



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIAS
DE LOS MATERIALES

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TITANIA DOPADAS CON CERIA PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS

Tesis que para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales

Presenta:

MC. ABIGAIL TORRES ROMERO

Directora de Tesis:

DRA. MARÍA EUGENIA DE LA SALUD CONTRERAS GARCÍA

Co-Director de Tesis:

DR. MARCOS CAJERO JUÁREZ

Morelia, Michoacán; Agosto de 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la Dra. María Eugenia Contreras García el haberme ofrecido la oportunidad de trabajar con ella, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y sus constantes muestras de apoyo, por aportarme su fuerza y tesón, claves para llevar a cabo una investigación que ha resultado ser tan exigente como apasionante, y que seguro me ayudará de ahora en adelante.

Esta tesis ha sido realizada bajo la codirección del Dr. Marcos Cajero Juárez y del comité tutorial conformado por: el Dr. Ariosto Medina Flores, el Dr. José Lemus Ruiz, el Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo y el Dr. Juan Zárate Medina, a los que quiero agradecer su enorme apoyo, su empeño y desempeño durante estos años. También quiero agradecer a la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita por su apoyo y valiosas observaciones.

Asimismo, deseo externar mi agradecimiento al personal técnico responsables de los equipos y dispositivos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, al M.C. Héctor Damián Orozco Hernández encargado del laboratorio de Materiales cerámicos y refractarios, al M.C. Víctor Sayil López Álvarez encargado del laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión, a la Sra. Victoria Luke Valdivia encargada del laboratorio de Difracción de Rayos-X, al M.C. José Antonio Rodríguez Torres encargado del laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo y a la M.C. María Remedios Cisneros Magaña encargada del laboratorio de Análisis Químico. Por último, pero no menos importante al Sr. Sergio Álvarez Díaz encargado de mantenimiento del edificio B del IIMM.

Agradezco especialmente al M.C Ares Hernández Torres por su ayuda en la discusión de resultados y observaciones que resultaron de mucha utilidad en el desarrollo de las actividades de investigación y experimentación.

Deseo expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través de la concesión de la beca, y por el apoyo financiero del proyecto CB A1-S-36506, para el desarrollo de la presente investigación. A la CIC UMSNH por el apoyo financiero otorgado al proyecto No. 108529. Mi agradecimiento al CMEB-UMSNH por las facilidades otorgadas durante la estancia de investigación realizada en sus instalaciones.

Gracias al Instituto de Investigación en Metalurgia y Ciencia de Materiales (IIMM), por su apoyo y las facilidades brindadas durante todo este tiempo.

A mi Mamá,

Carlos,

Gaby,

Paty,

Olaf,

Mely y

Rey

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	xii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	4
1.2. Objetivos	6
1.2.1. Objetivos específicos	6
1.3. Hipótesis.	6
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Nanotecnología	7
2.1.1. Aplicación de la nanotecnología en la industria.....	9
2.2. Nanotecnología aplicada en medicina	11
2.2.1. Nanomedicina aplicada en el tratamiento del cáncer	12
2.2.2. Sistemas de liberación de fármacos basados en nanotransportadores	13
2.2.3. Orientación selectiva de los sistemas de liberación de fármacos	15
2.2.3.1. Vectorización pasiva	15
2.2.3.2. Vectorización activa.....	16
2.3. Titania	17
2.3.1. Polimorfos de la titania.....	18

2.3.2.	Estructura cristalina de rutilo y anatasa.....	18
2.3.3.	Propiedades y aplicaciones de la titania a nanoescala.....	20
2.3.3.1.	Nanopartículas de titania como SAF.....	22
2.3.3.2.	Síntesis de nanopartículas de titania.....	24
2.4.	Modificación de las propiedades de la titania a través del dopaje.....	26
CAPÍTULO 3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....		32
3.1.	Etapa 1	33
3.1.1.	Síntesis de los sistemas de estudio	33
3.1.2.	Caracterización estructural y química	34
3.2.	Etapa 2	36
3.2.1.	Funcionalización.....	36
3.2.1.1.	Ensamblaje de Daunorrubicina a los sistemas TiO ₂ y TiCe15.....	37
3.2.1.2.	Limpieza de los complejos DNR-TiO ₂ y DNR-TiCe15.....	37
3.2.2.	Determinación de la eficiencia de encapsulación y de carga	37
3.2.3.	Caracterización de los complejos DNR-TiO ₂ y DNR-TiCe15.....	39
3.3.	Etapa 3	40
3.3.1.	Pruebas de liberación del fármaco.....	40
3.3.2.	Bioensayos.....	41
3.3.2.1.	Cultivo celular	41
3.3.2.2.	Ensayos de viabilidad celular por MTT	41
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		43
4.1.	Etapa 1. Caracterización de los sistemas de estudio.....	43
4.1.1.	Difracción de Rayos-X.....	43
4.1.2.	Fluorescencia de Rayos X	49

4.1.3.	Área superficial (BET)	49
4.1.4.	Luminiscencia ópticamente estimulada.....	51
4.1.5.	Espectroscopía RAMAN	52
4.1.6.	Espectroscopía FT-IR.....	54
4.1.7.	Espectroscopía UV-Vis	56
4.1.8.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	58
4.1.9.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	63
4.2.	Etapa 2. Caracterización de los complejos DNR-TiO ₂ y DNR-TiCe15	68
4.2.1.	Espectroscopía FT-IR.....	68
4.2.2.	Espectroscopía RAMAN	70
4.2.3.	Espectroscopía UV-Vis	72
4.2.4.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	73
4.3.	Etapa 3. Bioensayos	75
4.3.1.	Pruebas de liberación <i>in vitro</i>	75
4.3.2.	Ensayos de viabilidad celular por MTT	77
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES		81
5.1.	RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		84
ANEXO 1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DAUNORRUBICINA.....		104
ANEXO 2. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....		107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Industrias que utilizan nanotecnología en el mundo.....	10
Tabla 2.2.	Propiedades físicas de las estructuras cristalinas de TiO ₂	18
Tabla 2.3.	Estudios realizados utilizando iones metálicos como dopantes.....	27
Tabla 2.4.	Estudios realizados utilizando elementos no metálicos como dopantes	29
Tabla 2.5.	Estudios realizados utilizando elementos de tierras raras como dopantes	30
Tabla 3.1.	Claves asignadas a los diferentes sistemas de estudio sintetizados.	34
Tabla 3.2.	Procedimientos de caracterización utilizados en la síntesis de los sistemas mixtos	34
Tabla 3.3.	Procedimientos de caracterización utilizados en la funcionalización de las nanopartículas.....	39
Tabla 4.1.	Parámetros de red calculados para los sistemas titania-ceria	44
Tabla 4.2.	Tamaño de cristalito y microtensiones promedio presentes en los sistemas de estudio	47
Tabla 4.3.	Resultados del análisis cuantitativo de fases por DRX.....	49
Tabla 4.4.	Composición elemental de las muestras de titania en orden creciente de concentración de ceria obtenidos por XRF	50
Tabla 4.5.	Influencia de la modificación de la titania con ceria en el área superficial (BET) y volumen total de poros.	50

Tabla 4.6.	Bandas Raman observadas en los espectros de los diferentes sistemas de estudio	53
Tabla 4.7.	Asignaciones de las bandas observadas en los espectros IR de titania dopada con ceria	55
Tabla 4.8.	Valores de Band gap para las muestras de titania pura y dopada con ceria.....	58
Tabla 4.9.	Frecuencias Raman (cm^{-1}) identificadas en la molécula de DNR ...	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Evolución en el desarrollo de la nanotecnología	8
Figura 2.2.	Mecanismos de vectorización pasiva y activa. Acumulación de las nanopartículas en las células tumorales.....	16
Figura 2.3.	Fases polimórficas más comunes del TiO ₂ : a) anatasa, b) espacios interatómicos en una molécula de TiO ₂ en fase anatasa y, c) rutilo.....	19
Figura 2.4.	Actividad fotocatalítica de la titania	21
Figura 2.5.	Esquema de la conjugación del fármaco DNR sobre NPsTiO ₂	23
Figura 3.1.	Diagrama general de actividades	32
Figura 4.1.	Espectros de difracción de Rayos-X de los sistemas de titania obtenidos con diferentes concentraciones de ceria	45
Figura 4.2.	Descomposición de fases, cuantificación de fases de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b), y TiCe15 c).....	48
Figura 4.3.	Sensibilidad de OSL de las muestras de titania dopadas con ceria	52
Figura 4.4.	Espectros Raman de las muestras de titania pura y dopada con 5, 10 y 15% mol de ceria	53
Figura 4.5.	Espectros de FT-IR para los sistemas de titania pura y dopada con ceria.....	54
Figura 4.6.	Espectros de UV-Vis de muestras de titania pura y dopada con ceria.....	56

Figura 4.7.	Determinación de la brecha de energía prohibida para: titania a), titania dopada con: 5% b), 10% c) y 15% de ceria d).....	57
Figura 4.8.	Imágenes de SEM de una muestra de titania a) y b); análisis químico de EDS de la muestra c).....	59
Figura 4.9.	Imágenes de SEM de las muestra de titania dopada con 5% a), 10% b) y 15% de ceria c).....	61
Figura 4.10.	Análisis químico de EDS de las muestras de titania dopada con 10% b) y 15% de ceria c).....	62
Figura 4.11.	Imagen de TEM de una muestra de titania a); histograma de distribución de tamaño de nanopartícula para TiO ₂ b)	63
Figura 4.12.	Imágenes de HRTEM obtenidas de una muestra de titania a) y b)	64
Figura 4.13.	Micrografías de TEM de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b) y TiCe15 c); histogramas de distribución de tamaño de nanopartícula de los sistemas de Ti5 d), TiCe10 e) y TiCe15 f) ..	66
Figura 4.14.	Imágenes de HRTEM de las nanopartículas que conforman las muestras de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b) y TiCe15 c).....	67
Figura 4.15.	Espectros de FT-IR obtenidos de los complejos DNR-TiO ₂ , DNR-TiCe15, así como de DNR y de las nanopartículas libres de fármaco	69
Figura 4.16.	Espectros Raman obtenidos de muestras en polvo de DNR, TiCe15, y los complejos DNR-TiO ₂ y DNR-TiCe15	71
Figura 4.17.	Espectros de UV-Vis del fármaco daunorrubicina y los complejos DNR-TiO ₂ y DNR-TiCe15.....	72

Figura 4.18.	Imágenes de TEM en la modalidad de campo claro de los complejos DNR-TiO ₂ a) y DNR-TiCe15 b)	74
Figura 4.19.	Imágenes de TEM en la modalidad de campo claro de los complejos DNR-TiO ₂ a) y DNR-TiCe15 b)	74
Figura 4.20.	Imágenes de HRTEM de las nanopartículas que conforman las muestras de los complejos DNR-TiO ₂ y b) DNR-TiCe15.....	75
Figura 4.21.	Cinética de liberación de DNR de los complejos DNR-TiO ₂ y TiCe15	76
Figura 4.22.	Viabilidad celular de la línea RPMI 8226 tras 48h de incubación con el complejo DNR-TiCe15 a diferentes concentraciones de DNR (200, 400, 600, 800 y 1600 nM).....	78
Figura 4.23.	Viabilidad celular de la línea RPMI 8226 tras 96h de incubación con el complejo DNR-TiCe15 a diferentes concentraciones de DNR (200, 400, 600, 800 y 1600 nM).....	79
Figura A1.	Curva de calibración de DNR.....	105
Figura A2.	Curva de calibración de DNR, donde se puede observar la interpolación de las concentración de DNR en el sobrenadante y la suspensión coloidal	105
Figura A3.	Curva de calibración de DNR en la suspensión coloidal.....	106

GLOSARIO DE TÉRMINOS

a	Parámetro de red “a”
(a)	absortividad de la muestra, en la ecuación general de recta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AH	Ácido hialurónico
b	Intercepto de la recta al origen, en la ecuación de la recta
BAFF	Factor activador de linfocitos B
BCC	Business Communications Company Research
BET	Área de superficie de Brunauer-Emmett-Teller
c	Parámetro de red “c”
CAGR	Tasa de crecimiento anual compuesto
CW-OSL	Luminiscencia ópticamente estimulada de longitud de onda continua
CDDP	Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino(II)
CeO ₂	Ceria
Ce(NO ₃) ₃ *6H ₂ O	Nitrato de cerio hexa-hidratado
CMEB	Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
Cosθ	Coseno del ángulo theta
d _f	Distancia interplanar del plano (hkl)
d _o	Distancia interplanar teórica del plano (hkl)

D.O	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNR	Daunorrubicina
DNR-NPsTiO ₂	Complejo Daunorrubicina-nanopartículas de Titania
DNR-TiCe15	Complejo Daunorrubicina-nanopartículas de Titania dopad con 15% de Ceria
DL50	Dosis letal 50
DRX	Difracción de rayos-X
e	microtensión
ECR:	Eriocromo Cianina R
EPR	Efecto de permeabilidad y retención incrementados (Enhanced Permeability and Rentention)
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
K	Factor de forma
MB	Methylene blue (en español Azul de Metileno)
MC-LR	Microcistina-LR
MMD	Millones de dólares
m _a	Masa inicial de DNR empleada para la funcionalización
m _f	Masa de DNR conjugada a las nanopartículas

MO	Methyl orange (en español Anaranjado de metileno)
MRI	Resonancia magnética nuclear de imagen
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 bromuro de difenil tetrazolio
NPsTiO ₂	Nanopartículas de Titania
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solución Buffer Fosfato Salino)
RhB	Rodamina B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SAF	Sistema de liberación de fármacos
SEM	Scanning Electron Microscopy (en español Microscopía Electrónica de Barrido)
Senθ	Seno del ángulo theta
TEM	Transmission Electron Microscopy (en español Microscopía Electrónica de Transmisión)
(TiO ₂) ⁺²	Grupo triangular peróxido de titanilo
TiCe10	Nanopartículas de Titania dopadas con 10% mol Ceria
TiCe15	Nanopartículas de Titania dopadas con 15% mol Ceria
TiCe5	Nanopartículas de Titania dopadas con 5% mol Ceria
Ti-O	Enlace titanio-oxígeno

TiO ₂	Titania
Ti-O-Ce	Enlace titanio-oxígeno-cerio
TMZ	Temozolomida
TTIP	Butóxido de titanio
UFC	Unidad formadora de colonia
UV-Vis	Espectroscopía de ultravioleta visible
v/v	Volumen/Volumen
x	Concentración del analito de interés, en la ecuación general de la recta
XRF	Fluorescencia de rayos-X
y	Absorbancia, en la ecuación general de la recta
w/o	Microemulsión agua-en-aceite
4-CP	4-clorofenol
%EE	Porcentaje de DNR encapsulada
%EC	Porcentaje de DNR cargada
λ	Longitud de onda de radiación de rayos X
Δd	Distancia residual

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que afecta gravemente a la población mundial. Por lo tanto, uno de los grandes desafíos que enfrenta la medicina moderna es diseñar nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de esa patología. El desarrollo de nuevos dispositivos a nivel de nanoescala como apoyo terapéutico en la práctica médica ha dado lugar a nanodrogas, que permiten el transporte de una dosis efectiva de agentes terapéuticos a células o tejidos diana, sin daño colateral a células sanas. Debido a sus propiedades únicas, las nanoestructuras cerámicas han demostrado su potencial como nanotransportadores de moléculas de fármaco para atacar células o tejidos. En el presente trabajo, se reporta la síntesis de nanopartículas de Titania dopadas con Ceria (TiCe), a través del método sol-gel en una microemulsión de micelas inversas, su funcionalización con el antineoplásico daunorrubicina y su uso como sistema de liberación del daunorubicina en la línea celular neoplásica RPMI 8226. La caracterización del nanocompuesto DNR-TiCe se realizó mediante técnicas espectroscópicas de UV-Vis, IR, Raman y mediante TEM. Los resultados experimentales revelaron que las nanopartículas de Titania dopadas con Ceria presentan una eficacia de encapsulación del fármaco de $80.86\% \pm 2.14\%$, mucho mayor que la obtenida para las nanopartículas de Titania pura (TiO_2), $66.12\% \pm 3.61\%$. Los ensayos de citotoxicidad in vitro mostraron un efecto anticancerígeno mejorado de la DNR cuando se asoció con nanopartículas, lo que sugiere que las nanopartículas aumentan la acumulación intracelular del fármaco. Asimismo, se demostró que las nanopartículas son altamente biocompatibles con las células, lo que favorece su uso en aplicaciones médicas, específicamente en este caso, como portador de fármacos.

Palabras clave: sistema de administración de fármacos, daunorubicina, nanopartículas, cáncer, dopaje de Titania con Ceria.

ABSTRACT

Cancer is a disease that severely afflicts the world population. Therefore, one of the great challenges facing modern medicine is to design new strategies to improve the diagnosis and treatment of that pathology. The development of new devices at the nanoscale level as therapeutic support in medical practice has given rise to nanodrugs, which enable the transport of an effective dose of therapeutic agents to target cells or tissues, with no collateral damage to healthy cells. Due to their unique properties, ceramic nanostructures have demonstrated potential as nanocarriers of drug molecules to target cells or tissues. In the present work, we report the use of Cerium-doped TiO₂ nanoparticles –TiCe–, synthesized via the sol-gel method in a microemulsion of reverse micelle, as DDS of Daunorubicin in the neoplastic cell line RPMI 8226. The characterization of the nanocomposite DNR-TiCe was carried out through UV-Vis, IR, and Raman spectroscopy techniques. The experimental results revealed that TiCe had a drug- encapsulation efficiency of 80.86% ± 2.14%, much higher than that obtained for TiO₂, 66.12% ± 3.61%. *In vitro* cytotoxicity assays showed an improved anticancer effect of DNR when associated with nanoparticles, suggesting that the nanoparticles increase intracellular accumulation of the drug. Likewise, the nanoparticles were shown to be highly biocompatible with the cells, favoring their use in medical applications, specifically in this case, as a drug carrier.

Keywords: drug delivery system, daunorubicin, nanoparticles, cancer, doping

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos nos vemos inmersos en un entorno diseñado a partir de materiales de naturaleza metálica, polimérica, cerámica y todas sus posibles combinaciones. Estos materiales sustentan nuestro presente bienestar y hacen factible nuestro progreso futuro. Tal ha sido su impacto que algunas de las etapas de la civilización han sido denominadas por el tipo de material que el hombre utilizó, así recordamos la Edad de Piedra, de Bronce y de Hierro. En lo que respecta a esta época, está caracterizada por el surgimiento de nuevos materiales que ofrecen posibilidades tecnológicas otrora solo concebibles por la ciencia ficción [1].

Uno de los campos de mayor incidencia en el siglo XXI en relación al desarrollo de nuevos materiales es, sin lugar a dudas, el de la nanotecnología. Con el dominio de esta tecnología emergente, a la que muchos denominan ya la revolución científica del siglo XXI, se ha logrado manipular, estudiar y aplicar la materia a nivel atómico y molecular, lo que ha permitido avances significativos en diversas áreas de la ciencia y la tecnología [2]. Hoy día, por ejemplo, podemos encontrar aplicaciones en disciplinas como la ciencia de materiales, medicina, química, medio ambiente, entre otras.

En particular, los avances en nanotecnología aplicados al área médica, hoy denominada nanomedicina, se han orientado al desarrollo de nuevas herramientas aún más potentes, que permitan la detección, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades como el cáncer o el Alzheimer entre otras [3-5]. Uno de los campos de investigación dominante dentro de esta disciplina está relacionado con el diseño de sistemas de administración de fármacos (SAF), el cual constituye con un 76% de las publicaciones científicas actuales en el área de administración de fármacos, seguido por el diagnóstico *in vitro* con 11% de contribución según la compañía BCC Research [6]. En un SAF, el principio activo es incorporado a un soporte —generalmente es un material polimérico, liposomas, micelas poliméricas, así como nanomateriales [7, 8]— que actúa como vehículo y libera el medicamento exclusivamente en las células o zonas afectadas, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando los efectos secundarios [9].

El cáncer es una de las patologías más investigadas en este campo, llegando a suponer un 34% de las publicaciones enfocadas al diseño de SAF basados en nanomateriales, según resultados extraídos de Web of Science®. El mayor desafío de los estudios de nanomedicina en el tratamiento

del cáncer es el descubrir y diseñar nanotransportadores para el suministro y liberación de fármacos más eficaces que permitan así mejorar las terapias convencionales [10]. El potencial de esta disciplina reside en la versatilidad de las funcionalidades que los nanomateriales pueden incorporar. Esto permite diseñar vehículos capaces de aumentar la especificidad hacia tejidos tumorales y vencer los mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a los fármacos por parte del tumor [11]. Asimismo, una localización efectiva de los nanotransportadores en tejidos tumorales supondría una menor toxicidad sistémica y por tanto una reducción de los efectos secundarios en los pacientes sin comprometer la efectividad terapéutica. Por tanto, la nanomedicina supone una oportunidad de mejorar los tratamientos actuales, siendo su estudio y desarrollo cada vez mayor, como refleja el incremento de la inversión y número de publicaciones científicas en esta área [12-14].

A la fecha, se han desarrollado diversas nanoestructuras —que incluyen lípidos basados en polímeros, micelas de base polimérica, liposomas, dendrímeros y nanopartículas inorgánicas— empleadas con éxito en el diseño de SAF en la terapéutica del cáncer [15, 16]. Dentro de este gran arsenal de nanoplataformas, las nanopartículas de titania (NPsTiO₂) son consideradas un excelente candidato para tal aplicación debido principalmente a que han demostrado buena biocompatibilidad con baja o nula citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, estabilidad química y gran área superficial [17-18]. Además, su estructura superficial puede ser modificada por la inclusión de diversos grupos funcionales que permiten el anclaje de principios activos —proceso conocido como *funcionalización*— [19-22]. Finalmente, su elevada relación área superficial/volumen puede garantizar una gran capacidad de carga terapéutica útil [23, 24], lo cual puede ser atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en su superficie, generados por la quimisorción disociativa del agua, que actúan como sitios de anclaje para diferentes tipos de moléculas a través de enlaces covalentes [25].

Por otra parte, en la actualidad las investigaciones en este campo se centran en el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis que produzcan NPsTiO₂ con mayor área superficial, con el objetivo de mejorar su capacidad de carga terapéutica útil [26]. En tal contexto, se ha reportado que al dopar a la titania con óxidos de tierras raras, especialmente con ceria (CeO₂), se logra una disminución en su tamaño de partícula con un aumento en el área superficial y una mejora considerable en su capacidad de funcionalización en solución acuosa. Además, en ausencia de radiación, no presentan efectos citotóxicos [27-32]. Por ello, es factible considerar a las NPsTiO₂ dopadas con CeO₂ como

candidatos viables a nanotransportadores en sistemas de liberación de fármacos en la terapéutica del cáncer. En el contexto del presente trabajo dopar se refiere a la inclusión o sustitución de un átomo diferente (a Ti u O) en el cristal de la titania.

Cabe señalar, por lo que los autores han investigado, no se han reportado a la fecha estudios relacionados con el diseño de SAF basados en NPsTiO₂ dopadas con CeO₂. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar la posibilidad de aplicarlos en este campo, particularmente en la terapia del cáncer. La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo a través del método sol-gel en una microemulsión de micelas inversas. Además, sus caracterizaciones químicas, de fase y morfológicas se determinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), difracción de rayos-X (DRX), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía RAMAN, adicionalmente se determinaron las propiedades luminiscentes ópticamente estimula (OSL) de las nanopartículas de titania dopada con ceria. Posteriormente, las nanopartículas se funcionalizaron de forma covalente con daunorrubicina (DNR), para formar el complejo DNR-TiCe15, y se investigó su capacidad de carga mediante espectroscopía de ultravioleta visible (UV-Vis). Finalmente, con fines comparativos, se evaluó el efecto citotóxico de las nanopartículas con el fármaco libre y el complejo DNR-TiCe15. El efecto citotóxico se evaluó por medio del ensayo MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 bromuro de difenil tetrazolio) en un cultivo de células de linfocitos B, esta prueba se basa en la conversión de MTT en Cristales de Formazán por las células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial. Debido a que la actividad mitocondrial total está relacionada con el número de células viables para la mayoría de las poblaciones celulares, este ensayo se usa ampliamente para medir los efectos citotóxicos *in vitro* de los fármacos en las líneas celulares [33].

1.1. Justificación

La mayoría de las terapias actuales contra el cáncer se basan en la administración sistémica de fármacos citotóxicos convencionales, con efectos secundarios y una eficacia limitada. Los estudios en el tema indican que esto podría atribuirse a una falta de especificidad de los actuales fármacos antineoplásicos, que causan daños colaterales en tejidos y células sanas. Por lo tanto, las investigaciones en este campo centran sus esfuerzos en el desarrollo de sistemas o dispositivos que permitan que un fármaco pueda liberarse de manera controlada o bien orientarse a una región determinada del cuerpo, a fin de conseguir un tratamiento más efectivo, minimizando con ello los efectos secundarios. Es así como la investigación enfocada en el diseño de sistemas de administración de fármacos (SAF) ha experimentado un desarrollo importante en los últimos años.

En las últimas décadas, la nanotecnología se ha revelado como un nuevo paradigma tecnológico, y su convergencia en las distintas áreas de investigación, especialmente en medicina, se ha traducido en importantes avances científicos y tecnológicos. Uno de los avances más prometedores en esta área ha sido el desarrollo de sistemas de administración de fármacos mediados por nanopartículas para el tratamiento de diversas enfermedades. En particular, el uso de nanopartículas en estos sistemas ofrece ciertas ventajas, como son su gran área superficial, lo que le confiere un mayor capacidad de carga terapéutica útil en su superficie, así mismo pueden traspasar barreras biológicas para acceder a lugares específicos del cuerpo, incrementando con ello el índice terapéutico y minimizando los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

Existen muchas matrices cerámicas que han demostrado su potencial para ser empleados como soporte en sistemas de liberación de fármacos. Entre los materiales cerámicos investigados en este campo se encuentran las NPsTiO_2 , que han emergido como una plataforma versátil para la administración de fármacos, debido principalmente a propiedades como son biocompatibilidad con baja o nula citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, estabilidad química y gran área superficial para cargar fármacos y otras biomoléculas. Además, ofrecen un eficiente sistema pH-dependiente para el suministro de fármacos, por lo que han sido estudiadas para el desarrollo de sistemas de liberación dirigida en tratamientos con quimioterapéuticos. Como el microambiente de las células tumorales es ligeramente más ácido respecto al pH de la sangre y tejido sano (7.4) y en el compartimiento endocítico intracelular existen diversos gradientes de pH (4.5-6.5), las NPsTiO_2 pueden retener el

fármaco durante el transporte por el torrente sanguíneo y liberarlo tras internalizarse vía endocitosis en la célula tumoral.

Dentro de este contexto, las nanopartículas de Titania dopadas con óxidos de tierras raras (REE), especialmente Ceria (CeO_2), son una plataforma emergente en el tratamiento del cáncer, debido a sus propiedades ópticas y baja toxicidad [27-32]. Esto favorece su aplicación principalmente como radiosensibilizador y en el diagnóstico por imagen, así como en la terapia fotodinámica. Cabe señalar que, la incorporación tanto de elementos como de los óxidos de tierras raras en la red de la Titania provoca una disminución en el tamaño de partícula y un aumento en el área de superficie. Además, se ha reportado que las estrategias de funcionalización en solución acuosa de este tipo de nanopartículas son más sencillas y eficientes [34]. En vista de lo anterior, es factible considerar a las NPsTiO_2 dopadas con CeO_2 como candidatos viables a nanotransportadores o soporte en sistemas de liberación de fármacos principalmente en la terapéutica del cáncer.

Por otra parte, las investigaciones en este campo se han caracterizado por centrar sus esfuerzos en el desarrollo de nuevas estrategias de síntesis que produzcan nanopartículas esféricas con mayor área superficial, lo que podría garantizar una mejora considerable en su capacidad de carga de principios activos. Una de estrategia comúnmente estudiada consiste en la síntesis de nanopartículas por el método sol-gel asistido por diferentes técnicas, como ultrasonido o microondas, debido a que se trata de un método catalogado dentro de los conocidos como de “química suave”, que permite obtener materiales en el rango nanoscópico con elevada área superficial, de gran pureza y morfología esférica uniforme. Asimismo, la técnica de microemulsión de micelas inversas se ha empleado con éxito en la obtención de nanopartículas esféricas con una distribución de tamaño de partícula homogénea. Por lo que, en el presente estudio se propone llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de Titania dopadas con Ceria por el método sol-gel asistido por una microemulsión de micelas inversas, cuya serie de reacciones conjuntas de hidrólisis e intercalación-inserción iónica permitirá obtener nanopartículas con las características adecuadas para su incorporación en sistemas de liberación de fármacos.

1.2. Objetivos

Llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de titania dopadas con ceria y evaluar su potencial *in vitro* como nanotransportadores en un sistema de liberación de fármacos antineoplásicos.

1.2.1. Objetivos específicos

1. Sintetizar sistemas de nanopartículas de titania dopadas con ceria por el método sol-gel en un microemulsión de micelas inversas.
2. Funcionalizar las nanopartículas obtenidas con un fármaco de acción quimioterapéutica comprobada llamado daunorrubicina.
3. Evaluar las propiedades luminiscentes ópticamente estimulas de los sistemas mixtos titania-ceria.
4. Evaluar *in vitro* mediante el ensayo MTT la actividad quimioterapéutica del complejo conformado por Daunorrubicina ligada a las nanopartículas de titania dopadas con ceria.

1.3. Hipótesis.

Al llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas del sistema mixto titania-ceria por el método de sol-gel asistido por la técnica de microemulsión de micelas inversas, se obtendrán nanopartículas que cumplan con las características necesarias —morfología esférica, distribución de tamaño uniforme, gran área superficial y facilidad de funcionalización de la superficie— para su uso como nanotransportadores en sistemas de liberación de agentes quimioterapéuticos, presentando un mejor desempeño en cuanto su capacidad de carga terapéutica útil y sus propiedades optoelectrónicas, lo cual resultará en la obtención de un SAF más eficiente.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las grandes revoluciones tecnológicas, como la industrial del S. XVIII y la tecnológica basada en el transistor de estado sólido y los semiconductores del siglo XX, han demostrado cómo pueden cambiar de manera drástica la vida del ser humano en todos sus aspectos, y han dejado como enseñanza que las rápidas transformaciones científicas y tecnológicas requieren de otros paradigmas para educar las nuevas generaciones de estudiantes, científicos y líderes de la academia y de la industria. En tal contexto, la nanotecnología es una, relativamente, disciplina reciente definida en la escala de longitud donde científicos e ingenieros de múltiples campos descubren fascinantes fenómenos y aplicaciones y proveen con nuevas y exquisitas herramientas para diseñar novedosos materiales y componentes en electrónica, y avances fundamentales y aplicaciones en la física, la química, la biología molecular, la medicina, el medio ambiente, las industrias químicas, las farmacéuticas, etc [35].

2.1. Nanotecnología

Es importante comenzar por comprender que la nanotecnología no es una industria o un mercado per se, sino una tecnología habilitadora de alto impacto que funciona de manera transversal con otras tecnologías e impacta a casi todas las industrias [35, 36]. La nanotecnología se basa en manipular estructuras a nivel atómico o molecular para diseñar nuevos materiales, componentes y dispositivos con nuevas o mejoradas propiedades físicas, biológicas, químicas y electrónicas [37]. Durante los últimos años el desarrollo de nanomateriales se ha convertido en uno de los campos de investigación más dinámicos en el área de la nanotecnología. Este interés alcanza también otras áreas de la ciencia como la química, la física, la biología y la ingeniería [38, 39].

Uno de los primeros registros de cambios en la composición de los materiales data de hace cientos de años, cuando el uso común de altas temperaturas otorgaba nuevas propiedades a los materiales. Posteriormente, en la Edad Media, los artistas mezclaban el oro y la plata para crear colores para los vitrales de las iglesias, sin saber que estaban haciendo nanotecnología. Un panorama general de la evolución de la nanotecnología en los últimos años se puede observar en la línea de tiempo que se muestra en la Figura 2.1 [40].



Figura 2.1. Evolución en el desarrollo de la nanotecnología.

Analizando la evolución de la nanotecnología a nivel mundial, se observa que con el descubrimiento del nanotubo de carbono se comienzan a desarrollar una gran variedad de nanomateriales, cuyo crecimiento ha sido exponencial y hoy en día representan cerca del 80% del mercado de la nanotecnología. Las cuatro etapas a las que se hace referencia en la Figura 2.1, plantean que para el año 2002, estas tecnologías son las mundialmente aceptadas porque describen la evolución de los nanomateriales, de ahí su importancia [41].

A pesar del acelerado desarrollo y comercialización de productos y servicios con base nanotecnológica, se puede observar que la problemática para la salud y el medio ambiente expuesta por la Comisión Europea en 2010 ocasionó que las empresas que ya habían consolidado el escalamiento industrial de sus productos tuvieran que reconfigurar sus procesos e incluso eliminar el sufijo “nano” de su nombre comercial. Lo que es también una realidad, es que la alerta de la Comisión Europea ha representado una ventana de oportunidad para que otras naciones incursionen en la nanotecnología, tan es así, que hoy en día más de 60 países han adoptado esta ciencia dentro de un proyecto nacional o sectorial con base en sus capacidades, infraestructura, futuro deseado, talento, gasto en investigación y desarrollo, entre otros. Por la complejidad de la misma tecnología, su regulación es un tema central que todavía se encuentra en discusión en los principales foros a nivel mundial, principalmente respecto de su impacto ambiental y social, que ha provocado que adicionalmente se aborde el tema de normas internacionales [40].

2.1.1. Aplicación de la nanotecnología en la industria

Durante las últimas décadas, la mayor parte de las industrias han identificado en los nanomateriales nuevos sistemas capaces de ser utilizados en la obtención de nuevos productos y el desarrollo de aplicaciones innovadoras en una amplia gama de sectores industriales, causando un elevado impacto en la economía mundial [40]. Se tiene registro de 14 sectores que aplican la nanotecnología a sus productos [40, 42], conformados por poco más de 2 mil empresas distribuidas a lo largo de 56 países.

México, por su parte, cuenta con 28 tipos de productos en los sectores automotriz, construcción, petróleo y medicina (Tabla 2.1), sector en el que la empresa que sobresale es Nanomateriales S. A. de C. V. La empresa abrió sus puertas en 2009 con una inversión inicial de cuatro millones de dólares; se estableció en Nuevo León dentro del Cluster de Nanotecnología y abarca una capacidad de producción de aproximadamente mil ochenta toneladas anuales [43]. La empresa manufactura nanopartículas de distintos materiales: dióxido de titanio, dióxido de silicio, óxido de zinc, silicato de magnesio, grafenos, entre otros.

Actualmente, las cinco principales industrias alrededor del mundo, que producen mayores cantidades de productos nanotecnológicos son: electrónica (25%), medicina (11%), cosméticos

(9%), textil (8%) y construcción (8%). Las industrias; automotriz, energías renovables y medio ambiente producen en conjunto el 18%, mientras que el resto se hace cargo del otro 21% de la producción. El sector electrónico es el líder con más de 2 mil productos; no obstante, es uno de los más costosos de acuerdo con diferentes fuentes. Los productos que más se producen a nivel mundial son sensores, circuitos integrados, procesadores y láseres con nanotecnología.

Tabla 2.1. Industrias que utilizan nanotecnología en el mundo [40, 42]

Industrias	Productos	Empresas	Países
Electrónicos	2049	100	15
Salud	963	285	35
Cosméticos	779	190	28
Textil	693	402	39
Construcción	626	243	31
Agricultura	243	66	24
Automotriz	529	129	32
Medio Ambiente	523	214	31
Alimentos	333	125	23
Electrodomésticos	256	73	18
Petróleo	301	108	24
Impresión	127	56	20
Energías renovables	466	148	26
Deportes	144	35	18
Otras industrias	410	176	27

El sector salud ocupa el segundo lugar con el mayor número de productos y son los agentes antineoplásicos, restauradores, vendajes, andamios regenerativos y analgésicos lo más producidos. Estados Unidos, Alemania y China son los principales productores.

En la gama de los productos cosméticos elaborados con base nanotecnológica, se identifica producción en 28 países, entre los que destaca la participación de Estados Unidos, Brasil y Reino

Unido. Alrededor de 200 empresas a nivel mundial han logrado el escalamiento industrial de más de 800 productos. Es importante señalar, que no todos los productos existentes cuentan con certificaciones internacionales, motivo por el cual muchas de las empresas prefieren no mencionar el tamaño de las partículas contenidas.

El sector de la construcción ha encontrado mayores beneficios en la aplicación de la nanotecnología en sus productos para fabricar recubrimientos con características especiales: hidrófobos, ignífugos o autolimpiables; materiales más resistentes y soluciones más homogéneas que dan pie a la creación de nuevos materiales, de los que destacan como productores Estados Unidos, Alemania y China [40].

2.2. Nanotecnología aplicada en medicina

Los nanomateriales y la nanotecnología están llamados a transformar la medicina por su potencial aplicación en el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Las investigaciones realizadas a lo largo de los últimos años han dado lugar a una nueva área dentro de las ciencias biomédicas: la nanomedicina [40].

La investigación en un campo tan complejo requiere de un acercamiento interdisciplinario que permita cubrir los aspectos físicos, químicos, biológicos, de ciencias de materiales y tecnologías que ayuden a combatir las principales causas de mortandad en todo el mundo y que permitirán mejoras considerables, por ejemplo:

1. Suministro controlado de fármacos a través de sistemas nanométricos —SAF, también denominados nanofármacos—;
2. Nanobots inteligentes reparadores de tejidos y órganos vitales;
3. Nanosensores para la detección y cura de enfermedades;
4. Nanopartículas para la erradicación de tumores cancerígenos; y,
5. Modificación del ADN con nanoherramientas.

Asimismo, el mercado mundial de las nanomedicinas se estimó tan sólo en 2016 en cerca de 134.4 MMD y en 151.9 MMD en 2017. Se prevé que este mercado crezca a una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) de 14.0% de 2017 a 2022, por lo que se prevé que alcanzará 293.1 MMD para 2022.

