

INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Soluciones coloidales de nanopartículas metálicas funcionalizadas para uso médico

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ERNESTO ALONSO VALDEZ SALAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. BENJAMIN VALDEZ SALAS

ENERO 2019

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la memoria de mi Padre Don Benjamin Valdez Ramirez, a mi Madre Doña Lucila Salas Betancourt a quienes debo todo lo que soy.

Dedico este trabajo a mi esposa Melina, mis hijos, Melina Nathalie, Ernesto Alonso, y Sergio Valdez Ayala, por la fortaleza que infunden a mi vida, por el tiempo y apoyo durante estos años para la realización de la investigación.

Dedico este documento a mis pacientes y a todas aquellas personas que estando en condición de enfermedad luchan incansablemente por recuperar su salud y cumplir ese proyecto que la condición de vida hace posible. De igual forma lo dedico a todas aquellas personas que padecen enfermedades para las cuales las terapéuticas actuales resultan insuficientes y pasan a conformar el universo de pacientes que día con día robustecen las filas de los destinados a terapia paliativa, y que a pesar de esto no se dan por vencidos y animados por su gran fortaleza espiritual deciden a la par de su médico buscar una solución.

Agradezco profundamente a la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Ingeniería bajo la dirección de la Dra. Gisela Montero Alpírez por el apoyo brindado, a mi director de tesis Dr. Benjamin Valdez Salas por su valioso tiempo dedicado a este proyecto, por su entrega y por el desgaste físico y emocional que general al incursionar en esta área. Agradezco a los Doctores Lucien Veleza, Miguel Beltran Garcia, Navor Rosas Gonzalez, Nicola Radnev Nedev, Miguel Schor Wiener, Ernesto Alonso Beltran Partida, Mónica Carrillo Beltrán, Tito Enrique Herrera Larrasilla, por su apoyo y participación en la realización de esta investigación.

CONTENIDO

Índice	Pág.
Dedicatorias y agradecimientos	2
Capítulo 1 Aspectos Generales	5
1.1. Introducción	5
1.2. Objetivos generales	6
1.3. Objetivos específicos	7
1.4. Metodología propuesta	8
Capítulo 2. Fundamentos Teóricos	10
2.1. Introducción	10
2.2. Nanopartículas y vías de administración	11
2.2.1. Administración oral de nanopartículas	11
2.2.2. Nanopartículas y vía de administración intravenosa	12
2.3. Aspectos importantes de elementos esenciales y no esenciales de gran importancia en sistemas biológicos.	14
2.4.3.-Nano somas	36
Capítulo 3 Experimentación	43
3.1. Introducción	43
3.2. Materiales y métodos	43
3.3. Método de obtención de nanopartículas	44
3.4. Experimentación.	44
3.4.1.-Método electroquímico de preparación de nanopartículas de oro en solución acuosa.	45
3.4.2.-Método de obtención de Arsénico coloidal	45
3.4.3.-Preparación de plata coloidal de alta pureza	46
3.4.4. Preparación de soluciones acuosas de plomo coloidal	47
3.4.5.-Método para obtención de nanopartículas de selenio.	47
3.4.6.-Método electroquímico para la obtención de nanopartículas de Cadmio	48
3.4.7.-Método de obtención de nanopartículas de Manganeseo	48
3.4.8.-Complejo Ademetionina Manganeseo método de preparación	49
3.4.9.-Método de preparación de nanopartículas de Zinc	49
3.4.10.-Complejo Zinc-Ademetionina	49
3.4.11.-Método de preparación del complejo Zn-mesalazina. Complejo de Zn-salofalk (mesalazina)	50
3.4.12. Método de preparación del complejo Zn-ácido ursodesoxicólico	50
3.4.13. Método de preparación de Magnesio coloidal	51
3.4.14. Solución de cobalto coloidal	51
3.4.15. Molibdeno coloidal	51
3.4.16. Solución coloidal de Paladio	52
3.4.17. Solución coloidal de Platino	52
3.4.18. Solución coloidal de Hierro	53
3.4.19. Solución coloidal de Litio	53

3.4.17. Solución coloidal de cobre coloidal	54
Capítulo 4. Análisis de Resultados	56
4.1. Resultados de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR)	57
4.2. Espectroscopia UV-Visible	66
4.3. Análisis de contenido elemental Por Emisión Óptica de Plasma de Microondas MP-AES	75
4.4. Determinación de tamaño de partícula nanométrica por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	91
4.5. Análisis de superficie por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM). Análisis químico por Espectroscopia de Energía Dispersada por Rayos-X EDS	97
4.6. Análisis de microscopia óptica confocal	103
4.7. Discusión del análisis de resultados	113
Capítulo 5. Discusiones y Conclusiones	117
5.1. Discusiones finales	117
5.2. Conclusiones	117
5.3. Perspectiva a futuro	119
Referencias bibliográficas	121
Anexo: Publicaciones	144

Capítulo 1

Aspectos Generales

1.1 Introducción

Desde hace unos años la nanotecnología se está perfilando como un área emergente en ciencia y tecnología que nos está conduciendo a una nueva revolución industrial. La nanotecnología se define como el «desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm, para obtener una comprensión fundamental de fenómenos y materiales en dicha escala nanométrica y para crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño». Nanómetro (del latín nanus, enano) significa la milmillonésima parte de 1 metro. Lo más interesante de la nanotecnología no es la posibilidad de trabajar con materiales de reducidas dimensiones, sino el cambio a menudo radical que sufren las propiedades físicas y químicas de la materia cuando se trabaja a esta escala: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia o la elasticidad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hace el material volumétrico (Figura 1). Por ello, la nanotecnología tiene gran aplicación en diferentes campos, entre los que destacan los materiales, la electrónica, la medicina y la energía. Se han alcanzado ya avances significativos en la fabricación de materiales de mayor dureza y resistencia, ordenadores más veloces y con mayor capacidad de procesamiento gracias a los microprocesadores con componentes nanotecnológicos, diagnósticos médicos más eficaces o la obtención de energía a bajo costo y respetuosa con el medio ambiente. Ya existen multitud de productos «nanotecnológicos» en el mercado, como cosméticos más eficaces y protectores, raquetas de

tenis más flexibles y resistentes, gafas que no se rayan, ropa que no se arruga ni se mancha, por citar algunos ejemplos.

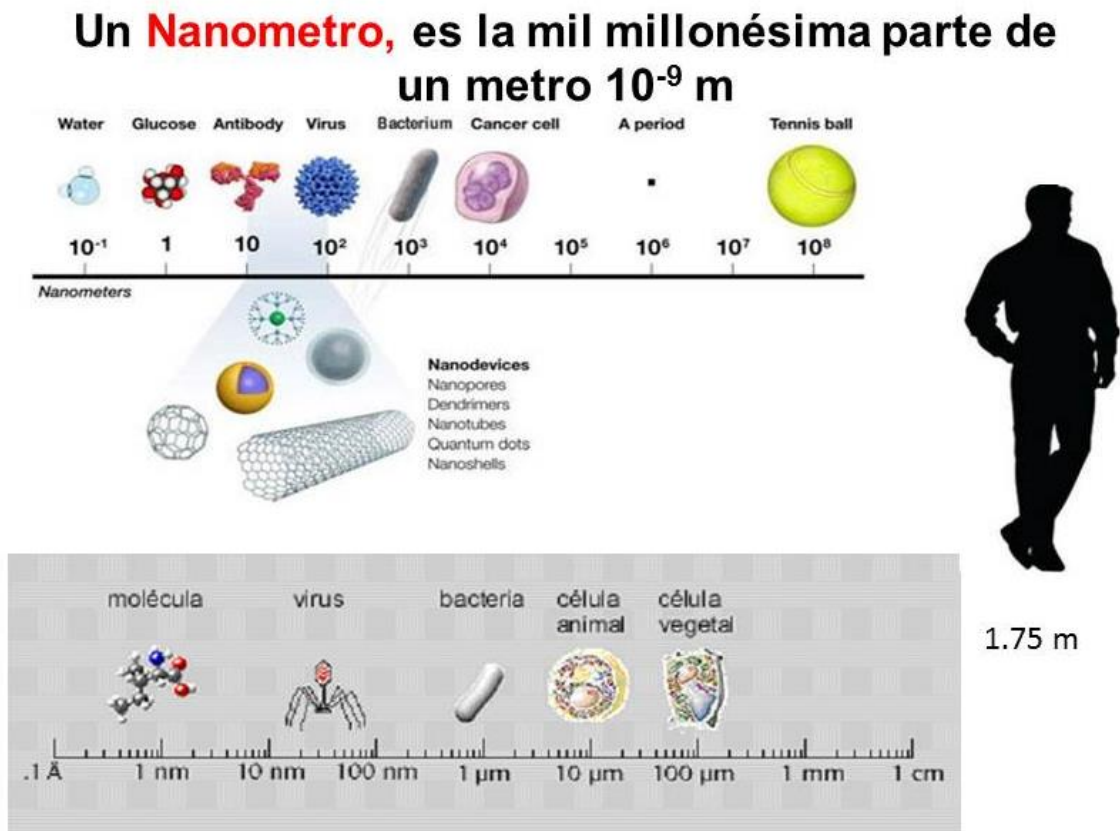


Figura 1. Las medidas en la nanotecnología

1.2-Objetivos generales

- Obtener nanopartículas de elementos metálicos y no metálicos esenciales
- Validar y caracterizar nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales con importancia clínica, en medio acuoso.
- Realizar ensayos con nanopartículas y sustratos vegetales

- Valorar la estabilidad de nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales, tratadas con Quitosán, ácido ascórbico, fructuosa y/o citrato de sodio.

1.3.- Objetivos específicos

- Obtener nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales menores a 20 nm y preferentemente de 1 a 10 nm con alto grado de estabilidad.
- Determinar el método adecuado para obtener nanopartículas con alta pureza, tamaño, y estabilidad de elementos esenciales y no esenciales.
- Analizar el comportamiento entre nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales y sustratos vegetales
- Analizar los mecanismos a través de los cuales generan su efecto las nanopartículas no funcionalizadas en el medio intravascular e intersticial.
- Analizar los mecanismos a través de los cuales generan su efecto las nanopartículas funcionalizadas.
- Reconocer la importancia del uso de terapéuticas simultáneas.
- Reconocer la importancia del uso de nanopartículas sometidas a procesos biotecnológicos.
- Reconocer la importancia de utilizar un sensibilizador (fuente de energía externa) y nanopartículas, en un sistema biológico.
- Reconocer la importancia de utilizar nanopartículas del menor tamaño posible.

1.4. Metodología

Para la realización de esta investigación se utilizaron técnicas de síntesis de compuestos inorgánicos en medio acuoso por reacciones químicas y electroquímicas, así como reacciones de interface entre sustratos orgánicos e inorgánicos para la creación de nano esferas.

Los parámetros a controlar son en general: pureza de los reactivos de origen principalmente los sustratos metálicos, temperatura, velocidad y tiempo de agitación, tiempo de reacción, variación de potencial aplicado, filtrado, purificación y esterilización de las soluciones coloidales obtenidas.

Para el análisis y caracterización, se utilizaron equipos para realizar análisis espectroscópico como son:

- Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)
- Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-VIS)
- Espectroscopia Raman (RE)

También se utilizaron técnicas de microscopia como las que a continuación se enlistan:

- Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)
- Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)
- Microscopio Confocal (CM)
- Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

Para el análisis de estabilidad de coloides y composición química se utilizaron las técnicas y equipos de:

- Electrones Dispersados de Rayos X (EDX/EDS)
- Espectrómetro de Emisión Óptica Inducción de Plasma (ICP)
- Medidor de Distribución de Tamaño de Partícula y Potencial Zeta por Dispersión Dinámica de Luz (DLS, Dynamic Light Scattering)

.

Capítulo 2

2.1.-Fundamentos Teóricos

2.1. Introducción

La medicina actual enfrenta el problema de mantener el estado de salud. En un mundo que avanza a ritmo vertiginoso, alentado por desarrollos tecnológicos que hacen más sencillos el trabajo humano, utilizando procesos de producción eficientes que proveen de insumos y productos a una población cada vez mayor. Sin embargo, para hacer posible este objetivo, en ocasiones se violentan los procesos naturales, ocasionando aumento considerable de metabolitos tóxicos, que finalmente contaminan aire, tierra y agua. Provocando modificaciones agudas de los procesos biológicos, sin dar oportunidad a los mecanismos de compensación de generar los ajustes necesarios para conservar la condición de equilibrio, dando cabida a la condición de enfermedad, así como cambios sustanciales en la historia natural de la misma; dicho de otra manera, estamos ante enfermedades que presentan mayor agresividad, que ocasionan grandes repercusiones a la salud en menor tiempo, que son en mayor o menor grado resistentes a las diversas formas de tratamiento convencional. Condición que exige el uso de medicinas en forma simultánea y en muchas ocasiones tratamientos secuenciados para poder resolver el problema.

Por todo lo anteriormente dicho, la medicina científica se encuentra en la búsqueda continua de nuevas alternativas de tratamiento, que cumplan con las condiciones de máxima eficacia, selectividad, y que sean amigables con las terapéuticas existentes, todo con la finalidad de potenciar los efectos benéficos y reducir los efectos colaterales de los fármacos utilizados.

