



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

***Desarrollo de nanopartículas de silicio como potenciales
agentes luminiscentes y agentes terapéuticos contra el
cáncer.***

Tesista: Cristian R. Lillo

Directora: Mónica C. Gonzalez

Codirectora: Mónica L. Kotler

Año 2016

INDICE

Siglas y abreviaturas	15
Capítulo 1: Introducción y objetivos.....	18
Introducción.....	19
1. Nanotecnología y Terapéutica.....	19
1.1. Aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento del cáncer	24
1.2. Aspectos de la terapia dirigida contra el cáncer.....	25
2. Puntos cuánticos de materiales semiconductores.....	27
2.1. El silicio semiconductor	28
2.2. Puntos cuánticos del silicio	29
3. Principios de la fotosensibilización.....	31
4. Principios de la radiosensitización.....	32
5. Puntos cuánticos y nanopartículas en terapia fotodinámica y radioterapia contra el cáncer	33
6. Nanopartículas de silicio como potenciales foto y radiosensitizadores.....	38
7. Aplicación de las nanopartículas de silicio para la obtención de imágenes en sistemas biológicos	38

8. Células C6 de glioma de rata como sistema modelo para el estudio de glioblastomas resistentes.....	39
9. El modelo de pez cebra (zebra fish) en estudios de toxicidad	40
Objetivos.....	41
Bibliografía.....	43
Capítulo 2: Equipamiento, materiales y métodos	55
1. Solventes, gases y reactivos	57
2. Material común de laboratorio	58
3. Técnicas y equipamiento.....	59
3.1. Estudios de absorción.....	59
3.1.1. Fundamentos teóricos.....	59
3.1.2. Corrección por dispersión de luz	59
3.2. Estudios de luminiscencia estacionaria.....	60
3.3. Estudios de luminiscencia resuelta en el tiempo	61
3.4. Análisis de regresión bilineal	62
3.5. Espectros de infrarrojo	62
3.6. Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X.....	64
3.7. Detección de oxígeno singulete	65

3.7.1. Detección de fosforescencia de oxígeno singulete.....	65
3.7.2. Detección mediante un electrodo sensible a oxígeno molecular	66
3.7.3. Detección de ¹ O ₂ mediante la sonda SOSG®	68
3.8. Detección de radical anión superóxido.....	69
3.9. Determinación de tamaños	70
3.9.1. Microscopía de transmisión electrónica	70
3.9.2. Dispersión dinámica de luz	71
3.10. Electroforesis en geles de agarosa.....	71
3.11. Potencial zeta	72
3.12. Termogravimetría analítica	74
4. Ensayos y protocolos biológicos.....	75
4.1. Cultivo celular.....	75
4.2. Sembrado de células.....	75
4.3. Incubación de nanopartículas con células	76
4.4. Ensayo de MTT	76
4.5. Ensayo de Rojo Neutro	77
4.6. Ensayo de determinación de ROS con DCH ₂ F-DA.....	77
4.7. Imágenes de microscopía de fluorescencia	78

4.8. Estudios de toxicidad en larvas de zebrafish	78
Bibliografía.....	80
Capítulo 3: Síntesis, caracterización y modificación superficial.....	83
Introducción.....	85
1. Síntesis por reducción de SiCl_4	85
1.1. Optimización de la cantidad de surfactante	86
1.2. Descripción de la síntesis.....	87
1.3. Aislamiento y purificación	88
1.4. Estimación del rendimiento de la síntesis.....	88
1.5. Modificación superficial	89
1.6. Conjugación con ácido fólico	91
1.6. PEGilación.....	92
2. Síntesis por oxidación del precursor Mg_2Si	95
3- Determinación de tamaños.....	96
3.1. Micrografías TEM.....	96
3.2. DLS.....	98
3.3. Anisotropía	99
3.4. Estimación de Pesos Moleculares y Número de terminaciones.....	103

4- Caracterización de la superficie.....	104
4.1. Espectros de infrarrojo (FT-IR e ir-ATR).....	104
4.2. Espectroscopía Fotelectrónica de Rayos X (XPS).....	108
4.3. Electroforesis en geles de agarosa y determinación de potencial zeta ..	110
4.4. Termogravimetría analítica (TGA)	111
Conclusiones	115
Bibliografía.....	116
Capítulo 5: Propiedades fotofísicas de las nanopartículas	121
Introducción.....	123
1. Espectros de absorción.....	123
2. Fluorescencia estacionaria	129
2.1. Nanopartículas en solventes orgánicos	130
2.2. Nanopartículas en suspensiones acuosas	131
2.3. Influencia del pH sobre la luminiscencia de las partículas	139
3. Rendimiento cuántico de fluorescencia	140
4. Fluorescencia resuelta en el tiempo.....	142
5. Emisión en presencia de suero fetal bovino	145
Conclusiones	153

Bibliografía.....	155
Capítulo 5: Generación de especies reactivas	158
Introducción.....	160
1. Nanopartículas como sensibilizadores de especies reactivas del oxígeno..	160
1.1. Oxígeno singlete	160
1.2. Radical anión superóxido	161
2. Generación de oxígeno singlete	162
2.1. Consumo de oxígeno molecular	162
2.2. Detección de ¹O₂ mediante la sonda fluorescente SOSG®	165
2.3. Detección de la Fosforencia de ¹O₂ resuelta en el tiempo a 1270 nm	170
3- Determinación del radical anión superóxido.....	174
Conclusiones	176
Bibliografía.....	177
Capítulo 6: Ensayos de toxicidad y obtención de bioimágenes	180
Introducción.....	182
1. Citotoxicidad	183
1.1. Ensayo MTT	184
1.2. Citotoxicidad en ausencia de SFB	186

1.3. Citotoxicidad a altas concentraciones	189
1.4. Ensayo de RN.....	191
2. Evaluación de las NPSiNH ₂ en terapia radiante: Ensayo de DH ₂ CF-DA.....	194
3. Toxicidad en larvas de zebra fish.....	196
3.1. Actividad de nado.....	196
3.1.1 Actividad de nado comparativa	196
3.1.2. DL50 para las NPSiNH ₂	198
3.2. Morfología comparativa.....	200
4. Obtención de imágenes de fluorescencia con NPSi	203
Conclusiones	204
Bibliografía.....	207
Capítulo 7: Conclusiones generales y futuros pasos.....	211
1. Conclusiones generales	213
2. Futuros pasos	216

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible el presente trabajo: a la Universidad Nacional de La Plata, y a la Facultad de Ciencias Exactas en particular, por la formación, gratuita y de excelencia y al INIFTA por la provisión de los espacios y laboratorios donde este trabajo fue llevado a cabo. Al CONICET, por haberme otorgado las becas que me permitieron iniciar mi carrera científica y contribuyeron con mi formación.

Y a las personas, que directa o indirectamente me formaron y acompañaron durante el desarrollo de la tesis doctoral, especialmente a Mónica Gonzalez, por haber puesto tanto empeño en mi instrucción científica, desde que era un estudiante de grado y luego durante este trabajo de tesis doctoral, con una paciencia infinita. Por tu calidad humana, que te convierte en una excelente jefa y persona, no me alcanzan las palabras para agradecerte.

A mi codirectora Mónica Kotler y todo su grupo de trabajo Agustina, Roxy y Soledad por toda su ayuda y excelente predisposición durante el desarrollo de los ensayos biológicos del presente trabajo.

A los todos los compañeros de laboratorio con los que tuve el placer de compartir el trabajo diario durante todo este tiempo, a Manuel Llansola y María Laura Dell Arciprete por haberme guiado con enorme paciencia dentro de mis primeros pasos en el mundo de las nanopartículas de silicio. A Juanjo Romero, Gaby Bosio y Fabio Mercado, siempre dispuestos a brindarme su ayuda y conocimiento en cada momento que lo fui necesitando, gracias. A los que vinieron luego, los pichones que fueron creciendo, Belén, Joaquín, María Laura, Francisca y Damián que llegaron para compartir risas, almuerzos, discusiones y por supuesto mucho trabajo. A todos ustedes muchas gracias, por su significativa contribución en los experimentos presentados y sobre todo, por los lindos momentos compartidos en el laboratorio y fuera de él.

Al grupo de Silvia Alonso de la Universidad Nacional de Quilmes, y especialmente a Jorge Montanari y Natalia Calienni por el trabajo en colaboración realizado con el modelo de las larvas de zebra fish, que ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

Al INIFTA y todo su personal, técnicos, administrativos, personal de apoyo a la investigación, becarios e investigadores, por la ayuda brindada durante todo este tiempo de trabajo. En especial para los grupos de trabajo del 1° piso y la gente de orgánica del 2° piso que me han salvado en tantas oportunidades.

A mis amigos, la familia que la vida te va presentando. A mi familia, a mi hermano y a mi viejo, sin vos viejo nada de esto hubiera sido posible nunca, gracias.

A mi viejo y mi hermano.

Siglas y abreviaciones

PDT: terapia fotodinámica

NP-Si: nanopartículas de silicio

NPSi: nanopartículas de silicio si recubrir obtenidas por el método de las micelas invertidas.

NPSiNH₂: nanopartículas de silicio aminadas obtenidas por el método de las micelas invertidas.

PEG: polietilenglicol

Fol: ácido fólico

NPSiNH-PEG: nanopartículas aminadas conjugadas con polietilenglicol obtenidas por el método de las micelas invertidas.

NPSiNH-Fol: nanopartículas de silicio aminadas conjugadas con ácido fólico obtenidas por el método de las micelas invertidas.

ROS: especies reactivas del oxígeno

¹O₂: oxígeno singulete

³O₂: oxígeno triplete

DPA: difenilantraceno

TPP: tetrafenilporfirina

QD: quantum dots (puntos cuánticos)

SFB: suero fetal bovino

AF: alcohol furfurílico

AzNa: azida de sodio

Exc: Excitación

Em: Emisión

BSA: albumina del suero bovino

RN: rojo neutro

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

DCH₂F-DA: dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato

RX: rayos X

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Introducción

1. Nanotecnología y terapéutica

La nanotecnología puede definirse como la ciencia y la ingeniería involucradas en el diseño, la síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuyo tamaño se encuentra, en al menos una dimensión, en el escala del nanómetro (una mil millonésima parte de un metro) (Emerich y Thanos 2003; Sahoo et al. 2007). La nanociencia y la nanotecnología tienen un enorme potencial en diversos ámbitos como ser el desarrollo de medicamentos, la descontaminación de aguas, las tecnologías de la información y la comunicación, y la producción de materiales más fuertes y ligeros.

El prefijo “nano” deriva de la palabra griega “νάνος”, que significa “enano”. Un nanómetro (nm) es el ancho aproximado de 6 átomos de carbono o de 10 moléculas de agua. Un cabello humano tiene un ancho aproximado de 80.000 nm, y un glóbulo rojo 7.000 nm, mientras que algunas proteínas tienen tamaños cercanos a 1 nm y algunas incluso tamaños mayores (Whitesides 2003).

Las bases conceptuales de la nanotecnología fueron establecidas por primera vez en 1959 por el físico Richard Feynman, quién había explorado la posibilidad de manipular los materiales en la escala de los átomos y moléculas individuales, imaginando que toda la Enciclopedia Británica podría ser escrita en la cabeza de un alfiler. Sin embargo, el término nanotecnología no fue utilizado hasta 1974, cuando el investigador Norio Taniguchi de la Universidad de Tokio, lo utilizó para referirse a la capacidad de manipular con precisión materiales en escala nanométrica. El motor primario que impulsó la nanotecnología vino de la mano de la industria electrónica, con el objetivo de desarrollar dispositivos electrónicos de silicio más pequeños y más rápidos. A principios de la década de 1970, IBM en los Estados Unidos, utilizó una técnica llamada litografía por haz de electrones para crear nanoestructuras y dispositivos de tamaños entre 40 y 70 nm.

En reconocimiento al enorme potencial científico y comercial de la nanotecnología, el presidente Clinton estableció la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI) en el año 2000. La NNI define a la nanotecnología como la "comprensión y el control de la materia a dimensiones de más o menos 1-100 nm, donde los fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones" (Muthu y Singh 2009).

Aunque la definición primaria de nanotecnología acota el tamaño de las nanopartículas entre 1 y 100 nm de diámetro, el tamaño de las partículas individuales testeadas para la administración de agentes terapéuticos puede variar de 10 a 1.000 nm (NNI). Recientemente, se han hecho intentos de introducir una definición completa de nanopartículas en nanomedicina (Kreuter 2007). Para fines farmacéuticos: “Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas que varían en tamaño desde 10 a 1.000 nm (1 μ m) y consisten en materiales macromoleculares en los que el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se disuelve, es atrapado, encapsulado y/o a los cuales el principio activo se une o se adsorbe (Kreuter 2004).

La aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, el diagnóstico, el seguimiento y control de los sistemas biológicos se conoce ahora como nanomedicina (Torchilin 2007). Muchas variedades de nanopartículas están disponibles para su uso en medicina (Torchilin 2006), tales como nanopartículas metálicas, liposomas, niosomas, partículas lipídicas sólidas, micelas, puntos cuánticos, dendrímeros, microcápsulas, y diferentes nano-ensamblados.

Por ejemplo, las nanopartículas de Au presentan propiedades interesantes, que incluyen su baja toxicidad y la posibilidad de funcionalizar su superficie y se postulan como sistemas de gran utilidad en el diseño de nanotransportadores de fármacos (Connor et al. 2005; Kim et al. 2009). Los puntos cuánticos o nanocristales semiconductores poseen una amplia gama de posibles aplicaciones clínicas incluyendo el etiquetado de células, obtención de imágenes in vivo y diagnóstico (Medintz et al. 2008). Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro son una de las pocas nanopartículas basadas en óxidos metálicos clínicamente aprobadas para usos en medicina, tales como la adquisición de imágenes por resonancia magnética (Ito et al. 2005), la entrega de drogas (Gupta et al. 2005) y la muerte de células de los tumores por hipertermia. Las nanopartículas de dióxido de titanio y óxido de zinc se utilizan en formulaciones de aplicación tópica como cremas y lociones de protección solar (Choksi et al. 2010). Las nanopartículas de plata ofrecen un efecto antimicrobiano marcado que se explota con éxito en aplicaciones médicas tales como vendajes para heridas, instrumentos quirúrgicos y prótesis óseas (Chen y Schluesener 2008; Eby et al. 2009). Los nanotubos de carbono debido a su tamaño y forma única presentan un amplio potencial para aplicaciones biomédicas, pero su utilización requiere una evaluación minuciosa de la toxicidad (Yildirimer et al. 2011). Algunas de estas aplicaciones se muestran esquemáticamente en la Fig. 1.1.

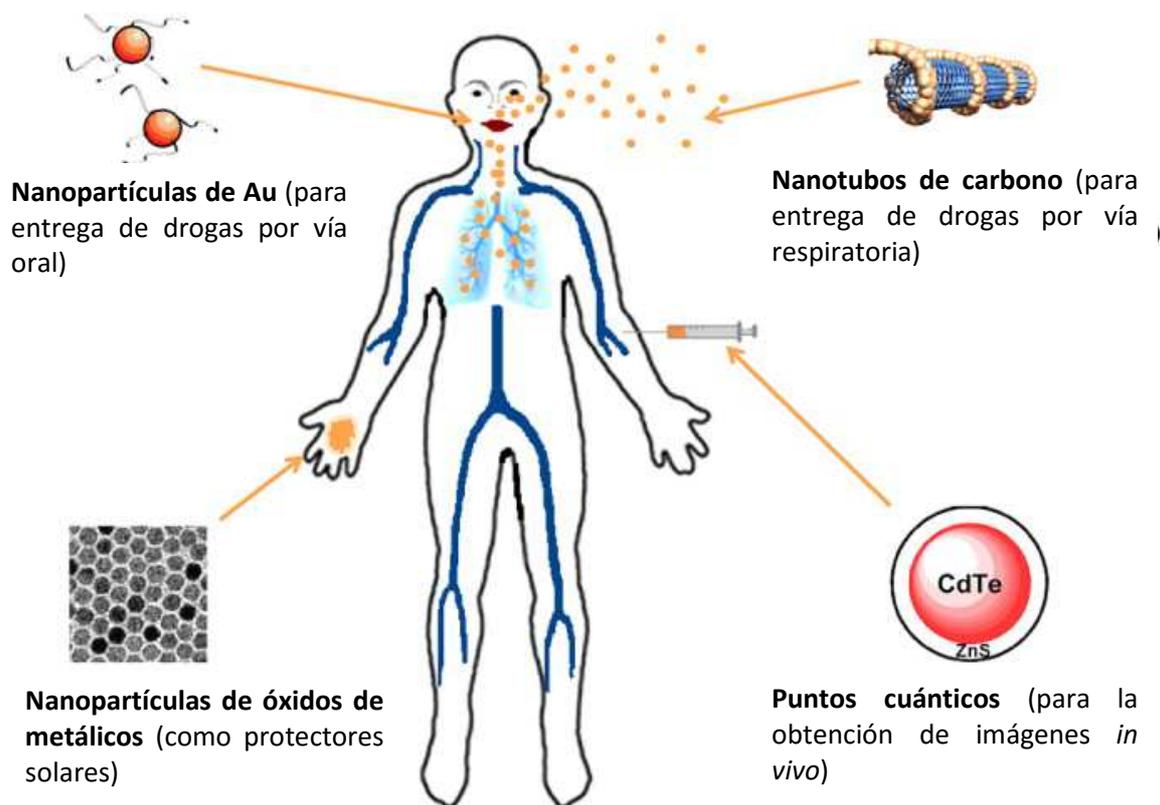


FIG. 1.1. NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES MÉDICAS: La figura muestra esquemáticamente algunos ejemplos de nanosistemas con aplicaciones en medicina, como ser nanopartículas de oro, nanotubos de carbono, puntos cuánticos y nanopartículas de óxidos metálicos. [tomado y modificado de (Yildirimer et al. 2011)]

En general, se espera que los nanosistemas empleados, cualquiera sea su función en el diagnóstico y terapéutica, sean biodegradables, fáciles de preparar, razonablemente baratos, tengan un pequeño tamaño de partícula, posean una circulación prolongada en el cuerpo e, idealmente, que se acumulen de manera específica en determinados sitios de acción (Myles et al. 1994). Deben además inactivarse luego del uso y no poseer efectos secundarios indeseables.

Las moléculas de peso molecular alto (40 kDa o superior), macromoléculas y varias nanopartículas portadoras de drogas de largo tiempo de circulación, son capaces de acumularse espontáneamente en diversos sitios patológicos, tales como tumores sólidos y áreas infartadas, a través del llamado efecto de permeabilidad y retención aumentada, EPR (Maeda et al. 2000). Este efecto se basa en el hecho de que la vasculatura patológica, a diferencia de la vasculatura normal de los tejidos sanos, es "permeable", es decir, penetrable para grandes moléculas e incluso para partículas pequeñas, lo que permite su extravasación y

acumulación en el espacio intersticial de un tumor. Tal acumulación se facilita adicionalmente por la falta de un sistema linfático responsable del drenaje de macromoléculas a partir de tejidos normales (Maeda et al. 2001). Se ha encontrado que el tamaño de poro efectivo en el revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos en la mayor parte de los tumores humanos periféricos varía de 200 nm a 600 nm de diámetro, y el efecto EPR permite la orientación pasiva a los tumores basada en el tamaño de corte de la vasculatura permeable.

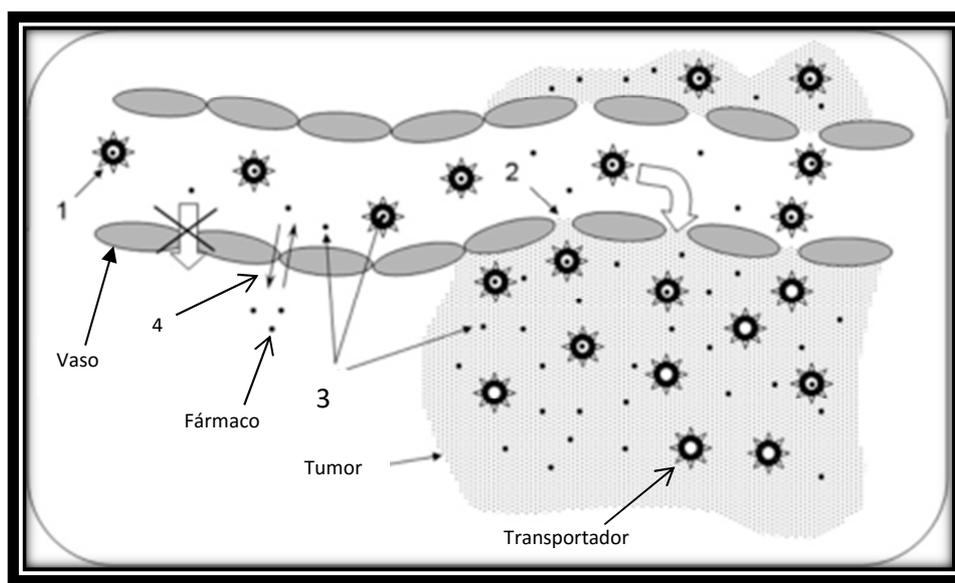


FIGURA 1.1 EFECTO DE RETENCIÓN Y PERMEABILIDAD AUMENTADA (EPR): La figura muestra una secuencia probable para transportadores de drogas de largo tiempo de circulación. El punto 1 muestra la circulación del nanotransportador cargando el fármaco a través de la vasculatura patológica del tumor, en 2 el sistema transportador+fármaco logra penetrar al intersticio tumoral dado el carácter permeable de la vasculatura, en 3 se produce la liberación del fármaco y se crea una alta concentración local del mismo. El punto 4 muestra la posibilidad de que el fármaco libre penetre a través de determinados puntos de unión de las células del epitelio vascular.

En general, los nanomateriales pueden ser modificados en su superficie por una variedad de moléculas diferentes para otorgarles ciertas propiedades y funcionalidades: (1) para lograr un tiempo prolongado de circulación en la sangre (Torchilin y Trubetskoy 1995), se utiliza con frecuencia un recubrimiento polimérico con polietilenglicol (PEG) (Lukyanov et al. 2004). (2) para lograr la capacidad de reconocer específicamente y unirse a tejidos o células blanco a través de la interacción mediada por un ligando unido a la superficie, se emplean, por ejemplo,

anticuerpos monoclonales así como sus fragmentos Fab, folato o transferrina (Zhao et al. 2008; Di Pasqua et al. 2009). (3) para responder a los estímulos locales característicos del sitio patológico; por ejemplo, la liberación de un fármaco encapsulado en el marco del pH o temperatura anormal, se utiliza una molécula unida a la superficie sensible al pH o la temperatura (Sun et al. 2010; Meng et al. 2014). (4) para penetrar en el interior de las células evitando la degradación lisosomal y la deficiente orientación de los fármacos a dianas intracelulares, la superficie de nano-transportadores se puede modificar con péptidos capaces de penetrar las células y ser liberados de los lisosomas (Sugahara et al. 2014).

1.1. Aplicación de la nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

El cáncer es una causa importante de mortalidad: más de diez millones de personas son diagnosticadas con la enfermedad cada año (Misra et al. 2010). El proceso de carcinogénesis implica múltiples pasos que involucran varios sistemas fisiológicos celulares, tales como la señalización celular y la apoptosis, por lo que es una enfermedad altamente compleja y difícil de comprender (Reichert y Wenger 2008). A pesar de los múltiples avances realizados en quimio y radioterapia, la terapia actual contra el cáncer no es óptima debido a múltiples inconvenientes. Entre los desafíos frecuentes encontrados en las terapias actuales contra el cáncer se incluyen, la inespecífica distribución sistémica de agentes antitumorales, concentraciones inadecuadas de drogas en el sitio del tumor, citotoxicidad en tejidos sanos, capacidad limitada para monitorear las respuestas terapéuticas y desarrollo de resistencia a múltiples drogas (Parveen y Sahoo 2008; Manasi et al. 2009).

La aplicación de la nanotecnología para la terapia contra el cáncer constituye un área interdisciplinaria de la investigación en ciencia, ingeniería y medicina, siendo un campo nuevo con extensas aplicaciones. Proporciona un enfoque único e integral en el tratamiento del cáncer mediante el diagnóstico precoz, la predicción, prevención y la terapia personalizada. La terapia farmacológica dirigida y los métodos para el diagnóstico precoz son las áreas prioritarias de investigación en las que la nanotecnología podría desempeñar un papel vital. Los nanosistemas tienen cuatro propiedades únicas que los distinguen de otros tipos de agentes terapéuticos: (i) pueden tener ellos mismos acción terapéutica o propiedades de diagnóstico y pueden ser diseñados para llevar una gran "carga útil"; (ii) se pueden unir a ligandos multivalentes dirigidos, que producen alta afinidad y especificidad para las células diana; (iii) se pueden diseñar para la carga de múltiples moléculas de fármaco que permiten

simultáneamente una combinación de terapias anticáncer y (iv) pueden pasar por alto mecanismos tradicionales de resistencia a los medicamentos.

En la actualidad, dos agentes terapéuticos uno liposomal y otro de nanopartículas de albúmina han sido aprobados por la FDA de Estados Unidos para prácticas clínicas. Además de la doxorubicina liposomal (Doxil®), paclitaxel unido a albumina (Abraxane®) es otro ejemplo de un nanovector asociado a un agente quimioterapéutico que presenta una mejorada permeabilidad y retención (EPR) en el tratamiento del cáncer de mama (Sparreboom et al. 2005; Bharali y Mousa 2010). Varias estrategias terapéuticas se encuentran en desarrollo con el fin de superar los problemas de resistencia asociados con los fármacos quimioterapéuticos convencionales, capaces de neutralizar, eludir o explotar varias bombas de eflujo de drogas y otros mecanismos de resistencia. Algunos de estos sistemas se encuentran en etapas avanzadas de la evaluación clínica con resultados prometedores (Shapira et al. 2011), tales como los nanovehículos que albergan una carga útil de combinaciones de fármacos terapéuticos para la dirección selectiva y la eliminación de las células tumorales, así como la superación simultánea de mecanismos de resistencia a los medicamentos. Estos nanovehículos teranósticos son capaces de albergar cuatro componentes principales: (1) un motivo de direccionamiento selectivo, (2) un elemento útil en el diagnóstico por imágenes para la localización del tumor maligno y su micro o macrometástasis, (3) un citotóxico o fármaco y (4) un agente quimiosensibilizador terapéutico capaz neutralizar los mecanismos de resistencia celular a los fármacos.

1.2. Aspectos de la terapia dirigida contra el cáncer

Idealmente, para que los tratamientos contra el cáncer sean eficaces, los medicamentos utilizados deben, en primer lugar, ser capaces de alcanzar el tumor. En segundo lugar, deben tener la propiedad de destruir selectivamente las células tumorales sin afectar a las células normales mediante un mecanismo controlado de liberación de la forma activa. Estas dos estrategias básicas influyen mejorando la supervivencia de los pacientes y la calidad de vida de los mismos. En principio, la entrega de drogas o nanovehículos contra el cáncer a los tejidos tumorales se puede lograr por “targeting” pasivo o activo (Fig. 1.3).

El targeting pasivo se refiere a la acumulación de un fármaco o medicamento en el sitio deseado debido a factores físico-químicos o farmacológicos. Este mecanismo aprovecha el tamaño inherente de las nanopartículas y las propiedades únicas de la vasculatura del tumor, tales como el efecto EPR y el microambiente tumoral. Este enfoque puede efectivamente

mejorar la biodisponibilidad y eficacia del fármaco. Se pueden lograr aumentos importantes en la acumulación de una droga en un tumor, generalmente diez veces o más, cuando se administra un fármaco asociado a una nanopartícula en lugar de una droga libre. Otro efecto que contribuye al targeting pasivo es el microambiente único que rodea a las células tumorales, que es diferente al de las células normales. Las células cancerosas crecen rápidamente y tienen una alta tasa metabólica, y el suministro de oxígeno y nutrientes por lo general no es suficiente para mantener este ritmo. Por lo tanto, las células tumorales utilizan la glucólisis para obtener energía extra, lo que produce un microambiente ácido. Existen nanopartículas sensibles al pH que son diseñadas para ser estables a un pH fisiológico de 7,4 pero que, en los tejidos diana, en los que el pH es inferior a los valores fisiológicos, tales como el microambiente tumoral, se degradan liberando su contenido (Zheng et al. 2013; Liu et al. 2014).

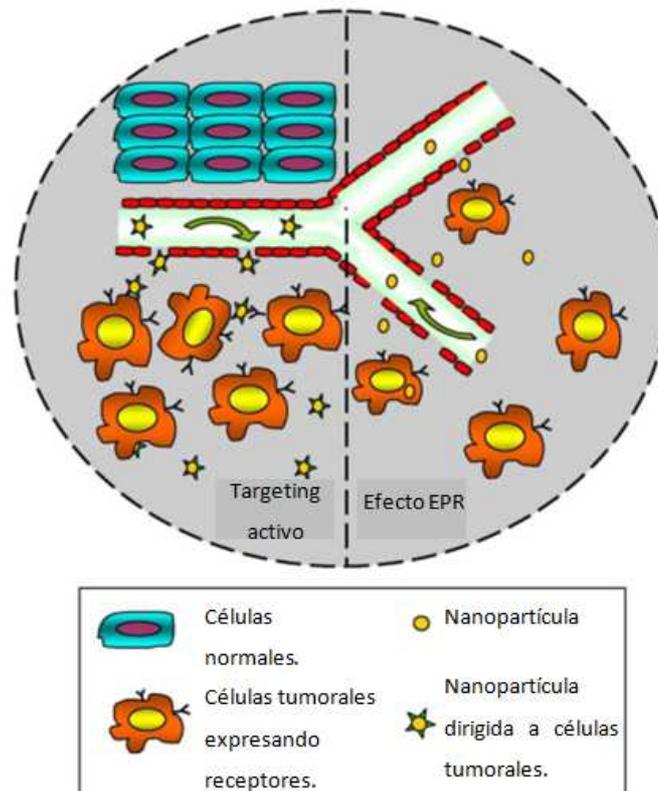


FIG. 1.3: MECANISMOS DE ENTREGA SELECTIVA DE DROGAS EN TORNO A UN SITIO TUMORAL. MODIFICADO DE (MISRA ET AL. 2010)]: La parte derecha de la figura muestra el aumento de la acumulación de las nanopartículas en el tumor debido a la vasculatura tumoral defectuosa, que conduce al efecto de permeabilidad y retención mejorada (targeting pasivo). La parte

izquierda de la figura muestra, además del efecto EPR, el targeting activo mediado por moléculas unidas a la superficie de las nanopartículas.

El targeting activo se logra uniendo a la superficie de la nanopartícula, una molécula o fragmento, tal como un anticuerpo monoclonal o un ligando, que tiene la capacidad de ser reconocido específicamente por las células tumorales a través de procesos de reconocimiento molecular (Kim et al. 2007; Di Pasqua et al. 2009). Al construir nanopartículas para targeting activo, deben considerarse algunos factores para crear sistemas de entrega eficientes. En primer lugar, el antígeno o receptor debe expresarse exclusivamente en las células tumorales y no expresarse (o expresarse en mucha menor proporción) en las células normales. En segundo lugar, debe expresarse homogéneamente en todas las células tumorales. Por último, los antígenos o receptores de la superficie celular no deben ser liberados a la circulación sanguínea.

La internalización de estos nanoconjugados dirigidos después de la unión a las células es un criterio importante para realizar la selección adecuada del ligando a utilizar. La internalización por lo general se produce a través de la endocitosis mediada por receptor. Por ejemplo, nanopartículas conjugadas con ácido fólico se unen al receptor de folato en la superficie de la célula tumoral, la membrana plasmática se invagina sobre el complejo ligando-receptor formando un endosoma, los que pueden dirigirse a determinadas organelas. El valor de pH en el interior del endosoma se hace cada vez más ácido activando las lisozimas, lo que permite la liberación de la droga al citoplasma, dependiendo de sus características fisicoquímicas. Finalmente el receptor de folato vuelve a la membrana celular para iniciar un nuevo ciclo de transporte. Los ligandos dirigidos a receptores de la superficie celular, tales como el ácido fólico y factores de crecimiento, tienen las ventajas de tener bajo peso molecular y menor inmunogenicidad que los anticuerpos. Sin embargo, la administración en la dieta de concentraciones altas de estos ligandos puede competir con el conjugado ligando-nanopartícula por la unión al receptor, reduciendo efectivamente la concentración intracelular del nanosistema suministrado.

2. Puntos cuánticos de materiales semiconductores

Los puntos cuánticos (QDs) son cristales de materiales semiconductores de tamaños entre los 2-6 nm compuestos por elementos de los grupos II-VI o III-V, que están definidos por tener dimensiones físicas menores al radio del excitón de Bohr. Si un fotón de luz visible choca contra un material semiconductor, algunos de sus electrones son excitados a estados de

energía más altos. Cuando estos electrones regresan a su estado fundamental, se emite un fotón de una frecuencia característica para ese material. Estas nanopartículas de materiales semiconductores resultan de gran interés ya que poseen dimensiones similares a las de las macromoléculas biológicas, como proteínas y ácidos nucleicos (Jamieson et al. 2007).

Los puntos cuánticos de materiales semiconductores poseen propiedades fotoquímicas y fotofísicas únicas que no se encuentran en moléculas aisladas o sólidos a granel. En comparación con los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes, estas nanopartículas son más brillantes, más resistentes al blanqueo y pueden emitir luz de diferentes longitudes de onda por excitación con una única fuente luminosa. Estas nanopartículas se pueden unir covalentemente a diferentes biomarcadores como péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas como el folato, de forma de reconocer específicamente determinados blancos biológicos. Los puntos cuánticos resultan también muy adecuados para aplicaciones ópticas debido a su amplio perfil de excitación y su espectro de emisión estrecho y simétrico (Bailey et al. 2004).

Recientemente, algunos investigadores se han centrado en el desarrollo de puntos cuánticos como agentes fotosensibilizadores capaces de producir especies radicales por absorción de luz visible. Este enfoque solo es adecuado para tratar tumores superficiales debido a la baja capacidad de penetración de la luz visible. La radiación ionizante (rayos X y rayos gamma) puede penetrar a mayores profundidades ofreciendo así una gran ventaja en el tratamiento de pacientes con tumores en órganos internos. Entre los temas de investigación actual en terapia fotodinámica y radioterapia, resultan de especial interés la potencial utilización de los puntos cuánticos con capacidad de generar especies radicales o liberar electrones al ser irradiados con luz visible o con rayos X de alta energía (Juzenas et al. 2008).

2.1. El silicio semiconductor

Los semiconductores tienen una banda llena (banda de valencia) que está separada de la banda de conducción (en el estado fundamental vacía) por una diferencia de energía (band gap) correspondiente a la diferencia de energía entre el HOMO – LUMO para pequeñas moléculas. El band gap para los semiconductores está entre 0,5 y 3,5 eV, siendo en particular el del silicio de 1,2 eV y por tanto solo absorbiendo radiación con longitudes de onda < 1100 nm (Fahlman 2007). Así mismo, el band gap es la energía que emiten en forma de fotón cuando los electrones pasan desde la banda de conducción a la banda de valencia (Rajeshwar 2007; Serway 2010).

En el caso del Si semiconductor a granel, la transición entre la parte inferior de la banda de conducción y la parte superior de la banda de valencia viola el principio de conservación del momento y por lo tanto es una transición prohibida (Kovalev 1999). De todas maneras la transición puede ocurrir, pero sólo con la asistencia de fonones (Rosso-Vasic et al. 2008), esto significa que la absorción y la emisión de fotón requiere el cambio adicional en el modo vibracional. Este es un proceso indirecto (band gap indirecto) con una baja probabilidad, y por esta razón, a diferencia de su extenso uso en dispositivos electrónicos, el Si a granel ha encontrado aplicaciones ópticas limitadas.

Existen evidencias que a medida que se disminuye el tamaño de las partículas se pasa de una emisión del band gap indirecta a una directa (Kovalev et al. 1998; Rosso-Vasic et al. 2008). También se le atribuye importancia al grado de oxidación de la superficie de las nanopartículas y a los defectos superficiales ya que estos favorecen las transiciones cuasi-directas (Kuntermann et al. 2008).

2.2. Puntos cuánticos del silicio

Los puntos cuánticos luminiscentes existen en un régimen intermedio entre los materiales a granel y los de comportamiento molecular. Las propiedades relevantes de los puntos cuánticos se producen debido al *confinamiento cuántico*: mientras el tamaño de un semiconductor disminuye, la diferencia entre la banda valencia y la banda de conducción se incrementa (Fig. 1.4) (Nirmal y Brus 1999). El concepto de confinamiento cuántico puede ser comprendido en términos del principio de incertidumbre de Heisenberg (Ec. 1.1).

$$\Delta x \cdot \Delta p \geq h \quad \text{Ec 1.1}$$

En cristales grandes de $\Delta x \sim 1 \text{ cm}$, la incerteza del momento, Δp , es pequeña. Por tanto, el momento es un número cuántico bien definido y su conservación tiene que ser cumplida en las transiciones electrónicas. Cuando el tamaño del cristal de silicio se aproxima a 1 nm , $\Delta x \rightarrow 1 \text{ nm}$, Δp se expande, la conservación del momento se relaja y las transiciones electrónicas (ej. la absorción de un fotón con la formación de un par hueco-electrón o su recombinación radiativa) son mucho más eficientes (Jutzi 2003).

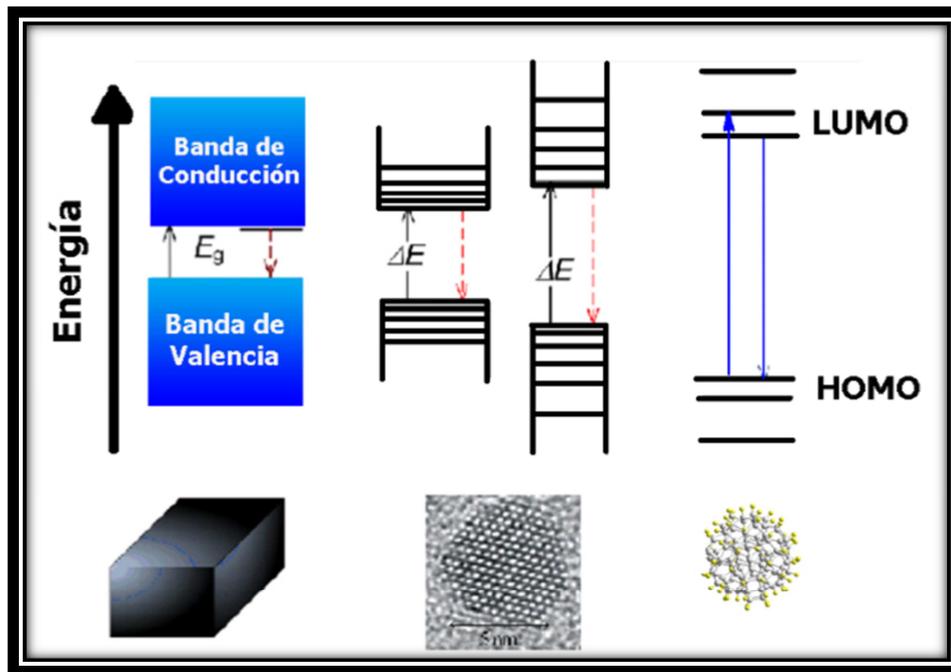


FIG. 1.4: VARIACIÓN DEL BAND GAP DE LOS SEMICONDUCTORES EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO: La figura muestra el efecto cualitativo de la variación del band gap a medida que cambia el tamaño del semiconductor, mostrándose para cristales macroscópicos, semiconductores de tamaño \leq radio de Bohr y de tamaño <1 nm (Murphy 2002).

La absorción de un fotón crea un par hueco-electrón que está deslocalizado a través del interior de la nanopartícula. La emisión de un fotón puede ocurrir tras la recombinación del electrón y el hueco. La fotoluminiscencia eficiente es sólo posible cuando el tamaño de los puntos cuánticos es menor que el radio de Bohr del material. El radio de Bohr define si un cristal de un material semiconductor se comporta como un punto cuántico, o simplemente como un semiconductor a granel y es una característica propia del material (Norris 2004). Tres radios de Bohr diferentes pueden ser definidos según muestra la Ec. 1.2:

$$a_e, a_h, a_{exc} = \epsilon \frac{m}{m^*} a_0 \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde m es la masa de la partícula en reposo tal como un electrón (e), (h) el par hueco-electrón (excitón), m^* es la masa reducida (masa inercial efectiva) de la partícula, ϵ es la constante dieléctrica del material, y a_0 es el radio de Bohr del hidrógeno ($5,291772 \times 10^{-11}$ m). Dependiendo del radio (R) del nanocristal, los puntos cuánticos pueden ser agrupados en tres regímenes diferentes: confinamiento alto ($R < a_e, a_h, a_{exc}$), confinamiento intermedio ($a_e, a_h < R < a_{exc}$) y confinamiento bajo ($a_h < R < a_e, a_{exc}$ o $a_e < R < a_h, a_{exc}$). Para los cristales de silicio, el radio de Bohr del excitón resulta ser del orden de los 4.3 nm.

Resolviendo la ecuación de Schrödinger aproximando los puntos cuánticos a una esfera (Ec. 1.3), la diferencia de energía depende recíprocamente del radio (Kippeny et al. 2002). Debido a la simetría del problema, la solución de las funciones de onda (Norris 2004) describe los niveles de energía como orbitales atómicos designados por los números cuánticos $\alpha_{n,l}$ ($n = 1, 2, 3$, etc., $l = s, p, d$, etc.):

$$E_g(QD) = E_{g,0} + \frac{\hbar^2 \alpha_{n,l}}{8\pi^2 m_{eh} R^2} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde $E_{g,0}$ es la diferencia de energía para un semiconductor a granel, $m_{eh} = m_e m_h / (m_e + m_h)$ es la masa efectiva de un par hueco-electrón (excitón), m_e and m_h son las masas efectivas de un electrón y un hueco, respectivamente. La estructura de bandas electrónicas de cristales de silicio se ve modificada cuando el tamaño de los cristales es del orden del radio de Bohr o menor.

3. Principios de la fotosensibilización.

La terapia fotodinámica implica la utilización de dos componentes no tóxicos, que al ser combinados inducen efectos celulares y tisulares dependientes del oxígeno. El primero de estos componentes es un fotosensibilizador, una molécula fotosensible que puede localizarse en una célula blanco y/o tejido. El segundo componente consiste en la administración de luz de una longitud de onda específica que activa el sensibilizador. El fotosensibilizador transfiere la energía de la luz al oxígeno molecular, generando especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas reacciones ocurren en el entorno de la molécula fotosensible que absorbe la luz. Por lo tanto, las respuestas biológicas desencadenadas por el fotosensibilizador se activan sólo en las áreas particulares que han sido expuestas a la luz (Dennis 2003).

La terapia fotodinámica ha sido recientemente aprobada como tratamiento para algunos tipos de cáncer y trastornos de la piel (Dougherty et al. 1998). Sin embargo, sólo unos pocos (Photofrin, Photosan, Foscan, Photogem, Photohem, Levulan, Metvix) de muchos fotosensibilizadores experimentalmente investigados han obtenido la aprobación reglamentaria para un pequeño número de enfermedades (Juarranz et al. 2008; Parveen y Sahoo 2008).

La oxidación fotosensibilizada de biomoléculas induce efectos patológicos tales como el daño celular, mutaciones, muerte celular y la fotooxidación de constituyentes celulares tales como proteínas y ADN. Desde las observaciones realizadas por Herzberg en 1931 (Wasserman y

Murray 1979) se ha reconocido al oxígeno singulete como el principal compuesto fotosensibilizado capaz de producir muerte celular (Fuchs y Thiele 1998; DeRosa y Crutchley 2002; Niedre et al. 2002). El oxígeno singulete puede actuar como intermediario para la activación o inhibición de vías de señalización celular mediante la producción de productos de oxidación que resultan ser reguladores positivos o negativos (Klotz et al. 2003).

El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es una forma electrónica excitada de la molécula de oxígeno (Weldon et al. 1999) que posee alta reactividad con biomoléculas (Schmidt 2007). Su reactividad con biomoléculas se limita a la distancia de difusión del oxígeno singulete, estimada en menos de 0,1 micras (Moan 1990; Kochevar 2004). Por lo tanto, la localización de un fotosensibilizador es de crucial importancia para la orientación específica de la PDT a determinadas organelas celulares (Cló et al. 2007). Es importante notar que la fotosensibilización no sólo es relevante en la terapia fotodinámica del cáncer, sino también en la iniciación de las enfermedades. En 1959 el Dr. Harman fue el primero en proponer la teoría de los radicales libres en los procesos de envejecimiento y aparición de enfermedades: la habilidad de las células para producir cantidades adecuadas de antioxidantes se determina por la edad, la herencia, la nutrición y el estrés. Durante muchos años su teoría fue rechazada, pero las teorías de Harman fueron aceptadas entre los años 1980-1990 (Finkel y Holbrook 2000). Cabe señalar, que el oxígeno singulete también puede ser generado por aminoácidos y proteínas por absorción de luz UV (Chin et al. 2008) o directamente por la radiación infrarroja (Krasnovsky et al. 2003; Jockusch et al. 2008).

4. Principios de la radiosensitización.

Desde el primer informe de uso médico de la radiación de alta energía presentado en 1896, la radioterapia sigue siendo el tratamiento más eficiente y común del cáncer. El principio de la radioterapia del cáncer es la irradiación con radiación de alta energía para destruir células malignas en el volumen tratado. La radiación puede actuar directamente en un objetivo por ionización o excitando e iniciando una cadena de acontecimientos que dan lugar a cambios biológicos. Su acción indirecta es la interacción de la radiación con otros átomos o moléculas para producir radicales libres que difunden y pueden dañar determinados blancos celulares. Hay dos tipos de radiación ionizante, su uso depende de la enfermedad y su ubicación: las ondas electromagnéticas de alta energía (rayos X y rayos gamma) que ionizan compartimentos celulares o moléculas de agua liberando electrones de alta velocidad y la radiación con partículas alfa o beta, electrones, neutrones o protones actuando principalmente en forma

directa sobre un objetivo (Hogle 2006). Los neutrones al no poseer carga son muy penetrantes en comparación con las partículas cargadas. Los sistemas biológicos están compuestos en un 75-90% por agua; por ello, la aplicación de la radiación ionizante en organismos vivos produce daño en diversas biomoléculas mediada por la radiólisis del agua. Cuando la radiación ionizante choca con una molécula de agua se desprende un electrón, e^- , y se producen una serie de radicales libres o iones tales como hidroxilo OH^\bullet , hidrógeno H^\bullet , agua H_2O^+ , H_3O^+ , superóxido O_2^- . Independientemente de la fuente de radiación (acelerador lineal, cobalto-60, cesio-137, iridio-192), la radiación ionizante daña un número de componentes intracelulares siendo el ADN un objetivo principal (Halliwell y Aruoma 1991). Entre los radicales formados, se considera al radical hidroxilo como el más reactivo capaz de inducir la peroxidación lipídica (Halliwell 1984; Yagi y Armstrong 1994). La radiación gamma induce daño oxidativo sobre liposomas de fosfatidilcolina y cambios en la permeabilidad de la bicapa lipídica (Marathe y Mishra 2002). El daño en la membrana celular como consecuencia de la producción de ROS actúa como un mediador de la apoptosis (Mishra 2004).

5. Puntos cuánticos y nanopartículas en terapia fotodinámica y radioterapia contra el cáncer.

A pesar de los avances en la neurocirugía y la radioterapia el pronóstico para los pacientes con gliomas malignos ha cambiado poco durante la última década. El tratamiento del cáncer requiere una alta precisión en la entrega de la radiación ionizante para reducir la toxicidad en los tejidos circundantes. Recientemente, se han centrado algunas investigaciones en el desarrollo de los puntos cuánticos como fotosensibilizadores capaces de producir ROS por absorción de luz visible. A pesar del hecho de que la luz visible es segura, tal como se mencionó anteriormente, este enfoque es adecuado solamente para el tratamiento de tumores superficiales. La radiación ionizante (rayos X y rayos gamma) es mucho más penetrante y ofrece una gran ventaja en el tratamiento de pacientes con tumores inaccesibles a la luz.

Las nanopartículas de materiales semiconductores poseen propiedades ópticas únicas y regulables y además pueden ser dirigidas a blancos específicos (Samia et al. 2006; Yaghini et al. 2009). El objetivo principal es desarrollar pequeñas sondas con alta selectividad, versatilidad, estabilidad y capacidad de penetrar en las células y organelas (Jovin 2003). A pesar del gran entusiasmo en el campo, su fabricación reproducible y las dificultades biológicas, como ser la agregación, biocompatibilidad, la unión no específica, toxicidad, son los desafíos a vencer.

Hasta ahora, la mayoría de los trabajos sobre los puntos cuánticos está centrado en el desarrollo de nanocristales y su bioconjugación para el seguimiento y formación de imágenes (Smith et al. 2004; Ferrari 2005). La posibilidad de utilizar puntos cuánticos como sensibilizadores para terapias contra el cáncer es aún un campo poco explorado. Los puntos cuánticos de materiales semiconductores poseen niveles de energía del band gap en el rango de 1-5 eV, lo que los hace útiles en la terapia fotodinámica (Figura 1.5) al igual que los fluoróforos orgánicos tradicionales (Samia et al. 2003; Bakalova et al. 2004).

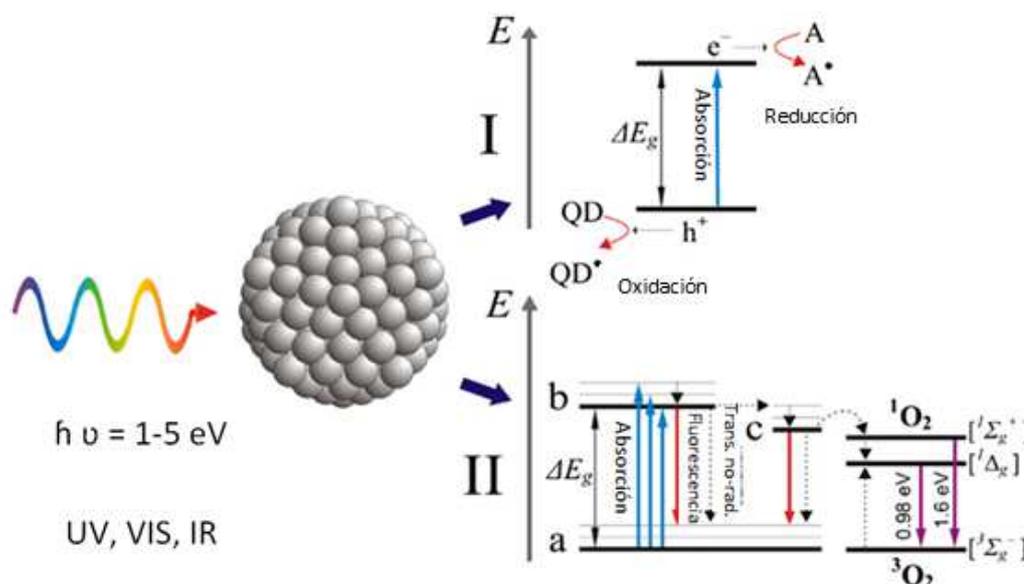
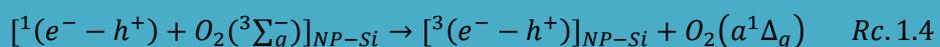


FIG. 1.5: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS EVENTOS MÁS PROBABLES QUE OCURREN CUANDO UN FOTÓN DE BAJA ENERGÍA GOLPEA UN PUNTO CUÁNTICO. [TOMADO Y MODIFICADO DE (Juzenas et al. 2008b)]

La Fig. 1.5 representa los eventos más probables que pueden ocurrir si un fotón de baja energía (radiación ultravioleta, luz visible, infrarrojo cercano) incide sobre un punto cuántico. Estos fenómenos pueden dividirse según: I) la transferencia de carga, donde QD es un donante y A es una molécula aceptora de electrones, ΔE_g es la energía del intervalo de banda del punto cuántico, e^- y h^+ es un par electrón-hueco generado por la absorción del fotón, II) la fotosensibilización, donde el punto cuántico pasa desde su estado fundamental "a" a un estado excitado mayor energía "b" y luego cae a un estado "c", a partir del cual puede transferir su energía al oxígeno triplete del estado fundamental (3O_2) que pasa a su estado de oxígeno singulete altamente reactivo (1O_2). Los niveles de vibración se representan para fines ilustrativos. Las flechas discontinuas representan transiciones no radiativas.

Al igual que el diagrama de Jablonski representa esquemáticamente los niveles electrónicos de energía de moléculas orgánicas (Lakowicz 2006) y las reacciones fotoquímicas que ocurren desde sus estados excitados (Juzeniene et al. 2006), un modelo de tres niveles puede del mismo modo delinear los estados de energía de los puntos cuánticos (Fig. 1.5, II). El nivel "c" del QD es generalmente conocido como estado excitón "oscuro" o "trampa" ya que se puebla desde el estado excitado "b" por una transición no radiativa (Bawendi et al. 1992). La existencia del estado "oscuro" se ha demostrado por la dependencia de las propiedades de luminiscencia de los puntos cuánticos bajo la influencia de un campo magnético externo (Nirmal et al. 1995). Tal estado "oscuro", que es comparable por su carácter a un estado triplete de larga vida de las porfirinas, puede generar oxígeno singulete (Samia et al. 2003). Si el oxígeno es su estado triplete fundamental entra en contacto con un estado fotoexcitado de los puntos cuánticos puede producirse la transferencia de energía al triplete (TET), como en el caso de los fotosensibilizadores convencionales (Schweitzer y Schmidt 2003; Krasnovsky 2007).

Sin embargo, el mecanismo antes descrito es discutido en la literatura a partir de datos experimentales realizados con nanopartículas de silicio obtenidas por vía electroquímica y recubiertas con metilmetacrilato (Llansola Portolés et al. 2010). Estos experimentos demuestran que la emisión se produce desde un estado singulete que es desactivado llevando el excitón a un estado triplete. Sería de esperar que el oxígeno singulete se generase con mayor eficiencia cuando los excitones son llevados a estados oscuros, en cambio no se observa un aumento en la generación de oxígeno singulete en este caso, por tanto el estado triplete debe de encontrarse a energías menores de 0,98 eV (1270 nm). En base a estos resultados, se propone un mecanismo donde la desactivación del excitón en su estado singulete $^1(e^- - h^+)$ por el oxígeno molecular genera un triplete de baja energía y oxígeno singulete (Rc. 1.4) es un mecanismo posible permitido por el spin. Esta reacción está limitada a una diferencia de energía entre singulete – triplete mayor a 0,98 eV (Schweitzer y Schmidt 2003) de forma de tener la energía suficiente para excitar al oxígeno a $O_2(a^1\Delta_g)$. La energía vibracional cero del estado excitado de las partículas $\Delta E_{0,0} \sim 3,1$ eV permite tal requerimiento. El oxígeno singulete formado puede difundir hacia fuera de la superficie de la partícula, como indican los tiempos de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ del orden esperado para su relajación en los solventes puros.



La mayor parte de los excitones en el estado singulete son capaces de emitir (Rc.1.5) o relajarse por caminos no-radiativos hasta el estado basal (Rc. 1.6). El cruce entre sistemas (ISC)

hacia el estado triplete y posterior relajación desde este estado y la desactivación con oxígeno sin cambio de espines para generar el radical anión superóxido (Rc. 1.7) son posibles mecanismos de relajación. Un esquema del mecanismo de relajación del excitón en presencia de oxígeno molecular se muestra en la Fig. 1.6.

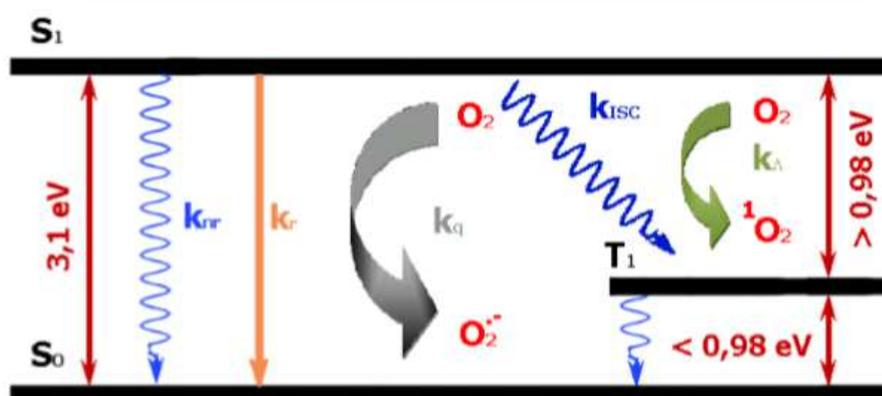
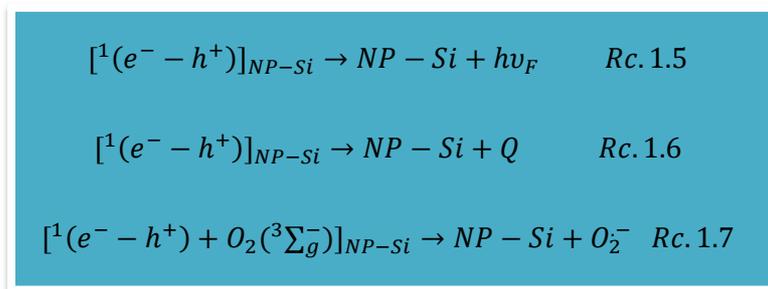


FIG. 1.6: MECANISMOS POSIBLES DE RELAJACIÓN DEL EXCITÓN EN PRESENCIA DE OXIGENO MOLECULAR.

(LLANSOLA PORTOLÉS ET AL. 2010)

A su vez, la gran densidad de átomos y electrones en los puntos cuánticos les confiere una alta capacidad de absorción de fotones de alta energía (rayos X y rayos gama) (Park 2006) pudiendo actuar así como radiosensibilizadores (Fig. 1.7) capaces de provocar el daño localizado y dirigido a células cancerosas (Carter et al. 2007).