2.2.1. Nanomedicina aplicada en el tratamiento del cáncer

Durante los últimos años, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, pues de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) tan sólo en América es la segunda causa de muerte, y se estima que cada año 2.9 millones de personas son diagnosticadas y 1.3 millones mueren por esta enfermedad [44].

En la actualidad, la terapia contra el cáncer se centra mayoritariamente y está limitada a la irradiación y quimioterapia, técnicas altamente invasivas y agresivas para el paciente y que en muchos casos conducen a la alteración de su salud integral. Los obstáculos más importantes frente a la consecución de una terapia oncológica eficaz se cifran en: i) la distribución no específica de los fármacos antitumorales administrados dentro del organismo, ii) la incapacidad de alcanzar concentraciones lo suficientemente elevadas en el sitio del tumor y iii) la resistencia desarrollada por las células tumorales a diferentes tipos de quimioterapia [45].

En este sentido, la nanomedicina brinda la posibilidad de aplicar una terapia selectiva en la que los efectos del agente citotóxico se manifiesten únicamente sobre el tejido patológico, lo que supondría un enorme avance sobre la terapéutica tradicional, basada en la monitorización de los niveles plasmáticos del fármaco. A tal fin, los agentes antitumorales se pueden incorporar sobre un nanotransportador que mejore su biodisponibilidad, aumente la solubilidad y estabilidad en un medio fisiológico, favorezca su acumulación en el tumor, y a la vez se minimice su toxicidad sobre las células sanas [45].

Los nanotransportadores poseen propiedades únicas que les permiten trabajar en la misma escala que las moléculas constituyentes de los seres vivos. Su alta relación superficie/volumen dota a estos dispositivos una alta reactividad en superficie, por lo que es posible funcionalizarlos con distintas biomoléculas para aprovechar sus funciones en la localización específica de células y/o tejidos [46]. Las propiedades físicas (resonancia plasmónica, superparamagnetismo, etc.) de algunos de estos sistemas los hacen muy interesantes para el diagnóstico del cáncer, utilizando técnicas como la microscopía de fluorescencia, la tomografía por emisión de positrones o la resonancia magnética nuclear de imagen (MRI) [47]. Por lo tanto, los nanotransportadores son capaces de modular los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de los fármacos consiguiendo aumentar su eficacia terapéutica [48, 49].

2.2.2. Sistemas de liberación de fármacos basados en nanotransportadores

Los sistemas de liberación controlada se empezaron a desarrollar en la década de 1960 cuando se descubrió que pequeñas moléculas lipofílicas podían difundir al exterior desde una pieza de gel de silicona [50]. En las décadas posteriores los sistemas de liberación sostenida evolucionaron hacia el uso de diferentes tipos de materiales como hidrogeles [51], microesferas [52] o polímeros hidrofóbicos que ya permitían la liberación controlada de macromoléculas [53]. Después de la incorporación de los nanomateriales en medicina, el campo de investigación en administración de fármacos ha crecido de forma importante, lo que se refleja en las más de 8000 publicaciones en revistas científicas en el año 2015 recogidas en la *Web Of Science*® dentro del campo de la ciencia de materiales.

Las tecnologías desarrolladas para el control de la liberación de fármacos están basadas en matrices y reservorios que pueden modular la liberación de los principios activos en su interior [54]. Los procesos de desorción y difusión de las moléculas terapéuticas desde una matriz sólida a través de una red de poros tortuosa, la erosión o degradación por medio del disolvente o agentes biológicos, o el intercambio de fármacos con la matriz del dispositivo por hidratación, rigen la liberación de los principios activos incluidos en el sistema [55-57].

Los nanotransportadores clasificados en función de su composición y propiedades da lugar a tres tipos: orgánicos, inorgánicos e híbridos. Los mecanismos de liberación controlada de fármacos dependen de las características físicas y químicas de cada nanotransportador y su interacción con el medio. Por ejemplo, el comportamiento de los dispositivos poliméricos se basa en propiedades como: hidrofilia/hidrofobia, fuerzas electrostáticas, energías de hidratación o enlaces químicos y/o grupos funcionales con funciones específicas [58]. Sin embargo, en transportadores inorgánicos, son sus propiedades intrínsecas como la resonancia plasmónica de superficie, la fluorescencia o sus características electroquímicas las que resultan interesantes en aplicaciones biomédicas [59].

Los transportadores inorgánicos habitualmente requieren de funcionalidades orgánicas para dotarlos de características como mayor estabilidad en medios biológicos, capacidad de carga de fármacos o vectorización activa entre otros, lo que los convierte en materiales híbridos [60-62].

Los nanotransportadores orgánicos comprenden un gran abanico de compuestos naturales o sintéticos diseñados para la administración controlada de fármacos. El control de los procesos de

auto-ensamblado y conjugación permite la fabricación de multitud de estructuras capaces de guiar, encapsular o retener agentes antitumorales. Varios de estos tipos de nanotransportadores ya han sido aprobados para uso clínico y forman parte de la primera generación de nanomedicamentos que se usan habitualmente en clínica como Doxil® o DaunoXome®, los cuales están formulados con liposomas que encapsulan potentes antitumorales como doxorubicina o daunorrubicina [63].

Otra aproximación es el uso de fármacos conjugados covalentemente a macromoléculas como polímeros, proteínas o anticuerpos para aumentar la selectividad hacia células tumorales objetivo. Algunos de ellos como Adcetris® o Kadcyła® ya han sido aprobados para su uso clínico en terapia antitumoral [64]. Otros nanotransportadores prometedores son aquellos basados en polímeros sintéticos, los cuales presentan una excelente versatilidad en composición química, tamaño, biodegradabilidad, morfología y facilidad de funcionalización de la superficie. El elevado control sobre el diseño de la estructura de estos polímeros permite la creación de multitud de matrices poliméricas capaces de retener y encapsular fármacos, como micelas, nanopartículas o polimersomas. Actualmente, algunas de estas formulaciones se encuentran en estudios en fase clínica I, como Nanoplatin® que es capaz de reducir los efectos secundarios de la administración sistémica de su compuesto activo, el cisplatino [65].

Los nanotransportadores de origen inorgánico presentan algunas ventajas frente a los orgánicos debido a su alta estabilidad mecánica, química y térmica bajo condiciones biológicas, a lo que se suma su biocompatibilidad [66-68]. Este tipo de transportadores están basados en su mayoría en nanopartículas metálicas, de sílice policondensada, y óxidos de metales cuyas propiedades se pueden modular en función de su tamaño y forma, por lo que resultan muy atractivas en biomedicina. Por ejemplo la formulación AuroLase [69], la cual se encuentra en estudios clínicos en fase I, utiliza la resonancia plasmónica de superficie de nanopartículas de oro para conseguir la ablación fototérmica de tejidos tumorales.

Otra de las propiedades ampliamente estudiadas es el superparamagnetismo de las nanopartículas magnéticas, las cuales son capaces de generar calor en presencia de un campo magnético alterno. Esto posibilita la aplicación de hipertermia localizada una vez las nanopartículas magnéticas se encuentran acumuladas en una masa tumoral [70-74]. Ésta tecnología ya está disponible con el nombre de NanoTherm® [75]. Las nanopartículas magnéticas también tienen aplicaciones en liberación controlada de fármacos. Mediante el recubrimiento de estas nanopartículas con matrices

capaces de retener fármacos, se obtienen dispositivos híbridos que pueden liberar agentes citotóxicos en el tejido tumoral al aplicar un campo magnético alterno. Una de las matrices más estudiadas para el transporte de fármacos son las nanopartículas de sílice mesoporosa, debido a su fácil funcionalización y su alta área superficial, que permite atrapar casi cualquier tipo de fármaco de tamaño adecuado [76–78].

2.2.3. Orientación selectiva de los sistemas de liberación de fármacos

Las estrategias adoptadas hasta el momento para conseguir la orientación y acumulación de los nanofármacos en las células tumorales se han basado en dos mecanismos diferenciados: vectorización pasiva y activa [45].

2.2.3.1. Vectorización pasiva

La vectorización pasiva consiste en el transporte de nanopartículas por simple convección a través de espacios intracelulares hacia el intersticio tumoral y su posterior acumulación en estos tejidos, aprovechando el efecto de permeabilidad y retención aumentada (Enhanced Permeability and Retention (EPR) en inglés). Este efecto, descrito inicialmente por Maeda [79], se fundamenta en la fisiología característica del endotelio de los capilares del tumor, los cuales presentan una estructura desorganizada con una serie de huecos en su estructura (200-600nm), permitiendo la extravasación de nanopartículas hacia el interior del tejido, que se ilustra en la Figura 2.2.

Aunado a lo anterior, las partículas son retenidas en estos sitios debido a un drenaje linfático deficiente característico de los tumores [80, 81]. Además, se han identificado una serie de parámetros que influyen en el acceso de las nanoestructuras al tejido tumoral. Por ejemplo, se sabe que para que ocurra una extravasación eficiente a través de las fenestras del tejido tumoral los nanofármacos deben presentar un tamaño inferior a los 400nm, no obstante, para evitar la filtración renal necesitan ser mayores a 10nm y para que sean específicamente capturados por el hígado deben de presentar un tamaño menor a los 100nm [82].

2.2.3.2. Vectorización activa

La vectorización activa hace referencia a la orientación activa de las nanopartículas, y no sólo una simple acumulación en los tejidos tumorales, motivada por su marcada especificidad hacia las células diana. Ésta especificidad se ha conseguido a través de procesos de reconocimiento celular aprovechando la sobreexpresión de varios tipo de receptores en la superficie de las células tumorales [84]. La acumulación de nanofármacos en el tumor ha demostrado incrementar significativamente la efectividad terapéutica de los fármacos asociados, reduciendo a su vez la aparición de daños colaterales [85].

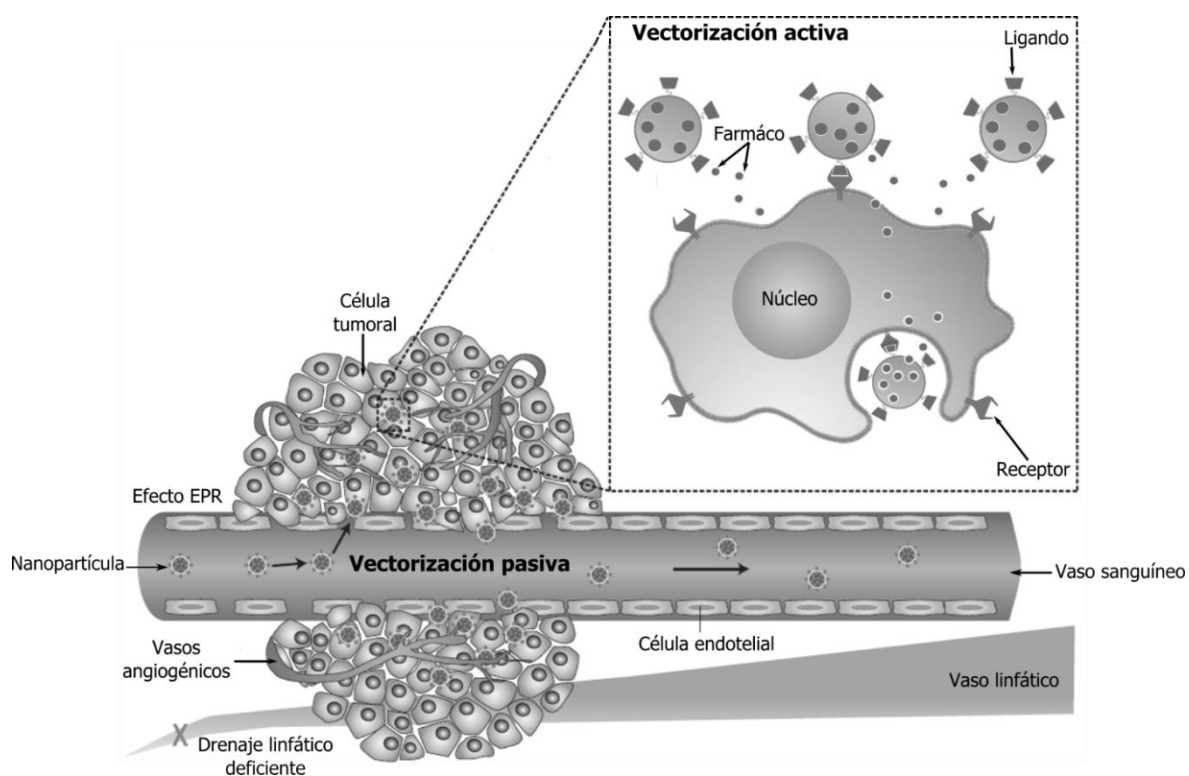


Figura 2.2. Mecanismos de vectorización pasiva y activa. Acumulación de las nanopartículas en las células tumorales [82].

Varias técnicas empleadas en el desarrollo de nanofármacos dotados de una orientación específica, todas ellas relacionadas específicamente con características bioquímicas y fisiológicas particulares del tumor y con la sobreexpresión de receptores, condiciones del medio tumoral, etc. Todas ellas

se han basado en la modificación de la superficie de los nanosistemas con diferentes tipos de moléculas o ligandos que van desde sencillas moléculas de bajo peso molecular a las más complejas macromoléculas. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 2.2, donde se esquematiza el uso de nanofármacos funcionalizados con orientación a receptores superficiales en células tumorales [86]. El ejemplo más frecuente de moléculas de bajo peso molecular es el ácido fólico, sustrato principal del receptor folato, sobre-expresado en una gran cantidad de células tumorales como en el caso del cáncer ovárico [87]. Asimismo, un ejemplo de macromolécula es el ácido hialurónico (AH), sustrato principal del receptor CD44 [88], sobre-expresado en una gran variedad de células tumorales, como en el ovárico, de estómago, de colon y varios tipos de leucemias [89]. Además de brindar propiedad de direccionalización, el AH aporta propiedades escudo a los sistemas en que se han empleado, lo que lo convierte en una interesante herramienta para conseguir los dos atributos de vectorización en un mismo medicamento.

2.3. Titania

El dióxido de titanio (TiO_2), también conocido como titania, es un constituyente común de los minerales que se encuentran en las rocas ígneas como óxidos de hierro-titanio, perovskita (BaTiO_3), y sustituyendo al Fe en algunas especies de silicatos como los olivinos y piroxenos [90]. Es uno de los óxidos metálicos más estudiados debido a sus numerosas aplicaciones tecnológicas es el dióxido de titanio, también conocido como titania. Sus aplicaciones son tan diversas como sorprendentes. Entre las más importantes podemos destacar el desarrollo de nuevos dispositivos en la industria microelectrónica; en el diseño de celdas solares nanoestructuradas para la producción de hidrógeno y energía eléctrica; como soporte de metales en catálisis heterogénea y fotocatalisis; en la industria de pinturas y cosméticos; también en implantes de huesos; en la desinfección de aguas, entre otras [91-94]. En su función como fotocatalizador tiene la ventaja de ser poco costoso industrialmente, poseer una considerable estabilidad térmica y mecánica, ser resistente a la fotocorrosión, inerte tanto química como biológicamente, no ser tóxico, y además posee propiedades fotoquímicas y fotoeléctricas únicas en la descomposición del agua [95-97].

2.3.1. Polimorfos de la titania

La titania está presente en la naturaleza en tres formas cristalinas; en rutilo (tetragonal simple, $a=b=4.584 \text{ \AA}$, $c=2.953 \text{ \AA}$), la anatasa (tetragonal centrada en el cuerpo, $a=b=3.782 \text{ \AA}$, $c=9.502 \text{ \AA}$) y la brokita (ortorrómbica, $a=b=5.436 \text{ \AA}$, $c=5.135 \text{ \AA}$) [3]. Existen otras estructuras del TiO_2 , por ejemplo, la comunita que ha sido sintetizada a altas temperaturas y es uno de los materiales policristalinos que más dureza presentan [98]. Sin embargo, solo el rutilo y la anatasa tienen aplicaciones tecnológicas, en donde la mayoría de estas aplicaciones están basadas en su constante dieléctrica y su índice de refracción. Adicionalmente, aplicaciones recientes están relacionadas con sus propiedades superficiales y catalíticas. En la Tabla 2.2, se presentan algunas de las propiedades físicas generales más importantes de las fases de la titania [99].

Tabla 2.2. Propiedades físicas de las estructuras cristalinas de TiO_2 [99]

	RUTILO	ANATASA	BROOKITA
Peso molecular [g/mol]	79.89	79.89	79.89
Sistema cristalino	Tetragonal	Tetragonal	Ortorrómbico
Parámetros de red [\AA]			
a	3.79	4.59	9.18
b	-	-	5.45
c	9.51	2.96	5.15
Volumen	62.07	136.25	257.38
Densidad [g/cm^3]	4.25	3.89	4.14

2.3.2. Estructura cristalina de rutilo y anatasa

Las estructuras cristalinas del rutilo y la anatasa se describen comúnmente mediante diferentes arreglos del mismo bloque constructor: un grupo TiO_2 donde el átomo de titanio (catión) se localiza en el centro de la celda unitaria y está rodeado por seis átomos de oxígeno (aniones) situados en

los vértices de un octaedro distorsionado [100]. Cada estructura se caracteriza por una distorsión particular del octaedro y por diferentes patrones de apilamiento. En todas las modificaciones naturales del TiO_2 , el octaedro está distorsionado, donde los dos átomos de oxígeno (átomos apicales) están ligeramente más distantes del átomo central de titanio que los cuatro restantes (átomos ecuatoriales) [101]. Las celdas primitivas convencionales del rutilo y la anatasa se muestran esquemáticamente en la Figura 2.3. En ambas estructuras existen seis átomos por celda unitaria y todos los átomos de los mismos elementos son equivalentes por simetrías. La anatasa tiene una estructura tetragonal centrada en el cuerpo, por lo que su celda convencional se representa por dos celdas unitarias (12 átomos). Puede observarse además que, como se mencionó anteriormente, en ambas estructuras octaedros ligeramente distorsionados son el bloque constructor. Adicionalmente, se representan la longitud del enlace y los ángulos de coordinación de los átomos de Titanio [102].

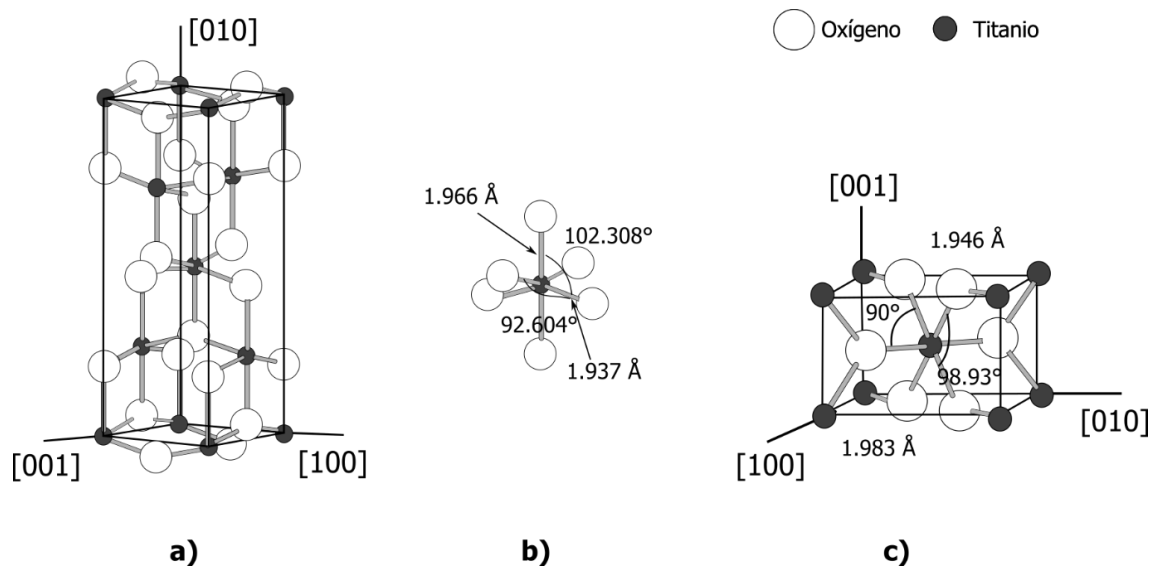


Figura 2.3. Fases polimórficas más comunes del TiO_2 : a) anatasa, b) espacios interatómicos en una molécula de TiO_2 en fase anatasa y, c) rutilo [102].

La estructura del rutilo está más densamente empaquetada que la de la fase anatasa. Como punto de referencia, la densidad de las fases anatasa y rutilo son de 3.820 g/cm^3 y de 4.240 g/cm^3 , respectivamente [103]. Estas densidades muestran que el rutilo es más compacto que la anatasa, que en contraste, presenta una estructura abierta, siendo al menos 10% menos densa que el rutilo.

La notable diferencia de densidades entre la anatasa y el rutilo desempeña un factor importante en las propiedades de las dos estructuras [104]. El volumen extra en la anatasa corresponde a regiones vacías, y que afectan solo aquellas propiedades que son promediadas en la celda completa, tales como la compresibilidad y la constante dieléctrica [105].

2.3.3. *Propiedades y aplicaciones de la titania a nanoescala*

Cuando el tamaño de partícula de TiO_2 decrece a magnitudes nanométricas, las proporciones relativas entre la superficie y el seno del material son comparables, el área superficial del material es incrementada y su estructura de bandas de energía se vuelve discreta exhibiendo propiedades ópticas y químicas diferentes a las generales del material [106, 107]. La morfología y el tamaño de las partículas y de los agregados pueden afectar las propiedades de la dispersión de la luz, así como también el grado de penetración del fotón, las propiedades de transporte de los reactivos y productos y, en consecuencia de la actividad fotocatalítica [108].

Por esta razón, durante las últimas décadas el uso de los nanomateriales de TiO_2 ha sido un área fuerte de investigación, mostrándose que dichas aplicaciones se pueden categorizar en cuatro tipos según las propiedades del material. Sus propiedades ópticas por ejemplo, permiten que sea un buen candidato para la protección UV, en tanto su propiedad fotocatalítica lo hace un material prometedor para la descomposición de contaminantes ambientales como el metanotiol (CH_3SH) un gas incoloro, con olor similar al de la col podrida, emitido de aguas residuales y sólidos residuales municipales. También por lo común es usado como agente bactericida de *E. coli* y las células tumorales en el cáncer. Por otro lado, las propiedades eléctricas le confieren las características de superhidrofilicidad o superhidrofobicidad por lo que pueden ser destinados para materiales de autolimpieza o anti-empañamiento [109-111].

La sensibilidad a la luz UV o actividad fotocatalítica de TiO_2 se describe como una reacción electroquímica y fotoelectroquímica que inicia cuando la radiación es capaz de excitar a un semiconductor, al grado de hacer que se comporte como un conductor. Cuando la radiación incide sobre el semiconductor se produce un salto de un electrón (e^-) de la banda de valencia a la banda de conducción generándose reacciones de óxido-reducción. En la Figura 2.4, se describe el proceso de fotocatalisis, este inicia con la excitación de una partícula semiconductor por rayos UV, dadas

estas condiciones, se crean pares electrón-hueco ($e^- - h^+$) cuyo promedio de vida está en el rango de los picosegundos. En este lapso, dichos pares deben migrar a la superficie y generar radicales libres muy reactivos que reaccionan con las especies alrededor mediante procesos de oxidación-reducción, rompiéndose algunos enlaces moleculares y reduciéndolas u oxidándolas hasta convertirlas en especies menos complejas. Los pares electrón-hueco que no alcanzan a separarse y a reaccionar con especies en la superficie se recombinan y la energía se disipa. Esta característica ha convertido al óxido de titanio en un candidato potencial para aplicaciones biomédicas [109, 112-114].

Por otra parte, el conocimiento que existe sobre los efectos de las NPsTiO_2 en sistemas biológicos se basa en que las especies potenciales reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en la superficie del TiO_2 durante su actividad fotocatalítica, al estar próximas a las células bacterianas las destruye fácil, pues es capaz de causar peroxidación de los fosfolípidos de la membrana de las células, e interrumpe así su respiración celular [115]

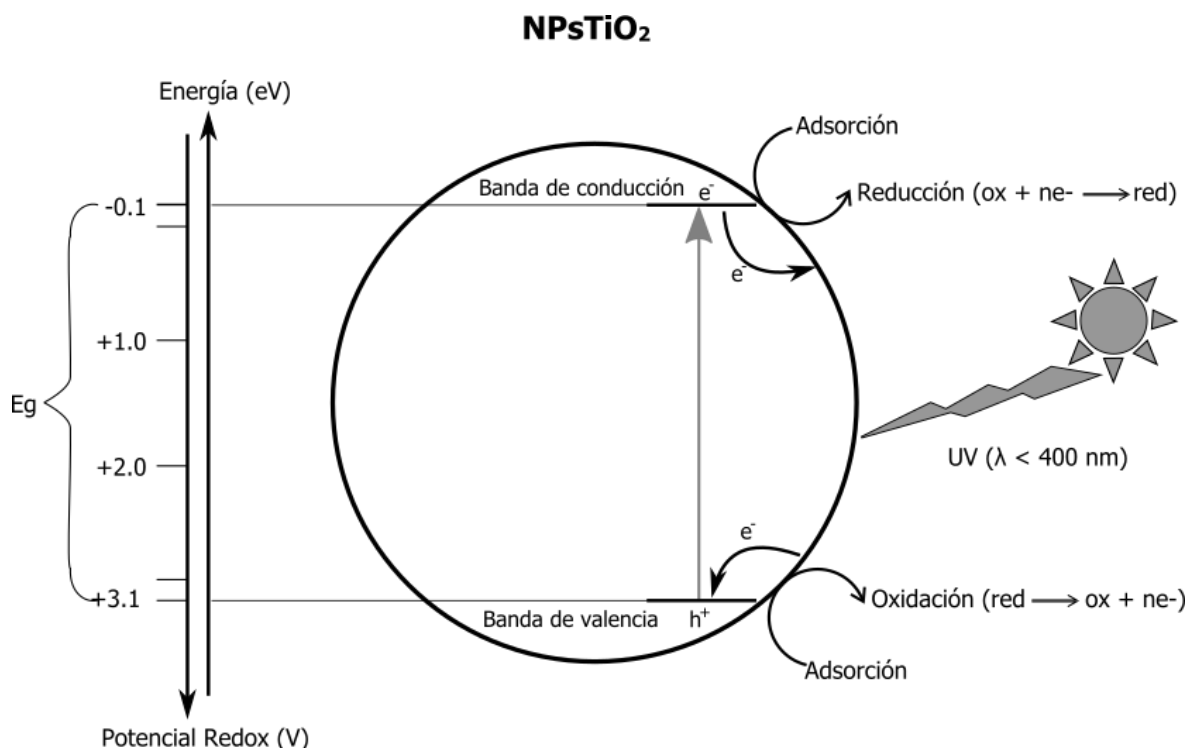


Figura 2.4. Actividad fotocatalítica de la titania [114].

2.3.3.1. Nanopartículas de titania como SAF

En el campo de la nanomedicina las NPsTiO_2 han suscitado un gran interés para su aplicación en la administración controlada de fármacos, principalmente debido que presentan buena compatibilidad con sistemas biológicos dada a su naturaleza inerte, con baja citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. También se caracterizan por presentar alta estabilidad química y mecánica, además de ser relativamente fáciles de preparar y de bajo costo. Además, su estructura superficial puede ser funcionalizada a través de diversos grupos funcionales lo que permite el anclaje de principios activos útiles como son: isótopos radiactivos o fármacos antineoplásicos [116, 117]. Finalmente, su elevada relación área superficial/volumen puede garantizar una gran capacidad de carga terapéutica [118, 119], lo cual puede ser atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en su superficie, generados por la quimisorción disociativa del agua, que actúan como sitios de anclaje para diferentes tipos de moléculas a través de enlaces covalentes [120].

Por ejemplo, se ha reportado que las NPsTiO_2 han mostrado una alta reactividad al ser funcionalizadas con daunorrubicina (DNR), uno de los fármacos antineoplásicos más importantes en el tratamiento de la leucemia aguda y tumores sólidos, e investigado el efecto sinérgico de esta combinación (DNR- NPsTiO_2) en presencia de radiación UV. Proponiéndose un posible mecanismo del efecto de sinergia entre las NPsTiO_2 y el fármaco en una célula, el cual propone que en un medio de pH 7.2 es posible que la superficie de las NPsTiO_2 puede estar cargada negativamente, mientras que la daunorrubicina es cargada positivamente, como se muestra en la Figura 2.5. Bajo estas condiciones la interacción que se da entre las partículas es electrostática; de manera que la liberación del principio activo se verifica a través de la formación de pares iónicos que atraviesan la membrana celular [121].

La Temozolomida (TMZ) —un antineoplásico empleado en el tratamiento de glioma cerebral que se caracteriza por ser bastante sensible a los cambios químicos, lo que puede provocar su activación fuera del sitio de interés— es un ejemplo de que su eficiencia antitumoral puede ser mejorada a través del uso de nanoestructuras de TiO_2 . López y col. [119], demostraron que al utilizar matrices nanoestructuradas de TiO_2 obtenidas por sol gel, donde la TMZ está inmersa, protegen el fármaco de los agentes externos (tanto medio ambientales como fisiológicos) preservando su estructura molecular, lo que posibilitaría optimizar su acción terapéutica y reducir los efectos colaterales. Empero, los autores reportan que debe tenerse cuidado con las condiciones de depositación, ya que

la TMZ se degradó convirtiéndose en Imidazol-4-carboxamida —la forma activa de la TMZ— y este compuesto exhibió una fuerte afinidad química por TiO_2 , lo que dificultó considerablemente la liberación de este principio activo de la matriz cerámica.

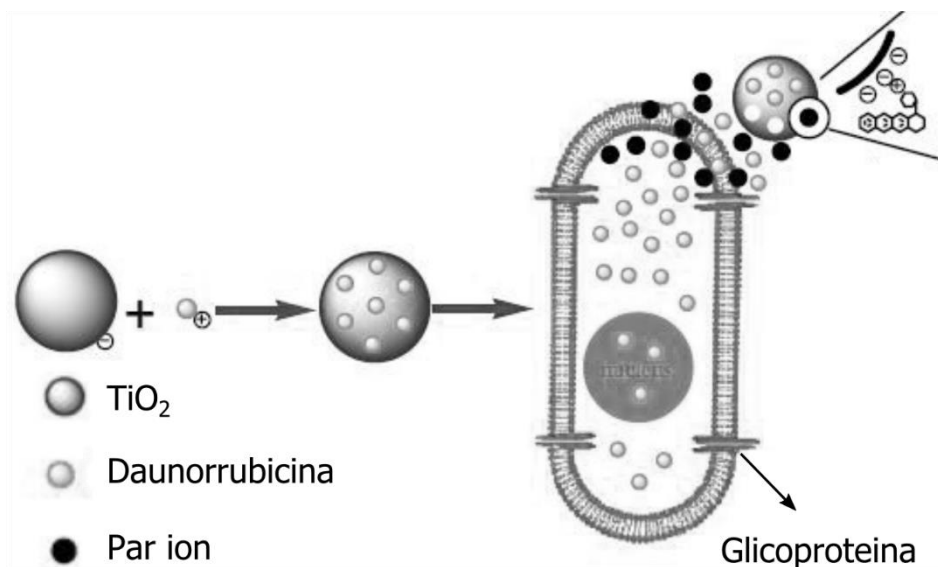


Figura 2.5. Esquema de la conjugación del fármaco DNR sobre NPsTiO_2 [121].

Actualmente, las composiciones farmacéuticas de liberación controlada dependiente del pH, que comprenden nanopartículas, han despertado un gran interés. Por lo que, se han llevado a cabo pruebas con NPsTiO_2 modificadas con ácido hialurónico (HA) y funcionalizadas con Cisplatino (CDDP), en células humanas de cáncer de ovario A2780 [122]. El ácido hialurónico es un polisacárido presente naturalmente en la matriz extracelular y fluidos sinoviales y ha sido investigado previamente como vector de orientación a células tumorales en el tratamiento contra el cáncer [123, 124]. Los resultados experimentales mostraron que la liberación del CDDP de las NPsTiO_2 -HA se incrementa al disminuir el pH de 7.4 a 5.0, lo que podría ser favorable en la terapia contra el cáncer. Además, las pruebas *in vitro* y el análisis de imagen *in vivo* revelaron elevadas concentraciones de CDDP y NPsTiO_2 en las células tumorales, como resultado de la acumulación de las NPsTiO_2 -CDDP en el sitio del tumor por difusión activa —vía endocitosis mediada por el ácido hialurónico— y al ser sensibles al pH del microambiente tumoral ácido, el fármaco es liberado en mayor cantidad. De igual manera, Zhang y col. [125], diseñaron por primera vez un SAF “inteligente” sensible a los cambios de pH a partir de la funcionalización de NPsTiO_2 con

Daunorubicina (DNR), uno de los fármacos quimioterapéuticos más importantes empleados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cuyo efecto terapéutico es limitado debido a sus serios efectos secundarios, incluyendo la insuficiencia cardiaca congestiva. Evaluaron *in vitro* el efecto sinérgico del SAF conformado por NPsTiO₂ en células humanas de leucemia k562 y reportaron que estos sistemas al disminuir el pH de 7.4 hasta alcanzar un pH de 5 o 6 aumentaron la concentración intracelular de DNR y la eficiencia quimioterapéutica induciendo una apoptosis dependiente de caspasa.

2.3.3.2. Síntesis de nanopartículas de titania

La titania, gracias a su actividad fotocatalítica ha despertado gran interés a nivel industrial. Sin embargo, el método de síntesis es un aspecto crucial ya que de este dependen las propiedades físicas químicas que presenta el material [108]. En la literatura se encuentran diversos métodos para la obtención de titania [126]. Uno de estos es la síntesis química en fase vapor, que consiste en la descomposición del precursor en uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor) bajo un flujo de argón, cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de las nanopartículas del material. Sin embargo esta ruta de síntesis dificulta el control estequiométrico, porque los diferentes precursores tienen diferentes velocidades de evaporación lo cual es desfavorable [126-128].

Otro método es la síntesis hidrotermal la cual se lleva a cabo de manera normal en recipientes cerrados (autoclave). Allí un precursor metálico (por lo general butóxido de titanio, alcóxido de titanio) es disuelto en un líquido (isopropanol, etanol-agua) y después son calentados por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica (alcanzándose la presión de saturación de vapor). Aunque este método tiene ventajas interesantes como la preparación de materiales que se descomponen a elevadas temperaturas su mayor debilidad radica en el poco control que se tiene de la porosidad del material [129-132].

La microemulsión y el método de precursor polimérico, son parte también de los métodos de síntesis más utilizados. El primero consiste en obtener gotas acuosas encapsuladas por moléculas de surfactante y rodeadas por una fase oleosa. La fase oleosa es usada como microreactor blando para la síntesis del material, pero su limitación radica en la formación de nanopartículas con un

tamaño muy estrecho [133, 134]. El segundo, conocido también como *Pechini*, consiste en mezclar los reactivos de interés en una solución, remover el solvente para que quede una mezcla amorfa o nanocrystalina de cationes y aniones (acetato, citrato, hidróxido, oxalato, alcóxido) y por último calentar el gel o polvo resultante para inducir la reacción al producto deseado. Entre las ventajas del método, se encuentra la eliminación de problemas de difusión y falta de homogeneidad del producto, la obtención de fases metaestables y la eliminación de fases intermedias impuras. Por otro lado, las desventajas del método consisten en la dificultad en ciertos casos, de controlar la estequiometría exacta, ya que algunas veces no es posible hallar reactivos compatibles [135, 136].

La ruta sol gel es utilizada para sintetizar gran variedad de óxidos metálicos como óxidos de titanio, a manera de solución a las debilidades que presentan los métodos antes descritos. Este proceso permite la formación de materiales metaestables con homogeneidad de composición (uniformidad y distribución de tamaños de partículas) y de alta pureza. Además, el método no demanda una infraestructura tecnológica o costosa y es una técnica versátil para la preparación de materiales a granel a temperaturas bajas. También facilita el control de la porosidad, lo que favorece la interacción con las células, y permite la síntesis de materiales con formas variables como fibras, películas, catalizadores, adsorbentes, nanopartículas y nanocompuestos. De manera global, el proceso sol-gel implica la transición de un sistema en estado líquido o sol, suspensión coloidal de partículas sólidas con tamaño nanométrico que está en esta condición gracias al movimiento Browniano, a una fase sólida denominada gel, sólido constituido por al menos dos fases, con la fase líquida atrapada e inmovilizada por la fase sólida. Este cambio se da gracias a la hidrólisis y policondensación del sol. Cuando se obtiene el gel, este se calienta para eliminar el disolvente y descomponer aniones precursores, permitir el reordenamiento de la estructura del sólido y favorecer la cristalización [137, 138].

Por otra parte, el método sol-gel ha presentado diferentes variantes para la síntesis de nanomateriales con diversos grados de eficiencia. Entre ellos se tiene la síntesis asistida por microemulsión de micelas inversas, método muy rápido y altamente eficaz para la formación de nanopartículas geoméricamente esféricas y monodispersas. Dado que el agua y el catalizador se encuentran en las micelas, el alcóxido añadido no puede ser hidrolizado hasta que se difunde dentro de las micelas. Por lo tanto, la poli-condensación del precursor tiene lugar dentro de las micelas. Las nanopartículas resultantes tienen estrecha distribución de tamaño limitado por el tamaño de las micelas. Una característica importante del método de las micelas inversas es que dentro de sus

ambientes acuosos de tamaño nanométrico se pueden llevar a cabo reacciones químicas, actuando así como nanoreactores [139-142].