Los avances en nanotecnología ofrecen un futuro prometedor en el campo de la medicina, ya que la materia a escala manométrica posee la propiedad de difundir con facilidad en los tejidos corporales, sin el obstáculo que representan las barreras naturales como lo son: la hematoencefálica y el sistema retículo endotelial, la membrana celular, el endotelio vascular que con mucha frecuencia ocasionan fallas en la entrega y disposición del fármaco. Es bien conocido

que la elección del tamaño y pureza de una partícula son factores que favorecen su tránsito por el torrente sanguíneo. Incluso facilitan su entrega, sin embargo cuando estos condicionantes no se pueden cumplir, la nanotecnología ofrece como recurso el utilizar partículas con recubrimientos que el cuerpo reconoce como parte de sí, como sucede con el uso de polietilenglicol, albúmina, colesterol, fructuosa, folatos y fosfolípidos; esta estrategia permite no solo garantizar la entrega y disposición del fármaco, sino además, el componente de la estructura que funge como vial de transportación puede ser utilizado como señuelo en patologías con altos requerimientos del mismo, como sucede en algunos tipos de cáncer.

El uso de partículas con la intención de repercutir un sistema in vivo, exige el conocimiento pleno del comportamiento de la misma. Según la vía de administración que se pretende utilizar, así como las reacciones biológicas en que participa, o bien al tejido que se incorpora, capacidad del sistema para depurarla, tiempo de depuración. Además, es importante saber si el elemento a utilizar es del orden esencial, es decir, aquellos que son vitales y de aporte exógeno.

2.2. Nanopartículas y vías de administración

2.2.1. Administración oral de nanopartículas

Siempre que sea posible, la vía de administración de elección será la vía oral, ya que es la vía natural, a través de la cual ingresan hacia nuestro organismo todo tipo de sustancias necesarias para el buen funcionamiento, esta vía ofrece seguridad, ya que mediante el mecanismo de vómito y diarrea se puede deshacer de sustancias no deseadas, antes de que la absorción de la misma se haya llevado a cabo en forma significativa. En el resto de las vías de administración este efecto no se presenta, representando en cualquiera de los casos una desventaja.

2.2.2. Nanopartículas y vía de administración intravenosa

La vía de administración endovenosa ofrece rápida presencia del fármaco en torrente sanguíneo, evita efecto de primer paso, es decir, todo tipo de modificaciones que sufre una sustancia al exponerse al jugo gástrico, sales biliares, enzimas, antes de su absorción. Sin duda

alguna, cuando se busca generar un efecto rápido, esta vía siempre será una buena elección, es importante tomar en consideración el tipo de solución que se pretende utilizar, así como el tamaño de la materia que funge como soluto. Estos factores juegan un papel muy importante en la capacidad de generar una respuesta violenta, por ejemplo en un paciente deshidratado, un facultativo puede administrar varios litros de disolución de cloruro de sodio al 0.9%, sin provocar otro efecto que beneficio, mientras que la administración de una solución coloidal en la que participa un elemento de transición a escala nanométrica, en la mayoría de los casos, ocasionaría en el paciente, aumento de temperatura considerable, cambios en la tensión arterial, modificaciones en la oximetría, esto debido a que estos elementos participan en reacciones tipo redox, en las que liberan grandes cantidades de radicales libres de oxígeno entre otros.

A escala nanométrica la superficie de contacto aumenta en forma exponencial, esto resulta ser de gran utilidad cuando se desea repercutir un sistema biológico hasta el orden molecular; más aún la presencia de nanopartículas en tejidos que reciben radiación ionizante pueden aumentar considerablemente el efecto citolítico de la misma, es decir, el poder destructivo de la radiación que el tejido absorbe; en la actualidad el personal entrenado para aplicar radioterapia realiza mediciones en base a somatometría, ubicación de la lesión a tratar, así como el o los ángulos en que serán realizados los disparos, todo esto redundando en que terapia se vuelve más selectiva, de tal forma que aun intensificando el efecto, el daño colateral es mínimo y en el mejor de los casos no se presenta. Existen otras formas de tratamiento en las que se utilizan ondas electromagnéticas y nanopartículas como insumos para producir efectos devastadores en zonas específicas, bajo el principio de hipertermia, por otra parte, la terapia fotodinámica utiliza una fuente de energía externa y un fotosensibilizador para generar muerte celular, bajo el principio de liberación de especies reactivas de oxígeno. Evidentemente estas terapias vienen a robustecer el arsenal de manejos mínimo invasivos. Conforme han ido avanzando las técnicas de imagenología, los conocimientos sobre la afinidad que guardan, iones, radioisótopos, con zonas corporales sanas y en condición de enfermedad, ha dado lugar al concepto de **“Teranóstica”**, el cual, día con día cobra mayor importancia, ya que desde el punto de vista de imagen nos permite mayor fidelidad, además del beneficio extra en el camino de curar la enfermedad. Por otra parte, se debe tener sumo cuidado, ya que puede dar origen a nuevas

formas de patología (como sucede en cáncer inducido), un aspecto importante de este tipo de tratamiento es que no distingue estirpe histológica, en este caso el sistema biológico participa a través de sus mecanismos de transportación para concentrar el elemento en el sitio que deseamos intervenir. Cuando esto no es posible, sin generar daño colateral, la aplicación directa del elemento resulta ser una buena opción, lo cual la vuelve una herramienta extraordinaria; cómo podemos ver, los avances de la medicina en las áreas anteriormente mencionadas, giran en torno a 2 tipos de insumos fundamentalmente; nanopartículas y fuentes de energía externa.

En algunas áreas de la medicina, la patología supera las formas de tratamiento, en ocasiones por factores inherentes al agente causal, al paciente y en otras, por factores relacionados con el tratamiento; en cualquiera de los casos esta condición motiva el pensamiento holístico por parte del clínico, llevándolo a la búsqueda de nuevas alternativas a la altura de los requerimientos actuales o bien que, en combinación con las terapias ya existentes potencien los efectos benéficos y de ser posible reduzcan los efectos colaterales.

Debido a sus importantes aplicaciones en el campo de la medicina. Se han abierto grandes líneas de investigación y desarrollo, así como de aplicación del conocimiento de la materia a escala nanométrica en diversas patologías, dentro de las ventajas que ésta ofrece. Se encuentran, selectividad, facilidad de entrega, disposición de fármacos, así como interacción con otras terapéuticas con las que logra efectos sinérgicos, de esta manera la nano tecnología permite interactuar con el agente causal, con el paciente y a su vez resuelve muchos de los problemas inherentes al tratamiento.

2.3. Aspectos importantes de elementos esenciales y no esenciales de gran importancia en sistemas biológicos.

El cobre es un elemento que participa en múltiples vías metabólicas, haciendo posible que se lleven a cabo procesos biológicos vitales como lo son, respiración en donde participa en la síntesis de hemoglobina porque es el transportador de oxígeno por excelencia, por otra parte las cuproenzimas como, la superóxido dismutasa con núcleo de cobre y la ceruloplasmina cumplen funciones antioxidantes, de esta manera son de gran ayuda en el proceso de cito

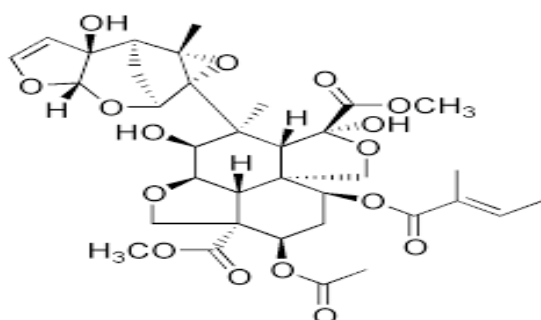
protección siempre y cuando los niveles de cobre sérico se encuentren dentro de rango normal. En los casos en que los niveles de ceruloplasmina se encuentran elevados en forma permanente, como sucede en los procesos inflamatorios crónicos la ceruloplasmina se encarga de oxidar las lipoproteínas de baja densidad, ocasionando depósito de placa de ateroma en la pared vascular, que más tarde se traduce en aterosclerosis. La deficiencia de cobre se manifiesta a nivel de sistema nervioso como poli neuropatía, desmielinización, inflamación del nervio de la visión. (43), entonces el cobre participa a través de la enzima citocromo oxidasa en la generación de energía, reduciendo oxígeno molecular a agua dando lugar a un gradiente de energía que la mitocondria dispone para producción de la molécula almacenadora de energía ATP (5).

Los principales datos de intoxicación por cobre son, dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea. Se sabe que la ingesta prolongada de hasta 10mg no ha sido suficiente para producir daño hepático en pacientes sanos (15), lo cual deja ver que existe gran tolerancia a la ingesta, es importante mencionar que el cobre llega a concentrarse hasta el punto de 80mg, lo cual lo ubica en el tercer lugar en abundancia, por otra parte participa de diferentes maneras, transfiere electrones individuales (43), actúa como centro catalítico y enlaza a otras estructuras, ejerce función en la activación y transporte, la presencia de desequilibrios corporales en función de la concentración óptima del elemento, traen como consecuencia enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson enfermedad de neurona motora (44).

Usos terapéuticos. – el cobre es importante en el manejo de algunos casos de neutropenia por deficiencia del mismo, de igual manera es de gran utilidad en el manejo de infecciones bacterianas (45), en muchas ocasiones no es suficiente el utilizar algún preparado de cobre para erradicar una bacteria y se hace uso de antibióticos logrando potenciar el efecto benéfico, acortando así el tiempo de tratamiento. Es importante valorar la concentración de cobre sanguíneo en pacientes que presentan intoxicación por Zn, ya que las altas concentraciones de Zn ocasionan disminución de la concentración de cobre, en algunos pacientes con anemia ferropénica.

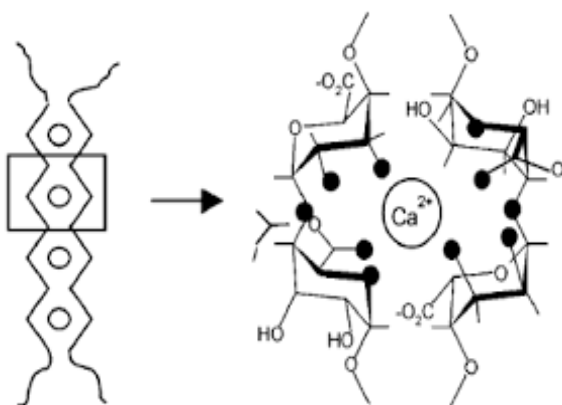
Además, el cobre es sumamente importante, ya que las peroxidasa son cuproenzimas encargadas oxidar (Fe^{2+}) ferroso a férrico (Fe^{3+}), para de esta manera poder ser transportado por transferrina (proteína transportadora de Fe^{3+}) al sitio de formación de glóbulos rojos (46). Es importante recordar que cobre presenta gran afinidad por grupo S-H y N-H lo cual hace a la membrana celular blanco fácil, logra con facilidad unirse a estos grupos ocasionando lisis de la misma y por consiguiente muerte celular, de allí la importancia de cobre en el manejo de cáncer [93,94]. Por último, la vía de eliminación de cobre por excelencia es la vía biliar, mientras que el cobre que no es ligado a nivel de intestino delgado por metalotionina, terminará eliminándose a través del excremento.

Interacción de cobre con biomoléculas posibles escenarios. El cobre tiene afinidad por; Azufre (S), Nitrógeno (N) y Oxígeno (O).



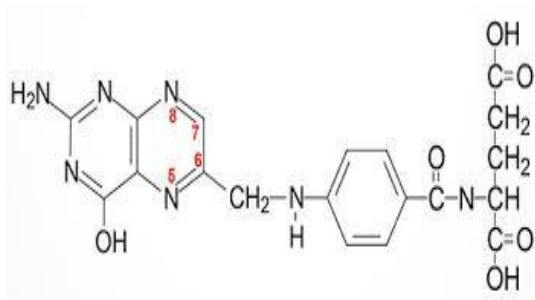
Azidaractina. Es evidente que los posibles sitios de unión del cobre serian, aquéllos en los que encontramos oxígeno y grupos OH, de tal forma que esta estructura triterpénica, resulta atractiva para su unión en múltiples sitios.

1) Azidaractina



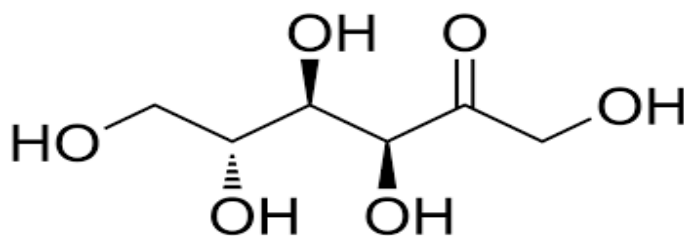
Las propiedades de Alginato como andamio son ampliamente conocidas, el complejo Alginato cobre puede ser de gran utilidad en el manejo de heridas. La aplicación de soluciones de Alginato, cloruro de calcio, nanopartículas mediante atomizadores permite la formación de biopelículas que se adhieren sin dejar zonas descubiertas.