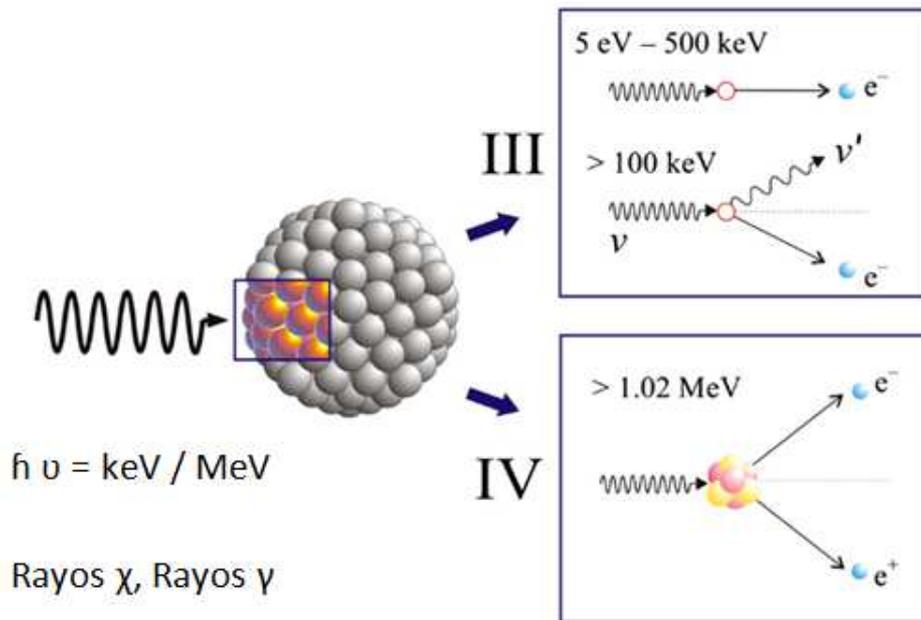


FIG. 1.7: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS EVENTOS MÁS PROBABLES QUE OCURREN CUANDO UN FOTÓN DE ALTA ENERGÍA GOLPEA UN PUNTO CUÁNTICO. [TOMADO Y MODIFICADO DE (Juzenas et al. 2008b)]

La Fig. 1.7 muestra los eventos más probables que ocurren si un fotón de alta energía (rayos X y rayos gamma) incide sobre un punto cuántico: III) Expulsión de un electrón de alta velocidad de un átomo que constituye el punto cuántico debido a la transferencia de energía del fotón al electrón (efecto fotoeléctrico de ionización) o dispersión de Compton, donde el fotón incidente continúa su viaje con energía menor hasta el próximo evento, IV) Aniquilación de fotones en un núcleo de un átomo y la generación de un par electrón-positrón. El positrón se aniquilará con un electrón libre liberando dos fotones, que perderán aún más su energía a través del efecto fotoeléctrico o dispersión Compton. Los electrones generados en los eventos III y IV inducirán la formación secundaria de electrones de alta velocidad, así como electrones Auger. Estos electrones pueden escapar con éxito y ser capturados en el entorno por un receptor (agua, biomolécula, oxígeno, óxidos de nitrógeno) en las proximidades del punto cuántico e inducir la formación de especies radicales como, superóxido, anión peroxinitrito, radical hidroxilo o radical óxido nítrico.

6. Nanopartículas de silicio como potenciales foto y radiosensibilizadores

El silicio es el segundo elemento más abundante de la corteza terrestre, lo que lo convierte en un gran candidato para múltiples aplicaciones. Sin embargo, siendo el silicio el material semiconductor dominante, aún no ha sido desarrollado activamente como biomaterial para terapias contra el cáncer. El silicio, en comparación con otros materiales semiconductores, no presenta toxicidad intrínseca y constituye un material biodegradable cuyo principal producto de degradación es el ácido silícico (SiOH_x), que puede ser fácilmente eliminado del cuerpo por la orina (He et al. 2008; Osminkina et al. 2012). Por otro lado las nanopartículas de silicio pueden ser modificadas superficialmente con diversos grupos como carboxilato (Rogozhina et al. 2006), alquilo (Rosso-Vasic et al. 2008), surfactantes (Chirvony et al. 2007), o polímeros como el PEG (Sudeep et al. 2008), obteniendo partículas hidrofílicas que forman dispersiones estables en solución acuosa. Una propiedad relevante de las NP-Si para sus aplicaciones biomédicas es su capacidad para producir oxígeno singulete cuando son irradiadas con una fuente luminosa adecuada (Kovalev y Fujii 2005; Llansola Portolés et al. 2010; Gara et al. 2012). Por otra parte, debido a su pequeño tamaño (menor de 5 nm), son capaces de penetrar las membranas celulares o los núcleos (Rogozhina et al. 2006) siendo este un requisito para su utilización en sistemas biológicos.

7. Aplicación de las nanopartículas de silicio para la obtención de imágenes en sistemas biológicos.

La obtención de imágenes biológicas por fluorescencia es una de las herramientas no invasivas más poderosas que se utiliza para la visualizar sistemas biológicos y realizar estudios médicos. El uso de sondas fluorescentes es de esencial importancia para esta aplicación. Una sonda fluorescente de alta calidad debe ofrecer altos rendimientos cuánticos de emisión, ser hidrosoluble o fácilmente dispersable en sistemas acuosos, presentar alta fotoestabilidad, y ser biocompatible o de baja toxicidad. Los colorantes orgánicos y las proteínas fluorescentes, se utilizan ampliamente en biología y la investigación biomédica, pero suelen ser susceptibles al “blanqueo” lo que dificulta su utilización a largo plazo y la obtención de imágenes en tiempo real.

Las NP-Si fluorescentes se presentan como sondas biológicas de importancia debido a la baja toxicidad intrínseca que poseen. Sin embargo, necesitan ser recubiertas superficialmente con moléculas adecuadas que les permitan formar suspensiones estables en solución acuosa. Se

encuentran en la bibliografía diversas estrategias para obtener NP-Si dispersables en solución acuosa. Una de las más directas es el recubrimiento superficial con ácido acrílico o alilamina (Li y Ruckenstein 2004; Warner et al. 2005). También se han desarrollado sistemas basados en micelas de fosfolípidos dentro de las cuales se puede encapsular las NP-Si que de esta manera pueden ser transportadas en sistemas acuosos (Erogbogbo et al. 2008). Posteriormente estos autores han demostrado que estos conjugados micela/NP-Si pueden ser útiles para la obtención de imágenes biológicas (Erogbogbo et al. 2011). Se han desarrollado también NP-Si oxidadas y recubiertas con un polímero hidrofílico, que al ser conjugadas con un anticuerpo han demostrado por primera vez la utilidad de un sistema basado en NP-Si en estudios de inmunofluorescencia (He et al. 2009). Nanopartículas de silicio obtenidas por microondas a partir de nanoalambres y ácido glutámico, han demostrado alta fotoestabilidad, lo que las hace adecuadas para la obtención de imágenes a largo plazo (He et al. 2011). Existen reportes del uso de NP-Si recubiertas con alilamina que muestran una fluorescencia uniforme y brillante dentro del citoplasma de células HeLa (Shiohara et al. 2009).

Se ha publicado un método sencillo de síntesis de NP-Si dispersables en agua, con altos rendimientos (0,1 g de NP-Si en 10 min.) y con una fotoestabilidad mayor en comparación con los colorantes orgánicos tradicionales o los puntos cuánticos de los grupos II-IV (Zhong et al. 2013). Estas NP-Si han demostrado ser altamente eficaces para la formación de imágenes celulares por inmunofluorescencia a largo plazo, produciendo fluorescencia estable y fuerte durante 60 minutos de observación por microscopía confocal.

8. Células C6 de glioma de rata como sistema modelo para el estudio de glioblastomas resistentes.

Para el estudio del mecanismo de crecimiento tumoral, la angiogénesis y el proceso de invasión, se ha validado la utilización de células C6 de glioma de rata como un modelo experimental para glioblastoma multiforme, GBM, que puede resultar de utilidad en el diseño y la evaluación de las terapias anticáncer (Grobben et al. 2002).

La línea celular de glioma C6 fue inducida originalmente en ratas Wistar-Furth expuestas a la N, N'-nitrosometilurea (Hecht et al. 1968), y es morfológicamente similar al glioblastoma multiforme (GBM) cuando se inyecta en el cerebro de ratas neonatas (Auer 1981). El GBM es el glioma agresivo más común resistente a las intervenciones terapéuticas, lo que provoca que la mayoría de los pacientes mueran dentro del año posterior al diagnóstico. Estos tumores tienden a ser morfológicamente multiformes, muestran regiones de necrosis y hemorragia, y

una diversidad genética con varias deleciones, amplificaciones y mutaciones puntuales (Holland 2000). Después de la inyección de 105-106 células en roedores, el crecimiento intracraneal de células de glioma C6, da como resultado la formación de tumores sólidos malignos, delimitados por un borde reactivo de astrocitos (Nagano et al. 1993).

9. El modelo de pez cebra (zebrafish) en estudios de toxicidad.

La determinación de toxicidad de nuevos nanocompuestos con finalidad terapéutica es fundamental para que estos lleguen a pruebas clínicas y para su futura aplicación en humanos.

En los últimos años, el uso de embriones de pez cebra ha ganado popularidad gracias a la investigación en el ámbito de la toxicología y teratología (Busch et al. 2011). El uso de embriones es particularmente atractivo por varias razones: (i) los embriones de peces se consideran una alternativa a las pruebas en animales y su uso no está restringido por las regulaciones para el bienestar animal (Balon 1986; Embry et al. 2010). (ii) El embrión transparente ofrece una gran variedad de aplicaciones para la detección de trastornos morfológicos, funcionales y la caracterización genética. (iii) La pequeña escala y la disponibilidad permanente de embriones ofrece el potencial para realizar en microplaca un gran número de experimentos de alto rendimiento que se aproximan a un modelo de vertebrados complejos (Yang et al. 2009).

Debido a estas ventajas, el embrión de pez cebra se ha considerado como un modelo alternativo para los ensayos de toxicidad *in vivo*.

Objetivos

Los estudios propuestos están orientados a desarrollar nuevos nanomateriales basados en el silicio aptos para ser utilizados como agentes terapéuticos en terapias contra el cáncer.

El plan de trabajo propuesto tiene como hipótesis: *las nanopartículas de silicio del tamaño de los pocos nanómetros, recubiertas con polietilenglicol y funcionalizadas con moléculas específicas, reúnen las condiciones necesarias para ser empleadas como agentes terapéuticos en radioterapia.*

Objetivos específicos:

Para demostrar la hipótesis de trabajo se proponen las siguientes actividades:

- Optimizar la síntesis por vía química de nanopartículas de silicio de diámetros menores a los 4 nm.
- Recubrir las partículas con PEG y funcionalizarlas con moléculas específicas como el ácido fólico.
- Caracterizar y determinar algunas propiedades de la nanopartícula tales como: su espectro de excitación - emisión luminiscente, tiempo de decaimiento luminiscente, potencial z, tamaño y estabilidad en suspensiones acuosas. Se evaluará la influencia del pH y componentes del suero fetal bovino (SFB) en las propiedades ópticas y estabilidad de las partículas, así como su capacidad de generación de ROS por excitación en el UV-visible.
- Evaluar la eficiencia de generación de ROS por irradiación de suspensiones acuosas de las diferentes nanopartículas.
- Evaluar el efecto de la funcionalización superficial sobre la generación de ROS por parte de las nanopartículas.
- Evaluar la incorporación de las NP-Si derivatizadas en cultivos de células C6 de glioma de rata y determinar la capacidad de estos sistemas de generar ROS al ser irradiadas con Rayos X.
- Desarrollar estudios de citotoxicidad en células C6 de glioma de rata y estudios de toxicidad en organismos vivos completos (larvas de zebrafish).

En el contexto del conocimiento actual del tema, el aporte original de las investigaciones a desarrollar involucra la síntesis de nanopartículas de silicio recubiertas con PEG para mejorar la biocompatibilidad del sistema y minimizar la interacción inespecífica con

proteínas. Para estudiar este último fenómeno se trabajará con las proteínas del SFB. También se desarrollarán y estudiarán las propiedades de NP-Si conjugadas con ácido fólico como una primera aproximación para lograr sistemas nanoparticulados basados en el silicio capaces de ser direccionados a células tumorales, que resulten potencialmente aptos como agentes en terapia. Por ello, se propone desarrollar investigaciones comenzando por la síntesis y derivatización de los nanomateriales, evaluación de sus capacidades como generadores de ROS en suspensiones acuosas y finalmente su comportamiento y toxicidad en cultivos celulares y en larvas de zebrafish.

Bibliografía:

- Auer (1981) A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* 8:325–31.
- Bailey RE, Smith AM, Nie S (2004) Quantum dots in biology and medicine. *Phys E Low-Dimensional Syst Nanostructures* 25:1–12. doi: 10.1016/j.physe.2004.07.013
- Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, et al (2004) Quantum dots as photosensitizers? *Nat Biotechnol* 22:1360–1361. doi: 10.1038/nbt1104-1360
- Balon EK (1986) Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model. *Environ Biol Fishes* 16:11–24. doi: 10.1007/BF00005156
- Bawendi MG, Carroll PJ, Wilson WL, Brus LE (1992) Luminescence properties of CdSe quantum crystallites: interior and surface localized states Resonance between. *J Phys Chem* 15:946–953. doi: 10.1063/1.462114
- Bharali DJ, Mousa S a (2010) Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise. *Pharmacol Ther* 128:324–35. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.07.007
- Busch W, Duis K, Fenske M, et al (2011) The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany. *Reprod Toxicol* 31:585–588. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.02.010
- Carter JD, Cheng NN, Qu Y, et al (2007) Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures. *J Phys Chem B* 111:11622–11625. doi: 10.1021/jp075253u
- Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 176:1–12. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004
- Chin KK, Trevithick-Sutton CC, McCallum J, et al (2008) Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins. *J Am Chem Soc* 130:6912–6913. doi: 10.1021/ja800926v
- Chirvony V, Chyrvonaya A, Ovejero J, et al (2007) Surfactant-modified hydrophilic

nanostructured porous silicon for the photosensitized formation of singlet oxygen in water. *Adv Mater* 19:2967–2972. doi: 10.1002/adma.200602891

Choksi A, Poonawalla T, Wilkerson M (2010) Nanoparticles: a closer look at their dermal effects. *J Drugs Dermatol* 9:475–81.

Cló E, Snyder JW, Ogilby PR, Gothelf K V. (2007) Control and Selectivity of Photosensitized Singlet Oxygen Production: Challenges in Complex Biological Systems. *ChemBioChem* 8:475–481. doi: 10.1002/cbic.200600454

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, et al (2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1:325–327. doi: 10.1002/smll.200400093

Dennis (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3:375–379. doi: 10.1038/nrc1070

DeRosa MC, Crutchley RJ (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 233-234:351–371. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6

Di Pasqua AJ, Mishler RE, Ship YL, et al (2009) Preparation of antibody-conjugated gold nanoparticles. *Mater Lett* 63:1876–1879. doi: 10.1016/j.matlet.2009.05.070

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW (1998) Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* 90:889–905.

Eby DM, Luckarift HR, Johnson GR (2009) Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical Instruments. *ACS Appl Mater Interfaces* 1:1553–1560. doi: 10.1021/am9002155

Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, et al (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97:79–87. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.12.008

Emerich DF, Thanos CG (2003) Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther* 3:655–663. doi: 10.1109/NANO.2004.1392425

Erogbogbo F, Yong K, Roy I, et al (2008) Biocompatible Luminescent Silicon. *ACS Nano* 2:873–878.

- Erogbogbo F, Yong KT, Roy I, et al (2011) In vivo targeted cancer imaging, sentinel lymph node mapping and multi-channel imaging with biocompatible silicon nanocrystals. *ACS Nano* 5:413–423. doi: 10.1021/nn1018945
- Fahlman BD (2007) *Materials Chemistry*. 2° Ed. Springer: Dordrecht
- Ferrari M (2005) Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161–171. doi: 10.1038/nrc1566
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247. doi: 10.1038/35041687
- Fuchs J, Thiele J (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 24:835–847. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00370-5
- Gara PMD, Garabano NI, Portoles MJL, et al (2012) ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. *J Nanoparticle Res*. doi: 10.1007/s11051-012-0741-8
- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310:257–270. doi: 10.1007/s00441-002-0651-7
- Gupta AK, Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26:3995–4021. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. *Febs* 281:9–19. doi: 10.1016/0014-5793(91)80347-6
- Halliwell JB (1984) Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 62:71–77.
- He X, Nie H, Wang K, et al (2008) In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. 80:9597–9603.
- He Y, Su Y, Yang X, et al (2009) Photo and pH Stable, Highly-Luminescent Silicon Nanospheres

and Their Bioconjugates for Immunofluorescent Cell Imaging. *J Am Chem Soc* 131:4434–4438.

He Y, Zhong Y, Peng F, et al (2011) One-Pot Microwave Synthesis of Water-Dispersible, Ultraphoto and pH Stable, and Highly Fluorescent Silicon Quantum Dots. *J Am Chem Soc* 133:14192–14195. doi: 10.1021/ja2048804

Hecht F, Case MP, Lovrien EW, et al (1968) Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science* 161:371–2.

Hogle WP (2006) The state of the art in radiation therapy. *Semin Oncol Nurs* 22:212–20. doi: 10.1016/j.soncn.2006.07.004

Holland EC (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6242–6244. doi: 10.1073/pnas.97.12.6242

Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T (2005) Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng* 100:1–11. doi: 10.1263/jbb.100.1

Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, et al (2007) Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28:4717–4732. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.014

Jockusch S, Turro NJ, Thompson EK, et al (2008) Singlet molecular oxygen by direct excitation. *Photochem Photobiol Sci* 7:235–239. doi: 10.1039/b714286b

Jovin TTM (2003) Quantum dots finally come of age. *Nat Biotechnol* 21:32–33. doi: 10.1038/nbt0103-32

Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, et al (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10:148–154. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2

Jutzi P (2003) *Silicon Chemistry - From the Atom to Extended Systems*. Wiler-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim

Juzenas P, Chen W, Sun YP, et al (2008a) Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1600–1614. doi: 10.1016/j.addr.2008.08.004

- Juzenas P, Chen W, Sun YP, et al (2008b) Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1600–1614. doi: 10.1016/j.addr.2008.08.004
- Juzeniene A, Nielsen KP, Moan J (2006) Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25:7–28.
- Kim C, Ghosh P, Rotello VM (2009) Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale* 1:61–67. doi: 10.1039/B9NR00112C
- Kim S-L, Jeong H-J, Kim E-M, et al (2007) Folate receptor targeted imaging using poly (ethylene glycol)-folate: in vitro and in vivo studies. *J Korean Med Sci* 22:405–411. doi: 10.3346/jkms.2007.22.3.405
- Kippeny T, Swafford L a., Rosenthal SJ (2002) Semiconductor Nanocrystals: A Powerful Visual Aid for Introducing the Particle in a Box. *J Chem Educ* 79:1094. doi: 10.1021/ed079p1094
- Klotz L-O, Kröncke K-D, Sies H (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2:88–94. doi: 10.1039/b210750c
- Kochevar IE (2004) Singlet oxygen signaling: from intimate to global. *Sci STKE* 2004:pe7. doi: 10.1126/stke.2212004pe7
- Kovalev D (1999) Optical Properties of Si Nanocrystals. *Phys Status Solidi B* 25:871–932.
- Kovalev D, Fujii M (2005) Silicon nanocrystals: Photosensitizers for oxygen molecules. *Adv Mater* 17:2531–2544. doi: 10.1002/adma.200500328
- Kovalev D, Heckler H, Ben-Chorin M, et al (1998) Breakdown of the k-Conservation Rule in Si Nanocrystals. *Phys Rev Lett* 81:2803–2806. doi: 10.1103/PhysRevLett.81.2803
- Krasnovsky a a (2007) Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research. *Biochemistry (Mosc)* 72:1065–1080. doi: 10.1134/S0006297907100057
- Krasnovsky a a, Drozdova NN, Ivanov a V, Ambartsumian R V (2003) Activation of molecular oxygen by infrared laser radiation in pigment-free aerobic systems. *Biochem Biokhimiia* 68:963–6.

- Kreuter J (2007) Nanoparticles—a historical perspective. *Int J Pharm* 331:1–10. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.021
- Kreuter J (2004) Nanoparticles as drug delivery systems. *Encycl. Nanosci. Nanotechnol.* 7 161–180.
- Kuntermann V, Cimpean C, Brehm G, et al (2008) Femtosecond transient absorption spectroscopy of silanized silicon quantum dots. *Phys Rev B* 77:115343. doi: 10.1103/PhysRevB.77.115343
- Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. PlenumPublishers
- Li ZF, Ruckenstein E (2004) Water-soluble poly(acrylic acid) grafted luminescent silicon nanoparticles and their use as fluorescent biological staining labels. *Nano Lett* 4:1463–1467. doi: 10.1021/nl0492436
- Liu J, Huang Y, Kumar A, et al (2014) pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol Adv* 32:693–710. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.009
- Llansola Portolés MJ, David Gara PM, Kotler ML, et al (2010) Silicon nanoparticle photophysics and singlet oxygen generation. *Langmuir* 26:10953–10960. doi: 10.1021/la100980x
- Lukyanov AN, Hartner WC, Torchilin VP (2004) Increased accumulation of PEG–PE micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits. *J Control Release* 94:187–193. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.10.008>
- Maeda H, Sawa T, Konno T (2001) Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release* 74:47–61. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00309-1
- Maeda H, Wu J, Sawa T, et al (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release* 65:271–284. doi: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5
- Manasi D, Chandana M, Sanjeeb K (2009) Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. *Expert Opin Drug Deliv* 6:285–304.

- Marathe D, Mishra KP (2002) Radiation-Induced Changes in Permeability in Unilamellar Phospholipid Liposomes Radiation-Induced Changes in Permeability in Unilamellar Phospholipid Liposomes. *Radiat Res* 157:685–692.
- Medintz IL, Mattoussi H, Clapp AR (2008) Potential clinical applications of quantum dots. *Int J Nanomed* 3:151.
- Meng F, Zhong Y, Cheng R, et al (2014) pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor-targeting doxorubicin delivery: concept and recent advances. *Nanomedicine (Lond)* 9:487–99. doi: 10.2217/nnm.13.212
- Mishra KP (2004) Cell Membrane Oxidative Damage Induced by Gamma Radiation and Apoptotic sensitivity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 23:61–66.
- Misra R, Acharya S, Sahoo SK (2010) Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov. Today* 15:842–850.
- Moan J (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues JOHAN. *J Photochem Photobiol B* 6:343–347.
- Murphy CJ (2002) Quantum Dots: A Primer. *Appl Spectrosc Rev* 56:1.
- Muthu MS, Singh S (2009) Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine (Lond)* 4:105–118. doi: 10.2217/17435889.4.1.105
- Myles DG, Biol D, Jaffe L a, et al (1994) Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres ILLauana Upon solvent evaporation , the. *Science (80-)* 263:1600–1603.
- Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K (1993) Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol* 86:117–125. doi: 10.1007/BF00334878
- Niedre M, Patterson MS, Wilson BC (2002) Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem Photobiol* 75:382–91. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2
- Nirmal M, Brus L (1999) Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Acc Chem*

Res 32:407–414. doi: 10.1021/ar9700320

Nirmal M, Norris DJ, Kuno M, et al (1995) Observation of the “dark exciton” in CdSe quantum dots. *Phys Rev Lett* 75:3728–3731. doi: 10.1103/PhysRevLett.75.3728

Norris DJ (2004) Electronic structure in semiconductor nanocrystals. In: Klimov VI (ed) *Semiconductor and metal nanocrystals: synthesis and electronic and optical properties*. Marcel Dekker, New York, pp 65–102

Osminkina L a., Tamarov KP, Sviridov AP, et al (2012) Photoluminescent biocompatible silicon nanoparticles for cancer theranostic applications. *J Biophotonics* 5:529–535. doi: 10.1002/jbio.201100112

Park, Y. et al. (2006) X-ray absorption of gold nanoparticles with thin silica shell. *J Nanosci Nanotechnol* 6:3503–3506.

Parveen S, Sahoo SK (2008) Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *J Drug Target* 16:108–123. doi: 10.1080/10611860701794353

Rajeshwar K (2007) Fundamentals of Semiconductors Electrochemistry and Photoelectrochemistry. *Encycl Electrochem* 1–51. doi: 10.1002/9783527610426.bard060001

Reichert JM, Wenger JB (2008) Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. *Drug Discov Today* 13:30–37. doi: 10.1016/j.drudis.2007.09.003

Rogozhina E V., Eckhoff D a., Gratton E, Braun P V. (2006) Carboxyl functionalization of ultrasmall luminescent silicon nanoparticles through thermal hydrosilylation. *J Mater Chem* 16:1421. doi: 10.1039/b509868h

Rosso-Vasic M, Spruijt E, Lagen B Van (2008) Synthesis and Photophysics of functionalized silicon nanoparticles.

Rosso-Vasic M, Spruijt E, Van Lagen B, et al (2008) Alkyl-functionalized oxide-free silicon nanoparticles: Synthesis and optical properties. *Small* 4:1835–1841. doi: 10.1002/smll.200800066

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ (2007) The present and future of nanotechnology in human

- health care. *Nanomedicine* 3:20–31. doi: 10.1016/j.nano.2006.11.008
- Samia a C, Chen X, Burda C (2003) Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc* 125:15736–15737. doi: 10.1021/ja0386905
- Samia ACS, Dayal S, Burda C (2006) Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 82:617–25. doi: 10.1562/2005-05-11-IR-525
- Schmidt R (2007) Photosensitized Generation of Singlet Oxygen. *Photochem Photobiol* 82:1161–1177. doi: 10.1562/2006-03-03-IR-833
- Schweitzer C, Schmidt R (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem Rev* 103:1685–1757. doi: 10.1021/cr010371d
- Serway RA (2010) *Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics.*, 8° Ed. Brooks/Cole, Belmont
- Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, Assaraf YG (2011) Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat* 14:150–163. doi: 10.1016/j.drug.2011.01.003
- Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, et al (2009) Chemical Reactions on Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots. *J Am Chem Soc* 132:248–253. doi: 10.1021/ja906501v
- Smith a, Gao X, Nie S (2004) Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. *Photochem Photobiol* 80:377–385. doi: 2004-06-21-IR-209R [pii]10.1562/0031-8655(2004)080<0377:QDNFIV>2.0.CO;2
- Sparreboom A, Scripture CD, Trieu V, et al (2005) Cancer Therapy : Clinical Comparative Preclinical and Clinical Pharmacokinetics of a (ABI-007) and Paclitaxel Formulated in Cremophor (Taxol). *Blood* 11:4136–4143. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2291
- Sudeep PK, Page Z, Emrick T (2008) PEGylated silicon nanoparticles: synthesis and characterization. *Chem Commun (Camb)* 6126–6127. doi: 10.1039/b813025f
- Sugahara KN, Braun GB, de Mendoza TH, et al (2014) Tumor-Penetrating iRGD Peptide Inhibits Metastasis. *Mol Cancer Ther* 14:120–128. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0366

- Sun JT, Hong CY, Pan CY (2010) Fabrication of PDEAEMA-coated mesoporous silica nanoparticles and pH-responsive controlled release. *J Phys Chem C* 114:12481–12486. doi: 10.1021/jp103982a
- Torchilin V (2006) *Nanoparticles as Pharmaceutical Carriers*. Imperial College Press, London, UK
- Torchilin VP (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J* 9:E128–E147. doi: 10.1208/aapsj0902015
- Torchilin VP, Trubetskoy VS (1995) Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? *Adv Drug Deliv Rev* 16:141–155. doi: 10.1016/0169-409X(95)00022-Y
- Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD (2005) Water-soluble photoluminescent silicon quantum dots. *Angew Chemie - Int Ed* 44:4550–4554. doi: 10.1002/anie.200501256
- Wasserman HH, Murray RW (1979) *Singlet Oxygen*. Academic Press, New York, London,
- Weldon D, Poulsen TD, Ogilby PR (1999) Review; Singlet sigma: The “other” singlet oxygen in solution. *Photochem Photobiol* 70:369. doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08238.x
- Whitesides GM (2003) The “right” size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* 21:1161–1165. doi: 10.1038/nbt872
- Yaghini E, Seifalian AM, MacRobert AJ (2009) Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy. *Nanomedicine (Lond)* 4:353–63. doi: 10.2217/nnm.09.9
- Yagi K, Armstrong D (1994) *Free Radicals in Diagnostic Medicine: A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 366. Springer US, pp 351–376
- Yang L, Ho NY, Alshut R, et al (2009) Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol* 28:245–253. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.04.013
- Yildirim L, Thanh NTK, Loizidou M, Seifalian AM (2011) Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today* 6:585–607. doi: 10.1016/j.nantod.2011.10.001

Zhao X, Li H, Lee RJ (2008) Targeted drug delivery via folate receptors. *Expert Opin Drug Deliv* 5:309–319. doi: 10.1517/17425247.5.3.309

Zheng J, Tian X, Sun Y, et al (2013) PH-sensitive poly(glutamic acid) grafted mesoporous silica nanoparticles for drug delivery. *Int J Pharm* 450:296–303. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.014

Zhong Y, Peng F, Bao F, et al (2013) Large-scale aqueous synthesis of fluorescent and biocompatible silicon nanoparticles and their use as highly photostable biological probes. *J Am Chem Soc* 135:8350–8356. doi: 10.1021/ja4026227

Capítulo 2

EQUIPAMIENTO, MATERIALES Y MÉTODOS

1. Solventes, gases y reactivos

En este trabajo se utilizaron los solventes que se describen en la Tabla 2.1 tal como se recibieron. Se procedió a reducir el contenido en agua mediante el uso de tamices moleculares de tamaño de malla 4 Å (Anedra). El agua calidad milli-Q ($>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, $< 20 \text{ ppb}$ de carbono orgánico) utilizada se obtuvo con un sistema de purificación de agua MILLI-Q® de filtros y resinas de intercambio iónico (Millipore®).

TABLA 2.1: SOLVENTES

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Agua Deuterada	D ₂ O	99,9	Aldrich
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	>99	U.V.E
Etanol	C ₂ H ₅ OH	99,9	J.T Baker
Metanol	CH ₃ OH	100	J.T. Baker
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	99,7	J.T. Baker
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	99,9	J.T. Baker
DimetilSulfoxido	CH ₃ SOCH ₃	>99	Sintorgan
Dimetilformamida	(CH ₃) ₂ NCHO	100	Anedra

La lista de reactivos utilizados se muestra en la Tabla 2.2.

TABLA 2.2: REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivo	Formula	Pureza (%)	Marca
9,10-difenilantraceno	9,10-DPA	>97	Sigma-Aldrich
Azida de sodio	NaN ₃	-	Sigma-Aldrich
Tetracloruro de silicio	SiCl ₄	99	Sigma-Aldrich
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂	30	Merck
Tetrahidruro de Al y Li	H ₄ AlLi	95	Aldrich
Alilamina	C ₃ H ₅ NH ₂	98	Aldrich
Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	≥ 97	Sigma
PEG600	H(OCH ₂ CH ₂) _n OH	≥ 99	Aldrich
Bromuro de tetraoctilamonio	C ₃₂ H ₆₈ BrN	98	Sigma-Aldrich

Diclohexilcarbodiimida	$C_{13}H_{22}N_2$	≥ 99	Aldrich
N-hidroxisuccinimida	$C_4H_5NO_3$	≥ 99	Aldrich
Anhídrido succínico	$C_4H_4O_3$	≥ 99	Anedra
Hidrógeno fosfato de potasio	K_2HPO_4	99,7	J.T. Baker
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	99,3	J.T. Baker
Cloruro de amonio	NH_4Cl	99,5	Carlo Erba
Siliciuro de magnesio	Mg_2Si	> 99	Aldrich
Ácido acrílico	$C_3H_4O_2$	> 99	Fluka
SOSG [®]	-	-	Molecular Probes [™]

Los gases se hicieron circular por una trampa inmersa en nitrógeno líquido para eliminar la humedad residual antes de ser usados. Los gases utilizados fueron: Nitrógeno (calidad cuatro bandas), Argón, Aire sintético y oxígeno suministrados por “La Oxígena S.A”.

2. Material Común de Laboratorio

Las pesadas se realizaron en una balanza electrónica marca Denver modelo TP-214 de $\pm 0,1$ mg de precisión.

Se utilizó un equipo de ultrasonidos marca TESLAB S.R.L. Modelo TB04TA con una potencia de 160 W y una frecuencia de 40 kHz.

En los procesos de aislamiento y purificación se emplearon filtros de membrana de Nylon con poros de $0,22 \mu m$ (OSMONICS INC.) y membranas de diálisis de 20,4 mm de diámetro MWCO 6000-8000 (Spectra/por[®]). Los cambios de solvente se llevaron a cabo en un rotavapor Senco con trampa de nitrógeno líquido.

Las medidas de pH se hicieron con un pHmetro modelo Consort C832 y las medidas de O_2 disuelto con un electrodo selectivo de O_2 multicanal modelo Consort C932 unido a una PC.

3. Técnicas y Equipamiento

3.1. Estudios de Absorción

3.1.1. Fundamentos Teóricos:

La absorción se define como la intensidad de luz absorbida por una muestra al atravesarla. La ley de Lambert – Beer establece que es la dependencia logarítmica entre la transmisión (T) de luz a través de una sustancia y a su vez, también se define como el producto del coeficiente de absorción (P/P₀) de la sustancia (ε) por su concentración y la distancia del camino óptico de la luz (ℓ) a través del material. Las ecuaciones 2.1-2.3 muestran las relaciones entre la absorción y el factor de absorción que será posteriormente utilizada para los cálculos de rendimientos cuánticos (Lakowicz et al. 1999).

$$A(\lambda) = -\ln(T(\lambda)) \text{ (Ec. 2.1)}$$

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda).l.c \text{ (Ec. 2.2)}$$

$$1 - T(\lambda) = 1 - P(\lambda)/P_0(\lambda) \text{ (Ec. 2.3)}$$

$$P(\lambda)/P_0(\lambda) = 1 - 10^{-A(\lambda)} \text{ (Ec. 2.4)}$$

Donde P(λ) es la potencia radiante luego de pasar por el camino óptico l (también conocido como potencia radiante transmitida) y P₀ es el poder radiante incidente. La fracción de luz absorbida por un sistema es independiente de la potencia radiante espectral incidente P₀(λ). Esta ley se cumple sólo cuando P₀(λ) es pequeño, la difusión es despreciable y los procesos multifotónicos, las poblaciones de los estados excitados y las reacciones fotoquímicas son también despreciables (Bourdelande et al. 1999).

3.1.2. Corrección por Dispersión de Luz

Cuando se trabaja con material particulado en suspensión los espectros de absorción presentan una desviación debido a la dispersión de luz incidente que no alcanza al detector y por tanto es interpretado como absorción (Lakowicz 2006). Dependiendo del tipo de choque producido, se producirá dispersión Raman (choques elásticos) o dispersión Rayleigh (choques inelásticos). En los casos donde las partículas son de un tamaño menor a un 10% de la longitud de onda incidente predomina el efecto Rayleigh.

La luz dispersada a partir de la luz incidente es detectada como absorción pero no necesariamente excita la muestra y no genera ninguna emisión que pueda ser analizada. Por tanto el espectro obtenido directamente del equipo es de atenuación y hay que eliminar la cantidad de luz dispersada por las nanopartículas, ya sea mediante el empleo de una esfera integradora o mediante una estimación de la luz dispersada, para obtener el espectro de absorción.

Trabajando a concentración constante y en el mismo equipo de medida, se puede trabajar con la ecuación 2.5, en la que se relaciona la cantidad de luz dispersada con la inversa de la longitud de onda elevada a la cuarta potencia (Landes et al. 2002).

$$\frac{I}{I_0} = a + b \left(\frac{1}{\lambda}\right)^4 \text{ Ec. 2.5}$$

Cuando el ajuste a la ecuación 2.5 es pobre, los espectros se ajustan a la ecuación 2.6, la cual tiene en cuenta la agregación de las partículas con un parámetro c que varía desde 4 para sistemas totalmente desagregados e ideales hasta valores de -2,2 para sistemas de distribuciones y agregación muy irregulares (Timasheff 1966).

$$\frac{I}{I_0} = b \left(\frac{1}{\lambda}\right)^c \text{ Ec. 2.6}$$

La diferencia en los valores de c pueden deberse a la mayor formación de agregados en agua por ser menos afines a este medio con el recubrimiento superficial. Distintos autores desarrollaron correcciones similares para corregir por la dispersión de luz (Eckhoff et al. 2005).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz T90 + UV/Vis (PG Instruments Ltd.), con ancho de banda entre 0,2 y 4,0 nm según el ancho de rendija seleccionado y velocidad de barrido de 300 nm/min. Las muestras se emplazaron en celdas de cuarzo Helma de 1,0 cm de camino óptico.

3.2. Estudios de Luminiscencia Estacionaria

Los espectros de excitación y emisión a temperatura ambiente se obtuvieron mediante un equipo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC con 2 nm de ancho de rejilla de entrada y de salida. Se utilizó un paso de longitud de onda de barrido 1 nm y un tiempo de

integración en cada paso de 0,3 segundos. Todos los espectros se corrigieron por la sensibilidad dependiente del detector y la fuente usando los espectros de patrones de calibración Camarina 115 y 9,10-DPA en ciclohexano (Lakowicz 2006) y por la dispersión Raman usando el espectro del solvente.

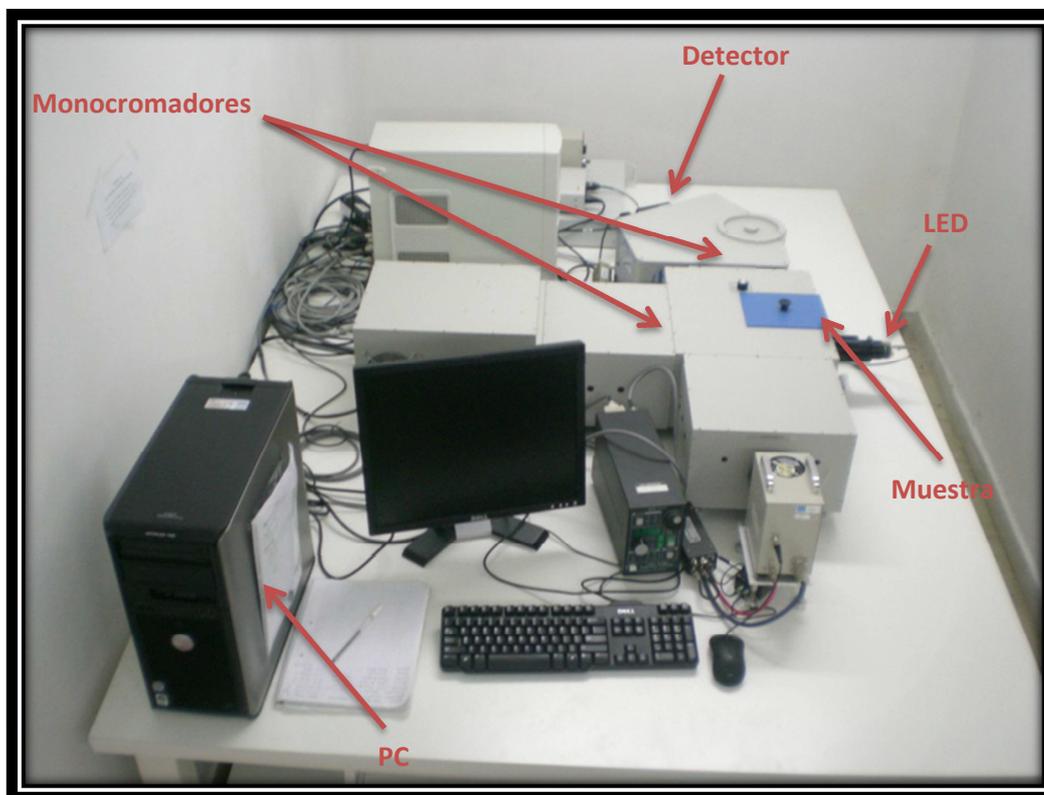


FIG. 2.1 ESPECTROFLUORÓMETRO JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 CON LIFETIME TCSPC.

3.3. Estudios de Luminiscencia Resuelta en el Tiempo

Se realizaron determinaciones de emisión y anisotropía resueltas en el tiempo utilizando la técnica de fluorimetría en el dominio del tiempo. Las medidas de tiempo de vida se llevaron a cabo mediante un equipo de single photon counting correlacionado en el tiempo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC con excitación LED a 341 nm. El espectro resuelto en el tiempo del LED, utilizado para la posterior deconvolución de las señales del LED con las de la muestra, se determinó, siguiendo las recomendaciones del fabricante, para lo que se utilizaron suspensiones de sílice coloidal Ludox (SM-30, 30 % SiO₂ en agua a pH 10,2 con un diámetro de partícula medio de 7 nm, área superficial: 345 m²/g, Sigma-Aldrich). El ajuste de los decaimientos de luminiscencia resueltos en el tiempo fue realizado optimizando los valores de Chi cuadrado para obtener los parámetros con el software DAS6 Analysis.

3.4. Análisis de Regresión Bilineal

El análisis de regresión bilineal se basa en que para cada longitud de onda de excitación de la suspensión de nanopartículas se presenta un espectro de emisión. Para una sustancia pura existe una única forma, el espectro de emisión es invariante, permaneciendo independiente de la longitud de onda de excitación. Para fluoróforos de baja absorbancia ($\leq 0,05$), la intensidad de emisión en estado estacionario a una longitud de onda de emisión dada ($I(\lambda_m)$) es proporcional al coeficiente de absorción del fluoróforo a la longitud de onda de excitación ($\epsilon(\lambda_x)$), y al factor $F(\lambda_m)$ que refleja la distribución de probabilidades de varias transiciones desde el estado vibracional inferior del primer estado electrónico excitado hacia los niveles vibracionales del estado basal (Valeur 2002).

Un análisis de regresión bilineal utiliza la linealidad de $I(\lambda_m)$ con $\epsilon(\lambda_x)$ y $F(\lambda_m)$ y lo aplica a la matriz de emisión experimental para obtener información del mínimo número de especies, su emisión relativa y su espectro de absorción (Gonzalez 1989). Usando los índices x y m para las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente en una matriz de la forma $[i_{xm}] = [\epsilon_{xj}] \cdot [f_{jm}]$, donde $[i_{xm}]$, $[\epsilon_{xj}]$ y $[f_{jm}]$ representan las matrices de intensidad de emisión, coeficientes de absorción y $F(\lambda_m)$, respectivamente. El procedimiento se basa en alternar los cálculos de las matrices $[\epsilon_{xj}]$ y $[f_{jm}]$ por múltiple regresión lineal iterativamente, hasta que la convergencia se alcanza cuando la condición de cuadrados mínimos es aplicada para minimizar los elementos de la matriz-error. De esta matriz, se obtiene la matriz de intensidad de emisión corregida $[i_{xm}^c]$. El número de especies se selecciona como el mínimo que muestra una aproximación razonable entre $[i_{xm}^c]$ y $[i_{xm}]$.

3.5. Espectros de infrarrojo

La Espectroscopia de Infrarrojo es una de las técnicas espectroscópicas más versátiles y de mayor aplicación en la caracterización e identificación de materiales ya que permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas. La técnica de ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR que se basa en la reflexión que experimenta la radiación en la interfaz de separación de dos medios de distinta densidad óptica (distinto índice de refracción, η) cuando esta viene del medio más denso. Se producen dos fenómenos: la refracción y la reflexión, observándose más este segundo cuanto mayor es el ángulo de incidencia. Superado cierto valor de dicho ángulo (ángulo crítico, que es función del η de ambos medios), se produce la reflexión total de la radiación. En espectroscopia ATR se coloca en estrecho contacto con la muestra un cristal de alto

índice de refracción y buenas propiedades de transmisión de la radiación IR. De este modo, cuando se hace pasar radiación IR por este cristal con un ángulo de incidencia igual a superior al crítico, la radiación experimentará reflexión total en la interfaz muestra-cristal. En la muestra se crea lo que se llama una onda evanescente que penetra en ella entre 2 y 15 μm , por lo cual para observar el efecto es esencial que exista un contacto real de la muestra y el cristal. La intensidad de esta onda evanescente va decayendo a medida que se aleja de la interfaz. Normalmente, los espectros ATR son similares a los espectros IR convencionales excepto en las regiones de longitudes de onda más cortas porque, en general, estas radiaciones penetran menos en la muestra y por tanto se absorben menos. Cabe aclarar que el grado de penetración no sigue una dependencia estrictamente proporcional de la longitud de onda porque, si bien por una parte depende directamente de esta, también tiene una dependencia compleja con los índices de refracción de la muestra y el cristal, que a su vez dependen de la longitud de onda, efecto este último que se conoce como de dispersión.

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 400 cm^{-1} con resolución de 1 cm^{-1} . Se tomaron promedios de 64 medidas con una resolución de 4 cm^{-1} . Se utilizaron tanto pastillas de KBr como cristales de silicio<100> como soporte de las muestras, las que se sembraron sobre la superficie. Los espectros de reflexión total infrarroja atenuada (ATR-FTIR) se obtuvieron mediante un equipo Nicolet 380 spectrometer usando un cristal de ZnSe con un ángulo de incidencia del haz de 45°.

La preparación de la pastilla de KBr se realiza prensando con una presión de 3 toneladas/ cm^2 una mezcla de KBr con la muestra sólida (en nuestro caso nanopartículas previamente secadas en estufa a 40°C y 0,2 atm). La ventaja de utilizar la pastilla de KBr como soporte radica en su sencilla y rápida preparación. Además, al tener gran cantidad de muestra los espectros se obtienen bien definidos y con una buena calidad señal/ruido. Cuando las medidas se encuentran condicionadas por la poca cantidad de muestra de la que se dispone se utilizó un cristal de silicio como soporte ya que este es transparente en la ventana de número de onda a las que se observa el espectro infrarrojo. Para ello se realiza una siembra de la suspensión de partículas gota a gota y constantemente se evapora el solvente en atmosfera inerte de Argón a temperatura ambiente. Se añaden gotas de la muestra hasta la obtención de espectros con una relación señal/ruido adecuada. En estos casos se utilizó como blanco una oblea de cristal de silicio sin sembrar.

3.6. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

La Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) es una técnica cuantitativa de exploración superficial capaz de determinar la composición elemental, la fórmula empírica y el estado químico y electrónico de los elementos presentes en un material. Por esta técnica se puede analizar y obtener información de la composición química de la superficie de un material entre 0-10 nm de profundidad.

La técnica XPS se cataloga dentro de las técnicas analíticas de espectroscopias electrónicas. El más básico análisis XPS de una superficie puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes, excepto H y He. Se obtiene además información acerca del entorno molecular: estado de oxidación y átomos enlazantes, estructuras aromáticas o insaturadas, entre otros.

El proceso básico a la técnica XPS resulta de la interacción de un fotón con el electrón de un orbital atómico con una transferencia total de la energía del fotón hacia el electrón, ocurriendo la emisión del electrón del átomo. Cuando ningún electrón es emitido por el átomo, se debe a que la frecuencia de excitación del fotón es demasiado baja. Cuando aumentamos gradualmente la energía del fotón se comienza a observar la fotoemisión de electrones del átomo. Una vez superada la frecuencia umbral, el número de electrones emitidos será proporcional a la intensidad de iluminación (mayor número de fotones de alta frecuencia de excitación). Por otra parte, la energía cinética de los electrones emitidos es linealmente proporcional a la frecuencia de los fotones excitantes, si se utiliza fotones de energía muy superior a la umbral, el exceso de energía es transmitido al electrón que se emite. El proceso de fotoemisión resulta ser extremadamente rápido, 10^{-16} s, y su física básica se describe mediante la ecuación de Einstein:

$$E_B = h \cdot \nu - KE \quad \text{Ec. 2.7}$$

donde E_B es la energía de enlace del electrón en el átomo, $h\nu$ es la energía de la fuente de rayos X, y KE es la energía cinética del electrón detectado que es medida por el espectrómetro del XPS. La energía de enlace de un electrón variará según el tipo de átomo (valor absoluto de su carga nuclear) y de los átomos que a él se unan mediante enlaces de tipo iónico o covalente (los cuales pueden alterar la distribución electrónica). Las interacciones débiles entre átomos no alteran suficientemente la distribución electrónica como para que se pueda observar un cambio en la energía de enlace medible. Para los gases, la energía de enlace de un electrón es igual a su energía de ionización. En cambio, en los sólidos existe una influencia por parte de la

superficie, y una energía adicional es necesaria para remover un electrón de la misma, esta energía extra se denomina función de trabajo Φ . De este modo $E_B^f = h\nu - KE - \Phi$. Cuando un sólido es irradiado por rayos X, también puede ocurrir la emisión de electrones Auger. Estos electrones se diferencian de los fotoelectrones, y se caracterizan porque su energía es independiente de la energía de irradiación.

Las medidas de Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) fueron obtenidas bajo ultra alto vacío con un espectrómetro XR50 SpecsGmbH con Mg K(α) como fuente de excitación y un analizador de energía de media esfera PHOIBOS 100. Se calibró con Au4f 7/2 y Cu2p 3/2 de 84,00 y 933,67 eV energías de enlace de, respectivamente. Se realizó una calibración interna para corregir el pico C 1s en BE = 284,6 eV debido al carbono espurio. Se tomaron espectros XPS de alta resolución para obtener una mejor observación del entorno químico de los diferentes átomos. Se utilizó una línea de base del tipo Shirley para cada espectro de forma de eliminar el efecto de la pérdida de estructura extrínseca y el espectro se deconvoluciona mediante una o más funciones de Gauss-Lorentz, de forma tal de obtener valores mínimos de χ^2 .

La preparación de la muestra se efectuó depositando 3 gotas (pipeta Pasteur) sobre un sustrato de Au-robax, partiendo de la mezcla líquida de aspecto límpido e incoloro que contenía nanopartículas de silicio junto con tolueno. La cantidad de mezcla utilizada sobre el sustrato corresponde a la mínima necesaria para la apreciación a simple vista de un depósito de aspecto claro.

3.7. Detección de Oxígeno Singulete

3.7.1. Detección de Fosforescencia de Oxígeno Singulete

La presencia del oxígeno singulete ($O_2(a^1\Delta_g)$) se determinó mediante la detección de su fosforescencia a 1273 nm debido a la relajación radiativa desde el estado singulete de menor energía al estado triplete basal del oxígeno molecular. Para ello se utilizó una suspensión saturada en oxígeno de nanopartículas de silicio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un láser Nd:YAG Surelite II Continuum laser (7 ns FWHM y 14 mJ por pulso a 355 nm). La radiación emitida se detectó en ángulo recto usando un amplificador Judson J 116/8sp y un detector de germanio (5 mm de diámetro) después de pasar por los filtros apropiados. Los decaimientos son promediados y almacenados en un osciloscopio (O) Agilent Infiniium 500 MHz. Las medidas se realizaron irradiando a 355 nm en tolueno y agua deuterada, respectivamente. Los solventes utilizados fueron tolueno y agua deuterada (D_2O) con un pD de 6,4 calculado añadiendo 0,4 a los valores de pH medidos (Martire et al. 1993).



FIG. 2.2 LÁSER ND:YAG SURELITE II CONTINUUM

3.7.2. Detección mediante un Electrodo Sensible de Oxígeno Molecular

La formación de $O_2(a^1\Delta_g)$ por las nanopartículas de silicio como sensibilizadores se detectó de forma indirecta mediante el monitoreo de consumo de oxígeno molecular en un reactor cerrado. El montaje experimental consta de una lámpara Rayonet irradiando a una longitud de onda de (350 ± 20) nm en un reactor cerrado donde se sitúa el fotosensibilizador (en este caso las nanopartículas), un electrodo sensible de oxígeno molecular (Orion 97-0899) y un compuesto capaz de reaccionar física o químicamente con el $O_2(a^1\Delta_g)$ en suspensiones saturadas en aire.

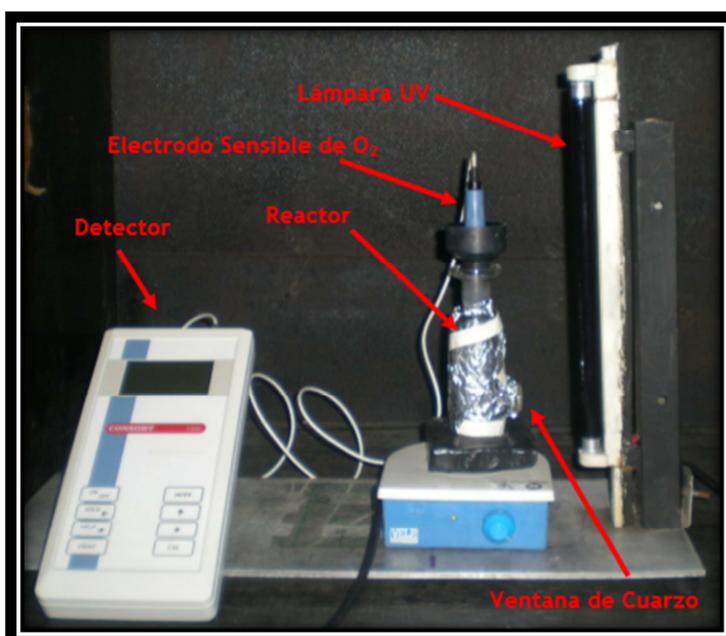
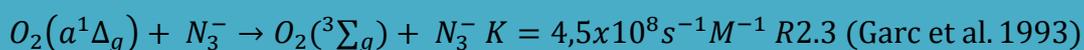
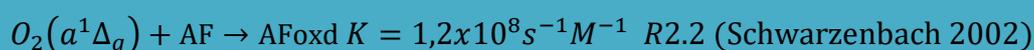


FIG. 2.3: ELECTRODO DE O_2

La técnica se basa en medir el consumo de oxígeno triplete molecular ($O_2(^3\Sigma_g)$) en función del tiempo de irradiación en un reactor cerrado mediante un electrodo sensible a la concentración de $O_2(^3\Sigma_g)$. Para tal propósito se realizan tres experiencias diferentes. En el primer experimento se irradian suspensiones acuosas de nanopartículas y se mide el consumo de oxígeno. Si se registra algún consumo de oxígeno podría ser debido a que el oxígeno singulete generado estuviese reaccionando con la superficie de la propia nanopartícula. De lo contrario, la energía de excitación electrónica del oxígeno singulete es eficientemente convertida en energía vibracional de los enlaces terminales desactivándose por las moléculas de agua según la reacción 2.1, volviendo al estado basal del oxígeno y no consumiéndose.

En el segundo experimento, se añade alcohol furfurílico (FA) a la suspensión anterior. Este reactivo es conocido por su eficacia en reaccionar con oxígeno singulete siguiendo la reacción 2.2. Como consecuencia de esta reacción se elimina $O_2(^3\Sigma_g)$ del medio, siendo detectado este consumo por el electrodo.

La tercera experiencia se basa en añadir azida sódica (NaN_3) a la anterior solución en una concentración un orden de magnitud mayor que la de FA. El oxígeno singulete interacciona con la azida sódica siguiendo el esquema de reacción 3, desactivándose al estado basal del oxígeno por lo que este no se consume. Al existir una competencia por el $O_2(a^1\Delta_g)$ entre el alcohol furfurílico y la azida sódica, donde la NaN_3 se encuentra en mayor proporción, se inhibe el consumo de $O_2(a^1\Delta_g)$ tal como se espera por la reacción 2.3.



DISEÑO EXPERIMENTAL:

En primer lugar se calibra el electrodo y luego se registran las medidas irradiando a 350 nm en agua para que sirvan como patrón. Se utiliza un reactor de volumen 125 ml con una ventana de cristal de cuarzo de 1 cm de diámetro.

Las medidas se realizan durante 30 minutos y se controla el pH al comienzo y al final del experimento. Se utiliza agua destilada como patrón y se miden las diferentes NP-Si a una concentración en agua destilada de 0,08 mg/ml. Los químicos que se agregan son alcohol

furfurílico 10^{-2} mol/L que en volumen corresponde a 104 μ l. También se utiliza un desactivador físico como la Azida de sodio (NaN_3) en una concentración de 10^{-2} mol/L que pesado corresponde a 0.081 gramos.

3.7.3. Detección de $^1\text{O}_2$ mediante la sonda SOSG®

Un método alternativo para la detección de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), es el uso de la sonda fluorescente conocida como “Singlet Oxygen Sensor Green” (SOSG®) que ha sido ampliamente utilizada en el estudio de materiales con aplicaciones médicas, por ej., en terapia fotodinámica (Ragàs et al. 2009).

La sonda SOSG® se compone de un donante de electrones (derivado de antraceno) y un aceptor (derivado de fluoresceína) unidos covalentemente (Kim et al. 2013). SOSG® exhibe débiles picos de fluorescencia azul a 395 y 416 nm bajo excitación a 372 y 393 nm. En presencia de $^1\text{O}_2$, SOSG® emite fluorescencia verde con máximos de excitación y emisión a 504 y 525 nm, respectivamente. La emisión de esta fluorescencia verde corresponde a la formación de un endoperóxido generado por la interacción del $^1\text{O}_2$ con el residuo de antraceno del SOSG, como se observa para otras sondas fluoresceína-antraceno similares, tales como DMAX o DPAX (Tanaka et al. 2001).

Algunos estudios utilizando la sonda SOSG® han demostrado la aparición de fluorescencia verde después de la exposición de SOSG a radiación UV o visible, incluso en ausencia de un fotosensibilizador de $^1\text{O}_2$ (Hideg 2008). También se sabe de la literatura, que la fluorescencia verde se desvanece bajo irradiación UV como consecuencia del proceso de fotoblanqueo mediado por radicales (Ragàs et al. 2009). Estos resultados deben tenerse en cuenta al utilizar la sonda diseñando el experimento con los controles adecuados.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se resuspende un vial del reactivo comercial (100 μ g SOSG®) en 33 μ l de metanol y se añaden luego 297 μ l de agua mQ. De esta solución madre se toman 3 μ l por cada 1447 μ l de muestra a determinar, de forma tal de tener una concentración 50 μ M de la sonda. Luego se preparan las siguientes mezclas: Blanco (3 μ l de solución SOSG® + 1477 μ l de agua), Muestra (3 μ l de solución SOSG® + 1477 μ l de suspensión de nanopartículas de silicio de absorbancia conocida y cercana a 0,5 a 355 nm), Referencia (3 μ l de solución SOSG® + 1477 μ l de una solución de un fotosensibilizador de absorción conocida a 355 nm, en nuestro caso se utilizó azul de metileno). Cada mezcla se irradió con un láser Nd:YAG Surelite II Continuum a 355 nm a diferentes tiempos. Se toma luego el espectro de emisión a 525 nm y excitación 461 nm.

