible evidenciar un aumento gradual entre las nanopartículas solas, recubiertas y funcionalizadas, esto debido a la presencia del APTES en la superficie de las nanopartículas de hierro y la presencia del fármaco.

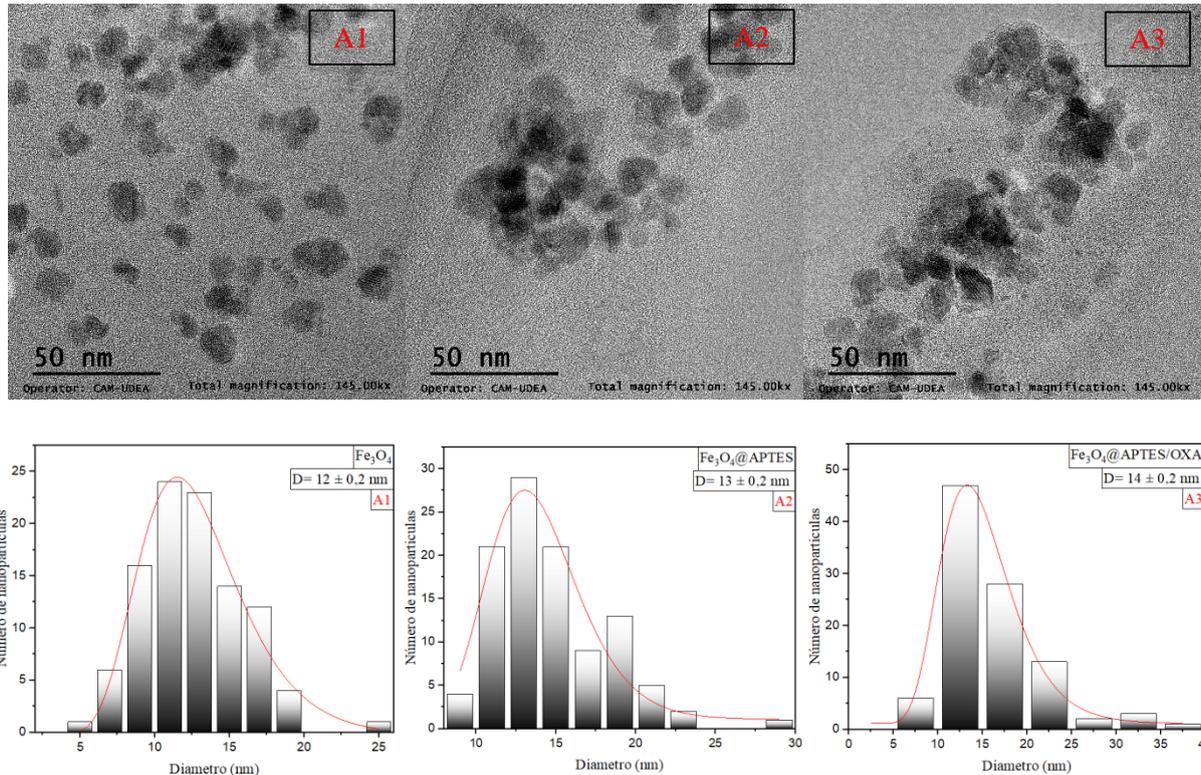


Fig.4. Microscopía electrónica de barrido (TEM) correspondientes a las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A1), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES (A2) y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES funcionalizada con Oxaliplatino (A3) y la distribución de tamaño correspondiente.

Basándonos en los resultados, podemos afirmar que las nanopartículas de hierro presentan una morfología esférica y un tamaño aproximado de 12 nm, las nanopartículas, una vez recubiertas con APTES, mantiene una morfología esférica, pero debido al recubrimiento se evidencia un aumento de tamaño a 13 nm y las nanopartículas funcionalizadas continúan presentando una morfología esférica y se evidencia un aumento del tamaño de las nanopartículas a 14 nm. Dichos tamaños son de gran interés, ya que para tamaños inferiores a 50 nm favorecen la internalización de las nanopartículas en las células diana, adicionalmente, su morfología esférica también favorece a dicha internalización tanto en células diana, como a través de diversas barreras biológicas (Kim et al., 2019).

## • 2.2. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM)

Se realizaron micrografías electrónicas de alta resolución (HRTEM) con el fin de observar la disposición espacial de los átomos y así estudiar la estructura cristalina de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> como se observa en la Fig. 5. Para esto se empleó el software DigitalMicrograph® con el cual es posible realizar una transformada rápida de Fourier, para calcular las distancias dentro los planos

crystalinos. Con base a estos resultados se puede decir que las nanopartículas presentan las franjas de cristalinidad con distancias interplanares de 0,205nm y 0,188nm para los planos (533) y (400) como se muestra en la Figura. 5<sup>a</sup>. Esto nos indica que las nanopartículas exhiben un alto grado de ordenamiento a corto y mediano alcance. Adicionalmente las imágenes TEM de alta resolución se pueden convertir en patrones de difracción a través del método de transformada rápida de Fourier (FFT) para el análisis cristalográfico (Figura 5b). A partir de la FFT se calculan las distancias interplanares, estas corresponden a los planos (111), (220), (311), (400), (511), (440) y (533), los cuales corresponden a la estructura de magnetita de espinela inversa (Fig.5b.), lo cual coincide con la tarjeta cristalográfica JCPDS #75-003. Para finalizar mediante la base de datos Materialsproject (*Materials Project - Materials Explorer*, n.d.), se realizó una simulación de la estructura cristalográfica de magnetita de espinela inversa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  para así contrastarla con la estructura cristalina que muestran las nanopartículas sintetizadas (Figura 5c), en esta se ven similitudes en la forma y la distribución de los átomos, dando como resultado nanoestructuras hexagonales propia de la magnetita.