2) Alginato



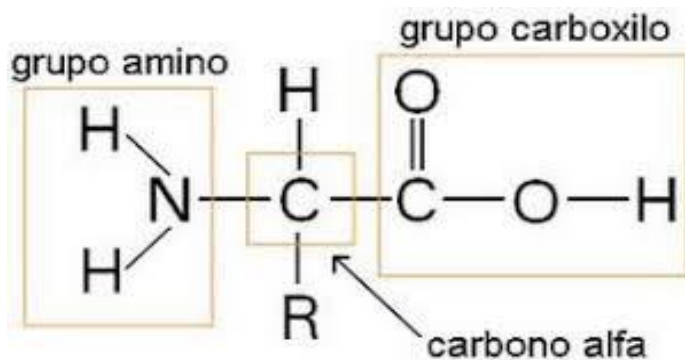
El ácido fólico o vitamina B9 es requerido ampliamente por lesiones tumorales, el cobre guarda afinidad por los grupos S-H, N-Oxígeno, OH. Cobre actúa sobre los grupos tiol y N-H de la membrana celular ocasionando muerte celular.

3).-Ácido fólico



Durante el proceso de elaboración de un hidrocoloide, la fructuosa juega un papel importante en la estabilización, la fructuosa como vial de transportación, evitando que la partícula de cobre genere radicales libres. En torrente sanguíneo.

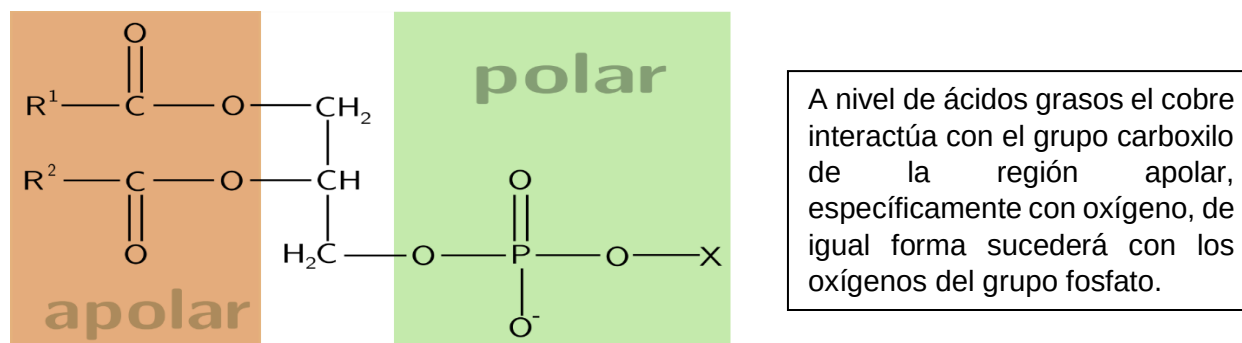
4).-Fructuosa



El cobre forma parte de gran cantidad de metal enzimas, interactúa con el grupo amino y carboxilo de la proteína, la utilización de sustratos vegetales y nanopartículas. Puede dar cabida a la formación de estructuras que por analogía realizan una acción

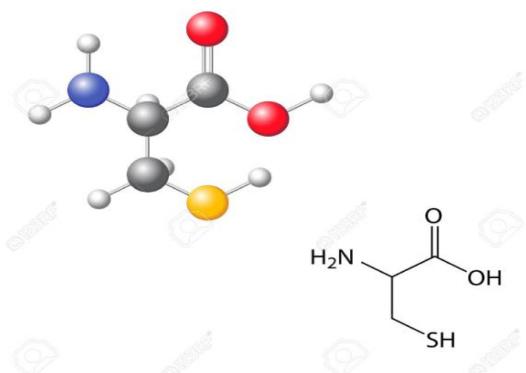
5).-Proteína

La interacción de cobre con la estructura de fosfolípidos, se realiza en el grupo polar representado por el grupo fosfato, de igual manera guarda suma afinidad por las 2 colas de ácidos grasos presente en la parte no polar, de tal forma que puede ser utilizado como vía de transportación y entrega con alto grado de selectividad.

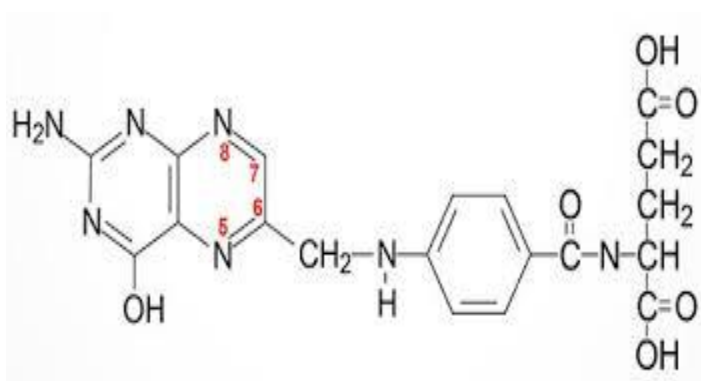


Oro. El hombre en su búsqueda incansable por mantener el estado de salud ha ido reconociendo las propiedades de los elementos que se encuentran en la naturaleza, desde tiempos memoriales el oro ha sido objeto de utilización en enfermedades como la artritis (27,28).

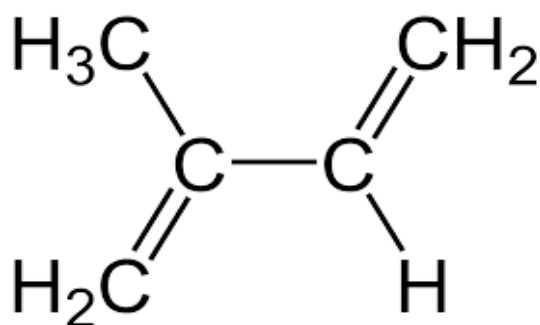
En la actualidad esta práctica se ha extendido a enfermedades como, cáncer de pulmón, y algunas otras infecto contagiosas como lo es el HIV, el avance de la nanotecnología y el conocimiento de los mecanismos de acción de las partículas en las rutas metabólicas en sistemas biológicos, ha permitido ordenar el pensamiento del clínico, en el momento de generar la logística de tratamiento, de esta forma, es del conocimiento actual, que aquellas estructuras funcionalizadas con partículas de oro, con fines terapéuticos, ligan con proteínas del tipo cisteína –tiolato [azufre], o bien cisteína-selenio (27). La presencia de partículas brinda a sus ligandos azufrados alineamientos lineales (S-Au-S), mientras que en el proceso de funcionalización de metabolitos secundarios de sustratos vegetales los posibles escenarios serían los siguientes:



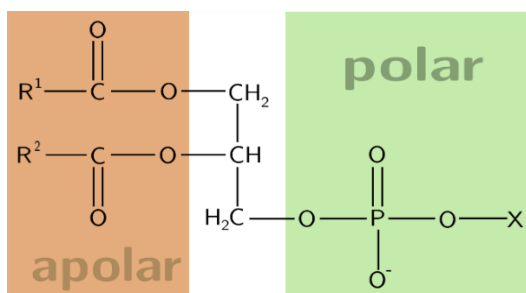
Cisteína. Oro guarda afinidad por grupos tioles, en el caso de su interacción cisteína el grupo S-H, será el sitio de unión. En el caso de metionina el resultado será el mismo, la fuerza de enlace AU-S es de 47Kcal/mol. (32)



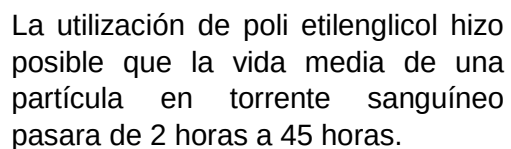
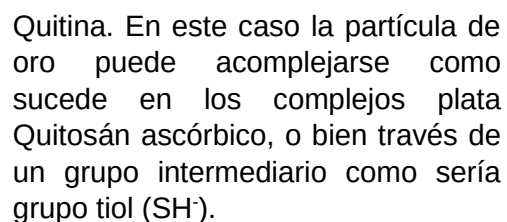
Ácido fólico. Las nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico, han sido utilizadas para señalar en caso de cáncer cervico uterino, el ácido fólico facilita la entrada de nanopartículas a sitios tumorales, oro puede enlazar débilmente con nitrógeno (fuerza de 6 Kcal/mol).



Terpenos. Los electrones π del doble enlace terpénico interactúa con los electrones de transición d en el oro y los pares de electrones libres de los heteroátomos como el S, O, N y P.



Fosfolípidos durante el proceso de elaboración de un liposoma, el utilizar fosfolípidos ofrece como ventaja, rápida transportación transmembrana, para elementos que no tienen esta facultad, como es el caso de algunos iones



(20), además tiene la capacidad de unirse a complejos proteicos y al complejo mayor de histocompatibilidad induciendo la respuesta inmune gestada por células T.

En sistemas biológicos el níquel presentará afinidad importante por péptidos, como es el caso de cisteína. Además, por ligando no proteicos como es el caso de azufre y oxígeno, en cualquiera de los casos, este hecho hace posible la presencia de 2 tipos de hidrogenasas donde la diferencia estriba en que níquel se una a ligando proteico o no (18).

El cuerpo humano concentra en condiciones normales 8 mg de níquel, se desconoce la acción de dicho elemento en vertebrados, pero es bien conocido su poder alergénico. Visto desde otra perspectiva, tiene la propiedad de incitar la respuesta inmune, la simple observación nos enseña que en condiciones normales una piel sana, al exponerse a níquel se desencadena una respuesta localizada dando lugar a una dermatitis. Este hecho deja ver como la presencia de níquel modifica la condición de estabilidad, de una región específica volviéndola blanco del sistema de defensa (8), propiedad que puede ser utilizada para afectar zonas no deseadas.

Litio. El Litio es un elemento que actúa a nivel de sistema nervioso central, en donde se deposita al igual que en hueso y tiroides, se encuentra en el mercado como carbonato de litio, su uso terapéutico está encaminado al tratamiento de paciente con trastorno bipolar y maniaco depresivo (47,6), su acción se ejerce por inhibición de la enzima glucógeno sintetiza kinasa-3b, la cual es responsable, de hiperfosforilar la proteína [tau] responsable de la muerte de neuronas en la enfermedad de Alzheimer (6).

Platino. Método de obtención. Arco eléctrico y electroquímico.

Mediante estos métodos se puede obtener nanopartículas de platino, de 1 a 2 nm. El platino no es un elemento esencial, pero sin duda alguna es el elemento anti cáncer más utilizado, por este motivo es considerado de suma importancia [1]. cis $[\text{PtCl}_2((\text{NH}_3)_2)]$ fue sintetizado por primera vez por el laboratorio de Barnett Rosenberg en la Universidad de Míchigan en el año de 1960. Actualmente algunos análogos como carboplatino y oxaliplatino son aceptados

mundialmente como tratamientos. Un aspecto importante del platino es que logra entrar a la célula por medio del mecanismo de endocitosis, una vez en el interior de la célula las drogas son liberadas por efecto del ambiente ácido (48), finalmente el platino tiene como blanco primario la estructura de DNA (49). Actualmente, se reconoce que el Platino, actúa sobre las proteínas transportadoras de cobre, esto representa un aspecto muy importante si reconocemos las rutas metabólicas de cobre y su significancia biológica.

Depuración de platino. – platino puede ser eliminado por vía renal cuando la partícula es igual o menor a 2 nm.

El Magnesio.- Es un elemento esencial, alcanza concentraciones de 25 g, se puede preparar por método electroquímico con gran pureza, su uso terapéutico es muy amplio ya que participa en replicación, transcripción, traslación de la información genómica (50,51), además aumenta la actividad antiviral en humanos, por lo anteriormente dicho es fácil asumir, que el papel del magnesio no se limita solo a cumplir con la gran tarea de perpetuar la información genómica en forma fiel, además la protege de agentes que tienen la capacidad de producir alguna mutación; trastornos en la homeostasis de este elemento, pueden dar origen a linfomas, mononucleosis infecciosa ocasionada por virus Epstein –Barr [56]

La regulación de la concentración crítica mínima de magnesio intracelular, está dada por el transportador magt1.

Cromo. Actualmente existe controversia entre si cromo es un elemento esencial o no. Se recomienda ingesta diaria de 30 mg y está presente en un gran número de productos, que comercializan como adyuvante en la reducción de peso, se le reconocen propiedades atractivas en el control de glucosa, con anterioridad se contemplaba la idea de que el cromo formaba parte del factor de tolerancia a glucosa, sin embargo, estudios actuales no demostraron que el cromo estuviera ligado a nicotinato y glutatión, lo cual descarta la esencialidad del cromo por esta vía, aun así picolinato de cromo sigue en el mercado [Cr^{+3}]. Otras presentaciones como [Cr^{+6}], son consideradas carcinogénicas genotóxicos, ya que pueden generar daño directo al DNA, en el

caso de cromo VI tiene como particularidad el poder generar daño al DNA; en ausencia de un agente reductor u oxidante, cromo forma enlaces con carbono e interactúa con gran cantidad de compuestos organometálicos.