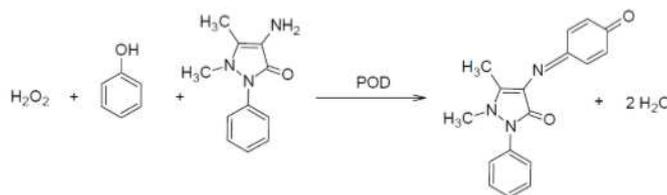
3.8. Detección del Radical Anión Superóxido

La generación de superóxido se determinó de forma indirecta mediante la detección de agua oxigenada (H_2O_2) producida a partir de la reacción 2.4.



La concentración de H_2O_2 en las muestras de reacción se midió mediante un método enzimático-colorimétrico empleando un kit comercial de Wiener para determinación de colesterol (Allain y Poon 1974). El kit comercial provee los siguientes reactivos: una solución de 4-aminofenazona (4-AF), una solución de fenol y una mezcla de enzimas (peroxidasa (POD), lipasa fúngica y colesterol oxidasa (CHOD)). El método se basa en la reacción del H_2O_2 con una mezcla de 4-AF y fenol para dar como producto la quinonaimina (4-(pbenzoquinona monoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm ($\epsilon(505) = 5035\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$) (Carlos 2009). La reacción catalizada por la POD se muestra a continuación:

R 2.5: REACCIÓN CATALIZADA POR LA POD



Las determinaciones de H_2O_2 en la mezcla de reacción se realizaron de la siguiente manera: se preparó el reactivo de trabajo mediante la mezcla de las soluciones provistas por el kit comercial. Las concentraciones finales de las diferentes especies en el reactivo de trabajo fueron las siguientes: [4-AF] = 1,5 mM; [fenol] = 2,75 mM; [POD] = 0,4 U·mL⁻¹; [Lipasa] = 6,0 U·mL⁻¹; [CHOD] = 0,06 U·mL⁻¹. Posteriormente 50 μ L de la mezcla de reacción fueron agregados a 2 ml de reactivo de trabajo. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se tomaron los espectros de absorción entre 400 y 600 nm. Es importante aclarar que las enzimas Lipasa y CHOD intervienen solamente en la secuencia de reacciones que involucra la determinación del colesterol, no afectando la determinación de H_2O_2 .

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se preparan diluciones a partir H_2O_2 comercial dentro del rango de 100 y 600 μ M de H_2O_2 . Un volumen de 400 μ l de las diferentes diluciones y de un blanco de agua destilada se mezclan

con 1,8 ml del reactivo comercial.

Las diferentes diluciones y el blanco se incuban durante 5 minutos a 37°C (o durante 30 minutos a temperatura ambiente). Transcurrido el tiempo de incubación se mide la ABS a 505 nm. Se arma la curva de calibración y se procede luego a la determinación de las muestras. Se determinaron muestras de NPSiNH₂, NPSiNH-Fol, NPSiNH-PEG y NPSi'PEG todas ajustadas a igual valor de absorbancia (0,5). Las muestras se irradian saturadas en oxígeno durante 30 min con una lámpara de 350 nm. Luego se agrega un volumen de 400 µl de cada muestra sobre 1,8 ml del reactivo y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Se realiza la lectura de absorbancia a 505 nm y de la curva de calibración se obtienen los valores de concentración de H₂O₂.

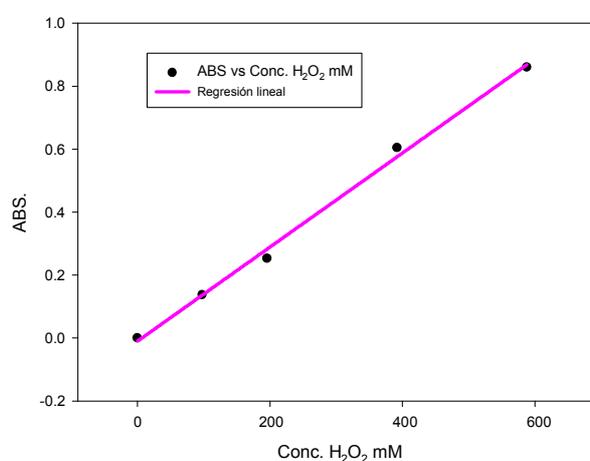


FIG. 2.4: CURVA DE CALIBRACIÓN H₂O₂ VS ABS DETERMINACIÓN RADICAL SUPERÓXIDO

3.9. Determinación de Tamaños

3.9.1. Microscopía de Transmisión Electrónica

Las micrografías por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) fueron adquiridas con un microscopio F 2010 (JEOL Ltd., Tokio, Japón) usando una malla de carbono recubierta de una malla de cobre de 300 rendijas. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.). A partir de estas micrografías se pueden obtener los diámetros de Feret de diferentes partículas (suponiendo una geométrica esférica) y a partir de este valor obtener un valor medio por ajuste a una distribución normal. El diámetro de Feret es la medida del tamaño del objeto a lo largo de una dirección específica. En general, se puede definir como la distancia entre dos planos paralelos que limitan el objeto perpendicular a esta dirección. Esta medida se utiliza en el análisis de tamaños de nanopartículas por microscopía, donde se aplica a proyecciones de un objeto tridimensional

(3D) en un plano 2D. En tales casos, el diámetro de Feret se define como la distancia entre dos líneas tangenciales paralelas en lugar de planos.

3.9.2. Dispersión Dinámica de Luz

Cuando la luz incide sobre partículas mucho menores de 250 nm se la dispersión Rayleigh. Si la luz proviene de un láser, y por tanto es monocromática y coherente, se observa una fluctuación en la intensidad de la dispersión de luz dependiente del tiempo. Estas variaciones se deben a que las partículas presentan movimientos Brownianos en la suspensión. Se puede generar una función de autocorrelación en el tiempo de la intensidad de luz dispersada (ecuación 2.7).

$$\hat{I}(\tau) = \frac{\langle I(\tau) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(\tau) \rangle^2} \quad \text{Ec. 2.7}$$

La función de correlación temporal se puede relacionar con el coeficiente de difusión de las partículas en el medio y por tanto mediante la ecuación de Stokes-Einstein con el radio hidrodinámico de las partículas. Si se considera que la muestra tiene un único tamaño se puede ajustar a una exponencial (ecuación 2.8) donde D es el coeficiente de difusión medio de la muestra. Si la muestra es polidispersa se utiliza el método numérico por ajuste de cumulantes, el cual realiza una suma de varias exponenciales obteniendo una distribución de tamaños (Koppel 1972).

$$\hat{I}(\tau) = \text{Exp}(-cte.D) \quad \text{Ec. 2.8}$$

El arreglo experimental consta de un láser que incide sobre la muestra y un detector de la luz dispersada a 90 grados. Las medidas se realizaron en agua ultra pura con un equipo Nano Zerasizer (Malvern Instruments; UK) a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

3.10. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar macromoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Se utiliza comúnmente para el análisis de proteínas y ácidos nucleicos, pero también puede utilizarse para el análisis de nanopartículas.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel

está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas. Se emplea usualmente para separar moléculas grandes (ácidos nucleicos de más de 20.000 nucleótidos).

La electroforesis en geles de agarosa se utilizó como técnica de caracterización superficial de las diferentes nanopartículas. Un gel de agarosa al 1% en una solución reguladora TAE (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA) de pH 8 se utilizó como soporte y la misma solución reguladora TAE 1X de pH 8 se utilizó como fase móvil. Por cada carril se sembró un volumen de 10 μ l de las diferentes nanopartículas y la corrida se realizó durante 30 minutos aplicando un voltaje constante de 100 V. Aprovechando la luminiscencia propia de las nanopartículas, el revelado se hizo en un transiluminador equipado con lámparas UV, con una exposición de 30 segundos y usando el filtro SW06. El equipo de revelado tiene incorporada una cámara fotográfica conectada a una PC que permite digitalizar las imágenes que se obtienen.

3.11. Potencial Zeta

Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir en el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern. Bajo ciertas condiciones, también se puede pensar al potencial zeta como la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. Este valor puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse en los fluidos. El potencial zeta es una medida efectiva para indicar los posibles cambios que se producen en el potencial de la superficie, así como en las fuerzas de repulsión existente entre los coloides. El potencial zeta es a menudo la única ruta disponible para la caracterización de las propiedades de doble capa. Por ello se lo utiliza ampliamente para la cuantificación de la magnitud de la carga eléctrica en la doble capa. Sin embargo, el potencial zeta no es igual al potencial de la superficie o potencial eléctrico de Stern en la doble capa. Estos supuestos de igualdad deben aplicarse con cautela. El potencial zeta se utiliza también, en la electroforesis, la cual se encarga de medir el movimiento que realizan las partículas de un coloide cuando se encuentran bajo la influencia de un campo electromagnético bajo.

La importancia del potencial zeta radica en que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales (Jiang et al. 2009), ya que da una idea del grado de repulsión entre partículas cargadas adyacentes en una dispersión. La estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula

coloidal y las fuerzas de atracción de van der Waals. Por ello, las moléculas y partículas cargadas que son lo suficientemente pequeñas y poseen un alto potencial zeta son estables en suspensión y se resisten a la agregación. Cuando el potencial zeta es bajo, se observa atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y las partículas tienden a coagular o flocular. Las nanopartículas con un potencial zeta entre -10 y 10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las nanopartículas con potenciales zeta mayores de 30 mV o menores de -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y aniónicas, respectivamente

Existe una relación destacable entre el potencial zeta y el potencial de superficie, relación que depende de la cantidad de iones presentes en la solución. Así por ejemplo, en el caso del agua, la doble capa provoca que el potencial zeta tenga una aproximación aceptable del potencial de superficie.

Cabe recordar que la capa Stern, en el modelo de la doble capa, hace referencia a la atracción que sufre el coloide negativo de la solución, la cual inicialmente provoca que algunos iones positivos y moléculas adsorbidas se dispongan conformando una capa rígida, la cual se sitúa rodeando la superficie del coloide. Dicha capa rígida es lo que conocemos como capa Stern.

El modelo de doble capa se utiliza frecuentemente, para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se encuentra en las proximidades de un coloide cargado, además de para explicar el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas (Fig. 2.5).

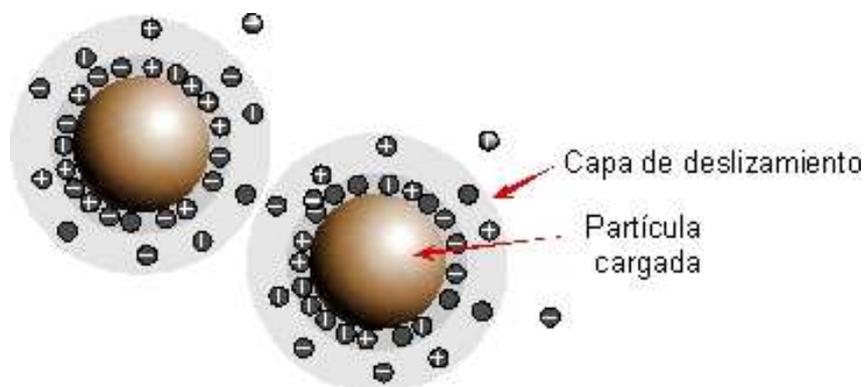


FIG. 2.5: MODELO DE LA DOBLE CAPA

Hay iones positivos que se encuentran atraídos por el coloide negativo, pero que a la vez son rechazados por la capa Stern, al mismo tiempo que otros iones con igual carga, intenta acercarse al nombrado coloide, hecho que crea un cierto equilibrio dinámico. Este equilibrio existe como resultado de la formación de una capa, conocida como difusa, de contra iones (iones que acompañan a los iones con la finalidad de mantener la neutralidad en sus cargas), los cuales tiene una presencia alta en la superficie, concentración que va disminuyendo a medida que se agranda la distancia, hasta conseguir de nuevo un equilibrio.

Existe una variación de los valores de potencial zeta en función del pH del medio dependiendo de la naturaleza de los grupos superficiales que aportan cargas a la superficie y valores dentro de los cuales una suspensión de partículas coloidales se considera estable. La Fig. 2.6 muestra esta dependencia para una partícula hipotética con un punto isoeléctrico cercano a 5.3.

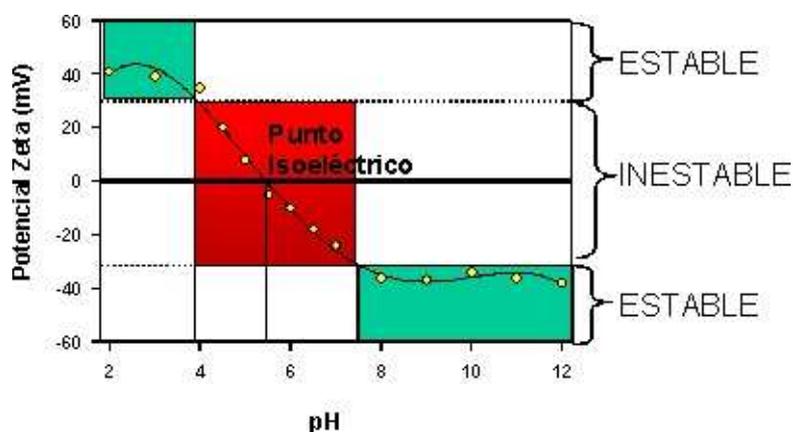


FIG. 2.6: VARIACIÓN DEL POTZ CON EL PH Y ZONAS DE ESTABILIDAD DE SUSPENSIONES COLOIDALES PARA UNA PARTÍCULA HIPOTÉTICA CON PUNTO ISOELÉCTRICO CERCANO A 5.3

Las medidas se realizaron en agua ultra pura con un equipo Nano Zetasizer (Malvern Instruments; UK) a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

3.12. Termogravimetría analítica

La termogravimetría (TGA) se define como la técnica mediante la cual se mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras ésta se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica.

El programa de temperatura puede ser el de mantener la temperatura constante (isotermo), calentamiento a velocidad constante (más habitual), enfriamiento o cualquier combinación de ellos. Lo habitual es que se produzca una pérdida de peso pero también es posible que haya una ganancia de peso. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado (también se emplean condiciones de presión reducida) y los gases más habituales son N_2 , aire, Ar y CO_2 .

Una característica fundamental de la técnica es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, etc. Esta técnica tiene una gran variedad de aplicaciones que entre otras cabe destacar las siguientes:

- Estudios de composición.

- Estudios de descomposición y estabilidad térmica.
- Determinación de pureza.
- Determinación del contenido de humedad, material volátil, cenizas y carbono fijo.
- Estudios cinéticos.

Las determinaciones se realizaron en presencia de O₂ usando un equipo Rigaku Serie Thermo Plus Evo, usando un programa de temperatura inicial de 30°C con una rampa de temperatura de 10°C/min hasta 900°C.

4. Ensayos y Protocolos Biológicos

4.1. Cultivo Celular

Las células de glioma de rata C6 (ATCC- CCL107) fueron mantenidas en cultivo en monocapa. El medio empleado fue DMEM (Invitrogen/GIBCO™) suplementado con 10% SFB (Toulbey/Bionos), 2,5 µg/mL Anfotericina B (Richet®), 100 µg/mL Estreptomina (Rontag S.A), 100 U/mL Penicilina (Richet®) y 2 mM Glutamina. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂- 95% aire y el medio de cultivo fue renovado 3 veces por semana. Para llevar a cabo los experimentos, las células C6 se tripsinizaron (tripsina 0,25%- EDTA 0,5 mM), se diluyeron en DMEM con 10% SFB y se re- plaquearon en cajas de 96 pocillos.

4.2. Sembrado de Células

Se utilizó una cámara de Neubauer (Strober 2001) para calcular el número de células en una muestra (Fig. 2.4). Este dispositivo consta de varios cuadrantes de dimensiones 1 x 1 mm. Cada cuadrante esta a su vez subdividido en 16 cuadrados lo cual facilita el conteo dentro del mismo. Cada cuadrante posee una altura de 0,1 mm de modo que el volumen del mismo queda definido en 0,1 mm³. Empleando un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100, Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón) se cuentan las células que se encuentran en los 4 cuadrantes (Fig. 6). El número total de células/mL se obtiene multiplicando el número medio de células contabilizado en los cuatro cuadrantes por 10⁴.

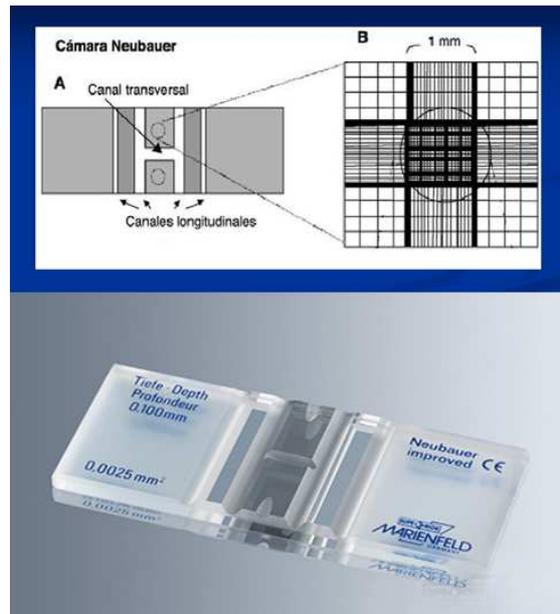


FIG. 2.4: CÁMARA DE NEUBAUER

4.3. Incubación de Nanopartículas con las Células

La toxicidad de las nanopartículas en las células se evaluó a distintos tiempos de incubación y concentraciones comparando con células control que no fueron incubadas con nanopartículas. Se procedió de la siguiente manera para realizar las incubaciones: Se parte de un cultivo de células C6 en monocapa, se lavan las células con PBS y se incuban 1 minuto en estufa a 37°C con tripsina al 0,025% para poder levantarlas. Luego se neutraliza la acción de la tripsina por agregado de medio completo y se centrifuga a 4.000 rpm 5 min. El pellet de células se resuspende en medio completo y se colocan 100 μ L de esa suspensión en la cámara de Neubauer para proceder a su conteo. Luego las células se siembran a una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos con medio de cultivo DMEM completo. Se mantienen en estufa a 37°C hasta que alcancen un 70-80% de confluencia, aproximadamente en 24 horas. Se retira el medio de cultivo y se hace un lavado con PBS. Se añade medio de cultivo completo con la concentración correspondiente de nanopartículas y se incuban en estufa a 37°C durante el tiempo correspondiente al experimento. Se procede con el ensayo de MTT o de NR.

4.4. Ensayo de MTT

Las sales de tetrazolio, como el MTT, poseen un anillo que es capaz de ser reducido por deshidrogenasas mitocondriales generando formazan, un producto azul oscuro y parcialmente insoluble. Dicha reacción tiene lugar en todas las células metabólicamente activas y es, por lo tanto, un indicador de viabilidad celular (Mosmann 1983). El ensayo se realizó según el

protocolo original descrito por Mosmann (1983) con leves modificaciones (Alaimo et al. 2011). Luego de los tratamientos, las células crecidas en placas de 96 pocillos se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 0,125 mg/ ml en medio de cultivo a 37°C. Una vez transcurridos 90 min, el medio se removió y el formazan se solubilizó en 200 µl de DMSO. La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de una referencia medida a 655nm. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680.

4.5 Ensayo de Rojo Neutro

Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de incorporar y retener el RN en los lisosomas (Repetto et al. 2008). La técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Repetto et al. (2008) con leves modificaciones. Un día antes del ensayo, una solución 40 µg/ml de RN en medio de cultivo sin suero se incubó overnight (ON) a 37°C. Luego, la solución se centrifugó durante 10 min a 2.600 rpm y se descartaron los cristales precipitados. Una vez finalizados los tratamientos, las células crecidas en placas de 96 pocillos se lavaron con PBS y se agregaron 200 µl de solución de RN por pocillo. Luego de 2 hs a 37°C, las células se lavaron con PBS y el RN se disolvió en 200 µl de una solución de alcohol ácido (Ácido acético 1% en etanol 50%). La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de una referencia medida a 690nm. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680.

4.6 Ensayo de determinación de ROS con DCH₂F-DA

Este ensayo utiliza la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCH₂F-DA). La DCH₂F-DA es un colorante no polar que es convertido por esterasas celulares en el derivado polar diclorodihidrofluoresceína (DCH₂F) que no es fluorescente pero que se convierte en el derivado diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente cuando se oxida por la presencia de ROS intracelulares y otros peróxidos (Aranda et al. 2013). La fluorescencia producida por la DCF se mide a 498 nm de excitación y se mide la emisión a 522 nm. Debe trabajarse con cuidado porque la sonda DHF-DA puede autooxidarse por acción la luz dando lugar a la formación de la sonda fluorescente DCF.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Las células se siembran en placas de wells y se mantienen en cultivo hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego, se retira el medio completo con rojo fenol y se lava con PBS. Los controles se completan con medio fresco y los tratados con medio a una concentración de 100 µg/ml de NPSiNH₂. Se deja incubando en estufa 6 hs, luego se lava con PBS y se repone el medio fresco (180 µl/well). Se irradia con 0, 2 y 3 Gy. Se coloca inmediatamente en la estufa y se deja 30 min.

Se saca de la estufa y se adicionan 20 μ l de medio con DHF-DA (15 μ M final) y 20 μ l de medio con DMSO a los controles. A partir de este punto es necesario trabajar en la mayor oscuridad posible.

Se deja en estufa 30 minutos. Se retira el medio y se pasa a placas negras de 96 pocillos. Estas placas de lectura se dejan envueltas en papel de aluminio. Se realiza un lavado con PBS y se pasa este lavado a la placa negra. Se agregan 70 μ l de solución hipotónica por well y se deja 1 h a 37°C (lisis). Se pasa el lisado a eppendorfs y se centrifuga 20 min a 12.000 rpm a 4°C (para bajar membranas). Se pasa el sobrenadante de cada muestra a la placa de lectura. Se mide a 485 nm de excitación y la emisión a 520 nm. Se relativizan las intensidades a la cantidad total de proteínas medida mediante Bradford (Bradford 1976).

4.7. Imágenes de microscopía de fluorescencia

Se sembraron células C6 cultivadas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro, previamente flameados y dispuestos en cajas de 24 pocillos. Las células se trataron durante 24 hs con suspensiones acuosas de 100 μ g/ml de las diferentes NP-Si. Luego del tratamiento, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA 4%/Sacarosa 4% (30 min, TA) y se lavaron 5 veces con PBS. Los cubreobjetos se montaron con PBS: Glicerol (1:1). Las muestras se analizaron en un microscopio confocal OlympusFluoview FV1000 modelo IX81 (Exc: 405 nm, Em: 430-470 nm), empleando un objetivo de inmersión Olympus 60X PLAPON (Apertura numérica: 1.42).

Por otro lado se obtuvieron imágenes con un microscopio de epifluorescencia, de larvas de zebrafish incubadas durante 24hs con una suspensión acuosa de NPSiNH₂ 100 μ g/ml. Para la obtención de estas imágenes se utilizó un microscopio OlimpusBX51 con filtros tipo #WB correspondientes a: espejo dicroico DM460, filtro de excitación BP350 y barrera de filtro BA400. *BP (band passfilter)*: filtros que dejan pasar una banda comprendida entre dos longitudes de onda, por ejemplo “BP460-580” significa que es opaco a longitudes de onda no comprendidas entre 460nm y 580nm.

4.8. Estudios de toxicidad en larvas de zebrafish.

La investigación toxicológica mediante el modelo de pez cebra se ha concentrado inicialmente en la ecotoxicología y la determinación de efectos tóxicos agudos. Sin embargo, el modelo ofrece muchas oportunidades más allá de la evaluación de la toxicidad aguda, en particular para la elucidación de los mecanismos de los efectos tóxicos (Scholz et al. 2008) y para la detección o la predicción de la toxicidad humana y la teratología (Chakraborty et al. 2009; Eimon y Rubinstein 2009). Dado que la evaluación de la toxicología es esencial para el

desarrollo y el registro de los medicamentos y productos químicos, el modelo de embrión de pez cebra presenta un alto potencial para la investigación aplicada.

Este ensayo se realizó para determinar la DL50 de la NPSiNH₂ y comparar los efectos en la actividad de nado, letalidad y cambios morfológicos a dicha concentración, y a bajas dosis, con la NPSi-Fol y NPSiNH-PEG. Se utilizaron embriones de la cepa silvestre *Danio rerio* (zebrafish). Los embriones fueron criados en un acuario de la Universidad Nacional de Quilmes y obtenidos por el método de puesta sincronizada en canasta. El ciclo de luz-oscuridad fue de 14-10 hs y la temperatura de 28,5° C. Las muestras se prepararon en medio salino E3, pH 6-7.

PROTOCOLO DE ACTIVIDAD DE NADO:

Embriones no eclosionados (48 horas pos-fecundación o hpf) se pasan a una placa de 96 pocillos (3 embriones por pocillo) conteniendo 225 µl de medio salino E3 y se almacenan en estufa a 28,5° C hasta su eclosión. A los 4 días pos-fecundación (dpf) (96 hpf) se agrega a cada pocillo 25 µl de una dilución de la solución madre de la droga cuya concentración sea 10 veces superior a la utilizada en el ensayo. En total son 24 larvas, agrupadas de a 3 larvas por pocillo, en 1 fila (8 pocillos) de una placa de 96 pocillos por concentración del compuesto, por lo que se considera un n=8. En la mañana de la exposición, luego de 4 horas de incubación con las NP-Si, se realiza la primera medida. Luego se mide a los días 5, 6 y 7 dpf. Las placas se almacenan a 28,5° C. Se realizaron mediciones automatizadas de actividad locomotora mediante el dispositivo de detección por haces infrarrojos wMicroTracker. Los resultados se relativizaron con respecto al promedio del control considerando la actividad de nado del control igual a 1. Los datos crudos se analizaron estadísticamente por Análisis Anova, PostTest Dunnett (comparando cada una de las concentraciones y drogas testeadas con el control sin droga; o bien Análisis Anova, PostTest Tukey's (compara cada una de las concentraciones testeadas con el control sin droga y entre las drogas).

El mismo protocolo se utilizó para la determinación de la dosis letal 50 (DL50), que corresponde a la disminución de la actividad de nado al 50% en comparación con el control.

Bibliografía

- Alaimo A, Gorojod RM, Kotler ML (2011) The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem Int* 59:297–308. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.001
- Allain C, Poon L (1974) Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin Chem* 20:470–475.
- Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, et al (2013) Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol Vitr* 27:954–963. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.016
- Bourdelande JL, Nonell S, Verhoeven JW (1999) Glosario de términos usados en fotoquímica.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Carlos L (2009) Estudio de la eficiencia de degradación de contaminantes empleando tecnologías de oxidación avanzada: Procesos Fenton y foto-Fenton. Universidad Nacional de La Plata
- Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, et al (2009) Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab* 10:116–124. doi: 10.2174/138920009787522197
- Eckhoff DA, Sutin JDB, Clegg RM, et al (2005) Optical characterization of ultrasmall Si nanoparticles prepared through electrochemical dispersion of bulk Si. *J Phys Chem B* 109:19786–19797. doi: 10.1021/jp052214e
- Eimon PM, Rubinstein AL (2009) The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:393–401. doi: 10.1517/17425250902882128
- Garc AA, Miskoski S, García N a (1993) Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated ($O_2[1.\delta.g]$) photooxidation of histidine and methionine dipeptides. A kinetic study. *Photochem Photobiol* 57:447–452.
- Gonzalez M (1989) Photochemistry of aqueous solutions of triphenyltetrazolium chloride. *J Phys Chem* 93:3536–3540.
- Hideg É (2008) A comparative study of fluorescent singlet oxygen probes in plant leaves. *Cent Eur J Biol* 3:273–284. doi: 10.2478/s11535-008-0018-5
- Jiang J, Oberdörster G, Biswas P (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanoparticle Res* 11:77–89. doi: 10.1007/s11051-008-9446-4
- Kim S, Fujitsuka M, Majima T (2013) Photochemistry of singlet oxygen sensor green. *J Phys*

Chem B 117:13985–13992. doi: 10.1021/jp406638g

Koppel DE (1972) Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J Chem Phys* 57:4814. doi: 10.1063/1.1678153

Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Publishers

Lakowicz JR, Lakowicz JR, Gryczynski I, et al (1999) Luminescence Spectral Properties of CdS Nanoparticles. *J Phys Chem B* 103:7613–7620. doi: 10.1021/jp991469n

Landes CF, Link S, Mohamed MB, et al (2002) Some properties of spherical and rod-shaped semiconductor and metal nanocrystals. *Pure Appl Chem* 74:1675–1692. doi: 10.1351/pac200274091675

Martire DO., Evans C, Bertolotti SG., et al (1993) SINGLET MOLECULAR OXYGEN [O₂ (1Ag)] PRODUCTION AND QUENCHING BY HYDROXYBIPHENYLS. *Chemosphere* 26:1691–1701.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

Ragàs X, Jiménez-Banzo A, Sánchez-García D, et al (2009) Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green®. *Chem Commun* 2920. doi: 10.1039/b822776d

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–31. doi: 10.1038/nprot.2008.75

Scholz S, Fischer S, Gündel U, et al (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res* 15:394–404. doi: 10.1007/s11356-008-0018-z

Schwarzenbach RP (2002) Environmental organic chemistry. John Wiley & Sons: Hoboken

Strober W (2001) Monitoring cell growth. *Curr Protoc Immunol Appendix 3:Appendix 3A*. doi: 10.1002/0471142735.ima03as21

Tanaka K, Miura T, Umezawa N, et al (2001) Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J Am Chem Soc* 123:2530–2536. doi: 10.1021/ja0035708

Timasheff SN (1966) TURBIDITY AS A CRITERION OF COAGULATION In the study of aggregating or coagulating macromolecular systems , the $I = K' N r^2 (r / X) \sim = K I' I (\sim) V \sim = X V_0$;

Valeur B (2002) Molecular Fluorescence. Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Wilkinson F, Worrall DR, Williams SL (1995) Primary Photochemical Processes of Anthracene Adsorbed on Silica-Gel. *J Phys Chem* 99:6689–6696. doi: 10.1021/j100017a061

Capítulo 3

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y MODIFICACIÓN SUPERFICIAL

Introducción

Existen varias metodologías de síntesis de nanopartículas de silicio descritas en la bibliografía. En forma general, el proceso de síntesis de las nanopartículas de silicio puede abordarse por dos estrategias diferentes, por un lado se encuentran los métodos que parten de una molécula precursora a partir de la cual se produce el crecimiento de las nanopartículas (bottom-up) y por el otro lado, una metodología inversa en la cual las nanopartículas se forman por reducción de tamaño de un determinado material (top-down). La elección del método de síntesis da lugar a la obtención de nanopartículas con diferente morfología y química superficial y por lo tanto con distintas propiedades finales. Algunas de las estrategias de síntesis que figuran en la bibliografía incluyen: la reducción química de silanos (Zou et al. 2006), la ablación del cristal de silicio por láser pulsado (Patrone et al. 2000), la descomposición asistida por plasma (Kortshagen et al. 2007), la oxidación electroquímica mediada por HF de obleas de Si (Carter et al. 2005), calentamiento de polvos de SiO_x a altas temperaturas seguido por tratamiento con HF (Liu et al. 2006) y a partir de la oxidación de siliciuros metálicos (Pettigrew y Liu 2003).

Las nanopartículas utilizadas en este trabajo se sintetizaron principalmente por un método tipo bottom-up que es una adaptación del método de reducción del precursor SiCl_4 con AlLiH_4 (Rosso-Vasic et al. 2008) en un sistema de micelas invertidas usando tolueno como solvente y TOAB como surfactante. Adicionalmente, con fines comparativos, se incluyó un segundo método de síntesis, también bottom-up, que consiste en la oxidación del precursor de silicio Mg_2Si con un haluro de amonio (Manhat et al. 2011).

1. Síntesis por reducción de SiCl_4

Desde hace muchos años se sabe que la reducción de SiCl_4 por LiAlH_4 produce silano pirofórico (Finholt et al. 1947) que puede ser empleado como un precursor principal para la síntesis de nanopartículas de silicio. La nucleación y el crecimiento de los nanoclusters se puede realizar en agregados nanométricos de tensioactivos (micelas inversas). En este enfoque, un compuesto anhidro (por ej. SiX_4 ; X = Cl, Br o I) se disuelve en el interior hidrófilo de una suspensión de micelas invertidas y la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas de silicio están restringidos al interior de las micelas. El control de tamaño del clúster puede lograrse mediante la variación del tamaño de las micelas, la interacción intermicellar y por reacción química (Wilcoxon et al. 1999). La reacción se realiza bajo atmósfera inerte para evitar la oxidación de las nanopartículas de silicio. Tal como se obtienen estas NPSi, sus

terminaciones corresponden a uniones Si-H, pero también existen evidencias de la presencia de uniones Si-Cl.

1.1. Optimización de la cantidad de surfactante

El método de síntesis empleado es una adaptación del publicado en bibliografía. El principal defecto de este método radica en la incompleta eliminación del exceso de surfactante que se usa durante la síntesis. Para mejorar este aspecto y obtener un producto más puro se buscó la determinación experimental del valor de la concentración micelar crítica (CMC) para el sistema TOAB/tolueno, dato que no se encontró publicado. Para encontrar este valor se usó un tensiómetro de Du Nouy, que permite determinar la tensión superficial de un líquido a través de la fuerza requerida para retirar un anillo de platino – iridio de la superficie del líquido (Fig. 3.1).



FIG. 3.1: TENSÍOMETRO DE DU NOUY

Se sabe que el valor de la tensión superficial de un líquido disminuye por agregado de cantidades crecientes de un surfactante, hasta un cierto punto en el cual el surfactante forma micelas (CMC), llegado a este punto la tensión superficial varía poco o se mantiene invariante frente a mayores agregados de surfactante al sistema. Se dispuso entonces de una serie de suspensiones de TOAB en tolueno abarcando un rango de concentraciones entre 0,2 mM y 10 mM y se

determinó el valor de la tensión superficial. Los datos de Tensión superficial (en unidades arbitrarias) vs Concentración se muestran en la Fig 3.2 y permiten determinar el valor de la CMC.

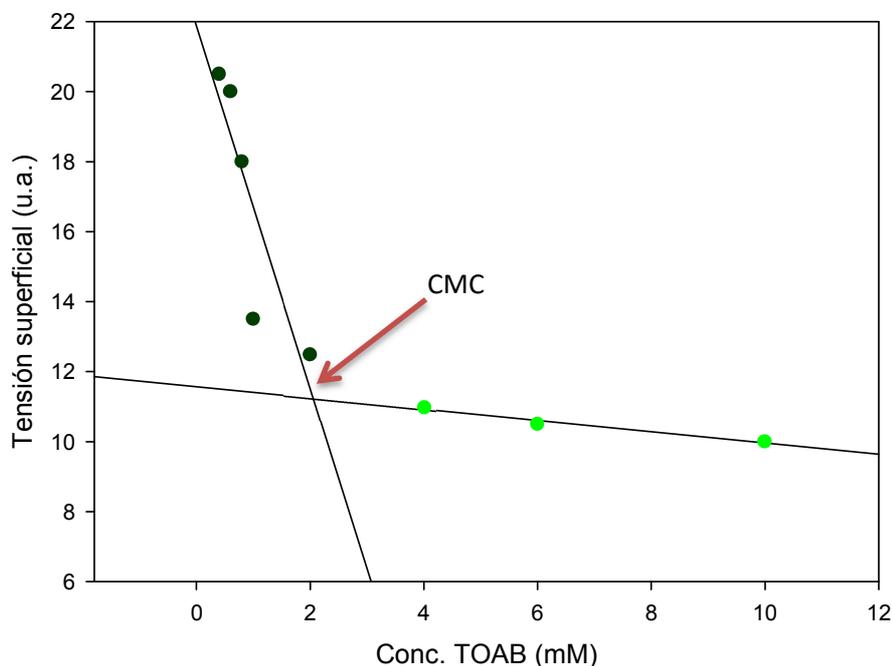


FIG. 3.2: GRÁFICO DE TENSIÓN SUPERFICIAL VS CONC. PARA EL SISTEMA TOAB/TOLUENO

En el gráfico se observa que los valores de tensión superficial disminuyen marcadamente para las concentraciones entre 0,4 mM y 2 mM y a partir de este valor, mayores agregados de surfactante producen cambios leves en el valor de la tensión superficial. A partir del punto de intersección que surge al ajustar los puntos que muestran este comportamiento, puede calcularse el valor de la CMC para el sistema TOAB/Tolueno, este valor es igual a 2,03 mM y coincide con el reportado para otros surfactantes de similar naturaleza. Este resultado nos permitió reducir 10 veces la cantidad de surfactante usado durante la síntesis, mejorando de esta manera el paso de purificación del producto y produciendo además un significativo ahorro de reactivo.

1.2. Descripción de la síntesis

En el balón de reacción se colocan 16.50 ml de tolueno seco y 0.63 g de TOAB. Esta dispersión se sonicada durante 20 minutos para dar lugar a la formación de micelas bajo atmósfera inerte de Argón, que se logra por burbujeo constante de la mezcla durante toda la síntesis. Luego del tiempo requerido, se colocan 0,63 ml de SiCl_4 mediante inyección. Se continúa con la sonicación durante 20 minutos más. Una vez pasado el tiempo se agregan 0,40 g de AlLiH_4 resuspendidos en

2 o 3 ml de tolueno seco y se agita por 30 minutos. Finalmente se agregan a la mezcla 30.0 ml de MetOH, para desactivar el exceso de reductor. Este agregado se hace lentamente para evitar una ebullición brusca de la mezcla de reacción. Se mantiene la sonicación de la mezcla durante 30 minutos más.

1.3. Aislamiento y purificación

Una vez agregado el MetOH y agitado durante 30 minutos, se evapora la mezcla de solventes en un rota vapor. Luego se redisuelve el resto sólido en 30.00 ml de ciclohexano para precipitar el surfactante y se deja toda la noche para que se separen claramente las fases. Al día siguiente se filtra la suspensión utilizando un sistema de vacío y filtros de nylon de 0,22 μm . Finalmente se evapora el solvente del filtrado obtenido y se disuelve en 30 ml tolueno seco.

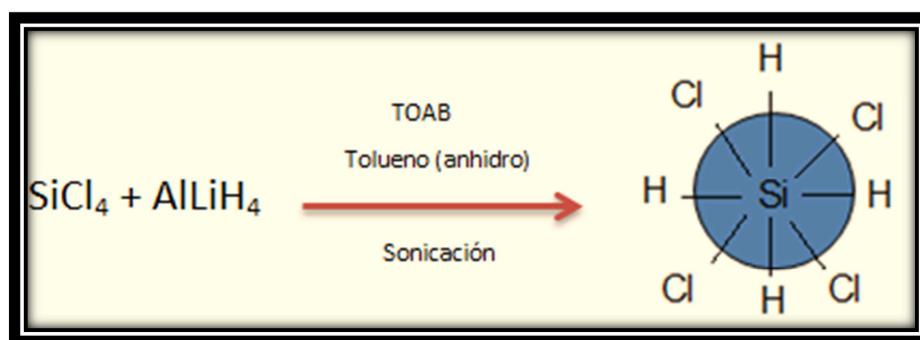


FIG. 3.3: ESQUEMA GENERAL DE LA SÍNTESIS DE LAS NPSi A PARTIR DEL PRECURSOR SiCl_4

1.4. Estimación del rendimiento de la síntesis

Finalizado el proceso de aislamiento y purificación se trató de estimar el rendimiento de la síntesis. Para ello fracciones de volumen conocido de diferentes procesos de síntesis se evaporaron a presión reducida hasta sequedad y se pesó el residuo seco obtenido. El proceso de síntesis parte de 0,63 ml del precursor SiCl_4 ($\delta = 1,48 \text{ g/ml}$, $\text{PM} = 169,9 \text{ g/mol}$) que equivalen a 0,93 g de SiCl_4 dentro de los cuales 0,154 g corresponden al Si. Suponiendo un 100% de rendimiento y que las nanopartículas están formadas solamente por átomos de Si, se esperarían obtener 154 mg de nanopartículas de silicio por cada proceso de síntesis. El valor promedio de residuo seco obtenido por pesada en diferentes procesos de síntesis, arrojó un valor de 30 mg de nanopartículas, es decir que el rendimiento del proceso de síntesis es de alrededor de un 20%. Dado que el producto final del proceso de síntesis se resuspende en 30 ml de tolueno seco, la suspensión final de nanopartículas tiene una concentración aproximada de 1 mg/ml. Cabe aclarar que este resultado corresponde a un valor máximo posible, dado que

se sabe que parte del surfactante no se logra eliminar correctamente durante el paso de aislamiento y queda adsorbido en la superficie de estas nanopartículas.

1.5. Modificación superficial

Las nanopartículas de silicio (NPSi) obtenidas en tolueno presentan una superficie química muy activa que puede modificarse fácilmente con diferentes grupos superficiales. Como las NPSi que se obtienen por este método son muy reactivas y poco solubles en agua, resulta necesario cubrir las con grupos superficiales adecuados con el fin de obtener un producto hidrosoluble y estabilizar la superficie que puede oxidarse con facilidad cuando no se encuentra recubierta.

Por otro lado para poder conjugar las nanopartículas con otras moléculas orgánicas y biomoléculas, es necesario unir covalentemente grupos funcionales a la superficie de la partícula que permitan plantear la sucesiva formación de uniones químicas estables con otras moléculas.

Para cumplir con este doble objetivo se recurrió a la modificación superficial de las NPSi desnudas con diferentes alilderivados (Llansola Portolés et al. 2009) obteniendo así suspensiones de NPSi con distintos grupos superficiales y que forman suspensiones estables en solución acuosa. Un esquema de la derivatización utilizada se muestra en la Fig. 3.4.

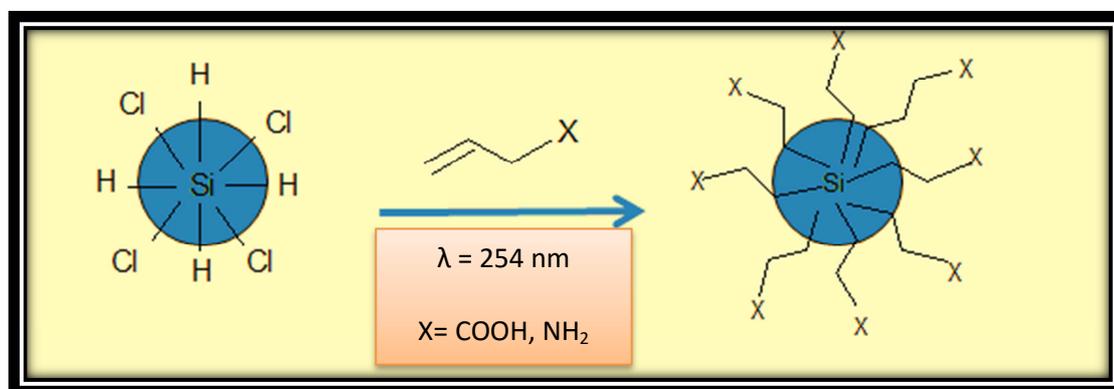


FIG. 3.4: ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN DE LAS NPSi

Procedimiento:

Para ajustar la relación estequiometría de los reactivos es necesario estimar el número de silicios superficiales que pueden soportar uniones covalentes con otras moléculas. A partir del tamaño medio obtenido de las medidas de TEM ($1,6 \pm 0,6 \text{ nm}$) y a partir de la Ec. 3.3 (Ver sección 3.4) se puede estimar el número de átomos de Si superficiales por partícula en 61-62. Considerando el número de Avogadro y la masa molecular relativa media de las NPSi ($PM_{\text{NPSi}} = 3010 \text{ g/mol}$) se

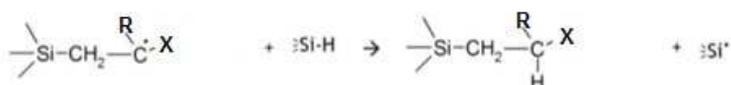
calculan aproximadamente $2,05 \times 10^{-3}$ moles de terminaciones por gramo de nanopartículas. Tomando en consideración este valor se calculó la cantidad mínima necesaria de reactivo a agregar en el proceso de modificación superficial de forma que exista una relación 1:1 entre el alilderivado correspondiente y los átomos de silicio superficiales, minimizando así la posibilidad de que se formen polímeros por reacción entre los alilderivados.

Se toma un volumen de NPSi sintetizadas y resuspendidas en tolueno y se agrega un volumen adecuado del alilderivado correspondiente (aproximadamente 10 μ l de alilamina o ácido acrílico) por cada 30 ml de suspensión de NPSi (30 mg de NPSi, equivalente a un proceso de síntesis). Se pone a burbujear la mezcla de reacción en Ar durante 5 minutos para eliminar el O₂ disuelto y luego se lleva a un tubo de cuarzo adaptado para su utilización en un fotorreactor tipo Rayonet equipado con 8 lámparas con emisión a 254 nm durante 3 hs. El mecanismo de esta reacción es radicalario y se esquematiza a continuación.

Etapa de iniciación



Etapas de Propagación



Etapa de Terminación

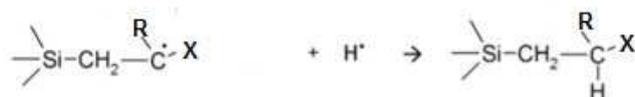


FIG. 3.4: MECANISMO DE REACCIÓN INVOLUCRADO EN EL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN SUPERFICIAL DE LAS NPSi: Donde R = H y X = NH₂ para la derivatización con alilamina, y R = CH₃ y X = COOH para la derivatización con ácido acrílico.

Finalizada la reacción se evapora el solvente en un rota vapor y el residuo que queda en el balón se resuspende en un volumen similar de agua destilada. Si quedara algún resto insoluble, este se puede eliminar por filtración. La suspensión acuosa resultante se purifica por diálisis (membrana Spectra/Por® MWCO: 3.5 kD) contra agua destilada durante 3 hs realizando dos cambios de agua durante el proceso, manteniendo una relación 1 a 100 entre el volumen a dializar y el agua de lavado.

Para determinar el rendimiento de la síntesis se procedió al secado y posterior pesada en balanza analítica hasta constancia en el peso seco (precisión 0,1 mg) de las nanopartículas purificadas.

1.6. Conjugación con ácido fólico

La conjugación de nanosistemas con ácido fólico es una estrategia comúnmente usada para dirigir selectivamente estos sistemas hacia células tumorales (Stella et al. 2000) en las cuales existe una sobreexpresión de receptores de membrana para el folato (Wang y Low 1998).

La molécula de ácido fólico, también conocida como vitamina B9 es una molécula orgánica que cuenta con grupos $-COOH$ ubicados en una cadena lateral alifática y grupos $-NH_2$ unidos al centro aromático. Ambos grupos pueden utilizarse para la conjugación química de la molécula de ácido fólico a diferentes nanosistemas mediante la formación de uniones amida estables (Ali et al. 2010; Chen et al. 2011).

Procedimiento:

La estrategia utilizada en este trabajo para lograr la unión del ácido fólico a las NPSi, fue la formación de uniones amida entre los grupos $-COOH$ del ácido fólico y los grupos $-NH_2$ superficiales que resultan de la derivatización de las NPSi (tal como se obtienen luego de su síntesis) con alilamina.

La técnica usada es una adaptación de la publicada en bibliografía (Aronov et al. 2003). El primer paso de este procedimiento es la activación de los grupos $-COOH$ del ácido fólico, para ello se pesaron 10 mg (0,022 mmoles) de ácido fólico, con 3,3 mg (0,016 mmoles) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 2,5 mg (0,022 mmoles) de N-hidroxisuccinimida (NHS) y se disolvieron en 3 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta mezcla se deja reaccionando 12 hs en ausencia de luz para evitar la degradación fotoquímica del ácido fólico. Transcurrido este tiempo se agrega un volumen de 10 ml de suspensión de $NPSiNH_2$ sobre la mezcla, la que se deja nuevamente en agitación al abrigo de la luz durante 12 hs. Finalizado el tiempo de reacción, se

observa la formación de un sólido blanquecino insoluble correspondiente a la formación del producto secundario dicitohexilurea (DCU) que se separa fácilmente por filtración. Una vez eliminado el sólido la mezcla se dializa durante 3 hs frente a agua destilada para eliminar el exceso de reactivos que quedaron sin reaccionar y el resto de los subproductos de la reacción.

1.7. PEGilación

Se define como PEGilación a la modificación de una proteína, péptido, molécula no peptídica o nanosistema por la unión de una o más cadenas de polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero no tóxico, no inmunogénico, no antigénico, altamente soluble en agua y su uso está aprobado por la FDA (Food and Drugs Administration). Los conjugados PEG-drogas tienen varias ventajas: una residencia prolongada en el cuerpo, una disminución de la degradación por las enzimas metabólicas y una reducción o eliminación de inmunogenicidad (Veronese y Pasut 2005).

El recubrimiento mediante uniones covalentes con nuevos polímeros de polietilenglicol (PEG) se ha usado ampliamente para la funcionalización de los más diversos nanomateriales, confiriéndoles mayor estabilidad en el suero sanguíneo y afinidad por el agua (Otsuka et al. 2003). La capacidad de los nanomateriales para moverse por el cuerpo puede depender de su reactividad química, características de la superficie y capacidad para unirse a proteínas. La PEGilación de agentes terapéuticos permite que éstos no sean reconocidos por el sistema inmune prolongando el tiempo de circulación sanguínea y facilitando su eliminación renal. Estas últimas propiedades son muy deseables en aplicaciones *in vivo* de nanomateriales para la administración de fármacos y en marcadores para imágenes.

Para lograr obtener NPSi modificadas superficialmente con polietilenglicol (PEG) se probaron diversas estrategias:

- Tratamiento térmico: mediante calentamiento a reflujo de una suspensión de NPSi en tolueno y el agregado de PEG en diferentes concentraciones.
- A través de la formación de un derivado silanizado del PEG: sobre una solución al 1% de PEG en 80 ml de tolueno anhidro se agregan 80 ml de trietanolamina. Los reactivos se mezclan a 25°C y se deja agitando por 1 h. Luego se agregan sobre esta solución 20 µl de SiCl₄ y se deja en agitación 15 minutos más. En este paso se forma un derivado PEGSiOCl₃. Finalmente sobre este producto se agregan 3 ml de NPSi en tolueno y se deja agitando por 12 hs. Finalmente sobre la mezcla orgánica se hacen

extracciones con agua para llevarse a la fase acuosa la porción hidrosoluble de las NPSi pegiladas.

- A través un derivado PEG-COOH: para ese propósito, un derivado PEG-Carboxilo (PEG-COOH) se sintetizó poniendo a reflujo una solución de PEG14 (6,6 g) y anhídrido succínico (4,4 g) en 50 ml de tetrahidrofurano (THF) seco (Li and Kao 2003). Después de 12 h de reflujo, la mezcla se trató con éter frío para precipitar PEG sin reaccionar y sus derivados monocarboxilados y dicarboxilados. El precipitado se disolvió en THF que contiene NHS y DCC (4,6 y 5,2 mg respectivamente por cada 0,04 mmol del derivado PEG-COOH) y se agitó durante 12 h. La solución resultante se añadió a una suspensión acuosa de NPSiNH₂ y se agitó vigorosamente durante 12 h. Se elimina por filtración el sólido correspondiente a la diciclohexilurea (DCU). Los reactivos en exceso se eliminan por diálisis contra agua destilada durante 3 hs.

De las tres estrategias descritas, sólo la última de ellas permitió lograr una suspensión hidrosoluble de NPSi, evidenciada por matrices de excitación – emisión en agua características, por lo cual se decidió seguir con esa metodología para realizar el proceso de PEGilación.

En la figura 3.5 se resumen la modificación superficial con ácido fólico y con PEG.

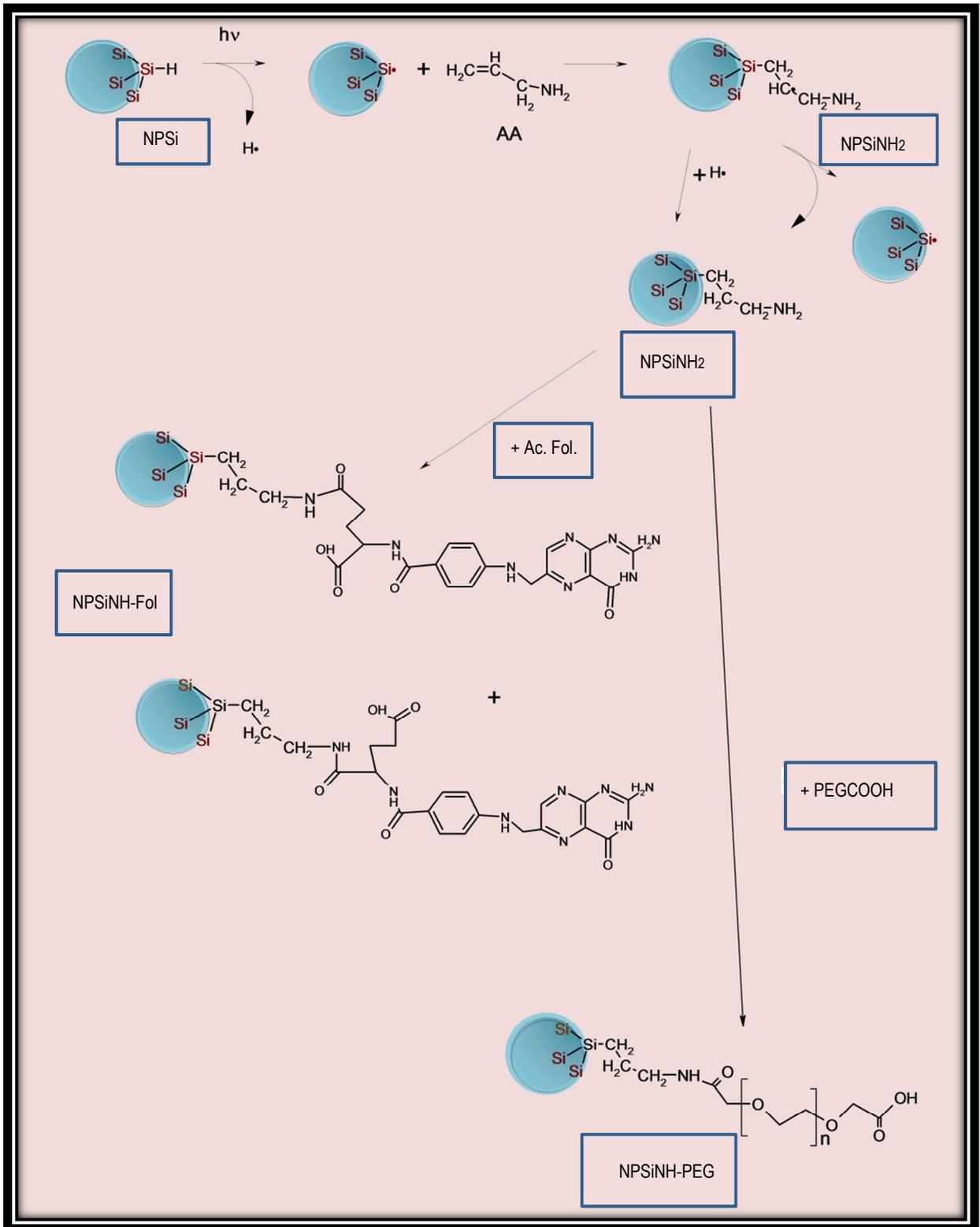


FIG. 3.5: MODIFICACIÓN SUPERFICIAL, PEGILACIÓN Y CONJUGACIÓN CON ÁCIDO FÓLICO DE LAS NPSI.

2. Síntesis por oxidación del precursor Mg_2Si

Este segundo método de síntesis consiste en la oxidación del precursor Mg_2Si por un haluro de alquilo utilizando al PEG como medio de reacción en presencia de calor y en una atmósfera libre de O_2 . La oxidación del siliciuro de magnesio permite obtener nanopartículas de silicio unidas covalentemente a moléculas de PEG (NPSi'PEG). El uso de PEG como disolvente en este método de síntesis favorece la formación de enlaces estables Si-C en lugar de uniones Si-H superficiales de alta reactividad. Además, no puede descartarse la formación de enlaces Si-O-C. El esquema general del proceso de síntesis es el que se detalla a continuación:

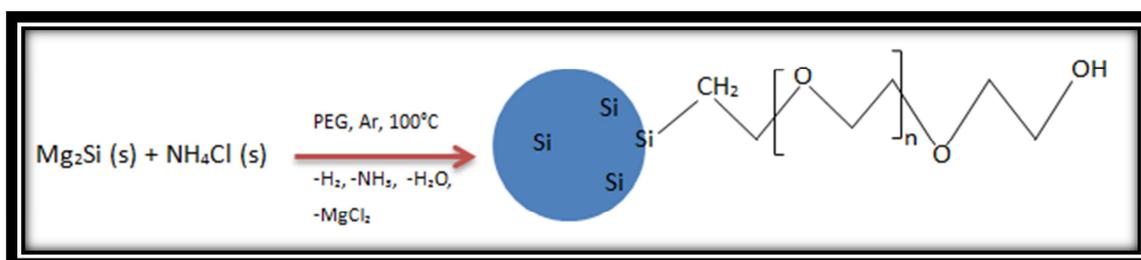


FIG. 3.6: SÍNTESIS DE NPSI'PEG A PARTIR DEL PRECURSOR Mg_2Si

Esta estrategia cuenta con algunas ventajas sobre el método de las micelas invertidas. En primer lugar se reduce el número de reactivos involucrados lo que hace más sencillo el paso de purificación. Además los productos secundarios de la reacción son sales que pueden eliminarse fácilmente por diálisis y las nanopartículas obtenidas se pueden aislar del exceso de reactivo por filtración. En el caso particular de este trabajo, este método de síntesis se incorporó para obtener un método de síntesis con mayor rendimiento de nanopartículas de silicio pegiladas (NPSi'PEG).

Procedimiento:

En el balón de reacción se colocan 10,00 ml de PEG y se lo calienta a 100 °C bajo agitación con burbujeo de Ar durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregan 100 mg del precursor Mg_2Si y se continúa con la agitación por 30 min. Por último, se agregan 184,6 mg de NH_4Cl y se deja reaccionando durante 20 hs.