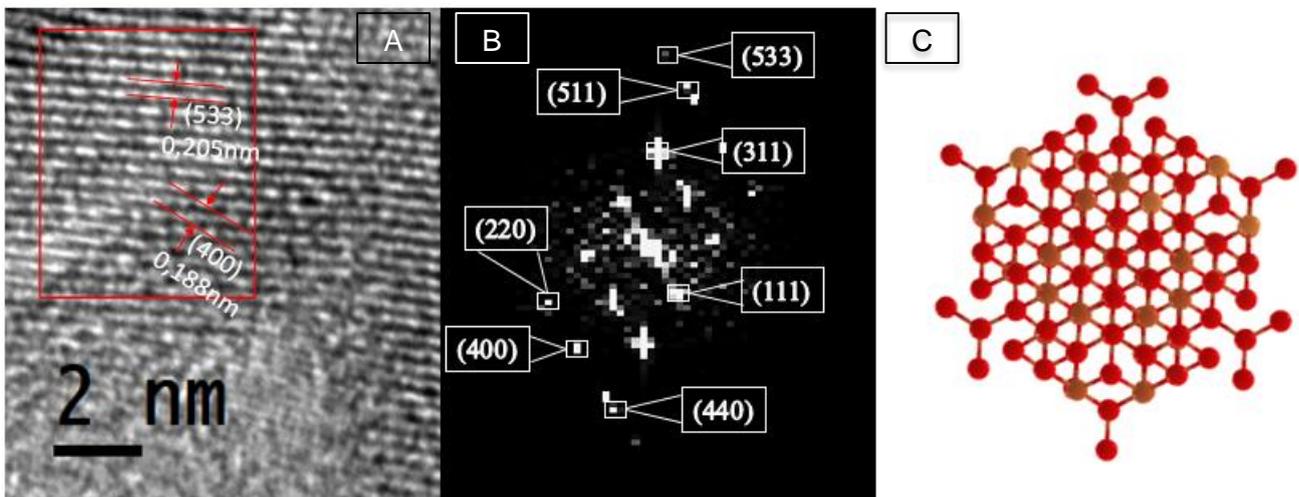


Fig.5. Espectro de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Para contrastar los resultados de HRTEM se adelantó un análisis de difracción de electrones de área seleccionada (SAED), esto para confirmar el plano de red de espinela inversa y los planos correspondientes a magnetita.

- **2.3. Difracción de electrones de área seleccionada (SAED)**

Los patrones de electrones de área seleccionada exhiben los diferentes anillos de la fase cristalina de

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , los cuales se correlacionan con los planos (111), (220), (311), (222), (400), (422) y (511), esto nos indica que las nanopartículas presentan un plano de red de espinela inversa para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Fig.6.) (con planos indexados JCPDS #75-003)(Kushwaha & Chauhan, 2023; Yu et al., 2022). Esta determinación se realizó mediante el software de imagen ImageJ y la ecuación para la calibración de la cámara de TEM  $d_{hkl} = \frac{\lambda L}{R}$ , donde  $d_{hkl}$  hace referencia a la distancia interplanar,  $\lambda L$  a la constante de la cámara que es igual a 205,249217 Ånm y R al radio del cada anillo de difracción, para así encontrar la distancia interplanar.

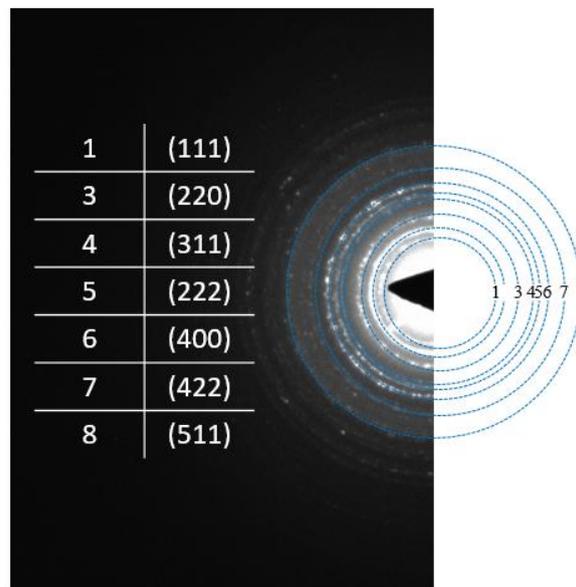


Fig.6. Espectro de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

#### • 2.4 Difracción de rayos x (DRX)

El difractograma de las nanopartículas SPION, SPION@APTES y SPION@APTES/OXA se muestra en la Fig.7. Los picos más intensos corresponden a los planos característicos (220), (311), (400), (422), (511), (440) y (533) de la estructura cristalina cubica de espinela inversa de magnetita, correspondientes a la tarjeta cristalográfica (JCPDS tarjeta #75-0033)(Cheng et al., 2010). Para realizar esto, se comparan las distancias interplanares de los picos y se evalúa si estas corresponden a su asignación en una tarjeta cristalográfica certificada.

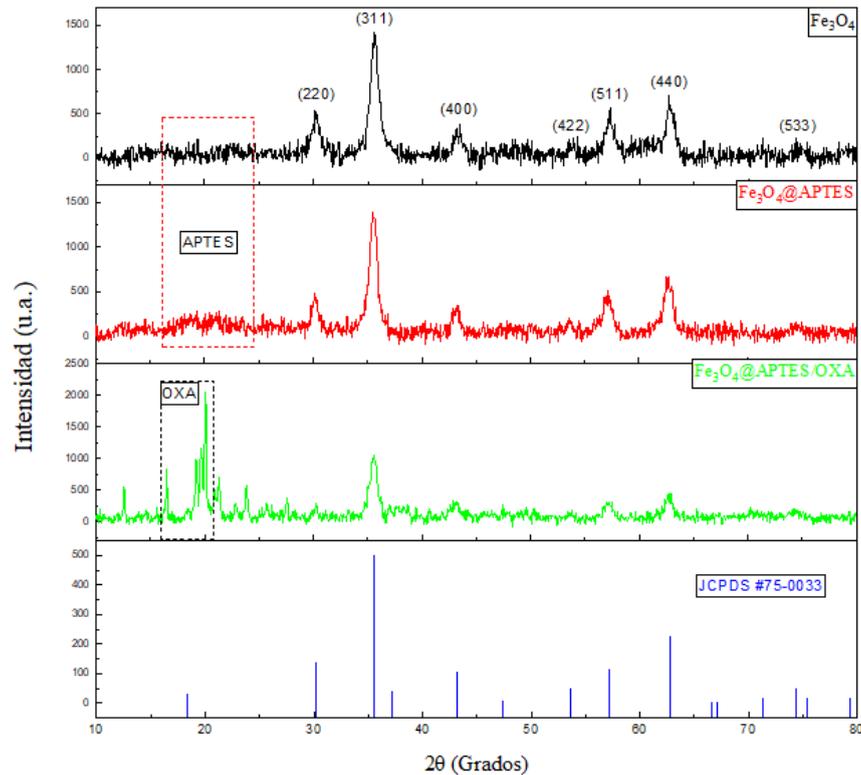


Fig.7. Difracción de rayos X (DRX) correspondientes a las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$  funcionalizada con Oxaliplatino

Para el caso de las  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$ , se puede observar (cuadro rojo) un aumento de la señal entre los rangos 15 y 30 grados, lo cual nos puede confirmar la presencia de la sílice amorfa (Biswas et al., 2018). Adicionalmente al comparar los picos con la tarjeta cristalográfica, nos confirma que estos no presentan ningún corrimiento, lo cual indica que la estructura cristalina del núcleo de magnetita se mantiene al haber recubierto las SPION con APTES, así como en la funcionalización con Oxaliplatino. Sin embargo, se puede apreciar una disminución en algunos de los picos principales del APTES en comparación con el hierro, debido a la fase amorfa que presenta el óxido de silicio. Para el caso de la funcionalización con oxaliplatino, se ve aún más la disminución del tamaño de los picos principales, debido a los azúcares y otros compuestos presentes en el fármaco, los cuales precipitan de forma amorfa.