Vanadio. El vanadio es considerado un elemento esencial, en el cuerpo humano, alcanza concentraciones de 2.4 mg (1), su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la ATP-ASA Na^+/K^+ , se le reconocen propiedades anti diabéticas, en su condición de vanadato bloquea la proteína ligando de fosfato

Manganeso. El manganeso es un elemento esencial, en el cuerpo humano se encuentra concentrado a razón de 16 mg, las nanopartículas de manganeso de alta pureza pueden ser obtenidas por método electroquímico, este aspecto, resulta de gran importancia cuando se pretende que la partícula sea utilizada, para fines médicos.

Usos terapéuticos. El manganeso participa en reproducción, metabolismo, sistema inmune, regulación de energía, mediante la acción de Mn-enzimas, que el genoma humano tiene capacidad de codificar, por otra parte Mn^{2+} es químicamente semejante a $[\text{Mg}^{2+}]$, en estado de oxidación $[\text{Mn}^{3+}]$ es sumamente accesible en su acción metabólica, un ejemplo de esto es la acción de la su peróxido dismutasa con núcleo de Mn^{3+} que participa de forma importante en la regulación del estrés oxidativo. Actualmente, se reconoce a la enzima glutamina sintetasa como el principal ligando de Mn y ésta ejerce su acción a nivel de sistema nervioso central (14). Desórdenes en la bio disposición de manganeso conducen a trastornos neurodegenerativos como disfunción motora y enfermedad de Parkinson [secundaria a mutación en el gen exportador de Mn], lo anteriormente dicho hace evidente la esencialidad de manganeso ya que al igual que magnesio participa en mantener el estado de armonía de las funciones de ATP, preservar la integridad del genoma, y mantener la homeostasis mediante la modulación de especies reactivas de oxígeno y otras sustancias tóxicas producto del metabolismo (52).

El manganeso tiene alta afinidad por transportadores metálicos de calcio y hierro, su mecanismo de transportación a través de barrera hematoencefálica se desconoce, se considera que lo hace

a través de zonas de la barrera afectadas, de igual forma se considera la posibilidad de transporte activo, difusión facilitada (53,54).

El hierro, es en definitiva un elemento esencial, el cuerpo humano concentra 4.8 g, participan en rutas metabólicas diversas mediante la acción de enzimas que son codificadas por el genoma humano (15), para la química inorgánica ha resultado muy intrigante, la presencia de sulfuro como ligando de hierro, en Fe-S-proteínas (55,56). Las Fe-S proteínas cumplen funciones de catálisis, transporte de electrones, y regulación de hierro, el ligando de azufre es proporcionado por la cisteína mediante la acción de la enzima cisteína disulfurasa, además este tipo de complejos enzimáticos están involucrados en el procesamiento de DNA; la biodisponibilidad de Fe se ve afectada por la ingesta de alimentos.

Niveles altos de hierro juegan un papel importante en el proceso de neuro degeneración (57). Actualmente el hierro tiene diversos usos terapéuticos, algunos óxidos súper paramagnéticos son utilizados en resonancia magnética, el nitro prusiato de sodio es utilizado como anti hipertensivo (58), complejos de hierro + tamoxifeno son prometedores en la terapia de cáncer de mama (16). En la actualidad las propiedades de hierro son utilizadas, en terapias donde se combinan fuentes de energía externa y partículas que tienen afinidad por zonas específicas.

Cobalto es un elemento que se concentra en el cuerpo humano a razón de 1.6 mg, la ingesta diaria es de 2 a 3 mg, trastornos en la utilización de este elemento conduce a presentar anemia perniciosa, ya que se inactiva 1 de las 2 enzimas humanas de las cuales B₁₂ es requerida como coenzima (metionina sintetasa, metilmalonil-coA mutasa) (59), B₁₂ puede ser sintetizada solo por microorganismo (bacterias y archaea), los estados de oxidación de cobalto en los que tiene actividad biológica son +1, +2, +3.

Primer organometálico reconocido en el cuerpo en su forma de Co-C, unido a de oxiadenosil y grupos metilo. Varios genes codifican proteínas encargadas de absorber B₁₂, en el tracto digestivo (60), este hecho resulta interesante, ya que permite visualizar como los seres vivos coexistimos en una constante simbiosis. Los seres humanos obtenemos del medio gran cantidad de sustancias que por sí mismos no podemos sintetizar, sin embargo, nuestro genoma

contiene la información para codificar proteínas, que cumplen con la función de absorción, de una manera sumamente eficiente y selectiva. En la actualidad el cobalto es utilizado para generar drogas antivirales (17).

Zinc. El cuerpo humano concentra 2.6 g, está involucrado en prácticamente todos los aspectos a celular y molecular, participa en 10% de la proteína, el grupo de proteínas de zinc involucra 3000 enzimas con actividad fisiológica (21). El zinc juega un papel importante en la estructura, catálisis, química de coordinación proteica (22).

En el cuerpo humano el zinc está presente básicamente en toda su economía, en algunas regiones se concentra en mayor cantidad como sucede en sistema nervioso (23), es evidente que por el número de enzimas en las que participa el zinc como parte de su estructura, su función en el cuerpo humano es muy grande, es muy posible que los conocimientos actuales sobre las funciones de zinc sean aun poco conocidas, a medida que los conocimientos sobre las rutas metabólicas en que participa y los mecanismos de acción sean revelados, sin duda alguna podremos sacar mayor provecho de este elemento y auxiliarnos en el tratamiento de enfermedades (23).

Actualmente se conoce que zinc realiza su acción como catión divalente uniéndose a enzimas y proteínas, en su estado de oxidación +2 es muy estable por tal motivo se le considera un agente redox inerte, presenta una gran facilidad para coordinarse en su estado de oxidación [IV, V, VI], gracias a esta condición y al hecho de que OH y H₂O le permiten entrar y salir del estado de coordinación, su reactividad se ve favorecida [87].

El zinc presenta gran tendencia a enlazarse con proteínas y ácidos nucleicos, a lo cual debe en gran medida su biodisponibilidad [95,96], el aumento en la concentración de zinc causa inestabilidad de la membrana celular, ADN, Ribosomas, Lisosomas (97), además provoca disminución en la concentración de cobre y fierro, en los dedos de zinc actúa como factor de transcripción, uniéndose a ADN, actualmente se ha identificado en muchos receptores de

membrana jugando un papel importante en señalización, influyendo en la liberación de hormonas y transmisión del impulso nervioso, por otro lado la disminución de la concentración de zinc deja a la célula en un estado de vulnerabilidad, ya que participa en la eliminación de especies reactivas cuando su concentración es adecuada [99].

La concentración adecuada de zinc obedece a dos factores fundamentalmente:

A) Presencia de estrés oxidativo

B) Concentración de metalotionina en intestino delgado (131).

La metalotionina es una enzima de bajo peso molecular rica en cisteína, la cual muestra gran afinidad por metales divalentes como cobre, zinc, calcio, cadmio, los cuales en su momento compiten entre sí, por los sitios dentro de la proteína (21). Una vez que se lleva a cabo la absorción de zinc, se transporta a través de torrente sanguíneo hasta hígado, médula ósea, hueso, piel, riñón y timo, siguiendo siempre este orden, es importante recordar que el transportador plasmático hasta en 70% es albúmina, y en menor grado participarán transferrina, cisteína, alfa macro globulina e histidina.

La excreción de zinc se lleva a cabo a través de secreciones pancreático y biliares, y en menos de 2% por vía urinaria, la concentración de zinc corporal puede verse disminuida, en problemas de absorción intestinal, abuso de alcohol, ingesta de quelatos, como lo es penicilamina (21). El estado carencial severo traerá como consecuencia: deficiente desarrollo psicomotriz, riesgo de infecciones (22), esquizofrenia, Parkinson, demencia senil, accidente cerebro vascular en mayor o menor grado (23). La intoxicación por zinc es muy rara dado el amplio margen de seguridad, el alto consumo de suplementos ricos en zinc está relacionado con la presencia de cáncer de próstata (23).

Fósforo. El cuerpo humano concentra 0.9 kg de fósforo, el 90% se encuentra en apatita en huesos y dientes y el resto en fluidos extra celulares. El fósforo es un poderoso reductor y juega

un papel importante en moléculas biológicas, sobre todo en lo que respecta a la estructura de DNA y RNA, además el fósforo juega un papel esencial en el transporte de energía especialmente en su forma de ATP [poli fosfato Ester].

Deficiencia en la bio-disposición de fosfato ya sea por aporte o bien transportación, pueden derivar en la presencia de rabdomiolisis, falla respiratoria, hemolisis, falla cardiaca (42).

Mientras que el aporte excesivo de fósforo ocasionará enfermedad renal crónica, un hecho importante es que las células cancerosas acumulan más fósforo que las células normales. Es evidente, que el consumo de energía por parte de las células tumorales es mayor, ya que su crecimiento es sumamente acelerado. El conocimiento de los insumos que son mayormente requeridos por los tumores, es fundamental cuando se trabaja con nanopartículas para afectar o en su defecto auxiliar algún órgano dañado. Este efecto puede verse favorecido, si tomamos en cuenta la esencialidad biodisponibilidad, transportación, tamaño de partícula, características fisicoquímicas y repercusiones biológicas, así como el estado de valencia del elemento que se pretende utilizar. Esta condición se ve favorecida en la acción de funcionalización de sustratos de origen biológico. Por otra parte, se pueden utilizar radio isotopos de fósforo que al depositarlos en el líquido pleural o bien peritoneal son de utilidad en el manejo de algunos tipos de cáncer. En algunas patologías el retorno de fluidos, así como el intercambio de fluidos se puede ver afectado por procesos obstructivos de diversa índole, esta condición puede representar una ventaja cuando deseamos que el tiempo de exposición y la concentración de un elemento aumente.

Hidrógeno. Es el elemento más abundante en la naturaleza, es esencial para el ser humano, cumple funciones importantes en estructura, homeostasia, se puede encontrar en forma de protón H^+ o bien de anión H^- , como sucede en el caso de la NAD(p)H reducida, en condiciones normales el pH corporal se encuentra en 7.4. Cifras superiores a este valor nos conlleva a distrés celular. El cuerpo humano cuenta con sistemas buffer de pH como lo es H_2CO_3 , bicarbonato en sangre y por proteínas. Un hecho importante es que el tejido tumoral conserva

un pH de 6 a 7 es decir, se desarrolla en un pH ligeramente ácido con respecto al estimado normal (2), mientras que en la mitocondria el pH fluctúa de 4 a 5 (3).

Sodio y Potasio. El cuerpo concentra 112 g y 160 g de Na y K respectivamente. Estos dos elementos difícilmente pueden ser mencionados por separado cuando se trata de la acción que realizan en la economía corporal, es definitiva su participación en homeostasia celular (7). En las membranas celulares existen enzimas que cumplen funciones altamente especializadas, como lo es la $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ — ATP ASA}$ que introduce sodio y saca potasio de la célula, conservando de esta manera el potencial de membrana. En el transporte activo, involucra el hidrólisis de ATP de donde obtiene la energía necesaria.

Estroncio. No es un elemento esencial, pero participa evitando la carcinogénesis y este hecho lo vuelve sumamente importante (61). La difracción de rayos X revela, que el estroncio valencia $2+ [\text{Sr}^{2+}]$ forma estructuras poliméricas con carboxilato y el oxígeno del agua (10), cumpliendo funciones analgésicas en pacientes con cáncer de próstata metastásico a hueso (11,12).

Silicio. El cuerpo humano concentra 21 g de silicio, aunque no es clara su esencialidad, genes no específicos codifican para silicio [1], y se considera esencial para la formación ósea (36). Es importante para la síntesis de colágeno y su estabilización, así como la mineralización de la matriz ósea; la ingesta de silicio puede favorecer el incremento de la densidad y grosor del esqueleto (37).

En foto sensibilizadores de segunda generación ejerce su acción en células linfoideas, piel, de tal forma que es utilizado en terapia fotodinámica orientada a linfomas (38), cáncer de piel y queratosis actínica [1].

Carbono. Representa el 18% del cuerpo humano, es el segundo elemento más abundante, el rango de estado de oxidación es de +4 (CO_2 y bicarbonato) a -4 (hidrocarburos). El monóxido se produce en el cuerpo humano (3-6 ml por día) y cumple funciones de señalización este hecho lo vuelve importante en el tratamiento de enfermedades. Para la transportación y entrega de monóxido de carbono en sitios específicos donde ejerce su acción se utilizan complejos metal carbonilo. Un ejemplo de esto $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glicerato})]$ también llamados [CORMS] (35), que en sistemas biológicos actúan como precursores en la generación de otros complejos organometálicos

Osmio. Su importancia radica en que en su forma de tetra óxido de osmio (OsO_4) es una molécula que mimetiza a la enzima superóxido dismutasa y cataliza la dismutación del superóxido, la cual es una especie reactiva involucrada en la respuesta inflamatoria (62). Un aspecto importante del comportamiento del osmio en el cuerpo humano es que se distribuye posteriormente a su aplicación en tejidos inflamados, como sucede en los casos de síndromes reumatológicos (24,25). La utilización de organometálicos donde se involucra osmio son vistos como una promesa en el manejo de cáncer (26).