Una vez cumplido el tiempo de reacción, la solución toma un color verdoso. La suspensión obtenida se deja enfriar y se filtra en vacío para eliminar el exceso de reactivo sin reaccionar. Se obtiene una suspensión de color ámbar. Finalmente se agrega un volumen igual de agua destilada y se dializa durante 3 hs frente a agua miliQ para obtener una suspensión purificada de NPSi'PEG.

3. Determinación de tamaños

3.1 Micrografías TEM

Los tamaños de las nanopartículas se midieron mediante el uso de un microscopio de transmisión electrónica. Se realizaron varias micrografías TEM para luego poder realizar un análisis estadístico utilizando el software ImageJ. En la Figuras 3.7 y 3.8 se muestran algunas micrografías representativas de las analizadas con distintos aumentos.

Distribución de tamaños por HR-TEM de las NPSi

Mediante esta técnica se pudo obtener la distribución del diámetro de Feret (D_F) para las NPSi sintetizadas por el método de las micelas invertidas, cuyo valor medio resultó ser de $D_F = 1,6 \pm 0,6$ nm, tamaño que coincide dentro del error experimental con el obtenido para las NPSiNH₂ por anisotropía. Debido al poco contraste de las imágenes obtenidas, la determinación de tamaños se realizó de forma individual, sólo se midieron los D_F de un pequeño número de partículas (menos de 100 partículas) que se consideraron representativas sobre el total, por lo cual no fue posible ajustar estos resultados a una distribución gaussiana.

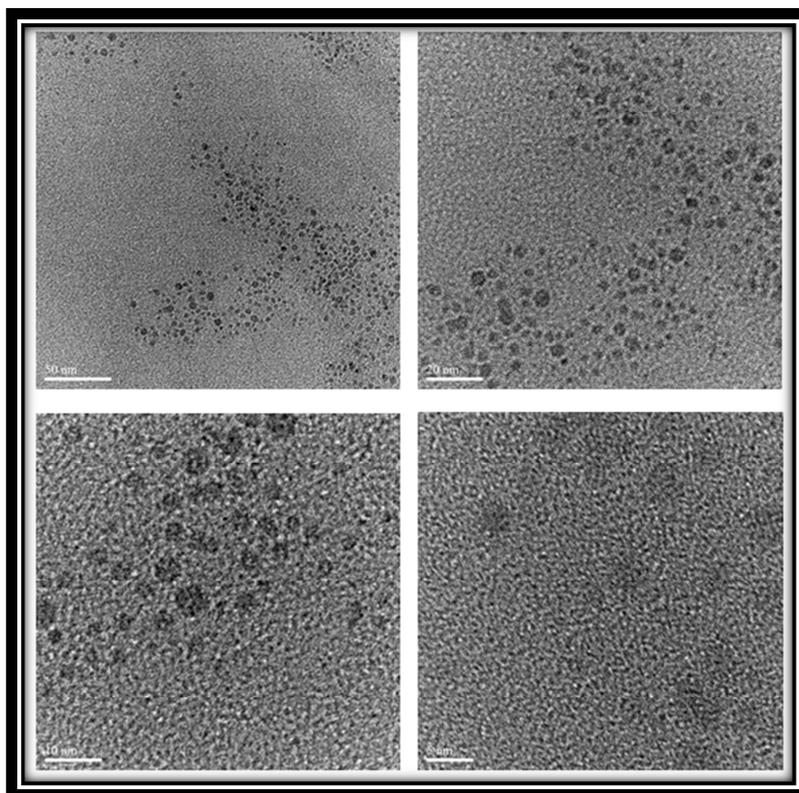


FIG. 3.7: MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR TEM PARA LAS NPSi SIN DERIVATIZAR.

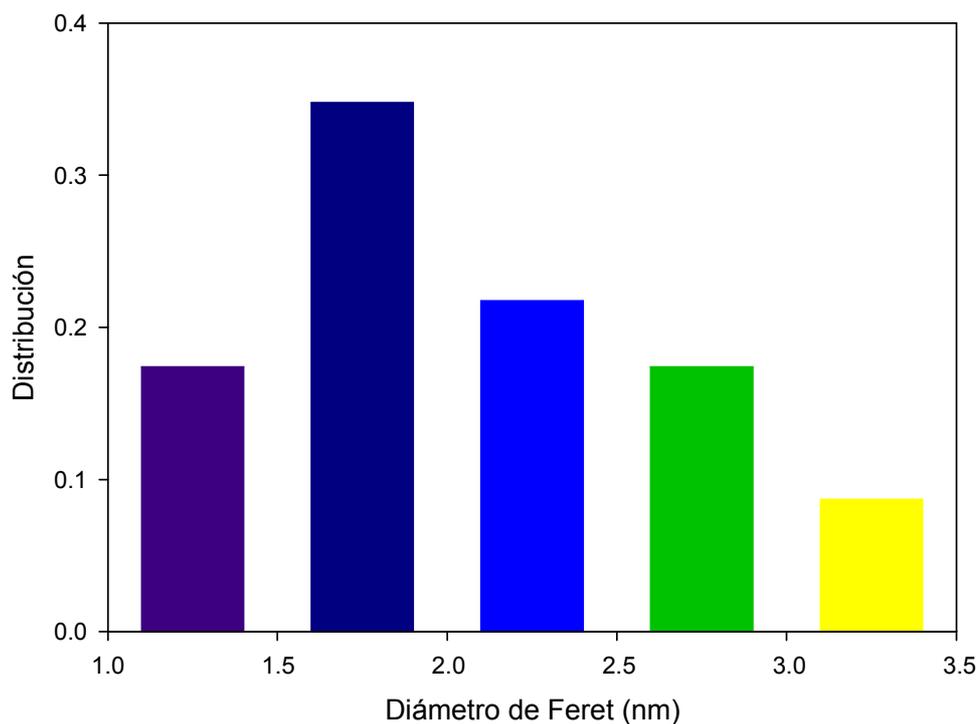


FIG. 3.8: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR TEM PARA LAS NPSi.

Debido a la pequeña masa atómica de Si y la presencia de una capa orgánica adsorbida en la superficie de las nanopartículas (surfactante), el contraste de las nanopartículas sobre el fondo no es bueno, lo que dificulta la visualización de los planos cristalinos para determinar si las partículas son cristalinas o amorfas. Para mejorar este contraste, las nanopartículas fueron sometidas a ablación láser con la finalidad de eliminar el material orgánico que las recubre. Luego de este procedimiento, se observa la formación de nanopartículas de silicio de tamaños mayores a los 20 nm que corresponden a aglomerados de nanopartículas (Llansola Portolés et al. 2012). En base a estas evidencias, no es posible asegurar o descartar el carácter cristalino de las nanopartículas obtenidas por esta metodología.

Distribución de tamaños por TEM de las NPSi'PEG

De manera similar, se obtuvo la distribución de diámetros de Feret para las NPSi'PEG a partir de las micrografías obtenidas por TEM. Del ajuste a una distribución normal de los diámetros de Feret medidos para 450 partículas individuales, se obtuvo un valor medio $D_F = 3,30 \pm 0,5$ nm.

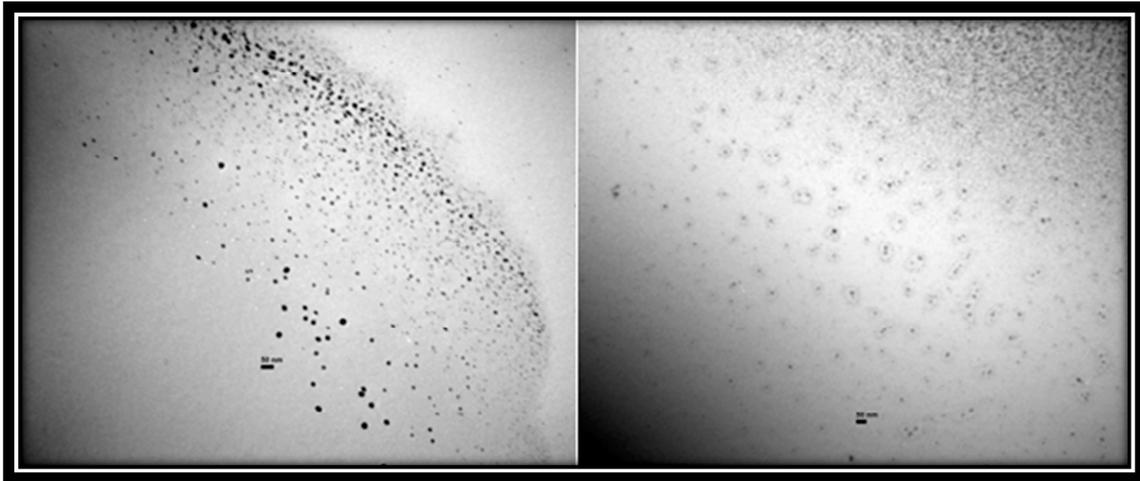


FIG. 3.9: MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR TEM PARA LAS NPSi'PEG

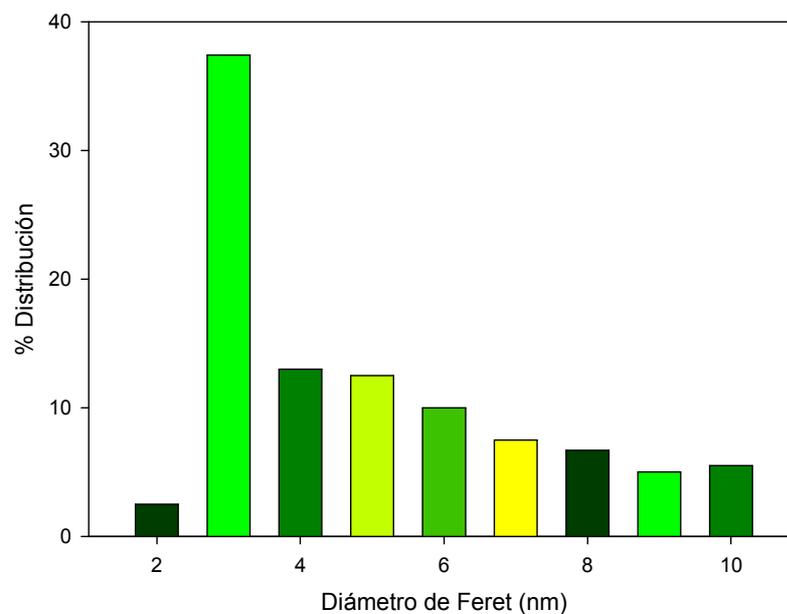


FIG. 3.10: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR TEM PARA LAS NPSi'PEG.

Dado que no se observaron planos cristalinos en las imágenes HR-TEM de las NPSi'PEG que permitiesen afirmar la presencia de estructuras cristalinas, estas nanopartículas se asumieron amorfas.

3.2 DLS

La técnica de dispersión dinámica de la luz se utilizó para determinar el diámetro hidrodinámico (D_H) para las distintas nanopartículas de silicio en suspensiones acuosas a pH 7,4 y fuerza iónica

0,01 M. Los resultados obtenidos para las diferentes nanopartículas sintetizadas se muestran en la tabla 3.1.

TABLA 3.1: VALORES DE D_H OBTENIDOS POR DLS PARA LAS DISTINTAS NANOPARTÍCULAS DE SILICIO

NPSi	Tamaño (nm)	% Vol
NPSiNH ₂	230 ± 40	100
NPSiNH-Fol	210 ± 60	26,5
	40 ± 9	72,8
	6000 ± 600	0,8
NPSiNH-PEG	2000 ± 500	33,5
	5000 ± 700	53,8
	140 ± 30	12,7
NPSi'PEG	1,5 ± 0,2	100

A partir de la comparación de los resultados de D_H obtenidos por esta técnica para las NPSiNH₂, NPSiNH-Fol y NPSiNH-PEG y los obtenidos por TEM para estas mismas nanopartículas sin recubrir, se puede concluir que estas nanopartículas forman aglomerados en suspensión acuosa. Por otro lado, los valores arrojados por DLS no corresponden a los valores reales de D_H , sino que muestran el tamaño de aglomerados de nanopartículas. Para obtener el valor real de D_H para una partícula se recurrirá a su determinación a partir de medidas de anisotropía.

La determinación de D_H obtenido por DLS para las NPSi'PEG muestra un único pico ubicado en un valor de $D_H = 1,5 \pm 0,2$ nm. Este resultado parece demostrar que estas nanopartículas, a diferencia de las anteriores, no forman aglomerados en suspensión acuosa. Dicha diferencia puede deberse a un mejor grado de recubrimiento para el caso de las NPSi'PEG, de forma tal que la suspensión de nanopartículas queda estabilizada por el impedimento estérico generado por las cadenas de PEG unidas a su superficie.

3.3 Anisotropía

La medida de anisotropía resuelta en el tiempo está relacionada con las orientaciones relativas de los momentos dipolares de las partículas en estado basal y excitado. Determinaciones de

anisotropía de las nanopartículas utilizando experimentos resueltos en el tiempo permiten obtener el tiempo de rotación Browniana (θ) y la anisotropía a tiempo cero (r_0). Debido a la simetría de las partículas de silicio, se esperaría que no presentasen cambios de polaridad al ser excitadas, de forma similar a como ocurre con algunos fullerenos esféricos (Valeur 2002). Sin embargo, estudios realizados sobre la polarización de nanopartículas de silicio durante su síntesis muestran una relación entre la forma de las partículas y el efecto de polarización (Polisski et al. 1997), lo cual indicaría que a pesar de que las partículas son esféricas en su conjunto, las irregularidades y asimetrías en su composición juegan un rol importante en el proceso de emisión.

Se han realizado experimentos en el dominio del tiempo (Fig. 3.17 a 3.19), a través de los cuales se determinó el tiempo de rotación Browniano (θ) y la anisotropía a tiempo cero (r_0) para las diferentes nanopartículas de silicio en suspensiones acuosas ajustándose a la ecuación 3.1 (Valeur 2002).

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-t/\theta} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde r_0 es la anisotropía a tiempo cero; t es el tiempo y θ es el tiempo de rotación Browniano.

Los experimentos de anisotropía resuelta en el tiempo se llevaron a cabo excitando con un nanoLED de 388 nm y detectando la emisión a 430 nm de forma de identificar el mayor número de especies que contribuyen a la luminiscencia general. Los perfiles de anisotropía obtenidos para las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y NPSi'PEG se ajustaron a un decaimiento monoexponencial (Ec 3.1), el tiempo de correlación rotacional (θ) y la anisotropía en el tiempo cero (r_0) se muestran en la Tabla 3.2.

El ajuste monoexponencial es consistente con la evidencia de que la emisión se origina principalmente a partir de una población de partículas con los tres ejes de rotación perpendiculares idénticos, lo que sugiere una forma esférica.

Los valores de r_0 obtenidos para las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG ($0,16 \pm 0,02$ y $0,18 \pm 0,02$, respectivamente) pueden considerarse iguales dentro del error experimental, por lo que se puede concluir que la derivatización no afecta la distribución de los estados involucrados.

TABLA 3.2: VALORES DE TIEMPO DE ROTACIÓN BROWNIANO (θ), ANISOTROPÍA A TIEMPO CERO (r_0) Y DIÁMETRO HIDRODINÁMICO (D_{AN}) OBTENIDOS POR ANISOTROPÍA PARA LAS NPSiNH₂, NPSiNH-PEG Y NPSi'PEG

NPSi	θ	r_0	D_{AN}
NPSiNH ₂	0,46 ± 0,02 ns	0,16 ± 0,02	1,6 ± 0,5 nm
NPSiNH-PEG	0,60 ± 0,02 ns	0,18 ± 0,02	1,8 ± 0,5 nm
NPSi'PEG	1,82 ± 0,03 ns	0,39 ± 0,05	3,6 ± 0,7 nm

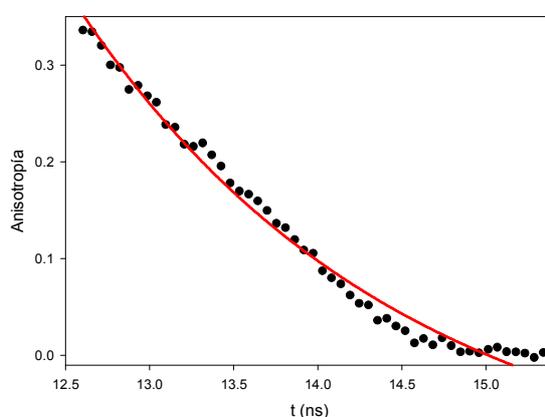


FIG 3.17: CURVA DE ANISOTROPÍA (EXC 388 NM, EM 430 NM) OBTENIDA EN SUSPENSIÓN ACUOSA PARA LAS NPSiNH₂ (PUNTOS NEGROS). La línea roja corresponde al ajuste monoexponencial que permite determinar los valores de θ y r_0 .

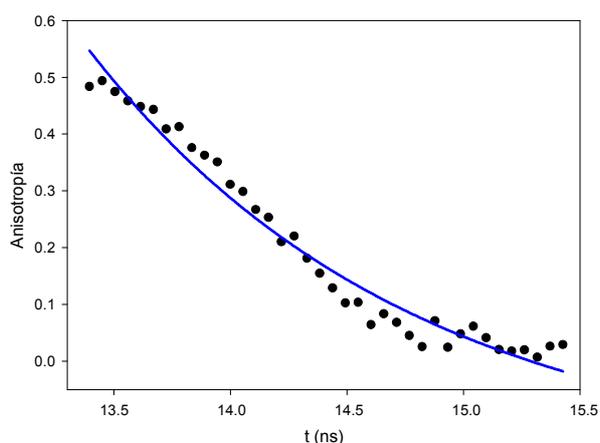


FIG 3.18: CURVA DE ANISOTROPÍA (EXC 388 NM, EM 430 NM) OBTENIDA EN SUSPENSIÓN ACUOSA PARA LAS NPSiNH-PEG (PUNTOS NEGROS). La línea azul corresponde al ajuste monoexponencial que permite determinar los valores de θ y r_0 .

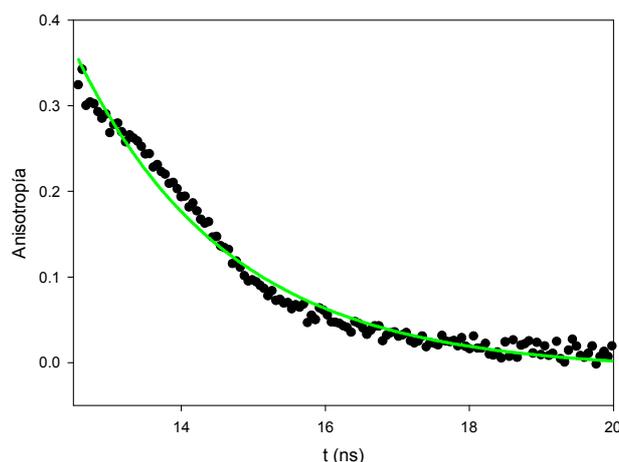


FIG 3.19: CURVA DE ANISOTROPÍA (EXC 388 NM, EM 430 NM) OBTENIDA EN SUSPENSIÓN ACUOSA PARA LAS NPSi'PEG (PUNTOS NEGROS). La línea verde corresponde al ajuste monoexponencial que permite determinar los valores de θ y r_0 .

Determinación del Diámetro Hidrodinámico (D_{AN})

A partir de los datos del tiempo rotación de las nanopartículas se puede obtener el valor del radio hidrodinámico de las mismas. La dependencia del tiempo de rotación Browniano (θ) con el volumen (V) para partículas esféricas está dado por la teoría hidrodinámica de la difusión rotacional representada en la ecuación 3.2, donde k_B es la constante de Boltzman y η es la viscosidad del solvente a 298 K (Lakowicz 2006).

$$\theta = \frac{\eta \cdot V}{K_B \cdot T} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Considerando la viscosidad del agua a 300 K ($\eta = 1,00 \text{ mPa} \cdot \text{s}$), se obtuvo un valor de diámetro hidrodinámico medio de $1,6 \pm 0,5 \text{ nm}$ y $1,8 \pm 0,5 \text{ nm}$ para las NPSiNH_2 y NPSiNH-PEG respectivamente (Tabla 3.2). Estos valores coinciden dentro del error experimental con el valor obtenido por TEM de $1,6 \pm 0,6 \text{ nm}$ para las NPSi recién sintetizadas. Por otra parte, el valor de diámetro hidrodinámico obtenido para las NPSiNH-PEG ($D_{AN} = 1,8 \pm 0,5 \text{ nm}$) es dentro del error experimental, del mismo orden que el obtenido para las NPSiNH_2 ($D_{AN} = 1,6 \pm 0,5 \text{ nm}$). Se obtuvo una estimación del tamaño de las nanopartículas después de la funcionalización con PEG mediante el supuesto de que el polímero presenta una estructura de ovillo estadístico después de la unión covalente a la superficie de la partícula (Sperling y Parak 2010). El radio de giro para una configuración de ovillo estadístico toma la expresión $R_g = (n \times l / 6)^{1/2}$, donde $n = 14$ y $l = 3,1 \text{ \AA}$ son el número y la longitud de unidades de óxido de etileno, respectivamente. Por lo tanto, el tamaño que se estima para las NPSiNH-PEG con un alto grado de recubrimiento

es de 2.6-3.6 nm. El hecho de haber obtenido un valor de $D_{AN} = 1,8 \pm 0,5$ nm que es menor al valor predicho podría indicar que las cadenas de PEG unidas se encuentran enrolladas sobre la superficie de la partícula evidencian un bajo grado de cobertura con PEG.

Finalmente para el caso de las NPSi'PEG se obtuvo un valor de $D_{AN} = 3,6 \pm 0,7$ nm que coincide dentro del error experimental con el valor obtenido por TEM ($D_F = 3,2 \pm 0,5$ nm) y es consistente con el diámetro esperado para nanopartículas de silicio con un alto grado de recubrimiento superficial con PEG.

3.4 Estimación de Pesos Moleculares y Número de terminaciones

Para el caso de las NPSi sin funcionalizar, el valor de la masa molar para cada partícula se calculó a partir del tamaño medio obtenido por TEM ($D_F = 1,6 \pm 0,6$ nm), asumiendo que las nanopartículas son esféricas y tomando de la bibliografía el dato de la densidad del silicio como 2330 kg/m^3 (Lide 2009). A partir de estos cálculos se obtuvo un valor de $PM_{NPSi} = 3010$ g/mol.

Para obtener el PM de las nanopartículas de silicio funcionalizadas fue necesario realizar un modelado teórico (Llansola Portolés 2011; Lillo et al. 2015) para determinar el número de átomos de Si en la superficie que eran susceptibles de funcionalización. Para ello se optimizaron las geometrías de las nanopartículas de diámetros en el rango de 0,7 a 2,2 nm. El número de átomos superficiales de Si ($N_{Si-term}$) se determinó de acuerdo a sus números de coordinación. Los átomos con número de coordinación igual a 1, 2, o 3 se consideraron como candidatos para la funcionalización. La Figura 3.20 muestra la dependencia de $N_{Si-term}$ con el diámetro al cuadrado de la NPSi (D^2), la línea continua en la figura representa el ajuste de $N_{Si-term}$ a la función encontrada (Ec. 3.3).

$$N_{Si-term} = 189,6 \times D^2 / (5.345 + D^2) \quad \text{Ec. 3.3}$$

Sobre la base de esta ecuación y un diámetro medio de partícula de 1,6 nm, se determinó que un promedio de 61 a 62 átomos terminales de Si por partícula estaban disponibles para la funcionalización.

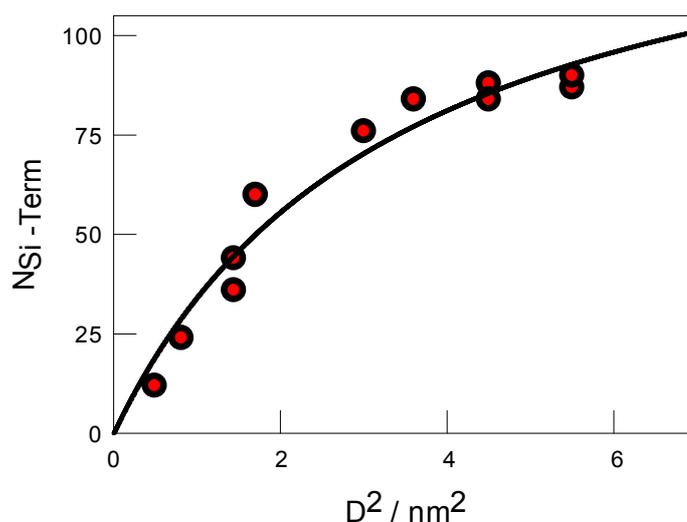


FIG. 3.20: DEPENDENCIA DE $N_{\text{Si-Term}}$ CON EL DIÁMETRO AL CUADRADO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE SILICIO (D^2), LA LÍNEA CONTINUA EN LA FIGURA REPRESENTA EL AJUSTE DE $N_{\text{Si-Term}}$ A LA FUNCIÓN DE $189,6 \times D^2 / (5,345 + D^2)$.

El peso molecular medio de un mol de NPSiNH_2 se estimó suponiendo que 62 átomos de Si de la superficie de las NPSi de tamaño de 1,6 nm se funcionalizan con propilamina y apoyándose en los datos obtenidos por FTIR, XPS, y de carga superficial que indican un grado significativo de funcionalización, se obtiene un valor de $\text{PM}_{\text{NPSiNH}_2} = 6606 \text{ g/mol}$, este valor y el dato experimental de concentración en mg/ml obtenido por pesada se utilizaron para calcular las concentraciones molares de las suspensiones de NPSiNH_2 .

Se aplicó un procedimiento similar para determinar la concentración molar de las NPSiNH-PEG . En este caso, los experimentos de anisotropía indican un bajo porcentaje de cobertura de las NPSiNH_2 con partículas de PEG. Luego, se calculó el PM suponiendo un 2% de funcionalización sobre los grupos amino terminales (ver TGA sección 4.4), resultando un $\text{PM}_{\text{NPSiNH-PEG}} = 8900 \text{ g/mol}$.

4. Caracterización de la superficie

4.1 Espectros de Infrarrojo (IR-ATR y FTIR)

Se obtuvieron los espectros de infrarrojos con el propósito de caracterizar los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas. Debido a la poca cantidad de muestra se recurrió a varios métodos de preparación de la muestra (pastillas de KBr y sembrado sobre

oleas de silicio) y a combinar técnicas de FTIR con técnicas de FTIR-ATR, descritos en el capítulo 2.

Nanopartículas recubiertas con grupos -NH₂

En el siguiente grafico (Fig. 3.21) se muestra el espectro FTIR de las NPSiNH₂. Las vibraciones N-H observadas en la región de 3400 cm⁻¹ y 1650-1580 cm⁻¹ son características de las aminas primarias. La presencia de bandas a 1450 y 1250 cm⁻¹ debido a la deformación Si-C y Si-CH₂ y los picos en la región 2930-2890 cm⁻¹ debido al estiramiento y flexión CH₂ confirma la presencia de grupos propil amino en la superficie de las NPSiNH₂ (Wahab et al. 2004). Además, el pequeño pico a 1030 cm⁻¹ puede ser asignado a vibraciones CN (Coates 2000).

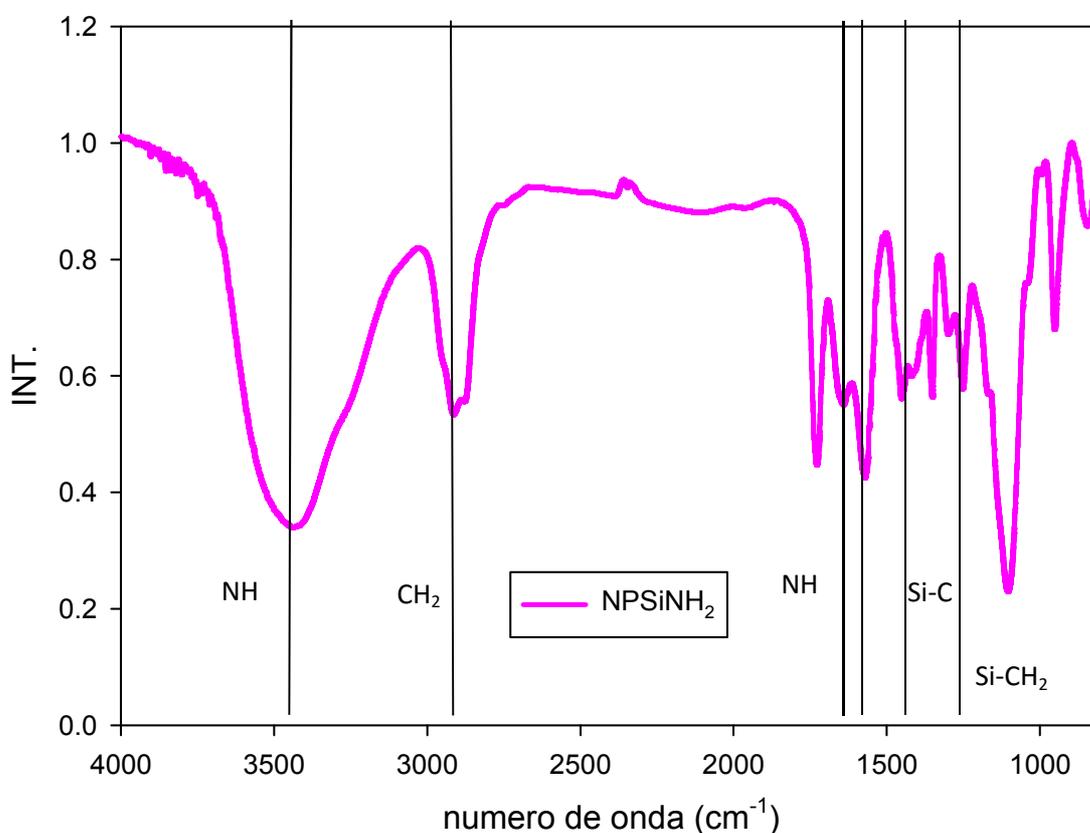


FIG. 3.21: ESPECTRO IR-ATR DE LAS NPSiNH₂

Nanopartículas recubiertas con grupos folato.

El espectro IR de las NPSiNH-Fol (Fig. 3.22) se comparó con la del ácido fólico libre depositado sobre una oblea de silicio limpia. El espectro de las NPSiNH-Fol muestra picos de absorción a 1510 y 3360 cm⁻¹ asignados al C=O y grupos NH de las amidas, respectivamente. Las bandas características del ácido fólico en 1450 y 1410 cm⁻¹ debido a los enlaces C = C en los anillos

fenilo y pterina también se observan (Haidary et al. 2013). Las bandas de absorción a 3000 y 2940 cm^{-1} fueron asignadas al estiramiento CH en grupos aromáticos y alquilo, respectivamente. Los picos en 1030 y 997 cm^{-1} se deben a la deformación de los grupos C=O en -CONH-.

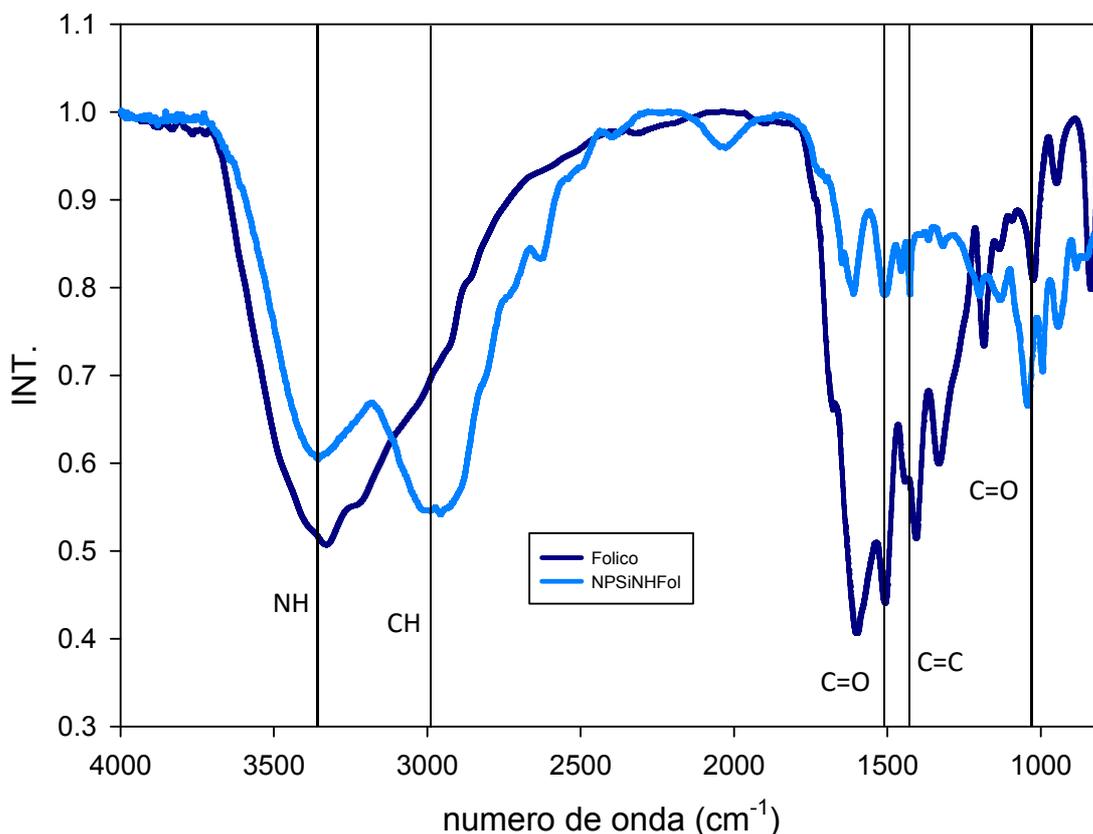


FIG. 3.22: ESPECTROS FT-IR COMPARADOS DEL ÁCIDO FÓLICO (EN AZUL) Y LAS NPSiNH-FOL (EN CELESTE).

Nanopartículas recubiertas con PEG.

A su vez, el espectro FTIR de las NPSiNH-PEG (Fig. 3.24) muestra las bandas características de derivados de PEG en 2880, 1100, y 950 cm^{-1} correspondientes a CH, COC, y C-OH, respectivamente (Wu et al. 2009). Por otra parte también se observan, los intensos picos a 1740-1660 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del grupo C=O en ácidos y amidas y una banda ancha a 3500-3400 cm^{-1} , que puede corresponder al estiramiento de los grupos OH en ácidos y agua adsorbida y al estiramiento del grupo NH en amidas. El pequeño pico en 1250-1270 cm^{-1} puede ser asignado a las vibraciones de la unión Si-C.

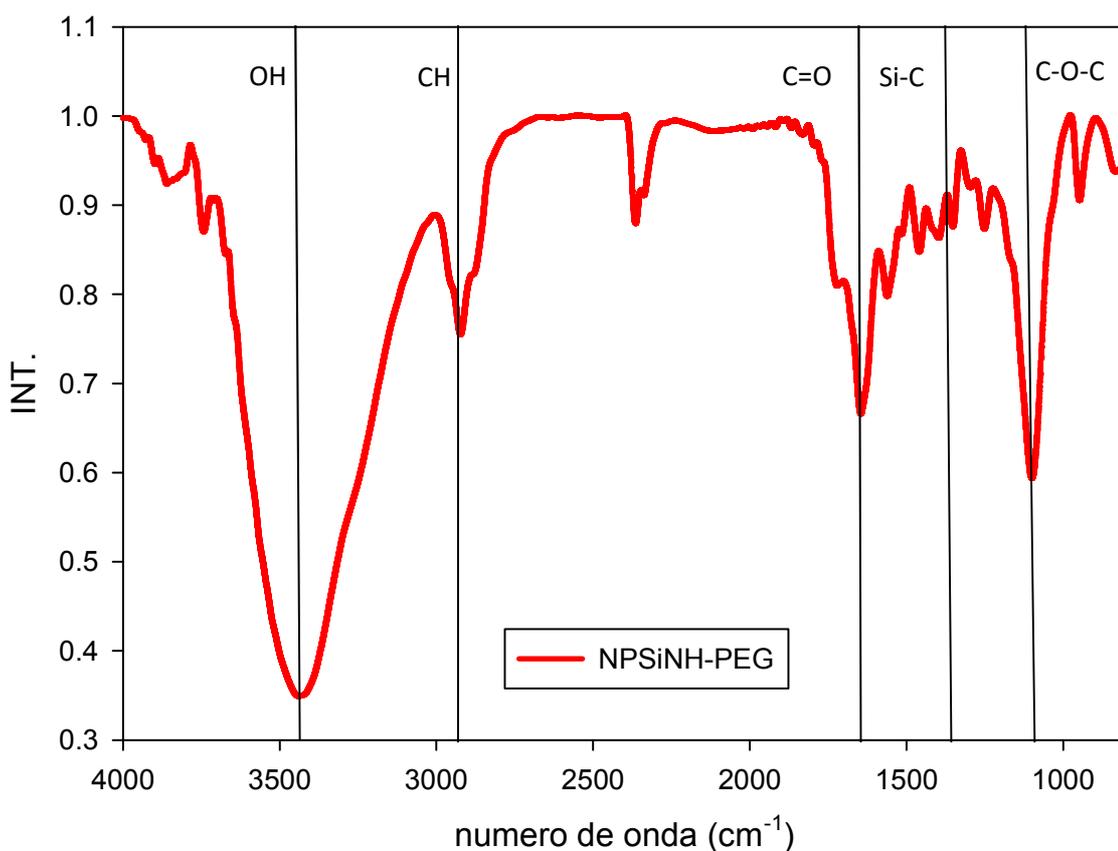


FIG. 3.24: ESPECTRO IR-ATR DE LAS NPSiNH-PEG

Por otro lado, el espectro infrarrojo de las NPSi'PEG (Fig. 3.25) también muestra los picos correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-H, C-O-C Y C-OH, presentes en el PEG, a 2960, 1150 y 950 cm^{-1} respectivamente, mientras que las bandas de 845 cm^{-1} corresponden a las vibraciones C-C. Las señales anchas alrededor de 3400 cm^{-1} y las menos importantes en 1350 cm^{-1} pueden corresponder a las vibraciones de los grupos OH terminales de las cadenas de PEG. No puede descartarse el aporte de moléculas de agua adsorbida al pico de 3400 cm^{-1} . Los pequeños picos a 1250 y 1450 cm^{-1} se asignan a las vibraciones Si-C y Si-CH₂, apoyando la unión de cadenas de PEG a las nanopartículas de silicio a través de enlaces Si-C. Sin embargo, la unión de PEG a través de enlaces Si-O-C no puede ser descartada debido a que las vibraciones Si-O-C aparecen en 1100 cm^{-1} en la misma región que las uniones C-O-C de las uniones polieter del PEG (Linstrom y Mallard 2011).

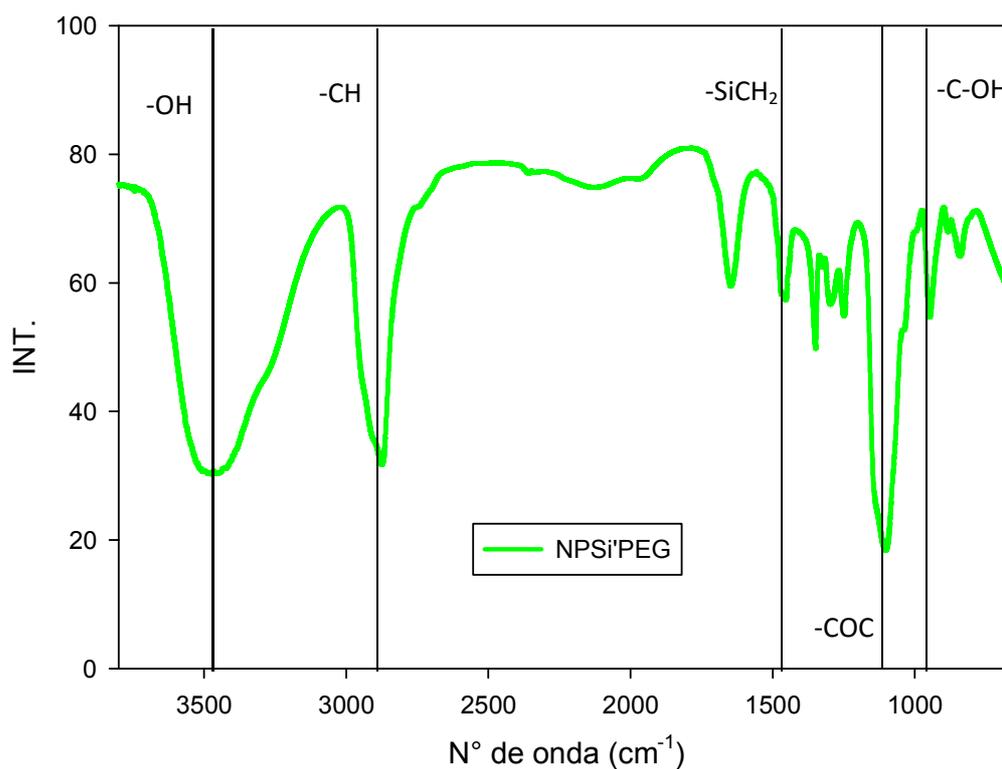


FIG. 3.25: ESPECTRO FT-IR DE LAS NPSi'PEG

4.2 Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Se obtuvieron los espectros de alta resolución de Si2p y N1s y se realizó un análisis de los diferentes entornos mediante la deconvolución de los mismos.

El espectro de XPS de las NPSiNH₂ muestra las señales de Si2p a 99,6 eV (27%), 100,8 eV (37%) y 101,6 eV (37%), características de los entornos Si⁰, Si-C, y Si⁺ (Fig. 3.26) respectivamente (Alexander et al. 1999).

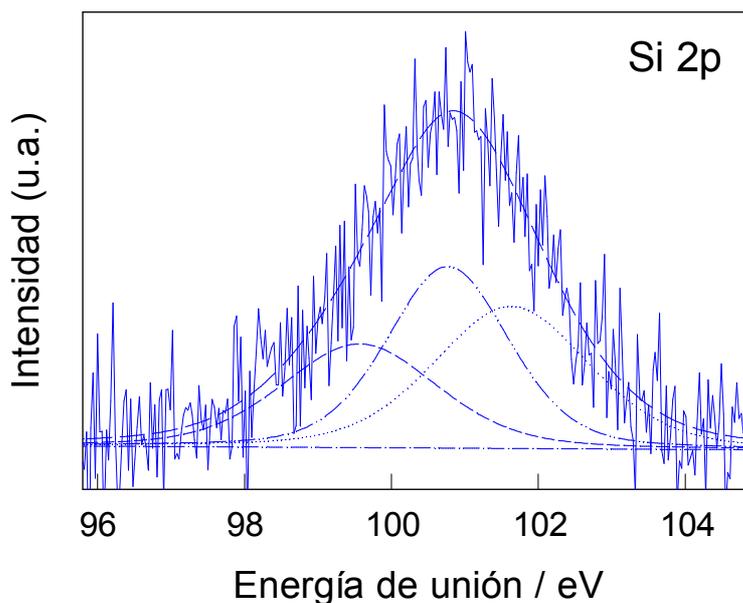


FIG. 3.26: SEÑALES Si2P DEL ESPECTRO XPS DE LAS NPSiNH₂

Las señales N1s (Fig. 3.27) a 399,4 y 401,4 eV son asignadas a las uniones C-NH₂ y C-NH₂⁺ X⁻ respectivamente. Por otro lado la ausencia de las señales Si 2p a 103,0 eV y Si 2s en 533,0 eV que son característicos de los grupos de SiO₂, indica que la funcionalización con propilamina protege a las NPSi del proceso de oxidación que ocurre con el tiempo.

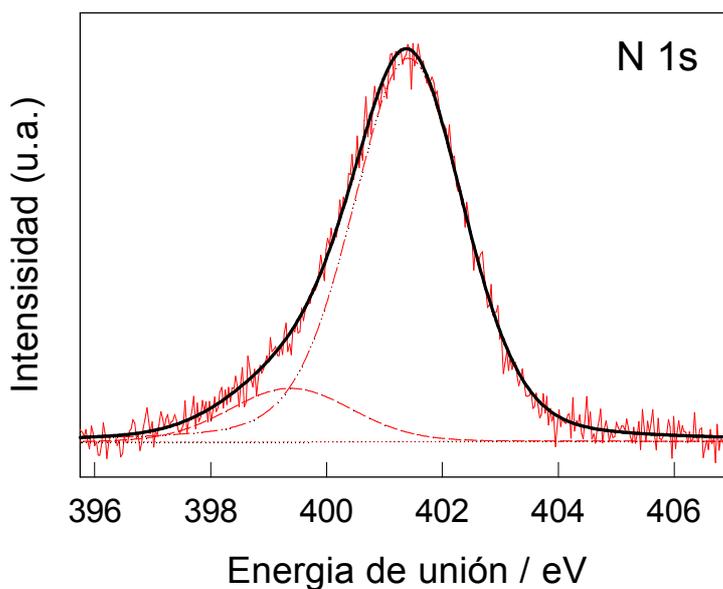


FIG. 3.27: SEÑALES N1S DEL ESPECTRO XPS DE LAS NPSiNH₂

4.3. Electroforesis en geles de agarosa y determinación de potencial Z.

En esta parte del trabajo se recurrió al uso de estas dos técnicas para evidenciar el efecto de la modificación superficial sobre la carga superficial de las nanopartículas. En la Fig. 3.28 se muestra la imagen del gel obtenido por electroforesis y en la tabla 3.2 muestra los resultados de la determinación de potencial Z para las NPSiNH-Fol y NPSiNH-PEG.

TABLA 3.2: VALORES DE POT Z OBTENIDOS PARA LAS NPSiNH-FOL Y NPSiNH-PEG

NPSi	Pot Z (mV)	% A
NPSiNH-Fol	$-16.5 \pm 0,5$	100
NPSiNH-PEG	$0,2 \pm 0,1$	100

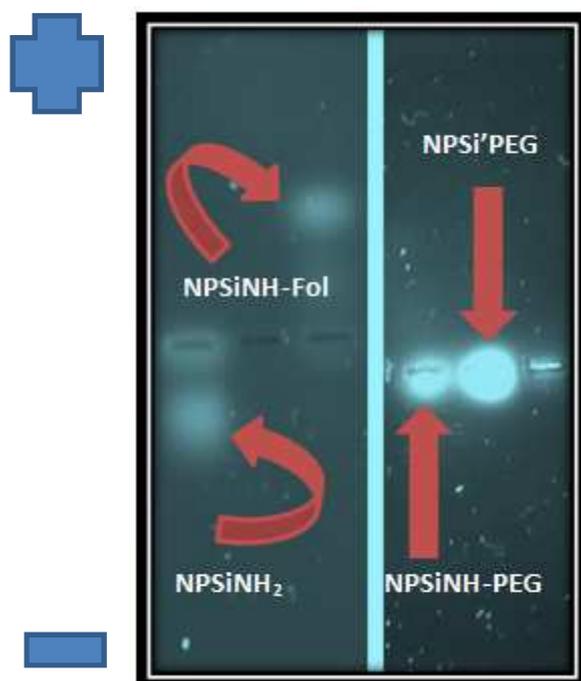


FIG. 3.28: IMÁGENES DE LOS GELES DE AGAROSA OBTENIDOS LUEGO DE LA CORRIDA DE LAS DIFERENTES NPSi.

La Fig. 3.28 muestra el comportamiento de las diferentes nanopartículas de silicio frente a un campo electromagnético a pH = 8 (pH de la solución tampón usada para la corrida y para armar el gel). Puede verse que las NPSiNH₂ migran hacia el polo negativo según lo esperado, ya que los grupos -NH₂ se encuentran en su forma protonada (-NH₃⁺) a valores de pH menores que el correspondiente a su pK (pK~10). Por su lado, las NPSi'PEG no se desplazan del punto de siembra y esto se corresponde con la carga de los grupos superficiales (OH terminales del PEG) en las condiciones de trabajo. Las NPSiNH-Fol migran hacia el polo positivo, y este resultado puede justificarse a partir de la ionización de los grupos -COOH del ácido fólico, que a pH = 8 se encontrarán como grupos carboxilato (COO⁻). Finalmente las NPSiNH-PEG se ubican en el punto de siembra y esto podría tener que ver con un apantallamiento de las cargas positivas de los grupos amino superficiales por las cadenas de PEG. Sin embargo esta última apreciación debería corroborarse mediante otro tipo de estudios.

Estos dos últimos comportamientos, se corroboran con los valores de potZ de la tabla 3.2. Las NPSiNH-PEG presentan un valor de potZ = 0,2 ± 0,1 mV, este valor cercano a 0 coincide con el resultado obtenido por electroforesis en gel y es consistente con el alto grado de aglomeración que presentan estas partículas en suspensión. Para las NPSiNH-Fol se obtuvo potZ = -15,6 ± 0,05 mV, resultado que concuerda con el comportamiento de estas nanopartículas en electroforesis en gel y que resulta más adecuado para favorecer la estabilidad de estas nanopartículas en suspensión.

4.4. Termogravimetría analítica

Esta técnica se utilizó con el fin de caracterizar el grado de recubrimiento con PEG para las diferentes nanopartículas de silicio. Primeramente se realizó la determinación termogravimétrica (TGA) de la muestra de PEG comercial utilizada en el proceso de derivatización superficial, de forma de encontrar la temperatura a la cual se produce la eliminación del polímero utilizado.

La Fig. 3.29 muestra las variaciones de peso registradas por TGA para una muestra de PEG puro en atmósfera de oxígeno.

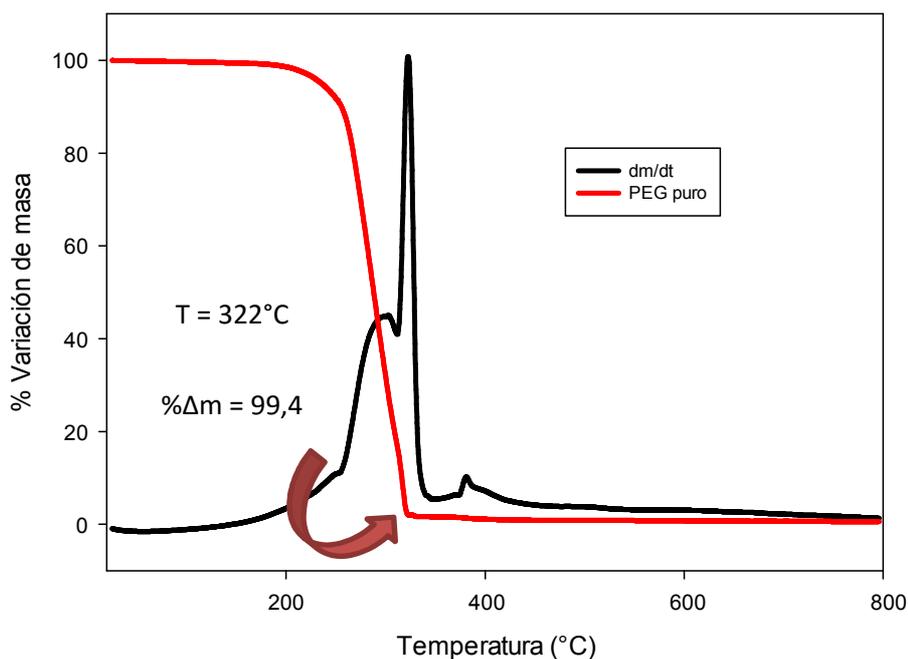


FIG 3.29: PÉRDIDAS DE PESO OBTENIDAS POR TGA EN ATMÓSFERA DE O₂ PARA EL PEG PURO

En la Fig 3.29 puede verse que el 99,4 % de la masa de muestra usada para este análisis se pierde a una temperatura cercana a los 322°C, resultado que coincide con el proceso de volatilización del PEG libre reportado en la bibliografía (Fan et al. 2012).

La Fig. 3.30 corresponde al análisis por TGA de partículas NPSiNH-PEG (línea negra). En el gráfico se visualizan dos zonas de pérdida de peso, una de ellas hasta los 321°C que se asigna a la eliminación de las moléculas de PEG y corresponde al 60% de pérdida de peso. El 40% del peso restante se asigna al silicio presente en las nanopartículas. A temperaturas mayores de 350°C y en atmósfera de O₂ las NPSi se oxidan a SiO₂ para luego descomponerse como ocurre con las nanopartículas de sílica (Liu et al. 2005; Hessel et al. 2006).

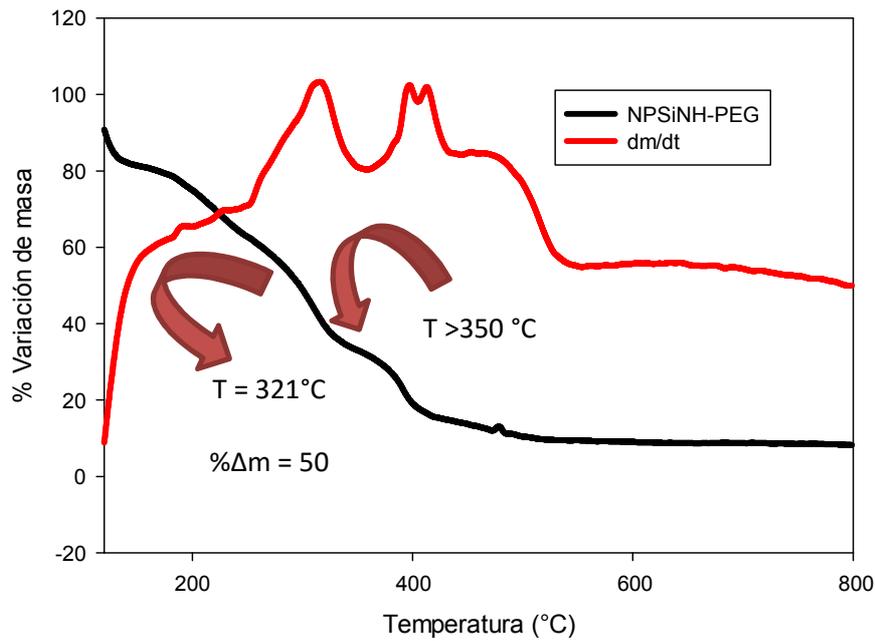


FIG 3.30: PÉRDIDAS DE PESO OBTENIDAS POR TGA EN ATMÓSFERA DE O₂ PARA LAS NPSiNH-PEG

A partir de los valores de pesos moleculares del PEG ($PM_{PEG} = 600 \text{ g/mol}$) y del PM estimado para NPSiNH₂ ($PM_{NPSi} = 6606 \text{ g/mol}$), se puede calcular el número de moléculas de PEG cada 100 gr de muestra. A partir de la relación moles PEG/moles de NPSi se puede estimar el número de moléculas de PEG por nanopartícula de silicio (~1 molécula de PEG por cada NPSiNH₂), lo que da una idea del grado de recubrimiento que tienen estas nanopartículas. Si se toma en cuenta que según el modelado teórico, nanopartículas de silicio de 1,6 nm de diámetro tienen en su superficie 61-62 átomos de silicio que pueden funcionalizarse, puede verse que según esta metodología se logró aproximadamente un ~2% de funcionalización con PEG.

De manera análoga, se realizó la determinación por TGA sobre las NPSi'PEG de forma de comparar el grado de PEGilación obtenido por esta segunda metodología. En el gráfico de la Fig. 3.31 pueden verse, nuevamente, dos zonas de pérdida de peso. La primera de ellas ocurre a una temperatura de 320°C y corresponde a una pérdida de peso del 92% y está relacionado con la pérdida de las moléculas de PEG del recubrimiento. El remanente de la masa a $T > 350 \text{ °C}$ se asigna al silicio.

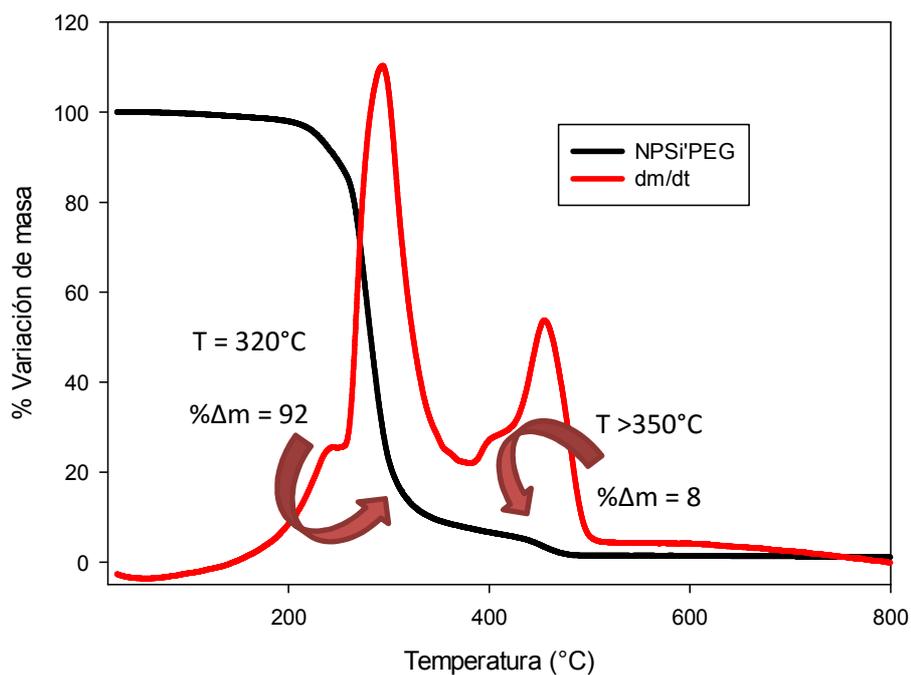


FIG 3.31: PÉRDIDAS DE PESO OBTENIDAS POR TGA EN ATMÓSFERA DE O₂ PARA LAS NPSi'PEG

A partir de los valores de pérdida de peso que se muestran en la Fig. 3.30 y los valores de PM del PEG y las nanopartículas de silicio, se calculó nuevamente la relación PEG/NPSi para estimar el grado de recubrimiento obtenido por esta segunda estrategia de PEGilación. Si se consideran 100 gr de muestra, los cálculos dan un total de 0,15 moles de PEG/100 g de muestra y 0,002 moles de NPSi/100 g de muestra y esta relación da un total de PEG:NPSi igual a 75:1. Dado que para partículas de 1,6 nm de diámetro se espera tener alrededor de 60 átomos de silicio superficiales con posibilidades de ser funcionalizados, este resultado indica un alto grado de recubrimiento superficial con moléculas de PEG sobre estas nanopartículas. Estas observaciones están en total acuerdo con lo discutido sobre el tamaño de las partículas medidos por TEM, anisotropía y los datos obtenidos a partir del análisis de la energía del gap con modelos teóricos.