Con los picos obtenidos en DRX se calcularon los valores del tamaño de cristalito, el cual fue determinado empleando la ecuación de Scherrer,  $L=K\lambda/\beta\cos\theta$ ; donde  $\lambda$  corresponde a la longitud de onda del haz incidente,  $\beta$  es el ancho de altura media del pico,  $\theta$  es el ángulo de reflexión de los picos

más intensos y  $K = 0,89$ , por el coeficiente dependiente de la forma del cristal, es decir si las partículas son esferoidales, cúbicas, tetraédricas u octaédricas, además del método con el que se calcula el tamaño del cristalito. Con esta fórmula y los valores calculados de los picos principales de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2/OXA$ , se obtiene el tamaño de cristalito el cual fue de 8,7 nm para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , de 7,4 nm para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  y debido al apantallamiento de las señales, debido a la creciente fase amorfa, no se pudo calcular el tamaño para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2/OXA$ .

El difractograma de  $\text{SPION}@APTES/OXA$ , mostro picos intensos de oxaliplatino en los valores de 2 theta de 16,32, 19,23, 20,66 grados (cuadro negro), esto debido a naturaleza cristalina del oxaliplatino (Pereira et al., 2016).

### • 2.5. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un análisis FTIR para las muestras de  $\text{SPION}$ ,  $\text{SPION}@APTES$  y  $\text{SPION}@APTES/OXA$ , las cuales se muestran en la Fig.8. En esta se evidencian las vibraciones de los enlaces presentes en las nanopartículas y en el oxaliplatino.

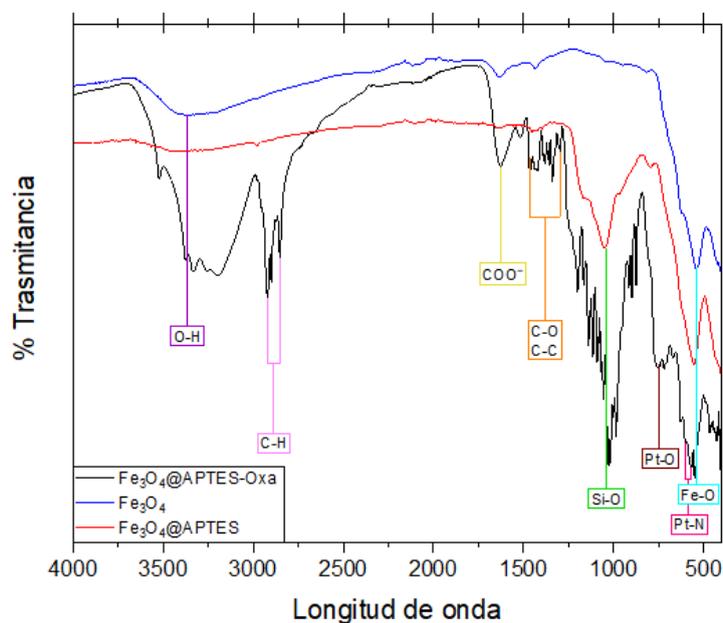


Fig.8. Espectrometría FTIR de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  funcionalizada con Oxaliplatino

Para confirmar la presencia del núcleo magnético del nanocompuesto se observa la presencia de una banda característica para la vibración del enlace Fe-O cercano a los  $500\text{ cm}^{-1}$ , indicando así la

presencia de óxido de hierro. Para el recubrimiento de las nanopartículas con SiO<sub>2</sub>, se aprecian las bandas de absorción características en 1.000 cm<sup>-1</sup>, asociada a la vibración de estiramiento asimétrico y simétrico del enlace Si-O. Adicionalmente se aprecia la presencia de bandas en 521 cm<sup>-1</sup> y 575 cm<sup>-1</sup> los cuales corresponden con vibraciones del enlace Pt-N y Pt-O respectivamente, lo cual nos confirma la presencia del fármaco oxaliplatino en nuestro nanocompuesto. Las bandas centradas en 1.300 cm<sup>-1</sup> corresponden al grupo ligando oxalato, confirmando la presencia del fármaco. La banda de absorción centrada en 1.666 cm<sup>-1</sup> permite confirmar la presencia del oxaliplatino en el nanocompuesto de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES. La presencia de un pico en 3.400 cm<sup>-1</sup> es debido a las vibraciones de estiramiento de la banda O-H, asociada a la presencia de agua adsorbida en la superficie de la sílice. Para finalizar se encuentran las señales características de los enlaces C-H en 2.900 cm<sup>-1</sup> y 2.860 cm<sup>-1</sup> (Alomairy et al., 2021; Hashemzadeh et al., 2021; Naini et al., 2022; Sundaresan et al., 2023).

- **2.6. Espectrometría de rayos X (EDS)**

El análisis de la espectrometría de rayos X (EDS) (Fig. 9), nos indicó la composición semi-cuantitativa de los elementos presentes en las muestras de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (B) y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>/OXA (C), lo cual nos señala que para las muestras de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, se detecta la presencia de Fe con una composición porcentual de 65,34% y la presencia de O con un 34,66%, lo cual nos confirma que los únicos elementos presentes son hierro y oxígeno correspondientes al óxido de hierro, es decir que no se generó ningún tipo de contaminación a la hora de la síntesis del núcleo magnético. Para las muestras de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>, encontramos la presencia de nitrógeno, oxígeno, hierro, sílice y sodio, con un porcentaje en peso de (1,10%), (35,84%), (46,93%), (5,88%) y (5,88%) respectivamente, esto nos indica la presencia de nuestro núcleo magnético (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Además, los picos característicos de SiO<sub>2</sub>, ya que se evidencian picos de Si y un pico de N perteneciente a nuestro precursor de óxido de sílice (APTES (C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>Si)), adicionalmente, encontramos la presencia de sodio, el cual pertenece a el redispersante de las nanopartículas, para evitar los agregados (SDS (NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>)). Para finalizar el espectro de la muestra de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>/OXA, muestra la aparición

de nitrógeno (1,89%), oxígeno (32,80%), sílice (10,22%), sodio (6,69%), hierro (38,02%) y platino (10,38%), lo cual nos señala la presencia de nuestro nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ , además de la presencia de nuestro fármaco oxaliplatino, esto por los picos presentes de platino en la muestra y los picos correspondientes a APTES y SDS.