Mercurio. Es utilizado para preservar vacunas (40), un aspecto importante es que su uso no reduce la eficacia de las mismas, puede ser causa de autismo en niños. La utilización de thiomersal elimina al mercurio y previene el efecto antes mencionado (29).

Aluminio. Es el metal más abundante por peso en la tierra y el tercero más abundante solo después de oxígeno y silicio; se desconoce su rol biológico, pero se relaciona con enfermedades crónicas (63,31). La absorción en sangre puede ocasionar su deposición en el cerebro provocando demencia y muerte (31). El aluminio está implicado en el proceso de estrés oxidativo ocasionando Alzheimer y Parkinson (30).

Galio. Puede suprimir el implante de tumores subcutáneos (32), actualmente se encuentra en estudio el manejo de este elemento en tumores como rabdomiosarcomas, neuroblastomas, linfomas no Hodgkin y tumores sólidos refractarios (64). El manejo de pacientes con galio ocasiona disminución de los niveles de calcio (34).

Germanio. No hay evidencia de su esencialidad en el hombre, se utiliza en algunos tipos de cáncer y pacientes con enfermedad por HIV (65,66). La intoxicación por germanio causa nefropatía, anemia, miopatía, desórdenes gastrointestinales, teratogenocidad, carcinogénesis, y baja mutagenicidad. Compuestos como el Bis 2-carboxietil germanio tienen efectos interesantes en el manejo anti cáncer, quemaduras, hepatitis, y algunos problemas cardiovasculares (67).

Plomo. El plomo es un elemento sumamente tóxico ya sea inhalado o ingerido, afecta sistema nervioso central, algunos otros síntomas son plétora, anemia, nefropatía, dolor abdominal (40,41). Los compuestos organometálicos de plomo son metabolizados en hígado, por la p_{450} dependiente de monooxigenasas a metabolitos neurotóxicos (68). En la actualidad se trabaja con plomo y monoclonales como una promesa anti tumor, ya que se unen al factor de crecimiento epidérmico 2(HER2) que es un receptor de tirosina quinasa que se encuentra sobre expresado en la superficie de células tumorales, por ultimo el plomo tiene la capacidad de inhibir la síntesis de grupo [haem] vía inhibición de ALA dehidratasa y ferroquelatasa.

Nitrógeno. El cuerpo humano concentra 2 kg, que representa el 3% de su peso, está presente en proteínas, amino ácidos, bases nitrogenadas, RNA y DNA, es un elemento esencial, su estado de oxidación fluctúa de -3 (NH_3) A +5 (NO_3^-). Los radicales libres de nitrógeno cumplen funciones sumamente importantes en el cuerpo humano que van desde señalización, neurotransmisión, contracción muscular, reacciones inmunes (69). Los radicales libres de nitrógeno, son producidos vía conversión de L –Arginina a L-Citrulina, por el óxido nítrico sintetasa (NOS). Usando NADPH y oxígeno (70).

Oxígeno. Respiramos aire del cual 21% es oxígeno, y más del 50% de nuestra masa corporal la representa la presencia de este elemento. Actualmente, se sabe que la presencia de especies reactivas de oxígeno, son sumamente dañinas generando (muerte celular), de este hecho resulta el fundamento de la terapia fotodinámica, el estado de oxidación en el cuerpo humano del oxígeno va de 0 (O_2) a -2 (H_2O), resulta evidente que la homeostasia del oxígeno es crucial para la vida de los vertebrados. Es un aceptor de electrones en reacciones redox para la generación de ATP y participa en la generación de mediadores de señalización [82]. La disminución en la concentración de oxígeno a nivel corporal puede ocasionar patologías severas dentro de las que figuran el cáncer (81), mientras que el aumento en el suministro de oxígeno a los tejidos puede incrementar la concentración de especies reactivas como son (1O_2 , O_2^- , H_2O_2 , OH) (80).

La hiperoxia puede ocasionar disrupción en el balance de oxidantes y antioxidantes, causando daño celular (82). El peróxido de hidrógeno cumple funciones de mensajero secundario, en la producción enzimática y degradación de tioles generando las condiciones adecuadas para la señalización (157).

Azufre. El azufre figura dentro de los elementos esenciales, participa en numerosos procesos de oxidación. Su estado de oxidación fluctúa de -2(sulfuro) a +6(sulfato, SO_4); ocupa el séptimo lugar en abundancia en el cuerpo humano en el cual concentra 160 g, los compuestos de azufre tienen 2 electrones donadores y 1 electrón aceptor en reacciones metabólicas [metionina].

El tio éter amino ácido tiene mayor manejo metabólico y catalítico, iniciando la síntesis proteica, y llevando reacciones reversibles redox que protegen la integridad de las proteínas [84]. Por otra parte, existe un tiol tripéptido intracelular llamado [GSH], que cumple funciones de detoxificación de drogas y carcinógeno (73), en otras palabras, protege a la célula del estrés oxidativo directamente o como cofactor de glutatión, el tioredoxin es el tipo de proteína que tiene

sitio activo de tiolsulfuro y cumple su rol de señalización redox (72), como la sulfhidratación de residuos de cisteína (71).

La sulfhidratación es responsable de la regulación de inflamación y señalización de estrés del retículo endoplásmico, así como la tensión vascular (73). Los blancos farmacológicos del ácido sulfhídrico [H_2S], son el canal de potasio sensible a ATP y la señal extracelular que regula quinasas (proteína quinasa B). El H_2S puede ser benéfico para la prevención y tratamiento de aterosclerosis (79, 80). En cuanto declina la concentración de H_2S , se induce la delación genética de ensamblados en la mitocondria y transportados fuera, donde se incorpora a ferredoxinasa [79].

Selenio. Los requerimientos diarios de selenio son de 55 mg/día, se considera que el cuerpo humano concentra 4 g de selenio el cual se encuentra formando parte de la estructura de innumerables enzimas desde donde cumple funciones de anti oxidación como es el caso del glutatión peroxidasa que son reconocidas por su efecto de cito protección distribuidas en prácticamente toda la economía corporal. De esta manera, el glutatión peroxidasa tipo 1 se ubica en el citosol, el tipo 2 en pulmón e intestino, el tipo 3 en tiroides y riñón, el tipo 4 que actúa a nivel de fosfolípidos y el tipo 5 que actúa en epitelio olfatorio.

El selenio es a su vez un protector del código genético, de esta manera podemos observar que su función es generada a través de selenio proteínas. Otro aspecto de suma importancia en que participa el selenio resulta ser la señalización Redox (74). El selenio –metil-seleno-L-cisteína está en fase de prueba como preventivos de cáncer de próstata, mientras que seleno sulfuro es manejado como anti fúngico (75). En los animales el aminoácido selenometionina puede ser incorporado en el sitio dentro de la proteína, que corresponde a metionina, mientras que las plantas no requieren selenio, pero lo incorporan del suelo a través de moléculas que contienen sulfuro.

Flúor. El flúor es un elemento que cumple funciones muy importantes en el transporte proteico, lo cual le brinda el carácter de esencial, la economía corporal concentra 3 g. HF cumple funciones específicas en el transporte proteico. F^-/H^+ co-transportador, F^-/OH^- anticipador proteico (77).

Arsénico. Desde la antigüedad el arsénico fue conocido por sus propiedades tóxicas, su ingesta provoca aumento en el vaciamiento intestinal, hematuria, hiperestesia muscular y fallecimiento, por la concentración que alcanza en el cuerpo humano se ubica dentro de los elementos ultra traza. En condiciones normales, el arsénico se concentra en el fluido sanguíneo a razón de 4 nM. Con una vida media de 2 h (85), la ingesta prolongada de arsénico ocasionará por acción enzimática, diarrea, vómito, sangrado por orina, calambres musculares y muerte, se concentra en torrente sanguíneo de 4 a 30 nM. Por acción enzimática puede convertirse en monometil y dimetil arsénico por efecto de la arsenita metiltransferasa, el arsénico decrece los niveles de ATP, el As^{3+} tiene alta afinidad por los tioles y puede inhibir enzimas como la pirúvica deshidrogenasa (78).

Cadmio. Dentro de los metales considerados como tóxicos o contaminantes se encuentran el mercurio, cadmio, plomo, bismuto. El cadmio fue identificado por primera vez en 1817, en su forma catiónica $Cd(II)$ presenta gran analogía con Zn y Ca, se encuentra como metal puro como contaminante del carbonato de zinc, como óxidos, sulfuros. cadmio es considerado como un gran contaminante ya que menos del 5% puede ser reciclado (107).

La toxicidad de cadmio, está en función a su depuración en el cuerpo humano, ingresa al cuerpo a través de piel, pulmón, intestino delgado en el que permanece unido a metalotionina hasta que la mucosa se descama y produce su eliminación a través de heces fecales (108,109). Aun así, parte del cadmio puede llegar a torrente sanguíneo viajando unido a albúmina, este hecho le permite llegar a hígado donde se liga a glutatión para finalmente eliminarse en cierto porcentaje por bilis, la otra parte viaja hasta el riñón en donde penetra la célula hasta alcanzar

el lisosoma, donde el complejo cadmio-metalotionina es separado en sus fracciones provocando depósito de cadmio en el citosol (110,111). La vía urinaria sigue siendo el principal conducto de eliminación de cadmio (112).

El cadmio es considerado un metal genotóxico, ya que tiene la capacidad de interactuar con el material genético, produciendo mutaciones. Por otra parte, es un elemento que tiene como característica la de ser poco reactivo, debiendo su capacidad para generar daño a la competencia que tiene por el sitio activo de zinc, cobre, calcio o hierro, los cuales, al verse desplazados, se acumulan en el torrente sanguíneo donde gracias a su gran capacidad para participar en reacciones redox, liberan grandes cantidades de HO, H₂O₂, óxido nítrico, oxígeno singulete (114).

En los estados carenciales de los elementos susceptibles a ser desplazados por cadmio el efecto tóxico de este elemento se potencia ya que actúa fuertemente con los grupos S-H, y OH, carboxilo, fosfatidil, cistenil, metalo enzimas (114).

En el proceso de detoxificación de cadmio, juegan un papel importante algunas plantas como (espartina densiflora), y algunos animales como son el caracol común y la trucha (92). En el reino vegetal, el cadmio se une a fitoquelantes y ácidos grasos, mientras que en animales se une a metalotionina, glutatión, albúmina (116). Actualmente se estudian estrategias de detoxificación utilizando levaduras, mediante las cuales se pretende cambiar el estado de oxidación logrando disminuir su reactividad (117).

Desde el punto de vista de medicina alopática, el uso de ácido etilendiamino tetra acético, sirve para eliminar metales considerados contaminantes, dentro de los que se encuentra el cadmio (118). Diariamente se utilizan sustancias como dimercaprol para eliminar arsénico, plomo y mercurio. Aspectos importantes de elementos esenciales y no esenciales de gran importancia en sistemas biológicos.

A continuación, se presenta una tabla donde se observa cuales elementos pueden tener algún tipo de participación en patologías diversas, con base en su mecanismo de acción, así como en las rutas biológicas en que participan.

Tabla 2.1. Correlación clínica y elementos esenciales y no esenciales.

Patología						
Infecciosa	Metabólica	Hidroelectrolítica	Oncológica	Autoinmune	Hematológica	Psiquiátrica
Cu	Cu	Na	Cu	Au	Fe	Li
Co	I	K	M	Se	Cu	Mg
Au	Fe	Mg	Ti	Zn	Co	
Mg	Co	Cl	Cr	Mg	Mo	
Ag	Cr	P	Fe	Mn	Te	
Ro	V		Au	Cu		
B	Mn		Pt	Ni		
Ge	Mo		Mo	Os		
Pb			Pd	Al		
Sb			Cd	Te		
Bi			Hf			
Se			Rd			
			Re			
			Sm			
			Ho			
			Ga			
			Si			
			Ge			
			As			
			Bi			

			S			
			O			
			Te			

En la interacción de metales esenciales y metales tóxicos pueden presentarse varios escenarios.

- A). Disminución de la concentración del elemento deseado (1).
- B). Competencia por su receptor.
- C). Competencia por su transportador (1).
- D). Activación de receptor de membrana.
- E). Interacción con ligandos, grupos funcionales (93).

Los metales que penetran hasta el núcleo celular, pueden ocasionar.

- 1). Generación de radicales libres, con consiguiente daño al DNA (30).
- 2). Incorporación al DNA (30).
- 3). Formación de puentes entre ADN y ADN.
- 4). Oxidación de bases nitrogenadas (5).