2.4. Modificación de las propiedades de la titania a través del dopaje

Dada la importancia que ha tomado el TiO_2 se ha intentado sacar el mayor provecho de este, desde modificaciones estructurales en la síntesis y los diversos métodos, hasta la adición de agentes externos como dopantes. De esta forma, la incorporación de diversos agentes dopantes en la estructura del TiO_2 han mostrado una mayor estabilidad y mejoras en sus propiedades fotocatalíticas y luminiscentes, así como potenciar su uso en diversas aplicaciones [109]. Recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios relacionados con la adición de diferentes metales a distintas matrices de TiO_2 , principalmente metales de transición como Fe y Cu, con la finalidad de otorgar características deseables al TiO_2 , tales como, la inhibición de la recombinación del par electrón-hueco ya que actuarían como captoreadores de carga tanto positiva (h^+) como negativa (e^-), mejorando de esta forma la fotoactividad del TiO_2 . Por otro lado, debido a sus niveles d incompletos, estos metales serían capaces de disminuir el *band gap*, mejorando desde otra perspectiva la actividad fotocatalítica de la matriz inicial [143]. En la bibliografía se han descrito tanto resultados positivos como negativos, apuntando a mejoras mínimas o inexistentes en la fotoactividad del TiO_2 , además de considerar los altos costos de, por ejemplo, los metales nobles como la plata y el platino, lo que lleva a creer que el mejor foco para este tipo de estudios es el uso de metales de transición más baratos como el hierro y el cobre. Sin embargo, aún se está investigando en lo que respecta a cómo afectaría el método de síntesis utilizado en las características posteriores del fotocatalizador, ya que se ha hallado que, en el caso de los metales nobles, esto es un factor que afecta la eficiencia fotocatalítica tanto para su uso en la eliminación de contaminantes orgánicos en el aire o el agua, como en la aplicación como agentes antibacterianos) [144]. Por otro lado, el uso de sistemas con co-dopaje también ha sido estudiado, sin embargo, no en tanta profundidad como para llegar a entender adecuadamente el mecanismo de la reacción de degradación de contaminantes [145]. En la Tabla 2.3 se resumen distintos artículos enfocados en el uso de distintos metales para dopar las matrices de titania, junto con el método de síntesis utilizado, el contaminante modelo a degradar y los resultados de degradación obtenidos para las condiciones aplicadas a cada estudio.

Tabla 2.3. Estudios realizados utilizando iones metálicos como dopantes

Sistema	Método de síntesis	Contaminante	Fuente de luz	Concentración de estudio	Degradación [% , min]	Ref
Fe/TiO ₂	Hidrotermal ultrasónico	Azul de metileno (MB)	Lámpara Philips CFL 150 W	MB-10mg/l Muestra - 0.5g/l	93% 180min	[143]
Ag/TiO ₂	Sol-gel	Cr (IV)	Lámpara de Xe 300W	CR (IV) - 10g/l Muestra - 0.02g/l	99.8% 240min	[144]
Cu-Ni/TiO ₂	Co-precipitación	Eriocromo Cianina R (ECR)	Lámpara de Xe 200W	ECR - 100mg/l Muestra - 2g/l	99% 120min	[145]
Fe/TiO ₂	Sol-Gel	As (III)	Lámpara halógena Philips 25W	As (III) - 0.5 g/l Muestra - 0.25g/l	100% 180min	[146]
Cu/TiO ₂ (NTs)	Anodización	Azul de metileno (MB)	Lámpara de Xe 200W	MB - 2mg/l Muestra - NP	90% 120min	[147]
Ir/TiO ₂	Método hidrotermal/ Microondas	Acetaldehído	Lámpara LED 1mW/cm ²	Acetal. - 500mg/l Muestra - 800mg/l	50% 21horas	[148]
In ³⁺ /TiO ₂	Sol-gel	Azul de metileno (MB)	Lámpara de Hg 500 W	MB - 8mg/l Muestra - 5g/l	80% 7hr	[149]
Cu ²⁺ /TiO ₂	Sol-gel	<i>E. coli</i>	Lámpara Philips WW T5 8W	Bacteria - 10 ⁸ ufc/ml Muestra - 0.2g/l	90% 240min	[150]
Ni ²⁺ /TiO ₂	Sol-gel	<i>E. coli</i>	Lámpara Philips WW T5 8W	Bacteria - 2.7x10 ⁴ ufc/ml Muestra - 0.2g/l	100% 300min	[151]
Fe ³⁺ /TiO ₂	Sol-gel	Rojo reactivo 198 (RR-198)	Lámpara de Hg 250W	RR-198 - 100mg/l Muestra - 1g/l	43% 300min	[152]

Por otra parte, diversos investigadores han considerado la adición de elementos no metálicos, tales como carbono, nitrógeno o flúor, dentro de matrices de TiO_2 , con el fin de mejorar la fotoactividad de este. En el caso de estos elementos, se ha encontrado que la existencia de los orbitales 2p en sus configuraciones, se solapan con los niveles energéticos del TiO_2 modificando su banda de valencia generando un band gap más estrecho. Por otro lado, la adición de estos elementos genera modificaciones en la superficie del material, mejorando sus características [153]. Se explica además, que la razón del mejoramiento de la actividad fotocatalítica en el rango visible, luego de la adición de dopantes no metálicos, corresponde a la formación de centros de color dentro del band gap, lo cual permite la absorción dentro de un rango mayor de longitudes de onda. Sin embargo, se explica que la creación de defectos en la microestructura del TiO_2 luego de la adición de dopantes puede generar centros de recombinación lo que conlleva un descenso en la actividad fotocatalítica del semiconductor; es por esto que se requiere un cuidado especial tanto en la concentración, como en el método de síntesis de los compuestos [153]. En la Tabla 2.4, se encuentran una serie de estudios donde se utilizan elementos no metálicos como dopantes de la matriz de TiO_2 con la finalidad de mejorar la actividad fotocatalítica dentro del rango visible.

El uso de elementos de la serie de los lantánidos como dopantes de TiO_2 ha sido igualmente estudiado. Los elementos de tierras raras presentan propiedades que apuntan hacia la mejora de la fotoactividad del TiO_2 en el rango de la luz visible; en particular, los distintos estudios distinguen la presencia de los orbitales f en estos elementos, lo que les permite formar complejos estables con varias bases de Lewis, tales como grupos amino, aldehídos, alcoholes, entre otros [163]. Por otra parte, a nivel luminiscente el dopaje con iones de tierras raras le confiere al TiO_2 mejoras importantes, ya que las transiciones que se presentan dentro de los niveles 4f (de los elementos lantánidos) generan líneas de emisión muy delgadas e intensas, las cuales pueden ser fácilmente escogidas de acuerdo al rango de interés para la aplicación. Son numerosos los estudios realizados con el óxido de titanio dopado con lantánidos para mejorar las propiedades luminiscentes. Muchas de estas partículas tienen aplicaciones como “fósforo” para dispositivos de iluminación y tubos de rayos catódicos, centelladores de rayos X y materiales que emiten luz a menor longitud de onda con respecto a la radiación excitante (fenómeno de conversión ascendente) [164]. En la Tabla 2.5 se presentan algunos resultados obtenidos por distintos investigadores que han incorporado el uso de elementos de tierras raras en sus estudios.

Tabla 2.4. Estudios realizados utilizando elementos no metálicos como dopantes

Sistema	Método de síntesis	Contaminante	Fuente de luz	Concentración de estudio	Degradación [%, min]	Ref
N/TiO ₂ (1:1)	Sol-gel	Anaranjado de metileno (MO)	Lámpara de Xe de alta presión 300W	MO – 20mg/L Muestra – 1g/L	96.6% 90min	[154]
F (10%p/p)/ TiO ₂	Sol-gel	Azul de metileno (MB)	Lámpara halógena de metal 400W	MB – 10 mg/L Muestra – 2g/L	91% 240min	[155]
C/TiO ₂	Sol-gel	Rodamina B (RhB)	Lámpara de Xe 300W	RhB – 5mg/L Muestra – 0.5g/L	95% 60min	[156]
C-N-S/TiO ₂	Sol-gel	Microcistina-LR (MC-LR)	Dos lámparas fluorescentes 15W	MC-LR – 0.5µM Muestra – 0.5g/L	100% 300min	[157]
N-B-F/TiO ₂	Método asistido por microondas	Anaranjado de metilo (MO)	Lámpara de arco de Xe 300W	MO – 10mg/l Muestra – 1g/l	84.2% 100min	[158]
N-F/TiO ₂	Tratamiento hidrotermal/ Agitación con NaF	Rodamina B (RhB) 4– Nitrofenol (4-NP)	Lámpara de Xe	RhB – 10mg/l 4-NP – 15mg/l Muestra 1g/l	90% (RhB) 62% (4-NP) 300 min 5	[159]
S/TiO ₂	Síntesis solvotermal	Rodamina B Azul de metileno	Lámpara de Xe 150W	RhB – 22.5mg/l MB – 20mg/L Muestra – 2g/l	97% (RhB) 100% (MB) 120 min	[160]
N-F/TiO ₂	Sol-gel	Microcistina-LR (MC-LR)	Dos lámparas fluorescentes 15W	MC-LR – 5mg/l Muestra – 0.5g/l	90% 480min	[161]
N-S/TiO ₂	Tratamiento Hidrotermal/ Calcinación	4-clorofenol (4-CP)	Lámpara de Xe 350W	4-CP – 1x10-4M Muestra – 5g/l	80% 90min	[162]

Tabla 2.5. Estudios realizados utilizando elementos de tierras raras como dopantes

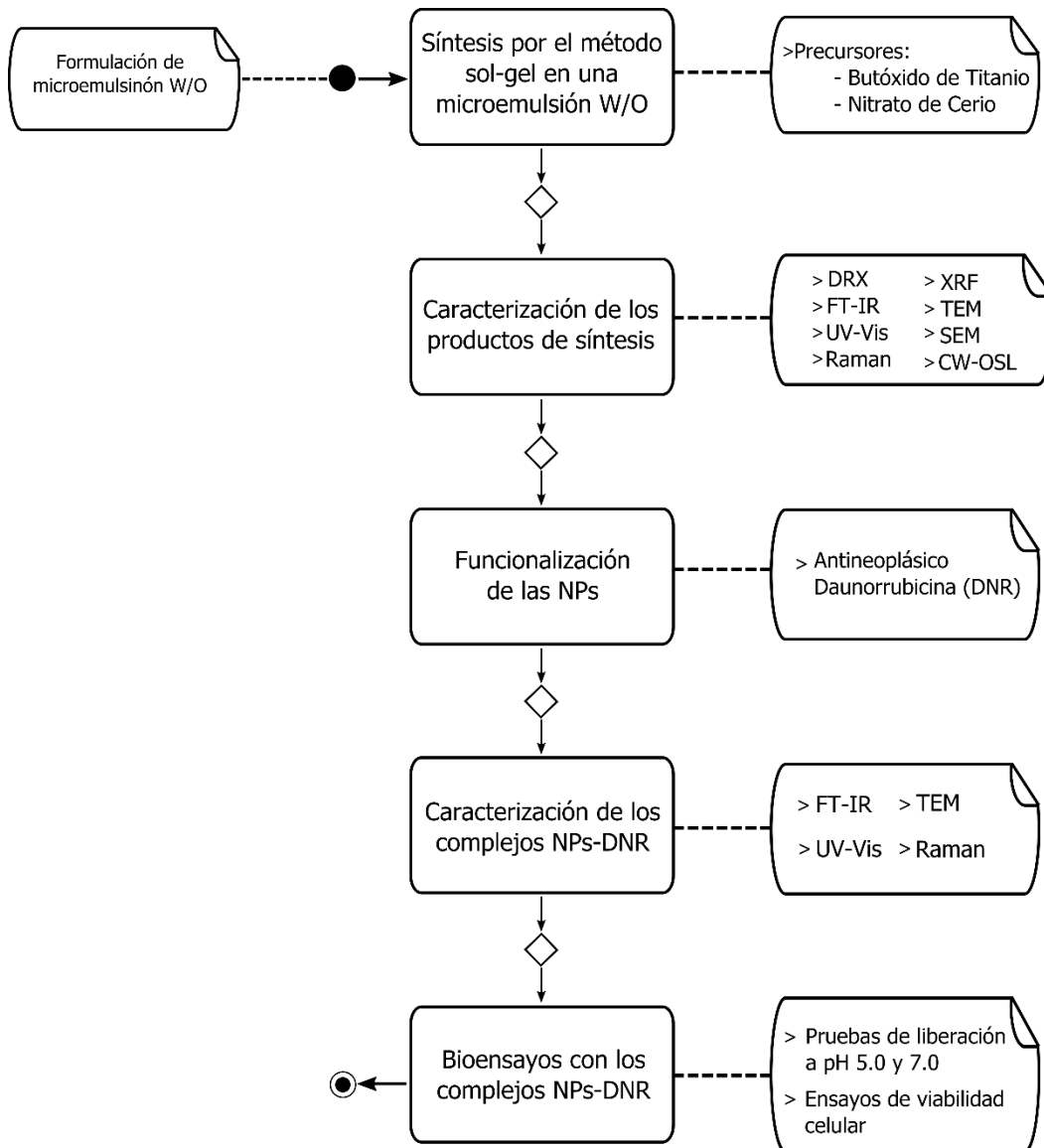
Sistema	Método de síntesis	Contaminante	Fuente de luz	Concentración de estudio	Degradación [% , min]	Ref.
Yb ³⁺ /TiO ₂ Er ³⁺ /TiO ₂ (0,5% mol)	Sol-gel	Fenol	Lámpara de Xenón 400W	Fenol – 0.21mM Muestra – 10g/l	89% (Yb ³⁺ /TiO ₂) 75% (Er ³⁺ /TiO ₂) 180 min	[164]
Pr/TiO ₂ (0,25% mol)	Sol-gel	Fenol	Lámpara de Xenón 1000W	Fenol – 0.21mM Muestra – 5g/l	25% 60 min	[166]
Nd ³⁺ /TiO ₂ (0,25% at)	Hidrotermal	Azul de metileno (MB) 4-Clorofenol (4-CP)	Estimulador Solar Heber	MB – 50ppm 4-CP – 30ppm Muestra – 4g/l	>80% (MB) 70% (4-CP) 60 min	[167]
Nd/TiO ₂ (0,25% at)	Sol-gel	Azul de metileno (MB)	Lámpara de Xenón 300W	MB – 0.01g/l Muestra – 10g/l	70% 120 min	[168]
Ce/TiO ₂	Sol-gel modificado	Rodamina B (RhB) Fenol	Estimulador solar	RhB – 25mg/l Fenol – 25mg/l Muestra – 500mg/l	100% (RhB) 80% (Fenol) 600 min	[169]

En este sentido, recientemente la ceria (CeO₂) ha sido considerada un dopante ideal debido principalmente a que los iones Cerio pueden formar complejos con diversos compuestos orgánicos por la interacción de los grupos funcionales de las moléculas orgánicas con los f-orbitales de los lantánidos. Por lo que, el dopaje con iones Ce⁺⁴/Ce⁺³ en una matriz de TiO₂ podría proporcionar una significativa ayuda al concentrar los contaminantes orgánicos en la superficie de este semiconductor y por lo tanto mejorar su fotoreactividad [165]. Además, se ha observado que como resultado de la incorporación de los dopantes en la red hospedera de la titania, el tamaño de partícula decrece e incrementa su área superficial respecto al material puro, así como la generación de defectos superficiales [29, 30], lo cual proporciona suficientes sitios activos expuestos para el

anclaje de moléculas orgánicas, mejorando con ello su rendimiento fotocatalítico en aplicaciones de remediación ambiental. Precisamente, su elevada área superficial y la presencia de estos defectos, es lo que hace factible considerar a las NPsTiO₂ dopadas con CeO₂ como candidatos viables a ser usadas como nanotransportadores en sistemas de liberación de fármacos en la terapéutica del cáncer.

CAPÍTULO 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo de este proyecto fue obtener nanopartículas de Titania dopadas con Ceria para su incorporación y evaluación en sistemas de liberación de fármacos. Para ello el procedimiento experimental consistió en 3 etapas: síntesis, funcionalización y bioensayos. En la Figura 3.1 se muestra el diagrama general de actividades experimentales de las tres etapas.



● **Nodo inicial:** Simboliza el inicio de las actividades del proceso

● **Nodo terminal:** Representa el paso final en las actividades del proceso

Figura 3.1. Diagrama general de actividades.

3.1. Etapa 1

3.1.1. Síntesis de los sistemas de estudio

La síntesis y dopaje de las nanopartículas de TiO₂ se llevó a cabo por el método sol-gel en una microemulsión agua-en-aceite (w/o), para ello se prepararon dos soluciones: fase orgánica (*Solución A*) y fase acuosa (*Solución B*). Se describen a continuación los métodos utilizados para preparar estas soluciones.

Solución A: Bajo agitación constante se mezclaron Tween-20 (surfactante), metanol (co-surfactante), tolueno (aceite) en una relación de 2/26/69 (v/v). Posteriormente, se adicionó butóxido de titanio (TTIP 97%, Sigma Aldrich) en las proporciones de 85, 90 y 95% TTIP, la concentración del precursor se hizo en % mol del reactivo).

Solución B: En la fase acuosa (1 v/v) se disolvió el nitrato de cerio (Ce(NO₃)₃*6H₂O, Merck) en proporciones de 0 a 15 % de CeO₂ con incrementos de 5%.

Posteriormente, en condiciones asépticas (campana de flujo laminar LABCONCO), agitación constante y en baño termoestable a 10° C; la solución B se añadió gota a gota la *solución A*, preservando las condiciones de temperatura y agitación durante 2h. La suspensión resultante se sometió a un secado en horno (24h a 80° C) para evaporar el agua fisisorbida y el solvente adsorbido, hasta obtener una muestra en polvo. Finalmente, la muestra fue tratada térmicamente a 600 °C por 2h con una velocidad de calentamiento de 3 °C/min. El tiempo de residencia de la muestra a esta temperatura fue de 2h. En la Tabla 3.1 se presentan las claves asignadas a los diferentes sistemas propuestos para su estudio, identificados de acuerdo con su composición.

Tabla 3.1. Claves asignadas a los diferentes sistemas de estudio sintetizados

TiO ₂ (%mol)	CeO ₂ (%mol)	Clave para el sistema
100	0	TiO ₂
95	5	TiCe5
90	10	TiCe10
85	15	TiCe15

3.1.2. Caracterización estructural y química

Se realizó la caracterización estructural y química a los productos de reacción. Para evaporar la humedad de las muestras, se colocaron dentro de un desecador por 48h. Las técnicas de caracterización que se emplearon fueron: difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de ultravioleta visible (UV-Vis), espectroscopía RAMAN y espectroscopía infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR), fluorescencia de rayos X (XRF), luminiscencia ópticamente estimulada de longitud de onda continua (CW-OSL), el área de superficie se determinó por el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), además fueron empleadas microscopia electrónica de transmisión en sus modalidades convencional (TEM) y de alta resolución (HRTEM), así como microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Tabla 3.2 se describen las técnicas de análisis empleadas en la caracterización de los productos obtenidos en la Etapa 1.

Tabla 3.2. Procedimientos de caracterización utilizados en la síntesis de los sistemas mixtos

P01. DRX	Los patrones de difracción de rayos X de las muestras sintetizadas fueron obtenidos en un difractómetro D8 ADVANCE BRUNKER, configurado según la geometría Bragg-Brentano y goniómetro vertical θ - θ . La radiación $\text{CuK}\alpha$ (1.542 Å) se obtuvo a partir de un tubo de rayos X de cobre a un potencial de 40 kV y 30 mA. Los difractogramas se obtuvieron en un rango de 20 a 90° (2 θ) con un paso de 0.02° y un tiempo de paso de 3s.
-------------	---

...continuación de la tabla 3.2.

P02. XRF	El análisis de fluorescencia de rayos X se realizó directamente en las muestras en polvo en un espectrómetro Bruker BrS8 TIGER
P03. BET	Las muestras se desgasificaron durante 2 h a 350° C. El área superficial se determinó por la fisisorción de Nitrógeno mediante la técnica Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando un sistema automatizado Quantachrome, en el equipo NOVAtouch.
P04. CW-OSL	Las propiedades de luminiscencia ópticamente estimuladas de longitud de onda continua (CW-OSL) de los diferentes sistemas de estudio, se obtuvieron en un equipo LexsygSmart TL/OSL automatizado, equipado con una fuente beta 90SR/90Y, que suministra una dosis 160mGy/s en las muestras, que emiten partículas beta con una energía máxima de 2.27 MeV, y un tubo fotomultiplicador (PMT) para la detección de la luz (modelo modelo H7360 Series Hamamatsu Photonics K.K.).
P05. RAMAN	Las mediciones de Raman se realizaron en un espectrómetro micro-Raman N8 NEOS SENTERRA con una línea de láser de 532 nm a temperatura ambiente.
P06. FT-IR	La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (se utiliza principalmente en el análisis cualitativo de grupos funcionales. Los espectros se adquirieron en la modalidad de absorbancia con una resolución de 4 cm ⁻¹ en el rango entre 400-4000 cm ⁻¹ , en un espectrómetro IR, BRUKER TENSOR27. Las muestras se prepararon mezclando los sólidos en polvo con KBr con una relación 15:85, para formar una pastilla.

...continuación de la tabla 3.2.

P07. UV-Vis	Se llevó a cabo en un espectrofotómetro micro-volumen Thermo Scientific Nanodrop 2000 con un rango de 190 a 840nm. La muestra se diluyó en una relación 1:10 en agua destilada. Se tomaron los espectros del agua destilada utilizada para la dilución y de la muestra, los picos característicos de la suspensión son el resultado de la substracción del espectro del agua destilada al espectro de la muestra.
P08. SEM	El análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó en el microscopio JEOL JSM-7600F FEG-SEM, en el modo de electrones retrodispersados.
P09. TEM, HRTEM	Utilizando las modalidades convencional (TEM) y de alta resolución (HRTEM) de microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Phillips, TECNAI F20, 200 KV, se observó la morfología de los polvos obtenidos de la síntesis. Las muestras se prepararon depositando 10-15 μ L de una suspensión de nanopartículas en rejillas de cobre con recubrimiento de carbono amorfo. La morfología y tamaño de las nanopartículas se determinaron a partir de las micrografías obtenidas.

3.2. Etapa 2

3.2.1. Funcionalización

La revisión y el análisis de los resultados de la Etapa 1, permitió determinar que las nanopartículas de Titania dopadas con 15% de Ceria (TiCe15) presentaron una mayor área superficial respecto a las nanopartículas de Titania pura y dopadas con 5 y 10% mol de Ceria. Por tal motivo, se llevó a cabo la funcionalización de los sistemas TiO₂ y TiCe15 con DNR, a fin de evaluar y comparar la

eficiencia de encapsulación y carga entre ambos sistemas. De manera que, la funcionalización se llevó a cabo en dos etapas: el ensamblaje de DNR a la superficie de las nanopartículas de Titania y dopadas con 15% de Ceria y la limpieza de los nuevos complejos (DNR-TiCe15 y DNR-TiO₂). Cada etapa se describe en la siguiente sección.

3.2.1.1. Ensamblaje de Daunorrubicina a los sistemas TiO₂ y TiCe15

Se prepararon 2mL de solución acuosa de daunorrubicina (2mg/mL) y se añadió a 1.5mL de suspensión acuosa de nanopartículas de titania pura y dopada con 15% de CeO₂ (15mg/mL). La mezcla de reacción permaneció bajo agitación constante durante 12hrs, protegida de la luz, para construir los complejos DNR-TiCe15 y DNR-TiO₂.

3.2.1.2. Limpieza de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15

Este paso se llevó a cabo con la finalidad de separar las nanopartículas funcionalizadas de las moléculas de DNR no ensamblada, mediante centrifugación a 5000 rpm durante 20 min (SOL-BAT J500). El precipitado se recuperó y dispersó en 2mL de agua desionizada. Este paso se repitió 1 vez más y la suspensión resultante se almacenó en un recipiente transparente a 4° C protegido de la luz, hasta su aplicación en los ensayos de citotoxicidad. En el sobrenadante obtenido se encontraba la DNR no ensamblada, cuya concentración se determinó mediante espectroscopía de UV-Vis y permitió determinar la eficiencia de encapsulación del fármaco y la eficiencia de carga de las nanopartículas.

3.2.2. Determinación de la eficiencia de encapsulación y de carga

La concentración de DNR encapsulada y cargada en los sistemas TiO₂ y TiCe15, se determinaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%EE = \frac{m_f}{m_a} \times 100 \quad (1)$$

$$\%EC = \frac{m_f}{NPs} \times 100 \quad (2)$$

Donde $\%EE$ corresponde al porcentaje de encapsulación, $\%EC$ el porcentaje de carga, m_f la masa de DNR conjugada a las nanopartículas, m_a la masa inicial de DNR empleada para la funcionalización, y NPs corresponde a la masa de los diferentes sistemas empleados. El valor de m_f se determinó por medio de espectroscopía de ultravioleta visible, para ello se empleó el método de la curva de calibración estándar, utilizando una longitud de onda máxima de 485nm, característica de las antraciclinas, para realizar las correspondientes medidas de absorbancias. Esta curva de calibración es una gráfica que relaciona los resultados de absorbancias vs la concentración conocida de al menos cinco soluciones estándar y por medio de regresión lineal conseguir la ecuación que describe el comportamiento de la recta.

La curva de calibración se determinó de la siguiente forma:

1. A partir de una solución Stock de DNR [18.9µM], se prepararon 6 diluciones seriadas de
2. Posteriormente, se tomó lectura de las absorbancias del punto máximo a 485nm en las diluciones seriadas y se trazó el gráfico de la curva de calibración.
3. Una vez obtenido el gráfico, se determinó la función matemática que presenta dicha recta a través del tratamiento estadístico de regresión de los mínimos cuadrados, la cual relaciona la absorbancia y la concentración de un analito. La siguiente ecuación matemática corresponde a dicha función lineal:

$$y = mx + b \quad (3)$$

donde y corresponde a la absorbancia, x a la concentración del analito de interés, m la pendiente de la recta y corresponde al producto entre la absortividad (a) de la muestra y el espesor del portamuestra, y b el intercepto de la recta al origen.

4. Luego, la absorbancia registrada medida en el sobrenadante obtenido en el proceso de limpieza de las NPs se reemplazó en la ecuación (3), para obtener el valor de concentración de la DNR en el sobrenadante. Cabe aclarar que la concentración de la solución problema debe estar comprendida en el rango de concentración que comprende la curva de

calibración. Si la concentración de la solución problema es menor que la concentración del estándar más diluido, debe usarse el método de adición estándar, que consiste en adicionar un volumen determinado de un estándar concentrado a la solución problema (sobrenadante), antes de realizar la lectura y que permite que esta lectura este dentro de las obtenidas para la curva de calibración. En el caso contrario, si la concentración del analito es mayor que la concentración del estándar más concentrado la solución problema deberá ser diluida.

3.2.3. Caracterización de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15

Los complejos formados tras la funcionalización de los sistemas de TiO₂ y TiCe15, se caracterizaron por las técnicas de RAMAN y FT-IR, UV-Vis, TEM y HRTEM. En la Tabla 3.3 se describen las técnicas de análisis empleadas en la caracterización de los productos obtenidos en la Etapa 2.

Tabla 3.3. Procedimientos de caracterización utilizados en la funcionalización de las nanopartículas

P05. FT-IR	La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (se utiliza principalmente en el análisis cualitativo de grupos funcionales. Los espectros se adquirieron en la modalidad de absorbancia con una resolución de 4 cm ⁻¹ en el rango entre 400-4000 cm ⁻¹ , en un espectrómetro IR, BRUKER TENSOR27. Las muestras se prepararon mezclando los sólidos en polvo con KBr con una relación 15:85, para formar una pastilla.
P06. RAMAN	Las mediciones de Raman se realizaron en un espectrómetro micro-Raman N8 NEOS SENTERRA con una línea de láser de 532 nm a temperatura ambiente.

...continuación de la tabla 3.3.

P07. UV-Vis	Se llevó a cabo en un espectrofotómetro micro-volumen Thermo Scientific Nanodrop 2000 con un rango de 200 a 600nm. La muestra se diluyó en una relación 1:10 en agua destilada. Se tomaron los espectros del agua destilada utilizada para la dilución y de la muestra.
P08. TEM, HRTEM	Utilizando las modalidades convencional (TEM) y de alta resolución (HRTEM) de microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Phillips, TECNAI F20, 200 KV, se observó la morfología de la suspensión de nanopartículas funcionalizadas. Las muestras se prepararon depositando 10-15 μ L de la suspensión en rejillas de cobre con recubrimiento de carbono amorfo.

3.3. Etapa 3

3.3.1. Pruebas de liberación del fármaco

La liberación del fármaco de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe₁₅ se investigó a pH 5.0 (el pH endosomal de las células cancerosas) y pH 7.4 (pH fisiológico de la sangre). Los complejos de DNR-NPs (2mg) se dispersaron en solución Buffer Fosfato Salino (PBS) (pH 7.4, 3 mL) y se transfirieron a bolsas de diálisis. Posteriormente, las bolsas de diálisis se sumergieron en 45mL de PBS (pH 5.3 y 7.4), en baño termoestable a 37 °C bajo agitación constante. Se tomaron alícuotas de solución buffer en contacto con los complejos (2mL) y se reemplazaron con la misma cantidad de PBS fresco (cada 2h durante 12h). Las alícuotas se tomaron inicialmente cada 6h hasta cumplir las 12h, y posteriormente cada 12h hasta cumplir las 48h. El análisis y caracterización de las soluciones extraídas, para detectar el fármaco liberado a través del tiempo, se llevó a cabo por medio de espectroscopía de ultravioleta visible, para ello se empleó el método de la curva de calibración estándar.

3.3.2. Bioensayos

Los ensayos de viabilidad se realizaron en el laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CMEB-UMSNH). Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo en la línea celular neoplásica suministrada por el CMEB: RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™) –Linfocito B–.

3.3.2.1. Cultivo celular.

El cultivo y mantenimiento de las células se llevó a cabo de acuerdo al “Protocolo y condiciones de las líneas celulares inmortales y determinación de viabilidad”, el cual consiste en:

1. Descongelamiento celular: el tubo criogénico que contenía las células se retiró del tanque de nitrógeno y se atemperó a 37°C por 5min (incubadora Thermolyne 37900).
2. Acondicionamiento celular: en condiciones asépticas (campana de flujo laminar LABCONCO) se transfirieron las células a un tubo cónico de plástico y se les adicionó 2mL de medio de cultivo (RPMI-1640, pH 4.2±0.2) y se homogeneizó. Posteriormente, se centrifugó durante 5min a 2000 rpm (SOL-BAT J500), y se decantó el sobrenadante.
3. Adaptación del paquete celular: el precipitado (células) se re-suspendió en 6mL de medio RPMI completo en caja de Petri plástica.
4. Las células fueron depositadas en una incubadora Lab-line CO₂ INCUBATOR para mantenerlas en un ritmo de crecimiento exponencial en condiciones estándar a 37° C, 5% en volumen de CO₂ y 90% de humedad.

3.3.2.2. Ensayos de viabilidad celular por MTT

El efecto citotóxico de la DNR en disolución y de las NPs con y sin fármaco, fue valorado por el método del MTT. Es un método simple y se usa para determinar la viabilidad celular por la actividad mitocondrial de las células. Está basado en la capacidad de las células vivas de reducir la sal de tetrazolio MTT de color amarillo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol), por rotura del anillo, en un producto insoluble de color violeta, el formazán, bajo la acción de enzimas

mitocondriales (succinato deshidrogenasa) que son funcionales sólo en células vivas [33]. El formazán generado queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización, el cual se cuantifica finalmente con ayuda de un espectrofotómetro a 500-600 nm. Cuantificar directamente la actividad enzimática succinato deshidrogenasa, que es un complejo proteico ligado a la membrana interna mitocondrial que interviene en rutas metabólicas claves como el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular y no se ha afectado la integridad estructural de dicho orgánulo. Este procedimiento consistió en los siguientes pasos:

1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad celular de 5×10^3 célula/pocillo; se trataron con distintas concentraciones de los complejos DNR-TiCe15 y DNR-TiO₂ y DNR en disoluciones: 100, 200 y 400, 600, 800 y 1600nM, y permanecieron bajo incubación por 48 y 96h. Utilizando como control negativo células sin tratamiento alguno.
2. Transcurrido el periodo del tratamiento, se añadieron 20µL a cada pocillo de una disolución de MTT al 20 % (5mg MTT/ml PBS). Tras incubar a 37° C durante 4 horas se centrifugaron las placas (por 5min a 2500rpm) y eliminó el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 100µL de Dimetil Sulfoxido al 0.2 % (DMSO) para disolver los cristales de formazán.
3. Se leyó el producto colorido (violeta) de la reacción a 595nm en un lector de microplaca. El % de viabilidad celular se estima con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Viabilidad celular} = \frac{D.O \text{ de la muestra}}{D.O \text{ del control negativo}} \times 100 \quad (4)$$

donde:

D.O (595nm) = Densidad óptica de las células tratadas con los compuestos puros

D.O del control (595nm) = Densidad óptica de las células sin tratamiento

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con el diseño experimental, el análisis y discusión de resultados se estructuró en tres etapas. En la etapa 1 se realizó la revisión y análisis de los resultados de la caracterización química, de fase y morfológica de los sistemas TiO_2 , TiCe_5 , TiCe_{10} y TiCe_{15} , lo que permitió determinar el sistema mixto que reúne los requisitos para su aplicación como sistema de liberación de fármacos. El sistema mixto con mejores perspectivas de uso como vehículo en sistema de liberación de fármacos (SAF) fue el utilizado en las siguientes etapas experimentales, en este caso se trató del sistema TiCe_{15} . La etapa 2 consistió en el análisis de los resultados de caracterización química y morfológica de los SAF basados en los sistemas TiO_2 y TiCe_{15} . A partir de estos resultados se determinaron la eficiencia de carga y encapsulación en ambos sistemas. La etapa 3 corresponde a los ensayos biológicos realizados sobre la línea celular RPMI 8226 a través de la prueba de MTT.

4.1. Etapa 1. Caracterización de los sistemas de estudio

4.1.1. Difracción de Rayos-X

La Figura 4.1 muestra los patrones de difracción de los sistemas TiO_2 , TiCe_5 , TiCe_{10} y TiCe_{15} . Con ayuda de la base de datos, se identificó únicamente la fase anatasa de titania (COD 7206075), lo que permite suponer que los átomos de cerio del dopante (CeO_2) se introdujeron en la red cristalina de la titania. Al comparar la posición de las reflexiones de Bragg para la muestra de titania pura (etiquetada con la clave TiO_2) y los sistemas dopados, puede notarse que los picos de difracción tienden a desplazarse a valores 2-theta menores conforme se incrementa el porcentaje de ceria (CeO_2) adicionado al sistema. El átomo de cerio tiene un radio de 185 pm, mientras que el radio atómico del titanio es de 176 pm, debido a esto, al entrar en la red cristalina de la titania, el valor del parámetro de red de la celda cristalina aumenta, y esto resulta en el corrimiento de los picos de difracción a ángulos menores —es decir distancias interplanares mayores—, lo que ha sido reportado con anterioridad [29]. Para confirmar esto, se calcularon los parámetros de red a

partir del valor θ de los picos de difracción (101) y (200); de acuerdo con la ecuación cuadrática de Bragg, para la estructura tetragonal:

$$\text{Sen}^2\theta = \frac{\lambda}{4} + \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (5)$$

Aquí, θ es el ángulo en el cual el plano difracta, λ es la longitud de onda de rayos X (1.54056 Å para $\text{CuK}\alpha$), y los términos a y c son parámetros de red. Se encontró que los parámetros de red de la estructura cristalina de la titania aumentaron a medida que el porcentaje de dopante incrementó, esto en comparación con los parámetros de titania pura, como se muestra en la Tabla 4.1. Estos aumentos en las constantes de red pueden relacionarse con la incorporación de los átomos de Ce en la red de titania en las posiciones intersticiales octaédricas, ya que estos sitios son lo suficientemente grandes para albergar átomos de mayor dimensión como el cerio [170].

Tabla 4.1. Parámetros de red calculados para los sistemas titania-ceria

Sistema	Parámetros de red [Å]	
	a	c
TiO ₂	3.71868	9.70346
TiCe5	3.73674	9.78362
TiCe10	3.75989	9.86298
TiCe15	3.79541	9.98706

En la Figura 4.1, puede notarse además que los picos principales de la fase anatasa presentan un ensanchamiento mientras disminuyen sus alturas en función del aumento en el porcentaje de ceria, lo que sugiere una disminución en el tamaño de cristalito. La incorporación de un porcentaje de átomos extraños en la red cristalina regular de un semiconductor como la titania, da origen a un proceso de deformación que provoca cambios microestructurales tales como la disminución en el tamaño de cristalito y microtensiones de la red cristalina, lo cual efectivamente se refleja en el

patrón como un ensanchamiento de los picos de difracción y una altura menor a los parámetros reales [170, 171-174].