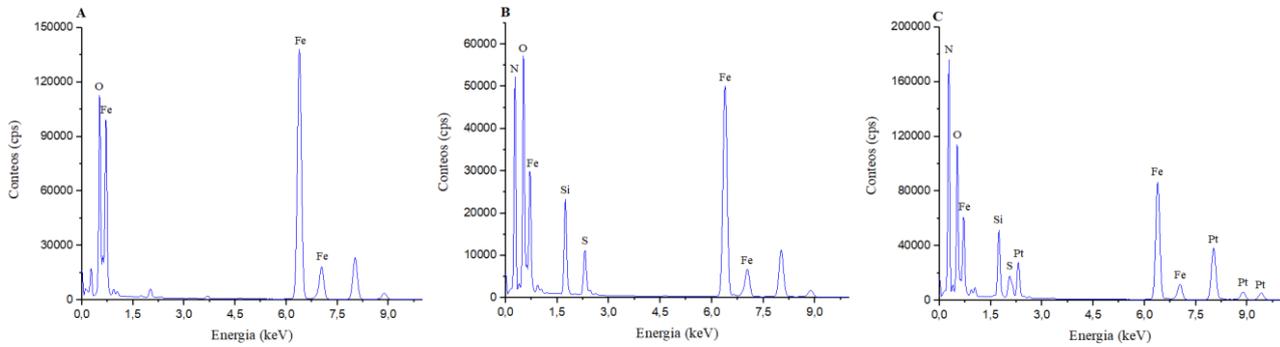


Fig.9. Espectrometría de rayos X (EDS) de la síntesis de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (A),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  (B) y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$  (C)

## • 2.7. Magnetometría de muestras vibrante (VSM)

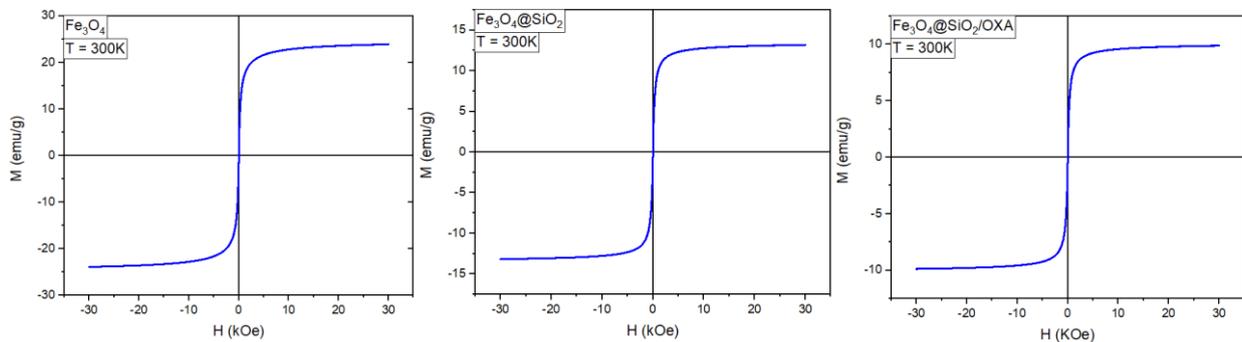


Fig.10. Curvas de caracterización magnética de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$

Se realizó un análisis mediante magnetometría (VSM), esto para evaluar las propiedades magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$  (Fig.10.). Este se realiza en función del campo magnético y a temperatura ambiente (300K), usando un campo magnético de -30 kOe a 30 kOe y se hace con el fin de determinar la presencia o no de bucles de histéresis a temperatura ambiente, la saturación de magnetización ( $M_s$ ) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$  fue de 23,9, 13,2 y 9,9 emu/g respectivamente. Esta disminución en la  $M_s$  es debido al recubrimiento de  $\text{SiO}_2$  y a la presencia de oxaliplatino en las muestras, por ende la magnetización de saturación disminuye. Sin embargo,

dicha disminución no afecta los valores de coercitividad en ninguna de las tres muestras, la cual fue de 0 (a temperatura ambiente), lo que nos indica que nuestras tres muestras tienen propiedades superparamagnéticas, las cuales son de gran interés en este trabajo (Z. Liu et al., 2023; Sajid et al., 2023), debido a que se pueden direccionar nuestras nanopartículas superparamagnéticas al tumor diana, empleando campos magnéticos externos.

- **2.8. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)**

Se realizó una espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), con el fin de determinar la concentración que adsorbe nuestro núcleo magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y el nanocompuesto ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) de oxaliplatino (Fig.11.). Este se realiza en el rango de 200nm a 500nm, ya que se evidencia que nuestro fármaco tiene un pico característico en una longitud de onda de 300nm. El núcleo magnético y el nanocompuesto ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) fueron expuestos a oxaliplatino en intervalos de tiempo, los cuales van de 0, 15 y 30 min. Los resultados expuestos en la Fig. 11. Nos indican que para el tiempo de 15 min, encontramos que el óxido de hierro adsorbe un 1,8% y que el nanocompuesto adsorbe un 11%, con respecto a la concentración en 0 min, lo cual indica la capacidad que tiene nuestra cubierta con  $\text{SiO}_2$  y para el tiempo de 30 min, tenemos que el óxido de hierro no adsorbe con respecto a la concentración inicial y para el caso del nanocompuesto adsorbe un 11%, lo cual sumado al tiempo anterior (15 min). Tenemos que para el tiempo de 30 min el nanocompuesto adsorbe un 22% de la concentración inicial de oxaliplatino.

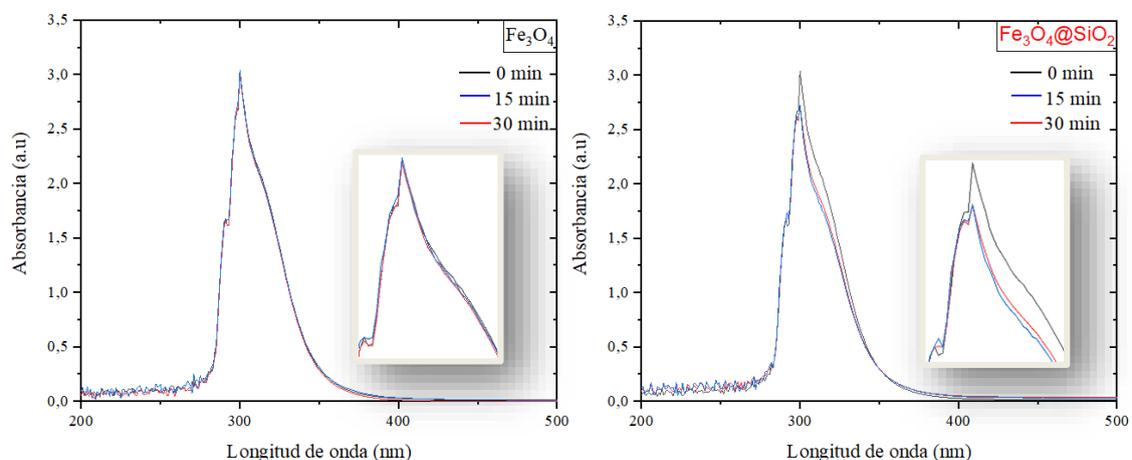


Fig.11. Curvas de absorbancia de oxaliplatino en UV-Vis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .

• **2.9. Ensayos viabilidad celular T98G y BHK-21**

Las células T98G fueron expuestas a los estímulos  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES-OXA$  y OXA, en intervalos de tiempo, los cuales van de 0, 24, 48 y 72h. Los resultados expuestos en la Fig. 12 y 13, muestran en porcentaje de viabilidad celular el impacto que tuvieron las nanopartículas funcionalizadas con el fármaco y el fármaco en las células

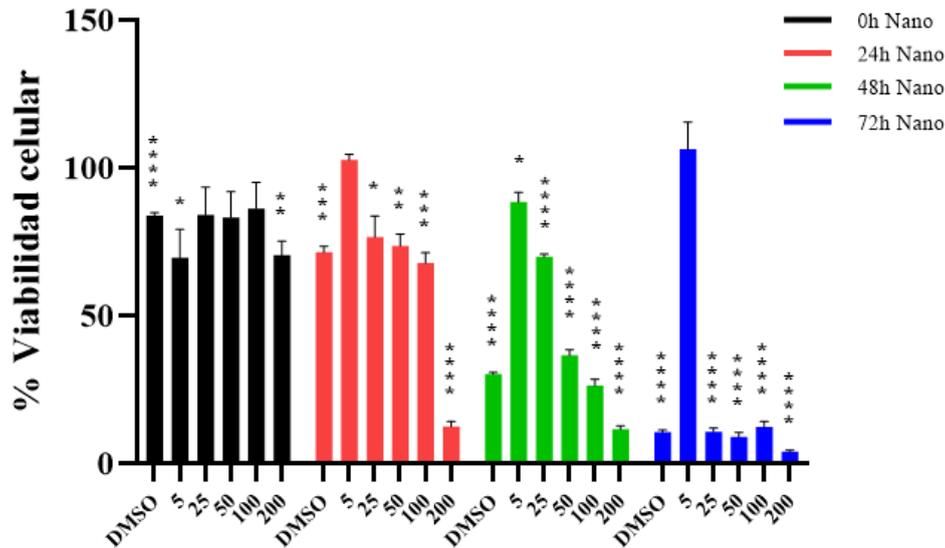


Fig.12. Porcentaje de viabilidad celular en células T98G en presencia del nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES/OXA$ , en el eje y se evidencia el % de viabilidad celular y en el eje x las diversas concentraciones que van desde 5, 25, 50, 100 y 200ppm y tiempos desde 0, 24, 48 y 72h, t-student de \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

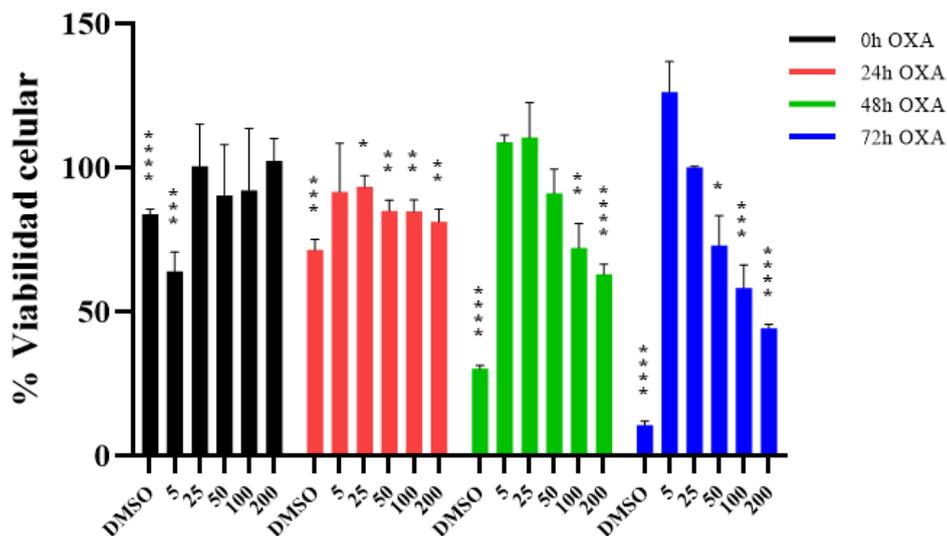


Fig.13. Porcentaje de viabilidad celular en células T98G en presencia de Oxaliplatino, en el eje y se evidencia el % de viabilidad celular y en el eje x las diversas concentraciones que van desde 5, 25, 50, 100 y 200ppm y tiempos desde 0, 24, 48 y 72h, t-student de \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Los valores usando la prueba t-student, nos indican que si hay una diferencia significativa entre el nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{APTES/OXA}$  y el fármaco Oxaliplatino, estas diferencias se ven con mayor claridad en el tiempo en el que estuvieron las células en contacto con el estímulo. Evidenciándose que a las 0 horas después del tratamiento la proliferación en la línea celular T98G, no se vio afectada por ningún tratamiento a ninguna concentración. Por otro lado, al cabo de 24 horas, el nanocompuesto funcionalizado disminuyó la viabilidad celular, por debajo del 50% en la concentración de 200ppm ( $p < 0,0001$ ), por el contrario, el fármaco no afectó la viabilidad celular, al cabo de 45 horas las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm del nanocompuesto funcionalizado disminuye la viabilidad celular por debajo del 50 % ( $p < 0,0001$ ) y el fármaco sigue sin presentar ningún tipo de respuesta citotóxica en las células. Para finalizar, en el tiempo de 72 horas el nanocompuesto disminuye la viabilidad por debajo del 15% para las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ppm ( $p < 0,0001$ ), por su parte el fármaco solo disminuye por debajo del 50% la viabilidad celular en la concentración de 200ppm ( $p < 0,0001$ ). Esto nos indica que el nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  aumentó significativamente el efecto anticancerígeno del fármaco oxaliplatino. Por lo cual se puede llegar a plantear que cuando las nanopartículas se internalizan en la célula por medio de una vía de endocitosis dependiente del receptor y entran al interior celular por medio de vesículas, estas vesículas se unen a los lisosomas de la célula, dicha interacción hace que las nanopartículas puedan entregar directamente el fármaco en el medio intracelular, dicha liberación podría ser dependiente del pH o por la acción de enzimas hidrolíticas y por ende el impacto en las células sea mucho más significativo que la internalización del fármaco de forma individual, ya que podría ingresar de forma más eficaz al núcleo celular (Elena Canepa, 2015; Odontostomatología & El Herpesvirus, 2011; Rojo Vea, n.d.)