En cualquiera de los casos cada uno de estos escenarios nos lleva a una condición pre mutagénica. Con riesgo alto de que se presenten cambios en la información genética, perdiéndose el carácter de fidelidad con todos los riesgos que esto conlleva, cuando hay exposición a metales las enzimas involucradas en la transcripción se ven afectadas al igual que el proceso de metilación del ADN, se introducen a la célula por endocitosis, la cual pertenece a las formas de transporte activo. En este tipo de transportación existen tres formas fundamentales: en una la endocitosis involucra partículas sólidas del medio intracelular, mismas

que son atraídas hacia la membrana celular la cual se invagina permitiendo que la partícula se aloje, para posteriormente formar una vesícula hacia el interior del medio intracelular. En el segundo caso, la endocitosis es mediada por receptores, en este caso partículas de mayor tamaño como lo son proteínas se fijan a receptores específicos que se encuentra ubicadas en la membrana celular, una vez que la proteína se une a su receptor inicia el proceso de endocitosis.

Este proceso es muy importante ya que provee a la célula de nutrientes y además participa en el proceso de renovación de la membrana celular, en el caso de la pinocitosis, el contenido de la vacuola que se genera cuando se invagina la membrana celular no es selectivo pudiendo de esta manera ingresar el contenido del líquido extracelular.

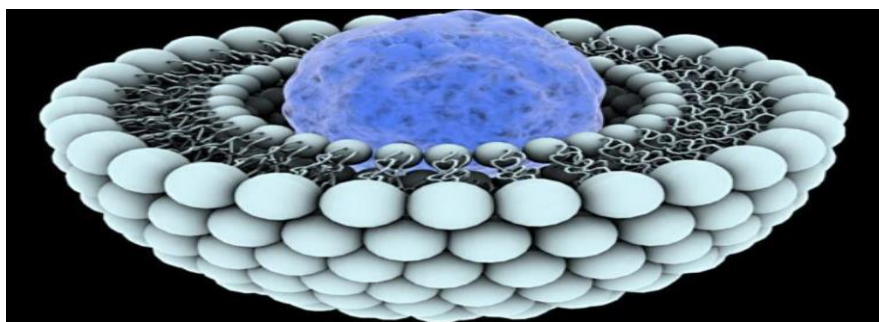
Como tercer término tenemos la fagocitosis la cual es llevada a cabo por células especializadas como lo son los macrófagos, a diferencia del mecanismo de endocitosis mediada por receptores, la fagocitosis no provee a la célula de insumos, de allí la importancia de utilizar el tamaño de partícula adecuado o bien un recubrimiento que le brinde carácter de invisibilidad, ya que de otra forma corre el riesgo de terminar en el interior de un macrófago.

2.4.3.-Nano somas

La creación de nano esferas recubiertas con biomoléculas ha resultado de gran importancia para la medicina (183), en este caso hablaremos de liposomas, los cuales son nano somas con recubrimiento lipídico que confinan en su interior un contenido acuoso o bien lipídico aprovechando la propiedad antipática del lípido (184), que hace las veces de un vial. Para preparar liposomas se utilizan lípidos naturales y/o sintéticos, nanopartículas cuyos tamaños pueden fluctuar desde 1 hasta 100 nm factor que es de suma importancia para la transportación y entrega de su contenido, la parte hidrófoba de la bicapa lipídica ofrece una barrera para

sustancias hidrofílicas que son afines a la superficie interna y externa de la membrana(186). Ya que los fosfolípidos al ponerse en contacto con sistemas acuosos, las fuerzas hidrófobas orientan la parte apolar del lípido hacia el centro de la bicapa mientras que la parte polar hace contacto con el medio externo. Ambas capas mantienen su posición gracias a las fuerzas de van der Waals, finalmente la estabilidad de la bicapa lipídica se debe a enlaces puente de hidrógeno e interacciones entre la parte polar del fosfolípido y el agua circundante (181).

Una característica importante de los liposomas es que pueden contar con una o varias capas, lo cual les brinda la propiedad de liberar en mayor o menor tiempo su contenido, entre mayor sea el número de capas mayor será el tiempo que se requiera para liberar el contenido. Además, el hecho de que los fosfolípidos queden confinados al interior de un liposoma multilamelar impide su transferencia hacia lipoproteínas, en algunas ocasiones se utilizan poli etilenglicol y carbohidratos para evitar que la nano estructura sea absorbida por el sistema retículo endotelial(187).



Estructura del liposoma

La capa lipídica normalmente suele ser impermeable a sustancias hidrófilas, como lo son los agentes anticancerígenos y altamente permeables a sustancias hidrófobas como lo es el paclitaxel. El coeficiente de partición aceite /agua determina el sitio que ocupará el fármaco. Mientras que el tamaño del liposoma determinará con mucho el destino del mismo, como se comentó en párrafos anteriores, en tejidos enfermos las condiciones de permeabilidad se encuentran modificadas, como sucede en pacientes oncológicos en los que los tumores presentan angiogénesis muy rápida con endotelio discontinuo de hasta 500 nm (185,186). Esta característica permite el paso de moléculas de gran tamaño al espacio intersticial y condicionando el ingreso al interior de la célula por proceso de fagocitosis, en cualquiera de los

casos el tamaño ideal recomendable para la entrega de fármacos es de 50 a 100 nm (187). Es importante el mecanismo de ingreso del liposoma al interior de la célula, el mecanismo de fagocitosis es utilizado cuando el tamaño de la partícula alcanza igual o mayor de 150nm (51,184), mientras que mecanismos de ingreso como lo son la endocitosis en la que intervienen receptores se da en partículas de tamaño menor a los 150nm y preferentemente en el rango ideal de 50 a 100 nm ya antes mencionado, otro factor muy importante a considerar en la entrega de fármaco en la que intervienen liposomas es la carga de superficie ya que esta puede ser positiva, negativa o neutra. En el caso de los liposomas con carga neutra, su estabilidad física estará muy comprometida, por tal motivo descargarán su contenido en el medio extra celular. Los liposomas con carga positiva protegen enormemente su integridad física ya que aumentan las fuerzas de repulsión en el sistema en que se encuentran, los liposomas con carga negativa son menos activos que los de carga neutra y positiva (200).

Para preparar un liposoma deben ser tomadas en consideración algunas variables.

- Características fisicoquímicas de los componentes del liposoma incluyendo su contenido (186).
- Toxicidad del contenido (159).
- Tamaño y vida media
- Costo
- Reproducibilidad procesamiento post formación (190).

Procesos a que puede ser sometido el liposoma posterior a su formación;

- Sonicación (irradiación ultrasónica) (192).
- Extrusión (paso a través de membrana) (194).
- Homogenización de alta presión (paso a través de una válvula).
- Centrifugado. (190)
- Calentamiento.
- Secado por pulverización.

- Secado por congelación.
- Supercrítico de fase inversa evaporación (191)
- Inyección de etanol-modificado.
- Micro fluidos. -permite el control estricto del proceso de hidratación de lípidos (195).

Sistemas continuos de flujo de micro fluidos. - esta metodología promete producción continua y homogénea a nano escala (172).

Valoración de liposomas.- algunas características importantes de valorar en un liposoma suelen ser tamaño, forma, lamelaridad., el tamaño del liposoma es evaluado a través de microscopia electrónica, la valoración de lamelaridad se realiza a través de tinción negativa y freeze fracturing para microscopia electrónica de transmisión (TEM), resonancia magnética, mientras que el tamaño del liposoma es evaluado a través de dispersión dinámica de luz (DLS), cromatografía de exclusión de la luz dispersa (ya que los liposomas en suspensión, experimentan movimiento browniano aleatorio) (170).

Los liposomas como viales de transportación ofrecen las siguientes ventajas.

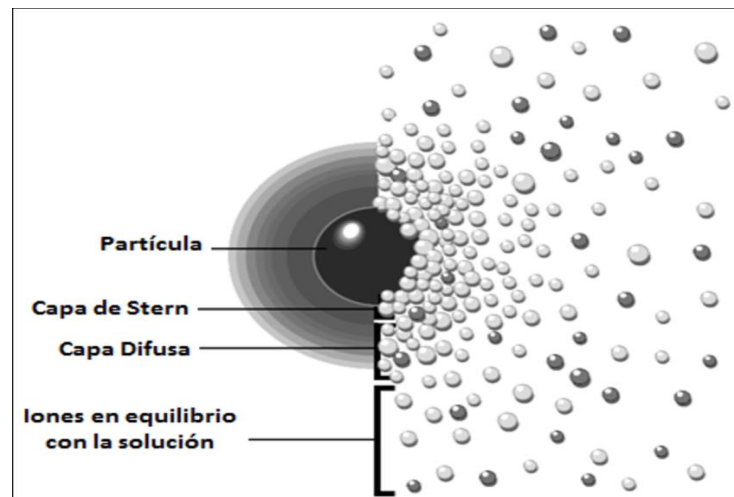
- Reducen toxicidad por efecto de distribución temporal y espacial
- Funcionan como vehículo de transportación de fármaco (162).
- Biocompatibilidad y biodegradabilidad
- Capacidad de transportación de fármacos hidrófilos e hidrófobos.
- La bicapa protege al fármaco de la degradación enzimática e inmunológica (184).
- Menor exposición al tejido sano (112).
- Aumenta la concentración en tejido diana.
- Disminuye el efecto colateral.

La entrega de fármaco dependerá de:

- La capa lipídica (179).

- Tamaño de la molécula. (167).
- Coeficiente de partición aceite /agua.
- Densidad de carga de la superficie del liposoma (potencial Z) (129).

2.4.4.-Potencial Z



Es el potencial que se genera entre la capa de Stern y la capa difusa, su importancia radica en que es una manera indirecta de conocer el comportamiento de la carga de superficie y su potencial (203). Ya que estos no pueden medirse, el potencial Z es una forma efectiva de monitorear los fenómenos resultantes de las variaciones que puedan presentarse en las fuerzas de atracción y repulsión entre las partículas, cuyo balance fue ampliamente explicado en la teoría de DLVD, dejando ver el verdadero valor de la correlación entre la sumatoria de fuerzas de atracción de van der Waals. La curva de repulsión electrostática, dando lugar a la llamada curva combinada que representa a la energía neta de interacción, que en el gráfico los puntos hacia arriba representan predominio de fuerzas de repulsión (estabilidad del sistema).

Los puntos hacia abajo por el contrario estarían --representando predominio de las fuerzas de atracción lo cual orientaría el sistema hacia la aglutinación (Figura 2.1). Para fines de tratamiento médico estos conceptos son de suma importancia, ya que nos permiten mayor eficiencia en los sistemas de transportación de medicamentos y nutrientes.

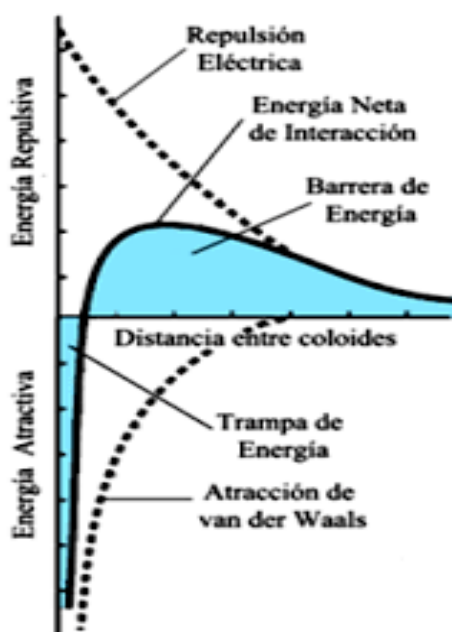


Figura 2.1. Energía neta de interacción.

En conclusión, la medición del potencial Z, provee de información precisa acerca del estado electrónico de la superficie de la nanopartícula (193), valores de ± 30 mV son considerados anormales y se deduce que estamos ante un sistema sumamente inestable propenso a la aglutinación, mientras que valores de potencial Z que se encuentran mayor a 30mV y menores a -30 mV indican condición estable ya que las fuerzas repulsivas son predominantes. (Figura 2.2)

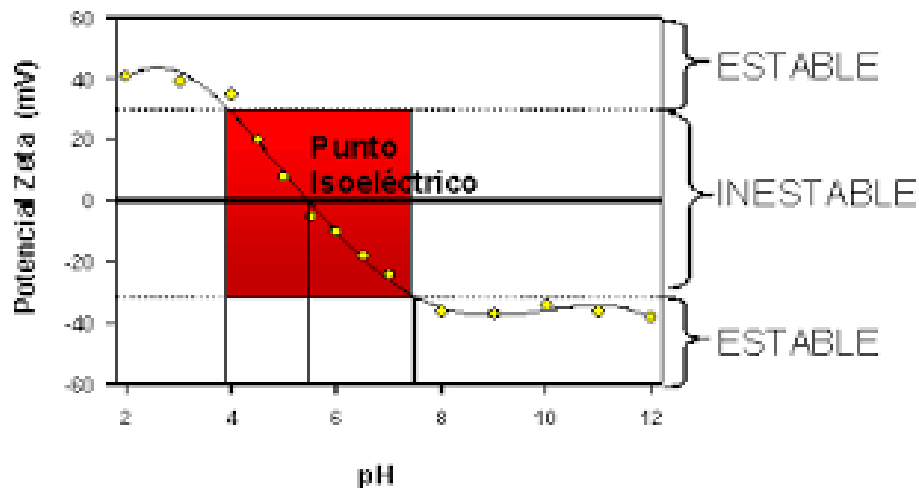


Figura 2.2. Correlación potencial Z y PH.