Conclusiones:

En este capítulo se describieron los métodos de síntesis desarrollados con el fin de obtener nanopartículas de silicio recubiertas con distintas moléculas y su caracterización mediante diferentes técnicas. Las nanopartículas sintetizadas en un sistema de micelas invertidas mostraron un diámetro de Feret medio de $1,6 \pm 0,6$ nm. Estas partículas resultaron adecuadas para su posterior modificación superficial con grupos amino, lo que permitió la formación de suspensiones acuosas estables de NPSiNH_2 . A su vez estas nanopartículas se conjugaron con ácido fólico y un derivado carboxilado del PEG, mostrando los correspondientes espectros IR los picos característicos de los diferentes grupos funcionales. El análisis por DLS muestra un alto grado de aglomeración en suspensión acuosa de las distintas nanopartículas, mientras que la electroforesis en geles de agarosa evidencia que el proceso de cobertura modifica la carga superficial. Los valores de diámetro hidrodinámico obtenidos por anisotropía para las NPSiNH_2 ($1,6 \pm 0,5$ nm) y para las NPSiNH-PEG ($1,8 \pm 0,5$ nm) evidencia un bajo grado de PEGilación sobre las partículas aminadas.

Por otro lado se desarrolló un segundo método de síntesis de nanopartículas recubiertas con PEG a partir de la oxidación del precursor Mg_2Si . Este método de síntesis permite generar nanopartículas con un diámetro de Feret medio de $3,3 \pm 0,5$ nm. A diferencia de las partículas obtenidas por la metodología que involucra una síntesis de muchos pasos, estas nanopartículas muestran por DLS un bajo grado de aglomeración en suspensión acuosa que puede deberse a un alto grado de recubrimiento con PEG. Esta última afirmación pudo ser corroborada a partir de los resultados de TGA obtenidos para las $\text{NPSi}^{\text{f}}\text{PEG}$ y las NPSiNH-PEG según se discutió al final de este capítulo.

Bibliografía:

- Alexander MR, Short RD, Jones FR, et al (1999) A study of HMDSO/O₂ plasma deposits using a high-sensitivity and -energy resolution XPS instrument: curve fitting of the Si 2p core level. *Appl Surf Sci* 137:179–183. doi: 10.1016/S0169-4332(98)00479-6
- Ali ASG, Reza M a, Eshghi H, et al (2010) Cancerous Cells Targeting and Destruction Using Folate Conjugated Gold Nanoparticles. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol* 4:6–12.
- Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A, Gibson D (2003) Folate-targeted PEG as a potential carrier for carboplatin analogs. Synthesis and in vitro studies. *Bioconjug Chem* 14:563–574. doi: 10.1021/bc025642l
- Carter RS, Harley SJ, Power PP, Augustine MP (2005) Use of NMR spectroscopy in the synthesis and characterization of air- and water-stable silicon nanoparticles from porous silicon. *Chem Mater* 17:2932–2939. doi: 10.1021/cm040377u
- Chen H, Li L, Cui S, et al (2011) Folate conjugated CdHgTe quantum dots with high targeting affinity and sensitivity for in vivo early tumor diagnosis. *J Fluoresc* 21:793–801. doi: 10.1007/s10895-010-0772-4
- Coates J (2000) Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encycl Anal Chem* 10815–10837. doi: 10.1002/9780470027318
- Fan M, Liang Y, Zhou F, Liu W (2012) Dramatically improved friction reduction and wear resistance by in situ formed ionic liquids. *RSC Adv* 2:6824. doi: 10.1039/c2ra20888a
- Finholt AE, Bond AC, Schlesinger HI (1947) Lithium Aluminum Hydride, Aluminum Hydride and Lithium Gallium Hydride, and Some of their Applications in Organic and Inorganic Chemistry. *J Am Chem Soc* 69:1199–1203. doi: 10.1021/ja01197a061
- Haidary SM, Córcoles EP, Ali NK (2013) Folic Acid Delivery Device based on Porous Silicon Nanoparticles Synthesized by Electrochemical Etching. 8:9956–9966.
- Hessel C, Henderson E, Veinot J (2006) Hydrogen Silesquioxane: A molecular precursor for nanocrystalline Si-SiO₂ Composites and Freestanding Hydride-Surface-Terminated Silicon Nanoparticles. *Chem Mater* 18:6139–6146. doi: 10.1039/b607476f.Bulk

- Kortshagen U, Mangolini L, Bapat A (2007) Plasma synthesis of semiconductor nanocrystals for nanoelectronics and luminescence applications. *J Nanoparticle Res* 9:39–52. doi: 10.1007/s11051-006-9174-6
- Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. PlenumPublishers
- Li J, Kao WJ (2003) Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated-peptide biopolymer conjugates. *Biomacromolecules* 4:1055–1067. doi: 10.1021/bm034069I
- Lide DR (2009) Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press. Inc., Boca Raton
- Lillo CR, Romero JJ, Portolés ML, et al (2015) Organic coating of 1–2-nm-size silicon nanoparticles: Effect on particle properties. *Nano Res.* doi: 10.1007/s12274-015-0716-z
- Linstrom PJ, Mallard WG NIST Chem WebBook, NIST Stand Ref Database Number 69. In: 2011.
- Liu SM, Yang Y, Sato S, Kimura K (2006) Enhanced photoluminescence from Si nano-organosols by functionalization with alkenes and their size evolution. *Chem Mater* 18:637–642. doi: 10.1021/cm0519636
- Liu YL, Hsu CY, Hsu KY (2005) Poly(methylmethacrylate)-silica nanocomposites films from surface-functionalized silica nanoparticles. *Polymer (Guildf)* 46:1851–1856. doi: 10.1016/j.polymer.2005.01.009
- Llansola Portolés M (2011) Desarrollo de nanopartículas de silicio como potenciales marcadores luminiscentes y agentes terapéuticos en sistemas biológicos. UNLP
- Llansola Portolés M, Diez RP, Dell L, et al (2012) Understanding the Parameters Affecting the Photoluminescence of Silicon Nanoparticles.
- Llansola Portolés MJ, Nieto FR, Soria DB, et al (2009) Photophysical properties of blue-emitting silicon nanoparticles. *J Phys Chem C* 113:13694–13702. doi: 10.1021/jp903727n
- Manhat B a., Brown AL, Black L a., et al (2011) One-step melt synthesis of water-soluble, photoluminescent, surface-oxidized silicon nanoparticles for cellular imaging applications. *Chem Mater* 23:2407–2418. doi: 10.1021/cm200270d

- Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K (2003) PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 55:403–419. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00226-0
- Patrone L, Nelson D, Safarov VI, et al (2000) Photoluminescence of silicon nanoclusters with reduced size dispersion produced by laser ablation. *J Appl Phys* 87:3829–3837. doi: 10.1063/1.372421
- Pettigrew K, Liu Q (2003) Solution synthesis of alkyl- and alkyl/alkoxy-capped silicon nanoparticles via oxidation of Mg₂Si. *Chem ...* 4005–4011. doi: 10.1021/cm034403k
- Polisski G, Averboukh B, Kovalev D, Koch F (1997) Control of silicon nanocrystallite shape asymmetry and orientation anisotropy by light-assisted anodization. *Appl Phys Lett* 70:1116. doi: 10.1063/1.118502
- Rosso-Vasic M, Spruijt E, Van Lagen B, et al (2008) Alkyl-functionalized oxide-free silicon nanoparticles: Synthesis and optical properties. *Small* 4:1835–1841. doi: 10.1002/smll.200800066
- Sperling R a, Parak WJ (2010) Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 368:1333–1383. doi: 10.1098/rsta.2009.0273
- Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, et al (2000) Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Sci* 89:1452–1464. doi: 10.1002/1520-6017(200011)89:11<1452::AID-JPS8>3.0.CO;2-P
- Valeur B (2002) *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany
- Veronese FM, Pasut G (2005) PEGylation, successful approach. 10:1451–1458.
- Wahab M a., Kim I, Ha CS (2004) Bridged amine-functionalized mesoporous organosilica materials from 1,2-bis(trimethoxysilyl)ethane and bis[(3-trimethoxysilyl)propyl]amine. *J Solid State Chem* 177:3439–3447. doi: 10.1016/j.jssc.2004.05.062
- Wang S, Low PS (1998) Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Control Release* 53:39–48. doi: 10.1016/S0168-

3659(97)00236-8

Wilcoxon J, Samara G, Provencio P (1999) Optical and electronic properties of Si nanoclusters synthesized in inverse micelles. *Phys Rev B* 60:2704–2714. doi: 10.1103/PhysRevB.60.2704

Wu Y, Zuo F, Zheng Z, et al (2009) A Novel Approach to Molecular Recognition Surface of Magnetic Nanoparticles Based on Host-Guest Effect. *Nanoscale Res Lett* 4:738–747. doi: 10.1007/s11671-009-9314-x

Zou J, Sanelle P, Pettigrew K a., Kauzlarich SM (2006) Size and spectroscopy of silicon nanoparticles prepared via reduction of SiCl_4 . *J Clust Sci* 17:565–578. doi: 10.1007/s10876-006-0082-9

Capítulo 4

PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS

Introducción

Las NP-Si de tamaños entre 1 a 5 nm presentan fotoluminiscencia intensa debido a un mecanismo de confinamiento cuántico (Prendergast et al. 2004; Llansola Portolés et al. 2009). Los máximos de excitación-emisión varían desde el infrarrojo hasta el azul (Wolkin et al. 1999; Belomoin et al. 2000; Choi et al. 2007) dependiendo del tamaño de partícula, la naturaleza del recubrimiento (Sweryda-Krawiec et al. 1999; Hua et al. 2006; Rogozhina et al. 2006), la oxidación (Belomoin et al. 2000) y los defectos superficiales (Kuntermann et al. 2008). La fotoestabilidad, el pequeño tamaño, la intensa luminiscencia, el amplio espectro de excitación, la baja toxicidad, sumado a la relativa facilidad de funcionalización de su superficie con diversidad de moléculas que le otorgan afinidad con blancos biológicos específicos, las convierte en candidatos prometedores como marcadores biológicos luminiscentes y herramientas diagnósticas tempranas, como por ejemplo en cáncer (Larson 2003; Juzenas et al. 2008; Zhao et al. 2008; Morgan et al. 2009).

1. Espectros de Absorción

Las nanopartículas de silicio presentan un espectro de absorción por debajo de los 450 nm desplazándose hacia el UV a medida que el tamaño disminuye desde los 6 nm a los 2 nm de diámetro (Littau y Muller 1993). Dependiendo de su tamaño, las partículas presentan dispersión de luz en la zona del visible/UV y por tanto los espectros que se obtienen mediante espectrofotómetros que no emplean esferas integradoras deben corregirse por la dispersión para obtener los espectros de absorción verdaderos (Rogozhina et al. 2006; Rosso-Vasic et al. 2008).

Espectros de Absorción en solución acuosa.

Las NP-Si utilizadas en este trabajo presentan un pico de absorción en solución acuosa alrededor de los 300 nm. La posición de este pico varía con las diferentes modificaciones superficiales y en función del pH del medio.

La Fig. 4.1 presenta el espectro de absorción en suspensión acuosa de las NPSiNH-PEG en función de la cantidad de nanopartículas en el medio. A partir de estos espectros puede obtenerse una relación lineal entre la absorción a 303 nm (máximo de absorción) y la concentración de las NPSiNH-PEG en agua (ver gráfico insertado). Sin embargo, como existe

una contribución de dispersión de luz sobre los valores de absorción, estos espectros deben corregirse.

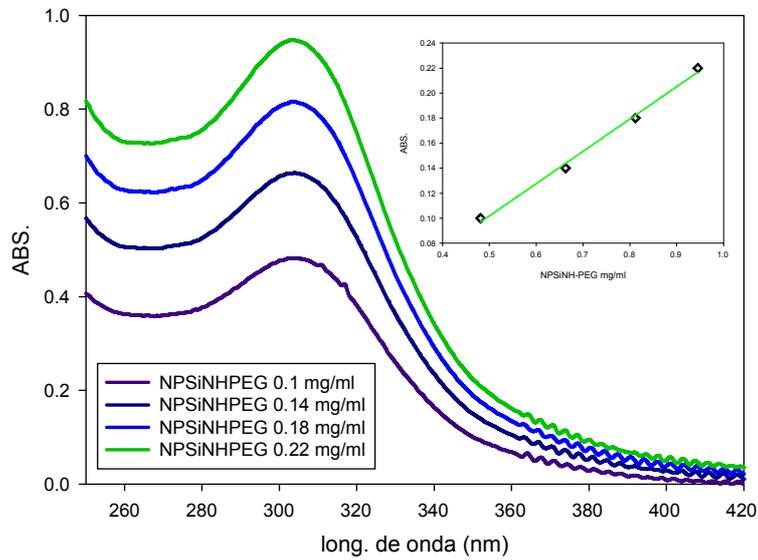


FIG. 4.1: ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LAS NPSiNH-PEG EN AGUA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.

Para obtener la absorción real de las nanopartículas en suspensión, se ajustaron los espectros de dispersión a la función $y = a + b(1/\lambda)^4$ (ver Ec. 2.6 en el Cap. 2), a longitudes de onda donde las nanopartículas no presentan absorción ($\lambda > 400$ nm).

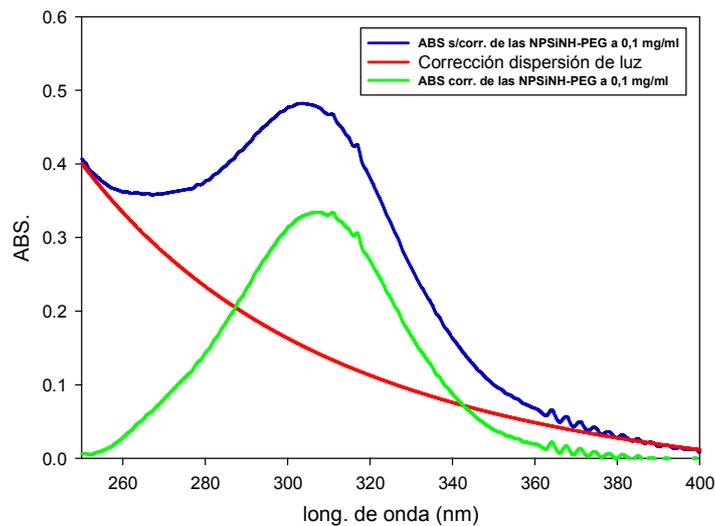


FIG. 4.2: CORRECCIÓN ESPECTROS DE ABS DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH-PEG POR DISPERSIÓN DE LUZ

La Fig. 4.2 muestra la corrección del espectro de ABS de la suspensión 0,1 mg/ml de las NPSiNH-PEG, la función que modela la dispersión (en rojo) arrojó los valores de $a = -0,0581$ y $b = 3,78$. El espectro corregido (en verde) surge de restarle al espectro original (en azul) los valores obtenidos para el efecto de la dispersión producida por las nanopartículas. Aplicando esta misma metodología para las diferentes concentraciones de las NPSiNH-PEG del gráfico 4.1, pueden obtenerse los espectros de absorción corregidos que se muestran en la Fig. 4.3.

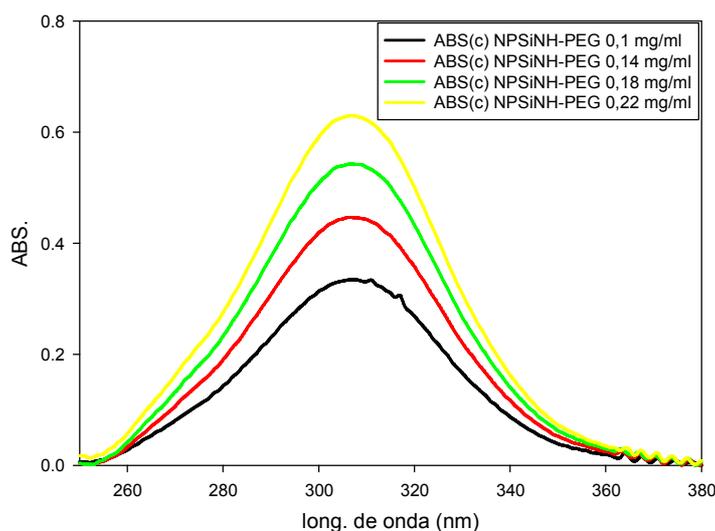


FIG. 4.3: ESPECTROS DE ABSORCIÓN CORREGIDOS DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH-PEG

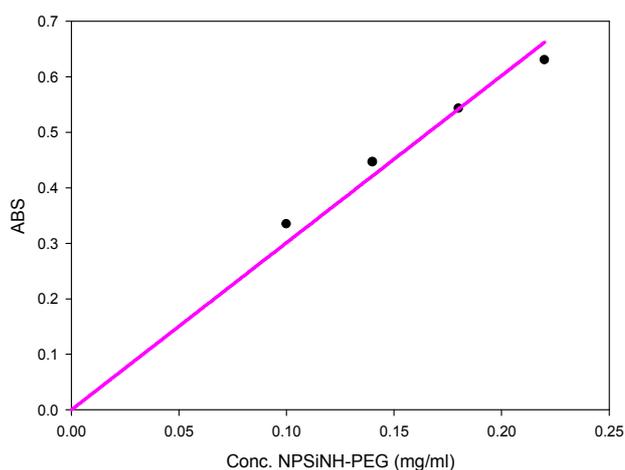


FIG. 4.4: AJUSTE LINEAL ABS CORREGIDA VS CONC. PARA LAS NPSiNH-PEG EN SUSPENSIÓN ACUOSA

Un aspecto interesante de corregir los espectros de absorción considerando el efecto de dispersión de luz, es que el ajuste lineal de la ABS corregida vs la concentración de partículas (Fig. 4.4) permite calcular los valores de ϵ a partir de la pendiente de las rectas obtenidas y los

valores de PM calculados en el Capítulo 3. Teniendo en cuenta la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon(\lambda) \cdot \ell \cdot C$) y el espesor de las celdas de 1 cm, se obtuvo un valor de $\epsilon(307 \text{ nm}) = 2,68 \times 10^4 \pm 8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

De manera similar, la Fig. 4.5 muestra los espectros de absorción sin corregir para las NPSiNH₂ en función de la concentración, y la Fig. 4.6 el espectro con la corrección por dispersión de luz.

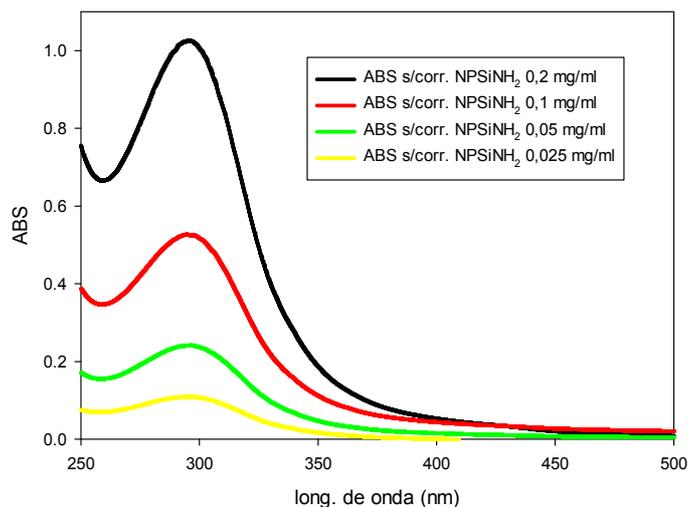


FIG. 4.5: ABSORCIÓN SIN CORREGIR DE LAS NPSiNH₂ EN SUSPENSIÓN ACUOSA A DISTINTAS CONCENTRACIONES.

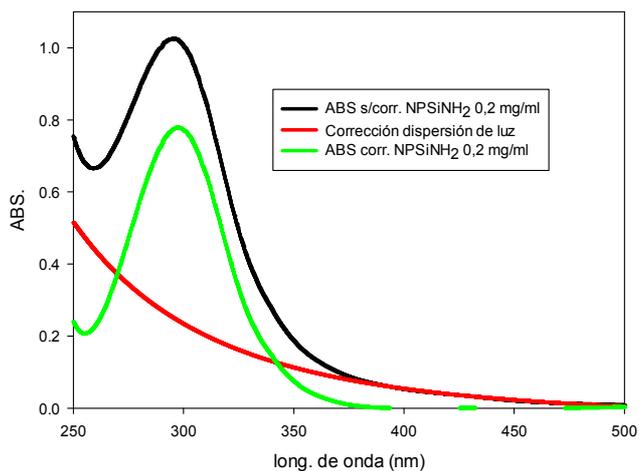


FIG. 4.6: CORRECCIÓN ESPECTROS DE ABS DE SUSPENSIÓN ACUOSA DE NPSiNH₂ POR DISPERSIÓN DE LUZ

Aplicando la corrección por dispersión de luz a los espectros de la Fig. 4.5, se pueden obtener los espectros de absorción corregidos que se muestran en la Fig. 4.7. Estos espectros, junto con los PM calculados en el Cap. 3 se usaron nuevamente para determinar el valor de ϵ para estas nanopartículas en el máximo de emisión (Fig. 4.8) obteniéndose un valor de $\epsilon(297 \text{ nm}) = 2,55 \times 10^4 \pm 4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para las NPSiNH₂.

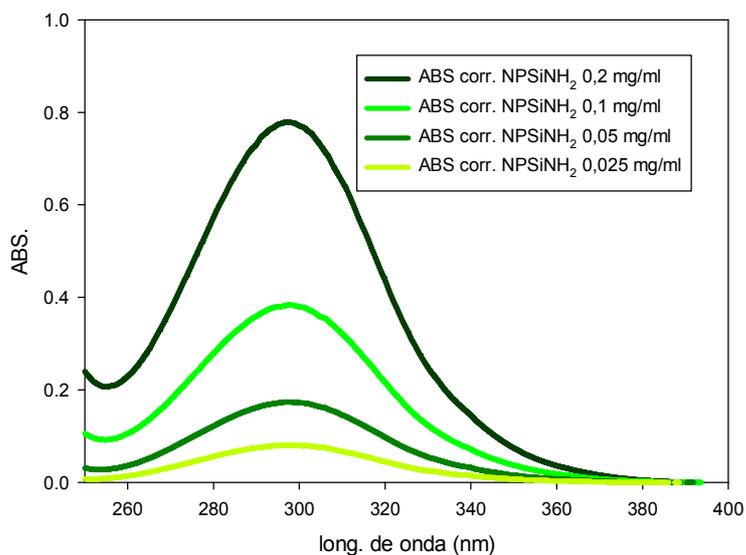


FIG. 4.7: ABSORCIÓN CORREGIDA DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH₂ EN FUNCIÓN DE LA CONC.

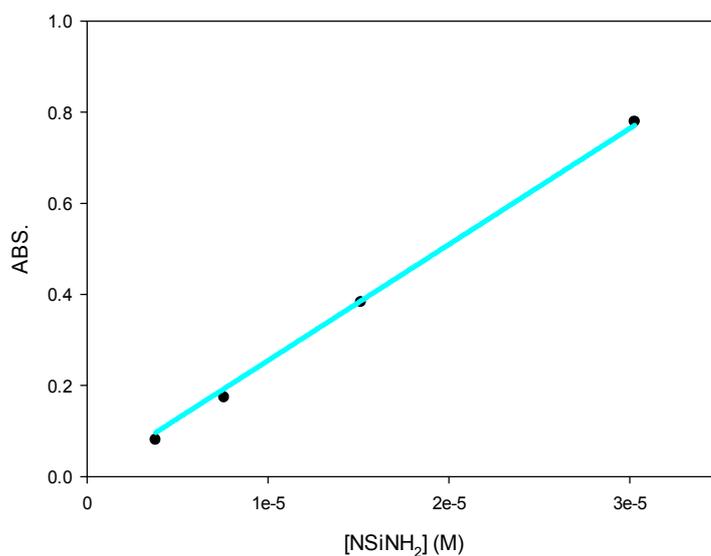


FIG. 4.8: AJUSTE LINEAL ABS CORREGIDA VS CONC. PARA SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH₂

De manera análoga, las NPSiNH-Fol presentan espectros de ABS que muestran una componente de dispersión de luz (Fig. 4.9) y que deben ser corregidos si se quiere obtener la absorción real (Fig. 4.10).

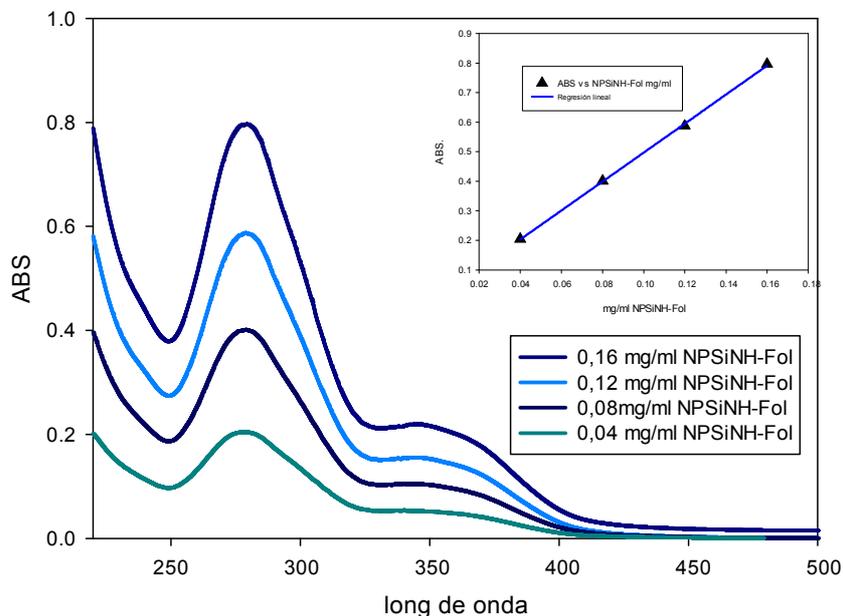


FIG. 4.9: ABSORCIÓN SIN CORREGIR DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH-FOL A DISTINTAS CONCENTRACIONES.

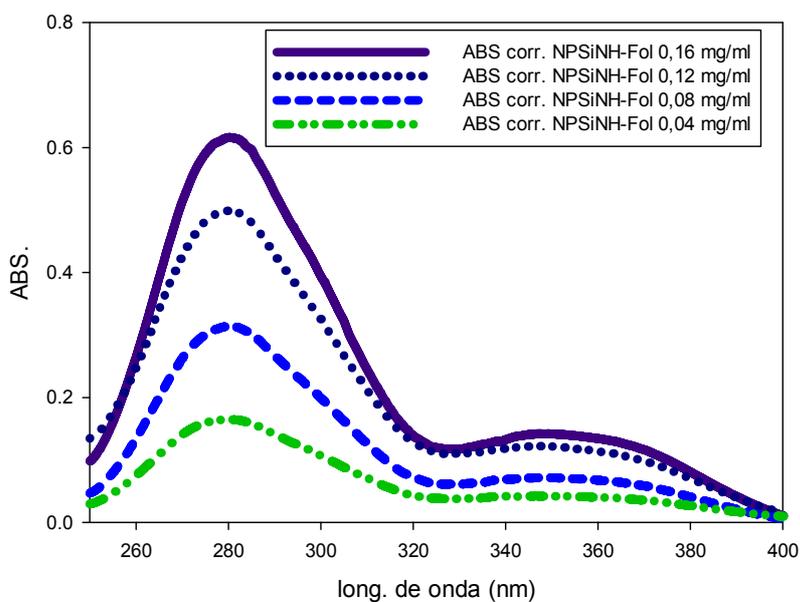


FIG. 4.10: ABSORCIÓN CORREGIDA DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH-FOL A DISTINTAS CONCENTRACIONES.

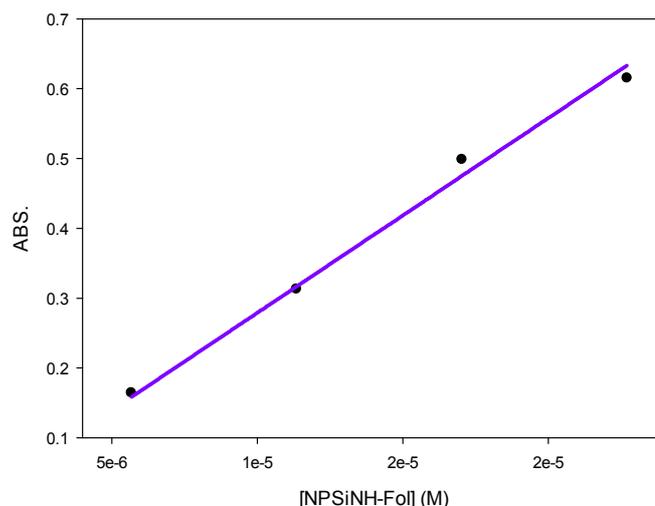


FIG. 4.11: ABSORCIÓN CORREGIDA VS CONC. DE SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSiNH-FOL

A partir de la Fig. 4.11 y estimando el PM de las NPSiNH-Fol, suponiendo que cada nanopartícula tiene unida en su superficie una molécula de ácido fólico, ($PM_{NPSiNH-Fol}=7047,4$ g/mol), se puede determinar una cota superior al valor de ϵ para estas nanopartículas en el máximo de emisión obteniéndose un valor de $\epsilon(280\text{ nm}) < 2,79 \times 10^4 \pm 6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para las NPSiNH-Fol.

Estos resultados muestran que las diferentes nanopartículas de silicio presentan espectros de absorción en solución acuosa que cambian poco con el recubrimiento (excepto para el fólico) y cuyos máximos se encuentra alrededor de los 300 nm. El ácido fólico observa un máximo a 280 nm y otro menor alrededor de 360 nm. A las concentraciones de trabajo, se encontró una relación lineal entre la absorción y la concentración para cada una de las diferentes NPSi. De estas relaciones se calculó el valor de ϵ a 300 nm para las diferentes nanopartículas. Los valores de ϵ calculados son todos muy similares y comparables a los de los colorantes orgánicos tradicionales (Resch-Genger et al. 2008). El espectro de absorción de las NPSiNH-Fol, siendo más complejo que lo esperable para el corazón de silicio sugiere una contribución de los estados electrónicos del fólico a la absorción de la partícula.

2. Fluorescencia Estacionaria

Como se comentó anteriormente, las NPSi utilizadas en este trabajo de tesis presentan fluorescencia debido al efecto de confinamiento cuántico. A lo largo de este trabajo se hizo uso de esta propiedad para el control y seguimiento de las partículas en suspensión. Las medidas se realizaron después de someter a las suspensiones a un baño de ultrasonidos

durante unos minutos para asegurarnos que las partículas estaban totalmente desagregadas. Los espectros obtenidos deben corregirse por varios factores para obtener la emisión real. Para ello se calibró la variación de intensidad de la lámpara de emisión en función de la longitud de onda teniendo en cuenta la sensibilidad del detector.

2.1. Nanopartículas en Solventes Orgánicos

Las NPSi obtenidas por el método de las micelas invertidas resultan insolubles en agua y forman suspensiones estables en solventes orgánicos. Típicamente se conservan durante largo tiempo en tolueno en atmósfera libre de oxígeno para evitar procesos de oxidación superficial. Las matrices de excitación-emisión de estas NPSi tal como se obtuvieron antes de los procesos de funcionalización se muestran en la Fig. 4.10.

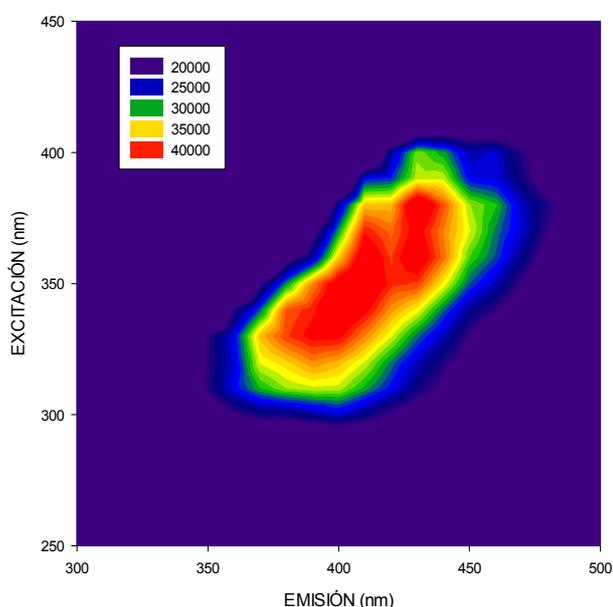


FIG. 4.10: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN DE SUSPENSIONES DE NPSi SIN FUNCIONALIZAR EN TOLUENO.

En la matriz de la Figura 4.10 puede verse que estas partículas emiten en la región azul del espectro electromagnético y que el rango de excitación se encuentra entre 300-400 nm mientras que la emisión se ubica entre 350-500 nm.

Comparativamente, en la bibliografía pueden encontrarse nanopartículas de silicio de 3 ± 1 nm de diámetro obtenidas por anodización de obleas de silicio que presentan un espectro de excitación entre 340-380 nm y un espectro de emisión entre 400-500 nm (Llansola Portolés et al. 2009), por otro lado nanopartículas de silicio de $3,9 \pm 1,3$ nm de diámetro obtenidas

por oxidación de NaSi con NH_4B tienen un espectro de excitación entre 360-400 nm mientras que la emisión se encuentra entre 420-450 nm (Zhang et al. 2007). Así mismo, nanopartículas funcionalizadas con alquilos de $1,6 \pm 0,2$ nm de radio sintetizadas mediante un método de reducción en solución en presencia de micelas muestran espectros de emisión con máximo en $\sim 280\text{--}290$ nm cuando la longitud de onda de excitación es de 260 nm (Rosso-Vasic et al. 2008).

Puede verse entonces que existe una variación en las zonas donde se produce la excitación y la emisión en nanopartículas de silicio en base al método de síntesis utilizado, mayormente relacionado con la distribución de tamaños de las mismas, observándose un corrimiento hacia la zona visible del espectro a medida que aumenta el tamaño del núcleo de silicio responsable de la emisión.

2.2. Nanopartículas en Suspensión Acuosa

Se midieron las matrices de excitación – emisión a temperatura ambiente en agua para las diferentes nanopartículas en concentraciones de 1 mg/mL. Las matrices son similares y no muestran cambios significativos en las regiones donde ocurre la emisión o la excitación, mostrando que son independientes del recubrimiento. Sin embargo, en algunos casos presentan diferencias en la intensidad de emisión.

Espectros de exc-em de las NPSiNH_2 en suspensión acuosa

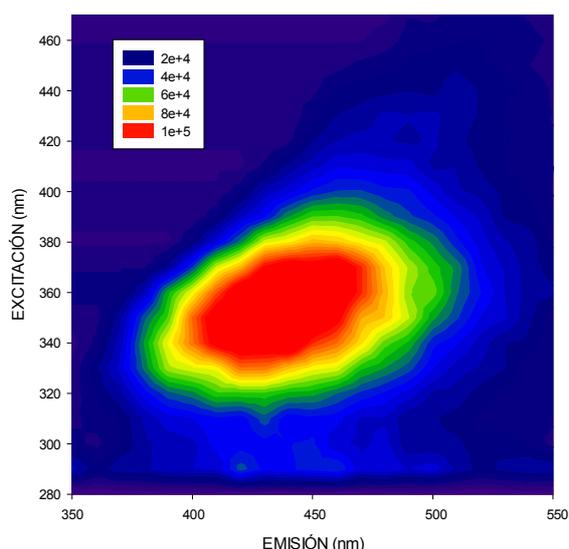


FIG. 4.11: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN EN AGUA DE LAS NPSiNH_2

La Fig. 4.11 muestra una matriz de exc-em típica obtenida para una suspensión acuosa de NPSiNH₂.

Los espectros de emisión de las diferentes nanopartículas, tanto en suspensiones acuosas como en solventes orgánicos, muestran una clara dependencia con la longitud de onda de excitación. Esta dependencia sugiere la contribución a la luminiscencia total proviene de partículas de diferente tamaño y morfología que se originan durante la síntesis del núcleo de silicio de las nanopartículas. La contribución de los diferentes emisores a la fotoluminiscencia general de las matrices de excitación-emisión, se analizó en el supuesto de que la suspensión de nanopartículas de silicio está compuesta por diferentes cromóforos con espectros de excitación emisión definidos, como en el caso de moléculas. Este estudio se realizó mediante análisis bilineal y dio como resultado un mínimo de dos emisores que contribuyen a la fotoluminiscencia general de las distintas nanopartículas.

Mediante un análisis bilineal de las matrices pueden obtenerse los espectros de excitación y emisión de cada emisor/cromóforo que contribuye a la emisión total. La Fig. 4.12 muestra el análisis los distintos emisores encontrados por análisis bilineal para las NPSiNH₂ en suspensión acuosa.

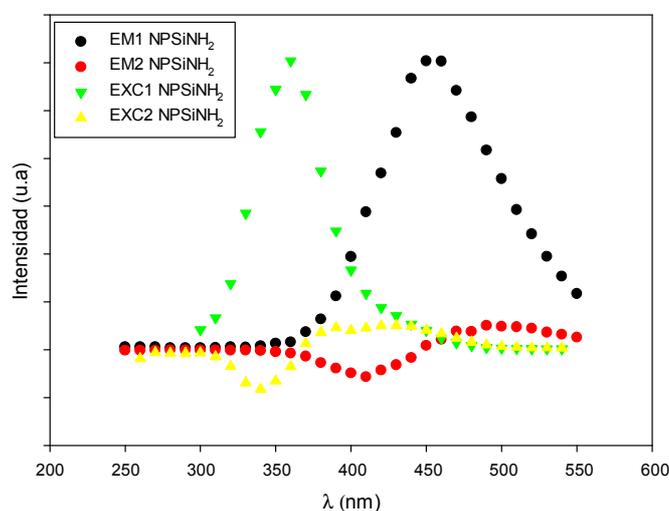


FIGURA 4.12: ESPECIES QUE CONTRIBUYEN A LA FOTOLUMINISCENCIA GENERAL DE LAS NPSiNH₂

En la Fig. 4.12 puede verse que al menos dos especies son responsables de la EM global de estas nanopartículas (designadas como EM1 y EM2). La especie EM1 presenta un máximo de emisión a 450 nm y la especie EM2 un máximo en 490 nm. En la misma figura se muestran los espectros de excitación respectivos de ambas especies (designados como EXC1 y EXC2).

Espectros de exc-em de las NPSiCOOH en suspensión acuosa

La Fig. 4.13 muestra la matriz de exc-em para las NPSi-COOH en suspensión acuosa. A continuación, la Fig. 4.14 muestra el análisis bilineal realizado sobre los datos obtenidos de la matriz de exc-em. De dicho análisis se desprende que al menos dos especies son responsables de la emisión global. Una de las especies contribuyentes presenta un máximo de emisión a 429 nm y la otra especie un máximo en 478 nm. En la misma figura se muestran los espectros de excitación de ambas especies.

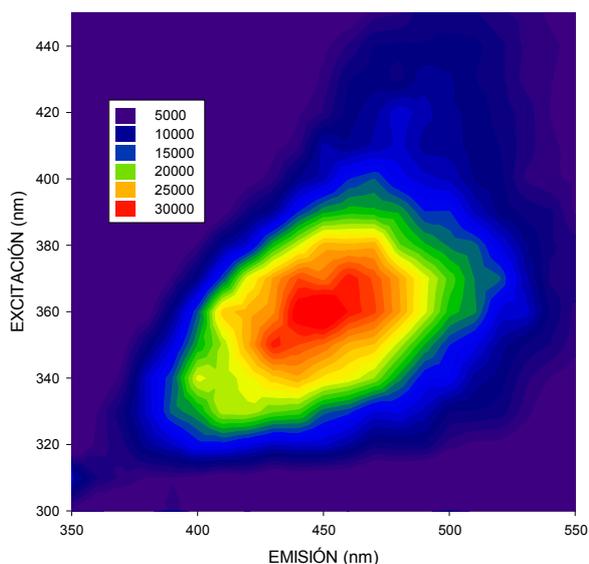


FIGURA 4.13: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN EN AGUA DE LAS NPSiCOOH

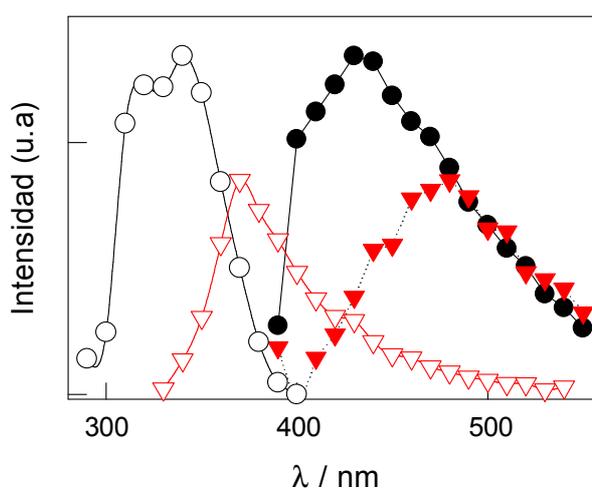


FIGURA 4.14: ESPECIES QUE CONTRIBUYEN A LA FOTOLUMINISCENCIA GENERAL DE LAS NPSiCOOH

EXCITACIÓN (PUNTOS VACÍOS) Y EMISIÓN (PUNTOS LLENOS)

Las matrices de las Fig. 4.11 y 4.13 correspondientes a las NPSiNH₂ y las NPSiCOOH en agua respectivamente muestran un cambio significativo en la intensidad de la emisión (un orden de magnitud menor para las NPSiCOOH respecto de las NPSiNH₂ y un corrimiento del orden de 10-20 nm en los máximos de emisión. Dada la potencial utilidad como agentes luminiscentes de las NPSi, se decidió continuar trabajando con las NPSiNH₂ en los siguientes procesos de funcionalización superficial debido a su mayor fotoluminiscencia. Al presente, no hemos investigado el origen de los corrimientos en los máximos de emisión, ya que ambas partículas provienen de un mismo lote de síntesis y difieren solo en los procesos de derivatización superficial.

Espectros de exc-em de las NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol en suspensión acuosa

De manera análoga, se obtuvieron las matrices de exc-em en suspensión acuosa de las NPSiNH-PEG (Fig. 4.15) y las NPSiNH-Fol (Fig. 4.16).

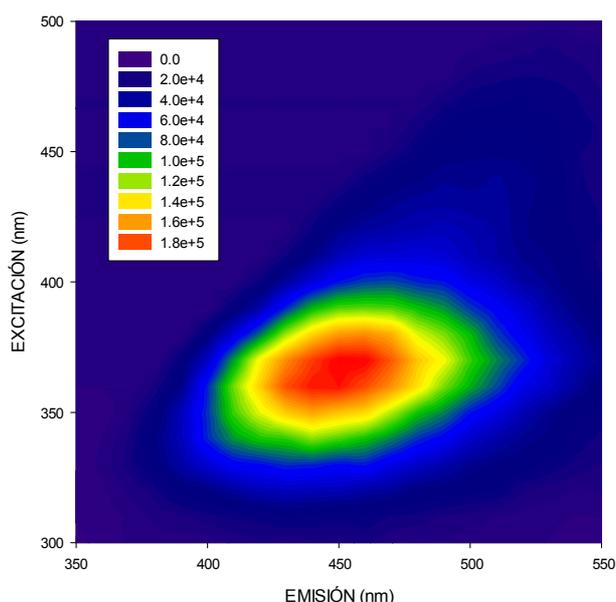


FIGURA 4.15: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN EN AGUA DE LAS NPSiNH-PEG

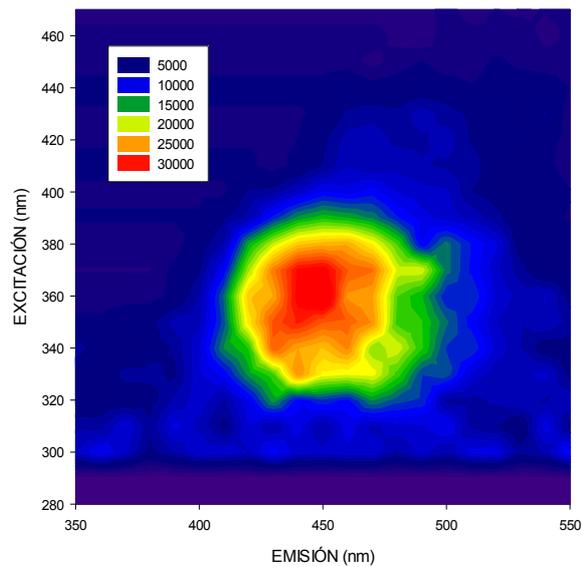


FIGURA 4.16: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN EN AGUA DE LAS NPSiNH-FOL

Mediante el análisis bilineal de las matrices en la Fig. 4.15 correspondiente a suspensiones acuosas de NPSiNH-PEG se determinó la participación de al menos dos especies emisoras como responsables de la emisión global. Los espectros de excitación y emisión de estas especies se muestran en la Fig. 4.17. La especie EM1 presenta un máximo de emisión a 448 nm y la especie EM2 un máximo en 490 nm, coincidentes con los máximos observados de las especies que contribuyen a la emisión total de las NPSiNH₂ en suspensión acuosa.

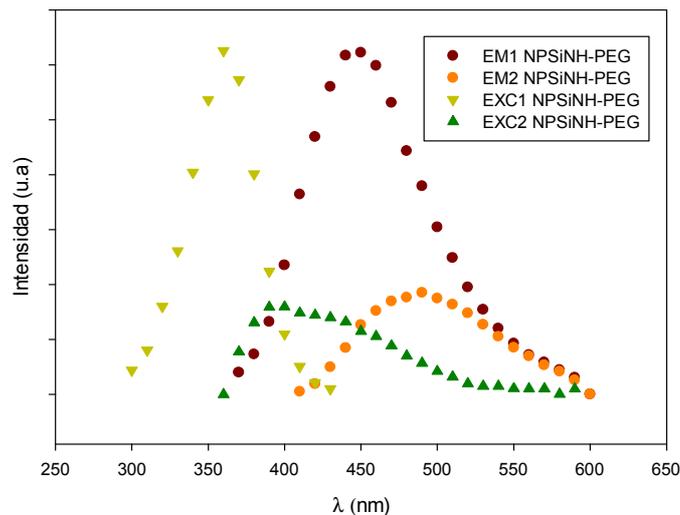


FIGURA 4.17: ESPECIES QUE CONTRIBUYEN A LA FOTOLUMINISCENCIA GENERAL DE LAS NPSiNH-PEG

Un análisis similar de las matrices en la Fig. 4.16 correspondientes a suspensiones acuosas de NPSiNH-Fol también indicó la participación de al menos dos especies emisoras como responsables de la emisión global. Los espectros de excitación y emisión de estas especies se muestran en la Fig. 4.18. La especie EM1 presenta un máximo de emisión a 450 nm y la especie EM2 un máximo en 495 nm, coincidentes, dentro del error del análisis, con los máximos observados de las especies que contribuyen a la emisión total de las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG en suspensión acuosa.

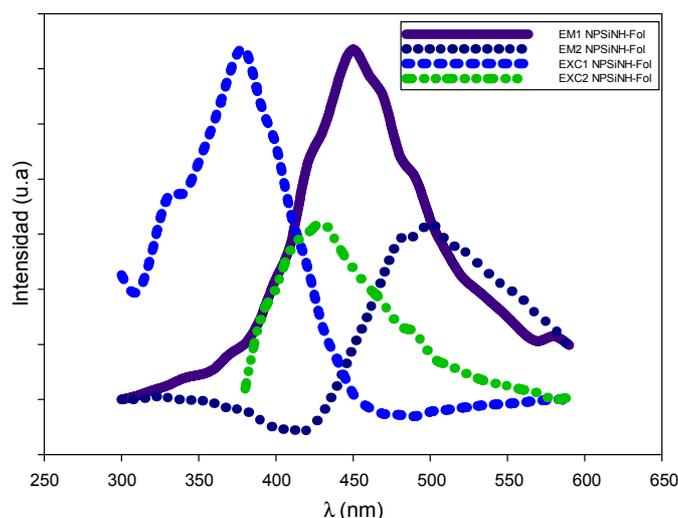


FIGURA 4.18: ESPECIES QUE CONTRIBUYEN A LA FOTOLUMINISCENCIA GENERAL DE LAS NPSiNH-FOL

En su conjunto, los resultados de estos análisis indican que la funcionalización de la superficie de las NPSi no modifica los espectros de excitación – emisión de partículas cuando el centro de silicio semiconductor corresponde a un mismo lote de síntesis.

Espectros de exc-em de las NPSi'PEG en suspensión acuosa

La Fig. 4.19 muestra una matriz de excitación-emisión típica obtenida en suspensión acuosa para las NPSi'PEG. La Fig. 4.20 muestra las especies que contribuyen a la emisión general de estas partículas identificadas mediante un análisis bilineal. En este caso las dos especies responsables de la emisión global presentan máximos de emisión a 410 nm (EM1) y en 460 nm (EM2). Estos valores difieren de los observados para las NPSiNH-PEG, como es de esperar para partículas cuyo centro de silicio proviene de distinto método de síntesis.

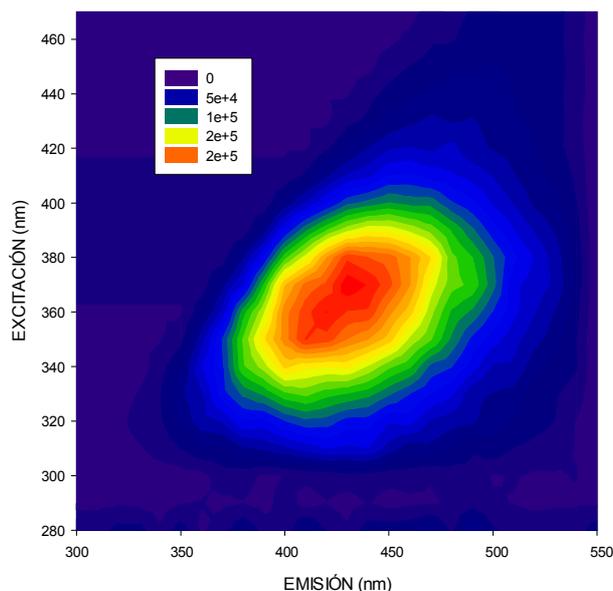


FIGURA 4.19: MATRIZ DE EXCITACIÓN-EMISIÓN EN AGUA DE LAS NPSi'PEG

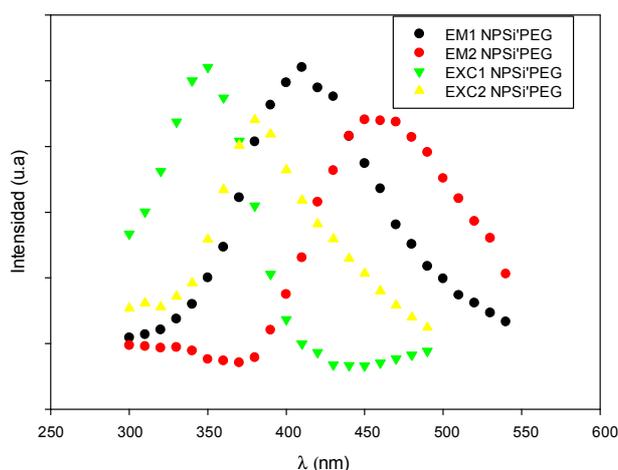


FIGURA 4.20: ESPECIES QUE CONTRIBUYEN A LA FOTOLUMINISCENCIA GENERAL DE LAS NPSi'

Resumiendo nuestras observaciones anteriores, con excepción de las NPSi'PEG que corresponden a síntesis del centro de silicio semiconductor distintos, los datos obtenidos por análisis bilineal de las matrices de exc-em de las diferentes nanopartículas poseen espectros de excitación y de emisión de las especies que contribuyen a la emisión general coincidentes dentro del error de su determinación. Esta observación indica que la fotoluminiscencia de las diferentes nanopartículas implica transiciones comparables, lo que sugiere que las moléculas que recubren las diferentes nanopartículas sintetizadas no modifican las propiedades luminiscentes de las partículas. Las diferencias observadas en los espectros de las NPSi'PEG,

indican que existen algunas diferencias en el tamaño y la morfología en los centros de silicio sintetizados mediante los diferentes precursores iniciales (reducción de SiCl_4 en micelas invertidas y oxidación de siliciuros de magnesio en PEG como medio de reacción). Las Fig. 4.21 y 4.22 comparan los espectros de emisión y de excitación, respectivamente, de los emisores que contribuyen a la luminiscencia total de las NPSi'PEG y las NPSiNH_2 .

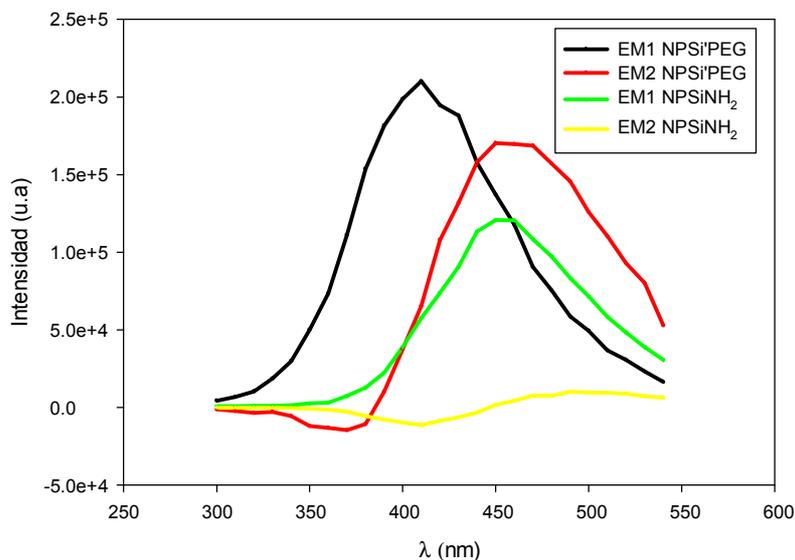


FIGURA 4.21: COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LOS EMISORES QUE CONTRIBUYEN A LA EMISIÓN GLOBAL DE LAS NPSi'PEG Y NPSiNH_2 EN SUSPENSIONES ACUOSAS

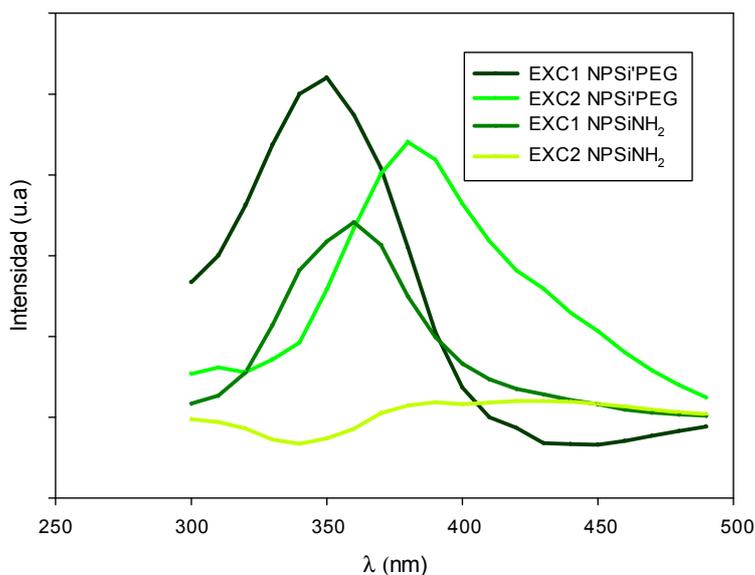


FIGURA 4.22: COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS DE EXCITACIÓN DE LOS EMISORES QUE CONTRIBUYEN A LA EMISIÓN GLOBAL DE LAS NPSi'PEG Y NPSiNH_2 EN SUSPENSIONES ACUOSAS.

Estas figuras muestran que solo uno de las especies emisoras de las NPSi'PEG coincide con una especie de las NPSiNH₂. Las otras especies emiten a menores y mayores energías respectivamente. Si se considera solo al tamaño como responsable de la zona de emisión debido a un efecto de confinamiento cuántico, podría pensarse que las NPSiNH₂ poseen un corazón de silicio con distribución de tamaños desplazado hacia valores más grandes que las NPSi'PEG. Sin embargo, estudios de nuestro grupo han demostrado fehacientemente que la oxidación y el grado de cristalinidad de las NPSi pueden afectar considerablemente los máximos de emisión-excitación. Por ello, con la información reunida en esta tesis no podemos determinar al presente las razones de las diferencias y coincidencias de estos espectros.

2.3. Influencia del pH sobre la luminiscencia de las partículas

Se estudió la variación de la intensidad de emisión de las nanopartículas de silicio con el pH del medio, dado que en los sistemas biológicos (p.ej.: en el interior de las células) este puede cambiar dependiendo de si son células tumorales o sanas, ya en las células enfermas se produce una irrigación desordenada produciéndose zonas de hipoxia y zonas de normoxia. Por tanto, es importante determinar si se producen cambios en la fotofísica de las nanopartículas por la variación de estos parámetros. Para su estudio se realizaron una serie de mediciones de fluorescencia de suspensiones de NPSiNH₂ en medio acuoso modificando el pH.