Adicionalmente se adelantó un ensayo MTT en las líneas celulares T98G y BHK-21 para establecer el porcentaje de viabilidad que presenta  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ . Después del tratamiento con concentraciones a 15ppm ( $\text{IC}_{50}$  de ensayos anteriores) durante 72h, cuyos resultados se muestran en la Fig. 14. Con el fin de evidenciar el efecto que tienen las nanopartículas en las células sin tener

presencia del fármaco y así poder confirmar el impacto que tiene el recubrimiento en la función del fármaco, además del impacto que tienen las nanopartículas en las células.

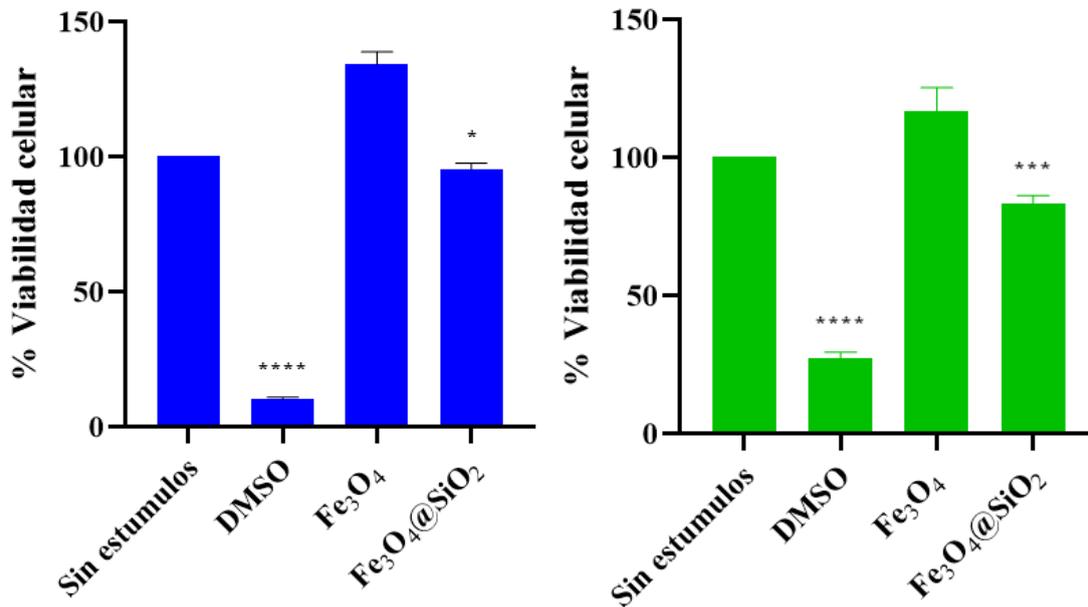


Fig.14. Porcentajes de viabilidad celular de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>, en presencia de las células T98G (grafico azul) y BHK-21 (grafico verde), en concentraciones de 15ppm y a un tiempo de 72h (IC50), t-student de \*p<0.1, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

Como se evidencia en la Figura. 14, las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en ambas líneas celulares no presentan ningún tipo de citotoxicidad, por otro lado, el complejo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> presenta un porcentaje de viabilidad celular superior al 80%, esto se puede deber a que las nanopartículas de hierro no activan ningún mecanismo de estrés celular, además de que no generan especies reactivas de oxígeno (mecanismos normales de muerte celular por parte de las nanopartículas), esto se debe principalmente al tamaño de las nanopartículas expuestas en este trabajo (Schlachter et al., 2011). Adicionalmente, las nanopartículas de hierro pueden ser metabolizadas por las células, lo que por su parte aumentaría la viabilidad celular, ayudando a la proliferación de las mismas células (Gu et al., 2011). Por su parte, la citotoxicidad presente en el nanocompuesto, se debe principalmente al recubrimiento, ya que este podría interferir en los procesos metabólicos del hierro y por ende generar estrés celular en las líneas celulares ensayadas, esto debido a disminución en la interacción que podría llegar a tener el nucleó

magnético con la célula diana (Nayamadi Mahmoodabadi et al., 2018).

En general el efecto antitumoral del nanocompuesto  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{OXA}$ , evidencia la eficacia y el aumento de la especificidad del fármaco, en comparación al fármaco solo. Adicionalmente, dicho efecto sería solo por el fármaco adsorbido en su superficie, ya que tanto el núcleo magnético, como el nanocompuesto, son muy biocompatibles, con las células sanas (BHK-21), como con las células cancerosas (T98G). Sin embargo, es importante continuar con estudios para aclarar el mecanismo intracelular de las nanopartículas funcionalizadas con oxaliplatino y de las nanopartículas sin funcionalizar, para así evidenciar el verdadero efecto que tienen estas en las células y en el ADN celular.

### **3. Conclusiones**

Se puede concluir a través del desarrollo del presente trabajo de investigación que las nanoestructuras producidas por coprecipitación asistida por ultrasonidos directos, exhibieron tamaños de 12nm y que una vez recubiertas este tamaño aumento a 13nm para finalmente crecer hasta los 14nm luego de la fisisorción del fármaco oxaliplatino. Se evidencia que la estructura cristalina corresponde con la estructura de la espinela inversa, magnetita con base a los patrones de DRX medidos. Los espectros de FTIR demostraron el recubrimiento con SiO<sub>2</sub> además de evidenciar la presencia de vibraciones fácilmente asociables a la presencia del fármaco en el nanocompuesto, lo cual se confirma con UV-vis ya que en este se evidencian los cambios de concentración del fármaco en presencia del nanocompuesto. Por otro lado, los resultados de VSM indican que las nanopartículas tienen un comportamiento superparamagnetico, aunque el recubrimiento con SiO<sub>2</sub> causa un efecto de apantallamiento, esto sin afectar las propiedades superparamagnéticas y su potencial aplicación en terapéuticas contra el cáncer. Finalmente, los ensayos MTT confirman la eficacia del nanotrasportador funcionalizado con el fármaco, ya que este presento una citotoxicidad celular en la línea T98G del 85% a las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 ppm a 72h en comparación al fármaco solo que solo fue de un 50% a 200ppm en el mismo tiempo de estímulo. Adicionalmente, se demostró la biocompatibilidad del núcleo magnético y del nanocompuesto al encontrar que el núcleo magnético no presenta citotoxicidad en ninguna línea celular y que por su parte la citotoxicidad del nanocompuesto solo disminuye un 11% la viabilidad células en las líneas BHK-21 y T98G.