En la actualidad el campo de la medicina se ha visto sumamente beneficiado con el uso de nano esferas logrando resultados mejores en las terapéuticas a través de las cuales se aplican, para lograr estos efectos los nano somas son sometidos a estándares rigurosos de calidad, utilizando métodos y técnicas de alta precisión para validar y caracterizar los parámetros que se reconocen importantes para lograr el fin para el cual fueron diseñados.

Técnicas de caracterización:

1. Difracción de rayos x.-esta técnica es utilizada para valorar tamaño de cristal, grado de cristalinidad y orientación, composición química del cristal (161).
2. Dispersión de rayos x Angulo pequeño. -esta técnica es utilizada para valorar el tamaño de partícula, forma, distribución espacial, interacciones entre partículas, distancias inter atómicas. (186).
3. Dispersión dinámica de luz. -es de gran utilidad para valorar tamaño de partícula, distribución de tamaño, potencial z (densidad de carga de superficie (193).
4. Microscopia de luz polarizada. -técnica útil para valorar anisotropía (182).
5. Microscopia electrónica. -valora tamaño de partícula, tamaño de distribución, estructura y forma de partícula, estabilidad, identifica la composición elemental (188).

6. Microscopia electrónica de transmisión. - valora tamaño de partícula, tamaño de distribución, estructura y forma, estabilidad (13,6,3).
7. Poro simetría. - valora tamaño de poro, área de superficie, volumen de poro (160).

Capítulo 3

Experimentación

3.1. Introducción

La presente investigación está orientada a generar nuevos conocimientos necesarios, para sintetizar, validar y caracterizar nanopartículas de elementos esenciales para el cuerpo humano, como lo son: F, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo, I, Si, V, Cr, Ni, Br y Sn, con la finalidad de utilizarlas en terapia simultánea a quimioterapicos, cirugía, fitoquímica, herbolaria y fuentes de energía externa. Por razones de extensión del estudio se presentarán para la defensa de esta tesis doctoral y a manera de solución al problema de investigación planteado el desarrollo y comportamiento de al menos 10 nanopartículas metálicas y sus variantes funcionalizadas.

3.2. Materiales y métodos

Con la finalidad de obtener nanopartículas de elementos metálicos, y no metálicos, se tomaron en consideración fundamentalmente diseños de síntesis química y electroquímica y sus combinaciones, en los casos en que la obtención de la nanopartículas lo requiriese. Debido a la naturaleza energética de la terapéutica se dio preferencia al método electroquímico, tomando en consideración las ventajas que ofrece la metodología como son las siguientes, no se generan metabolitos tóxicos, se utiliza agua bidestilada, sales y reactivos de grado farmacológico y electrodos del metal de muy alta pureza química. De esta manera, todos y cada uno de los insumos están presentes en una o varias vías metabólicas. Por otra parte, para estabilizar las soluciones coloidales fueron utilizados componentes que son reconocidos por los sistemas de defensa corporal como propios para evitar reacciones de anafilaxia, garantizar la transportación y entrega del elemento en función.

3.3. Método de obtención de nanopartículas.

Para la obtención de partículas por método electroquímico se utilizaron dos electrodos de el mismo elemento de alta pureza y reactivos de grado farmacológico. Durante el proceso ambos electrodos permanecen fijos a una placa de acrílico que cuenta con múltiples perforaciones a través de las cuales se fijan los electrodos. La longitud de electrodo inmerso y su diámetro definirán la superficie para la reacción electroquímica de síntesis. La fuente de poder de corriente directa tiene una capacidad de 200 V y una corriente máxima de 5 A y está acondicionada con un programador de barrido variable con control de tiempo de 1 a 999 minutos. El sistema potencioestático se complementa con un sistema de calentamiento controlado que cuenta además con agitación magnética y en algunos casos sistemas de reflujo con refrigerante. En todos los casos uno de los electrodos fungió como cátodo y el otro como ánodo, y la solución de electrolito fue preparada con agua destilada o bidestilada y agentes surfactantes y reductores sintéticos y naturales.

La preparación de algunas nanopartículas requirió realizar variaciones en la metodología descrita, tal es el caso de selenio con el cual contábamos en forma de polvo, de tal forma que fue necesario confeccionar una funda con malla de nylon número dos, introducir electrodos de grafito grado electroquímico en cada una de ellas, rellenar la funda con el polvo de selenio y por ultimo fijar la funda al electrodo de grafito mediante un hilo de nylon, con el cual se realizó un sūrgete circular en torno al perímetro de la abertura . Que al jalar cada uno de sus extremos en direcciones opuesta genera un cierre concéntrico y muy resistente.

3.4. Experimentación.

Las formulaciones desarrolladas para la fabricación de soluciones acuosas de nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales de importancia en medicina. A continuación, se describirán los detalles de los distintos experimentos y elementos coloidales, mediante el método electroquímico.

Metodología de preparación de nanopartículas de elementos esenciales y no esenciales con significancia clínica

3.4.1.-Método electroquímico de preparación de nanopartículas de oro en solución acuosa.

En una solución acuosa de cloruro de sodio y un agente reductor orgánico. En algunas ocasiones se puede utilizar citrato de sodio, ácido ascórbico, fructuosa, entre otros, en relación molar 3:1 NaCl/Citrato, para estabilizar el coloide se puede agregar dextrosa/fructuosa 0.5ml por cada litro de solución acuosa, se debe utilizar electrodos de oro 0.999, y diferencia de potencial en rango 35-175 V, utilizando el dispositivo anteriormente descrito. Es recomendable mantener una temperatura de 80 °C o mayor y agitación constante durante todo el tiempo de síntesis.

Para un litro de solución se agregan 165 mg de NaCl, y 250 mg de citrato de sodio, al iniciar la formación del coloide de oro, la solución se tornará de color desde rojo a púrpura dependiendo del tamaño de nanopartícula, las concentraciones alcanzadas fluctúan entre 5 y 20 ppm, con un pH 7 aproximadamente.

3.4.2.-Método de obtención de Arsénico coloidal.

Cuando se trata de elaborar la solución coloidal de Arsénico es necesario utilizar un aparato de reflujo para lograr la solución deseada. Posteriormente enfriar la solución estando está bajo agitación constante, finalmente se somete a electrólisis utilizando electrodos de platino durante un periodo de 30 minutos, este hecho deja ver que en la elaboración de una solución no basta con la obtención de la misma y por ello en ocasiones el proceso termina sometiendo la solución electrólisis en celda electroquímica.

En todos los casos la solución fue filtrada a flujo de media velocidad antes de ser envasada en recipientes de vidrio previamente enjuagados hasta conductividad cero.

3.4.3.-Preparación de plata coloidal de alta pureza.

Se utiliza un par de electrodos de alta pureza, Ag 0.999, Ag 0.997, Ag 0.99, en donde un electrodo funge como cátodo y el otro como ánodo, se fijan intervalos de tiempo de 0.5 a 5 minutos para polarizar la celda, utilizando el dispositivo electrónico antes mencionado. La solución electrolítica se prepara con agua destilada o bidestilada y sales de nitrato borohidruro de sodio, la temperatura de trabajo se fija en 50 °C, el potencial aplicado por medio de las fuentes de poder de corriente directa fluctúa entre 25-30 V.

Es recomendable, mantener en todo momento, la solución en la celda electroquímica bajo agitación magnética, después de 30 minutos, la solución presentara un cambio de coloración, el cual se incrementará durante el resto del tiempo que dure el proceso, de color amarillo paja a café, el color guarda relación con tamaño de partícula, la presencia de plata sólida, no es un buen indicador y nos obliga detener el proceso.

Posteriormente, la solución debe ser filtrada, y puede ser estabilizada con peróxido de hidrógeno, la solución final de plata coloidal debe guardarse en recipientes de plástico o vidrio, que protejan de la exposición a la luz.

Se pueden alcanzar concentraciones de 3 a 20 ppm, o mayores en función al tiempo. Con un potencial de óxido reducción, ORP de 485 mV, y pH de 6.8, el área del electrodo juega un papel importante y debe ser acorde al volumen de solución que se desea utilizar. El tiempo que dura el proceso de obtención es de aproximadamente de 15 a 30 minutos, en ocasiones puede llegar a una hora dependiendo del potencial, con el que se pretende trabajar, cuando se utilizan potenciales altos el pH puede llegar a 9. Durante este proceso se puede utilizar, citrato de sodio, ácido ascórbico, dando como resultado, nanopartículas de plata funcionalizadas, a una concentración, que alcanza 8 ppm y un pH de 6, ORP de 112mv.

3.4.4. Preparación de soluciones acuosas de plomo coloidal

Las soluciones acuosas de plomo coloidal puedan ser preparadas de manera electroquímica utilizando electrodos de plomo de alta pureza y un sistema de fuente de poder que permita polarizar los electrodos (ánodo -cátodo- ánodo -cátodo) cada 4 minutos (puede variar el intervalo).

El electrolito se prepara agregando a 1 l de agua bidestilada y cloruro de potasio (KCl) en el rango de 100 a 750 mg, se espera lograr un coloide de aproximadamente 5 ppm de plomo por cada 100 mg de la sal. El potencial a aplicar puede variar en el rango de 15 a 45 V donde se pueden alcanzar corrientes de hasta 1A. El pH final es de 6.8 a 7.3 y la temperatura de preparación debe mantenerse cercana a los 100 °C. También se puede preparar el coloide de plomo en agua agregando citrato de sodio (100 mg) y 100 mg de KCl en un mismo rango de potencial y 100 °C bajo agitación magnética. El pH se incrementará hasta 8.7 y la concentración a 30 ppm con un ORP = -62.1 mV.

3.4.5.-Método para obtención de nanopartículas de selenio

El selenio coloidal puede ser obtenido en una solución acuosa, utilizando dos electrodos de selenio puro, los cuales fueron preparados con polvo de este elemento construido en soportes rígidos y porosos de polietileno con un alma para contacto eléctrico de grafito de grado electrolítico y enfundado en una malla de nylon. La reacción se lleva a cabo aplicando una diferencia de potencial de 75 V entre los dos electrodos inmersos en una solución acuosa de 225 a 950 mg/l de citrato de sodio y 150-300 mg/l de cloruro de sodio a una temperatura mayor a 75°C la solución tiende a un color rojo escarlata en un tiempo menor a 30 minutos, para estabilizar el coloide se puede agregar uno 0.2 ml de la solución de fructuosa.

La concentración obtenida está en el rango de 30 ppm de selenio, y pH de 6.8. También puede ser preparado en agua a una temperatura mayor a 100°C, con fructuosa obteniendo hasta 20 ppm de concentración. (nota: todas las reacciones son realizadas bajo agitación magnética y filtradas antes de envasar).

3.4.6.-Método electroquímico para la obtención de nanopartículas de Cadmio

El cadmio coloidal se prepara electroquímicamente utilizando dos electrodos de Cd de alta pureza en un rango de temperatura de 70 a 100 °C, agregando de 50 a 100mg de NaCl y 0.2 ml de solución de fructuosa al 70% y con agitación magnética a un voltaje no mayor a 95 V.

3.4.7.-Método de obtención de nanopartículas de Manganese

Las soluciones de manganeso coloidal se pueden obtener a partir de una solución acuosa de 1 g de cloruro de manganeso (MnCl_2) y 1.35 g de citrato de sodio, utilizando dos electrodos de platino y calentando bajo agitación magnética con un rango de 75-100 °C, y una diferencia de potencial de 25 V por un periodo de 20 minutos. El pH es de aproximadamente 8. La solución puede ser estabilizada con 0.2 ml de solución acuosa de fructuosa al 70%. La solución tiene un color rosado y 700 ppm. El pH es cercano a 8 y el ORP de -6.7 mV. Se pueden también utilizar electrodos de manganeso de 99.9 % de pureza en una solución 100 a 300 de NaCl, 300 mg de citrato de sodio y 300 mg de ácido ascórbico aplicando una diferencia de potencial mayor a 90 V calentando la solución 100 °C y 0.4 ml de solución de fructuosa al 70%, al cabo de 2 horas se obtiene una solución después de filtrado con pH de 8.5 y ORP de 198.1 mV y 387 ppm de concentración.

3.4.8.-Complejo Ademetonina Manganese método de preparación

El complejo de manganeso con Ademetonina (500 mg), se prepara a partir del manganeso coloidal con una solución de 300 mg de NaCl, 300 mg de citrato de sodio y 390 mg de ácido ascórbico. El potencial fluctúa en el rango de 80 a 95 V a 100°C y se aplica durante 50 minutos de reacción. La solución final tiene pH de 7.7, ORP de 259 mV y 558 ppm de concentración.

3.4.9.-Método de preparación de nanopartículas de Zinc

La solución de zinc coloidal puede ser preparada electroquímicamente utilizando electrodos de zinc de alta pureza en una solución acuosa de cloruro de sodio.

Dada la alta reactividad del zinc, se requiere tener cuidado con el potencial aplicado. El rango a utilizar es 5 a 30 V y es función del tiempo de electrólisis y de la concentración de NaCl. Se pueden utilizar de 40-60 ppm de NaCl y temperatura de 60 a 100°C, bajo agitación magnética.