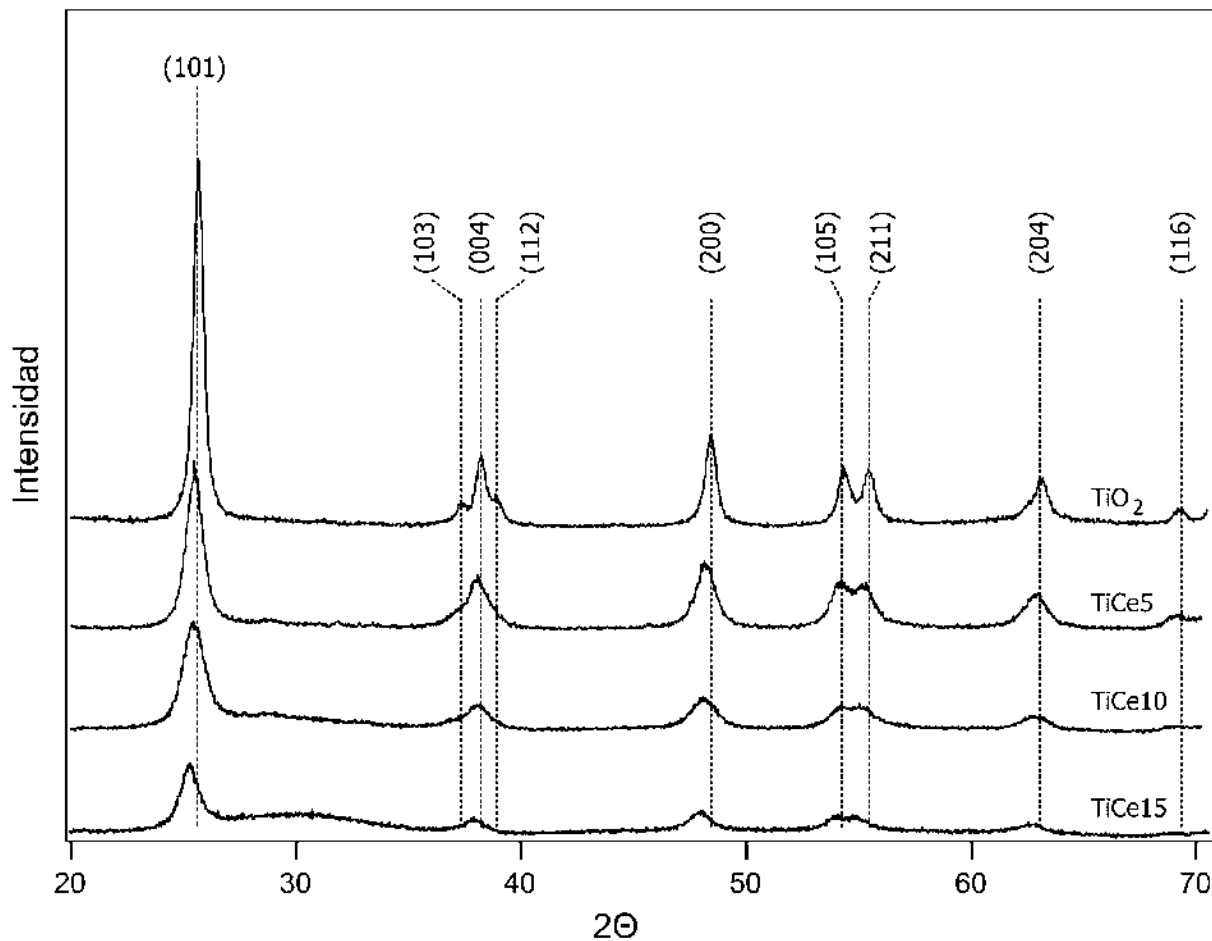


Figura 4.1. Espectros de difracción de Rayos-X de los sistemas de titania obtenidos con diferentes concentraciones de ceria.

Por lo anterior, en primer lugar, se analizó la influencia del dopaje de la ceria en la titania, sobre el tamaño de cristalito a través de la ecuación de Scherrer, la cual establece una estrecha relación entre el ensanchamiento del pico de difracción, con el tamaño del cristalito, deduciendo que el ancho integral (β) del pico varía de manera inversamente proporcional al tamaño del cristalito (L), a través de la relación:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (6)$$

donde K es el factor de forma (se utilizó un valor de 0.9 en este estudio), λ es la longitud de onda de radiación de rayos X (1.54056 Å para $\text{CuK}\alpha$), y β es el ancho integrado del pico de difracción principal (101). En la Tabla 4.2, se muestran los resultados obtenidos aplicando la ecuación de Scherrer, en donde se puede apreciar que el tamaño de cristalito de las muestras dopadas disminuyó con forme incrementa el porcentaje de ceria. Este efecto puede atribuirse a la incorporación de los átomos de cerio en la red de la titania durante el proceso de síntesis. Resultados similares han sido reportados por diferentes autores [31, 173, 175], y lo han atribuido a la incorporación de los átomos de los dopantes en la red cristalina hospedera, debido estos tienen la capacidad de retardar la cristalización de la titania, debido a sus propiedades fisicoquímicas (electronegatividad, radio iónico, número de coordinación). Como es el caso de Chaisuk y col. [31], quienes reportaron que el dopaje de la titania con CeO_2 provocó una disminución en el tamaño de cristalito medida que el contenido del dopante aumenta. Asimismo Kubacka y col. [175], observaron que el dopaje con molibdeno y wolframio provocó una disminución en el tamaño de cristalito de la fase anatasa al incrementar el contenido de dopante.

Para el caso del dopaje con CeO_2 , dicha tendencia puede estar relacionada además con el número de coordinación. De acuerdo con la cuarta regla de Pauling, en un cristal que contiene diferentes cationes, los que presentan un pequeño número de coordinación tienden a no compartir los sitios poliédricos con otro catión, lo que limita el crecimiento del cristal [174]. Por consiguiente, a medida que se van incorporando cationes de la ceria con un número de coordinación más bajo (4) en la red de la titania (8), retarda el crecimiento de los cristalitos.

Como se mencionó anteriormente, el segundo efecto microestructural que produce el ensanchamiento de los picos, es la presencia de microtensiones residuales en la estructura cristalina de la titania, las cuales tienen su origen en las fuerzas de compresión elástica por la distorsión de la red debido la incorporación del dopante [171, 172]. Debido a que no existe un método directo para evaluar la microtensión en la red cristalina, en diversos trabajos de investigación previos se le determina a partir del desplazamiento que sufren los planos cristalinos (101), mediante la siguiente expresión:

$$e = \frac{\Delta d}{d} = \frac{d_f - d_0}{d_0} \quad (7)$$

donde d_0 es la distancia interplanar teórica del plano (hkl) sin deformación y d_f es la distancia interplanar del plano (hkl). La Tabla 4.2 resume los resultados del análisis de microtensión. Como puede apreciarse, existe una tendencia a incrementar la microtensión en la estructura cristalina de titania conforme el contenido de ceria aumenta, lo que nos indica que los sistemas de estudio están conformados por nanopartículas con dimensiones menores a los 20 nm.

Tabla 4.2. Tamaño de cristalito y microtensiones promedio presentes en los sistemas de estudio

Sistema	Tamaño de cristalito [nm]	Microtensión
TiO ₂	12	0.0075
TiCe5	11.15	0.0124
TiCe10	10.26	0.0231
TiCe15	9.12	0.0309

Mediante una cuantificación de fases por el método de Rietveld se determinó la composición para los diferentes sistemas, los resultados se muestran en la Tabla 4.3. El margen de error en resultados obtenidos por el método de Rietveld, con respecto a las concentraciones reales medidas en muestras calibradas, está en el rango de $\pm 0.5\%$ a $\pm 3\%$ [176]. Como puede apreciarse, los esfuerzos residuales de análisis de Rietveld para la titania dopadas con CeO₂= 5, 10 y 15% rondan valores dentro del límite admisible, Rwp= 8.75, 8.90 y 9.26, respectivamente, lo cual indica un buen ajuste. Adicionalmente, en la Figura 4.2 a), b) y c) se presentan los espectros simulados y experimental de los diferentes sistemas de estudio. De esta manera, aunado a lo discutido anteriormente, los resultados obtenidos del análisis de los patrones de rayos X muestran evidencia que permite afirmar que los átomos de cerio se incorporaron en la red cristalina de titania.

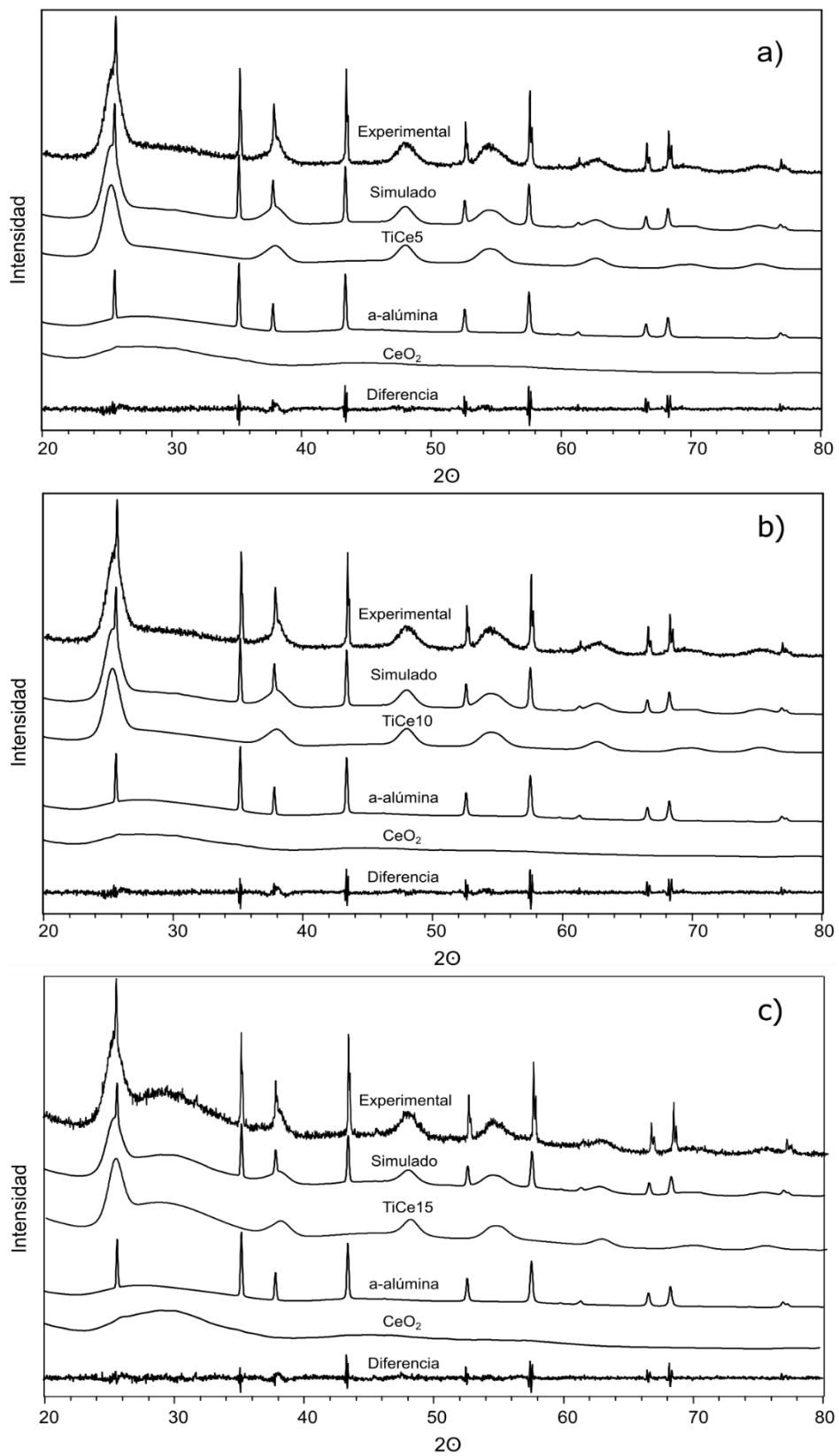


Figura 4.2. Descomposición de fases, cuantificación de fases de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b), y TiCe15 c).

Tabla 4.3. Resultados del análisis cuantitativo de fases por DRX

Sistema	Fases	Intensidad integrada	% Intensidad	% mol calculado	Rwp
TiCe5	CeO ₂	201.76	8.08	4.987	8.75
	TiO ₂	2,232.03	89.46	94.973	
TiCe10	CeO ₂	398.80	19.21	9.896	8.90
	TiO ₂	2,064.91	78.36	89.968	
TiCe15	CeO ₂	814.06	30.70	14.875	9.26
	TiO ₂	1,662.73	62.72	84.825	

4.1.2. Fluorescencia de Rayos X

La composición química de los diferentes sistemas de estudio determinado por XFS, se presenta en la Tabla 4.4. Esta composición está dada en forma de óxidos y expresada en porcentaje molar (% mol). Los análisis revelan que las muestras exhiben la composición formulada en el diseño experimental. Asimismo, estos resultados coinciden perfectamente a los obtenidos por DRX, por lo que es posible concluir que las muestras están conformadas por ambas fases, titania y ceria, lo cual confirma la incorporación de los átomos de cerio en la red cristalina de la titania.

4.1.3. Área superficial (BET)

Con el propósito de conocer las propiedades superficiales de los materiales preparados por el método propuesto, así como la influencia de la relación TiO₂-CeO₂ en el área superficial y el volumen total de poros, se realizaron análisis de adsorción de nitrógeno a 77° K por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.5. El área superficial BET está relacionada con el tamaño de cristalito de la muestra, de manera que, al disminuir el

tamaño de cristal, el área superficial aumenta [177, 178]. Como puede apreciarse en los datos de la Tabla 4.5, la muestra de titania presenta un área superficial relativamente baja, que puede deberse a que contiene un gran número de cristales grandes. Al aumentar la cantidad de ceria, el área superficial aumenta, desapareciendo los cristales más grandes, lo que provocaría dicho incremento [177]. Algunos autores proponen que el incremento en el área superficial se debe, además, a la posible generación de defectos en la superficie de la partícula [30, 179].

Tabla 4.4. Composición elemental de las muestras de titania en orden creciente de concentración de ceria obtenidos por XRF

Sistema	Fases	%mol experimental	%mol calculado
TiCe5	CeO ₂	5	4.94
	TiO ₂	95	94.923
TiCe10	CeO ₂	10	9.871
	TiO ₂	90	89.798
TiCe15	CeO ₂	15	14.87
	TiO ₂	85	84.91

Tabla 4.5. Influencia de la modificación de la titania con ceria en el área superficial (BET) y volumen total de poros

% CeO ₂	S _{BET} [m ² /g]	Vt [cm ³ /g]
0	120.20	0.17
5	199.28	0.2
10	212.46	0.2
15	236.14	0.21

S_{BET}, área superficial BET; Vt, Volumen promedio de poro

En cuanto a los resultados del volumen de microporos, algunos autores han publicado que la medida de este parámetro da una idea de la incorporación de los átomos del dopante en la estructura huésped [180, 181], ya que no se ve afectado por el tamaño de cristalito y por lo tanto, un aumento en el volumen de poros se puede atribuir a la introducción del cerio en la red de titania. En la Tabla 4.5, puede apreciarse un aumento en el volumen total de poros al aumentar el porcentaje molar de ceria. Ambos hechos están de acuerdo con los resultados de caracterización realizados y pueden utilizarse como una prueba más que confirma la incorporación del cerio en la estructura cristalina de la titania. Resultados similares fueron reportados por Xiao y col. [30], quienes evaluaron el efecto del dopaje con 1 y 5% de ceria sobre el área superficial de la titania y encontraron que el área superficial incremento en un 6 y 10%, respectivamente, y coinciden con Larsson y col [179] en que podría ser el resultado de la introducción de los átomos de cerio, que estabiliza la red de la titania y genera defectos superficiales.

4.1.4. Luminiscencia ópticamente estimulada

La Figura 4.3 muestra las señales de luminiscencia ópticamente estimuladas de los sistemas TiO_2 , TiCe_5 , TiCe_{10} y TiCe_{15} irradiados con una dosis de 10Gy de una fuente beta $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ y estimulada con luz azul (458nm y $100\text{mW}/\text{cm}^2$) durante 30s. Como se aprecia en la figura, la señal luminiscente es mayor en las muestras dopadas con Ceria que en titania pura, lo cual ha sido atribuido a la presencia de los átomos de Cerio en la red cristalina de la titania y los defectos estructurales que actúan como activadores, facilitando las transiciones ópticas entre los estados electrónicos característicos de la Titania [182-184]. Así pues, el análisis de OSL confirma la incorporación de la ceria en la red de la titania. De igual manera, se pudo determinar que a mayores concentraciones de dopante los sistemas mixtos exhiben una mejor eficiencia óptica, que puede ser aprovechada en futuras investigaciones relacionadas con el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades o el mal funcionamiento celular en los estadios más iniciales.

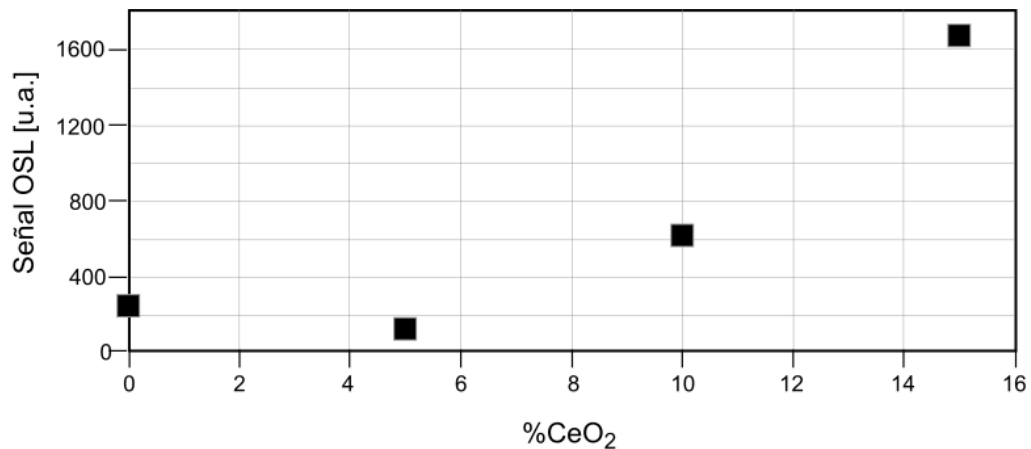


Figura 4.3. Sensibilidad de OSL de las muestras de titanio dopadas con ceria.

4.1.5. Espectroscopía RAMAN

La Figura 4.4 muestra los espectros Raman obtenidos para muestras de titanio puro y dopado con CeO₂. Mediante esta figura, se puede apreciar que en todos los casos únicamente se observan bandas a 144, 190, 399, 514 y 638 cm⁻¹, las cuales corresponden a los modos de la fase anatasa Eg, Eg, B1g, A1g y Eg [185-187], y por el contrario no presentan bandas que puedan ser asociadas con el CeO₂ que, de acuerdo a la literatura, el pico característico de la fase cúbica tipo fluorita de la ceria se encuentra a 450 cm⁻¹ [188, 189]. Las frecuencias de los modos observados en los espectros se resumen en la Tabla 4.6. Al comparar los espectros, se observa un desplazamiento acompañado de un ensanchamiento de las bandas conforme el contenido de ceria aumenta. Este comportamiento ha sido atribuido a la presencia de estrés debido a la distorsión de la red tetragonal por la incorporación de impureza, átomos de cerio, en los sitios intersticiales octaédricos de la estructura cristalina de la titanio [190-193]. Puede notarse además, una disminución en la altura del modo Eg (144 cm⁻¹) en función del incremento de dopante [194-197]. En los espectros Raman el aumento de bajas frecuencias asignados como modo Eg de la fase anatasa indica un incremento en el ordenamiento de largo alcance, lo que significa que el número de enlaces Ti-O que forman la molécula de anatasa se incrementa. La incorporación de los átomos de cerio en la red de la titanio, supone la ruptura de los enlaces Ti-O y la formación de nuevos enlaces Ti-O-Ce, lo que provoca una disminución en el ordenamiento de largo alcance y por consiguiente un decremento en la altura del modo Eg de la fase anatasa [191, 193, 196].

Tabla 4.6. Bandas Raman observadas en los espectros de los diferentes sistemas de estudio

Número de onda (cm ⁻¹)	Enlace	Modo	Ref.
144, 190	$\sigma(\text{O-Ti-O})$	Eg	
399	$\sigma_s(\text{O-Ti-O})$	B1g	[185-187]
514	$\sigma_{as}(\text{O-Ti-O})$	A1g	
638	$\nu_s(\text{O-Ti-O})$	Eg	
458	$\nu(\text{O-Ce-O})$	-	[188,189]
144-154	$\sigma(\text{Ti-O-Ce})$	Eg	[191-193, 197]

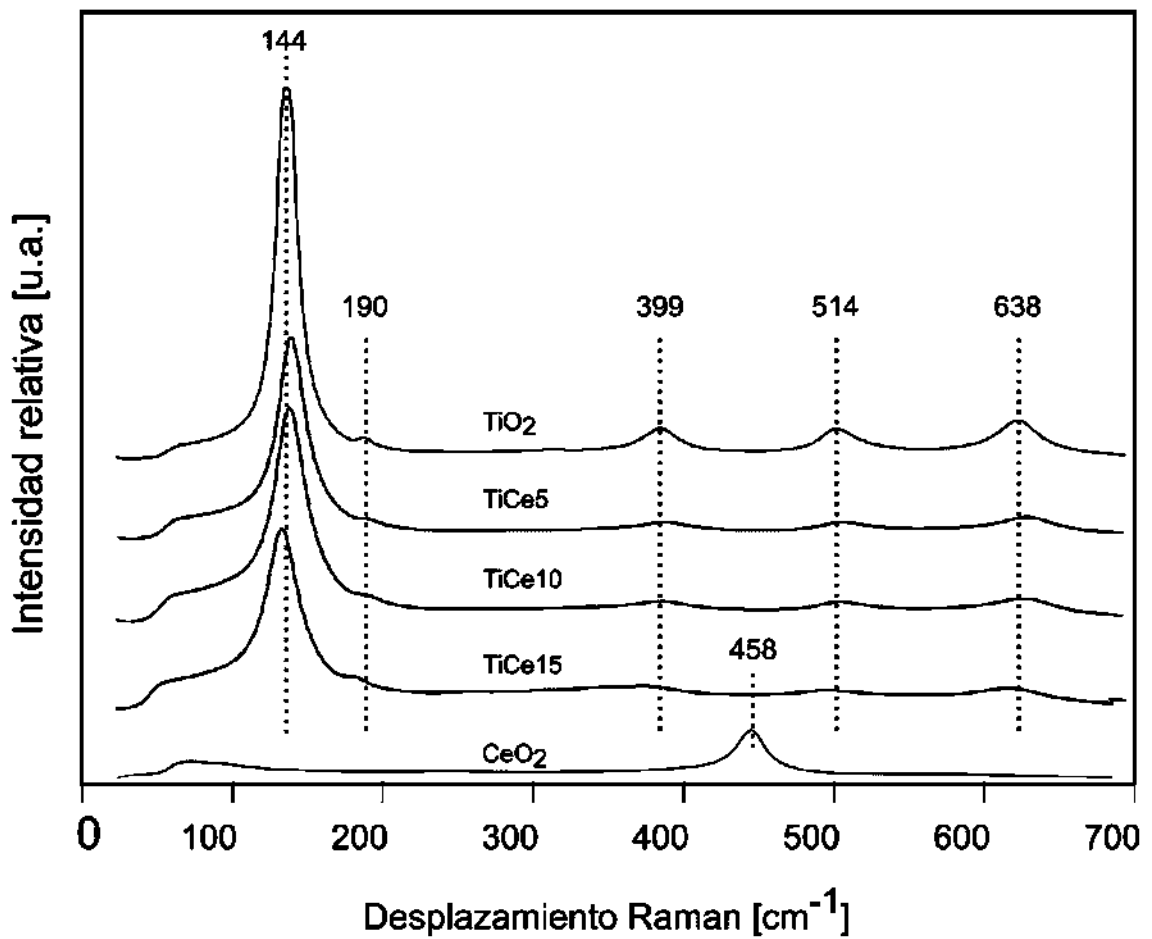


Figura 4.4. Espectros Raman de las muestras de titania pura y dopada con 5, 10 y 15% mol de ceria.

4.1.6. Espectroscopía FT-IR

En la Figura 4.5 se muestran los espectros de infrarrojo para muestras de titania pura y dopada con ceria. En dicha figura se puede observar que, en todos los casos las bandas presentes corresponden a titania y ceria en el caso de las muestras dopadas. En Tabla 4.7 se muestran las bandas y sus posiciones en el espectro.

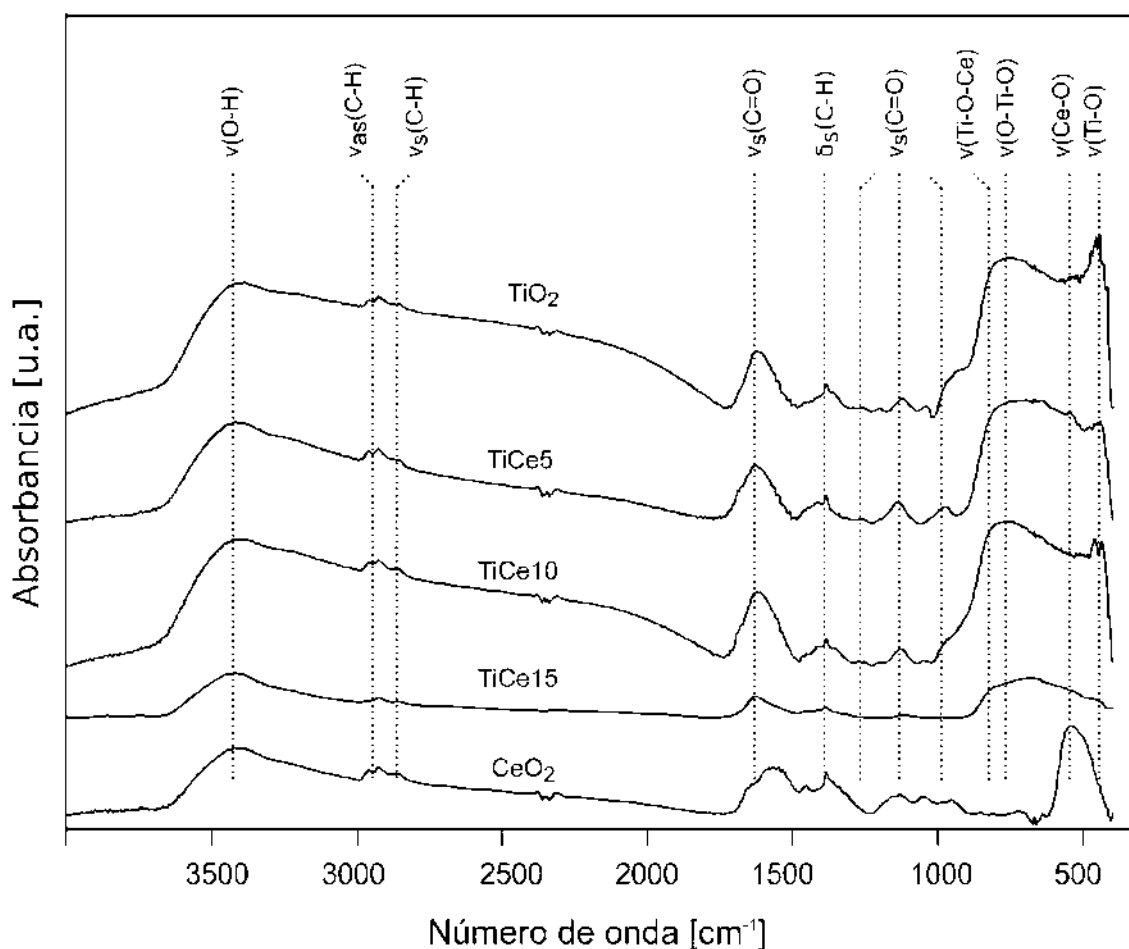


Figura 4.5. Espectros FT-IR para los sistemas de titania pura y dopada con ceria.

Al comparar los espectros de las muestras de titania dopada con el obtenido para titania pura, se aprecia que la banda ubicada aproximadamente a 784 cm⁻¹, que corresponde a las vibraciones de tensión del grupo triangular peróxido de titanilo (TiO₂)⁺² [32, 197, 198], que disminuye en altura y se desplazan hacia longitudes de onda mayores a medida que se incrementa el porcentaje de

dopante; esto sugiere la formación del enlace (Ti-O-Ce), lo que provoca la deformación de la estructura y modifica la distribución de densidad electrónica –induciendo un cambio en el momento dipolar- y geometría de la molécula, provocando alteraciones en la altura y posición de las bandas de absorción. Estos resultados coinciden perfectamente con los reportados por Raman, por lo que se puede concluir que los átomos de cerio lograron incorporarse en la red cristalina de la titania, es decir el proceso de dopaje se dio exitosamente [32, 198].

Tabla 4.7. Asignaciones de las bandas observadas en los espectros IR de titania dopada con ceria

Número de onda (cm^{-1})		Asignaciones	Ubicación del funcional	Ref
3410	(mf)	$\nu_s(R - OH)$	Debido a la adsorción/coordinación de moléculas de H_2O en la superficie del óxido	[32]
2910	(d)	$\nu_{as}(C - H)$		[197]
2833	(d)	$\nu_s(C - H)$		[198]
1616	(f)	$\nu_{as}(C = O)$	Especies resultantes de la interacción del CO con los grupos hidroxilo	
1384	(m)	$\delta(C - H)$		
1200-850	(d)	$\nu_s(C = O)$		
784	(m)	$\nu(O - Ti - O)$	Tensión del grupo triangular peróxido de titanilo y modos fundamentales de vibración de TiO_2	[198]
440	(mf)	$\nu(Ti - O)$		
450	(m)	$\nu(Ce - O)$	Modos fundamentales de vibración de CeO_2	
788-880	(mf)	$\delta(Ti - O - Ce)$	Modo debido a la incorporación de iones Ce^{3+} en la red de titania	[197]

Referencias. Intensidad de las bandas: (d)= débil; (m)= media; (f)= fuerte; (mf)= muy fuerte.
Vibraciones: ν =modo de estiramiento/tensión; δ = modo de formación/flexión. s= simétrico; as=asimétrico.

4.1.7. Espectroscopía UV-Vis

La Figura 4.6, muestra los espectros de UV-visible de titania pura y dopada con ceria. En esta figura es posible observar que todas las muestras presentan una fuerte absorción de luz en el espectro entre 320 nm y 420 nm, la cual es atribuida a las transiciones de los electrones de la banda de valencia a la banda de conducción pertenecientes a la titania. No obstante, con la incorporación de la ceria en la estructura de titania, se aprecian ligeras diferencias entre los espectros de los materiales. Se puede observar que cuando se utiliza mayor porcentaje de ceria las bandas de absorción de UV-Vis se desplazan a la región del espectro de menor energía; es decir hacia el espectro visible (Vis), presentando una mayor longitud de onda. Dichos desplazamientos han sido atribuidos a una transición de carga entre los electrones de la subcapa f de los iones Ce^{3+} y las bandas de conducción o de valencia de TiO_2 [32, 196]. Realizando un análisis de datos de la absorción para determinar el mecanismo de transición óptica predominante y graficando los valores de energía para transición directa —Figura 4.7 a), b), c) y d)—, se obtuvieron los valores del “band gap” óptico mediante el método Kubelka-Munk para las muestras de titania pura y dopada con ceria. Las magnitudes del ancho de banda prohibida se presentan en la Tabla 4.8.

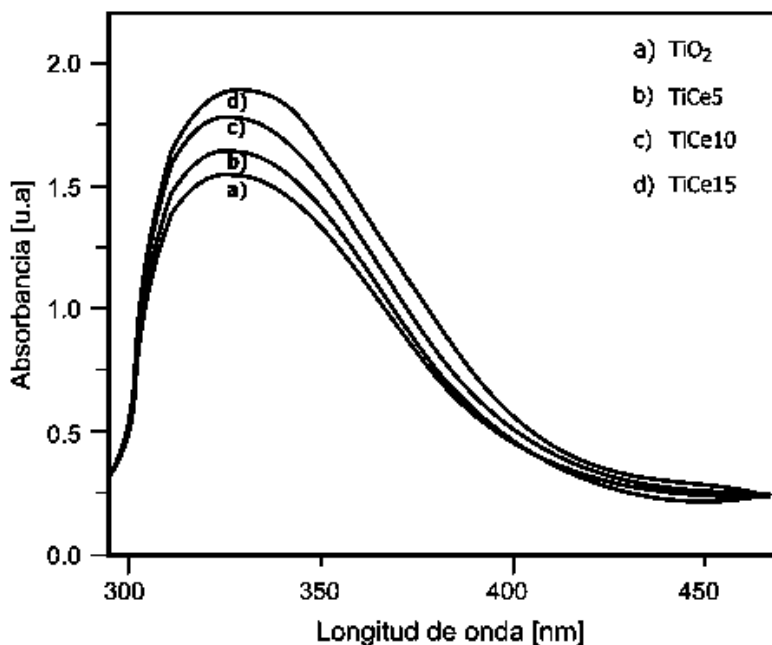


Figura 4.6. Espectros de UV-Vis de las muestras de titania pura y dopada con ceria.

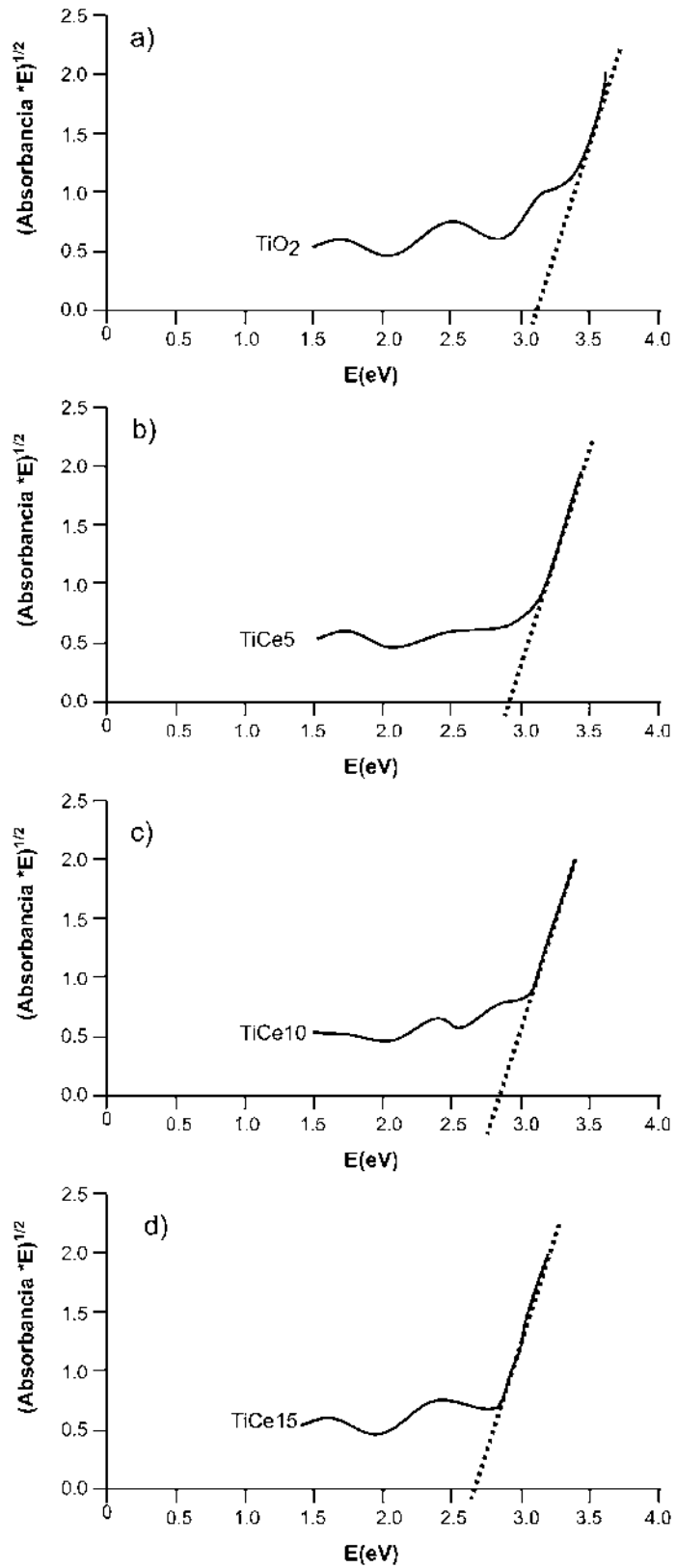


Figura 4.7. Determinación de la brecha de energía prohibida para: titania a), titania dopada con: 5% b), 10% c) y 15% de ceria d).

Como se observa en la Tabla 4.8, el valor del Band gap de la titania es mayor que el Band gap de las muestras dopadas con ceria, lo que nos indica que la adición de CeO_2 rebaja el valor del Band gap hacia valores de energía menores, es decir, valores más desplazados hacia el visible. De este modo parece ser que el átomo de cerio efectivamente se incorporó en la red tetragonal de la titania, por lo que, aunque los valores de Band gap de los óxidos, en principio, entrarían en el rango del ultravioleta, el valor final de Band Gap efectivo es menor que el valor inicial para los sistemas estudiados. Podría pensarse también que el contacto entre las fases ambos semiconductores provoca una deslocalización de la carga produciendo una recombinación electrónica que favorece el paso de los electrones de la banda de valencia de uno de los óxidos a la banda de conducción del otro, produciéndose dicha disminución de la energía necesaria para que esa transición pueda darse. Esta disminución del Band gap hace que las transiciones prohibidas de la capa de valencia a la capa de conducción sean menores, por lo que se puede pensar que estos fotocatalizadores serán más activos que la titania para radiación de tipo solar [189].

Tabla 4.8. Valores de Band gap para las muestras de titania pura y dopada con ceria

Muestras	Band gap (eV)
TiO ₂	3.1
TiCe5	2.84
TiCe10	2.75
TiCe15	2.62

4.1.8. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La técnica de SEM se utilizó para analizar la morfología y composición química de los polvos de Titania y Titania dopada con Ceria. Las Figuras 4.8 a) y b) presentan imágenes de SEM representativas de una muestra de los polvos de Titania — TiO_2 — obtenidos después del proceso de síntesis. Como se aprecia en las imágenes, la muestra está conformada por partículas esferoidales de tamaño homogéneo inferior a los 100 nm.