### **Agradecimientos**

En primera instancia, quiero agradecer al proyecto de la convocatoria interna UAN Cód. 2022-204, por la financiación de mi trabajo de grado, adicionalmente agradecer a mis padres y a mi hermana, por brindarme todo su apoyo a lo largo de mi vida y el desarrollo de mi carrera profesional, para siempre seguir adelante. Agradezco al semillero NanoMat y al semillero de Nutrición e Inmunología, por brindarme el apoyo y los medios necesarios para poder culminar mi proyecto de la mejor manera

posible. También, agradecer a mis directores de TG, Javier Rincón Ortiz, Mónica Losada Barragán y Daniel Llamosa Pérez por la paciencia, tiempo y la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, además de todo el apoyo que me brindaron a lo largo de mi carrera universitaria. Finalmente, agradezco a mis amigos del pregrado que siempre me brindaron su apoyo y conocimiento y por ayudarme a seguir adelante.

## Referencias

- Abdul Razak, N. A., Othman, N. H., Mat Shayuti, M. S., Jumahat, A., Sapiai, N., & Lau, W. J. (2022). Agricultural and industrial waste-derived mesoporous silica nanoparticles: A review on chemical synthesis route. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *10*(2), 107322. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.107322>
- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., & Maqbool, M. (2022). Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *300*, 102597. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2021.102597>
- Alomairy, S., Al-Buriahi, M. S., Abdel Wahab, E. A., Sriwunkum, C., & Shaaban, K. S. (2021). Synthesis, FTIR, and neutron/charged particle transmission properties of Pb3O4–SiO2–ZnO–WO3 glass system. *Ceramics International*, *47*(12), 17322–17330. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.03.045>
- Batash, R., Asna, N., Schaffer, P., Francis, N., & Schaffer, M. (2017). Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(27). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170516123206>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Kumar, S., Bhat, H. F., Aadil, R. M., & Bekhit, A. E. D. A. (2022). Ultrasonication as an emerging technology for processing of animal derived foods: A focus on in vitro protein digestibility. *Trends in Food Science & Technology*, *124*, 309–322. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2022.04.012>

- Biswas, R. K., Khan, P., Mukherjee, S., Mukhopadhyay, A. K., Ghosh, J., & Muraleedharan, K. (2018). Study of short range structure of amorphous Silica from PDF using Ag radiation in laboratory XRD system, RAMAN and NEXAFS. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 488(March), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.02.037>
- Cairós, C., González-Sálamo, J., & Hernández-Borges, J. (2020). The current binomial Sonochemistry-Analytical Chemistry. *Journal of Chromatography A*, 1614, 460511. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.460511>
- Cáncer. (n.d.). Retrieved January 16, 2023, from <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>
- Cheng, W., Tang, K., Qi, Y., Sheng, J., & Liu, Z. (2010). Supporting information One-Step Synthesis of Superparamagnetic Monodisperse Porous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Hollow and Core-Shell Spheres 2Theta (degree) (440) (511). 0033(c), 4. <http://www.rsc.org/suppdata/jm/b9/b919164j/b919164j.pdf>
- Dinakar, Y. H., Karole, A., Parvez, S., Jain, V., & Mudavath, S. L. (2022). Organ-restricted delivery through stimuli-responsive nanocarriers for lung cancer therapy. *Life Sciences*, 310(August), 121133. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121133>
- Elena Canepa. (2015). *HERPESVIRUS Elena Cánepa GENERALIDADES*. 3(1), 23. <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 5.pdf>
- Fuentes-García, J. A., Alavarse, A. C., de Castro, C. E., Giacomelli, F. C., Ibarra, M. R., Bonvent, J. J., & Goya, G. F. (2021). Sonochemical route for mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles towards pH-triggered drug delivery system. *Journal of Materials Research and Technology*, 15, 52–67. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2021.08.014>
- Gu, J. L., Xu, H. F., Han, Y. H., Dai, W., Hao, W., Wang, C. Y., Gu, N., Xu, H. Y., & Cao, J. M. (2011). The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Science China Life Sciences*, 54(9), 793–805. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4215-5>
- Harris, R. A. (2019). Chemotherapy drug temozolomide adsorbed onto iron-oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

nanoparticles as nanocarrier: A simulation study. *Journal of Molecular Liquids*, 288, 111084.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111084>

Hashemzadeh, A., Amerizadeh, F., Asgharzadeh, F., Darroudi, M., Avan, A., Hassanian, S. M., Landarani, M., & Khazaei, M. (2021). Delivery of oxaliplatin to colorectal cancer cells by folate-targeted UiO-66-NH<sub>2</sub>. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 423(May), 115573.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115573>

Hincapié-Rojas, D. F., Rojas-Hernández, S. P., Castaño-González, F., Parra-Castaño, K. N., & Giraldo-Torres, L. R. (2020). Obtención, funcionalización y aplicaciones biomédicas de las Nanopartículas de Sílice Mesoporosa: una revisión. *DYNA*, 87(215), 239–253.

<https://doi.org/10.15446/dyna.v87n215.88586>

Kandasamy, G., & Maity, D. (2015). Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles ( SPIONs ) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *International Journal of*

*Pharmaceutics*, 496(2), 191–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.058>

Kim, W., Kim, W. K., Lee, K., Son, M. J., Kwak, M., Chang, W. S., Min, J. K., Song, N. W., Lee, J., & Bae, K. H. (2019). A reliable approach for assessing size-dependent effects of silica

nanoparticles on cellular internalization behavior and cytotoxic mechanisms. *International*

*Journal of Nanomedicine*, 14, 7375–7387. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224183>

Kushwaha, P., & Chauhan, P. (2023). Facile synthesis of water-soluble Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PVA nanoparticles for dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging. *Magnetic*

*Resonance Imaging*, 95(December 2021), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2022.09.009>

Liu, S., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 281,

102165. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2020.102165>

Liu, Z., Lei, M., Zeng, W., Li, Y., Li, B., Liu, D., & Liu, C. (2023). Synthesis of magnetic

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-(-NH<sub>2</sub>/-COOH) nanoparticles and their application for the removal of heavy metals from wastewater. *Ceramics International*, 49(February), 20470–20479.

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.03.177>

Madhubala, V., Nagarajan, C., Baskaran, P., Raguraman, V., & Kalaiivani, T. (2023). Formulation of magnetic core-shell nanostructured Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TiO<sub>2</sub> for cytotoxic activity against Huh-7 cells.

*Inorganic Chemistry Communications*, 149, 110430.

<https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2023.110430>

*Materials Project - Materials Explorer*. (n.d.). Retrieved May 24, 2023, from

<https://materialsproject.org/materials?chemsys=Fe-O>

McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585–594. <https://doi.org/10.1189/JLB.0205074>

Mdlovu, N. V., Lin, K. S., Chen, Y., Juang, R. S., Chang, T. W., & Mdlovu, N. B. (2019).