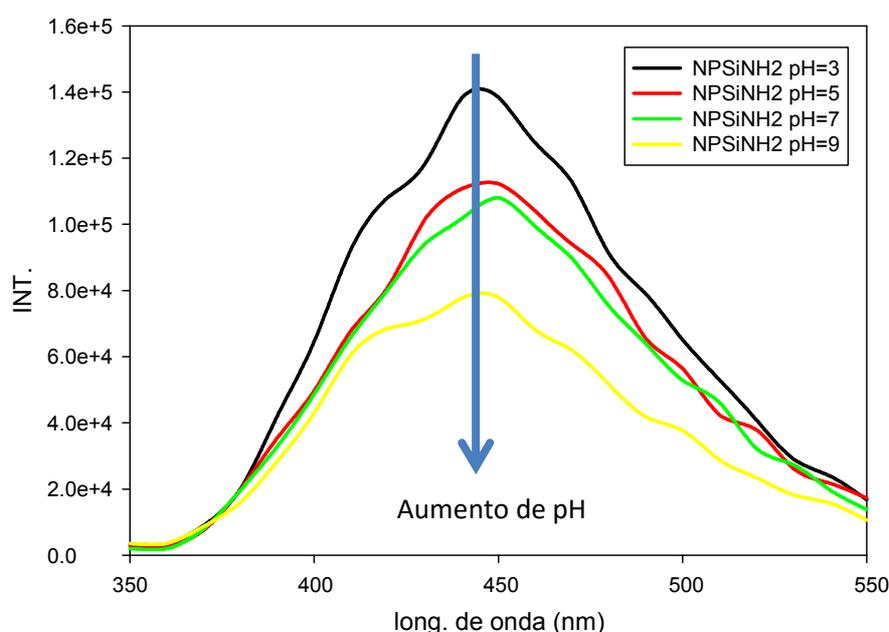


FIGURA 4.23: ESPECTROS DE EMISIÓN PARA LAS NPSiNH₂ A DISTINTOS pH (EXC 350 NM)

Del análisis de los espectros obtenidos puede verse un aumento en la intensidad de emisión para las NPSiNH₂ a medida que el medio se hace más ácido. En medios ácidos, los grupos amino se encuentran protonados, lo que otorga una mayor carga superficial a las partículas. Una posible explicación para esta variación puede darse a partir del cambio en la carga superficial de las NPSiNH₂ que podrían afectar los procesos de decaimiento no radiativo hacia estados superficiales relacionados con la transferencia de carga y/o energía a moléculas ancladas en la superficie de las nanopartículas (Llansola Portolés et al. 2010). Otra consecuencia del aumento en la carga superficial concierne a la mayor repulsión entre nanopartículas lo que desfavorece la formación de aglomerados en suspensión. El efecto de la aglomeración de partículas sobre los procesos fotofísicos de las NPSi es un campo aún poco explorado.

3. Rendimiento Cuántico de Fluorescencia

Para estimar los rendimientos cuánticos de luminiscencia (Φ_{em}) de las diferentes nanopartículas de silicio en suspensión acuosa, se tomaron los espectros de emisión a varias longitudes de onda de excitación. Estos espectros se comparan con los obtenidos para una referencia medidos bajo idénticas condiciones experimentales, tales como misma longitud de onda de excitación, energía de la lámpara, ancho de rendija, e idéntica absorbancia y, de ser posible, en el mismo solvente. Se tomó como referencia al DPA en ciclohexano en ausencia de aire, que emite entre 400 y 500 nm con una eficiencia del 90% mediante excitación en el intervalo de longitudes de onda de 275 a 405 nm (Lakowicz 2006; Llansola Portolés et al. 2010). Los espectros de emisión obtenidos bajo estas condiciones se muestran en la Fig. 4.24 y los valores obtenidos se presentan en la tabla 4.1.

TABLA 4.1: VALORES DE Φ PARA LAS DISTINTAS NPSi (450 NM DE EM Y 350 NM DE EXC)

Muestra	ABS	Φ
9,10-DPA	0,095	1
NPSiNH ₂	0,09	0,11 ± 0,01
NPSiNH-Fol	0,09	0,04 ± 0,01
NPSiNH-PEG	0,067	0,12 ± 0,01
NPSi'PEG	0,075	0,14 ± 0,01

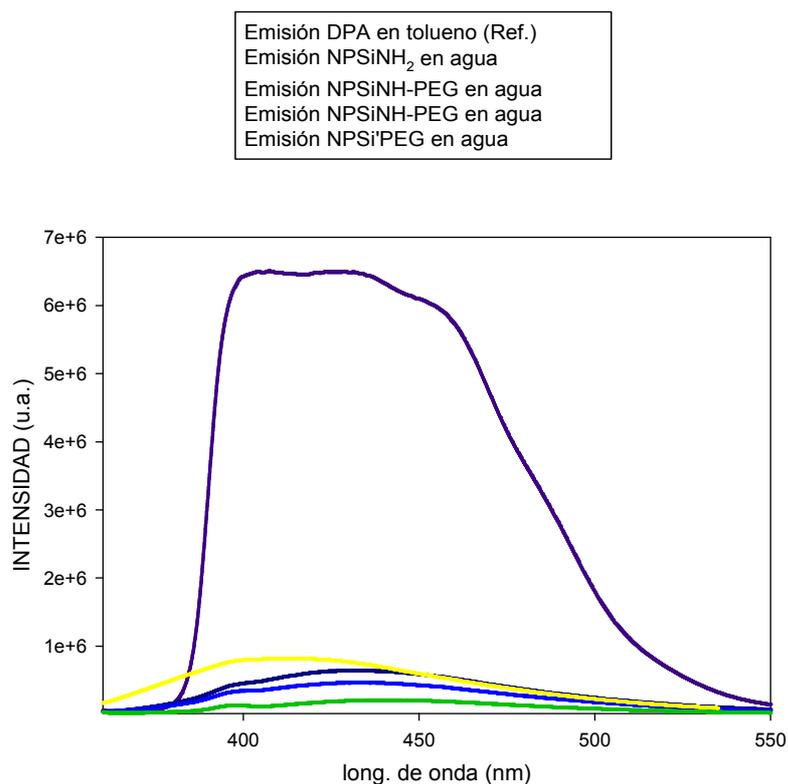


FIGURA 4.24: EMISIÓN DE LAS DIFERENTES NPSi EN SUSPENSIÓN ACUOSA Y LA REFERENCIA DPA EN CICLOHEXANO MEDIANTE LA EXCITACIÓN A 350 NM.

En el caso de utilizar diferentes solventes en las suspensiones de muestra y solución de referencia, se corrige mediante el cuadrado de la relación entre los índices de refracción de los disolventes (Lakowicz 2006). La Ec. 4.1 muestra la relación que permite calcular el rendimiento cuántico de emisión por comparación con una referencia.

$$\Phi = \Phi_R \cdot \frac{I}{I_R} \cdot \left[\frac{(1-10^{-A_R})}{(1-10^{-A})} \right] \cdot \left(\frac{n}{n_R} \right)^2 \quad \text{Ec. 4.1}$$

Los subíndices R se refieren a los valores de la referencia; Φ es el valor de rendimiento cuántico de emisión; I es el área bajo el espectro de emisión; A es la absorción a la longitud de onda de excitación y η es el índice de refracción del medio ($\eta_{\text{agua}} = 1,333$ y $\eta_{\text{tolueno}} = 1,496$).

Los valores de Φ encontrados para las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG se encuentran alrededor del ~11% y del 14% para las NPSi'PEG, siendo del 4% para las NPSiNH-Fol. Estos valores resultan

adecuados para pensar un potencial uso de las NPSi como agentes de obtención de imágenes por fluorescencia. El menor rendimiento cuántico de emisión encontrado para el fólico puede deberse a una participación activa de esta molécula superficial en los procesos de absorción de luz y generación de especies reactivas, tal como se discutirá en el próximo capítulo.

4. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Utilizando la espectroscopia en el dominio de tiempos se realizaron determinaciones de los tiempos de vida de emisión de las diferentes NPSi funcionalizadas en suspensión acuosa. Para la obtención de los resultados se tuvo en cuenta el espectro temporal de la excitación (LED a 341 nm) mediante la deconvolución con los datos de los decaimientos. Las trazas (ver Figuras 4.25 y 4.26 para NPSiNH₂ y NPSiNH-Fol, respectivamente) se ajustaron a decaimientos con uno o dos componentes según la bondad del ajuste (Ec. 4.2 y 4.3).

$$I(t) = I_0 \cdot \sum \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad \text{Ec. 4.2}$$

$$1 = \sum_1^n \alpha_i \quad \text{Ec. 4.3}$$

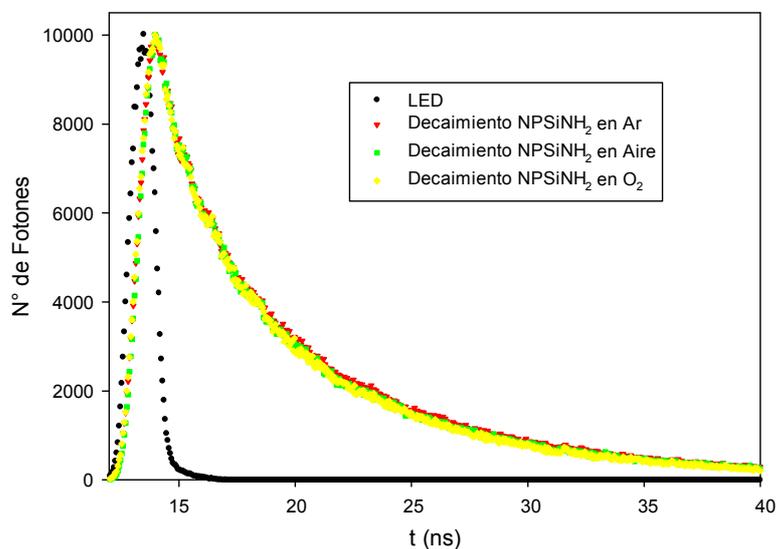


FIGURA 4.25: DECAIMIENTOS DE LAS NPSiNH₂ EN AIRE, ARGÓN Y OXÍGENO

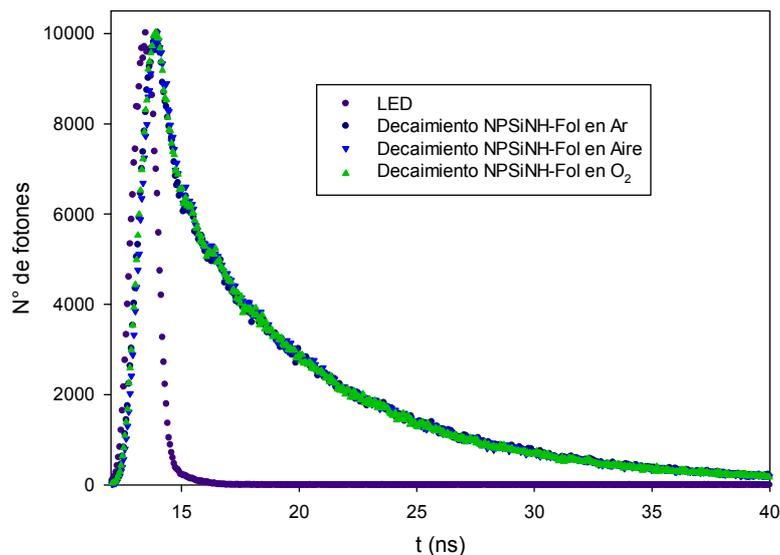


FIGURA 4.26: DECAIMIENTOS DE LAS NPSiNH-FOL EN AIRE, ARGÓN Y OXÍGENO

Los resultados obtenidos para las diferentes NPSi en las distintas condiciones se muestran en la Tabla 4.2.

Los datos obtenidos están de acuerdo con los publicados por diferentes autores con nanopartículas de tamaños entre 2-4 nm y de diverso origen. Por ejemplo, nanopartículas de 2 nm recubiertas con 3-viniltiofeno en suspensión de etanol con emisión a 460 nm muestran tiempos de decaimiento de 1,3 ns (Kuntermann et al. 2008). Cristales de silicio esféricos de 4,64 nm modificados superficialmente con octanotiol mostraron un decaimiento en 600 nm de 3,1 ns (English et al. 2002).

TABLA 4.2: VALORES DE TIEMPOS DE VIDA EN AIRE, AR Y O₂ PARA LAS DIFERENTES NPSi

NPSi	τ (ns) (% em) Ar	τ (ns) (% em) Aire	τ (ns) (% em) O ₂
NPSiNH ₂	10,26 ± 0,04 (60)	9,80 ± 0,03 (60)	9,31 ± 0,03 (60)
	4,18 ± 0,1(40)	3,72 ± 0,07 (40)	3,72 ± 0,08 (40)
NPSiNH-PEG	11,43 ± 0,06 (44)	11,82 ± 0,06 (44)	11,18 ± 0,05 (44)
	3,77 ± 0,07 (56)	3,96 ± 0,07 (56)	3,65 ± 0,06 (56)
NPSiNH-Fol	8,31 ± 0,03 (74)	8,15 ± 0,03 (74)	7,92 ± 0,03 (74)
	4,22 ± 0,2 (26)	4,01 ± 0,02 (26)	3,97 ± 0,2 (26)

A partir de los datos señalados en la tabla 4.2 se observa que todas las nanopartículas presentan un decaimiento luminiscente biexponencial. El hecho de que existan dos tiempos de vida está de acuerdo con la presencia de dos especies contribuyentes a la emisión total. A excepción de las NPSiNH-PEG, se observa una disminución de los tiempos de vida más largos a medida que aumenta el % de oxígeno. Estos datos indican la ocurrencia de un quenching dinámico de la fluorescencia para el caso de las NPSiNH₂ y NPSiNH-Fol, cuyas constantes de quenching (Kq) pueden calcularse a partir de la relación de Stern-Volmer (Ec. 4.4).

Es de notar que para emisiones luminiscentes que decaen en tiempos del orden o menores a 3 nseg, los procesos de quenching dinámicos en solventes a temperatura ambiente no son de importancia, debido a la poca probabilidad de que la partícula y las moléculas de oxígeno distantes se encuentren en dicho tiempo (Lakowicz 2006).

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + Kq[O_2] \quad \text{Ec. 4.4}$$

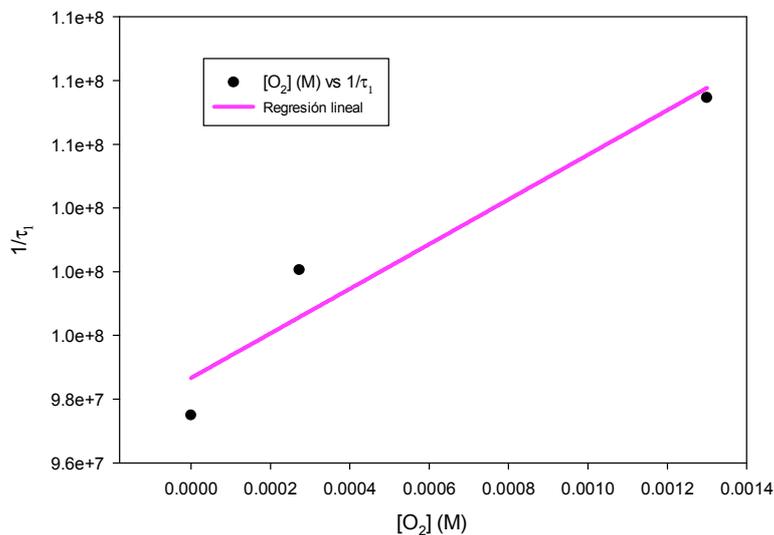


FIGURA 4.27: DETERMINACIÓN DE LA Kq DE LAS NPSiNH₂

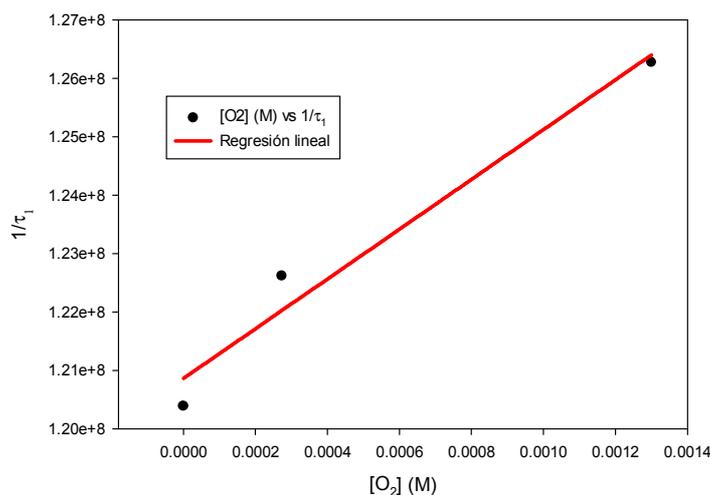


FIGURA 4.28: DETERMINACIÓN DE LA K_q DE LAS NPSiNH-FOL

De los valores de las pendientes de los ajustes de la Fig. 4.27 y 4.28 se obtuvieron los valores de $K_q = 7 \times 10^9 \pm 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $K_q = 4,0 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las NPSiNH₂ y NPSiNH-Fol respectivamente. Los valores obtenidos son del orden de los encontrados para muchos colorante orgánicos. El hecho de que no se observe un quenching dinámico para la componente de decaimiento más larga de las NPSiNH-PEG podría ser una consecuencia de la protección eficiente de superficie de la partícula por las cadenas de PEG que impiden el proceso de transferencia de energía de la partícula al oxígeno. Mayor evidencia sobre la protección de la superficie de las NPSi por las cadenas de PEG se discutirá más adelante.

5. Emisión en presencia de suero fetal bovino.

La adición de cantidades crecientes de suero fetal bovino (SFB) sobre suspensiones acuosas de NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG conduce a un aumento de la luminiscencia de las partículas, sin que se modifique la forma de los espectros, como se muestra en la figura 4.29 para las NPSiNH₂.

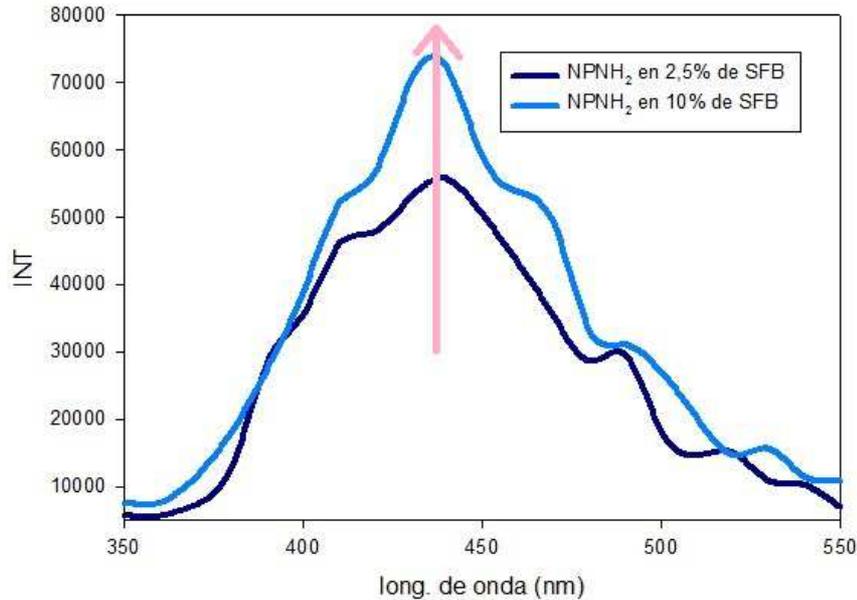


FIGURA 4.29: AUMENTO EN LA EMISIÓN DE LAS NPSiNH₂ EN PRESENCIA DE SFB (EXC 350 NM)

Por otro lado, la adición de cantidades crecientes de NPSiNH₂, NPSiNH-PEG, y NPSiNH-Fol a soluciones acuosas al 10% de SFB conduce a una disminución de la fluorescencia de las proteínas del SFB (máximos de emisión a 345-350 y 290-300 nm para la excitación), tal como se muestra en las Fig. 4.30 y 4.31 para el agregado de NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG respectivamente. Los tiempos de decaimiento de la fluorescencia de los residuos de triptófano pueden ajustarse a un decaimiento bi-exponencial cuyos valores resultan $\tau_1 = (1,88 \pm 0,03)$ ns y $\tau_2 = (6,60 \pm 0,03)$ ns, respectivamente. Estos tiempos de decaimiento no se vieron afectados, dentro del error experimental, mediante el agregado de NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG. Por lo tanto, se sugiere un quenching estático debido a la formación de complejos en el estado fundamental BSA - NPSiNH₂ y BSA - NPSiNH-PEG, respectivamente (Alarcón et al. 2012). La estabilización de diversas nanopartículas por albumina bovina o de suero humano (BSA / HSA) ha sido publicado en la literatura (Rahman 2013) y asignado al entorno hidrófobo proporcionado por BSA y HSA (Ying et al. 2004; Lynch y Dawson 2008). Por otra parte, teniendo en cuenta que los disolventes hidrófobos y la cobertura de la superficie aumentan la fotoluminiscencia de las partículas (Romero et al. 2013), los resultados observados apoyan fuertemente la interacción entre la estructura de las proteínas del SFB y las NPSi.

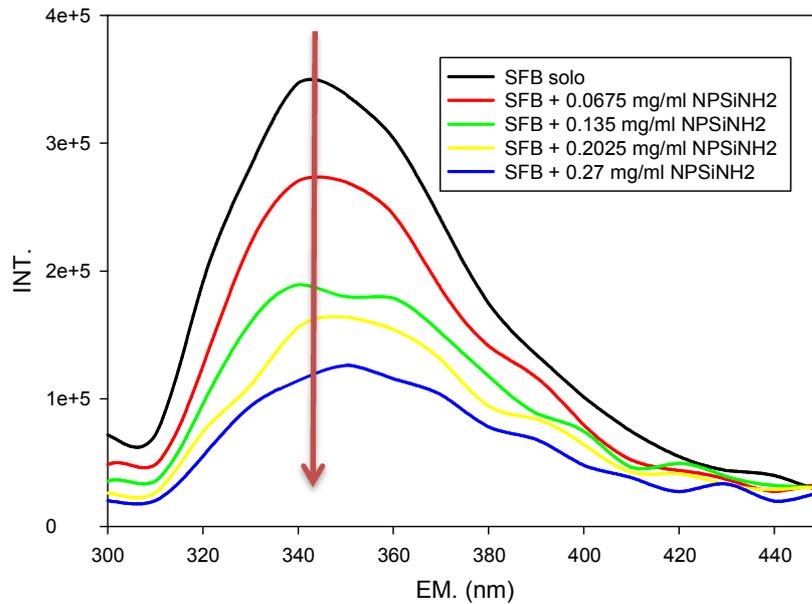


FIGURA 4.30: ESPECTROS DE EMISIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SFB POR AGREGADO DE NPSiNH₂ (EXC 300 nm)

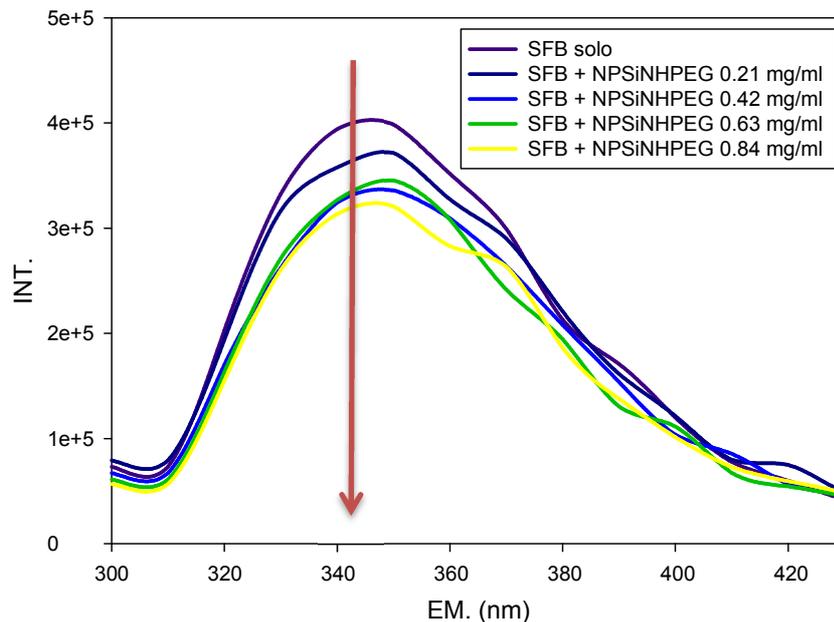


FIGURA 4.31: QUENCHING DE LA EMISIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SFB POR AGREGADO DE NPSiNH-PEG (EXC 300 nm)

Recientemente, se ha informado en la literatura, la formación de complejos en el estado fundamental entre puntos cuánticos de silicio terminados en propilamina y BSA (Chatterjee y

Mukherjee 2014). El quenching de la intensidad de luminiscencia de residuos de triptófano por adición de NPSi puede ser analizado mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ec. 4.5):

$$\frac{I_{0FBS}}{I_{FBS}} = I + K_{SV} \times [NPSi] \quad Ec. 4.5$$

donde: I_{0FBS} y I_{FBS} son las intensidades de fluorescencia integradas (áreas bajo las curvas de fluorescencia) en ausencia y presencia de nanopartículas, corregidas por efectos de filtro interno (Alarcón et al. 2012) y K_{SV} es la constante de quenching de Stern-Volmer. La corrección por efectos de filtro interno debe ser realizada para descartar que el quenching de la fluorescencia de la proteína no esté relacionado por la absorción de luz por parte de las nanopartículas en la longitud de onda de excitación de la proteína y/o por la absorción de la fluorescencia emitida por la proteína por parte de las nanopartículas. Con el fin de tener en cuenta estos efectos de filtro interno, las intensidades de fluorescencia medidas pueden ser corregidas según la Ec. 4.6.

$$I_{corr} = I_{obs} \cdot 10^{(ABS_{exc} + ABS_{em})/2} \quad Ec. 4.6$$

Donde el factor 2 supone que la absorción y la emisión se lleva a cabo en el centro de la celda. En esta ecuación, ABS_{exc} es la absorbancia de las nanopartículas a la longitud de onda de excitación de la proteína y ABS_{em} es la absorbancia de las nanopartículas a la longitud de onda de emisión de la proteína.

La relación I_{0FBS} / I_{FBS} muestra una dependencia lineal con la concentración de partículas, como se muestra en la Fig. 4.32, y esto concuerda con un modelo de quenching estático como proceso principal.

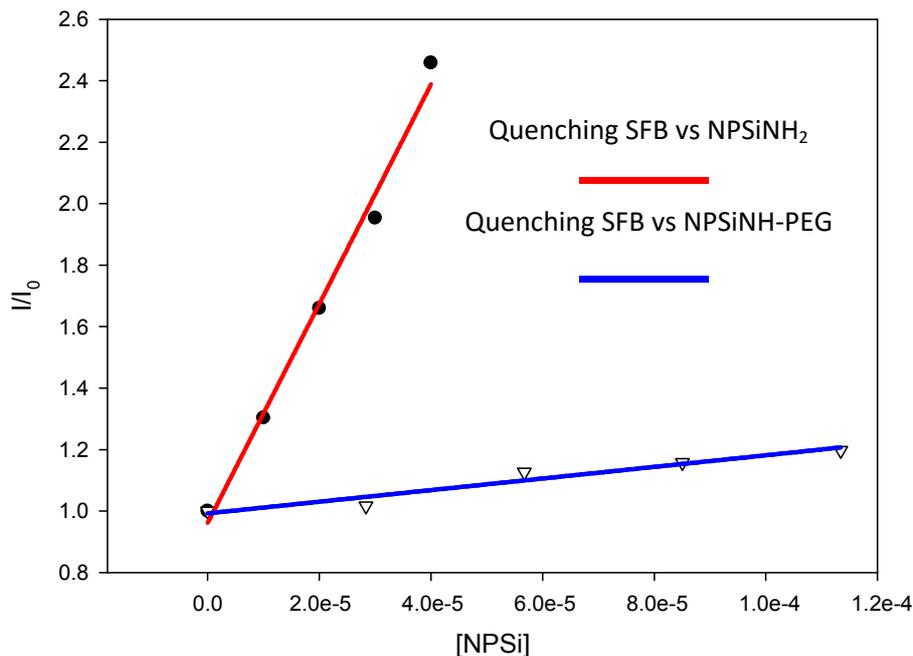


FIGURA 4.32: AJUSTE LINEAL QUENCHING DE LA EMISIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SFB POR AGREGADO DE NPSi (EXC 300 NM)

Por lo tanto, las NPSi se unen a los residuos de triptófano en el interior de la proteína y K_{SV} representa la constante de unión BSA:NPSi. De la pendiente de los gráficos se obtienen $K_{SV} = (3,56 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para los complejos BSA:NPSiNH₂, del orden de los valores publicados para la interacción de la mayoría de las moléculas con albúmina, y $K_{SV} = (1,89 \pm 0,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para BSA:NPSiNH-PEG. El hecho de que la constante de unión encontrada para las NPSiNH-PEG sea menor que la encontrada para las NPSiNH₂, puede indicar que las nanopartículas PEGiladas interactúan de manera distinta con la BSA, ya sea por tener una menor afinidad por la proteína o bien porque no se ubican en un sitio favorable dentro de la proteína que permita un quenching eficiente de la emisión de los residuos de triptófano de la BSA. Para calcular la concentración molar de las NPSi a partir de los valores en mg obtenidos por pesada, se utilizaron los datos y las aproximaciones discutidas en el capítulo 3.

El aumento de la fluorescencia de las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG por la adición de cantidades crecientes de SFB para longitudes de onda de excitación donde el SFB no absorbe (es decir, 350 nm), también puede ser estudiado mediante un gráfico doble recíproco siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand (Ec. 4.7):

$$\frac{I}{I_{NPSi} - I_{0NPSi}} = \frac{I}{I_{\infty NPSi} - I_{0NPSi}} + \frac{I}{[K_{BH}(I_{\infty NPSi} - I_{0NPSi})]} + \frac{I}{[SFB]} \quad \text{Ec. 4.7}$$

donde I_{0NPSi} , I_{NPSi} y $I_{\infty NPSi}$ son las integrales de las intensidades de fluorescencia de las NPSi en ausencia de proteína, a una concentración de proteína intermedia, y a una concentración de interacción completa, respectivamente; K_{BH} es la constante de unión.

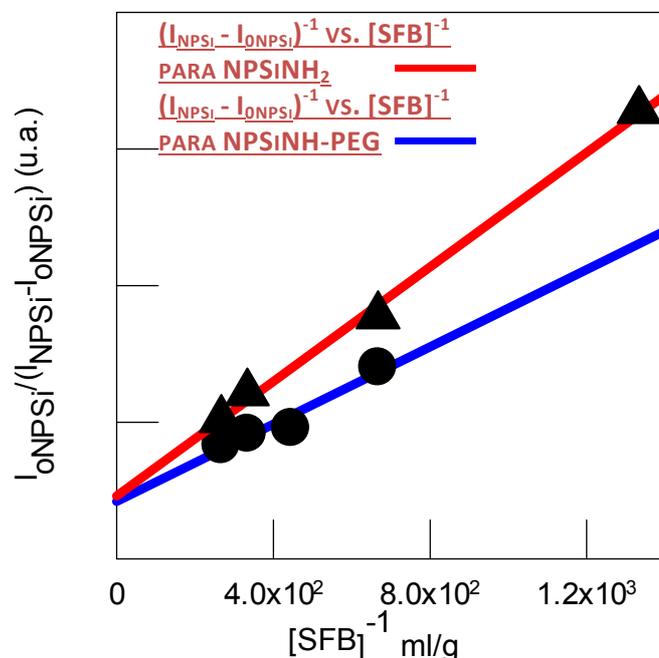


FIGURA 4.33: REGRESIÓN LINEAL DE $(I_{NPSi} - I_{0NPSi})^{-1}$ VS. $[SFB]^{-1}$ PARA NPSiNH₂ Y NPSiNH-PEG

La Figura 4.33 muestra los gráficos lineales de $(I_{NPSi} - I_{0NPSi})^{-1}$ vs. $[SFB]^{-1}$ para NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG. A partir de la pendiente y la ordenada de estos gráficos, se pueden obtener las constantes de unión K_{BH} . Los espectros de emisión se tomaron fijando la longitud de onda de excitación a 350 nm, y concentraciones de $1,1 \times 10^{-4}$ M y $1,9 \times 10^{-5}$ M de las NPSiNH-PEG y NPSiNH₂ respectivamente.

Teniendo en cuenta que el SFB comercial tiene un 3,0-4,5% en peso de proteína total y asumiendo que la albúmina es la principal proteína presente (Valeur 2001), se pueden estimar las constantes de unión para NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG en $(2 \pm 1) \times 10^4$ y $(4 \pm 2) \times 10^3$ M⁻¹ respectivamente. Estos valores están en el orden de las constantes de unión respectivas obtenidas a partir de los experimentos de quenching de la fluorescencia. Esta coincidencia sugiere que el incremento de la luminiscencia de las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG se relaciona con la formación de complejos en el estado fundamental BSA:NPSi.

La luminiscencia de las NPSiNH-Fol no se ve aumentada por la adición de cantidades crecientes de SFB. Sin embargo, la adición de NPSiNH-Fol (0,075 g/l de NPSiNH-Fol) a las

soluciones de SFB produce un quenching de la fluorescencia y de los tiempos de decaimiento de los residuos de triptófano a valores de $\tau_1 = 1,38 \pm 0,03$ ns y $\tau_2 = 5,55 \pm 0,03$ ns. Se evidencia entonces un proceso de quenching estático y dinámico entre NPSiNH-Fol y la BSA que son responsables de la curvatura ascendente observada en el gráfico de Stern-Volmer de la Fig. 4.34. El análisis de los datos permite obtener un valor de $K_{SV} = (1,5 \pm 1) \times 10^4$ M⁻¹ que está en el orden de los valores encontrados para los complejos BSA:NPSiNH₂.

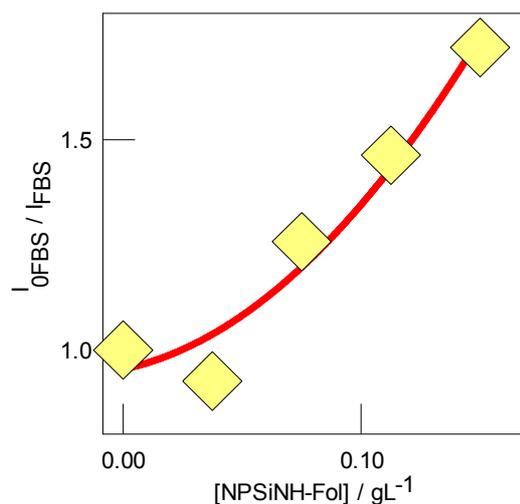


FIGURA 4.34: QUENCHING DE LA EMISIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SFB POR AGREGADO DE NPSiNH-FOL

La observación de que el espectro de emisión del triptófano se solapa con el espectro de excitación de las nanopartículas, como se muestra en la figura 4.35, podría indicar la ocurrencia de un fenómeno de transferencia de energía de resonancia (RET) entre el triptófano (donante) y las NPSi (aceptor). De hecho, la aparición del espectro de excitación de la BSA mientras se detecta la emisión de las NPSiNH₂ en mezclas SFB-NPSiNH₂ (figura 4.36), apoya firmemente la ocurrencia de un fenómeno de transferencia de energía de resonancia (RET) entre los residuos de triptófano de la BSA y las NPSiNH₂. Sin embargo, este comportamiento no se observa para las mezclas de SFB y NPSiNH-Fol y NPSiNH-PEG lo que sugiere que la transferencia de energía de resonancia en estos sistemas no es de importancia. Las últimas observaciones indican que las interacciones BSA/NPSi dependen fuertemente de la cobertura de la superficie de la partícula.

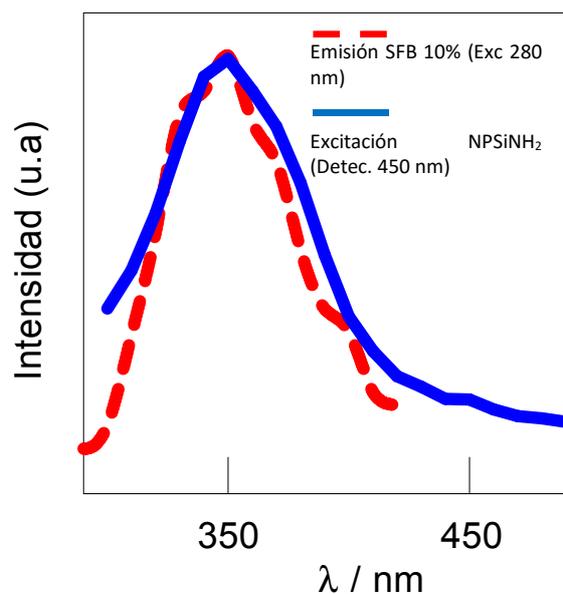


FIGURA 4.35: SUPERPOSICIÓN DEL ESPECTRO DE EMISIÓN DEL SFB CON EL ESPECTRO DE EXCITACIÓN DE LAS NPSiNH₂

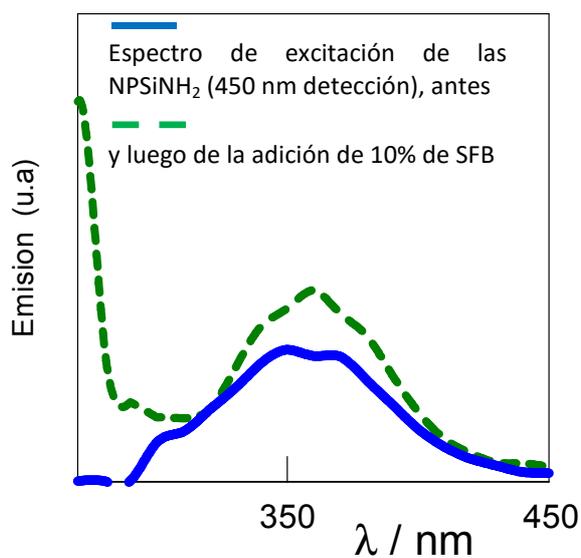


FIGURA 4.36: APARICIÓN DEL ESPECTRO DE EXCITACIÓN DE LA BSA MIENTRAS SE DETECTA LA EMISIÓN DE LAS NPSiNH₂ EN UNA MEZCLA NPSiNH₂/SFB (10%)

Conclusiones:

En el intervalo de concentraciones utilizadas, la absorbancia de las nanopartículas aumenta linealmente con la concentración de las mismas, observándose un cumplimiento de la ley de Beer. Esto permitió determinar los coeficientes de extinción molares, cuyos valores resultaron ser del orden de los que presentan los colorantes orgánicos.

Se puede observar en base a los datos obtenidos, que el recubrimiento superficial no afecta la forma de los espectros de emisión de las diferentes nanopartículas constituidas por un corazón de silicio semiconductor provenientes de un mismo proceso de síntesis (reducción de CCl_4 en micelas invertidas). Nanopartículas con corazones de silicio semiconductor provenientes de distintos procesos de síntesis muestran espectros algo diferentes, como consecuencia de una distribución de tamaños y morfologías diferentes, así como distinto grado de cristalinidad.

El análisis bilineal de las diferentes nanopartículas parece indicar la existencia de más de una especie responsable de la emisión general. Esta observación está también de acuerdo con la presencia de dos tiempos de vida luminiscentes. Los diferentes emisores que contribuyen a la emisión global de cada tipo de partícula pueden deberse a la presencia de dos familias de partículas diferentes, que difieren en el tamaño y /o en su morfología. Es de destacar que solo los emisores con tiempos de vida mayores a los 3 ns muestran un quenching dinámico frente al oxígeno molecular, con excepción de las partículas derivatizadas con PEG. En este último caso, el PEG ofrecería un efecto protector de la superficie como se discute para la interacción de estas nanopartículas con proteínas.

Las partículas aminadas, dado el carácter ácido-base de su recubrimiento y su capacidad de adoptar carga superficial positiva en función del pH del medio, muestran cambios en la intensidad de la emisión luminosa que puede deberse a efectos de repulsión electrostática entre partículas de igual carga superficial o bien a cambios en los procesos de decaimiento no radiativos.

Los valores obtenidos para los rendimientos cuánticos de fluorescencia resultan prometedores para pensar en la utilidad de estas nanopartículas en la obtención de imágenes.

Finalmente se estudió el fenómeno de interacción entre las proteínas del SFB y las diferentes NPSi, dichos resultados muestran la ocurrencia de un fenómeno de transferencia de energía que puede resultar de utilidad en distintas aplicaciones. Así mismo, el proceso de PEGilación

sobre las NPSiNH₂ para obtener las NPSiNH-PEG parece modificar la interacción de estas últimas con las proteínas del SFB ya sea por cambios de la afinidad entre ambas o bien a una modificación en las distancias óptimas donde ocurre la interacción.

Bibliografía:

- Alarcón E, Aspée a., Abuin EB, Lissi E a. (2012) Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements. *J Photochem Photobiol B Biol* 106:1–17. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.11.002
- Belomoin G, Therrien J, Nayfeh M (2000) Oxide and hydrogen capped ultrasmall blue luminescent Si nanoparticles. *Appl Phys Lett* 77:779. doi: 10.1063/1.1306659
- Chatterjee S, Mukherjee TK (2014) Spectroscopic investigation of interaction between bovine serum albumin and amine-functionalized silicon quantum dots. *Phys Chem Chem Phys* 16:8400. doi: 10.1039/c4cp00372a
- Choi J, Wang NS, Reipa V (2007) Photoassisted tuning of silicon nanocrystal photoluminescence. *Langmuir* 23:3388–3394. doi: 10.1021/la062906+
- English DS, Pell LE, Yu Z, et al (2002) Size Tunable Visible Luminescence from Individual Organic Monolayer Stabilized Silicon Nanocrystal Quantum Dots. *Nano Lett* 2:681–685. doi: 10.1021/nl025538c
- Hua F, Erogbogbo F, Swihart MT, Ruckenstein E (2006) Organically capped silicon nanoparticles with blue photoluminescence prepared by hydrosilylation followed by oxidation. *Langmuir* 22:4363–4370. doi: 10.1021/la0529106
- Juzenas P, Chen W, Sun YP, et al (2008) Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1600–1614. doi: 10.1016/j.addr.2008.08.004
- Kuntermann V, Cimpean C, Brehm G, et al (2008) Femtosecond transient absorption spectroscopy of silanized silicon quantum dots. *Phys Rev B* 77:115343. doi: 10.1103/PhysRevB.77.115343
- Lakowicz JR (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. PlenumPublishers
- Larson DR (2003) Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science* (80-) 300:1434–1436. doi: 10.1126/science.1083780
- Littau A, Muller AJ (1993) A luminescent silicon nanocrystal colloid via a high-temperature aerosol reaction. *J Phys Chem* 97:1224–1230. doi: 10.1021/j100108a019
- Llansola Portolés MJ, David Gara PM, Kotler ML, et al (2010) Silicon nanoparticle photophysics and singlet oxygen generation. *Langmuir* 26:10953–10960. doi: 10.1021/la100980x
- Llansola Portolés MJ, Nieto FR, Soria DB, et al (2009) Photophysical properties of blue-emitting silicon nanoparticles. *J Phys Chem C* 113:13694–13702. doi: 10.1021/jp903727n
- Lynch I, Dawson K a. (2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3:40–47. doi: 10.1016/S1748-0132(08)70014-8

- Morgan NY, Kramer-Marek G, Smith PD, et al (2009) Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers: calculation of required physical parameters. *Radiat Res* 171:236–244. doi: 10.1667/RR1470.1
- Prendergast D, Grossman JC, Williamson AJ, et al (2004) Optical properties of silicon nanoparticles in the presence of water: A first principles theoretical analysis.
- Rahman M (2013) *Protein-Nanoparticle Interactions in The Bio-Nano Interface*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al (2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods* 5:763–775. doi: 10.1038/nmeth.1248
- Rogozhina E V., Eckhoff D a., Gratton E, Braun P V. (2006) Carboxyl functionalization of ultrasmall luminescent silicon nanoparticles through thermal hydrosilylation. *J Mater Chem* 16:1421. doi: 10.1039/b509868h
- Romero JJ, Llansola-Portolés MJ, Dell’Arciprete ML, et al (2013) Photoluminescent 1-2 nm sized silicon nanoparticles: A surface-dependent system. *Chem Mater* 25:3488–3498. doi: 10.1021/cm401666a
- Rosso-Vasic M, Spruijt E, Lagen B Van (2008) Synthesis and Photophysics of functionalized silicon nanoparticles.
- Rosso-Vasic M, Spruijt E, Van Lagen B, et al (2008) Alkyl-functionalized oxide-free silicon nanoparticles: Synthesis and optical properties. *Small* 4:1835–1841. doi: 10.1002/smll.200800066
- Sweryda-Krawiec B, Cassagneau T, Fendler JH (1999) Surface Modification of Silicon Nanocrystallites by Alcohols. *J Phys Chem* 103:9524–9529. doi: 10.1021/jp992298p
- Valeur B (2001) Resonance Energy Transfer and Its Applications. In: *Molecular Fluorescence*. pp 247–272
- Wolkin M V., Jorne J, Fauchet PM, et al (1999) Electronic States and Luminescence in Porous Silicon Quantum Dots: The Role of Oxygen. *Phys Rev Lett* 82:197–200. doi: 10.1103/PhysRevLett.82.197
- Ying P, Jin G, Tao Z (2004) Competitive adsorption of collagen and bovine serum albumin—effect of the surface wettability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 33:259–263. doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.10.015
- Zhang X, Neiner D, Wang S, et al (2007) A new solution route to hydrogen-terminated silicon nanoparticles: synthesis, functionalization and water stability. doi: 10.1088/0957-4484/18/9/095601
- Zhao X, Li H, Lee RJ (2008) Targeted drug delivery via folate receptors. *Expert Opin Drug Deliv* 5:309–319. doi: 10.1517/17425247.5.3.309

Capítulo 5

GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS

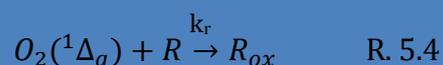
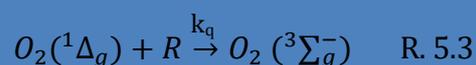
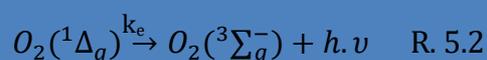
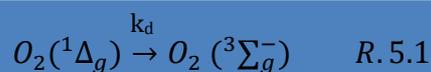
Introducción

1. Nanopartículas como Sensibilizadores de Especies Reactivas del Oxígeno

1.1 Oxígeno Singulete

El estado electrónico fundamental del oxígeno molecular (O_2 ($X^3\Sigma_g^-$)) es paramagnético debido a dos spines electrónicos paralelos. Existen dos estados excitados energéticamente más próximos que surgen de la misma configuración electrónica pero con diferente paridad de spin $^1\Delta_g$ y el $^1\Sigma_g^+$ que poseen energías 94 y 158 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ sobre el estado fundamental triplete $^3\Sigma_g^-$ respectivamente (DeRosa and Crutchley 2002). El estado $^1\Sigma_g^+$ se desactiva rápidamente (130 ns en tetracloruro de carbono) al estado $^1\Delta_g$ de forma que el primero no tiene posibilidades de reaccionar (Wilkinson 1995). Por lo tanto, el término oxígeno singulete suele referir solo a la especie O_2 ($^1\Delta_g$). La transición del estado $^1\Delta_g$ al $^3\Sigma_g^-$ aun estando prohibida por las reglas de selección, ocurre a 1268,7 nm; lo que le confiere al estado singulete un tiempo de vida relativamente largo. La energía necesaria para generar el estado $O_2(^1\Delta_g)$ usualmente es transferida mediante colisiones entre el oxígeno molecular y un compuesto que se encuentre en estado excitado (sensibilizador).

El oxígeno singulete puede desactivarse en forma no radiativa por transferencia de energía con el solvente (R. 5.1) y en forma radiativa emitiendo luz (R. 5.2). También puede interactuar con un sustrato, transfiriendo su exceso de energía mediante quenching físico (R. 5.3) y/o reaccionar con el sustrato para dar lugar a la fotooxidación (R. 5.4). Se designa constante total de quenching (k_t) a la suma de los procesos físicos (k_q) y reactivos (k_r).



La generación de oxígeno singulete tiene importantes aplicaciones en química medioambiental (David Gara et al. 2009) y biológica; particularmente en terapia fotodinámica del cáncer (Braslavsky et al. 1997). Por tanto, es necesario desarrollar sensibilizadores biocompatibles que

presenten baja toxicidad inherente y alta eficiencia de generación de oxígeno singlete en entornos biológicos.

La terapia fotodinámica (photodynamic therapy o PDT) es una modalidad terapéutica mínimamente invasiva aprobada para el tratamiento clínico de varios tipos de cáncer y trastornos no oncológicos (Juarranz et al. 2008). En PDT, un fotosensibilizador (FS) o un compuesto con propiedades fotosensibilizantes se acumula selectivamente en los tejidos malignos. La posterior activación del FS por la luz visible, preferentemente en la región roja del espectro electromagnético ($\lambda \geq 600$ nm), donde los tejidos son más permeables a la luz, genera especies reactivas del oxígeno, principalmente oxígeno singlete (1O_2), responsables de la citotoxicidad de las células neoplásicas y la regresión del tumor. La terapia fotodinámica es potencialmente útil debido a su especificidad: sólo las células en estrecha proximidad al fotosensibilizador se ven afectadas, y el fotosensibilizador no es citotóxico hasta no ser activado por una fuente luminosa, permitiendo que el exceso de reactivo se elimine del sistema. Esta especificidad podría ser especialmente valiosa en la orientación hacia células tumorales para no dañar el tejido circundante.

1.2. Radical Anión Superóxido

El radical anión superóxido (O_2^-) es el radical derivado por adición de un electrón al oxígeno molecular. Se encuentra en equilibrio (R. 5.5) con el radical hidroperóxido con un pK de 4,88. Es uno de los aniones radicales más simples y uno de los más importantes tanto en química de fase acuosa del medio ambiente como en los procesos biológicos celulares (Muller et al. 2007). Esta especie es capaz de reaccionar con una gran variedad de sustratos debido a su naturaleza aniónica, radical y reductora aunque las reacciones nucleofílicas y de transferencia de electrones son los caminos predominantes por los que reacciona (Frimer y Rosenthal 1978).



Esta especie reactiva de oxígeno ocupa un rol central en muchas enfermedades, ya que participa en una extensa variedad de procesos metabólicos. El superóxido no es, como se pensó en el pasado, solo un tóxico que se produce como producto del metabolismo del oxígeno. Por el contrario, actualmente se ha postulado como un intermediario del metabolismo capaz de regular la oxidación-reducción de los genes junto con otros químicos. Estos mecanismos son vitales para el correcto funcionamiento de la célula (McCord 2000).

2. Generación de Oxígeno Singulete

La extinción de la luminiscencia en presencia de O_2 puede ser un signo de formación de 1O_2 . Para demostrar si las nanopartículas de silicio son capaces de producir oxígeno singulete, se realizaron tres series de experimentos:

- La detección del consumo de oxígeno molecular durante la irradiación continua de suspensiones acuosas de nanopartículas de silicio con luz de 350 nm, en presencia y ausencia de sondas específicas de 1O_2 como el alcohol furfurílico (AF) y la azida de sodio (AzNa).
- El uso de una sonda fluorescente específica para el 1O_2 (SOSG®).
- Experimentos resueltos en el tiempo de detección de la luminiscencia del 1O_2 a 1.270 nm.

2.1 Consumo de Oxígeno Molecular

Se ha investigado la capacidad de las diferentes NPSi de fotosensibilizar la generación de O_2 ($^1\Delta_g$). Para ello se midió la generación de O_2 ($^1\Delta_g$) de forma indirecta como consumo de O_2 disuelto mediante un conjunto de tres experimentos que fueron descritos en el Capítulo 2.

La Fig. 5.2 muestra los cambios en la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo ($\ln C/C_0$) cuando se irradia una suspensión acuosa de $NPSiNH_2$ conteniendo solo las nanopartículas (ensayo 1), en presencia de alcohol furfurílico (AF, ensayo 2) y en presencia de AF y azida de sodio (AzNa, ensayo 3). Puede verse que no se produce una disminución en los valores de oxígeno molecular disuelto cuando se irradia una suspensión de $NPSiNH_2$ solas. En cambio, cuando se realiza el agregado de alcohol furfurílico se observa una caída de los niveles de oxígeno molecular, lo que estaría evidenciando la formación de oxígeno singulete. Para terminar de corroborar esta evidencia experimental, se realiza un tercer experimento agregando a la solución anterior azida de sodio que es un quenching físico eficiente del oxígeno singulete. En este último ensayo se observa que los niveles de oxígeno molecular se recuperan parcialmente durante la irradiación cuando se lo compara con el ensayo 2.

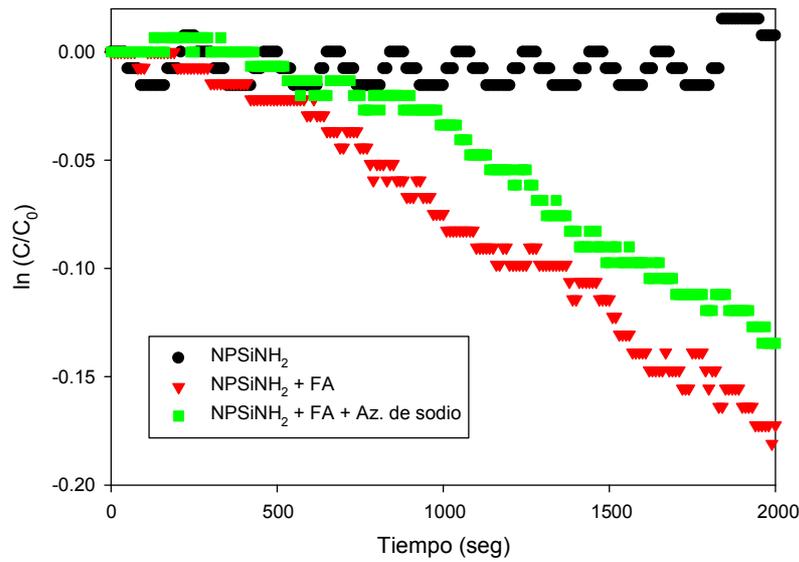


FIGURA 5.2: CONSUMO DE OXÍGENO MOLECULAR PARA LAS NPSiNH₂ (EXC 350 NM Y T 20°C)

Un experimento similar se realizó con una suspensión de NPSiNH-PEG. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 5.3. Se observa que los niveles de oxígeno molecular disuelto descienden cuando una suspensión de NPSiNH-PEG es irradiada en presencia de AF, y que el agregado de AzNa produce una recuperación parcial de los niveles de oxígeno molecular.

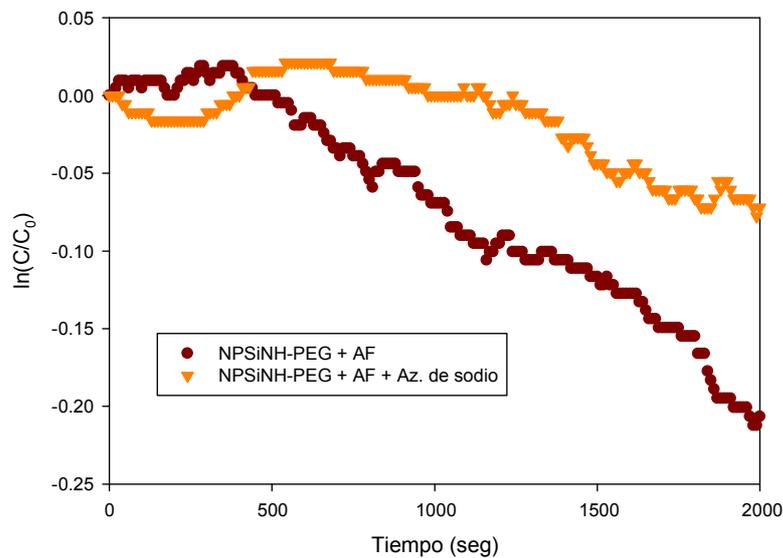


FIGURA 5.3: CONSUMO DE OXÍGENO MOLECULAR PARA LAS NPSiNH-PEG (EXC 350 NM Y T 20°C)

Finalmente la Fig. 5.4 muestra los resultados obtenidos al irradiar una suspensión acuosa de NPSiNH-Fol. En ella se observa un descenso moderado de los niveles de oxígeno molecular disuelto cuando se irradia una suspensión acuosa de NPSiNH-Fol en presencia de AF. El descenso de estos valores logra una recuperación hasta los valores control por el agregado de azida de sodio.

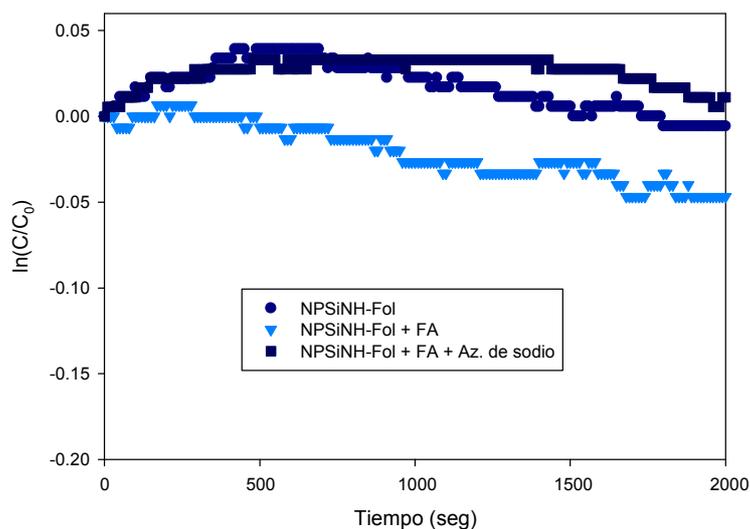


FIGURA 5.4: CONSUMO DE OXÍGENO MOLECULAR PARA LAS NPSiNH-FOL (EXC 350 NM Y T 20°C)

En estos experimentos puede verse que la irradiación de suspensiones acuosas saturadas en aire de NPSiNH₂, NPSiNH-PEG o NPSiNH-Fol no produce la caída de los niveles de O₂ disuelto. Sin embargo, la adición de AF (1x10⁻³ M) a la suspensión de nanopartículas produce la caída de los niveles de O₂ disuelto. Esta última observación pone en evidencia la capacidad de las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y las NPSiNH-Fol de producir ¹O₂ tras la irradiación a 350 nm, debido a que el AF es conocido desde hace tiempo por su capacidad de reaccionar químicamente con el oxígeno singlete. Finalmente el agregado de un desactivador físico de ¹O₂, como la azida de sodio añadida en exceso disminuye la tasa de consumo de O₂ debido a la competencia de entre la azida y el AF por el ¹O₂.

Este grupo de experimentos da una primera evidencia de la capacidad de las diferentes NPSi usadas en este trabajo de producir oxígeno singlete, lo que las convierte en candidatas para su aplicación en terapia fotodinámica.