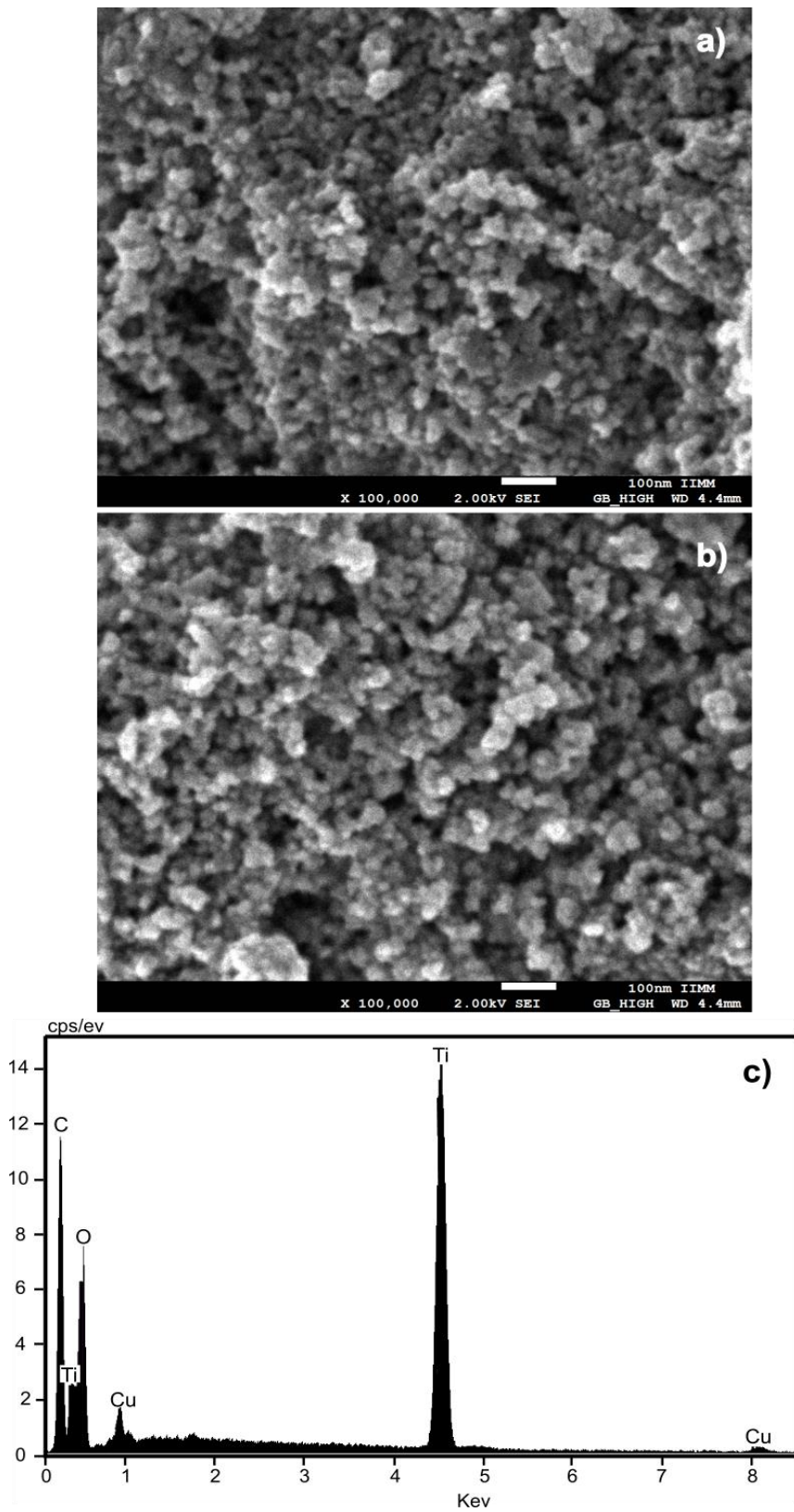


Figura 4.8. Imágenes de SEM de una muestra de titania a) y b); análisis químico de EDS de la muestra de titania c).

Las observaciones realizadas en las imágenes 4.8, sugieren que las micelas jugaron un papel importante en la formación de las nanopartículas de titania controlando el tamaño y morfología de las partículas [142, 199]. De acuerdo con Nasi y col. [142], quienes llevaron a cabo la síntesis de nanopartículas de Titania y Titania dopada con molibdeno por el método sol gel aplicando la técnica de microemulsión de micelas inversas, el núcleo de la micela inversa proporciona un entorno adecuado para la nucleación y crecimiento controlado de las nanopartículas, al tiempo que proporciona una buena dispersión de los precursores de Titania y Ceria. La Figura 4.8 c) presenta el patrón de energía dispersiva (EDS) de la muestra observada, el cual muestra fuertes señales de titanio, seguidas de O_2 , que corresponden a los elementos que conforman a la Titania; así como señales de Cu pertenecientes al portamuestras. Este resultado concuerda con los obtenidos por DRX, en donde se encontró únicamente la presencia de titania.

Las Figuras 4.9 a), b) y c) presentan imágenes de SEM obtenidas de muestras de titania dopada con 5, 10 y 15% mol de ceria — $TiCe_5$ $TiCe_{10}$ y $TiCe_{15}$, respectivamente—. En las imágenes se aprecia que las muestras están compuestas por pequeñas partículas esferoidales en el rango nanoscópico. Asimismo, se observa que la morfología de las nanopartículas no se ve afectada como resultado de la incorporación de la Ceria en la red de la Titania.

Por otra parte, las Figuras 4.10 a), b), y c) corresponden a los análisis por EDS realizados en las muestras de Titania dopada con 5, 10 y 15% de Ceria, respectivamente. Los análisis indican la presencia de Titanio, Oxígeno y Cerio principalmente, así como la presencia de Cobre perteneciente al portamuestras. Estos resultados confirman la presencia de la ceria en las muestras y coinciden con los resultados obtenidos por XFS y DRX. De acuerdo con Chandra y col. [200], de los diferentes métodos de síntesis reportados en la literatura, la variante del método sol-gel asistido por micelas inversas permite la incorporación y distribución del dopante más homogénea químicamente, tanto en volumen como en toda la superficie de la muestra, así como un mayor control de la morfología y distribución de tamaño de partícula. Por lo que, los resultados obtenidos del análisis por SEM demuestran que a través de este método es posible nanopartículas del sistema Titania-Ceria geoméricamente esféricas y monodispersas, con tamaño de partícula menor a los 100nm.

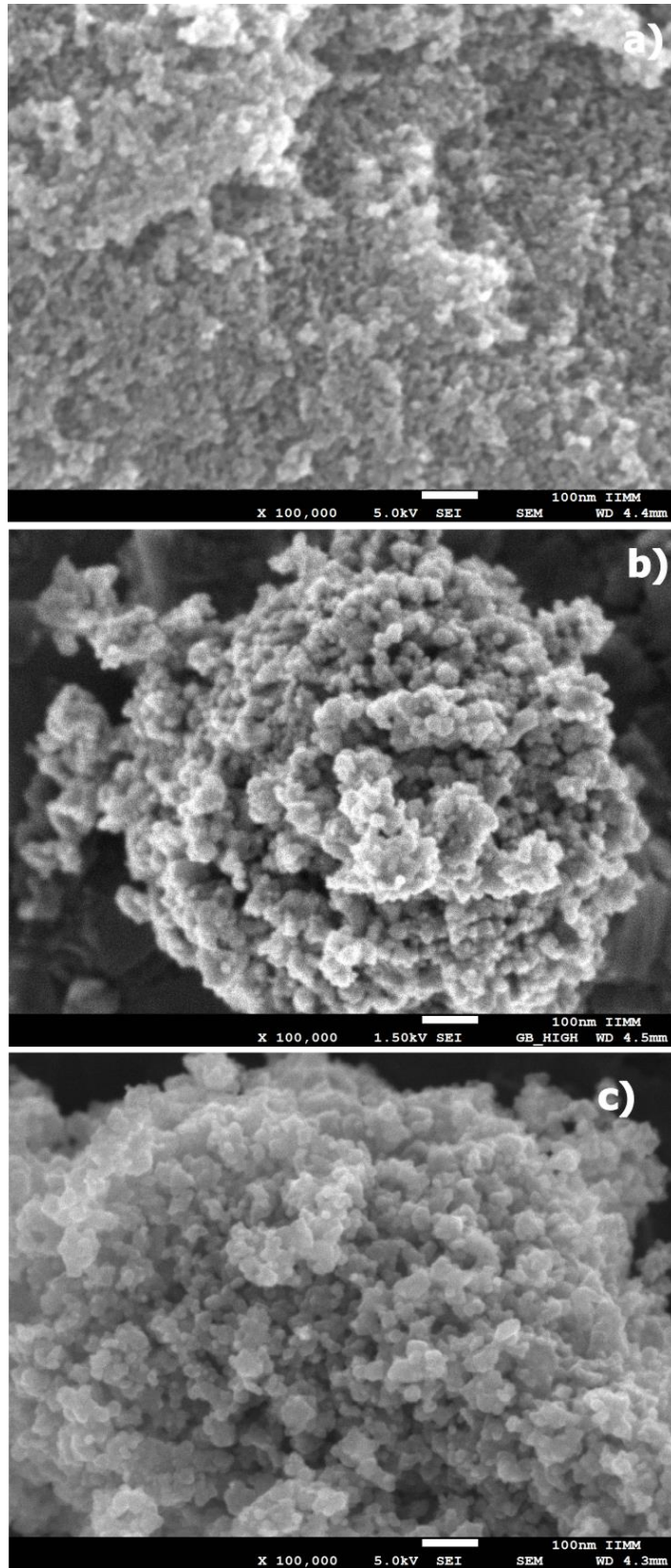


Figura 4.9. Imágenes de SEM de muestras de titania dopada con 5% a), 10% b) y 15% de ceria c).

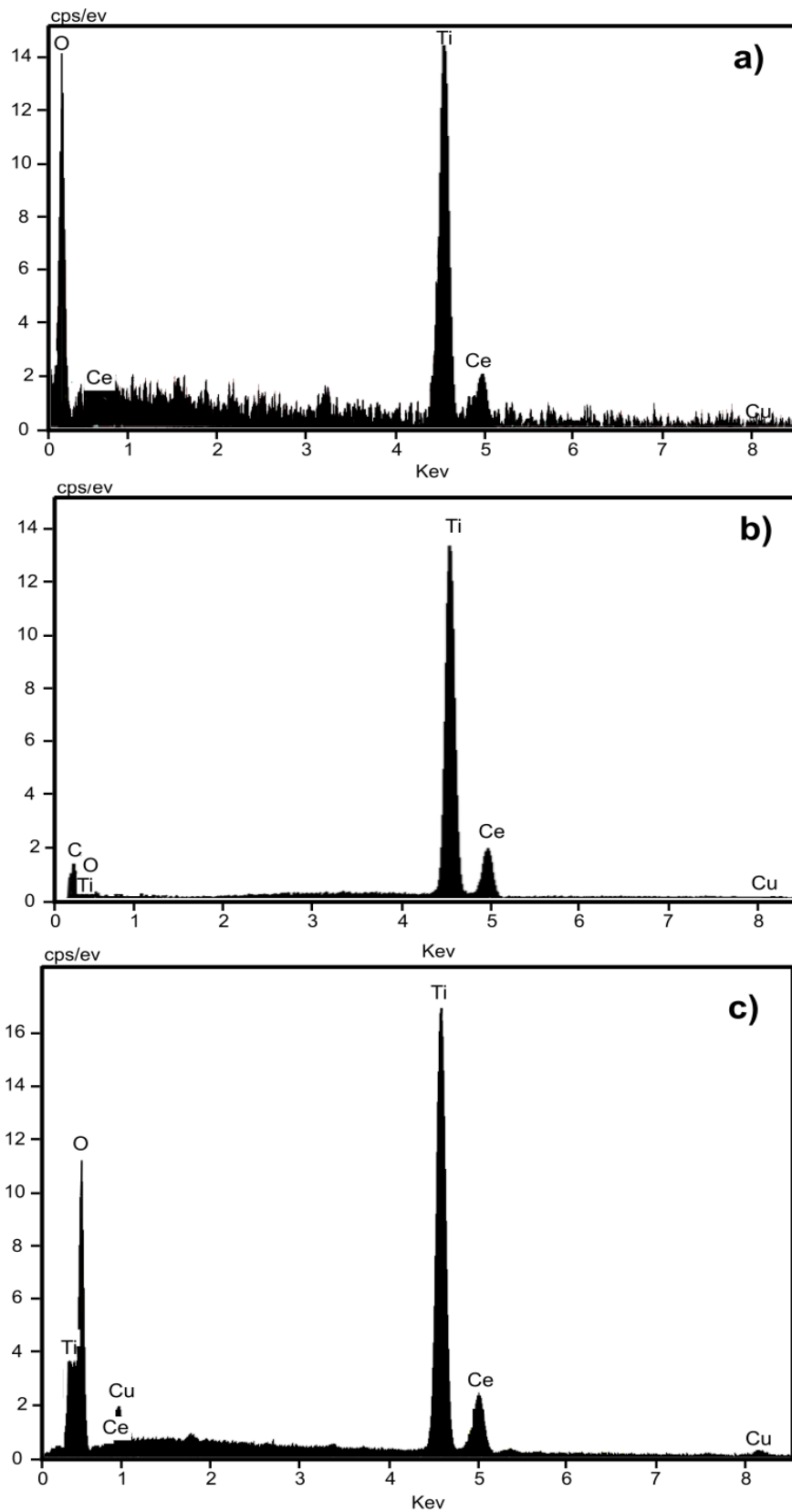


Figura 4.10. Análisis químico de EDS de muestras de titanía dopada con 10% b) y 15% de ceria c).

4.1.9. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Con el propósito de conocer las propiedades microestructurales de los materiales preparados por el método de síntesis propuesto, así como la influencia de la relación $\text{TiO}_2\text{-CeO}_2$ sobre la morfología de las nanopartículas, se realizó el análisis de la muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 4.11 a) presenta una imagen obtenida por TEM en el modo de campo claro (a 50,000 aumentos) de la muestra de titania — TiO_2 —.

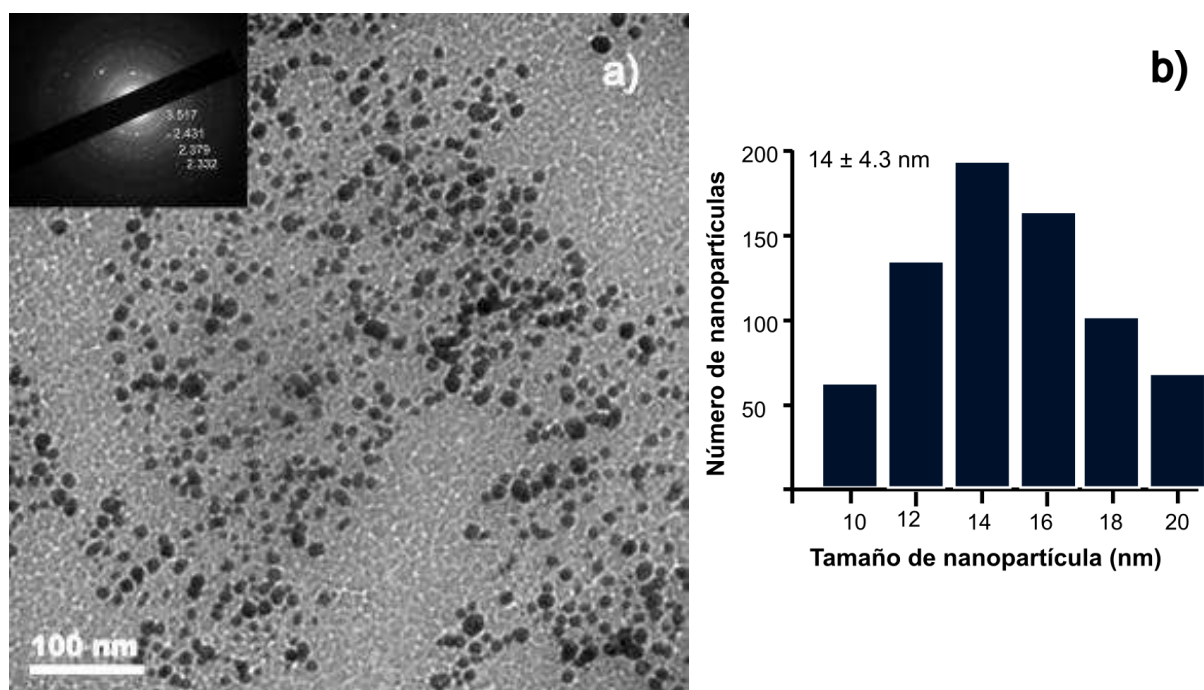


Figura 4.11. Imagen de TEM de una muestra de titania a); histograma de distribución de tamaño de nanopartícula para TiO_2 b).

De acuerdo con esta imagen, la muestra está formada por partículas esferoidales pequeñas. En la misma figura se muestra el patrón SAEDP correspondiente a toda zona de observada, indicando que efectivamente la muestra es policristalina. La indexación del patrón indicó que la muestra corresponde a la estructura tetragonal de la fase anatasa con parámetros de red $a = b = 3.785$ nm y $c = 9.519$ nm (tarjeta Crystallography Open Database, COD, 7206075). La Figura 4.11 b) muestra el histograma de distribución de tamaño de nanopartículas que corresponde a la Figura 4.11 a). El tamaño de las nanopartículas oscila entre 12 a 20nm, no obstante el grueso de las mediciones cae

en los valores más bajos, con un intervalo de confianza del 90% para la media de 14 ± 4.3 nm, este rango de valores para la media está en concordancia con los resultados mostrados en la Tabla 4.9, de los tamaños de los cristalitos obtenidos a partir de los espectros de difracción de rayos X.

Las Figuras 4.12 a) y b) corresponden imágenes de alta resolución HRTEM de las nanopartículas, en donde se puede observar claramente que los polvos están conformados por nanopartículas predominantemente esféricas con diámetros entre 11 a 17 nm. Asimismo, se indexaron las partículas, corroborando que se trata de la fase anatasa (grupo espacial I41 amd) [23], presentando planos con distancias interplanares igual a 0.35 nm, correspondientes al plano (101) de titanía.

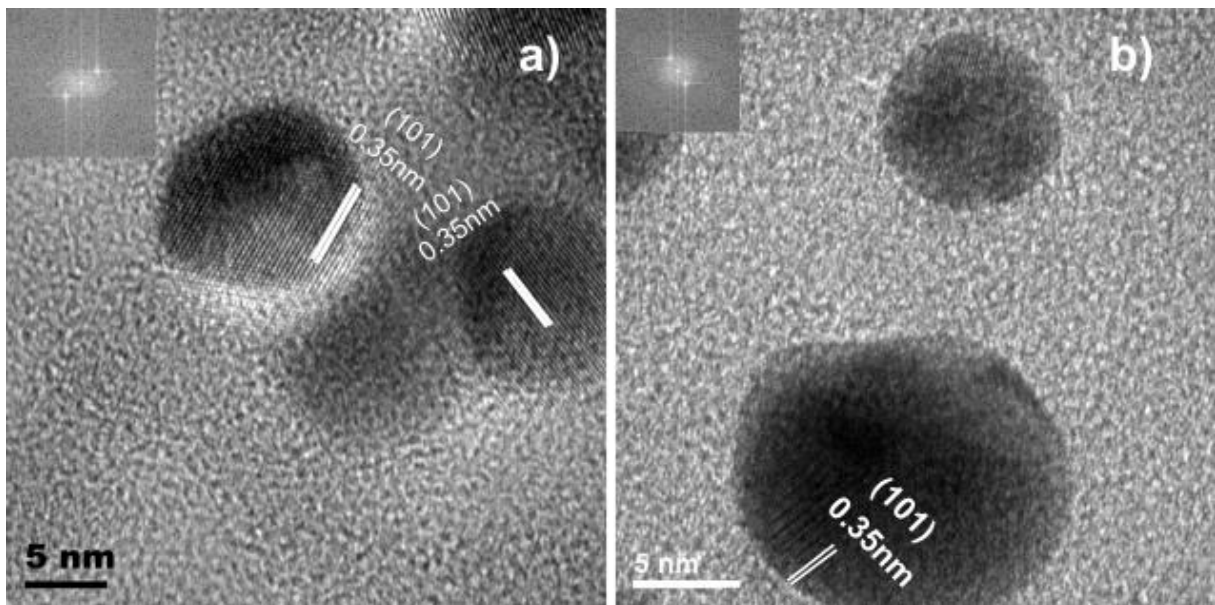


Figura 4.12. Imágenes de HRTEM obtenidas de una muestra de titanía a) y b).

Las Figuras 4.13 a), b) y c) muestran micrografías de TEM obtenidas de muestras de titanía dopada con 5, 10 y 15% mol de ceria —TiCe5 TiCe10 y TiCe15, respectivamente— en el modo de campo claro. En las imágenes se aprecia que las muestras están constituidas por pequeñas partículas esferoidales en el rango nanoscópico. De acuerdo con estas imágenes, la morfología de las nanopartículas no varía tras la incorporación de los átomos de cerio en la red cristalina de la titanía, así como con el porcentaje de dopante incorporado. Adicionalmente, en las imágenes se presentan sus correspondientes patrones de SAEDP, los cuales al indexarse mostraron que, en todos los casos se trata de la estructura tetragonal de la titanía, tomando como referencia la tarjeta COD-7206075.

Cabe hacer notar que, las distancias interplanares estimadas a partir los patrones, incrementaron en función del porcentaje de ceria respecto a los valores estimados anteriormente para la red cristalina de titania pura.

En las imágenes 4.13 d), e) y f) se muestran los histogramas de distribución de tamaño de partícula determinados a partir de las Figuras 4.9 a), b) y f), respectivamente. Como se puede apreciar en estas imágenes, en el caso de la muestra dopada con 5% de ceria —TiCe5— el tamaño de partícula muestra una reducción respecto a la muestra de titania pura, ya que el tamaño de partícula se estimó en un rango entre 14 a 16nm aprox., con un intervalo de confianza de 95% para la media de 14 ± 2.5 nm. En tanto que, para la muestra dopada con 10% de ceria —TiCe10— comienza a ser evidente la disminución en el tamaño de partícula, alcanzando una media de 12 ± 2 nm con un intervalo de confianza de 90%. De acuerdo con el histograma para titania dopada con 15% de ceria —TiCe15—, el tamaño de nanopartícula es notoriamente más pequeño y presentan una distribución más homogénea respecto a las estimaciones realizadas en la muestra de titania pura, con un intervalo de confianza del 90% para la media de 10.60 ± 3 nm. Estos resultados sugieren que a mayor porcentaje de ceria incorporado en la red de titania, el tamaño de partícula disminuye.

Las Figuras 4.14 a), b) y c) corresponden a imágenes de alta resolución HRTEM de las nanopartículas de titania y dopada con 5, 10 y 15% de ceria, en las cuales es posible apreciar que las diferentes muestras están conformadas por nanopartículas esféricas en el rango nanoscópico. Asimismo, se indexaron las partículas, corroborando que se trata de la fase anatasa (grupo espacial I41 amd) [23], presentando planos con distancias interplanares igual a 0.35nm, correspondientes al plano (101) de titania. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los análisis de DRX, en donde se encontró sólo la presencia de la fase anatasa; así como con el análisis Raman que sugiere, que la incorporación de los átomos de cerio en la red de la titania, supone la ruptura de los enlace Ti-O y la formación de nuevos enlaces Ti-O-Ce que, debido a sus diferentes números de coordinación, retardan el crecimiento de las nanopartículas y permite conservar su forma esférica [174, 193, 196].

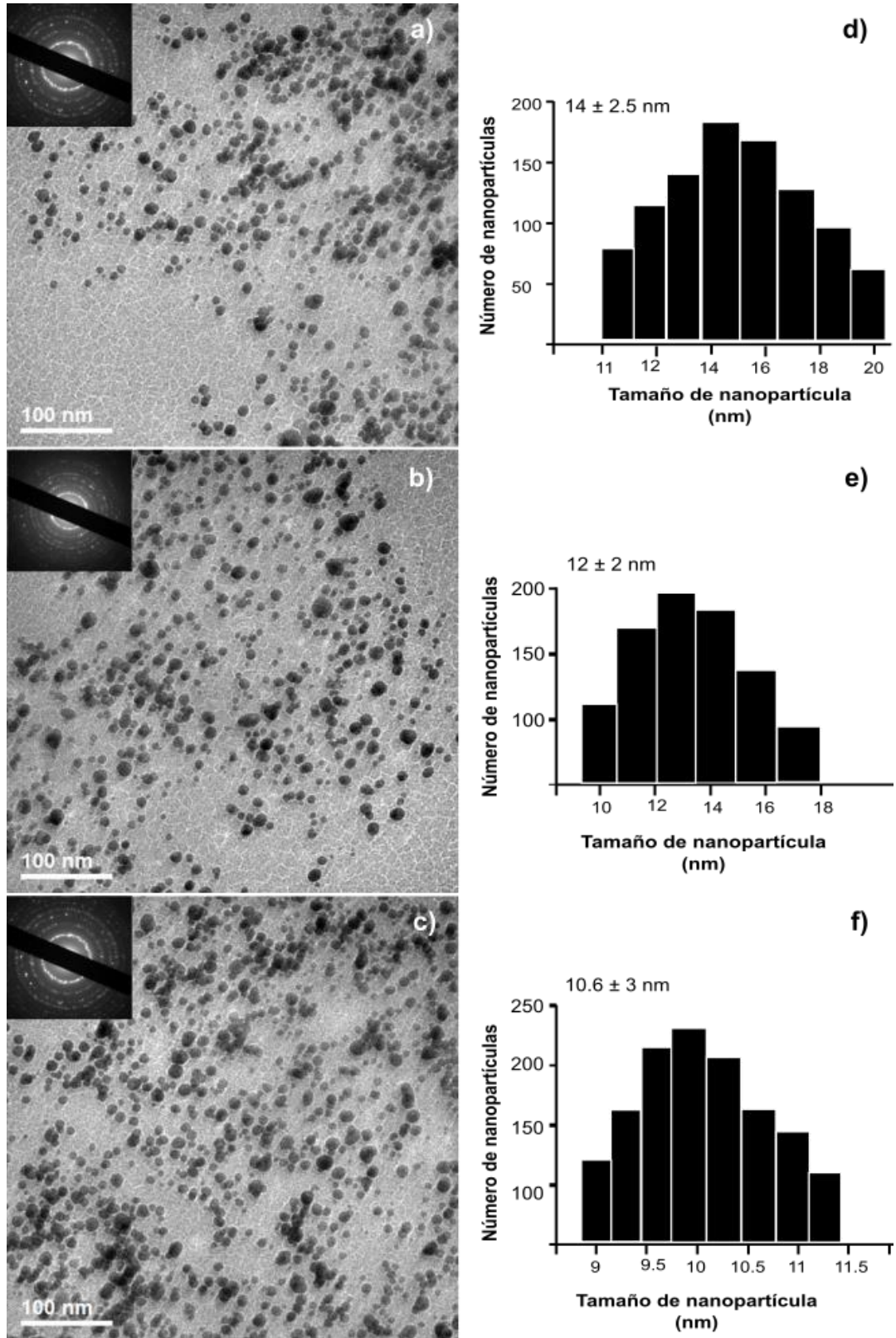


Figura 4.13. Micrografías de TEM de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b) y TiCe15 c); histogramas de distribución de tamaño de nanopartícula de los sistemas TiCe5 d), TiCe10 e), y TiCe15 f).

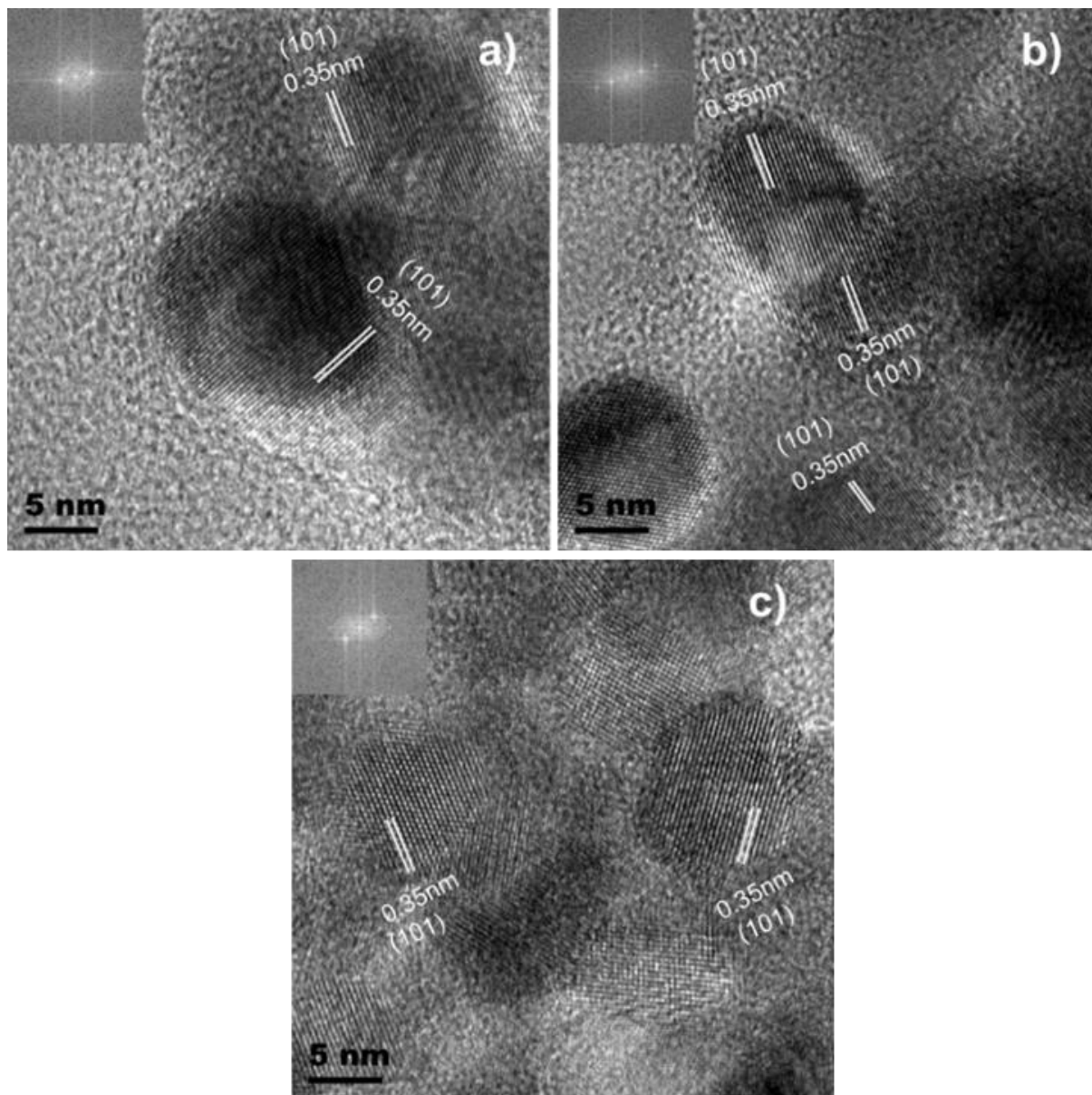


Figura 4.14. Imágenes de HRTEM de las nanopartículas que conforman las muestras de los sistemas TiCe5 a), TiCe10 b) y TiCe15 c).

Tomando en cuenta que, los reportes en este campo indican que las nanopartículas en un rango entre los 10-40nm son capaces de evadir el sistema renal —principal sistema de excreción de sustancias extrañas que han ingresado al organismo—, así como el Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF) —las células y tejidos responsables de la eliminación física de las partículas de la circulación sanguínea— [201, 202], lo que favorece el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático incrementando la vida media plasmática del fármaco hasta alcanzar por

difusión pasiva (efecto EPR) los tejidos diana e incrementar su acumulación en las células tumorales vía endocitosis [123]. Por lo que, en este sentido, las nanopartículas obtenidas por el método propuesto —método sol-gel asistido por una microemulsión de micelas inversas— presentan las características que les permitiría incorporarse y contribuir en el campo de la administración de fármacos, particularmente en el tratamiento del cáncer.

4.2. Etapa 2. Caracterización de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15

Derivado del análisis por TEM, SEM, DRX y BET, se encontró que las nanopartículas de Titania dopadas con 15% mol de Ceria (TiCe15) reúnen las propiedades de notable utilidad para el encapsulamiento y liberación gradual de agentes terapéuticos, como son su morfología esférica homogénea y elevada área superficial, respecto a las nanopartículas de titanio pura y dopadas con 5 y 10% mol de ceria. Por tal motivo, en este trabajo se realizó la funcionalización de TiCe15 a daunorrubicina (DNR), evaluándose y comparándose su eficiencia de carga, así como sus efectos sobre la línea celular neoplásica RPMI 8226 con las nanopartículas de titanio pura, con el propósito de obtener un soporte adecuado para quimisorción de daunorrubicina, para ser empleados como sistemas de quimioterapéuticos.

4.2.1. Espectroscopía FT-IR

La Figura 4.15 muestra los espectros de infrarrojo obtenidos de muestras de titanio puro y dopado con 15% de ceria después de los procesos de funcionalización con DNR y limpieza, etiquetadas como DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15 respectivamente. Adicionalmente, en esta figura se presenta el espectro de DNR, obtenido de una muestra del fármaco comercial empleado en la funcionalización, y de las nanopartículas dopadas con ceria —TiCe15—. De acuerdo con investigaciones previas [21, 125], la unión entre las moléculas de DNR y las nanopartículas se da a través de enlaces covalentes con el átomo de oxígeno de las funciones ceto-fenolato de la molécula de DNR —{C(12)=O, C(11)-O⁻} o {C(5)=O, C(6)-O⁻} [203, 204, 205], cuyos modos de vibración o bandas generalmente se ubican en la región comprendida entre los 1,550 cm⁻¹ a 1,700cm⁻¹, respectivamente— con el átomo metálico de las nanopartículas [21, 125]. Asimismo se ha

reportado que, como resultado del anclaje de la molécula de DNR a las nanopartículas, dichas bandas disminuyen en intensidad.

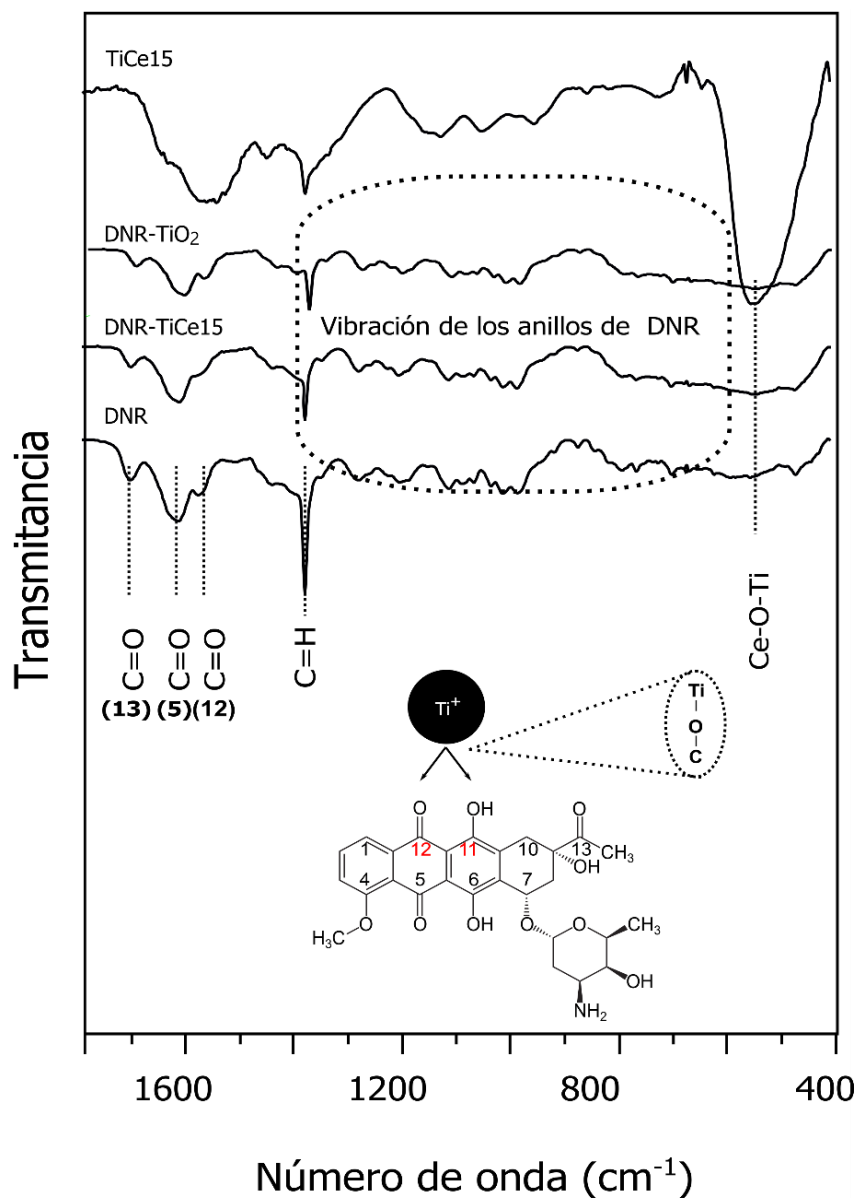


Figura 4.15. Espectros de FT-IR obtenidos de los complejos DNR-TiO₂, DNR-TiCe15, así como de DNR y de las nanopartículas libres de fármaco.

Al comparar los espectros para DNR y los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15, puede notarse que las bandas que corresponden a los grupos carboxilo, involucrados en la unión con las

nanopartículas, se ubican a los 1570cm^{-1} y 1621cm^{-1} , tienden a disminuir en altura, lo que sugiere que se ha logrado establecer la unión entre el fármaco y las nanopartículas de titania pura y dopadas con 15% mol de ceria. En tal contexto, la disminución de intensidad de estas bandas puede atribuirse a la quimisorción de los grupos carboxilos en la superficie de las nanopartículas, lo que provoca una disminución en la vibración de sus enlaces —que se traduce como débiles señales o bandas en el espectro de IR en el espectro—. Por otra parte, al contrastar los espectros de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15 con el espectro de las nanopartículas sin funcionalizar—TiCe15—, no se observó la banda asignada al modo de vibración δ (Ti-O-Ce) característico de las nanopartículas dopadas [193, 195], debido a que las nanopartículas se encuentran recubiertas con el fármaco. Adicionalmente, en la figura se muestra una representación esquemática propuesta para el anclaje de las moléculas de DNR en la superficie de la nanopartícula a través de puentes "oxo".