Formulation and characterization of multifunctional polymer modified-iron oxide magnetic nanocarrier for doxorubicin delivery. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 104, 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.08.010>

*Ministerio de Salud y Protección Social*. (n.d.). Retrieved January 28, 2023, from

<https://www.minsalud.gov.co/Portada2021/index.html>

*Minsalud se unió a conmemoración del Día Mundial contra el Cáncer*. (n.d.). Retrieved May 16, 2023, from <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Minsalud-se-unio-a-conmemoración-del-Dia-Mundial-contra-el-Cancer.aspx>

Movileanu, C., Anghelache, M., Turtoi, M., Voicu, G., Neacsu, I. A., Ficai, D., Trusca, R., Oprea, O.,

Ficai, A., Andronescu, E., & Calin, M. (2022). Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor.

*International Journal of Pharmaceutics*, 625(March), 122064.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122064>

Munnier, E., Cohen-Jonathan, S., Linassier, C., Douziech-Eyrolles, L., Marchais, H., Soucé, M.,

Hervé, K., Dubois, P., & Chourpa, I. (2008). Novel method of doxorubicin–SPION reversible association for magnetic drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), 170–

176. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.07.006>

Naini, N., Sid Kalal, H., Almasian, M. R., Niknafs, D., Taghiof, M., & Hoveidi, H. (2022).

Phosphine-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/composites as efficient magnetic nanoadsorbents for the removal of palladium ions from aqueous solution: Kinetic, thermodynamic and isotherm studies.

*Materials Chemistry and Physics*, 287(May), 126242.

<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126242>

National Cancer Institute. (2022). What Is Cancer ? Differences between Cancer Cells and Normal

Cells How Does Cancer Develop ? *Www.Cancer.Gov*, 1–8. [https://www.cancer.gov/about-](https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer)

[cancer/understanding/what-is-cancer](https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer)

Nayamadi Mahmoodabadi, A., Kompany, A., & Mashreghi, M. (2018). Characterization, antibacterial

and cytotoxicity studies of graphene-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles

synthesized by a facile solvothermal method. *Materials Chemistry and Physics*, 213, 285–294.

<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.04.033>

Odontoestomatología, A. E., & El Herpesvirus, R. (2011). Bascones-Martínez A, Pousa-Castro X.

Herpesvirus Herpesvirus Bascones-Martínez A\*\*, Pousa-Castro X\*. In *Av. Odontoestomatol*

(Vol. 27, Issue 1). <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v27n1/original1.pdf>

Páez, A., Burbano, N., Merchancano, C., & Erazo, N. (2013). Caracterización de los tumores

cerebrales en un Hospital Universitario de Pereira,. *Revista Médica Risaralda*, 19(6), 120–125.

Parnell, C., & Woll, P. J. (2005). Principles of cancer chemotherapy. *The Foundation Years*, 1(2), 18–

22. [https://doi.org/10.1053/S1744-1889\(06\)70015-9](https://doi.org/10.1053/S1744-1889(06)70015-9)

Pereira, E. D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J. C., Ramón, J. A., Oliveira, G. E.,

& De Souza, F. G. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of

oxaliplatin. *Polimeros*, 26(2), 137–143. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2323>

Pillai, A. S., Manikantan, V., Alexander, A., Varalakshmi, G. S., Akash, B. A., & Enoch, I. V. M. V.

(2022). Designed dual-functional surface-modified copper-iron sulfide nanocarrier for anticancer

drug delivery. *Materials Today Communications*, 33, 104862.

<https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2022.104862>

- Riedl, S., Zweytick, D., & Lohner, K. (2011). Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8), 766–781. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2011.09.004>
- Rojo Veja, S. (n.d.). *Universidad Internacional de La Rioja Facultad de Educación*.
- Sadeghi, M., Moghimifar, Z., & Javadian, H. (2023). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanocomposite immobilized with cellulase enzyme: Stability determination and biological activity. *Chemical Physics Letters*, 811, 140161. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2022.140161>
- Sajid, M., Shuja, S., Rong, H., & Zhang, J. (2023). Size-controlled synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles and their superparamagnetic properties tailoring. *Progress in Natural Science: Materials International*, 33(1), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2022.08.003>
- Schlachter, E. K., Widmer, H. R., Bregy, A., Lönnfors-Weitzel, T., Vajtai, I., Corazza, N., Bernau, V. J. P., Weitzel, T., Mordasini, P., Slotboom, J., Herrmann, G., Bogni, S., Hofmann, H., Frenz, M., & Reinert, M. (2011). Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1793–1800. <https://doi.org/10.2147/ijn.s23638>
- Stoyanov, G. S., Dzhenkov, D., Ghenev, P., Iliev, B., Enchev, Y., & Tonchev, A. B. (2018). Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. *Medical Oncology*, 35(3), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S12032-018-1083-X/METRICS>
- Sundaresan, K., Mohan, S., Manojkumar, M. S., Sakthisaravanan, Raja, M. V., Shkir, M., & Ali, H. E. (2023). Magneto recyclable, green fabricated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorods on photo responsive of textile dye degradation and identification products by LC-MS. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100(4), 100930. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2023.100930>
- Valenzuela, R. (2017). New Therapies for the Management of High Grade Gliomas. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 28(3), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2017.03.001>

- Xu, W., Yang, T., Liu, S., Du, L., Chen, Q., Li, X., Dong, J., Zhang, Z., Lu, S., Gong, Y., Zhou, L., Liu, Y., & Tan, X. (2022). Insights into the Synthesis, types and application of iron Nanoparticles: The overlooked significance of environmental effects. *Environment International*, 158, 106980. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106980>
- Yang, C. Y., Shiranthika, C., Wang, C. Y., Chen, K. W., & Sumathipala, S. (2023). Reinforcement learning strategies in cancer chemotherapy treatments: A review. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 229, 107280. <https://doi.org/10.1016/J.CMPB.2022.107280>
- Yang, H. W., Hua, M. Y., Liu, H. L., Huang, C. Y., Tsai, R. Y., Lu, Y. J., Chen, J. Y., Tang, H. J., Hsien, H. Y., Chang, Y. S., Yen, T. C., Chen, P. Y., & Wei, K. C. (2011). Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas. *Biomaterials*, 32(27), 6523–6532. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.05.047>
- Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102336. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102336>
- Yu, J., Wang, B., Lu, Q., Xiao, L., Ma, X., Feng, Y., & Qian, Y. (2022). Fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by using cathode glow discharge electrolysis plasma and its electrochemical properties. *Electrochimica Acta*, 427(July), 140843. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140843>

**Documento realizado por:** Alicia Romero

**Modificado por:** Diana Martínez Pachón

**Actualizado por:** Alejandra Baena

2021-II