2.2 Detección de $^1\text{O}_2$ mediante la sonda fluorescente SOSG®

Un método alternativo para la detección de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), es el uso de la sonda fluorescente conocida como “Singlet Oxygen Sensor Green” (SOSG®). La sonda SOSG® está compuesta por un derivado del antraceno y un resto derivado de la fluoresceína. En presencia de $^1\text{O}_2$, SOSG® emite fluorescencia verde con máximos de excitación y emisión a 504 y 525 nm, respectivamente. La emisión de esta fluorescencia verde corresponde a la formación de un endoperoxido generado por la interacción del $^1\text{O}_2$ con el residuo de antraceno del SOSG®. La sonda puede sufrir blanqueo y tiene la capacidad de producir ella misma oxígeno singlete, por lo que su uso debe hacerse utilizando los controles adecuados.

En esta parte del trabajo se utilizó la sonda SOSG para confirmar la capacidad de producir oxígeno singlete por parte de las NPSiNH₂ y las NPSi'PEG en suspensiones acuosas. Para ello, suspensiones acuosas de estas nanopartículas junto con la sonda SOSG fueron irradiadas a diferentes tiempos según se describe en el Capítulo 2. Se realizaron en paralelo dos controles, uno utilizando el fotosensibilizador azul de metileno (MB) como control positivo de la producción de oxígeno singlete, y un blanco de la SOSG sola para descartar que la fluorescencia producida luego de la irradiación no corresponda a la propia capacidad que tiene la sonda de generar oxígeno singlete.

En la Fig. 5.5 se muestra los cambios en la intensidad de la emisión de una solución acuosa de la sonda SOSG cuando es irradiada a diferentes tiempos a 350 nm.

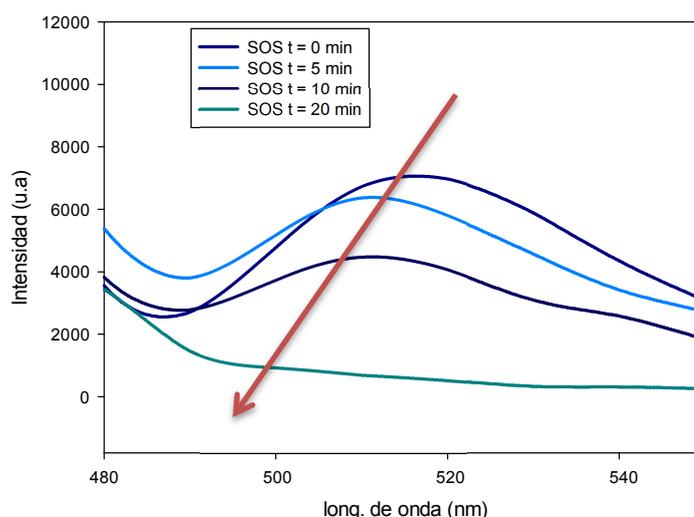


FIG. 5.5: CAMBIOS DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LA SONDA SOSG CUANDO ES IRRADIADA A DIFERENTES TIEMPOS A 350 NM

En el gráfico de la Fig. 5.5 puede verse como la intensidad de emisión de la sonda SOSG va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

En otro experimento, se irradió una solución del fotosensibilizador azul de metileno (MB) en presencia de la sonda SOSG y se registraron nuevamente los cambios en la intensidad de emisión de la sonda a diferentes tiempos de irradiación. El comportamiento de la sonda se muestra en la Fig. 5.6.

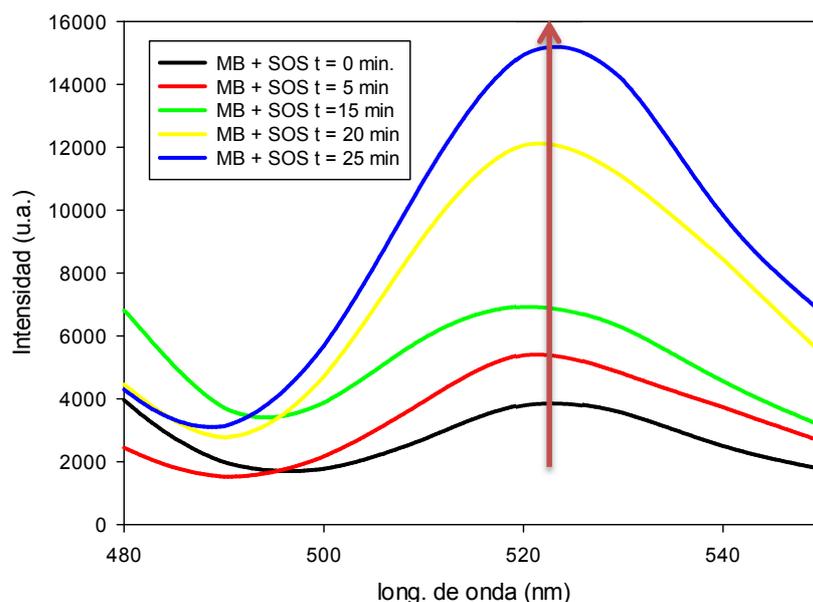


FIG. 5.6: CAMBIOS DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LA SONDA SOSG CUANDO ES IRRADIADA A DIFERENTES TIEMPOS A 350 NM EN PRESENCIA DE MB

En el gráfico de la Fig. 5.6 puede verse como se produce un aumento en la intensidad de emisión de la sonda SOSG a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Este resultado es el esperado a partir de la conjugación de la sonda con la especie $^1\text{O}_2$ generada por el fotosensibilizador durante la irradiación.

Posteriormente, habiendo comprobado el funcionamiento de la sonda SOSG sola y en presencia de un fotosensibilizador conocido como el MB, se procedió a determinar el comportamiento de la sonda en presencia de suspensiones de nanopartículas de silicio.

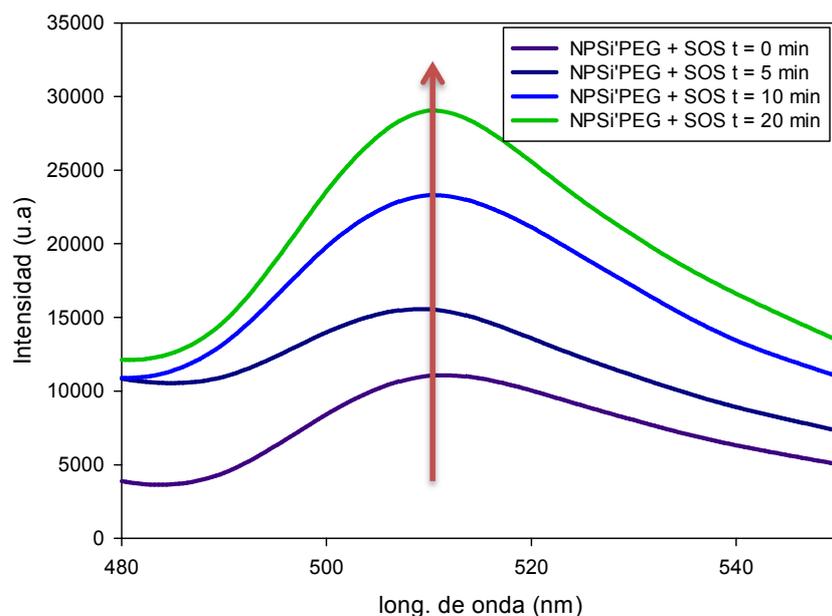


FIG. 5.7: CAMBIOS DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LA Sonda SOSG CUANDO ES IRRADIADA A DIFERENTES TIEMPOS A 350 NM EN PRESENCIA DE NPSi'PEG

En el gráfico de la Fig. 5.7 puede verse que a medida que se aumentan los tiempos de irradiación del sistema NPSi'PEG-SOSG se produce un aumento en la intensidad de emisión de la sonda SOSG. Este comportamiento constituye una nueva evidencia de la capacidad de estas nanopartículas de producir oxígeno singulete por irradiación a 350 nm.

Se realizó un experimento similar con suspensiones acuosas de NPSiNH₂, de forma de evidenciar la capacidad de estas nanopartículas de generar oxígeno singulete por excitación a 350 nm. La Fig. 5.8 muestra los aumentos en la intensidad de la emisión producida en el sistema NPSiNH₂-SOSG a medida que se aumentan los tiempos de irradiación. Este resultado es el esperado a partir de la conjugación de la sonda con la especie ¹O₂ generada por el fotosensibilizador durante la irradiación.

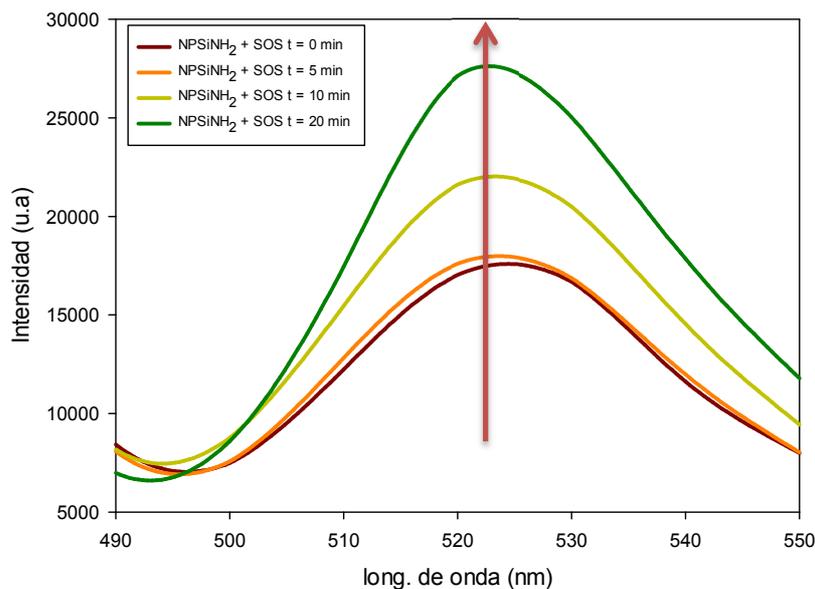


FIG. 5.8: CAMBIOS DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LA Sonda SOSG CUANDO ES IRRADIADA A DIFERENTES TIEMPOS A 350 NM EN PRESENCIA DE NPSiNH₂

Determinación indirecta de los rendimientos cuánticos (ϕ) de generación de oxígeno singulete.

A partir de los datos obtenidos con el uso de la sonda SOSG es posible determinar el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete de las nanopartículas de silicio en medio acuoso.

Para ello, es necesario conocer la concentración de oxígeno singulete producida por una solución acuosa de un fotosensibilizador de referencia cuyo rendimiento cuántico es conocido, como el azul de metileno (MB). La concentración de $^1\text{O}_2$ se calcula a partir de la eficiencia cuántica de formación del oxígeno singulete de la referencia, conocidas las absorbancia de las soluciones de MB y la intensidad de luz irradiada sobre la solución. Esta última se mide por actinometría química bajo las mismas condiciones experimentales (en la misma celda, ubicación de la celda, el mismo solvente, y similar absorbancia a la longitud de onda de interés) que las empleadas para medir la $[\text{}^1\text{O}_2]$ producida por irradiación de la solución de MB. Para estas medidas se utilizó una solución acuosa de MB de 0,01 absorbancia (celda de 1 cm de camino óptico) e irradiación a 350 nm. De estos datos se obtiene una curva de calibración que permite correlacionar la $[\text{}^1\text{O}_2]$ con la intensidad de emisión fluorescente del aducto SOSG- $^1\text{O}_2$ a una dada temperatura y en agua (ver el gráfico insertado en la Fig. 5.9).

Luego de la irradiación a 350 nm de suspensiones acuosas de NPSi'PEG en presencia de la sonda SOSG, es posible detectar la fluorescencia verde a 520 nm por formación del aducto SOSG-¹O₂ bajo las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para medir la fluorescencia del aducto en la curva de calibración. A partir de los valores de la intensidad de fluorescencia a 520 nm medida, se calcula la [¹O₂] producida a partir de la curva de calibración. Estos cálculos presuponen que todo el oxígeno singlete producido por el MB y el producido por las NPSi'PEG reacciona con SOSG, por lo que los valores de eficiencia que se obtengan son en realidad un límite inferior al valor real. De hecho, las medidas de los tiempos de decaimiento del ¹O₂ en suspensión de solventes orgánicos muestran alguna reactividad de la cobertura de PEG con el oxígeno singlete, tal como se discutirá más adelante. Debido a la gran reactividad con el oxígeno singlete demostrada para las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG, no se obtuvieron los rendimientos cuánticos de ¹O₂ para estas partículas mediante este método.

La figura 5.8 muestra la relación entre el oxígeno singlete producido por las partículas de NPSi'PEG en función de la intensidad de luz absorbida. El cálculo de la intensidad de luz absorbida considera la absorbancia de las muestras de NPSi'PEG a 350 nm y la intensidad de luz de irradiación a esa longitud de onda. A partir de estas medidas se determinó $\phi_{\text{NPSi'PEG}} = 0,03 \pm 0,01$, del orden publicado para otras nanopartículas en solución acuosa (Llansola Portolés et al. 2010).

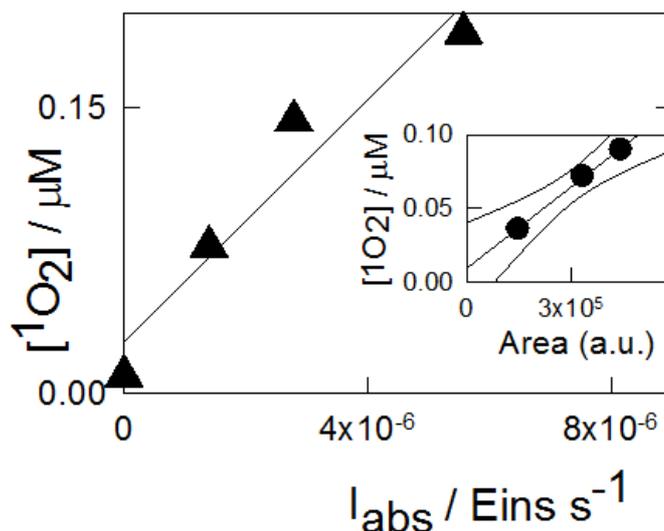


FIG 5.9: PRODUCCIÓN DE ¹O₂ VS IABS POR SUSPENSIONES ACUOSAS DE NPSi'PEG. EL GRÁFICO INSERTADO CORRESPONDE A LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE [¹O₂] OBTENIDA PARA LA REFERENCIA MB EN LAS MISMAS CONDICIONES

2.3 Detección de la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo a 1270 nm.

NPSi oxidadas en tolueno

Las NPSi obtenidas por el método de las micelas invertidas, parcialmente oxidadas y resuspendidas en tolueno muestran trazas de emisiones en 1270 nm al excitar con un láser a 355 nm. Estas señales son de baja intensidad y se ajustan a un decaimiento mono exponencial (Fig. 5.5) a partir de los cuales se puede obtener el valor del tiempo de vida (τ) del oxígeno singlete en tolueno ($\tau = 34 \mu\text{s}$), este valor coincide con el publicado para este solvente en la bibliografía (WILKINSON et al. 1995).

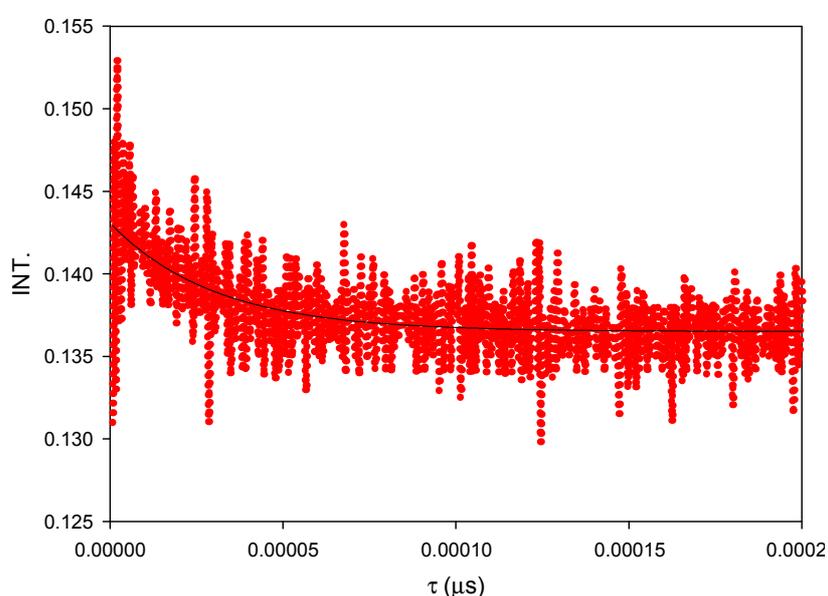


FIG. 5.5: DETECCIÓN A 1270 NM OXÍGENO SINGLETE NPSi OXIDADAS EN TOLUENO

Por otro lado, por este ensayo no se encontraron trazas de emisiones en 1270 nm al excitar con un láser a 355 nm suspensiones de nanopartículas en tolueno y D_2O saturadas en aire de NPSiNH_2 , NPSiNH-Fol , y NPSiNH-PEG . Sin embargo, el $^1\text{O}_2$ generado por irradiación a 355 nm de soluciones de difenilantraceno (DPA) en tolueno es atrapado de manera eficiente por cantidades crecientes de nanopartículas. La Fig. 5.6 muestra un decaimiento creciente de las trazas de $^1\text{O}_2$ con el agregado de cantidades crecientes de NPSiNH_2 .

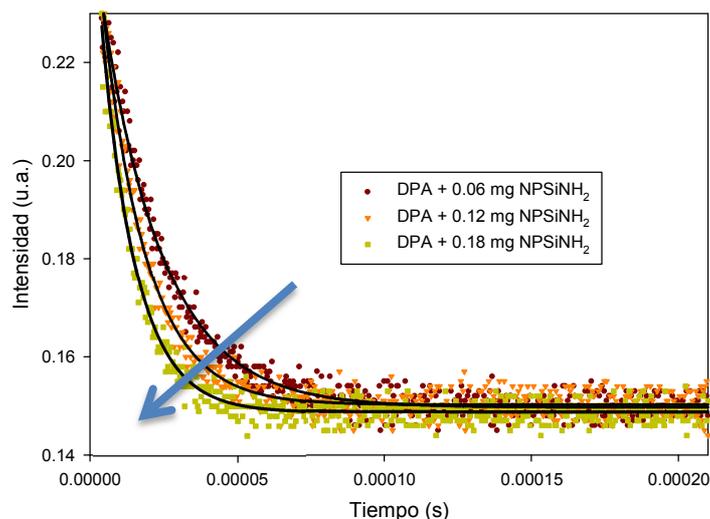
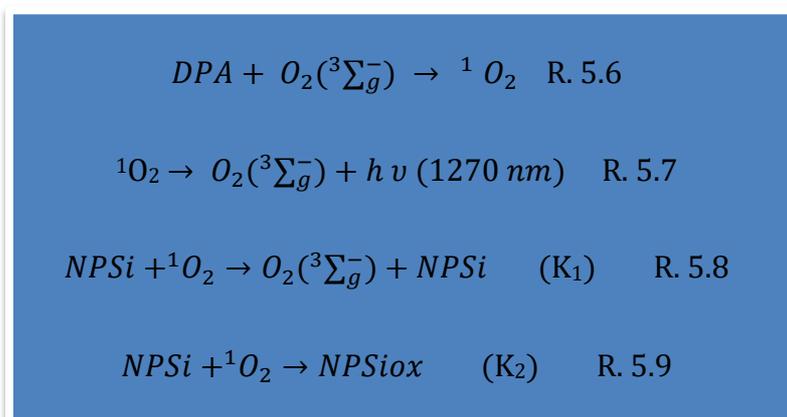


FIG. 5.6: QUENCHING OXÍGENO SINGULETE POR LAS NPSiNH₂: TRAZAS DE ¹O₂ A 1270 NM POR IRRADIACIÓN A 350 NM DE UNA SOLUCIÓN DE DPA (Abs=0,5) EN TOLUENO

Un comportamiento similar se encontró para el sistema DPA/NPSiNH-PEG. Este proceso puede explicarse a partir de las siguientes reacciones:



El ajuste de los decaimientos mono exponenciales permite obtener información respecto de los tiempos de vida en ausencia (τ^0) y presencia de NPSi (τ). A través de la ecuación de Stern-Volmer (Ec. 5.1) en la que se grafica la inversa de tiempos de vida vs [NPSi], es posible obtener los valores de las constantes ($K_{app} = k_1 + k_2$) que involucran la desactivación física (R. 5.8) y química (R. 5.9) de la especie oxígeno singulete (Schweitzer and Schmidt 2003).

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + K_{app} \cdot [NPSi] \quad Ec. 5.1$$

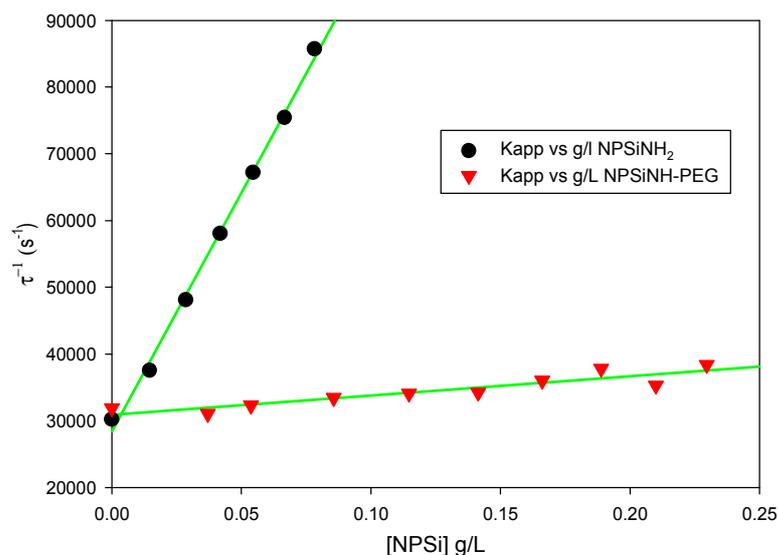


FIG. 5.7: AJUSTE LINEAL A LA EC. 5.1 PARA LOS SISTEMAS DPA/NPSiNH₂ (PUNTOS NEGROS) Y DPA/NPSiNH-PEG (TRIÁNGULOS ROJOS)

La Fig. 5.7 muestra los cambios en la inversa de los tiempos de vida del oxígeno singlete generado por la excitación a 350 nm de una solución del fotosensibilizador DPA en tolueno, por agregado de cantidades crecientes de suspensiones en tolueno de NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG.

A partir de las pendientes de las rectas de la Fig. 5.7 se obtuvieron los valores de las constantes Kapp para las NPSiNH₂ ($2 \pm 0,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) y para las NPSiNH-PEG ($2.1 \pm 0,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Los grupos NH son conocidos por su efecto de relajación del ¹O₂ al estado fundamental (Darmanyan et al. 1998). La contribución individual por grupo propilamina a la desactivación general produciría una constante de velocidad de $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (suponiendo 62 grupos propilamina por nanopartícula), que es casi dos órdenes de magnitud mayor que la reportada para la molécula propilamina, pero en el orden de aminas capaces de estabilizar un intermediario de transferencia de carga parcial [¹O₂^{δ-}-N^{δ+}R₃] (Wilkinson et al. 1995). El aumento de la eficiencia en el proceso de desactivación de los grupos propilamina sugiere que la unión química de estos grupos a las nanopartículas de silicio produce la estabilización de un intermediario de transferencia de carga. Estas observaciones son consistentes con la disminución en la eficiencia de fotosensibilización del ¹O₂ que produce un derivado hidrofílico de silicio poroso con grupos propilamina terminales en comparación con el material oxidado en la superficie (Fumon et al. 2008). Por otra parte, la constante de desactivación más

pequeña observada para las partículas NPSiNH-PEG sugiere un efecto protector ejercido por el PEG sobre la reactividad de la superficie de la partícula hacia el $^1\text{O}_2$.

NPSi'PEG en acetonitrilo

De manera similar se detectaron las trazas de la emisión a 1270 nm para las NPSi'PEG en ACN (Fig. 5.6) y para la referencia TPP en este mismo solvente. El ajuste de estas señales permitió obtener un valor de $\tau = 43 \pm 7 \mu\text{s}$ para la referencia (TPP) y un valor de $\tau = 19 \pm 1 \mu\text{s}$ para las NPSi'PEG en este solvente. El valor obtenido para la referencia está dentro del tiempo de vida esperado para el $^1\text{O}_2$ en este solvente ($\tau = 39 \pm 10 \mu\text{s}$) (Wilkinson 1995) mientras que el valor más pequeño observado para las NPSi'PEG podría sugerir una reacción entre el $^1\text{O}_2$ y la superficie de las partículas. De hecho, se espera que los grupos hidroxilo terminales del PEG sean reactivos frente al $^1\text{O}_2$ (Schweitzer y Schmidt 2003).

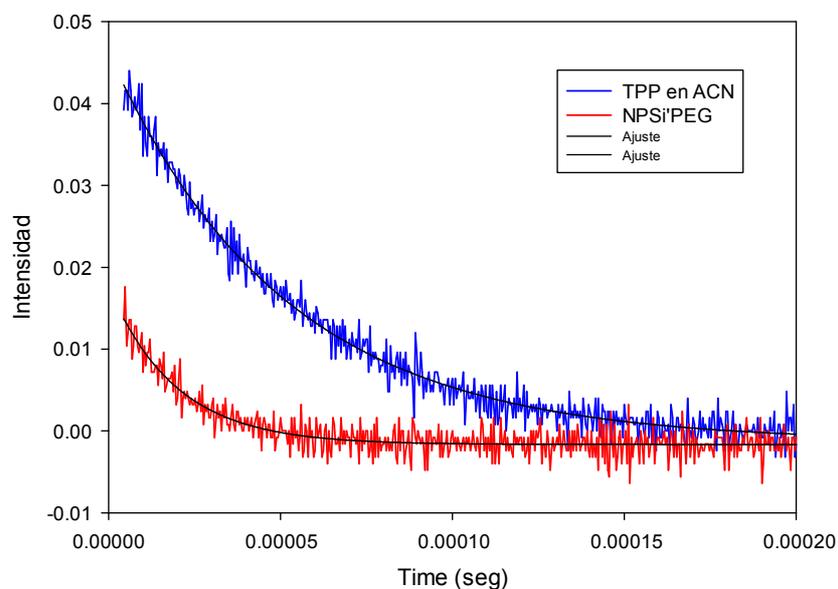


FIGURA 5.6: DETECCIÓN A 1270 NM OXÍGENO SINGULETE NPSi'PEG Y LA REFERENCIA TPP EN ACN

A partir de las señales obtenidas para las NPSi'PEG y la referencia TPP en el mismo solvente, es posible determinar los rendimientos cuánticos de generación de $^1\text{O}_2$ de estas nanopartículas en este solvente usando la Ec. 5.2. Para la determinación se utilizó un método directo en el cual se obtienen las trazas de $^1\text{O}_2$ para la referencia y la muestra irradiando con un láser a 350 a diferentes energías (Fig.5.7).

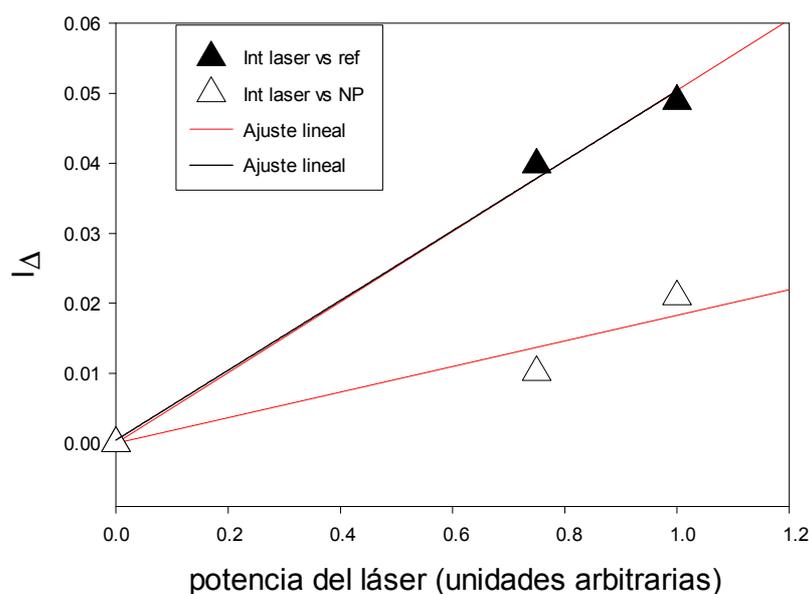


FIG. 5.7: INTENSIDAD DE LAS TRAZAS DE ¹O₂ EN FUNCIÓN DE LA POTENCIA DEL LÁSER

$$\Phi_{sens} = \frac{\Phi_{ref} \cdot P^{sens} A_{\lambda}^{ref}}{P^{ref} A_{\lambda}^{sens}} \quad \text{Ec. 5.2}$$

De donde Φ_{ref} es el rendimiento cuántico de la referencia (en este caso $\Phi_{TPP} = 0,6$ (WILKINSON et al. 1995)), P es la pendiente del gráfico I vs Energía del láser para la referencia y la muestra, y A son las absorbancias a la longitud de onda de trabajo ($A_{350}^{TPP} = 0,5$ y $A_{350}^{NPSi'PEG} = 0,5$). A partir de estos datos se obtiene un valor de $\Phi_{NPSi'PEG} = 0,12 \pm 0,04$. El hecho de que ϕ en este solvente, sea mayor que el obtenido en suspensiones acuosas, indica que el agua juega un papel importante en los canales de desactivación no radiativos del estado fotoexcitado activo

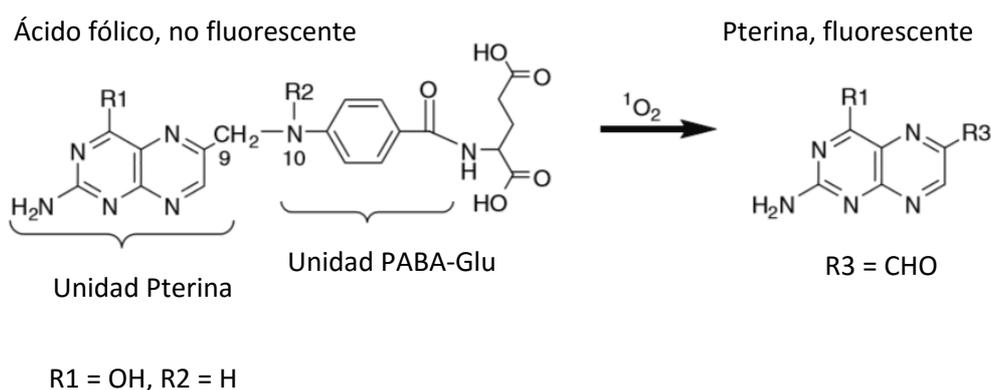
3. Determinación del Radical anión superóxido:

La recombinación de $O_2^{\cdot -}$ conduce a la generación de H_2O_2 . Para la determinación indirecta de $O_2^{\cdot -}$, se empleó un método colorimétrico enzimático comercial (*vide supra*) que permite determinar la $[H_2O_2]$.

Mediante este experimento, se observó la formación de H_2O_2 solamente cuando se irradian suspensiones acuosas de NPSiNH-Fol (1.3×10^{-4} M de H_2O_2), mientras que no se detectaron cantidades significativas ($<1 \times 10^{-5}$ M) en experimentos con suspensiones de NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y NPSi'PEG. La formación de superóxido por NPSiNH-Fol está en línea con el consumo de O_2

tras la irradiación de las suspensiones saturadas en aire saturado de las partículas en la ausencia de secuestradores de $^1\text{O}_2$.

El ácido fólico pertenece a la familia de las pterinas conjugadas y posee un sustituyente voluminoso en posición 9 (-CH₂-PABA-Glu). Estos compuestos son eficientes desactivadores físicos del $^1\text{O}_2$, debido principalmente a un mecanismo de transferencia de carga inducido por el grupo amino aromático de la unidad PABA, de forma similar a lo que ocurre con distintos tipos de aminas (Darmanyán et al. 1998). Sin embargo, la reacción química entre el $^1\text{O}_2$ con una pterina conjugada (como es el caso del ácido fólico) puede conducir a la oxidación del grupo amino secundario de la unidad de PABA con formación de una imina y H₂O₂ (R. 5.10 y 5.11); posteriormente la hidrólisis del grupo imina en solución acuosa produce la escisión del sustituyente en posición 6, liberando el resto PABA-Glu (Oliveros et al. 2010). Esta reacción con $^1\text{O}_2$ conduce no sólo a la producción de H₂O₂, sino también a la formación de una pterina no conjugada con una fuerte absorción en el UV-A y con una eficiente capacidad de sensibilizar al $^1\text{O}_2$ (Jamieson et al. 2007).



Entonces, la producción de oxígeno singlete por parte de las NPSiNH-Fol, puede producir la ruptura de la unión en la posición 9 del ácido fólico, liberando una pterina y H₂O₂. La pterina liberada a su vez tiene la capacidad de producir especies reactivas del oxígeno por excitación en el UV-A, a diferencia del ácido fólico, lo que justifica la evidencia experimental de que estas nanopartículas sean capaces de producir especies reactivas del oxígeno.

Conclusiones:

Los experimentos que se detallan en este capítulo muestran la capacidad de las nanopartículas de silicio de producir especies reactivas del oxígeno, y cómo el recubrimiento superficial puede modificar esta capacidad.

En conjunto, los experimentos de consumo de oxígeno indican que todas las diferentes nanopartículas de silicio utilizadas en este trabajo pueden producir oxígeno singulete por irradiación a 350 nm. Sin embargo, en algunos casos, el recubrimiento de la nanopartícula resulta ser muy reactivo con el oxígeno singulete generado.

Los experimentos realizados por detección de las trazas de oxígeno singulete a 1270 nm muestran como las NPSi sin recubrir y parcialmente oxidadas y las NPSi'PEG tienen la capacidad de producir oxígeno singulete. Por otro lado, no fue posible detectar con nuestro diseño experimental las señales de las trazas de oxígeno singulete para las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol. Esto se debe a una reacción del oxígeno singulete generado con la superficie de las nanopartículas de silicio. Esta última evidencia indica que en el diseño de nanofotosensibilizadores de silicio para su uso en terapia fotodinámica es recomendable evitar el uso de grupos superficiales NH si lo que se busca es optimizar la fotosensibilización del oxígeno singulete.

Por otro lado, los experimentos de irradiación de NPSi'PEG junto con la sonda SOSG permitieron determinar valores de rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singulete en medio acuoso del orden de 0.03. Estos valores, si bien bajos, son de importancia para el uso de las NPSi'PEG como fotosensibilizadores del oxígeno singulete en medio acuoso.

Finalmente, sólo las partículas que contienen grupos folato unidos en su superficie, tienen la capacidad de producir radical anión superóxido, y este resultado tiene estrecha relación con la fotoquímica compleja que aporta el propio ácido fólico al unirse a la superficie de las nanopartículas de silicio.

Bibliografía:

- Braslavsky SE, Miiller M, Daniel M, et al (1997) Photophysical properties of porphycene derivatives (18 pi porphyrinoids). *J Photochem Photobiol B* 40:191–198. doi: 10.1016/s1011-1344(97)00075-4
- Darmanyan AP, Jenks WS, Jardon P (1998) Charge-Transfer Quenching of Singlet Oxygen O₂ (Δg) by Amines and Aromatic Hydrocarbons. *J Phys Chem A* 102:7420–7426. doi: 10.1021/jp982326o
- David Gara PM, Bosio GN, Arce VB, et al (2009) Photoinduced degradation of the herbicide clomazone model reactions for natural and technical systems. *Photochem Photobiol* 85:686–92. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00467.x
- DeRosa MC, Crutchley RJ (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 233-234:351–371. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6
- Frimer AA, Rosenthal I (1978) Chemical Reactions of Superoxide Anion Radical in Aprotic Solvents. *Photochem Photobiol* 28:711–717. doi: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07005.x
- Fumon H, Nojiri M, Fujii M, et al (2008) Sensitized generation of singlet oxygen by allylamine-terminated hydrophilic porous Si. *Trabs Mat Res Soc Jpn* 33:165–168.
- Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, et al (2007) Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* 28:4717–4732. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.014
- Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, et al (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10:148–154. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2
- Llansola Portolés MJ, David Gara PM, Kotler ML, et al (2010) Silicon nanoparticle photophysics and singlet oxygen generation. *Langmuir* 26:10953–10960. doi: 10.1021/la100980x
- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108:652–659. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00412-5
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, et al (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 43:477–503. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034
- Oliveros E, Dántola ML, Vignoni M, et al (2010) Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules. *Pure Appl Chem* 83:801–811. doi: 10.1351/PAC-CON-10-08-22
- Schweitzer C, Schmidt R (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem Rev* 103:1685–1757. doi: 10.1021/cr010371d
- Wilkinson F (1995) Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically.pdf.crdownload. *J Phys Chem Ref Data* 24:663–677.
- Wilkinson F, Helman WP, Ross AB (1995) Rate Constants for the Decay and Reactions of the

Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular-Oxygen in Solution - an Expanded and Revised Compilation. J Phys Chem Ref Data 24:663–1021.

Capítulo 6

ENSAYOS DE TOXICIDAD Y OBTENCIÓN DE BIOIMÁGENES

Introducción

Las nanopartículas de silicio (NPSi) se postulan como potenciales marcadores biológicos y/o sensibilizadores en terapias fotodinámicas debido a que presentan propiedades físicas y químicas interesantes (Romero et al. 2013; Lillo et al. 2015) y a su baja toxicidad intrínseca (Peng et al. 2014). A pesar de las expectativas generadas en cuanto a sus posibles aplicaciones en el campo de la salud, se ha de tener en cuenta que las nanopartículas poseen una toxicidad intrínseca que debe de ser evaluada en ensayos *in vitro* antes de realizar el traslado a pruebas *in vivo* (Ruizendaal et al. 2009).

Poco se sabe acerca de la toxicidad específica de las nanopartículas en sistemas biológicos y en los seres humanos. Los puntos cuánticos de los elementos semiconductores como los de CdSe, CdTe, ZnS, GaAs y InP se han utilizado en la hibridación de ADN (Mitchell et al. 1999), inmunoensayos (Chan and Nie 1998), endocitosis mediada por receptor (Chen et al. 2011), y obtención de imágenes de fluorescencia en tejidos biológicos (Dahan et al. 2001). Los nanocristales de elementos semiconductores también resultan de interés como una nueva clase de marcadores fluorescentes para la obtención de imágenes de cultivo celular. Una ventaja importante es que la alta fotoestabilidad de los puntos cuánticos permite el seguimiento o rastreo de los procesos intracelulares durante largos períodos (minutos a horas) en tiempo real (Chan et al. 2002). Sin embargo, muchos de estos elementos son altamente tóxicos en concentraciones bajas, como el cadmio, selenio, plomo y arsénico (Derfus et al. 2004). Dado que la degradación del núcleo es un factor importante en la citotoxicidad, generalmente se adiciona una cáscara biocompatible sobre el mismo retrasando así la fuga de los elementos tóxicos (Chen et al. 2012). No obstante, se ha demostrado que estas nanopartículas pueden ser igualmente tóxicas, aunque los resultados de toxicidad de diferentes estudios publicados en la literatura son difíciles de comparar debido a las diferencias resultantes del uso de distintos métodos, materiales y líneas celulares (Ruizendaal et al. 2009).

En contraste, las NPSi poseen un núcleo de silicio sin presencia de elementos tóxicos. Este hecho junto con las propiedades fluorescentes y la posibilidad de modificar la superficie mediante enlaces covalentes, hacen que estos nanomateriales sean potencialmente muy útiles como plataforma para aplicaciones biomédicas.

Paralelamente, diferentes estudios demuestran que las nanopartículas de elementos metálicos también presentan problemas de toxicidad en organismos vivos. Por ejemplo, nanopartículas de oro esféricas desnudas resultan altamente tóxicas en líneas celulares HeLa (células de cáncer cérvico-uterino), teniendo que ser recubiertas con PEG para reducir este efecto (Niidome et al. 2006). Ensayos realizados en células PC12 (células derivadas de feocromocitoma de médula adrenal de rata) expuestas a concentraciones crecientes de nanopartículas de óxido de hierro (desde 0,15 hasta 15 mM en hierro), evidencian una citotoxicidad dependiente de la concentración, reflejada en una disminución de la viabilidad celular y pérdida de la capacidad de diferenciarse en respuesta al factor de crecimiento nervioso (Pisanic et al. 2007). Se ha demostrado que las nanopartículas de plata de tamaños de alrededor de 56 nm muestran toxicidad por vía oral en un período de 13 semanas en ratas F344, a partir de una dosis de 30 mg/kg (Kim et al. 2010).

En función de dichos antecedentes, es de fundamental interés estudiar la toxicidad de las NPSi. Para tal fin, se evaluó la citotoxicidad en células de glioma de rata C6. Esta línea celular se eligió teniendo en cuenta que entre los tumores sólidos, los gliomas representan una de las estirpes más resistentes a los tratamientos actuales. Esto puede deberse en parte a la cantidad de alteraciones genéticas, epigenéticas y moleculares que controlan el ciclo celular así como a la exacerbada respuesta protectora frente al estrés oxidativo y su bien conocida resistencia a la apoptosis (Franco-Hernandez et al. 2007). Los pacientes portadores de este tipo de tumores, tratados según los esquemas estándar (resección seguida de radioterapia) poseen una expectativa de vida de un año desde el momento de su diagnóstico (Lefranc y Kiss 2006). Es por ello que es importante realizar nuevas contribuciones que permitan mejorar el diagnóstico y/o tratamiento de este tipo de tumores.

Por otro lado, como se discute en el capítulo 1, en los últimos años, el uso de embriones de pez cebra ha ganado popularidad gracias a la investigación en el ámbito de la toxicología y teratología (Busch et al. 2011). Este modelo presenta varias ventajas y se considera como un modelo alternativo para los ensayos de toxicidad *in vivo*.

1. Citotoxicidad

La incorporación de las NPSi en las células es un factor de importancia para evaluar su grado de toxicidad, lo cual es fundamental en el diseño de posteriores aplicaciones. La misma se ve afectada por el tamaño de las nanopartículas, la hidrofobicidad y la naturaleza química de su superficie. En el presente trabajo se empleó un tiempo fijo de incubación para el cual se

conoce que las nanopartículas se incorporan a la célula (Gara et al. 2012). Además, se utilizaron concentraciones que presentan toxicidad para éstas y otras nanopartículas de semiconductores de los grupo II-VI (Lovrić et al. 2005). Los métodos empleados para estudiar cuantitativamente la viabilidad celular fueron el ensayo de MTT y de RN.

1.1. Ensayo de MTT

En principio, la citotoxicidad de las diferentes NPSi en células C6 de glioma de rata se analizó empleando un tiempo de incubación de 24 horas y concentraciones de NPSi entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en base a la experiencia obtenida en nuestro grupo (Gara et al., 2012, Miglietta, 2015). Posteriormente, se estudiaron concentraciones mayores (entre 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En todos los casos se realizaron los controles correspondientes en ausencia de nanopartículas.

Los resultados se muestran a continuación.

Citotoxicidad de las NPSiNH₂

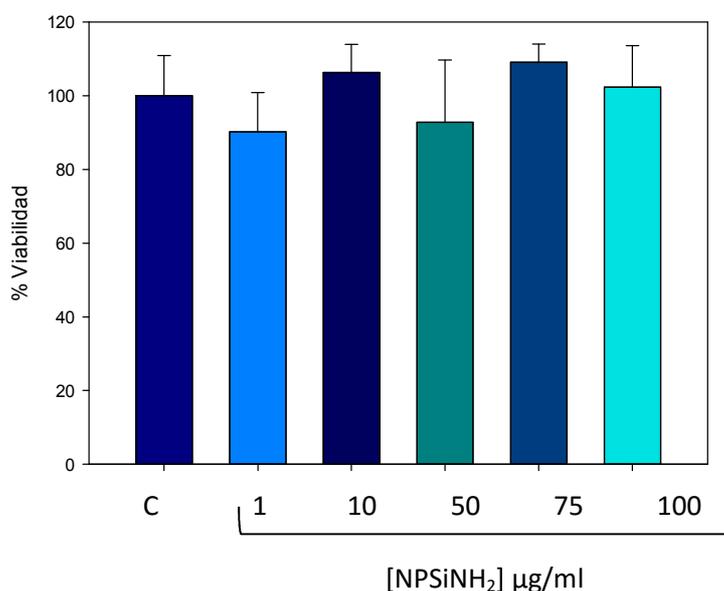


FIG. 6.1: ENSAYO DE MTT PARA LAS NPSiNH₂: Las barras de la Fig. 6.1 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey.

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.1 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad para las concentraciones entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de las NPSiNH₂ respecto del control.

Citotoxicidad de las NPSiNH-PEG

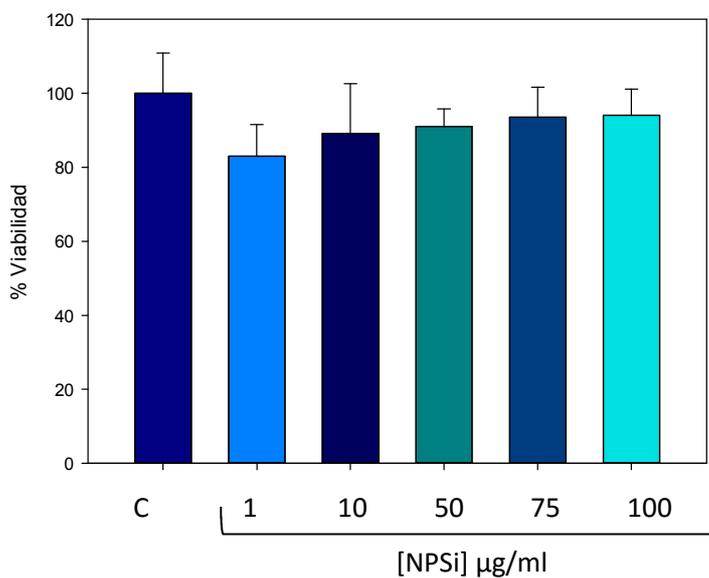


FIG. 6.2: ENSAYO MTT PARA LAS NPSiNH-PEG: Para el caso de la Fig. 6.2 se procedió de la misma manera que lo indicado en la Fig. 6.1.

Citotoxicidad de las NPSiNH-Fol

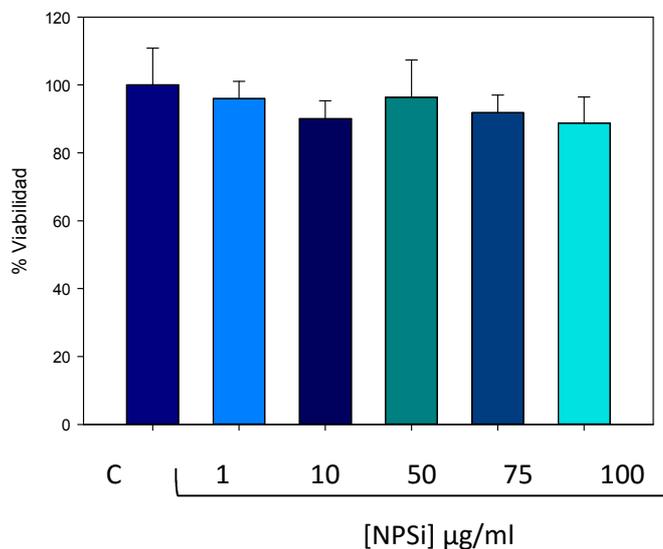


FIG. 6.3: ENSAYO MTT PARA LAS NPSiNH-FOL: Para el caso de la Fig. 6.3 se procedió de la misma manera que lo indicado en la Fig. 6.1.

El análisis estadístico de los resultados de las Fig. 6.2 y 6.3 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad para las concentraciones entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de las NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol respecto del control.

Comparación de la citotoxicidad de las diferentes NPSi

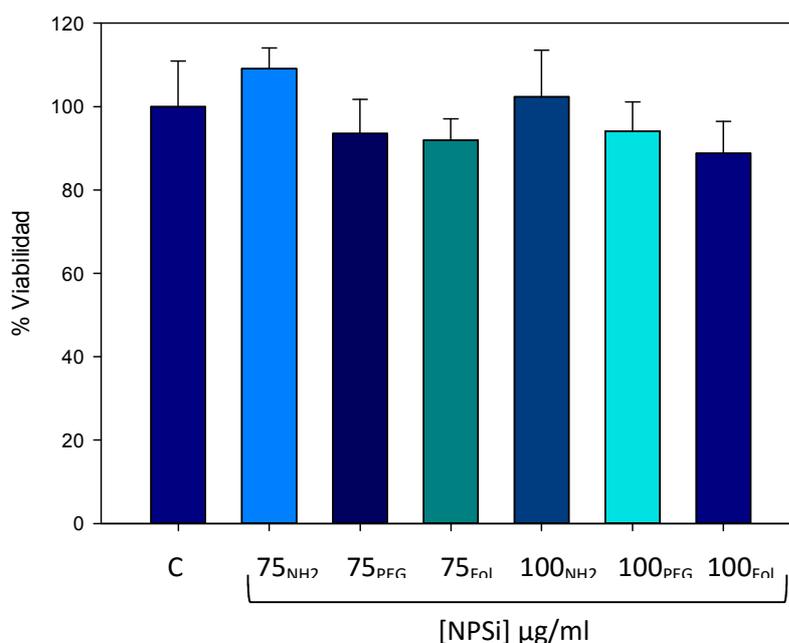


FIG. 6.4: CITOTOXICIDAD COMPARATIVA DE DIFERENTES NPSi A 75 $\mu\text{g/ml}$ Y 100 $\mu\text{g/ml}$: Los subíndices indican a que nanopartículas corresponde cada valor de concentración (NH₂ aminadas, PEG pegiladas, Fol con folato).

La Fig. 6.4 muestra los valores de citotoxicidad comparativos entre las diferentes NPSi a las concentraciones de 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados parecen mostrar alguna diferencia de toxicidad entre las NPSiNH-Fol o NPSiNH-PEG respecto de las NPSiNH₂. Sin embargo, aplicando el análisis estadístico de Anova y el test Tukey se encuentra que estas diferencias no son significativas entre sí ni respecto del control.

1.2. Citotoxicidad en ausencia de SFB

En base a los resultados obtenidos con respecto a la interacción de las NPSi con las proteínas del SFB, que indican que las NPSiNH-PEG podrían tener una menor afinidad por la albúmina del SFB en comparación con las NPSiNH₂ (Ver capítulo 4), se decidió repetir los experimentos de citotoxicidad para las diferentes NPSi en ausencia de SFB (que suplementa habitualmente los

medios de cultivo celular). La finalidad de este experimento fue analizar si la ausencia de SFB y por lo tanto, de las interacciones NPSiNH₂-BSA, ponía de manifiesto alguna diferencia en la citotoxicidad de las diferentes NPSi.

Los resultados se muestran a continuación.

Citotoxicidad de las diferentes NPSi en ausencia de SFB

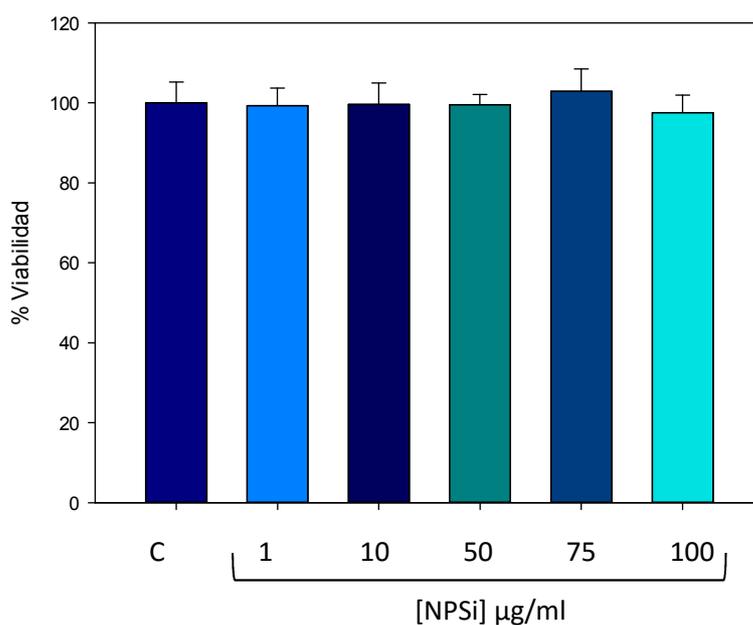


FIG.6.5: CITOTOXICIDAD EN AUSENCIA DE SFB PARA LAS NPSiNH₂: Las barras de la Fig. 6.5 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey.

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.5 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad en ausencia de SFB para las concentraciones entre 1 y 100 µg/ml de las NPSiNH₂ respecto del control.

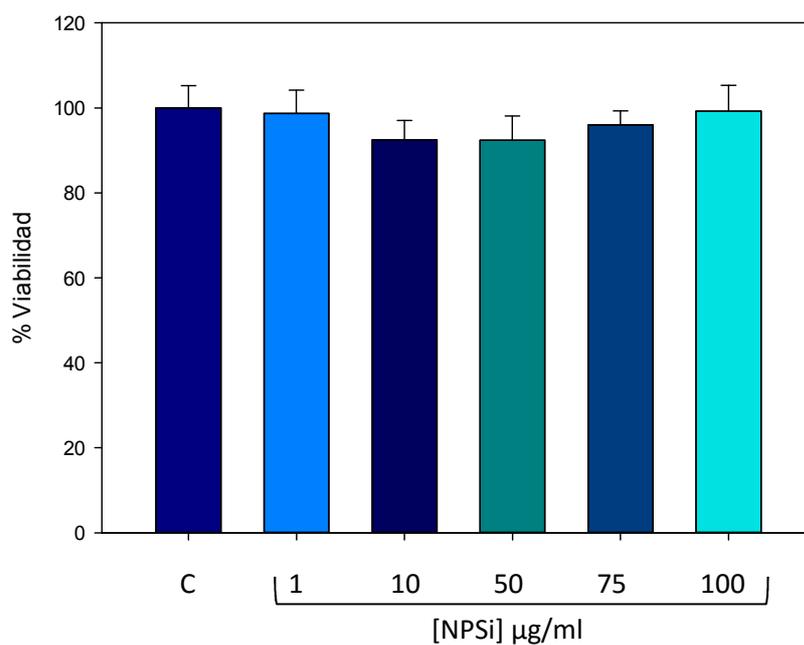


FIG. 6.6: CITOTOXICIDAD EN AUSENCIA DE SFB PARA LAS NPSiNH-PEG: Para el caso de la Fig. 6.6 se procedió de la misma manera que lo indicado en la Fig. 6.5.

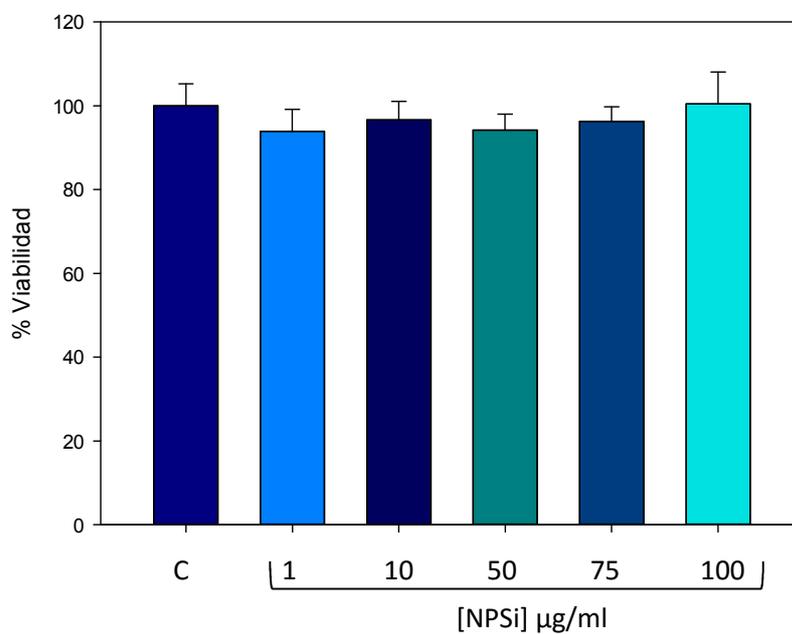


FIG. 6.7: CITOTOXICIDAD EN AUSENCIA DE SFB PARA LAS NPSiNH-FOL: Para el caso de la Fig. 6.7 se procedió de la misma manera que lo indicado en la Fig. 6.5.

El análisis estadístico de los resultados de las Fig. 6.6 y 6.7 (*p<0,01) indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad en ausencia de SFB para las concentraciones entre 1 y 100 µg/ml de las NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol respecto del control.

Estos experimentos, demuestran además que no existen diferencias de toxicidad cuando las diferentes NPSi son incubadas ya sea en presencia o ausencia de SFB.

1.3. Citotoxicidad a altas concentraciones

Dado que las NPSi utilizadas en este trabajo no resultaron tóxicas para concentraciones donde otras NPSi, provenientes de diferentes métodos de síntesis, muestran toxicidad (Llansola Portolés 2011), se decidió realizar estudios de citotoxicidad a valores de concentración mayores.

Se utilizó nuevamente el ensayo MTT en presencia de SFB para las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/ml. El tiempo de incubación se mantuvo en 24 hs. Los resultados se muestran a continuación.

Citotoxicidad de las diferentes NPSi a altas concentraciones

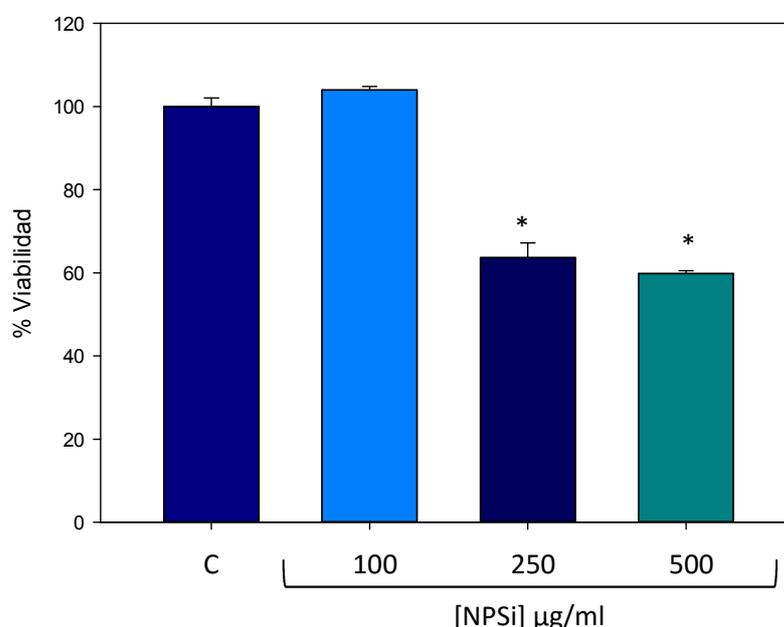


FIG. 6.8: CITOTOXICIDAD DE LAS NPSiNH₂ A ALTAS CONCENTRACIONES: Las barras de la Fig. 6.8 representan la media de 5 réplicas ± SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey (*p<0,01 vs control).