4.2.2. Espectroscopía RAMAN

La Figura 4.16 muestra los espectros Raman para DNR, TiCe15, y los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15. De acuerdo con el análisis de IR, la unión de la molécula de daunorrubicina a la superficie de las nanopartículas se dio a través de los grupos carboxilo funcionales $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $\nu(\text{C}-\text{O})$ — de las funciones ceto-fenolato [204, 205]. En el espectro Raman de DNR, los modos de vibración que corresponden a estos grupos $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $\nu(\text{C}-\text{O})$ se ubicaron alrededor de los 420cm^{-1} y 610cm^{-1} , respectivamente. Las frecuencias de los modos más significativos de la molécula de DNR se resumen en la Tabla 4.9 [203-205]. Al comparar los espectros para los complejos DNR-TiO y DNR-TiCe15 con el espectro de DNR, puede notarse que estos modos de vibración pierden intensidad hasta casi desaparecer por completo, lo que sugiere que la molécula de DNR se ha unido a la superficie de las nanopartículas, como se ha reportado para nanopartículas funcionalizadas con daunorrubicina y doxorubicina [21, 203, 204]. En cuanto a la desaparición de las señales $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $\nu(\text{C}-\text{O})$ en el espectro de los complejos puede deberse al cambio en sus modos de vibración al formarse los nuevos enlaces entre estos grupos y las nanopartículas. Cabe hacer notar que, los espectros de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15 con el espectro TiCe15, no es posible observar la banda asignada al modo de vibración δ (Ti-O-Ce) característico del sistema mixto, cuya explicación al igual que en análisis de FT-IR, se debe a que las nanopartículas se encuentran recubiertas con el fármaco.

Tabla 4.9. Frecuencias Raman (cm^{-1}) identificadas en la molécula de DNR

Enlace y grupo funcional	Región (cm^{-1})	Ref.
σ Anillo, σ (C-H)	100-400	
ν (C=O), grupo carbonilo de la cetona	420	[203]
ν (C-O), grupo carbonilo	600	[205]
ν (C-O), grupo carbonilo	1000-1300	
ν (C=O), grupo carbonilo de la cetona	1400-1600	

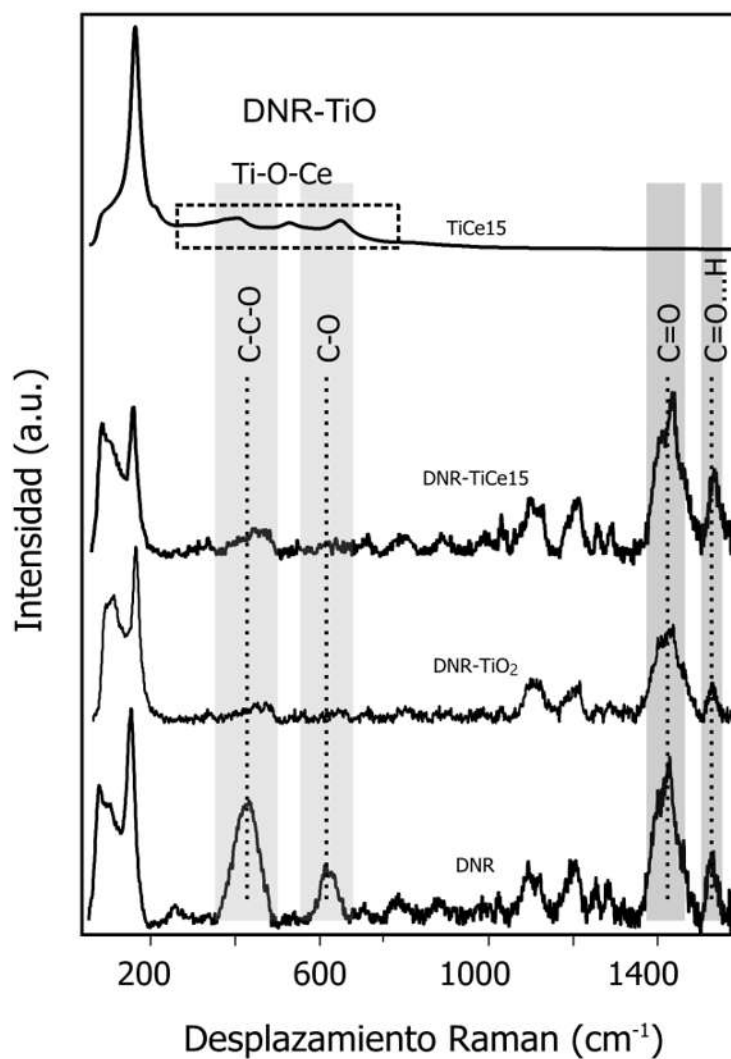


Figura 4.16. Espectros Raman obtenidos de muestras en polvo de DNR, TiCe15, y los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15.

4.2.3. Espectroscopía UV-Vis

La Figura 4.17, muestra los espectros UV-Vis para DNR y los complejo funcionalizados DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15. De acuerdo con la literatura, el espectro de absorción UV-Vis de DNR se caracteriza por presentar un pico de absorbancia máximo alrededor de los 400 a 500nm, correspondiente al modo de vibración de su núcleo antraquinónico [206]. Los espectros presentan además, tres picos entre los 200 a 300nm, que por su ubicación se atribuyen a la molécula del agua. Usando como método analítico la espectrofotometría UV-Vis, se determinó la eficiencia de encapsulación y carga de las nanopartículas, a partir de las absorbancias registradas en los espectros presentados en la Figura 4.17 y la curva de calibración de DNR, la cual se presenta y describe en el Anexo 1.

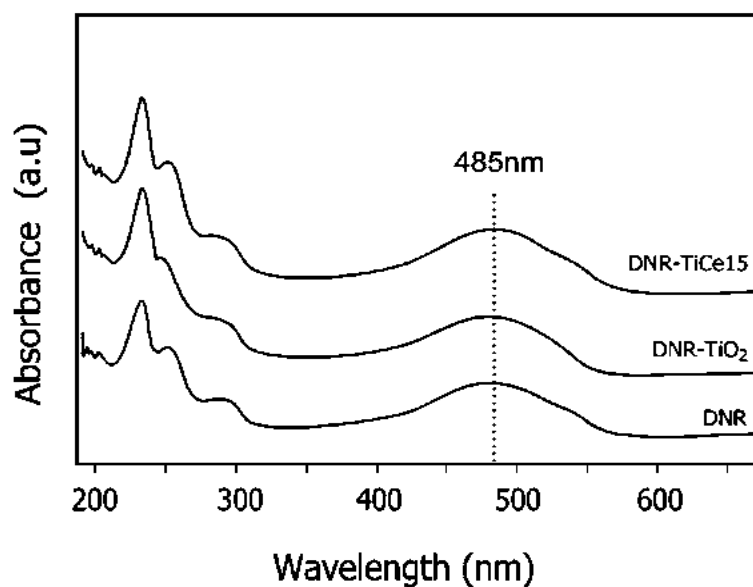


Figura 4.17. Espectros de UV-Vis del fármaco daunorrubicina y los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15.

La eficiencia de carga y encapsulación para las nanopartículas de titania pura (TiO₂) se estimó en $66.12\% \pm 3.61\%$ y $8.81\% \pm 2.83\%$, respectivamente; mientras que para las nanopartículas dopadas con 15%mol de ceria (TiCe15) fueron de $80.86\% \pm 2.14\%$ y $10.78\% \pm 2.46\%$, respectivamente. Los resultados muestran que al dopar las nanopartículas, su eficiencia de encapsulación aumentó un 25.61% y su capacidad de carga aumentó un 18.27%, respecto a titania pura, lo que puede ser

atribuido al aumento en el área superficial, y posiblemente al aumento de los sitios activos generados en la superficie de las nanopartículas como consecuencia del dopaje. En base a estos resultados, es posible concluir que las nanopartículas dopadas con ceria pueden actuar más eficazmente como nanotransportadores de agentes quimioterapéuticos. Zhang y col. [125] fueron los primero en llevar a cabo la a cabo la funcionalización con DNR de nanopartículas de titania obtenidas por el método sol-gel, y reportaron una eficiencia de encapsulación del $65.46\% \pm 6.82\%$. Lo anterior sugiere que, el método de síntesis propuesto en el presente trabajo de investigación permite obtener nanopartículas cuya superficie presenten un mayor número de sitios activos para el anclaje de moléculas orgánicas.

4.2.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las Figuras 4.18 a) y b) muestran las imágenes de TEM en la modalidad de campo claro de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15, respectivamente, en las cuales es posible observar que las nanopartículas presentan un recubrimiento sobre la superficie, en base los resultados obtenidos del análisis por UV-Vis, IR y Raman, se puede concluir que se trata del fármaco ligado a las nanopartículas. Las Figuras 4.19 a) y b) corresponden a imágenes de TEM de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15, en ellas pueden apreciarse nanopartículas esféricas, la mayoría se encuentran alrededor de 11-15nm, además no se observan aglomerados. Este resultado es de vital importancia para el curso de la investigación, tomando en cuenta que la ausencia de una envoltura polimérica provoca aglomeración de las nanopartículas cuando se encuentran en condiciones fisiológicas debido a la presencia de sales y proteínas, lo que podría causar la obstrucción de vasos capilares. No obstante, la capa de moléculas de DNR que se adsorben en la superficie de las partículas inhibe el proceso de aglomeración al evitar las interacciones de Van der Waals. [123, 206] como lo sugieren las observaciones a través de microscopía electrónica de transmisión para ambos complejos. Por lo que se puede concluir, que al funcionalizar a las nanopartículas de titania pura y dopada con ceria con DNR, les confiere mayor estabilidad y poder antineoplásico.

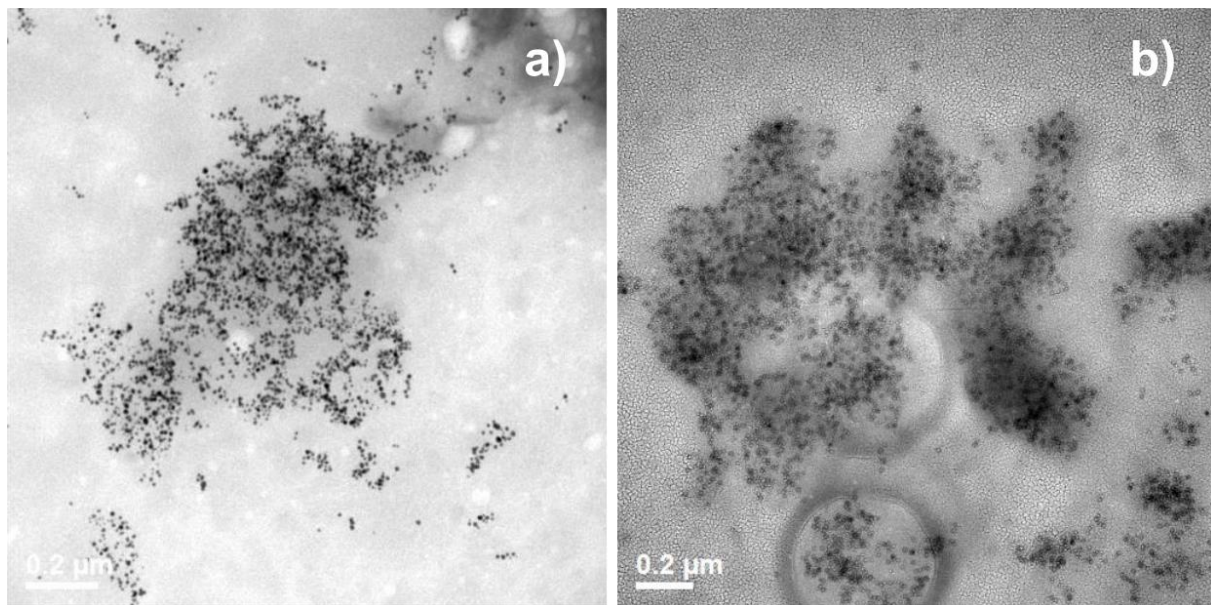


Figura 4.18. Imágenes de TEM en la modalidad de campo claro de los complejos DNR-TiO₂ a) y DNR-TiCe15 b).

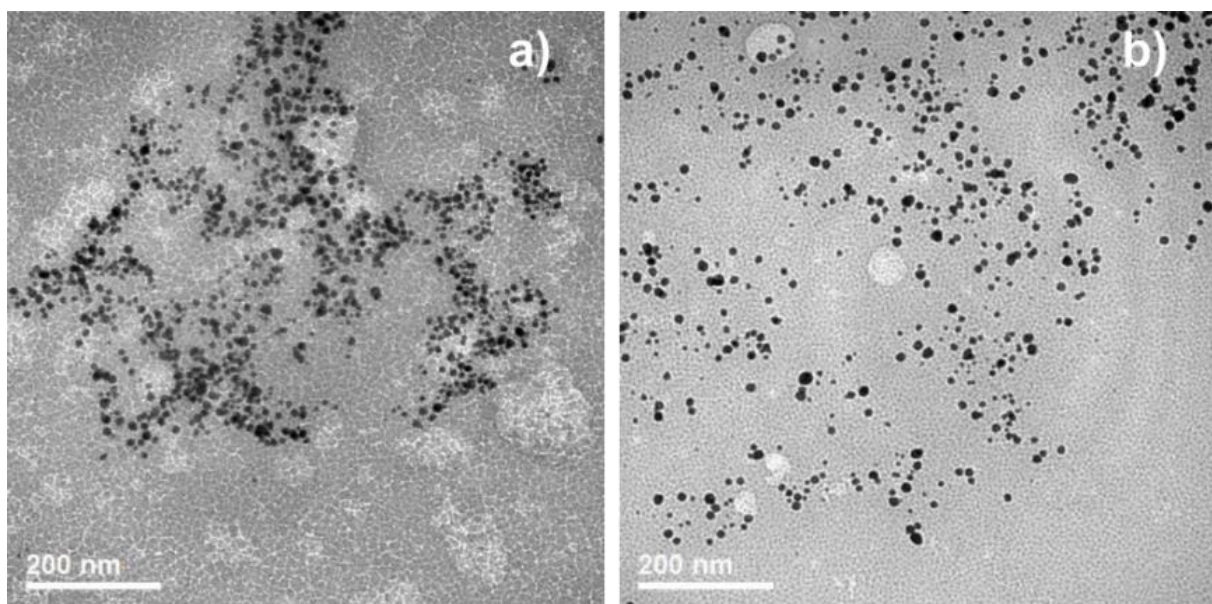


Figura 4.19. Imágenes de TEM en la modalidad de campo claro de los complejos DNR-TiO₂ a) y DNR-TiCe15 b), en las cuales se puede apreciar que las nanopartículas obtenidas después del proceso de funcionalización, las cuales no presentan aglomerados.

Las Figuras 4.20 a) y b) corresponden a imágenes de HRTEM de los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15, en las cuales pueden ser observadas las nanopartículas y que corroboran lo discutido en las figuras 4.19 a) y b).

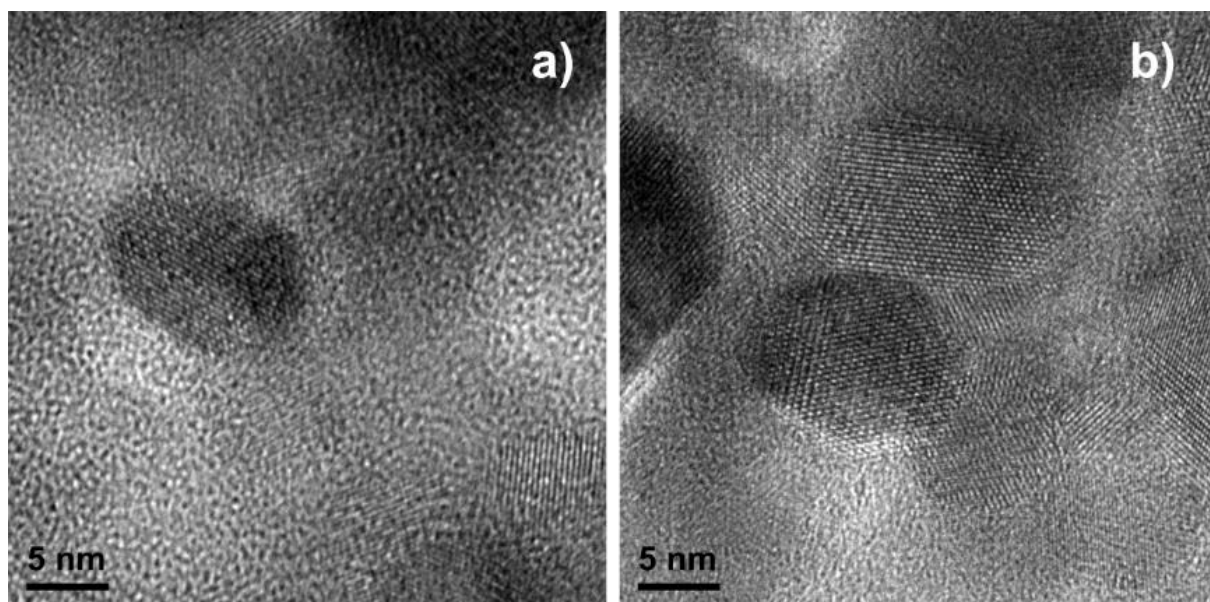


Figura 4.20. Imágenes de HRTEM de las nanopartículas que conforman las muestras de los complejos DNR-TiO₂ y b) DNR-TiCe15.

4.3. Etapa 3. Bioensayos

4.3.1. Pruebas de liberación *in vitro*

En la Figura 4.21, se presentan los perfiles de liberación de DNR para los complejos DNR-TiO₂ y DNR-TiCe15, en donde se comparan los comportamientos de ambas partículas en el proceso de liberación del fármaco frente a un medio de simulación a pH endosomal de las células cancerosas (PBS, pH 5.0), seguido de un medio alcalino para simular el torrente sanguíneo (PBS, pH 7.4). Como se aprecia en la figura, ambos complejos presentan a pH 7.4 una cinética de liberación similar, la cual fue considerablemente lenta y sostenida en el tiempo, alcanzando porcentajes de liberación de 17% para el complejo DNR-TiCe15 y 18.5% en el caso de DNR-TiO₂, dentro de las

primeras 48h de observación. Dicho comportamiento, ha sido atribuido a que en condiciones alcalinas no es posible ionizar el enlace covalente entre DNR y las nanopartículas, lo que le confiere a estos complejos la capacidad de proteger a la DNR encapsulada en ellas contra la degradación enzimática, manteniendo por más tiempo el fármaco en el torrente sanguíneo, minimizando las fluctuaciones y evitar los efectos adversos o secundarios [21, 125].

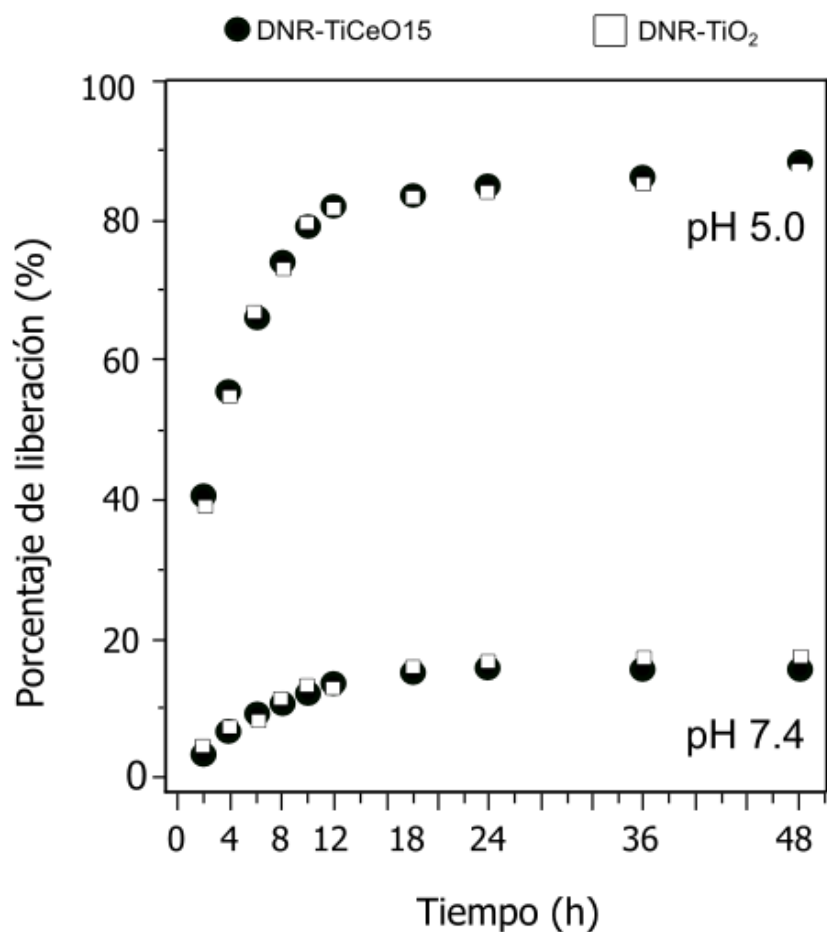


Figura 4.21. Cinética de liberación de DNR de los complejos DNR-TiO₂ y TiCe15.

Mientras que, en condiciones que simula el microambiente tumoral (pH 5.0), la tasa liberación de la DNR en ambos complejos es mucho más elevada, liberando al medio casi 88% de la carga en el caso de DNR-TiCe15 y 85% para DNR-TiO₂, al cabo de 48h de iniciada la prueba. Asimismo, el cambio en el comportamiento en este caso, ha sido atribuido a la protonación del grupo amino en la molécula de DNR a pH más bajo, lo que debilita la unión de las moléculas de DNR a las

nanopartículas, desencadenando su liberación [125]. Estos resultados, indican que las nanopartículas obtenidas en el presente trabajo, una vez en el torrente sanguíneo serán capaces de prolongar los tiempos de circulación del fármaco al no liberarlo hasta que penetren en la célula tumoral, por lo cual resultan un candidato eficiente para su incorporación como nanotransportador de fármacos en el campo de la oncología.

4.3.2. Ensayos de viabilidad celular por MTT

La mayoría de los estudios de citotoxicidad más comúnmente utilizados se basan en métodos colorimétricos, como el ensayo MTT, que determinan la actividad mitocondrial y nos permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular tras la exposición a las nanopartículas, en la línea celular neoplásica RPMI 8226. En la Figura 4.22, se muestra la viabilidad celular en porcentaje, donde cada punto representa la media de 3 réplicas \pm desviación estándar de la media, en donde se comparan el comportamiento de las nanopartículas de titania dopada con 15% mol de ceria frente a Daunorrubicina. En este tipo de estudios se considera que los tratamientos no son tóxicos cuando la viabilidad celular es del 80% o superior.

Como se puede apreciar en la figura, en el caso del complejo DNR-TiCe15 disminuye la viabilidad celular de un modo dosis-dependiente. Con respecto a los tiempos de incubación y concentración de DNR, se observa al emplear concentraciones a partir de 400nM DNR unida a las nanopartículas se logró una mayor eficiencia citotóxica, incluso por debajo de la DL50. Mientras que, para la misma concentración de DNR libre la DL50 se alcanzó a partir de concentraciones de 800nM. Esto puede atribuirse, de acuerdo con Li y col. [21] y Zhang y col. [125], a que las nanopartículas al internalizarse en las células –vía endocitosis– logran transportar una mayor carga terapéutica efectiva potenciando el efecto quimioterapéutico de la DNR, viéndose reflejado en un menor porcentaje de viabilidad en la prueba MTT. En contraste con los resultados que se han reportado al emplear nanopartículas de titania pura como portadoras de DNR, las nanopartículas dopadas con CeO₂ mostraron un mayor efecto citotóxico, que se puede atribuir al mejor rendimiento de carga logrado frente a lo reportado para titania pura.

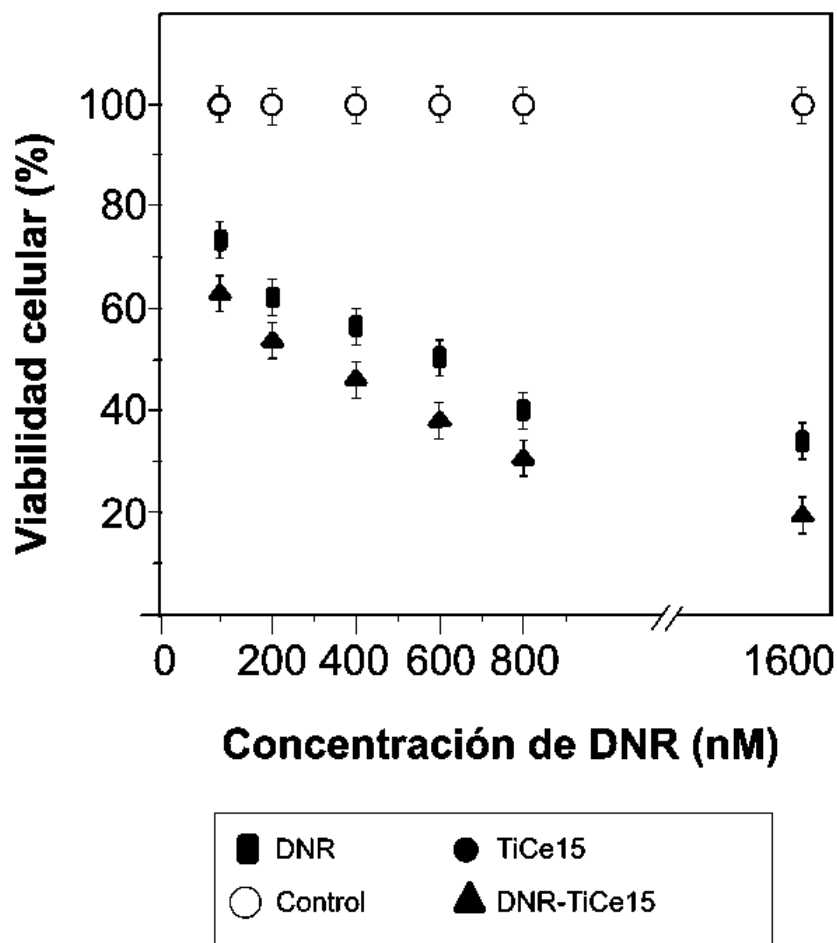


Figura 4.22. Viabilidad celular de la línea RPMI 8226 tras 48h de incubación con el complejo DNR-TiCe15 a diferentes concentraciones de DNR (200, 400, 600, 800 y 1600 nM).

Con respecto a los tiempos de incubación, hubo una reducción gradual del número de células viables con el aumento del tiempo de exposición (Figura 4.23). De acuerdo con la farmacocinética de la DNR, su vida media de eliminación terminal es de 18.5hr. La línea celular RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™) se caracteriza por un crecimiento lento, es decir el tiempo de duplicación necesario para que la población duplique el número de sus células suele prolongarse más allá de las 48hrs. Por lo tanto, el efecto citotóxico de la DNR no se verá reflejado sino hasta transcurrido un ciclo de división celular, periodo tras el cual el antineoplásico habría sido eliminado de las células.

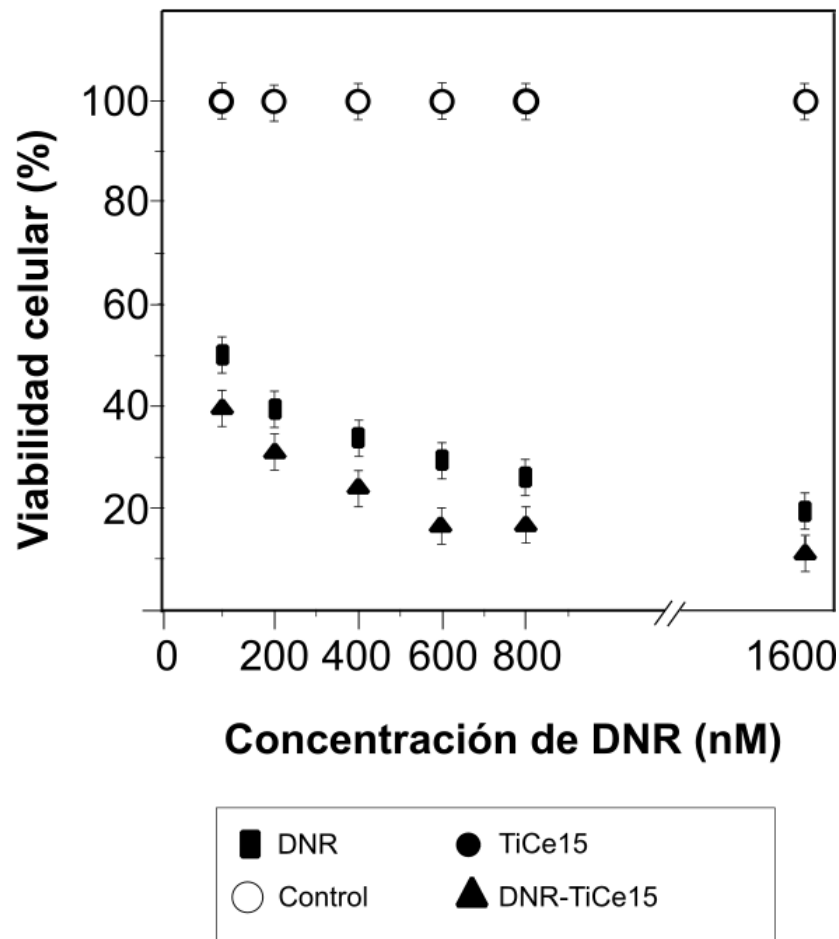


Figura 4.23. Viabilidad celular de la línea RPMI 8226 tras 96h de incubación con el complejo DNR-TiCe15 a diferentes concentraciones de DNR (200, 400, 600, 800 y 1600 nM).

Tomando en cuenta que, el porcentaje de células que sobrevivieron tras las 48hrs de exposición a los tratamientos es relativamente bajo, sobre todo con dosis altas de DNR y DNR-NPs, y que esas células quedaron dispersas en el medio de cultivo, esto podría dificultar la comunicación con otras células para el intercambio de factores de crecimiento y los receptores para esos mismos factores producidos por las células y así perpetuar su proliferación descontrolada. De manera que, el intercambio de dichos factores se dará a través de una comunicación autocrina y paracrina, que en la mayoría de los casos no es suficiente. La falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean, pueden activar los procesos de apoptosis –inducción negativa– [207].

Entre los factores de crecimiento que estimulan la división celular en linfocitos B y cuya insuficiencia puede desencadenar la muerte celular por apoptosis se encuentra el BAFF (factor activador de linfocitos B perteneciente a la familia TNF), también conocido como BLyS, THANK, TALL-1 o zTNF4 [208]. Por lo que, consideramos que la pérdida de viabilidad celular, al cabo de 96hr de la exposición a los tratamientos, está asociada con la falta de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células tumorales RPMI y no efectos inducidos por el nanofármaco o la DNR libre.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de las nanopartículas libres del fármaco sobre la viabilidad celular. Con respecto a esto hay que puntualizar que en la mayoría de los estudios realizados *in vitro e in vivo*, se ha observado que la respuesta celular se encuentra afectada de una manera dependiente a la concentración de las NPs y tiempo de exposición empleados en un determinado ensayo [209]. Los resultados obtenidos se contrastaron El análisis de la citotoxicidad después de la incubación de las células RPMI con las NPs libres de fármaco a las concentraciones ensayadas (100, 200, 400, 600, 800 y 1600 nM), no indicó cambios en la viabilidad celular después de 48 y 96 h de tratamiento. Por lo que, en este caso las NPs de TiO₂ dopadas con CeO₂ demostraron ser biocompatibles y no afectan la viabilidad celular.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. El método sol-gel asistido por una microemulsión de micelas, fue determinante en la síntesis de nanopartículas de morfología esferoidal, altas superficies específicas (120-236 m^2/g) y facilidad de funcionalización, como lo indica los análisis por TEM y BET. El análisis de cuantificación de fases por el método de Rietveld y XRF, indican que la composición de las muestras sintetizadas corresponden a los porcentajes molares de titania-ceria formulados para este estudio, confirmando que el método asistido propuesto favorece además la incorporación de los átomos de cerio en la red de la titania.
2. Asimismo, de acuerdo con el análisis de DRX indican que, para todas composiciones estudiadas, las muestras presentan únicamente la fase tetragonal (grupo espacial I41/amd de anatasa), los resultados también indican una disminución en el tamaño de cristalito y un aumento en sus parámetros de red acompañados de microtensiones en la estructura cristalina, como resultado de la incorporación de la ceria en la red de la titania.
3. A partir del análisis OSL, es posible concluir que la principal luminiscencia emitida por los óxidos mixtos TiCe, está dada por los centros vacantes del oxígeno e introducidos por la presencia de las impurezas. En este caso, la impureza es el átomo de cerio que posee el cristal, el cual está presente
4. Por su parte, las técnicas espectroscópicas de FT-IR y Raman indican la formación del enlace Ti-O-Ce, hecho que junto a los resultados del análisis por DRX, corrobora el dopaje de la titania con los diferentes porcentajes de ceria propuestos.
5. De acuerdo con los resultados obtenidos por las diferentes técnicas de caracterización, las nanopartículas que presentan las mejores características de morfología y elevada área superficial para aplicaciones en sistemas de liberación gradual de agentes terapéuticos son las nanopartículas de titania dopadas con 15% de ceria (TiCe15), respecto a las nanopartículas de titania pura y dopadas con 5 y 10% mol de ceria.

6. Los análisis de FT-IR y Raman confirmaron la unión de daunorrubicina a ambos tipos de nanopartículas por enlace covalente, formado entre el átomo de oxígeno de los grupos funcionales $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $\nu(\text{C}-\text{O})$ de las funciones ceto-fenolato de la molécula del fármaco y el átomo metálico de las nanopartículas.
7. El dopaje de la titania con ceria mejoró la eficiencia de carga de DNR en comparación con titania pura. Lo anterior se debe a que con el dopaje logró incrementar sustancialmente el área de superficie específica, y dio lugar a un aumento significativo en la eficiencia de encapsulación y de carga de daunorrubicina en las nanopartículas dopadas con ceria.
8. Los ensayos de liberación empleando TiCe15 mostraron buenos tiempos de retención y liberación de DNR, debido a sus propiedades de mayor retención de carga bajo condiciones alcalinas que simulan el pH de la sangre y mayor tasa de liberación controlada de DNR en condiciones tumorales simuladas.
9. Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* utilizando en la línea celular neoplásica RPMI 8226, demostraron que el efecto quimioterapéutico de dosis equivalentes de DNR fue mayor cuando se administró el fármaco unido a la superficie de las nanopartículas. De manera similar, al comparar los resultados de las pruebas con nanopartículas libres de fármaco, para dosis equivalentes de nanopartículas funcionalizadas (y el control negativo), no presentaron efectos citotóxicos sobre la línea celular de estudio.
10. Los resultados del ensayo de viabilidad indicaron que las nanopartículas de titania dopadas con ceria son biocompatibles y son una alternativa prometedora en la administración de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades, específicamente como nanotransportadores de DNR en tratamiento del cáncer

5.1. RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

Los resultados obtenidos, han puesto de manifiesto que la ruta de síntesis propuesta para la obtención y dopaje con ceria de nanopartículas de titania con potencial uso en nanomedicina, es factible dadas las características morfológicas y de área superficial logradas, que permitieron mejoras considerables en su capacidad de carga y encapsulamiento de DNR respecto a titania pura. Por lo que, se propone llevar a cabo los procesos de síntesis y dopaje de la titania con otro tipo de óxidos de tierras para verificar si logran resultados igual de favorables.

Asimismo, se propone realizar la funcionalización de las nanopartículas con otro tipo de agentes quimioterapéuticos, bactericidas y/o analgésicos, determinar las eficiencias de carga y encapsulamiento, así como los ensayos de liberación *in vivo* y pruebas de citotoxicidad, con el objetivo de expandir su campo de aplicación.

Se propone además, la funcionalización de las nanopartículas de titania pura con DNR con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos a partir de las pruebas de viabilidad celular con nanopartículas de titania dopadas con ceria.

Por último, el análisis de las propiedades de luminiscencia ópticamente estimuladas (OSL) sugiere que las nanopartículas dopadas con ceria se pueden llegar a incorporar en otros campos de la medicina, tales como en el desarrollo de sistemas de análisis y de imagen para la detección de enfermedades o el mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles. Además, pueden llevar al desarrollo de una nueva terapia de nanopartículas conjugadas, en la que las características optoelectrónicas del semiconductor $\text{CeO}_2\text{-TiO}_2$ y el comportamiento probado de las nanopartículas como SAF se pueden aplicar simultáneamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bartolomé, F., Damborenea, J. D., García Fierro, J. L., Figueras, A., González de la Campa, J., Hernando, A., Zaldo, C. (2007). Nuevos materiales en la sociedad del siglo XXI. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España).
- [2] Zaroni, J. R. (2006). ¿Qué pueden hacer las políticas energéticas por la integración?. Nueva sociedad, 204, 176-185.
- [3] López, A. G. (2017). Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. Revista Repertorio de Medicina y Cirugía, 26(3), 129-130.
- [4] Gordijn, B. (2005). Nanoethics: from utopian dreams and apocalyptic nightmares towards a more balanced view. Science and engineering ethics, 11(4), 521-533.
- [5] Gregori, M., Masserini, M., Mancini, S. (2015). Nanomedicine for the treatment of Alzheimer's disease. Nanomedicine, 10(7), 1203-1218.
- [6] James, K., Highsmith, J., Evers, P. (2014). Nanotechnology market–nanotechnology markets in healthcare & medicine. Drug Dev Deliv, 11(12), 43-45.
- [7] Theeuwes, F. (1975). Elementary osmotic pump. Journal of pharmaceutical sciences, 64(12), 1987-1991.
- [8] Fassihi, R. A., Ritschel, W. A. (1993). Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: *In vitro* and *In vivo* evaluation. Journal of pharmaceutical sciences, 82(7), 750-754.
- [9] Lechuga, L.M. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. In Biotecnología aplicada a la salud humana, S.L. Edikamed, ed., pp. 98-112.
- [10] Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. Journal of controlled release, 200, 138-157.
- [11] Shapira, A., Livney, Y. D., Broxterman, H. J., Assaraf, Y. G. (2011). Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. Drug resistance updates, 14(3), 150-163.
- [12] Liu, Y., Miyoshi, H., Nakamura, M. (2007). Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. International journal of cancer, 120(12), 2527-2537.

- [13] Sumer, Baran, and Jinming Gao. "Theranostic nanomedicine for cancer." (2008): 137-140.
- [14] Hare, J. I., Lammers, T., Ashford, M. B., Puri, S., Storm, G., Barry, S. T. (2017). Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 108, 25-38.
- [15] Leopoldo, V. R. (2010). *Nanotecnología Farmacéutica*. Farmacia, Ciencias biológicas, 1era Revista Americana, DF., México, 15-19.
- [16] Hu, C. M. J., Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1104-1111.
- [17] Masuda, Y., Seo, W. S. and Koumoto, K. (2004). Deposition mechanism of anatase TiO₂ from an aqueous solution and its site-selective deposition. *Solid State Ionics*, 172(1-4), pp.283-288.
- [18] Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohlleben, W., Van Ravenzwaay, B. (2008). Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of toxicology*, 82(3), 151-157.
- [19] Sahoo, S. K., Misra, R., Parveen, S. (2017). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. In *Nanomedicine in Cancer* (pp. 73-124). Pan Stanford.
- [20] Treccani, L., Klein, T. Y., Meder, F., Pardun, K., Rezwan, K. (2013). Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7115-7150.
- [21] Li, Q., Wang, X., Lu, X., Tian, H., Jiang, H., Lv, G. Chen, B. (2009). The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of titanium dioxide whiskers. *Biomaterials*, 30(27), 4708-4715.
- [22] Qin, Y., Sun, L., Li, X., Cao, Q., Wang, H., Tang, X., Ye, L. (2011). Highly water-dispersible TiO₂ nanoparticles for doxorubicin delivery: effect of loading mode on therapeutic efficacy. *Journal of Materials Chemistry*, 21(44), 18003-18010.
- [23] Borm, P. J., Kreyling, W. (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles—potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 4(5), 521-531.

- [24] Venkatasubbu, G. D., Ramasamy, S., Ramakrishnan, V., Kumar, J. (2013). Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Advanced Powder Technology*, 24(6), 947-954.
- [25] Zhang, H., Wang, L., Xiong, H., Hu, L., Yang, B. and Li, W. (2003). Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals. *Advanced Materials*, 15(20), pp.1712-1715.
- [26] Guel, M. L. A., Jiménez, L. D., Hernández, D. C. (2013). Materiales nanoestructurados cerámicos como vehículo para la liberación de principios activos. *Avances en Química*, 8(3), 171-177.
- [27] Townley, H. E., Rapa, E., Wakefield, G. and Dobson, P. J. (2012). Nanoparticle augmented radiation treatment decreases cancer cell proliferation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), pp.526-536.
- [28] Townley, H. E., Kim, J. and Dobson, P. J., 2012. *In vivo* demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale*, 4(16), pp.5043-5050.
- [29] Jeynes, J. C. G., Jeynes, C., Palitsin, V. and Townley, H. E. (2016). Direct quantification of rare earth doped titania nanoparticles in individual human cells. *Nanotechnology*, 27(28), pp.285103.
- [30] Xiao, J., Peng, T., Li, R., Peng, Z. and Yan, C. (2006). Preparation, phase transformation and photocatalytic activities of cerium-doped mesoporous titania nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*, 179(4), pp.1161-1170.
- [31] Chaisuk, C., Wehatoranawee, A., Preampiyawat, S., Netiphat, S., Shotipruk, A. and Mekasuwandumrong, O. (2011). Preparation and characterization of CeO₂/TiO₂ nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Ceramics International*, 37(5), pp.1459-1463.
- [32] Nasir, M., Bagwasi, S., Jiao, Y., Chen, F., Tian, B. and Zhang, J. (2014). Characterization and activity of the Ce and N co-doped TiO₂ prepared through hydrothermal method. *Chemical Engineering Journal*, 236, pp.388-397.
- [33] Lee, Y., Lee, H., Kim, Y. B., Kim, J., Hyeon, T., Park, H., Park, T. G. (2008). Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Advanced Materials*, 20(21), 4154-4157.
- [34] Bouzigues, C., Gacoin, T. and Alexandrou, A. (2011). Biological applications of rare-earth based nanoparticles. *ACS nano*, 5(11), pp.8488-8505.

- [35] Takeuchi, N., Ramos, M. E. (2011). Divulgación y formación en nanotecnología en México. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 4(2).
- [36] Arias, F. G. (2012). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica*. 6ta. Fidas G. Arias Odón.
- [37] Puzder, A., Williamson, A. J., Reboredo, F. A., Galli, G. (2003). Structural stability and optical properties of nanomaterials with reconstructed surfaces. *Physical review letters*, 91(15), 157405.
- [38] Záyago-Lau, E., Foladori, G. (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*, 10(32), 143-178.
- [39] Cornejo, L. (2015). *Nuevas Tecnologías y Materiales*. Obtenido de *Nuevas tecnologías y Materiales: Clasificación de los nanomateriales* [en línea]. Disponible en: <http://nuevastecnoogiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales> [Consultado 14 de febrero de 2019]
- [40] *El mundo de la nanotecnología situación y prospectiva para México*. ProMéxico de 2018, Unidad de Inteligencia de Negocios.
- [41] M. Roco. *Nanotechnology's Future* [en línea]. Disponible en: <https://www.scientificamerican.com/article/nanotechnologys-future/> [Consultado 14 de febrero de 2019]
- [42] *StatNano Releases Its Third Annual Statistical Report on Nanotechnology* [en línea]. Disponible en: <http://statnano.com> [Consultado 12 de diciembre de 2018]
- [43] *BCC Research: The Maturing Nanotechnology Market* [en línea]. Disponible en: <https://www.bccresearch.com/> [Consultado 01 de marzo de 2019]
- [44] *World Cancer Day 2018* [en línea]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14047:world-cancer-day-2018-general-information&Itemid=42322&lang=en [Consultado 20 de Febrero de 2019]
- [45] Lollo, G., Rodríguez, G. R., Torres, D., Alonso, M. J. (2011). Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 77(4).

- [46] Steichen, S. D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N. A. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European journal of pharmaceutical sciences*, 48(3), 416-427.
- [47] Key, J., Leary, J. F. (2014). Nanoparticles for multimodal *in vivo* imaging in nanomedicine. *International journal of nanomedicine*, 9, 711.
- [48] Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release*, 200, 138-157.
- Colilla, M., Izquierdo-Barba, I., Vallet-Regí, M. (2008). Novel biomaterials for drug delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 18(6), 639-656.
- [49] Folkman, J. (1990). How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research. *Biomaterials*, 11(9), 615-618.
- [50] Armaly, M. F., Rao, K. R. (1973). The effect of pilocarpine Ocusert with different release rates on ocular pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 12(7), 491-496.
- [51] Chang, T. M., MacIntosh, F. C., Mason, S. G. (1966). Semipermeable aqueous microcapsules: I. Preparation and properties. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 44(1), 115-128.
- [52] Langer, R., Folkman, J. (1976). Polímeros para la liberación sostenida de proteínas y otras macromoléculas. *Nature*, 263(5580), 797.
- [53] Colilla, M., Manzano, M., Vallet-Regí, M. (2008). Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 3(4), 403.
- [54] Langer, R. S., Peppas, N. A. (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2(4), 201-214.
- [55] Tibbitt, M. W., Dahlman, J. E., Langer, R. (2016). Emerging frontiers in drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 138(3), 704-717.
- [56] Manzano, M., Colilla, M., Vallet-Regí, M. (2009). Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(12), 1383-1400.
- [57] Tong, R., Tang, L., Ma, L., Tu, C., Baumgartner, R., Cheng, J. (2014). Smart chemistry in polymeric nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 43(20), 6982-7012.

- [58] Daniel, M. C., Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 104(1), 293-346.
- [59] Taylor-Pashow, K. M., Della Rocca, J., Huxford, R. C., Lin, W. (2010). Hybrid nanomaterials for biomedical applications. *Chemical Communications*, 46(32), 5832-5849.
- [60] Dendrons as New Non-viral Oligonucleotide Delivery Carriers. *Chemistry–A European Journal*, 21(44), 15651-15666.
- [61] Sailor, M. J., Park, J. H. (2012). Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Advanced materials*, 24(28), 3779-3802.
- [62] Fang, J. Y., Al-Suwayeh, S. A. (2012). Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs. *Expert opinion on drug delivery*, 9(6), 657-669.
- [63] Duncan, R. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature reviews cancer*, 6(9), 688.
- [64] Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010.
- [65] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., Fadeel, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(3), 361-373.
- [66] Fu, C., Liu, T., Li, L., Liu, H., Chen, D., Tang, F. (2013). The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials*, 34(10), 2565-2575.
- [67] Vila, M., Portolés, M. T., Marques, P. A. A. P., Feito, M. J., Matesanz, M. C., Ramírez-Santillán, C., Vallet-Regi, M. (2012). Cell uptake survey of pegylated nanographene oxide. *Nanotechnology*, 23(46), 465103.
- [68] Li, J., Gupta, S., Li, C. (2013). Research perspectives: gold nanoparticles in cancer theranostics. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 3(6), 284.
- [69] Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Schlag, P. M. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The lancet oncology*, 3(8), 487-497.

- [70] Le Renard, PE, Buchegger, F., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Doelker, E. y Jordan, O. (2014). Formulaciones para el tratamiento local de hipertermia mediada magnéticamente de tumores sólidos. *Nanotechnology Research Journal*, 7 (1), 1.
- [71] Gneveckow, U., Jordan, A., Scholz, R., Brüß, V., Waldöfner, N., Ricke, J., Wust, P. (2004). Description and characterization of the novel hyperthermia-and thermoablation-system for clinical magnetic fluid hyperthermia. *Medical physics*, 31(6), 1444-1451.
- [72] Kastner, E. J., Reeves, R., Bennett, W., Misra, A., Petryk, J. D., Petryk, A. A., Hoopes, P. J. (2015, March). Alternating magnetic field optimization for IONP hyperthermia cancer treatment. In *Energy-based Treatment of Tissue and Assessment VIII* (Vol. 9326, p. 93260M). International Society for Optics and Photonics.
- [73] Kobayashi, T. (2011). Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnology journal*, 6(11), 1342-1347.
- [74] Gil, P. R., Hühn, D., Loretta, L., Sasse, D., Parak, W. J. (2010). Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological research*, 62(2), 115-125.
- [75] Martín-Saavedra, F. M., Ruíz-Hernández, E., Boré, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., Vilaboa, N. (2010). Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(12), 4522-4531.
- [76] Wang, Y., Gu, H. (2015). Core–Shell-Type Magnetic Mesoporous Silica Nanocomposites for Bioimaging and Therapeutic Agent Delivery. *Advanced materials*, 27(3), 576-585.
- [77] Knežević, N. Ž., Ruiz-Hernández, E., Hennink, W. E., Vallet-Regí, M. (2013). Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications. *Rsc Advances*, 3(25), 9584-9593.
- [78] Maeda, H., Bharate, G. Y., Daruwalla, J. (2009). Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), 409-419.
- [79] Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H. (2011). The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 136-151.
- [80] Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 131-135.

- [81] Danhier, F., Feron, O., Pr at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release*, 148(2), 135-146.
- [82] Danhier, F., Feron, O., Pr at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release*, 148(2), 135-146.
- [83] Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751.
- [84] Vila-Jato, J. L. (2009). *Nanotecnolog a Farmac utica: Realidades y posibilidades farmacoterap uticas*. Monograf as, Madrid, Espa a. Real Academia Nacional de Farmacia, 409.
- [85] Byrne, J. D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1615-1626.
- [86] Wang, M., Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological research*, 62(2), 90-99.
- [87] Oyarzun-Ampuero, F. A., Goycoolea, F. M., Torres, D., Alonso, M. J. (2011). A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 54-57.
- [88] Oyarzun-Ampuero, F. A., Goycoolea, F. M., Torres, D., Alonso, M. J. (2011). A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 54-57
- [89] Mizrahy, S., Raz, S. R., Hasgaard, M., Liu, H., Soffer-Tsur, N., Cohen, K., Peer, D. (2011). Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *Journal of controlled release*, 156(2), 231-238.
- [90] Dai, J., Yang, J., Wang, X., Zhang, L., Li, Y. (2015). Enhanced visible-light photocatalytic activity for selective oxidation of amines into imines over TiO₂ (B)/anatase mixed-phase nanowires. *Applied Surface Science*, 349, 343-352.

- [91] Fujishima, A., Rao, T. N., Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry reviews*, 1(1), 1-21.
- [92] Thompson, T. L., Yates, J. T. (2006). Surface science studies of the photoactivation of TiO₂ new photochemical processes. *Chemical Reviews*, 106(10), 4428-4453.
- [93] Diebold, U. (2003). The surface science of titanium dioxide. *Surface science reports*, 48(5-8), 53-229.
- [94] Ganduglia-Pirovano, M. V., Hofmann, A., Sauer, J. (2007). Oxygen vacancies in transition metal and rare earth oxides: Current state of understanding and remaining challenges. *Surface science reports*, 62(6), 219-270.
- [95] Anpo, M. (1997). Photocatalysis on titanium oxide catalysts: approaches in achieving highly efficient reactions and realizing the use of visible light. *Catalysis Surveys from Asia*, 1(2), 169-179.
- [96] Yang, N., Li, N., Wang, L., Li, B. (2007). Thermal rectification and negative differential thermal resistance in lattices with mass gradient. *Physical Review B*, 76(2), 020301.
- [97] Das, C., Roy, P., Yang, M., Jha, H., Schmuki, P. (2011). Nb doped TiO₂ nanotubes for enhanced photoelectrochemical water-splitting. *Nanoscale*, 3(8), 3094-3096.
- [98] Yoshitake, H., Sugihara, T., Tatsumi, T. (2002). Preparation of wormhole-like mesoporous TiO₂ with an extremely large surface area and stabilization of its surface by chemical vapor deposition. *Chemistry of Materials*, 14(3), 1023-1029.
- [99] Han, S., Choi, S. H., Kim, S. S., Cho, M., Jang, B., Kim, D. Y., Hyeon, T. (2005). Low-Temperature Synthesis of Highly Crystalline TiO₂ Nanocrystals and their Application to Photocatalysis. *Small*, 1(8-9), 812-816.
- [100] Wang, X., Yu, J. C., Ho, C., Hou, Y., Fu, X. (2005). Photocatalytic activity of a hierarchically macro/mesoporous titania. *Langmuir*, 21(6), 2552-2559.
- [101] Smarsly, B., Grosso, D., Brezesinski, T., Pinna, N., Boissière, C., Antonietti, M., Sanchez, C. (2004). Highly crystalline cubic mesoporous TiO₂ with 10-nm pore diameter made with a new block copolymer template. *Chemistry of materials*, 16(15), 2948-2952.
- [102] Corma, A. (1997). From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis. *Chemical reviews*, 97(6), 2373-2420.
- [103] Arami, H., Mazloumi, M., Khalifehzadeh, R., Sadrnezhad, S. K. (2007). Sonochemical preparation of TiO₂ nanoparticles. *Materials Letters*, 61(23-24), 4559-4561.

- [104] Liu, Y., Li, Y., Xie, L., Zheng, J., Li, X. (2008). Sonochemical synthesis and photocatalytic activity of meso- and macro-porous TiO₂ for oxidation of toluene. *Journal of hazardous materials*, 150(1), 153-157.
- [105] Tian, B., Chen, F., Zhang, J., Anpo, M. (2006). Influences of acids and salts on the crystalline phase and morphology of TiO₂ prepared under ultrasound irradiation. *Journal of colloid and interface science*, 303(1), 142-148.
- [106] Brus, L. (1986). Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(12), 2555-2560.
- [107] Galeano, L., Navío, J. A., Restrepo, G. M., Marín, J. M. (2013). Preparación de sistemas óxido de titanio/óxido de silicio (TiO₂/SiO₂) mediante el método solvotérmico para aplicaciones en fotocatalisis. *Información tecnológica*, 24(5), 81-92.
- [108] Maira, A. J., Yeung, K. L., Lee, C. Y., Yue, P. L., Chan, C. K. (2000). Size effects in gas-phase photo-oxidation of trichloroethylene using nanometer-sized TiO₂ catalysts. *Journal of Catalysis*, 192(1), 185-196.
- [109] Betancur Henao, C. P., Hernández Montes, V., Buitrago Sierra, R. (2017). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4), 366-381.
- [110] Chen, X., Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical reviews*, 107(7), 2891-2959.
- [111] Chen, X., Mao, S. S. (2006). Synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(4), 906-925.
- [112] Pencheva, D., Bryaskova, R., Kantardjiev, T. (2012). Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 32(7), 2048-2051.
- [113] Malato, S., Blanco, J., Alarcón, D. C., Maldonado, M. I., Fernandez-Ibanez, P., Gernjak, W. (2007). Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catalysis Today*, 122(1-2), 137-149.
- [114] Ashkarran, A. A., Hamidinezhad, H., Haddadi, H., Mahmoudi, M. (2014). Double-doped TiO₂ nanoparticles as an efficient visible-light-active photocatalyst and antibacterial agent under solar simulated light. *Applied Surface Science*, 301, 338-345.

- [115] Menard, A., Drobne, D., Jemec, A. (2011). Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environmental Pollution*, 159(3), 677-684.
- [116] Treccani, L., Klein, T. Y., Meder, F., Pardun, K., Rezwan, K. (2013). Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7115-7150.
- [117] Rajh, T., Nedeljkovic, J. M., Chen, L. X., Poluektov, O., Thurnauer, M. C. (1999). Improving optical and charge separation properties of nanocrystalline TiO₂ by surface modification with vitamin C. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(18), 3515-3519.
- [118] Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J., Mousa, S. A. (2008). Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(4), 273-282.
- [119] Lopez, T., Sotelo, J., Navarrete, J., Ascencio, J. A. (2006). Synthesis of TiO₂ nanostructured reservoir with temozolomide: Structural evolution of the occluded drug. *Optical Materials*, 29(1), 88-94.
- [120] Zhang, H., Wang, L. P., Xiong, H., Hu, L., Yang, B., Li, W. (2003). Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals. *Advanced Materials*, 15(20), 1712-1715.
- [121] Wang, P., Ueno, K., Takigawa, H., Kobiro, K. (2013). Versatility of one-pot, single-step synthetic approach for spherical porous (metal) oxide nanoparticles using supercritical alcohols. *The Journal of Supercritical Fluids*, 78, 124-131.
- [122] Liu, E., Zhou, Y., Liu, Z., Li, J., Zhang, D., Chen, J., Cai, Z. (2015). Cisplatin loaded hyaluronic acid modified TiO₂ nanoparticles for neoadjuvant chemotherapy of ovarian cancer. *Journal of Nanomaterials*, 16(1), 275.
- [123] Choi, K. Y., Chung, H., Min, K. H., Yoon, H. Y., Kim, K., Park, J. H., Jeong, S. Y. (2010). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*, 31(1), 106-114.
- [124] Lee, Y., Lee, H., Kim, Y. B., Kim, J., Hyeon, T., Park, H., Park, T. G. (2008). Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Advanced Materials*, 20(21), 4154-4157.
- [125] Zhang, H., Wang, C., Chen, B., Wang, X. (2012). Daunorubicin-TiO₂ nanocomposites as a "smart" pH-responsive drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 235.

- [126] Avril, L., Bourgeois, S., de Lucas, M. M., Domenichini, B., Simon, P., Addou, F., Imhoff, L. (2015). Thermal stability of Au–TiO₂ nanocomposite films prepared by direct liquid injection CVD. *Vacuum*, 122, 314-320.
- [127] Piszczek, P., Muchewicz, Ż., Radtke, A., Gryglas, M., Dahm, H., Różycki, H. (2013). CVD of TiO₂ and TiO₂/Ag antimicrobial layers: Deposition from the hexanuclear μ -oxo Ti (IV) complex as a precursor, and the characterization. *Surface and Coatings Technology*, 222, 38-43.
- [128] Lee, H., Song, M. Y., Jurng, J., Park, Y. K. (2011). The synthesis and coating process of TiO₂ nanoparticles using CVD process. *Powder Technology*, 214(1), 64-68.
- [129] Mahmoud, M. H. H., Ismail, A. A., Sanad, M. M. S. (2012). Developing a cost-effective synthesis of active iron oxide doped titania photocatalysts loaded with palladium, platinum or silver nanoparticles. *Chemical engineering journal*, 187, 96-103.
- [130] Li, C., Yoshimura, M., Hotsuki, N., Isobe, T., Wang, C. A., Matsushita, S., Nakajima, A. (2015). Processing of porous spherical Co-doped SiO₂/Cu-grafted TiO₂ hybrid particles for the decomposition of gaseous acetaldehyde in the dark and under visible light. *Materials Letters*, 139, 397-400.
- [131] Mori, K., Maki, K., Kawasaki, S., Yuan, S., y Yamashita, H. (2008). Síntesis hidrotérmica de fotocatalizadores de TiO₂ en presencia de NH₄F y su aplicación para la degradación de compuestos orgánicos. *Ciencia de la ingeniería química*, 63 (20), 5066-5070.
- [132] Ahn, J. H., Wang, G., Kim, Y. J., Lee, H. M., Shin, H. S. (2010). Synthesis and properties of Ti–O based nanowires. *Journal of Alloys and Compounds*, 504, S361-S363.
- [133] Veréb, G., Manczinger, L., Oszkó, A., Sienkiewicz, A., Forró, L., Mogyorósi, K., Hernádi, K. (2013). Highly efficient bacteria inactivation and phenol degradation by visible light irradiated iodine doped TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*, 129, 194-201.
- [134] Zielińska, A., Kowalska, E., Sobczak, J. W., Łacka, I., Gazda, M., Ohtani, B., Zaleska, A. (2010). Silver-doped TiO₂ prepared by microemulsion method: Surface properties, bio- and photoactivity. *Separation and Purification Technology*, 72(3), 309-318.
- [135] Janković, B., Marinović-Cincović, M., Dramićanin, M. (2015). Kinetic study of isothermal crystallization process of Gd₂Ti₂O₇ precursor's powder prepared through the Pechini synthetic approach. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 85, 160-172.

- [136] Takamura, H., Enomoto, K., Kamegawa, A., Okada, M. (2002). Electrical conductivity of layered compounds in SrO–La₂O₃–TiO₂ systems prepared by the Pechini process. *Solid State Ionics*, 154, 581-588.
- [137] Guglielmi, M. (2014). Estrategias de síntesis para la preparación de nanocompuestos de sol-gel. En *Sol-Gel Nanocomposites* (pp. 51-82). Springer, Nueva York, NY.
- [138] Chen, X., Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical reviews*, 107(7), 2891-2959.
- [139] Bagwe, R. P., Yang, C., Hilliard, L. R., Tan, W. (2004). Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. *Langmuir*, 20(19), 8336-8342.
- [140] Jin, Y., Lohstreter, S., Pierce, D. T., Parisien, J., Wu, M., Hall III, C., Zhao, J. X. (2008). Silica nanoparticles with continuously tunable sizes: synthesis and size effects on cellular contrast imaging. *Chemistry of Materials*, 20(13), 4411-4419.
- [141] Yin, Y., Alivisatos, A. P. (2004). Colloidal nanocrystal synthesis and the organic–inorganic interface. *Nature*, 437(7059), 664.
- [142] Nasi, R., Esposito, S., Freyria, F. S., Armandi, M., Gadhi, T. A., Hernandez, S., Bonelli, B. (2019). Application of Reverse Micelle Sol–Gel Synthesis for Bulk Doping and Heteroatoms Surface Enrichment in Mo-Doped TiO₂ Nanoparticles. *Materials*, 12(6), 937.
- [143] Sood, S., Umar, A., Mehta, S. K., Kansal, S. K. (2015). Highly effective Fe-doped TiO₂ nanoparticles photocatalysts for visible-light driven photocatalytic degradation of toxic organic compounds. *Journal of colloid and interface science*, 450, 213-223.
- [144] Lei, X. F., Xue, X. X., Yang, H. (2014). Preparation and characterization of Ag-doped TiO₂ nanomaterials and their photocatalytic reduction of Cr (VI) under visible light. *Applied Surface Science*, 321, 396-403.
- [145] Malika, M., Rao, C. V., Das, R. K., Giri, A. S., Golder, A. K. (2016). Evaluation of bimetal doped TiO₂ in dye fragmentation and its comparison to mono-metal doped and bare catalysts. *Applied Surface Science*, 368, 316-324.
- [146] Garza-Arévalo, J. I., García-Montes, I., Reyes, M. H., Guzmán-Mar, J. L., Rodríguez-González, V., Reyes, L. H. (2016). Fe doped TiO₂ photocatalyst for the removal of As (III) under visible radiation and its potential application on the treatment of As-contaminated groundwater. *Materials Research Bulletin*, 73, 145-152.

- [147] Momeni, M. M., Ghayeb, Y., Ghonchehi, Z. (2015). Fabrication and characterization of copper doped TiO₂ nanotube arrays by in situ electrochemical method as efficient visible-light photocatalyst. *Ceramics International*, 41(7), 8735-8741.
- [148] Menéndez-Flores, V. M., Ohno, T. (2014). High visible-light active Ir-doped-TiO₂ brookite photocatalyst synthesized by hydrothermal microwave-assisted process. *Catalysis today*, 230, 214-220.
- [149] Zhang, P., Li, X., Wu, X., Zhao, T., Wen, L. (2016). Influence of In³⁺-doping and Ag⁰-depositing on the visible-light-induced photocatalytic activity of TiO₂. *Journal of Alloys and Compounds*, 673, 405-410.
- [150] Yadav, H. M., Otari, S. V., Koli, V. B., Mali, S. S., Hong, C. K., Pawar, S. H., Delekar, S. D. (2014). Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO₂ nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 280, 32-38.
- [151] Yadav, H. M., Otari, S. V., Bohara, R. A., Mali, S. S., Pawar, S. H., Delekar, S. D. (2014). Synthesis and visible light photocatalytic antibacterial activity of nickel-doped TiO₂ nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 294, 130-136.
- [152] Moradi, H., Eshaghi, A., Hosseini, S. R., Ghani, K. (2016). Fabrication of Fe-doped TiO₂ nanoparticles and investigation of photocatalytic decolorization of reactive red 198 under visible light irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 32, 314-319.
- [153] Marschall, R., Wang, L. (2014). Non-metal doping of transition metal oxides for visible-light photocatalysis. *Catalysis Today*, 225, 111-135.
- [154] Li, H., Hao, Y., Lu, H., Liang, L., Wang, Y., Qiu, J., Yao, J. (2015). A systematic study on visible-light N-doped TiO₂ photocatalyst obtained from ethylenediamine by sol-gel method. *Applied Surface Science*, 344, 112-118.
- [155] Yu, W., Liu, X., Pan, L., Li, J., Liu, J., Zhang, J., Sun, Z. (2014). Enhanced visible light photocatalytic degradation of methylene blue by F-doped TiO₂. *Applied Surface Science*, 319, 107-112.
- [156] Shao, P., Tian, J., Zhao, Z., Shi, W., Gao, S., Cui, F. (2015). Amorphous TiO₂ doped with carbon for visible light photodegradation of rhodamine B and 4-chlorophenol. *Applied Surface Science*, 324, 35-43.

- [157] El-Sheikh, S. M., Zhang, G., El-Hosainy, H. M., Ismail, A. A., O'Shea, K. E., Falaras, P., Dionysiou, D. D. (2014). High performance sulfur, nitrogen and carbon doped mesoporous anatase–brookite TiO₂ photocatalyst for the removal of microcystin-LR under visible light irradiation. *Journal of hazardous materials*, 280, 723-733.
- [158] Li, F. T., Wang, X. J., Zhao, Y., Liu, J. X., Hao, Y. J., Liu, R. H., Zhao, D. S. (2014). Ionic-liquid-assisted synthesis of high-visible-light-activated N–B–F-tri-doped mesoporous TiO₂ via a microwave route. *Applied Catalysis B: Environmental*, 144, 442-453.
- [159] Elbanna, O., Zhang, P., Fujitsuka, M., Majima, T. (2016). Facile preparation of nitrogen and fluorine co-doped TiO₂ mesocrystal with visible light photocatalytic activity. *Applied Catalysis B: Environmental*, 192, 80-87.
- [160] Zhu, M., Zhai, C., Qiu, L., Lu, C., Paton, A. S., Du, Y., Goh, M. C. (2015). New method to synthesize S-doped TiO₂ with stable and highly efficient photocatalytic performance under indoor sunlight irradiation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(12), 3123-3129.
- [161] Andersen, J., Han, C., O'Shea, K., Dionysiou, D. D. (2014). Revealing the degradation intermediates and pathways of visible light-induced N-F-TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. *Applied Catalysis B: Environmental*, 154, 259-266.
- [162] Xiang, Q., Yu, J., Jaroniec, M. (2011). Nitrogen and sulfur co-doped TiO₂ nanosheets with exposed {001} facets: synthesis, characterization and visible-light photocatalytic activity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(11), 4853-4861.
- [163] Ranjit, K. T., Willner, I., Bossmann, S. H., Braun, A. M. (2001). Lanthanide oxide-doped titanium dioxide photocatalysts: novel photocatalysts for the enhanced degradation of p-chlorophenoxyacetic acid. *Environmental science & technology*, 35(7), 1544-1549.
- [164] Reszczyńska, J., Grzyb, T., Sobczak, J. W., Lisowski, W., Gazda, M., Ohtani, B., Zaleska, A. (2015). Visible light activity of rare earth metal doped (Er³⁺, Yb³⁺ or Er³⁺/Yb³⁺) titania photocatalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 163, 40-49.
- [165] Hwang, D. W., Lee, J. S., Li, W., Oh, S. H. (2003). Electronic band structure and photocatalytic activity of Ln₂Ti₂O₇ (Ln= La, Pr, Nd). *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(21), 4963-4970.
- [166] Reszczyńska, J., Esteban, D. A., Gazda, M., Zaleska, A. (2014). Pr-doped TiO₂. The effect of metal content on photocatalytic activity. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 50(2), 515-524.

- [167] Thomas, J., Radhika, S., Yoon, M. (2016). Nd³⁺-doped TiO₂ nanoparticles incorporated with heteropoly phosphotungstic acid: A novel solar photocatalyst for degradation of 4-chlorophenol in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 411, 146-156.
- [168] Dongfeng, S. U. N., Kai, W. A. N. G., Zhijian, X. U., Ruixing, L. I. (2015). Synthesis and photocatalytic activity of sulfate modified Nd-doped TiO₂ under visible light irradiation. *Journal of rare earths*, 33(5), 491-497.
- [169] Belver, C., Bedia, J., Álvarez-Montero, M. A., Rodriguez, J. J. (2016). Solar photocatalytic purification of water with Ce-doped TiO₂/clay heterostructures. *Catalysis Today*, 266, 36-45.
- [170] Štengl, V., Bakardjieva, S., Murafa, N. (2009). Preparation and photocatalytic activity of rare earth doped TiO₂ nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 114(1), pp.217-226.
- [171] Fermín, J. R., Salcedo, D. Y., Durante Rincón, C., Castro, J. A. (2017). Análisis de tensión/tamaño en compuestos ternarios AgIn₅VI₈ (VI= S, Se, Te) mediante difracción de Rayos-x. *Revista mexicana de física*, 63(4), 345-350.
- [172] Feijoó, I., Cabeza, M., Merino, P., Pena, G., Pérez, M. C., Cruz, S., Rey, P. (2018). Evaluación del tamaño de cristalito y la micro-deformación durante el proceso de molienda mecánica del material compuesto AA6005A+ 10% nano-TiC. *Materiales Compuestos*, 2(1).
- [173] De Keijser, T. H., Mittemeijer, E. J., Rozendaal, H. C. F. (1983). The determination of crystallite-size and lattice-strain parameters in conjunction with the profile-refinement method for the determination of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, 16(3), 309-316.
- [174] Torres Martínez, L. M., Ruiz Gómez, M. A. (2011). Estudio de las propiedades estructurales, texturales y catalíticas de TiO₂ dopado con indio y níquel. *Ingenierías*, 14(53), 23-34.
- [175] Kubacka, A., Colón, G., Fernández-García, M. (2009). Cationic (V, Mo, Nb, W) doping of TiO₂-anatase: A real alternative for visible light-driven photocatalysts. *Catalysis Today*, 143(3-4), 286-292.
- [176] L. Fuentes, *Introducción al Método de Rietveld* (Sociedad Mexicana de Cristalografía, México, D. F., 2004).

- [177] Paredes, P. S. (1998). Síntesis de la silicalita de titanio TS-2(Vol. 82). Univ de Castilla La Mancha.
- [178] Gontier, S., Tuel, A. (1996). Synthesis of titanium silicalite-1 using amorphous SiO₂ as silicon source. *Zeolites*, 16(2-3), 184-195.
- [179] Larsson, P. O., Andersson, A. (1998). Complete oxidation of CO, ethanol, and ethyl acetate over copper oxide supported on titania and ceria modified titania. *Journal of Catalysis*, 179(1), 72-89.
- [180] Tuel, A., Taârit, Y. B. (1994). Influence of the nature of silicon and titanium alkoxides on the incorporation of titanium in TS-1. *Applied Catalysis A: General*, 110(1), 137-151.
- [181] Reddy, J. S., Kumar, R., Ratnasamy, P. (1990). Titanium silicalite-2: synthesis, characterization and catalytic properties. *Applied Catalysis*, 58(1), L1-L4.
- [182] Acevedo, R. (2010). Elementos Introductorios en Espectroscopía Atómica y Molecular. Aplicaciones a Sistemas de Interés Espectroscópico. Red Internacional del Libro. Inscripción 116361. ISBN: 956-284-146-4. Santiago. Chile
- [183] Fang, J. (2007). Xinzhen Bi, Dejun Si, Zhiquan Jiang, and Weixin Huang, " Spectroscopic studies of interfacial structures of CeO₂--TiO₂ mixed oxides". *Applied Surface Science*, 253(22), 8952-8961.
- [184] Jun Fang, Xinzhen Bi, Dejun Si, Zhiquan Jiang, Weixin Huang "Spectroscopic studies of interfacial structures of CeO₂–TiO₂ mixed oxides". *Applied Surface Science* 253 (2007) 8952–8961.
- [185] Gupta, S. K., Desai, R., Jha, P. K., Sahoo, S., Kirin, D. (2010). Titanium dioxide synthesized using titanium chloride: size effect study using Raman spectroscopy and photoluminescence. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 41(3), 350-355.
- [186] Šćepanović, M. J., Grujić-Brojčin, M., Dohčević-Mitrović, Z. D., Popović, Z. V. (2007). Temperature dependence of the lowest frequency Eg Raman mode in laser-synthesized anatase TiO₂ nanopowder. *Applied Physics A*, 86(3), 365-371.
- [187] Ohsaka, T., Izumi, F., Fujiki, Y. (1978). Raman spectrum of anatase, TiO₂. *Journal of Raman spectroscopy*, 7(6), 321-324.

- [188] Spanier, J. E., Robinson, R. D., Zhang, F., Chan, S. W. and Herman, I. P. (2001). Size-dependent properties of CeO_{2-y} nanoparticles as studied by Raman scattering. *Physical Review B*, 64(24), pp.245407.
- [189] Nishikawa, Y., Fukushima, N., Yasuda, N., Nakayama, K., Ikegawa, S. (2002). Electrical properties of single crystalline CeO_2 high-k gate dielectrics directly grown on Si (111). *Japanese journal of applied physics*, 41(4S), 2480.
- [190] Chen, W. E. N., Hua, D. E. N. G., Tian, J. Y., Zhang, J. M. (2006). Photocatalytic activity enhancing for TiO_2 photocatalyst by doping with La. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 16, 728-s731.
- [191] Francisco, M. S. P., Mastelaro, V. R. (2002). Inhibition of the anatase–rutile phase transformation with addition of CeO_2 to CuO – TiO_2 system: Raman spectroscopy, X-ray diffraction, and textural studies. *Chemistry of Materials*, 14(6), 2514-2518.
- [192] Fan, C., Xue, P., Sun, Y. (2006). Preparation of nano- TiO_2 doped with cerium and its photocatalytic activity. *Journal of Rare Earths*, 24(3), 309-313.
- [193] Cheng, K., Liu, J., Zhang, T., Li, J., Zhao, Z., Wei, Y. Duan, A. (2014). Effect of Ce doping of TiO_2 support on NH_3 -SCR activity over V_2O_5 – WO_3 / CeO_2 – TiO_2 catalyst. *Journal of Environmental Sciences*, 26(10), 2106-2113.
- [194] Reddy, B. M., Khan, A., Lakshmanan, P., Aouine, M., Loridant, S. and Volta, J. C. (2005). Structural characterization of nanosized CeO_2 - SiO_2 , CeO_2 - TiO_2 , and CeO_2 - ZrO_2 catalysts by XRD, Raman, and HREM techniques. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(8), pp.3355-3363.
- [195] Lopez, T., Rojas, F., Alexander-Katz, R., Galindo, F., Balankin, A., Buljan, A. (2004). Porosity, structural and fractal study of sol–gel TiO_2 – CeO_2 mixed oxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 177(6), 1873-1885.
- [196] Matějová, L., Kočí, K., Reli, M., Čapek, L., Hospodková, A., Peikertová, P., Kotarba, A. (2014). Preparation, characterization and photocatalytic properties of cerium doped TiO_2 : On the effect of Ce loading on the photocatalytic reduction of carbon dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 152, 172-183.
- [197] Nair, R. R., Arulraj, J., Devi, K. S. (2016). Ceria doped titania nano particles: Synthesis and photocatalytic activity. *Materials Today: Proceedings*, 3(6), 1643-1649.