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.8 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad entre el control y la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de las NPSiNH₂. Por otro lado se ven descensos claros en los % de Viabilidad para las concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ ($37 \pm 4\%$) y 500 $\mu\text{g/ml}$ ($41 \pm 1\%$) de las NPSiNH₂, siendo estas diferencias, significativas respecto de los controles.

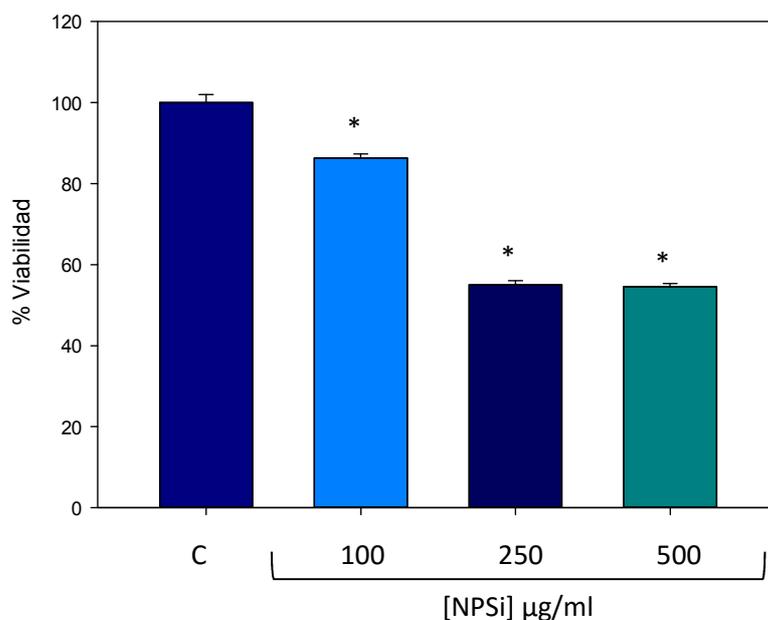


FIG. 6.9: CITOTOXICIDAD DE LAS NPSiNH-PEGA ALTAS CONCENTRACIONES: Las barras de la Fig. 6.9 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey ($*p < 0,01$ vs control).

La Fig. 6.9 muestra descensos en los valores de % de Viabilidad respecto de los controles para las NPSiNH-PEG de concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ ($15 \pm 4\%$), 250 $\mu\text{g/ml}$ ($46 \pm 1\%$) y 500 $\mu\text{g/ml}$ ($47 \pm 1\%$). El análisis estadístico de estos resultados indica que las diferencias en los valores de % de Viabilidad entre el control y las tres concentraciones ensayadas resultan significativas.

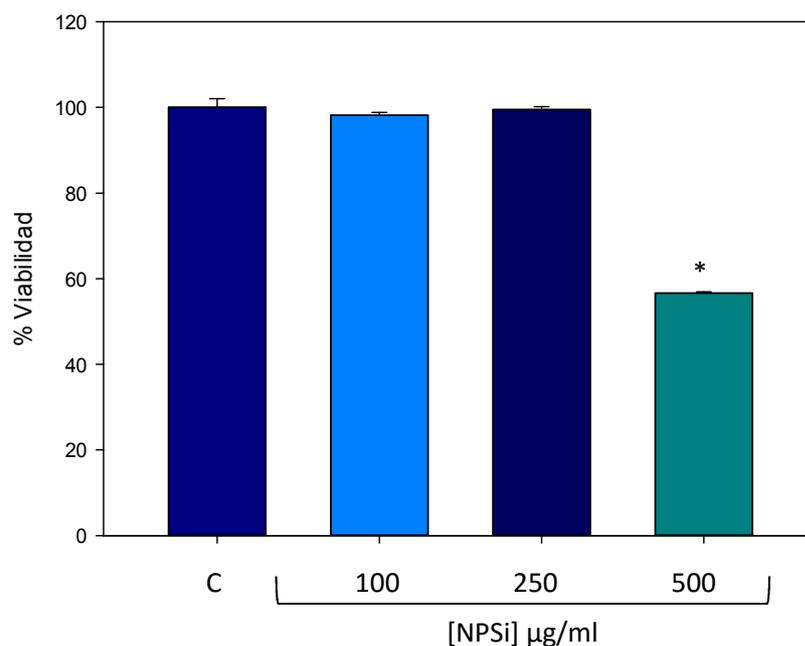


FIG. 6.10: CITOTOXICIDAD DE LAS NPSiNH-FOL A ALTAS CONCENTRACIONES: Las barras de la Fig. 6.10 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey (* $p < 0,01$ vs control).

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.10 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad entre el control para las concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$ de las NPSiNH-Fol. Por otro lado se ve un descenso claro en el % de Viabilidad para la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ (44 \pm 1%) de las NPSiNH-Fol, siendo esta diferencia, significativa respecto de los controles.

1.4. Ensayo de RN

Para poder concluir si un determinado compuesto resulta tóxico en modelos *in vitro*, es conveniente realizar diferentes ensayos de citotoxicidad que permitan evaluar la funcionalidad celular a distintos niveles. Por otro lado, como no se encontraron efectos tóxicos en el ensayo de MTT para valores de concentración donde otras NPSi resultan tóxicas, se decidió evaluar la citotoxicidad por un método diferente. El ensayo de rojo neutro (RN) provee una estimación cuantitativa del número de células viables en cultivo. Es uno de los ensayos de citotoxicidad más empleados y se basa en la habilidad de las células viables de incorporar y unir este colorante en los lisosomas. Se trabajó nuevamente con células C6 de glioma de rata para un tiempo de incubación fijo y distintas concentraciones. El tiempo de incubación fue nuevamente de 24

horas y se estudiaron concentraciones de NPSi entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Todos los ensayos se llevaron a cabo junto con controles de células sin nanopartículas en las mismas condiciones.

Citotoxicidad de las NPSiNH₂

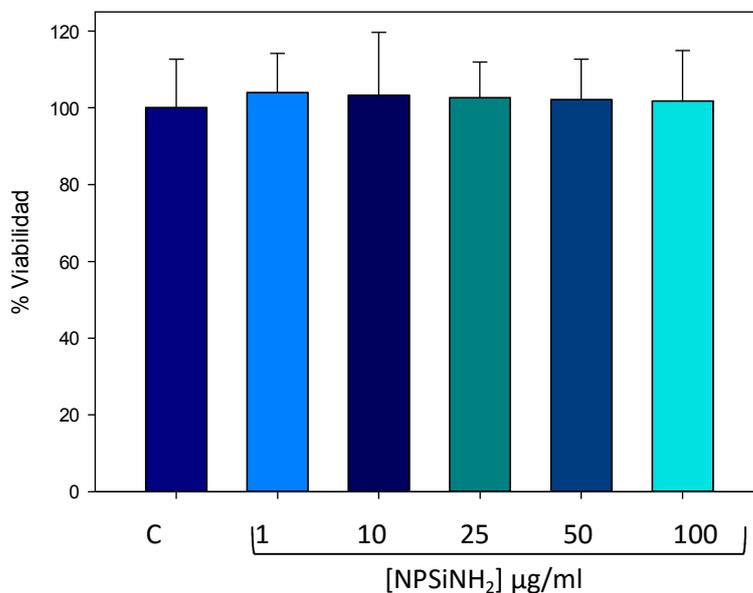


FIG. 6.11: ENSAYO DE RN PARA LAS NPSiNH₂: Las barras de la Fig. 6.11 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey.

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.11 indica que no existen diferencias significativas en los valores de % de Viabilidad para las concentraciones entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de las NPSiNH₂ respecto de los controles.

Citotoxicidad de las NPSiNH-PEG

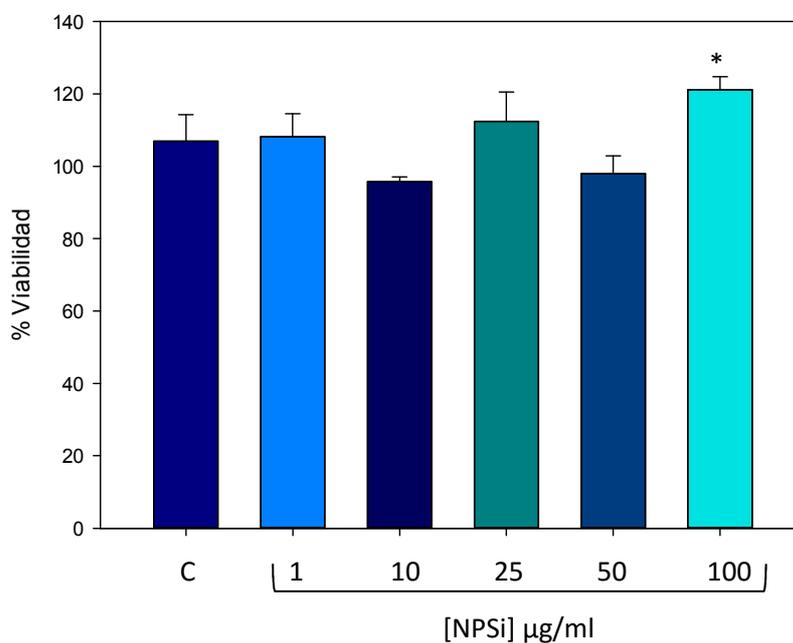


FIG. 6.12: ENSAYO DE RN PARA LAS NPSiNH-PEG: Las barras de la Fig. 6.12 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey (* $p < 0,01$ vs control).

En el gráfico de la Fig. 6.12 pueden verse algunos cambios en la captura del colorante RN para los distintos tratamientos respecto de los controles. Sin embargo, sólo el aumento del tratamiento de 100 $\mu\text{g/ml}$ resulta ser significativamente diferente respecto de los controles ($15 \pm 4\%$).

Citotoxicidad de las NPSiNH-Fol

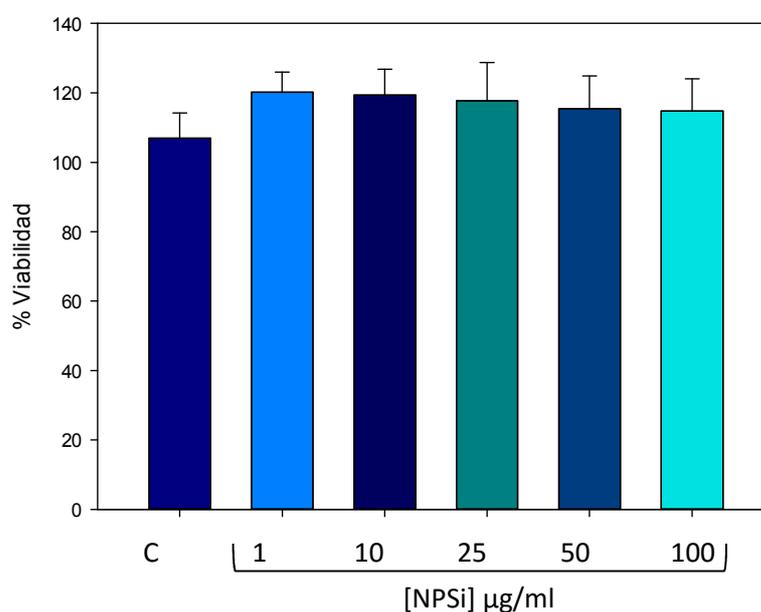


FIG. 6.13: ENSAYO DE RN PARA LAS NPSiNH-FOL: Las barras de la Fig. 6.12 representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Se aplicó un análisis estadístico ANOVA seguido de un Test Tukey.

En el gráfico de la Fig. 6.13 pueden verse aumentos en la captura del colorante RN para los distintos tratamientos respecto de los controles. Sin embargo el análisis estadístico indica que estas diferencias no son significativas respecto de los controles.

2. Evaluación de las NPSiNH₂ en terapia radiante: Ensayo de DH₂CF-DA

Se analizó la generación de ROS por parte de las células irradiadas con distintas dosis de radiación ionizante en presencia y ausencia de NPSiNH₂. Este ensayo se realizó para determinar si las NPSiNH₂ tienen la capacidad de aumentar la producción de ROS cuando las células en cultivo reciben diferentes dosis de rayos X, de forma tal de poder lograr un efecto tóxico similar utilizando una dosis menor de radiación ionizante durante el tratamiento.

Para la detección de la formación de ROS por parte de las células durante el proceso de irradiación, se utilizó la sonda DH₂CF-DA que es una sonda fluorescente específica para la detección de ROS (Aranda et al. 2013).

Las células se irradiaron con dos dosis distintas de radiación ionizante (2 y 3Gy). Los resultados se muestran a continuación.

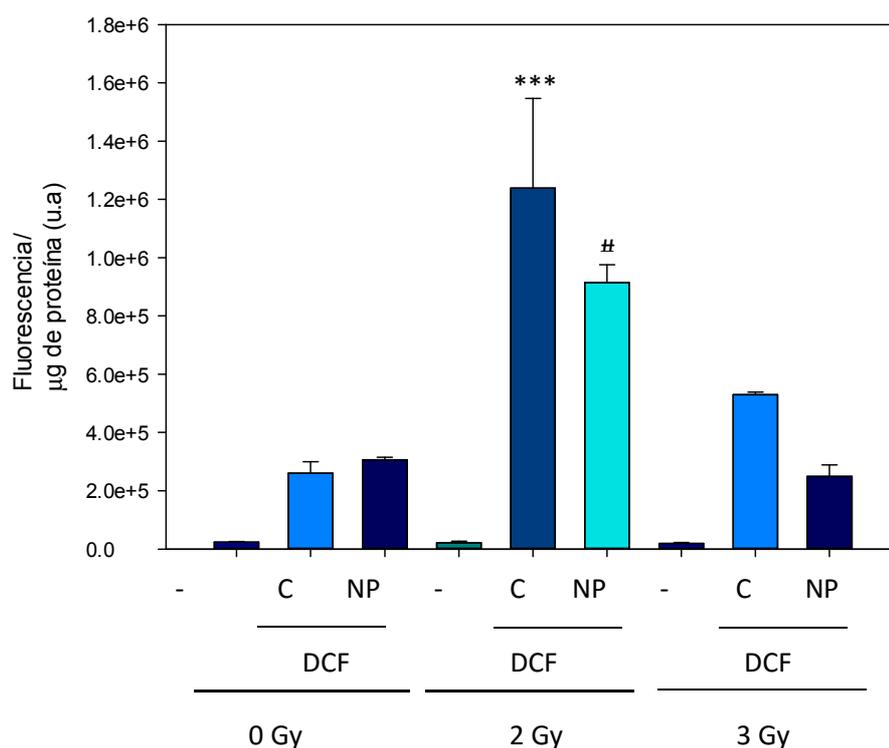


FIG. 6.14: GENERACIÓN DE ROS EN CÉLULAS C6: Se grafica la intensidad relativa de fluorescencia de la sonda DCF por μg de proteína frente a la dosis de irradiación para las células incubadas en presencia de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ de NPSiNH_2 (NP) y en ausencia de nanopartículas (C). Las barras representan la media de 5 réplicas \pm SEM. Las diferencias experimentales se analizaron mediante estadístico ANOVA post Test Tukey (***) $p < 0,001$ contra el control no irradiado y # $p < 0,05$ contra el control de 2Gy).

Como se muestra en la Fig 6.14, la exposición a 2Gy de radiación ionizante indujo un aumento en la generación de ROS ($1 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$) con respecto al control, el cual resultó menor para 3Gy. La incubación con NPSiNH_2 , produjo una disminución en la generación de ROS, en ambos casos.

Este experimento demuestra, que la suspensión $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ de las NPSiNH_2 usadas en el ensayo no produce un aumento en la producción de ROS por parte de las células al ser irradiadas con las dosis de 2Gy y 3Gy, sino que por el contrario, estas nanopartículas parecerían actuar como scavengers de ROS. Este resultado difiere del obtenido en experimentos realizados con otras nanopartículas de silicio (Gara et al. 2012) y sugiere que estas NPSiNH_2 no serían aptas para su empleo como radiosensibilizadores en terapia radiante. No obstante, la generación de ROS en

las condiciones de este experimento se analizará también en las otras nanopartículas de silicio desarrolladas en este trabajo, como ser las NPSiH-PEG o las NPSiH-Fol.

Este resultado concuerda con la alta reactividad que presentan los grupos amino hacia las especies generadas en el proceso de radiólisis del agua (Getoff y Schwörer 1973; Rao y Hayon 1975).

3. Toxicidad en larvas de zebrafish

La determinación de toxicidad de nuevos nanocompuestos con finalidad terapéutica es fundamental para que estos lleguen a pruebas clínicas y para su futura aplicación en humanos. Un modelo cada vez más utilizado para estudiar nanotoxicidad *in vivo* es el zebrafish debido a sus múltiples ventajas de tiempos, costos, elevada homología genética con el humano, transparencia de las larvas y gran número de crías.

Existen varios parámetros que indican la toxicidad de un determinado compuesto en este modelo. En este trabajo se utilizaron dos de ellos: la actividad de nado y la determinación de cambios morfológicos.

3.1. Actividad de nado

Este protocolo se basa en la exposición química de “larvas” (eleuthero-embriones) a partir de los 4 días pos-fecundación (dpf). Se mide la actividad locomotora de dichas larvas como indicador de toxicidad a las 4, 24, 48 y 72 horas post-incubación (hpi).

Este ensayo se hizo con dos objetivos: por un lado comparar los efectos tóxicos de las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol a bajas dosis y por otro determinar la dosis letal 50 (DL50, dosis en la que se produce la muerte de la mitad de las larvas tratadas) de las NPSiNH₂.

3.1.1 Actividad de nado comparativa

Para elegir el valor de concentración al cual trabajar en el ensayo comparativo, se realizó primeramente un pre- ensayo con NPSiNH₂ a concentraciones 25, 50 y 100 µg/ml. Mediante este ensayo no se encontraron evidencias de toxicidad (disminución de la actividad de nado), por lo cual se decidió trabajar con una concentración de 100 µg/ml de las diferentes NPSi, que es la misma dosis hasta la cual no se encontraron efectos citotóxicos en estas nanopartículas.

Los resultados de este ensayo se muestran a continuación.

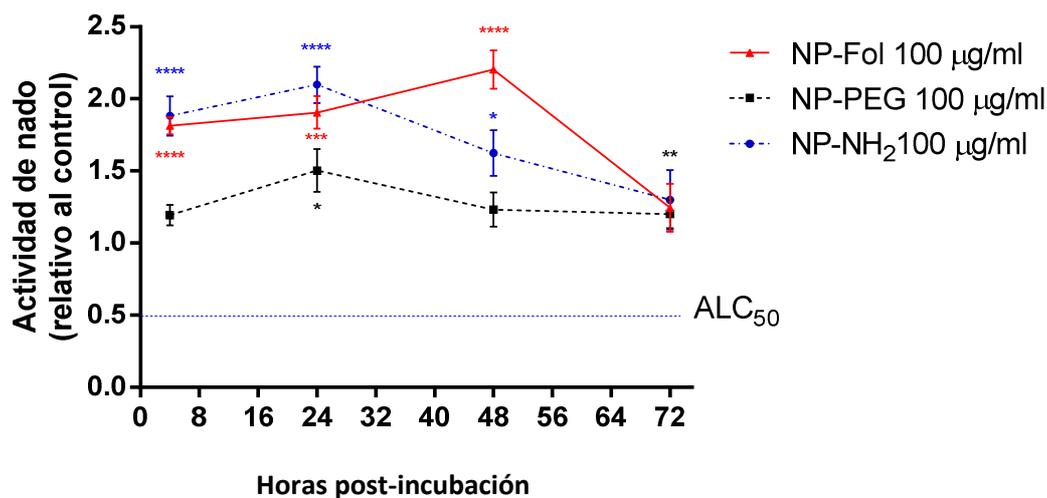


FIG. 6.15: ACTIVIDAD DE NADO COMPARATIVA PARA DIFERENTES NPSI DE IGUAL CONCENTRACIÓN: El gráfico muestra los cambios presentados en la actividad de nado de las larvas en función del tiempo cuando son tratadas con una concentración de 100 µg/ml de las diferentes NPSi. Se indica también en el gráfico la ALC₅₀ (caída de la actividad locomotora al 50% respecto de los controles).

En la Fig. 6.15 puede verse que los tres tipos de nanopartículas presentan un efecto excitatorio sobre la actividad de nado de las larvas, siendo las NPSiNH-PEG las que producen el efecto más leve.

La actividad fue prácticamente idéntica en los tres casos a las 72 hpi. La tendencia de leve aumento en la actividad de nado entre las 4 y 24 hpi y posterior disminución entre las 48 y 72 hpi, fue semejante entre las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG. Por otra parte, para las NPSiNH-Fol se observó un aumento gradual en la actividad de nado, alcanzando un máximo a las 48 hpi, y un posterior decaimiento de la misma a las 72 hpi.

La Fig. 6.16 muestra el ensayo de actividad de nado en el que se incorporaron dos concentraciones mayores de las NPSiNH₂ (192 y 384 µg/ml). En este rango de concentraciones no se observaron diferencias significativas para las dos concentraciones mayores de NPSiNH₂.

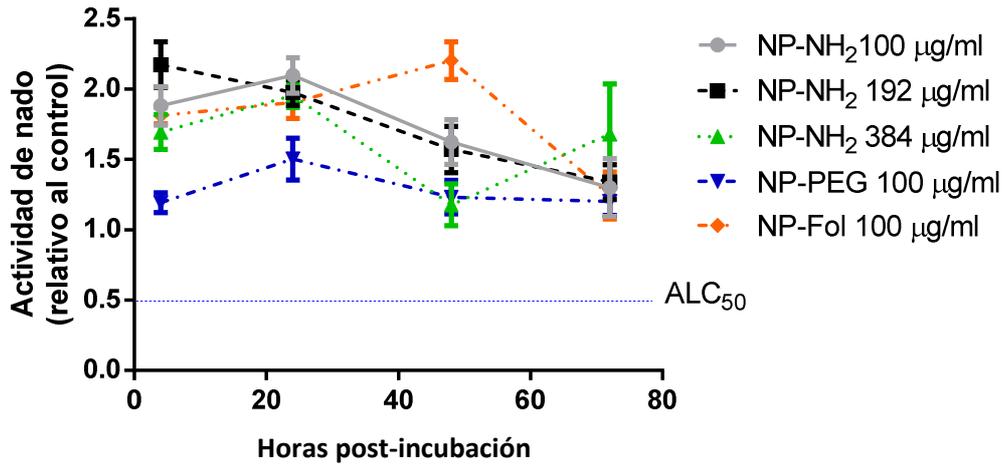


FIG. 6.16: ACTIVIDAD DE NADO COMPARATIVAS DE DISTINTAS NPSi DE DIFERENTE CONCENTRACIÓN

3.1.2 DL50 para las NPSiNH₂

Las mismas larvas utilizadas para las determinaciones de actividad de nado se usaron para determinar la DL50 al día 7 post-fecundación (dpf) que equivale a las 72 hpi.

En esta técnica se hace una observación con lupa de todos los animales tratados (24 para cada condición → 3 larvas por pocillo en un total de 8 pocillos) y se considera como parámetro de letalidad la ausencia de latido cardíaco. La DL50 se determina mediante análisis estadístico de los datos obtenidos: ensayos probit, StatPlus®.

Los resultados se muestran en la Fig. 6.17 que consiste en el gráfico de actividad de nado obtenido por este ensayo. La tabla 6.1 muestra los resultados del ensayo de DL50.

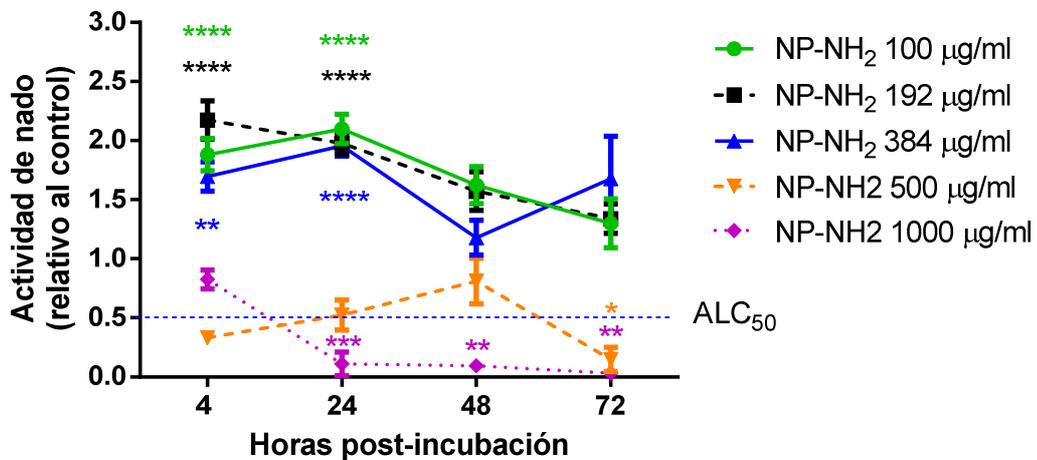


FIG. 6.17: ACTIVIDAD DE NADO A ALTAS CONCENTRACIONES PARA LAS NPSiNH₂

El gráfico de la Fig. 6.17 muestra los cambios en la actividad de nado de las larvas durante el ensayo de determinación de DL50. Puede verse que para la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ hay una ausencia de actividad a las 72 h, mientras que para la dosis de 1000 $\mu\text{g/ml}$ la ausencia de actividad ocurre a las 24 horas post-incubación.

TABLA 6.1: ENSAYO DE DETERMINACION DE LA DL50

NPSi	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Animales totales	Muertos	Controles muertos	% mortalidad
NPSiNH ₂	100	24	0	1	0
NPSiNH ₂	192	24	1	0	4
NPSiNH ₂	384	24	6	0	25
NPSiNH ₂	500	24	24	0	100
NPSiNH ₂	1000	24	24	0	100

Para obtener el valor de la DL50 a partir de los datos de la tabla 6.1 se graficaron los valores y se realizó un ajuste lineal de los puntos (Fig. 6.18). La concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ se descartó para este análisis. El valor encontrado para la DL50 de las NPSiNH₂ fue de $402,6 \pm 32,0 \mu\text{g/ml}$. Como los valores de la regresión no son buenos, este valor es un estimativo y el ensayo debería repetirse sumando concentraciones intermedias entre 384 y 500 $\mu\text{g/ml}$.

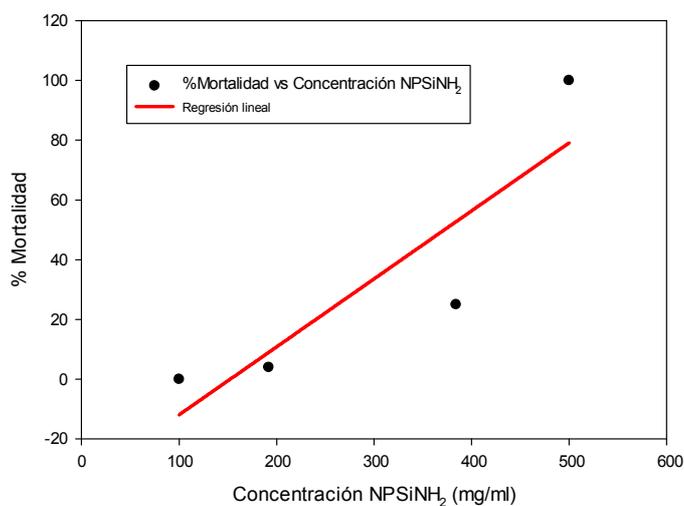


FIG.6.18 : AJUSTE LINEAL USADO PARA DETERMINAR LA DL50 DE LAS NPSiNH₂

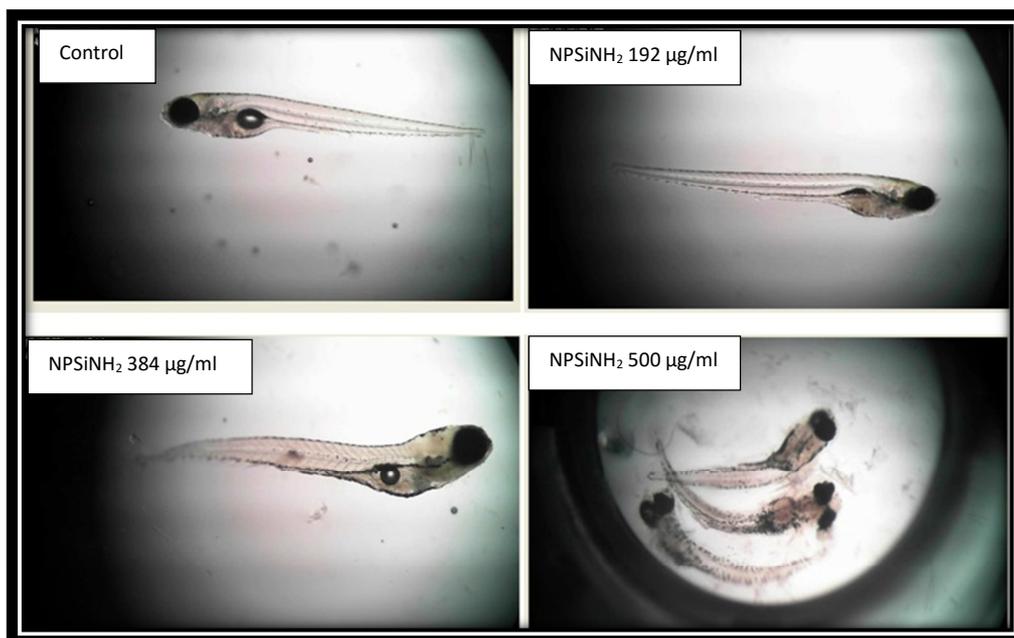


FIG. 6.19 : IMÁGENES DE MICROSCOPIA DEL ENSAYO DE DL50 DE LAS NPSiNH₂: La imágenes fueron tomadas durante el ensayo de determinación de la DL50. Puede verse en el tratamiento de 384 µg/ml la presencia de arqueado de las larvas tratadas y a la concentración de 500 µg/ml individuos no viables con tejido ulcerado y ausencia de vejiga natatoria.

3.2 Morfología comparativa

Las mismas larvas utilizadas para las determinaciones de actividad de nado se usaron para determinar si se producen cambios morfológicos en las larvas tratadas.

Se realizaron las siguientes determinaciones: área del ojo, longitud rostrocaudal y longitud de la médula espinal. Los datos crudos fueron analizados estadísticamente por Análisis Anova, PostTest Dunett comparando cada una de las concentraciones de las NPSi testeadas con el control sin NPSi, o bien Análisis Anova, PostTest Tukey's para comparar cada una de las concentraciones testeadas con el control sin droga y entre las drogas.

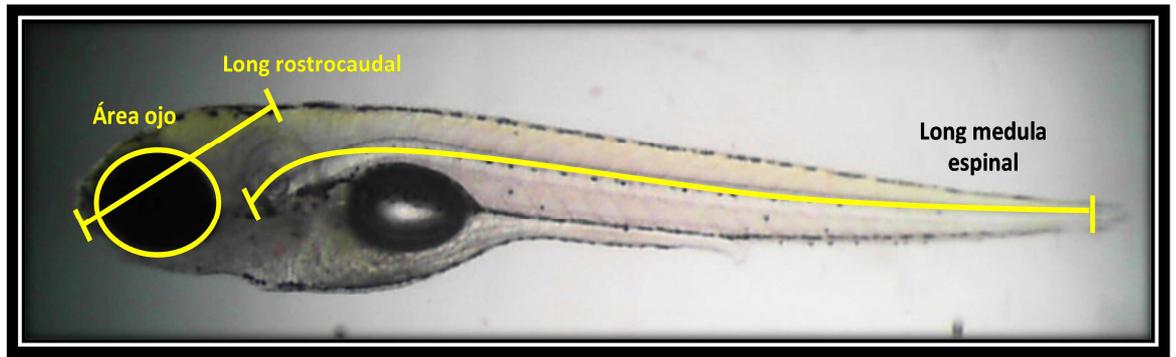


FIG. 6.20: MEDIDAS A DETERMINAR EN EL ENSAYO DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Estos resultados se muestran a continuación.

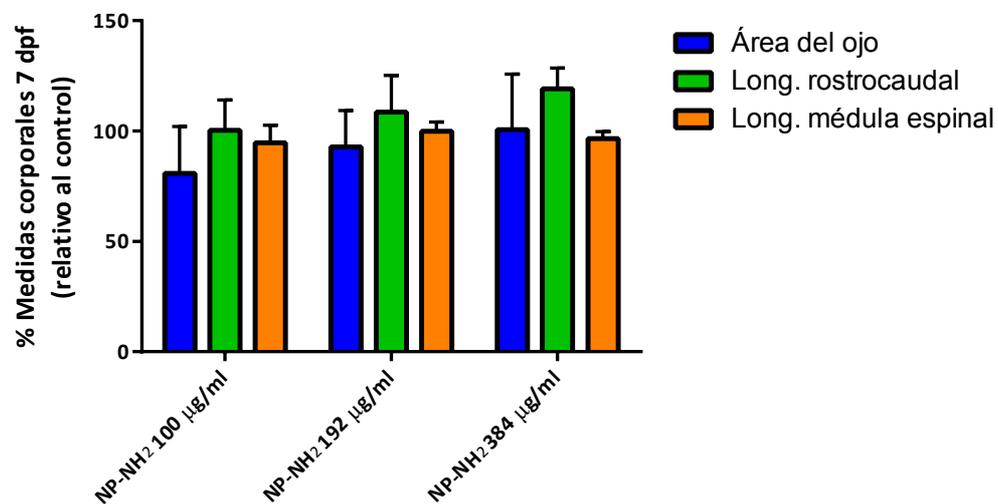


FIG. 6.21: DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS PARA LAS NPSiNH₂: El gráfico muestra los cambios en los parámetros morfológicos (n=5) para diferentes concentraciones de las NPSiNH₂ (*p<0,01).

El análisis estadístico de los resultados de la Fig. 6.21 indica los cambios observados no son significativos con respecto al control para ninguna de las tres concentraciones estudiadas de las NPSiNH₂.

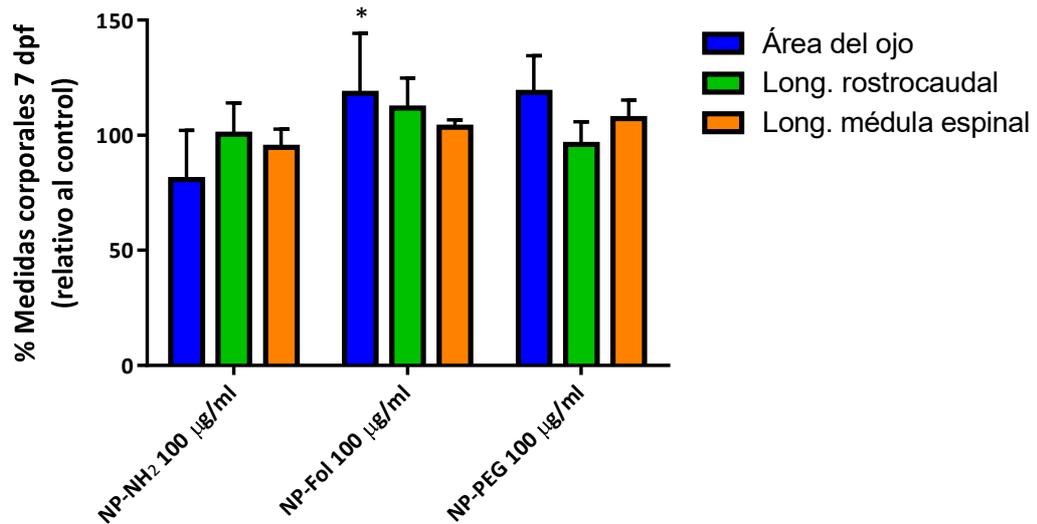


FIG. 6.22: DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS PARA LAS DISTINTAS NPSi A 100 µG/ML: El gráfico muestra los cambios en los parámetros morfológicos (n=5) comparativo para una misma concentración de las distintas NPSi (*p<0,01).

La Fig. 6.22 corresponde al análisis morfológico comparativo entre las diferentes NPSi a una concentración de 100 µg/ml. Por este ensayo solo se observó un leve cambio significativo en el área del ojo entre NPSiNH₂ y NPSiNH-Fol. No se observaron diferencias significativas con respecto al control o entre las diferentes NPSi para el resto de los parámetros estudiados.

Se realizaron además las siguientes determinaciones: ausencia de vejiga natatoria, presencia de cuerpo arqueado, presencia de tejido ulcerado y presencia de edema pericardial. A partir de estas observaciones se obtuvo el porcentaje de animales del total que presentaban cada una de dichas características. Se consideró un efecto leve (+) entre un 20-50%, moderado (++) 60-80% y grave (+++) entre 80-100%.

Los resultados se muestran en la tabla 6.2.

TABLA 6.2: CAMBIOS MORFOLÓGICOS PARA LAS DISTINTAS

NPSi	Dosis (µg/ml)	Ausencia de vejiga natatoria	Presencia de cuerpo arqueado	Presencia de tejido ulcerado	Presencia de edema pericardial	Individuos tratados (n)
NPSiNH ₂	100	+	-	-	-	5
NPSiNH ₂	192	+	+	-	-	5
NPSiNH ₂	384	+	++	+	-	5
NPSiNH ₂ Fol	100	+	-	-	-	10
NPSiNH ₂ PEG	100	+	-	-	-	10

A partir de los datos de la tabla 6.2 puede verse que los diferentes tratamientos producen cambios leves sobre la vejiga natatoria de las larvas. La presencia de cuerpo arqueado tiene un efecto leve para las NPSiNH₂ a 192 µg/ml y un efecto moderado a 384 µg/ml, mientras que no se encuentran cambios en este parámetro para las tres NPSi a una concentración de 100 µg/ml. La presencia de cuerpo ulcerado resulta leve para la concentración de 384 µg/ml de las NPSiNH₂ y no se evidencia a concentraciones más bajas ni para las otras NPSi a 100 µg/ml.

4. Obtención de imágenes de fluorescencia con NPSi

En esta parte del trabajo se trató de determinar si las NPSi desarrolladas pueden resultar útiles en la obtención de bioimágenes como marcadores fluorescentes.

Se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal de células C6 cultivadas sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro. Las células se trataron durante 24 hs con suspensiones acuosas de 100 µg/ml de las diferentes NP-Si y luego se fijaron y se montaron sobre vidrios con PBS: Glicerol (1:1).

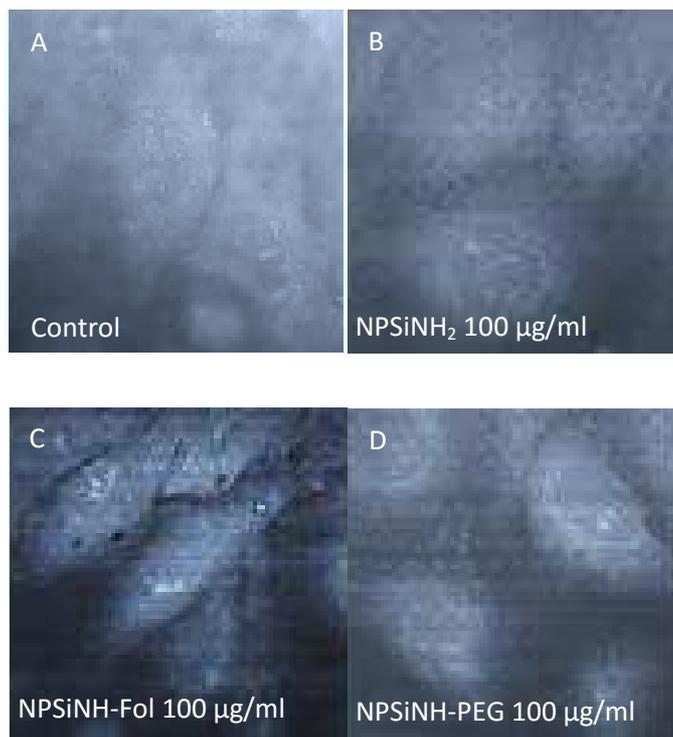


FIG. 6.23: IMÁGENES DE MICROSCOPÍA CONFOCAL: **A** corresponde al control, **B** a las células tratadas con 100 µg/ml de NPSiNH₂, **C** a las células tratadas con 100 µg/ml de NPSiNH-Fol y **D** al tratamiento con 100 µg/ml de NPSiNH-PEG.

Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 modelo IX81 (Exc: 405 nm, Em: 430-470 nm), empleando un objetivo de inmersión Olympus 60X PLAPON (Apertura numérica: 1.42).

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal tienen baja calidad, pero puede verse que las nanopartículas son capaces de incorporarse a las células ubicándose en el citoplasma celular.

También se analizó la aplicabilidad de estas NPSi para la obtención de imágenes en larvas de zebrafish. Para obtener estas imágenes se incubaron las larvas con NPSiNH₂ a una concentración final de 100 µg/ml durante 24 hs. Para la obtención de estas imágenes se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 con filtros tipo #WB correspondientes a: espejo dicróico DM460, filtro de excitación BP350 y barrera de filtro BA400. *BP (band pass filter)*: filtros que dejan pasar una banda comprendida entre dos longitudes de onda, por ejemplo “BP460-580” significa que es opaco a longitudes de onda no comprendidas entre 460nm y 580nm. Se utilizó como modelo a las NPSiNH₂.

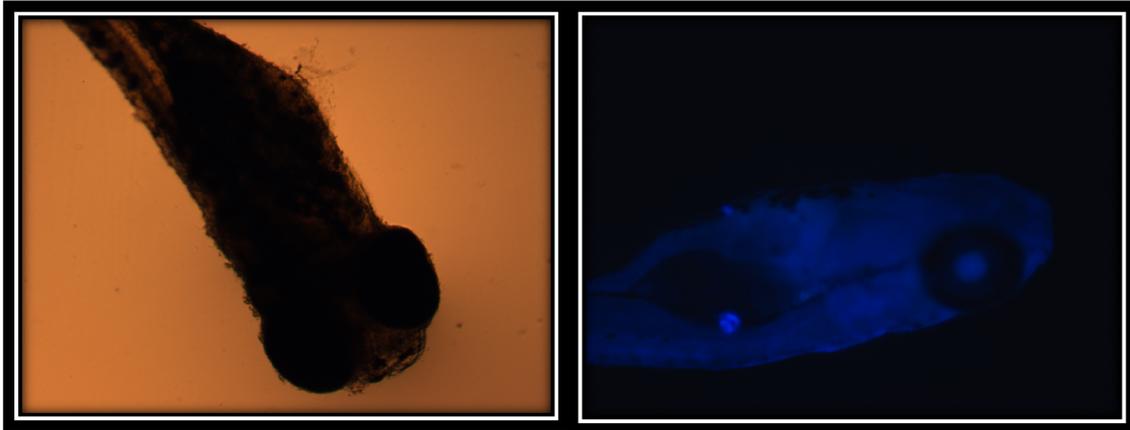


FIG. 6.24: IMÁGENES DE FLUORESCENCIA DE LARVAS INCUBADAS CON 100 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE NPSiNH_2 : La imagen de la izquierda corresponde a un control en ausencia de NPSi y a la derecha se muestra una imagen obtenida en presencia de nanopartículas.

Las imágenes de epifluorescencia de la Fig. 6.24 tienen buena calidad y muestran que las NPSiNH_2 ingresan al interior de las larvas y se distribuyen de manera homogénea por el cuerpo de las larvas.

Conclusiones:

Los ensayos de citotoxicidad (MTT y RN) realizados en esta parte del trabajo demostraron que las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol no resultan tóxicas para la línea celular C6 hasta una concentración de 100 µg/ml. Por otro lado, si se encuentran efectos citotóxicos en esta línea celular por el ensayo de MTT a partir de los 250 µg/ml para las NPSiNH₂ y las NPSiNH-PEG, mientras que las NPSiNH-Fol presentaron toxicidad por este ensayo a partir de 500 µg/ml.

Los ensayos en larvas de zebrafish muestran que las diferentes NPSi no producen diferencias significativas de la actividad de nado de larvas a bajas dosis ([NPSi] = 100 µg/ml), mientras que la actividad de nado se reduce drásticamente a [NPSiNH₂] ≥ a 500 µg/ml. De hecho la dosis de 500 µg/ml resultó letalmente tóxica para el 100 % de las larvas expuestas a este tratamiento. Estos resultados permitieron estimar la DL50 para las NPSiNH₂ en un valor de 402 ± 32 µg/ml. El estudio de cambios morfológicos en larvas tratadas con las diferentes NPSi, no evidencia diferencias significativas hasta la concentración de 384 µg/ml de las NPSiNH₂.

Por otro lado, las NPSiNH₂ no produjeron aumentos en la producción de ROS por parte de las células tratadas con diferentes dosis de radiación ionizante. Este efecto se discute en la bibliografía y se atribuye a la alta reactividad de los grupos aminos por los radicales generados durante el proceso de radiólisis del agua.

Las imágenes de fluorescencia obtenidas en células C6 tratadas con las diferentes nanopartículas no presentan buena resolución, por lo que se planea repetir el ensayo. Por el contrario las imágenes de fluorescencia de larvas incubadas con NPSiNH₂ resultan de buena calidad lo que plantea la posibilidad de uso para la obtención de imágenes.

Bibliografía:

- Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, et al (2013) Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol Vitr* 27:954–963. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.016
- Busch W, Duis K, Fenske M, et al (2011) The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany. *Reprod Toxicol* 31:585–588. doi: 10.1016/j.reprotox.2011.02.010
- Chan WCW, Maxwell DJ, Gao X, et al (2002) Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol* 13:40–46. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00282-3
- Chan WCW, Nie S (1998) Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* (80-) 281:2016–2018. doi: 10.1126/science.281.5385.2016
- Chen H, Li L, Cui S, et al (2011) Folate conjugated CdHgTe quantum dots with high targeting affinity and sensitivity for in vivo early tumor diagnosis. *J Fluoresc* 21:793–801. doi: 10.1007/s10895-010-0772-4
- Chen N, He Y, Su Y, et al (2012) The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33:1238–1244. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.070
- Dahan M, Laurence T, Pinaud F, et al (2001) Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Opt Lett* 26:825–827. doi: 10.1364/OL.26.000825
- Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN (2004) Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett* 4:11–18. doi: 10.1021/nl0347334
- Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Rey A (2007) Biología Molecular de los glioblastomas. *Neurocirugia* 18:373–382.
- Gara PMD, Garabano NI, Portoles MJL, et al (2012) ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. *J Nanoparticle Res.* doi: 10.1007/s11051-012-0741-8

- Getoff N, Schwörer F (1973) Pulse radiolysis of ethyl, n-propyl, n-butyl and n-amyl amine in aqueous solutions. *Int J Radiat Phys Chem* 5:101–111. doi: 10.1016/0020-7055(73)90032-6
- Kim YS, Song MY, Park JD, et al (2010) Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:1–11.
- Lefranc F, Kiss R (2006) Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas. *Neurosurg Focus* 20:E7. doi: 10.3171/foc.2006.20.4.4
- Lillo CR, Romero JJ, Portolés ML, et al (2015) Organic coating of 1–2-nm-size silicon nanoparticles: Effect on particle properties. *Nano Res.* doi: 10.1007/s12274-015-0716-z
- Llansola Portolés M (2011) Desarrollo de nanopartículas de silicio como potenciales marcadores luminiscentes y agentes terapéuticos en sistemas biológicos. UNLP
- Lovrić J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D (2005) Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol* 12:1227–1234. doi: 10.1016/j.chembiol.2005.09.008
- Mitchell GP, Mirkin CA, Letsinger RL (1999) Programmed Assembly of DNA Functionalized Quantum Dots. 8122–8123.
- Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, et al (2006) PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J Control Release* 114:343–347. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.06.017
- Peng F, Su Y, Zhong Y, et al (2014) Silicon nanomaterials platform for bioimaging, biosensing, and cancer therapy. *Acc Chem Res* 47:612–623. doi: 10.1021/ar400221g
- Pisanic TR, Blackwell JD, Shubayev VI, et al (2007) Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 28:2572–2581. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.043
- Rao PS, Hayon E (1975) Oxidation of Aromatic-Amines and Diamines By Oh Radicals - Formation and Ionization-Constants of Amine Cation Radicals in Water. *J Phys Chem* 79:1063–1066.

Romero JJ, Llansola-Portolés MJ, Dell’Arciprete ML, et al (2013) Photoluminescent 1-2 nm sized silicon nanoparticles: A surface-dependent system. Chem Mater 25:3488–3498. doi: 10.1021/cm401666a

Ruizendaal L, Bhattacharjee S, Pournazari K, et al (2009) Synthesis and cytotoxicity of silicon nanoparticles with covalently attached organic monolayers. Nanotoxicology 3:339–347. doi: 10.3109/17435390903288896

Capítulo 7

CONCLUSIONES GENERALES Y FUTUROS PASOS

1. Conclusiones generales

Tal como se describió en la introducción, los estudios encarados en este trabajo de tesis tuvieron como objetivo verificar o refutar la hipótesis de trabajo: *Las nanopartículas de silicio del tamaño de los pocos nanómetros, recubiertas con polietilenglicol y funcionalizadas con moléculas específicas, reúnen las condiciones necesarias para ser empleadas como agentes terapéuticos en radioterapia.*

Para ello, las investigaciones desarrolladas involucraron la síntesis de nanopartículas de silicio recubiertas con PEG y funcionalizadas con ácido fólico, como una primera aproximación para lograr sistemas nanoparticulados basados en el silicio capaces de ser direccionados a células tumorales que resulten potencialmente aptos como agentes en terapias contra el cáncer. Estos estudios involucraron: la optimización de la síntesis por vía química de nanopartículas de silicio de diámetros menores a los 4 nm que presentan luminiscencia intensa en el visible y la evaluación de la influencia de la derivatización superficial con PEG y ácido fólico sobre sus propiedades fotofísicas y fotosensibilizantes de las nanopartículas. Por último se estudió la citotoxicidad de las nanopartículas y su capacidad de producir ROS por irradiación con rayos X de alta energía.

A continuación se describen las conclusiones alcanzadas durante el desarrollo de las distintas etapas:

- (1) Se optimizó el método de reducción de SiCl_4 en micelas invertidas y se derivatizaron los centros de silicio así obtenidos con propilamina y con ácido acrílico de forma de obtener partículas con grupos superficiales NH_2 y COOH que forman suspensiones estables en ambientes acuosos, de forma que permitiese la conjugación posterior de las NPSi con ácido fólico y PEG. Dado que las NPSi con grupos propilamino superficiales resultaron más fotoluminescentes que las NPSi con grupos propil ácido, las NPSiNH_2 se sintetizaron como intermediarios para la posterior funcionalización con PEG y ácido fólico.

A pH fisiológico, las NPSiNH_2 muestran cargas superficiales positivas y suspensiones acuosas altamente estables. El valor de ϵ obtenido para estas partículas a partir de los espectros de absorción en agua resulta del mismo orden que el de los colorantes orgánicos tradicionales. Estas partículas son capaces de producir oxígeno singulete, evidenciado a través del consumo de oxígeno molecular disuelto. Sin embargo, los grupos amino superficiales parecen producir un quenching físico del oxígeno singulete. En soluciones acuosas de SFB las partículas se unen a la BSA a una distancia tal que produce la extinción de la fluorescencia de los residuos de triptófano a través de un fenómeno de transferencia de energía. La formación de complejos de estado fundamental BSA:NPSiNH_2 conduce a un aumento neto de la fotoluminiscencia de

las partículas sin cambios en el espectro. Esta propiedad de producir FRET con los residuos de triptófano de la BSA abre nuevas oportunidades para las aplicaciones multifuncionales de las NPSi. Estas propiedades y la baja citotoxicidad mostrada sobre células C6 de glioma de rata y en Zebra Fish apoyan firmemente su potencial uso como sensores en sistemas biológicos.

(2) Se funcionalizaron las NPSiNH₂ con PEG y se observó que la presencia del PEG no modifica las propiedades fotoluminiscentes de las partículas, aunque sí afecta su carga superficial, y por lo tanto la aglomeración de las partículas en suspensión. A partir del análisis por TGA pudo observarse que se obtuvo un bajo grado de recubrimiento superficial con PEG, y se presume que la cadena de PEG se encuentra probablemente enrollada sobre la superficie de la partícula. Las NPSiNH-PEG también son capaces de fotosensibilizar oxígeno molecular, aunque los ligandos de superficie PEG-NH- siguen mostrando un quenching físico del ¹O₂. La luminiscencia de las partículas también se incrementa en soluciones de FBS, aunque la constante de unión es más baja que la observada para las NPSiNH₂. Este es un dato importante dado que la absorción de proteínas es el paso preliminar para el reconocimiento por parte de los macrófagos del sistema inmune. La PEGilación parece ser una buena estrategia para lograr una reducción en la absorción de proteínas. Sin embargo, para permitir una reducción mayor se debe mejorar el grado de recubrimiento en el proceso de PEGilación.

(3) Por otro lado, la cobertura de la superficie con una molécula fotofísicamente activa como el ácido fólico conduce a una superficie cargada negativamente a pH fisiológico y la modificación del espectro de excitación de las partículas. La unión de ácido fólico ofrece a las partículas la capacidad de producción de O₂⁻ tras la irradiación de luz, una propiedad necesaria para su uso como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica (PDT). Estas observaciones sugieren que la molécula de ácido fólico está probablemente involucrada en la fotofísica de las partículas.

Del análisis de estos resultados, surge que, a pesar de que las NPSiNH₂, NPSiNH-PEG y las NPSiNH-Fol han demostrado la capacidad de generar ¹O₂, la modificación con grupos -NH₂ superficiales podría ser una desventaja al usar estas partículas como fotosensibilizadores de ¹O₂ en PDT. Dado que la presencia de los grupos amina y amida parece ser la causa de eliminación de oxígeno singulete, el uso de enlaces amida como ligandos enlazantes es sumamente desalentador cuando se utiliza NPSi como sensibilizadores en PDT.

(4) Finalmente, se recurrió a la síntesis de nanopartículas recubiertas con PEG obtenidas por un segundo método de síntesis de un solo paso. Este método presenta algunas ventajas respecto

de las obtenidas por el método de las micelas invertidas. Por un lado la síntesis no involucra el uso de solventes orgánicos, lo que lo convierte en un método de síntesis más “ambientalmente amigable” y reduce la posibilidad de que se presenten efectos tóxicos provenientes de un incompleto proceso de purificación. Estas NPSi’PEG parecen tener un alto grado de recubrimiento superficial evidenciado por el análisis por TGA, lo que hace que presenten menor grado de aglomeración. A su vez es de esperar que un alto grado de recubrimiento con PEG disminuya la interacción inespecífica con proteínas aumentando los tiempos de circulación en el sistema sanguíneo. Estas partículas también tienen la capacidad de generar oxígeno singulete tal como se demostró mediante la detección de trazas a 1270 nm, con rendimientos cuánticos de generación de oxígeno singulete del orden de los reportados en la bibliografía para partículas sin recubrimiento.

- (5) Los estudios de viabilidad celular con células C6 de glioma de rata han demostrado que las diferentes partículas no resultan tóxicas para las células hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, tanto en el ensayo MTT como RN. Esta baja toxicidad apoya fuertemente su potencial aplicación como sensores en sistemas biológicos. Sin embargo, se encuentran efectos citotóxicos en esta línea celular a partir de una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ para las NPSiNH₂ y NPSiNH-PEG, mientras que las NPSiNH-Fol resultaron tóxicas a partir de una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$. Los estudios de toxicidad en larvas de Zebra fish demuestran que estas tres mismas nanopartículas no resultan tóxicas para las larvas a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. En este modelo se evidencian efectos tóxicos a partir de una concentración de 384 $\mu\text{g/ml}$ de NPSiNH₂, resultando letales para las larvas dosis mayores a 500 $\mu\text{g/ml}$ de estas nanopartículas. Se pudo estimar a partir de estos resultados una DL50 de 400 $\mu\text{g/ml}$ de NPSiNH₂.
- (6) Estudios con RX sobre células C6 de glioma de rata en ausencia y presencia de NPSiNH₂ demostraron que estas nanopartículas no parecen ser útiles para producir un aumento en la generación de ROS, situación que coincide con la alta reactividad que presentan los grupos amino por las especies radicales que se generan por la radiólisis del agua. Este resultado no es lo esperado para el objetivo inicial de desarrollar radiosensitizadores basados en las NP-Si. Sin embargo, si se piensa a las NPSiNH₂ como sensores fluorescentes, su actividad antioxidante capaz de proteger a las células de la actividad ionizante abre nuevas potenciales aplicaciones de estas partículas.

2. Futuros pasos

A partir de los resultados encontrados en el presente trabajo de tesis, se planifica la realización de algunos experimentos a fin de completar el trabajo y se plantean otras estrategias a desarrollar en futuros trabajos.

Por un lado, para completar los estudios de irradiación con RX, se evaluará la capacidad de las NPSiNH-PEG y NPSiNH-Fol de potenciar la generación de ROS por aplicación de radiación ionizante sobre cultivo celular. Este ensayo permitirá concluir, si la unión de grupos funcionales a través de enlaces amida a la superficie de las NPSi es una estrategia adecuada para su utilización en terapia radiante. Al mismo tiempo, se analizará el comportamiento de las nanopartículas NPSi-PEG bajo acción de la radiación con RX, ya que en este caso el proceso de PEGilación de la nanopartícula no involucra la utilización de grupos amino o amida.

Finalmente, resulta interesante evaluar en futuros trabajos mecanismos de funcionalización de NP-Si a través de uniones que no involucren grupos amida, de manera de mejorar la capacidad de generación de especies reactivas por parte de estas partículas.