- [198] Devi, R. S., Venckatesh, D. R., Sivaraj, D. R. (2014). Synthesis of titanium dioxide nanoparticles by sol-gel technique. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.*, 3(8), 15206-15211.
- [199] Ghosh, S. (2011). Comparative studies on brij reverse micelles prepared in benzene/surfactant/ethylammonium nitrate systems: Effect of head group size and polarity of the hydrocarbon chain. *Journal of colloid and interface science*, 360(2), 672-680.
- [200] Chandra, P., Doke, D. S., Umbarkar, S. B., Biradar, A. V. (2014). One-pot synthesis of ultrasmall MoO₃ nanoparticles supported on SiO₂, TiO₂, and ZrO₂ nanospheres: an efficient epoxidation catalyst. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(44), 19060-19066.
- [201] Zhang, D., Zhang, H., Nie, J. and Yang, J. (2010). Synthesis and self-assembly behavior of pH-responsive amphiphilic copolymers containing ketal functional groups. *Polymer International*, 59(7), pp.967-974.
- [202] Uddin, M. J., Mondal, D., Morris, C. A., Lopez, T., Diebold, U., Gonzalez, R. D. (2011). An in vitro controlled release study of valproic acid encapsulated in a titania ceramic matrix. *Applied Surface Science*, 257(18), 7920-7927
- [203] Beraldo, H., Garnier-Suillerot, A., Tosi, L. and Lavelle, F., 1985. Iron (III)-adriamycin and iron (III)-daunorubicin complexes: physicochemical characteristics, interaction with DNA, and antitumor activity. *Biochemistry*, 24(2), pp.284-289.
- [204] Barick, K. C., Nigam, S., Bahadur, D. (2010). Nanoscale assembly of mesoporous ZnO: A potential drug carrier. *Journal of Materials Chemistry*, 20(31), 6446-6452.
- [205] Das, G., Nicastrì, A., Coluccio, M. L., Gentile, F., Candeloro, P., Cojoc, G., Di Fabrizio, E. (2010). FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microscopy research and technique*, 73(10), 991-995.
- [206] Kaczmarek, A., Cielecka-Piontek, J., Garbacki, P., Lewandowska, K., Bednarski, W., Barszcz, B., Jelińska, A. (2013). Radiation sterilization of anthracycline antibiotics in solid state. *The Scientific World Journal*, 2013.
- [207] Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*, 22(6), 100-6.
- [208] Reyes, L. I., León, F., Rozas, V., Fernanda, M., González, P., Naves, R. (2006). BAFF: Una citoquina reguladora de linfocitos B implicada en autoinmunidad y cáncer linfoide. *Revista médica de Chile*, 134(9), 1175-1184.

- [209] Thevenot, P., Cho, J., Wavhal, D., Timmons, R. B., Tang, L. (2008). Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(3), 226-236

ANEXO 1

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DAUNORRUBICINA

La Figura A1 muestra la curva de calibración construida a partir de los datos de absorbancia en las ordenadas y la concentración en las abscisas para las concentraciones de Daunorrubicina. Cada uno de los puntos de la curva de calibración representa el promedio de dos observaciones. Al realizar la regresión lineal se obtuvo la ecuación $y = 0.0005X - 0.0753$ (3) con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.97 –dada la alta correlación lineal, la ecuación obtenida puede utilizarse para interpolar de manera confiable la concentración de daunorrubicina. El valor pequeño de la pendiente indica, además, que cumple con la ley de Beer–. La presente ecuación nos permitió calcular la concentración de las muestras problema, el sobrenadante y la suspensión de NPs resultantes del proceso de funcionalización. El valor de D.O de la DNR obtenido fue 0.591 en el sobrenadante y 0.721 en la suspensión de NPs. La concentración resultó, por la regresión inversa, de sustituir en la ecuación de la recta la variable dependiente “x”, asociada con la concentración de los analitos, por los valores de absorbancia mencionados.

La concentración obtenida de DNR en ambas muestras fue: 1031nM en el sobrenadante y de 1291nM en la suspensión coloidal, los cuales se interpolaron en la curva de calibración estándar de DNR (Figura A2). Estas concentraciones se multiplicaron por el factor de dilución empleado y se estimó la concentración de DNR en mg presentes en cada una de las muestras, dando como resultado 0.8mg de DNR en el sobrenadante y 3.2 mg en la suspensión de NPs.

La Figura A3 muestra la curva de calibración construida a partir de los datos de absorbancia obtenidos del análisis de la DNR en suspensión coloidal, cuya regresión lineal dio como resultado la ecuación $y = 0.0008X - 0.2474$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.986. A partir de los resultados de esta curva se calcularon las concentraciones de DNR para los tratamientos en los ensayos de viabilidad considerando el porcentaje de DNR unida al material.

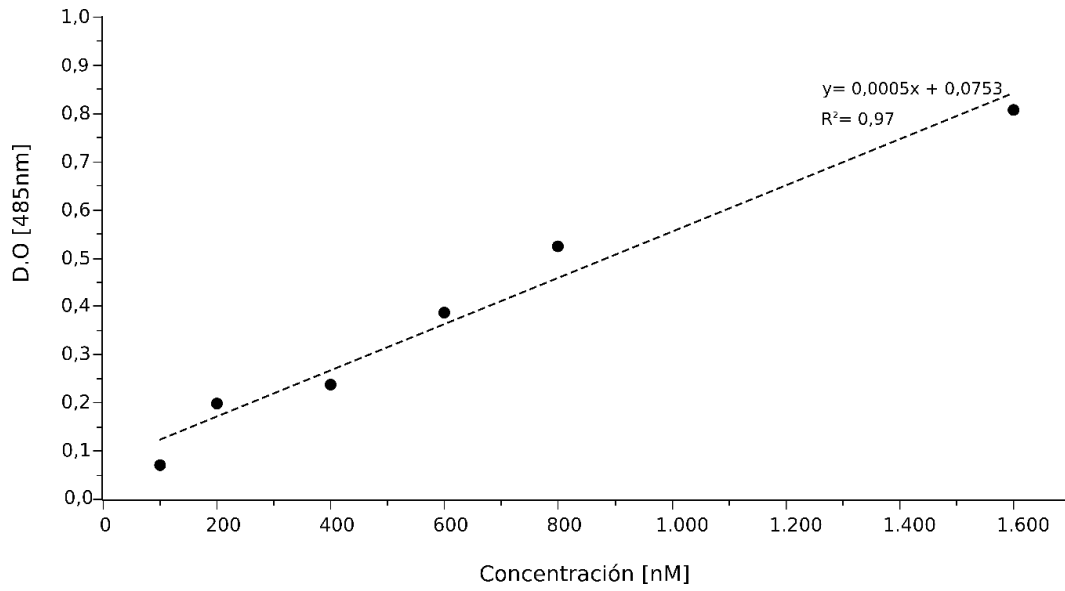


Figura A1. Curva de calibración de DNR

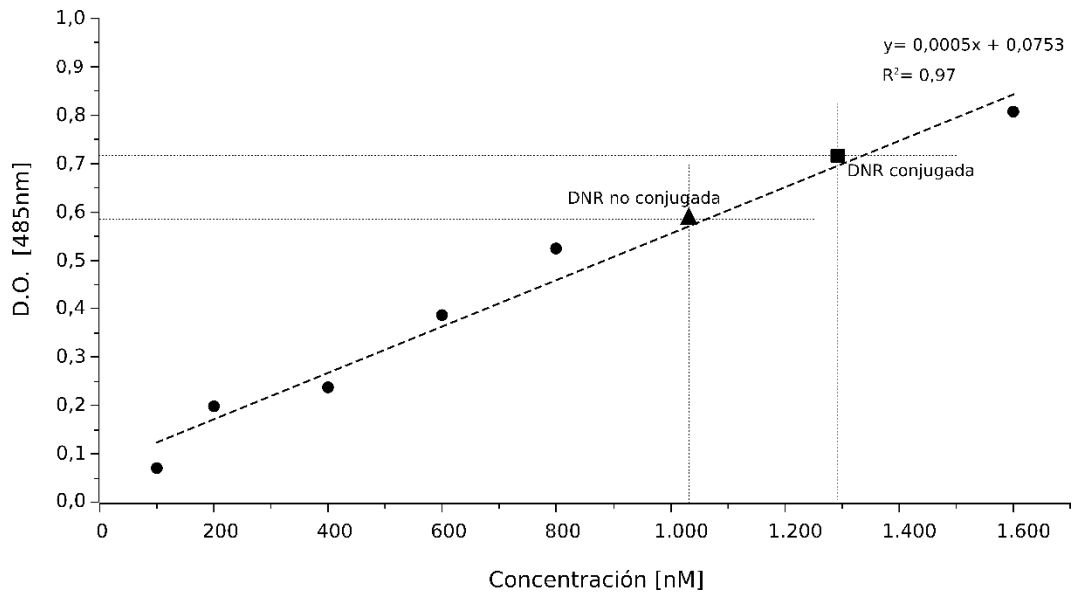


Figura A2. Curva de calibración de DNR, donde se puede observar la interpolación de las concentración de DNR en el sobrenadante y la suspensión coloidal.

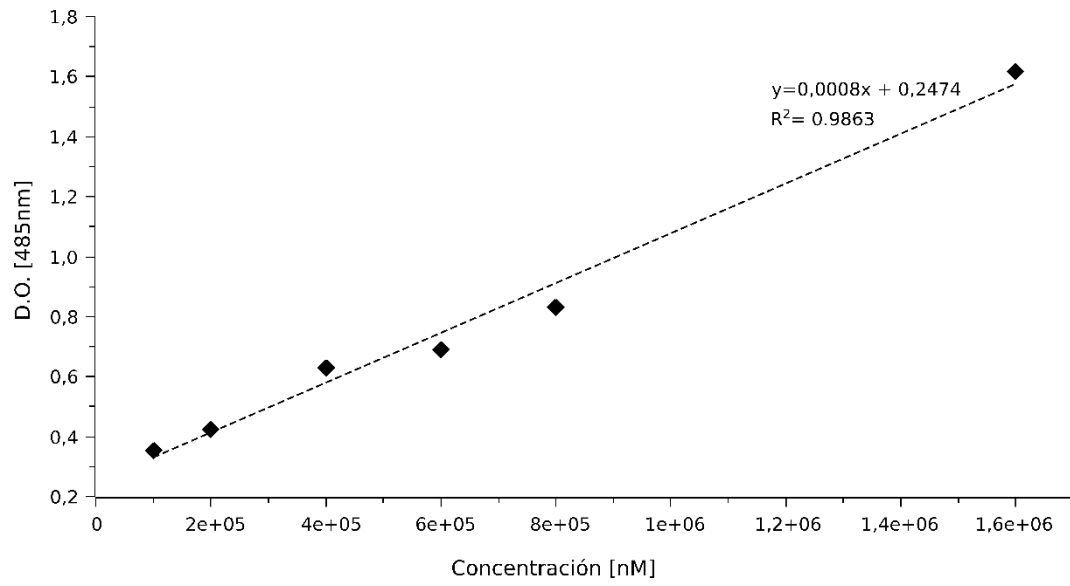


Figura A3. Curva de calibración de DNR en la suspensión coloidal.

ANEXO 2

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULOS

2017; Torres-Romero, A., Cajero-Juárez, M., Contreras-García, M. E. (2017). Titania-Ceria surfactant assisted sol-gel synthesis and characterization. *Epitoanyag-Journal of Silicate Based & Composite Materials*, 69(1). <http://dx.doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2017.2>

2.19; A. Torres Romero, M. Cajero-Juárez, R.E. Nuñez-Anita, M.E. Contreras-García. Ceria-doped titania nanoparticles as drug delivery system. *Journal of nanoscience and nanotechnology*.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

2016; Synthesis of TiO₂ Nanoparticles Doped CeO₂ in a Reverse Micelle Microemulsion, Nacional, VIII Congreso Nacional de Cristalografía. II Reunión de la Asociación Latinoamericana de Cristalografía, M. E. Contreras-García, M. Cajero-Juárez, A. Torres-Romero, Mérida, Yucatán.

2.18; Evaluation of cerium-doped TiO₂ nanoparticles as anticancer release systems, Extranjero, 7th International Congress on Ceramics-ICC7, Brazil.

Titania-Ceria surfactant assisted sol-gel synthesis and characterization

A TORRES-ROMERO ■ IIMM UMSNH ■ abigailtorresromero2014@gmail.com

M CAJERO-JUÁREZ ■ IIAF UMSNH ■ eucontre@gmail.com

ME CONTRERAS-GARCÍA ■ IIMM UMSNH ■ cajeromarco@hotmail.com

Érkezett: 2016. 11. 19. ■ Received: 19. 11. 2016. ■ <http://dx.doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2017.2>

Abstract

The nanoparticles of titanium dioxide are important in a wide range of applications such as catalysis, environmental remediation and solar energy conversion. While cerium oxide is rare-earth oxide material used in the fields of photoluminescence, photosensitive material to UV radiation. Furthermore, research on the synthesis of nanoparticles of titanium dioxide has given rise to different methods such as sol-gel, in solid states, hydrothermal processes, among others. The process of solid state synthesis is most often used for the technical production of ceramic materials, while the sol-gel has gained much popularity in recent decades. Between these methods, microemulsion of reverse micelles technique, is one of the most versatile allowing control of particle properties such as size distribution, morphology and surface area. In this work, titania-ceria nanoparticles in anatase phase were synthesized by sol-gel method assisted by microemulsion reverse micelle using titanium butoxide and cerium nitrate hexahydrate as the precursors. The sample was thermally treated at 600 °C at a rate of 3 °C min⁻¹. The residence time of the sample at this temperature was 2 hrs. TEM and XRD analysis were used to characterize the samples obtained. According to the results, the obtained nanoparticles present spherical morphology and have a size distribution of 5 nm for CeO₂, 9.5 for TiO₂ and 14, 17 and 20 nm for the doped TiO₂ with 5, 10 and 15% CeO₂, respectively. The results indicate that the CeO₂ was incorporated into the network of titania.

Keywords: nanoparticles, titania, ceria, microemulsion, sol-gel.

1. Introduction

Nanomaterials based on metal oxides exhibit remarkable physical and chemical properties that enable the development of novel nanodevices that can be used in different physical, biological, biomedical and pharmaceutical applications [1-7]. The surface of these nanostructures is crucial for these applications. These nanostructures excel in catalytic applications because of the presence of surface defects that act as active sites for adsorption of reactive molecules [6]. These defects present in the nanoparticles, especially cerium dioxide and titanium, increase the active surface area that favors the union of a large variety of ligands on its surface [8]. Although so far the use of nanoparticles of titania and ceria in the biomedical and therapeutic area has been carried out separately and not mixed [3-7], it is possible to harness the power possessed by lanthanide ions with electronic configuration 4f, as cerium, which when entering the network of the titania acts as an electronic trap [9-10], which could increase the number of molecules captured on its surface, which will be extremely useful for increasing the binding of drugs in nanoparticles of titania and improve its efficiency as a nanocarrier.

Furthermore, research on the synthesis of these nanomaterials has given rise to different methods such as sol-gel, solid, chemical vapor deposition, hydrothermal processes, among others. The process of solid state synthesis is most often used for the production of technical ceramic materials, while the sol-gel has gained much popularity in recent decades [3]. These methods microemulsion technique reverse micelles is one of the most versatile allowing control of particle properties such as size distribution, morphology and surface area [5]. The

reverse micelles are used as a micro-heterogeneous medium for generating nanoparticles, where microcavities surfactant provide a similar effect to a cage which influences the particle nucleation, growth and agglomeration. The scale of these nanoreactors size is in the range 2 to 10 nm. This is a dynamic system on a micellar level. Micelles collide with each other and quickly share their content, which is essential for carrying out chemical reactions [11].

In this work a combined method for synthesis of TiO₂ nanoparticles doped CeO₂, for use as drug delivery systems described. Using Tween-20 as surfactant, as cosurfactant methanol, toluene as continuous phase and titanium butoxide and cerium nitrate as precursors.

2. Materials and methods

All reagents used in this study were of analytical grade, Ti(OC₄H₉)₄ (98%, Aldrich), Ce(NO₃)₃·6H₂O (99.8%, Merck), C₇H₈ (99.5%, Merck), CH₃OH (99.8%, Merck), C₅₈H₁₁₄O₂₆ (Merck) and deionized water (Merck).

2.1 Nanoparticles synthesis

TiO₂, CeO₂ and TiO₂-CeO₂ nanoparticles were synthesized by sol-gel method assisted by a surfactant. The precursor Ce(NO₃)₃·6H₂O was dissolved in 2 mL of deionized water (0, 5, 10 and 15 mol%), then slowly added to an organic phase

A Torres-Romero

Master of sciences since 2015, post-graduate student in Ceramic Biomaterials, Department of Advanced Ceramics, Metallurgy and Materials Research Institute on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. She is specialist in sciences of biofunctionalization and synthesis of ceramic materials. Her teaching experience includes: introduction to bioassays, technical capacitation and analytical methods design.

ME Contreras-García

Doctor of Sciences since 2000, Titular C Professor and Researcher at the Ceramic Materials Department of the Metallurgy and Materials Research Institute on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo since 1988 and Level 2 National Researcher since 2001. Specialized on Ceramic Synthesis and Processing Techniques such as ceramic powder processing via sol-gel and chemical techniques, focused on nanostructured ceramics processing and functional ceramics including: structural ceramics, bioceramics, magnetic ceramics, optoelectronic ceramics, catalytic and photocatalytic ceramics, macro-mesoporous ceramics all of them in bulk and in thin films. She is author and co-author of more than 100 international indexed papers, two book chapters and editor in one. She is member of several scientific societies and regional director of the Mexican Academy of Crystallography.

M Cajero-Juárez

Doctor in Genetic and Molecular Biology, Titular C Professor and Researcher at the Animal Biotechnology Laboratory of the IIAF on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and National Researcher. Specialized on animal genome manipulation, gene expression on cells and synthetic biology for gene and protein design.

Tween-20/methanol/toluene in a v/v ratio of 6/1/10 mL and was at a temperature of 60 °C for 10 min, then added drop by drop the titanium butoxide (in the following proportions: 100, 95, 90 and 85 mol%) while preserving the conditions of temperature and agitation for 40 min. The resulting suspension remained standing at room temperature protected from light for 12 hrs. The synthesis of nanoparticles becomes evident that is possible to observe the separation of the microemulsion into two layers. The upper layer is recovered and subjected to drying at 100 °C in an oven for 24 hrs, the resulting powder sample was heat treated at 600 °C at a rate of 3 °C / min¹. The residence time of the sample at this temperature was 2 hrs.

2.2 Characterization

The structural and chemical characterization of the nanoparticles was made from powder samples obtained in the synthesis. The samples were prepared in the form of dilutions of varied concentration (according to the analysis technique), and powders obtained from the heat treatment. The characterization techniques that were used were: X-ray diffraction, XRD and conventional and high resolution transmission electron microscopy, TEM and HRTEM.

3. Results and discussion

3.1 Nanoparticles synthesis

The synthesis process from the hydrolysis reaction of titanium butoxide and the insertion of cerium nitrate into the micelles formed by Tween-20 and methanol under acidic conditions (pH 5) was manifested by the separation of the microemulsion in two layers upon completion of 40 minutes of reaction. The upper layer consists of the organic phase containing the non-agglomerated nanoparticles and the lower layer is treated with the inorganic phase [12].

In Fig. 1, the diffraction patterns of the single TiO₂ (a) and doped with (b) 5%, (c) 10% and (d) 15% CeO₂ powders are shown. In the four diffraction patterns only the reflections corresponding to the anatase phase of titanium dioxide (JCPDS # 01-071-1166) could be identified; while in the three doped titania patterns, the Bragg peaks corresponding to the doping species, CeO₂, were not observed, suggesting the incorporation of CeO₂ in the TiO₂ network. It can also be observed in these three diffraction patterns that, as the CeO₂ percentage increases.

The average crystallite size (TC) for the four systems studied was determined by the Debye-Scherrer formula, the results of the measurements are shown in Fig. 2. When comparing these results with the simple nanoparticles obtained by this same method, it can be seen that when doping the TiO₂ nanoparticles with CeO₂, the average grain size increases, however as the percentage of dopant increases the size of crystallite decreases, this may be due to the segregation of the dopant cations at the grain boundary may prevent the growth of nanocrystallite in the nanoparticles [2, 13-14]. Another possible cause is that the Ce⁺ ion absorbed in the titania network decreases the free surface energy of the particles, which inhibits the process of aggregation of the nanoparticles [2, 15].

The microstructural effect of spreading in the peaks is the presence of residual stresses in the material due to the inclusion of the cerium atoms in the titania network, causing a deformation of its crystalline planes. In this particular case the effect is presented at the microscopic level, causing a widening of the diffraction profile with respect to the original position of the standard pattern diffraction peaks [9-10]. The evaluation of the microtensions was carried out from the displacement of the crystalline plane (101) of the titania, because they suffer a variation in the interplanar distances caused by the internal residual forces, the results of the estimations are shown in the Fig. 2.

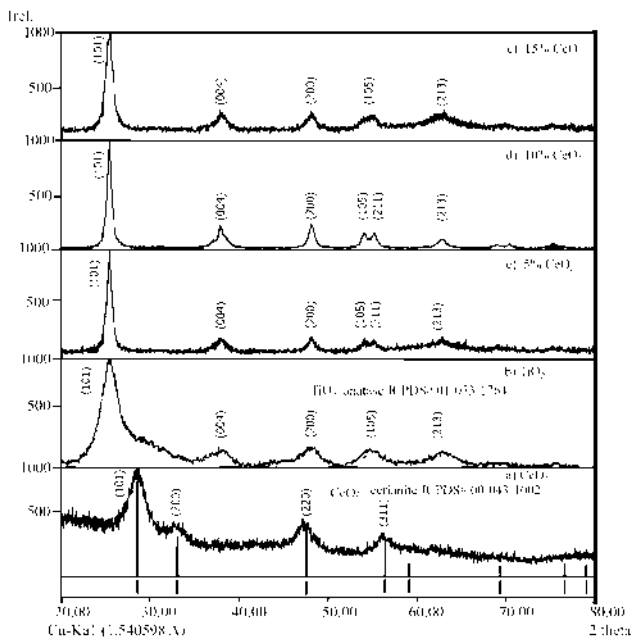


Fig. 1 Diffraction patterns obtained from CeO₂ powders (a), TiO₂ (b) doped 5% (c), 10% (d) and 15% CeO₂ (e).
1. ábra Röntgendiffraktogramok: (a) CeO₂, (b) TiO₂, (c) TiO₂ + 5% CeO₂, (d) TiO₂ + 10% CeO₂, (e) TiO₂ + 15% CeO₂

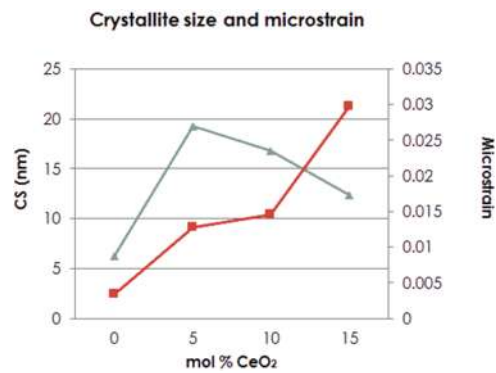


Fig. 2 Crystallite size measurements and microtension diffraction patterns simple and TiO₂, doped 5%, 10% and 15% CeO₂.
2. ábra Krisztallit méret és mikrodeformáció: CeO₂, TiO₂ + 5% CeO₂, TiO₂ + 10% CeO₂, TiO₂ + 15% CeO₂

From the measurements of the crystallite size and microtension in the diffraction patterns of the powders of simple titania and ceria doped, represented in Fig. 2, it is possible to affirm that for the case of simple TiO₂ the increase in the maximum width a half peak (FWHM), is only provoked by the decrease in crystallite size; whereas for the powders of doped titania, it is mainly due to the microdeformations caused in their crystalline planes when the ceria atoms are incorporated and the decrease

of the crystallite size is possibly the result of an increase in the percentage of dopant incorporated in their network. This effect is more noticeable in the system doped with 15% of ceria because when using higher percentages of CeO_2 , the greater the tension provoked in the network that of the titania.

The crystallographic data of the phase identified in the pattern of Fig. 1a (TiO_2 ; JCPDS # 01-073-1764) were used as crystalline model from the obtained diffraction patterns. In Fig. 3, it is seen that as the dopant percentage increases, CeO_2 , the Ti factor occupying factor in the unit cell decreases, this suggests that the cerium atoms are incorporated in the titania network by displacing these atoms.

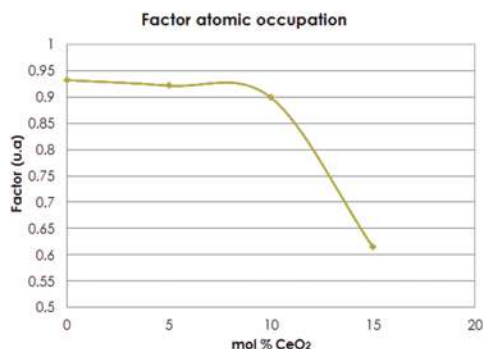


Fig. 3 Factor atomic occupation of simple and TiO_2 doped 5%, 10% and 15% CeO_2 .
3. ábra Atom illeszkedési tényező: CeO_2 TiO_2 + 5% CeO_2 TiO_2 + 10% CeO_2 TiO_2 + 15% CeO_2

Fig. 4 shows a high-resolution image, accompanied by its corresponding Fast Fourier Transform (FFT), taken from the TiO_2 sample. The selected nanoparticle has a size which is about 8.5 nm, in which an interplanar distance of about 0.343 nm, corresponding to the plane (101) of the tetragonal cubic structure of TiO_2 , could be measured. Likewise, in their respective FFT, the periodic arrangement of the points makes evident the crystalline character of the particle.

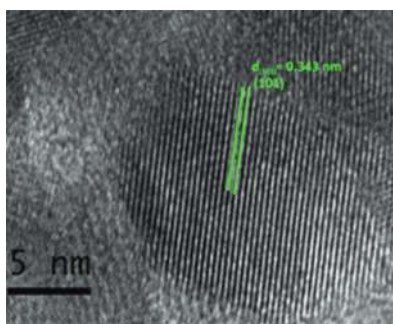


Fig. 4 High resolution micrograph of a nanoparticle showing an interplanar distance of 0.343 nm.
4. ábra Nano-részecske nagy felbontású mikroszkópos felvétele: 0,343 nm síktávolság figyelhető meg

Fig. 5a corresponds to a high resolution image of the doped sample, where spheroidal nanoparticles with a diameter of 20 nm are observed, which is in agreement with the crystallite size estimated from the main intensity in the pattern i.e. the doping at low percentages of CeO_2 increases the size of crystallite and thus the particle diameter; it can be thought that the main reason for this growth is because the radius of the cerium atom is more large than the Ti^+ and to enter in low percentages causes that the nanoparticles increase their size. While in Fig. 5b, a nanoparticle

with an approximate size of 22 nm is observed, in which an interplanar distance of approximately 2.48 Å, corresponding to the plane (101) of the tetragonal cubic structure of TiO_2 . This reinforces the observations in the diffraction patterns, which suggests the incorporation of CeO_2 in the TiO_2 network [16-18].

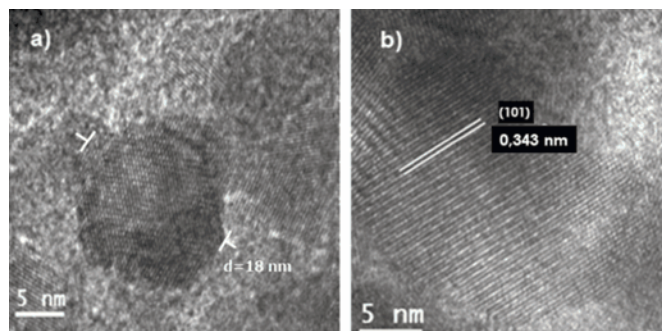


Fig. 5 HRTEM micrographs. One observed nanoparticles of 18 nm (a), a nanoparticle exhibiting an interplanar distance of 0.343 nm (b).
5. ábra Nagy felbontású mikroszkópos felvételek (a) 18 nm méretű nano-részecske, (b) nano-részecske 0,343 nm síktávolsággal.

Fig. 6a and 6b shows clear field micrographs at a magnification of 690,000×, taken in different areas of the doped titania sample with 15% CeO_2 , where it is observed that the nanoparticles have average diameters of 14 nm. As can be seen in the micrographs, the particle size decreases with increasing dopant percentage, suggesting that the cerium ion upon incorporation into the titania network slows the growth of the nanoparticles.

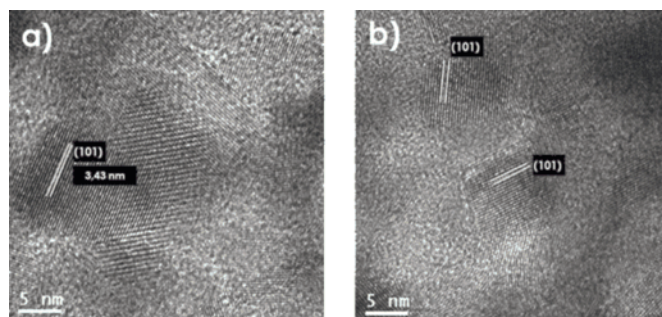


Fig. 6 Brightfield TEM micrographs with a magnification of 690,000×, in which a group of spheroidal TiO_2 nanoparticles doped 15% CeO_2 is observed.
6. ábra Brightfield TEM felvételek 690.000× nagyítással; gömszerű nano-részecskék figyelhetők meg

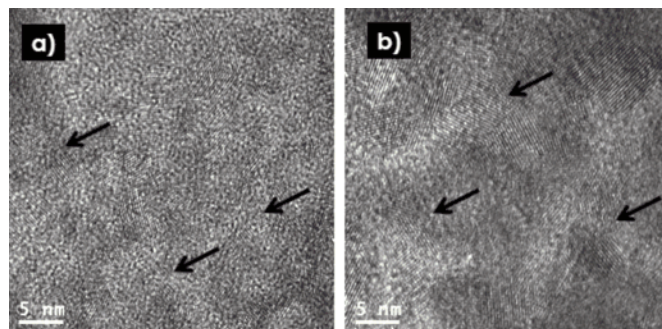


Fig. 7 Light field micrographs with a magnification of 99,000×, obtained by TEM.
7. ábra Light field TEM felvételek 99.000× nagyítással

Fig. 7a and 7b correspond to clear-field micrographs taken from a CeO_2 sample, in which spheroidal nanoparticles with an average size of 5 nm (indicated by arrows) are observed. These

results indicate that using the proposed methodology can be obtained CeO₂ nanoparticle, and suggesting that during the joint process of synthesis and doping both types of nanoparticles, however, because the CeO₂ nuclei are smaller, due to the low concentration of reagent, gives a secondary nucleation, where the nanoparticles of TiO₂ are formed [12, 19].

4. Conclusions

The conditions for the synthesis of nanoparticles of TiO₂ doped with ceria were established by the inverse micelles method, emphasizing the surfactant handling and the formation of suspensions in which the material is synthesized.

By the microemulsion method of reverse micelles, nanoparticles of anatase phase titania and titania doped with ceria of spheroidal shape were obtained with an average diameter of 9.5, 14 and 20 nm, respectively. This suggests that in the interior of the micelles there is a greater availability of water to carry out the hydrolysis and dopant insertion reaction in the TiO₂ nanoparticles, which favors the nucleation stage, so it is probable that increase the number of nuclei produced thereby forming smaller particles.

5. Acknowledgments

This research was funded by CIC UMSNH (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México) and CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México), A. Torres-Romero, received a doctoral grant from CONACYT.

References

- [1] Oskam, G. – Nellore, A. – Penn, R. L. – Searson, P. C. (2003): The growth kinetics of TiO₂ nanoparticles from titanium (IV) alkoxide at high water/titanium ratio. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(8), 1734-1738. <https://doi.org/10.1021/jp021237f>
- [2] Xu, J. – Ao, Y. – Fu, D. (2009): A novel Ce, C-codoped TiO₂ nanoparticles and its photocatalytic activity under visible light. *Applied Surface Science*, 256(3), 884-888. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.08.079>
- [3] Sitthisang, Onthikan – Komarneni, Sridhar – Tantirungrotechai, Jonggol – Dong Noh, Young – Li, Huihui – Yin, Shu – Sato, Tsugio – Katsuki, Hiroaki (2012): Microwave-hydrothermal synthesis of extremely high specific surface area anatase for decomposing NO_x, *Ceramics International*, Vol 38, No 8, pp. 6099-6105. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.04.057>
- [4] Sugimoto, Tadao – Zhou, Xingping – Muramatsu, Atsushi (2003): Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 3. Formation process and size control. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259(1): 43-52. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00036-5)
- [5] Hirai, T. – Sato, H. – Komasa, I. (1993): Mechanism of formation of titanium dioxide ultrafine particles in reverse micelles by hydrolysis of titanium tetrabutoxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 32(12), 3014-3019. <https://doi.org/10.1021/ie00024a009>
- [6] Noguera, C. (1996): Physics and chemistry at oxide surfaces. *Cambridge University Press*.
- [7] Kung, H. H. (1989): Transition metal oxides: surface chemistry and catalysis (Vol. 45). Elsevier.
- [8] Erdem, B. – Hunsicker, R. A. – Simmons, G. W. – Sudol, E. D. – Dimonie, V. L. – El-Aasser, M. S. (2001): XPS and FTIR surface characterization of TiO₂ particles used in polymer encapsulation. *Langmuir*, 17 (9), 2664-2669. <https://doi.org/10.1021/la0015213>
- [9] Štengl, V. – Bakardjieva, S. – Murafa, N. (2009): Preparation and photocatalytic activity of rare earth doped TiO₂ nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 114(1), 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.09.025>
- [10] El-Bahy, Z. M. – Ismail, A. A. – Mohamed, R. M. (2009): Enhancement of titania by doping rare earth for photodegradation of organic dye (Direct Blue). *Journal of Hazardous Materials*, 166(1), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.022>
- [11] Keswani, R. K. – Ghodke, H. – Sarkar, D. – Khilar, K. C. – Srinivasa, R. S. (2010): Room temperature synthesis of titanium dioxide nanoparticles of different phases in water in oil microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 369(1), 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.001>
- [12] Patil, S. – Kuiry, S. C. – Seal, S. – Vanfleet, R. (2002): Synthesis of nanocrystalline ceria particles for high temperature oxidation resistant coating. *Journal of Nanoparticle Research*, 4(5), 433-438. <https://doi.org/10.1023/A:1021696107498>
- [13] Jin, Y. – Zhu, Y. – Yang, X. – Wei, C. – Li, C. (2007): Fabrication and characterization of cerium-doped titania inverse opal by sol-gel method. *Materials Chemistry and Physics*, 106(2), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.05.047>
- [14] Marimuthu, T. – Anandhan, N. – Rajendran, S. – Mummooorthy, M. – Vidhya, M. (2014): Studies on pure and Ce doped TiO₂ thin films prepared by sol-gel technique. *International Journal of ChemTech Research*, Vol.6, No.13, pp 5309-5314, November 2014
- [15] Tong, T. – Zhang, J. – Tian, B. – Chen, F. – He, D. – Anpo, M. (2007): Preparation of Ce-TiO₂ catalysts by controlled hydrolysis of titanium alkoxide based on esterification reaction and study on its photocatalytic activity. *Journal of colloid and interface science*, 315(1), 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.051>
- [16] Liu, Z. – Guo, B. – Hong, L. – Jiang, H. (2005): Preparation and characterization of cerium oxide doped TiO₂ nanoparticles. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 66(1), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2004.09.002>
- [17] Xiao, J. – Peng, T. – Li, R. – Peng, Z. – Yan, C. (2006): Preparation, phase transformation and photocatalytic activities of cerium-doped mesoporous titania nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*, 179(4), 1161-1170. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2006.01.008>
- [18] Chaisuk, C. – Wehatoranawee, A. – Preampiyawat, S. – Netiphat, S. – Shotipruk, A. – Mekasuwandumrong, O. (2011): Preparation and characterization of CeO₂/TiO₂ nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Ceramics International*, 37(5), 1459-1463. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.11.018>
- [19] Wheeler, D. W. – Khan, I. (2014): A Raman spectroscopy study of cerium oxide in a cerium-5wt% lanthanum alloy. *Vibrational Spectroscopy*, 70, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2013.12.006>

Ref.:

Torres-Romero, A. – Cajero-Juárez, M. – Contreras-García, M. E. : *Titania-Ceria surfactant assisted sol-gel synthesis and characterization*
Építőanyag – Journal of Silicate Based and Composite Materials, Vol. 69, No. 1 (2017), xx-xx. p.
<http://dx.doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2017.2>

Szol-gél eljárás jellegzetességei titándioxid és cériumdioxid alapanyag szintézisével

Titándioxid nano-részecskék fontos szerepet töltenek be a katalízisben és a napenergia hasznosításban, sok egyéb más területtel együtt. A cériumdioxid egy ritkaföldfém vegyület amelyet elsősorban fotolumineszcens anyagként, fényérzékeny anyagok előállítása során hasznosítanak. Napjainkban a szol-gél eljárás egy népszerű módszer mezopórusos anyagok előállítására. A cikk bemutatja anatóz fázisú titándioxid-cériumdioxid nanorészecskék előállítását szol-gél eljárással, amelynek során a kiindulási prekursorok titánbutoxid és cérium-nitrát-hexahidrát. A hőkezelés hőmérséklete 600 °C, sebessége 3 °C min⁻¹, a hőtartás időtartama 2 óra volt. TEM és XRD vizsgálatokon keresztül figyelhetjük meg az elkészült termék jellegzetességeit. Azeredmények igazolják, hogy a CeO₂ beépül a TiO₂ szerkezetbe.
Kulcsszavak: nanorészecskék, titán, cérium, mikroemulzió, szol-gél

ACCEPTANCE OF MANUSCRIPT

Manuscript No. : 2018-1183

Title : Ceria-doped titania nanoparticles as drug delivery system

Author(s) : Maria Eugenia Contreras-Garcia*, Abigail Torres-Romero, Marco Cajero-Juárez, Rosa Elvira Núñez-Anita

Received Date : 2019-04-15

Deadline for submitting items : 2019-06-30

URL : <http://jnn.aspbs.org>

Dear Prof. Maria Eugenia Contreras-Garcia,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the JNN.

Attached, find the referee's report.

Please upload the following documents for the publishing process:

1. Final manuscript (MS-word file)
2. Graphical abstract (MS-word file)
3. Copyright Transfer Agreement

✂ *You can find the exact document format on the JNN website (<http://jnn.aspbs.org/>).*

We are honored to publish your work in JNN., and we hope that you will also consider us for future papers.

Sincerely yours,

Asian Editor Geun Young Yeom
JNN