Debe evitarse el consumo excesivo de los electrodos que son durante el proceso de polarización electroquímicamente. Esto es fácil de observar toda vez que la presencia de partículas sólidas insolubles se hace patente en el reactor.

3.4.10.-Complejo Zinc-Ademetionina

Se prepara una solución acuosa con agua destilada de 120 mg de ácido ascórbico y 55 mg NaCl como también se disuelven dos capsulas de sal (1,4 butil sulfato de Ademetionina) en agua destilada y se agregan a la solución de electrolito mediante un embudo con papel filtro a fin de retirar todos los insolubles inorgánicos (falsos) que son utilizados como excipientes en las pastillas de esta manera se están agregando 1 g de compuesto de Ademetionina, se introducen los electrodos de zinc de alta pureza y se deja que la solución alcance una temperatura de 100°C, para luego aplicar un voltaje de 10 V durante 20 minutos, se permite al reactor enfriarse a temperatura ambiente para después filtrar, medir *pH*, *ORP* y conductividad. Los valores típicos que se obtienen son a manera de ejemplo los siguientes:

ORP = 196.8 mV, pH de 4.3 y 593 ppm.

Nota: para estabilizar se puede agregar 0.5 ml de jarabe de fructuosa.

3.4.11.-Método de preparación del complejo Zn-mesalazina. Complejo de Zn-salofalk (mesalazina)

Las partículas de zinc se preparan a una temperatura de 95 °C en un electrolito de agua bidestilada que contiene 100 mg de citrato de sodio y 55 mg de NaCl. Se introducen los electrodos de zinc y se aplica un potencial de 10 a 15 V después de 6 minutos de reacción se agregan 500mg de mesalazina en pastilla que fue previamente disuelta en agua caliente y filtrada para eliminar los compuestos insolubles del excipiente. Esto genera un incremento de la corriente en aproximadamente 60 mA, después de 20 minutos en total separa la reacción se deja enfriar bajo agitación magnética, para luego filtrar y envasar. Se obtiene un ORP = 125 mV, pH de 7.82 y 175 ppm de concentración.

3.4.12. Método de preparación del complejo Zn-ácido ursodesoxicólico

El complejo de ácido ursodesoxicólico-zinc, se prepara a partir de zinc coloidal al cual se agregan 2 tabletas del ácido ursodesoxicólico previamente disueltos y filtrados para una concentración de 500 ppm de ursodesoxicólico. Después de 10 minutos se separó la reacción de reposar la solución bajo agitación magnética por una noche. Luego se filtró se realizaron mediciones con los siguientes resultados: ORP = 252 mV, pH de 7.56 y 120 ppm.

3.4.13. Método de preparación de Magnesio coloidal

Para preparar un coloide de magnesio se utiliza una celda electroquímica que consiste de dos electrodos de Mg puro y una solución acuosa preparada con agua destilada o bidestilada a la que se han agregado 100 mg de NaCl, y 200 mg de citrato de sodio. Se calienta la solución en un rango de 70-100°C y se aplica un potencial de 10 a 15 v c0 bajo agitación magnética. El coloide se puede estabilizar con unos 0.2 ml de solución de fructuosa. El tiempo para la obtención de productos es de unos 20 minutos La solución final es filtrada y tiene las siguientes características: ORP = 230 mV, pH de 10.5 y 230 ppm.

Después de 15 minutos se torna color rojo y se sigue intensificando el color. El tiempo final fue de 25 minutos a una temperatura de 100°C.

3.4.14. Solución de cobalto coloidal

La solución acuosa de cobalto coloidal se puede preparar utilizando dos electrodos de Co de alta pureza y un electrolito en agua destilada que contenga 300 mg de citrato de sodio y 100 mg de cloruro de sodio y un potencial de 90 V.

La solución debe mantenerse a 100°C y las partículas coloidales pueden ser estabilizadas agregando 0.2 ml de una solución de fructuosa – ácido ascórbico (70%). Siempre debe mantenerse agitación magnética. La solución final después de filtrada es color verde olivo y tiene un pH de 10.5 y 295 ppm.

3.4.15. Molibdeno coloidal

Las soluciones acuosas de molibdeno coloidal pueden ser preparadas electroquímicamente utilizando dos electrodos de molibdeno de alta pureza, y aplicando, y aplicando un potencial de 90 V, es una solución de electrolito que contiene 250 mg de citrato de sodio y 100 mg de NaCl disueltos en agua destilada. La solución es llevada a 100°C bajo agitación magnética. La solución final se filtra y tiene un color morado, con pH de 4.5 y 280 ppm, para estabilizar las partículas se agregan 0.2 ml de solución de fructuosa.

3.4.16. Solución coloidal de Paladio.

Las soluciones de paladio coloidal en agua se pueden preparar en soluciones de electrolito compuestos de la siguiente manera:

Se agrega citrato de sodio; 125 mg en un volumen de 500 a 600 ml de agua bidestilada y 0.2 ml de solución acuosa fructuosa/dextrosa, y un rango de temperatura de 80 a 100°C. Los electrodos de paladio de alta pureza se someten a un potencial en el rango de 25 a 175 mV. El tiempo estimado de reacción es de 1 hora.

3.4.17. Solución coloidal de Platino.

Las soluciones de platino preparadas electroquímicamente requieren del uso de electrodos de alta pureza de este metal. A diferencia de soluciones de platino formadas por arcos eléctricos, en el método electroquímico debemos contar con una buena extensión de superficie de platino y un voltaje alto, se prepara agregando 200 mg de NaCl, a un litro de agua bidestilada. La solución se calienta a una temperatura mayor a 100°C y se aplica un voltaje en el rango de 90 a 180 V, para estabilizar el coloide se agregan surfactantes que pueden ser catiónicos o no iónicos. La solución tiende a un color ligero café metálico después de 1 hora de reacción y la concentración varía de 3 a 10 ppm. También se pueden utilizar un electrodo de Pt y uno de grafito en cuyo

caso obtendremos una solución coloidal Pt-C. Con concentraciones de 5-10 ppm y pH de 6. En todos los casos será necesaria La utilización de agitación magnética.

Se pueden obtener soluciones coloidales de Pt más concentradas y estables si se agrega a la solución de electrolito 200 mg de NaCl, 500 mg de ácido ascórbico y 300 mg de citrato de sodio. El potencial aplicado deberá ser mayor a V acción se pueden agregar unas gotas de solución jarabe de fructuosa y después de 1 hora se tiene una solución de color amarillo intenso.

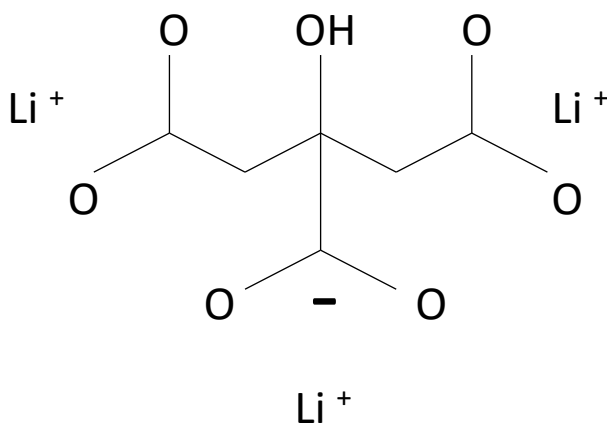
3.4.18. Solución coloidal de Hierro.

La solución de hierro coloidal se prepara electroquímicamente utilizando dos electrodos de hierro de alta pureza y aplicando un potencial de 90 V en agua bidestilada a 100°C bajo agitación magnética. Se estabiliza la solución agregando fructuosa (0.2ml). Las soluciones acuosas de Níquel coloidal se pueden preparar utilizando dos electrodos con potencial polarizable a tiempo establecido, inmersos en una solución acuosa de 250 mg de citrato de sodio y temperatura >mayor a 95°C.

Es importante que la distancia entre los electrodos sea pequeña ya que este favorece el proceso. La solución final después de ser filtrada tiene un pH de 6.5 y 100 ppm. El potencial debe ser mayor a 90 V. Esta reacción puede ser favorecida con la adicción de 50-100 mg de cloruro de sodio. Las partículas coloidales se pueden estabilizar utilizando soluciones de surfactantes.

3.4.19. Solución coloidal de Litio

Las soluciones coloidales de litio se preparan con un carbonato de litio y ácido cítrico en agua en relaciones 3:1



Citrato de sodio M.W. 258.03 g/mol

Ácido cítrico M.W. 192.13 g/mol

Carbonato de litio M.W. 73.84 g/mol



Se utilizan electrodos de platino inmersos en una solución de 300 mg ácido cítrico y 173 mg Li_2CO_3 en 1 L de H_2O destilada y se calienta a 100°C a un potencial de polarización de 30V. El pH de 7 y 260 ppm de concentración.

3.4.17. Solución coloidal de cobre coloidal.

El cobre coloidal en soluciones acuosas puede ser obtenido electroquímicamente, utilizando dos electrodos de este metal, cuidando siempre que sea de alta pureza(0.999), agua bidestilada, temperatura mayor a 90 grados centígrados, potencial mayor a 90v, que deben ser aplicados con una fuente de poder de corriente directa, con este método pueden obtenerse soluciones con concentraciones de 30 ppm y pH de 6.3, después de una hora de reacción, durante la cual el potencial es polarizado a intervalos de 1 a 4 minutos.

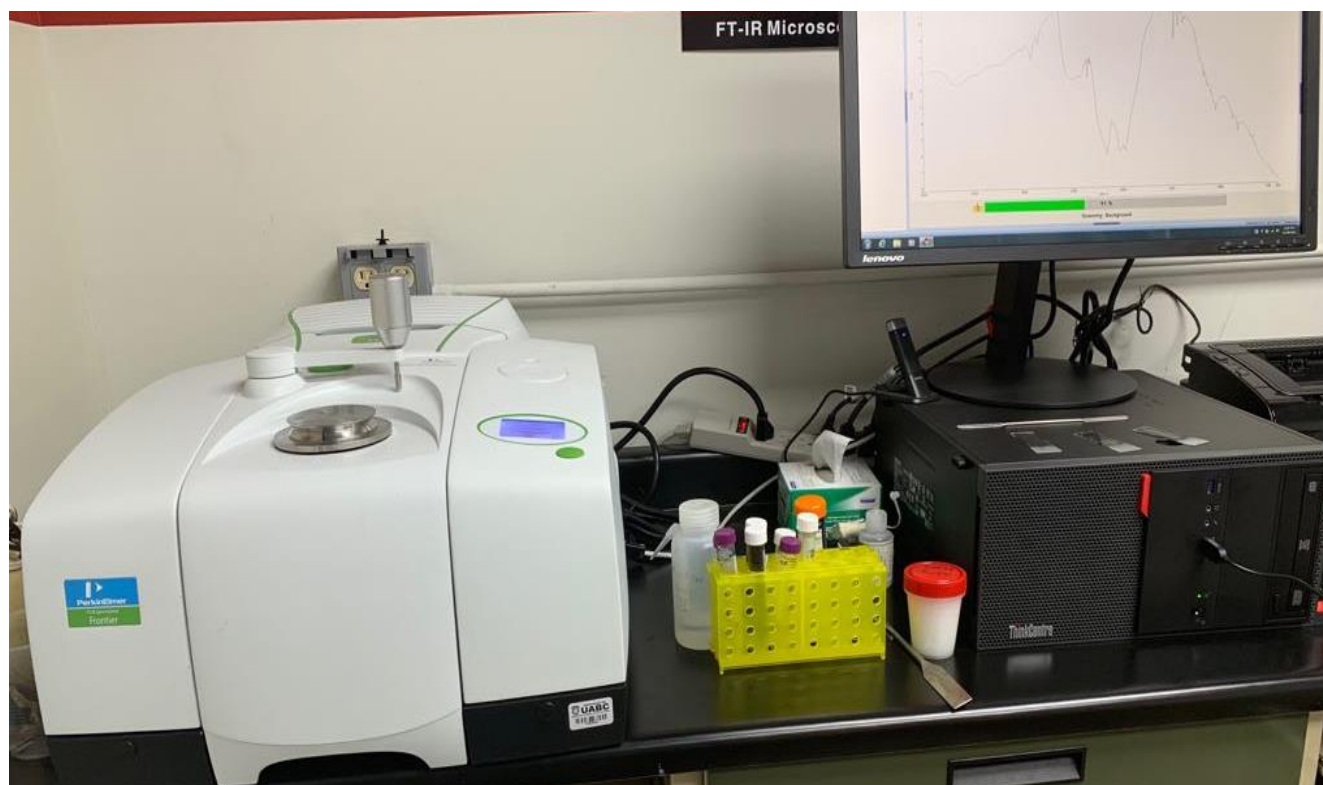
Otro método consiste en utilizar citrato de sodio, ácido ascórbico o fructuosa/dextrosa y activar el electrodo con cloruro de sodio o potasio hasta 150 mg por litro y un potencial en el rango de 50 a 100 V, pH de 8 a 9.5 y ORP de 199 mV.

Capítulo 4.

Análisis de Resultados

4.1. Resultados de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR)

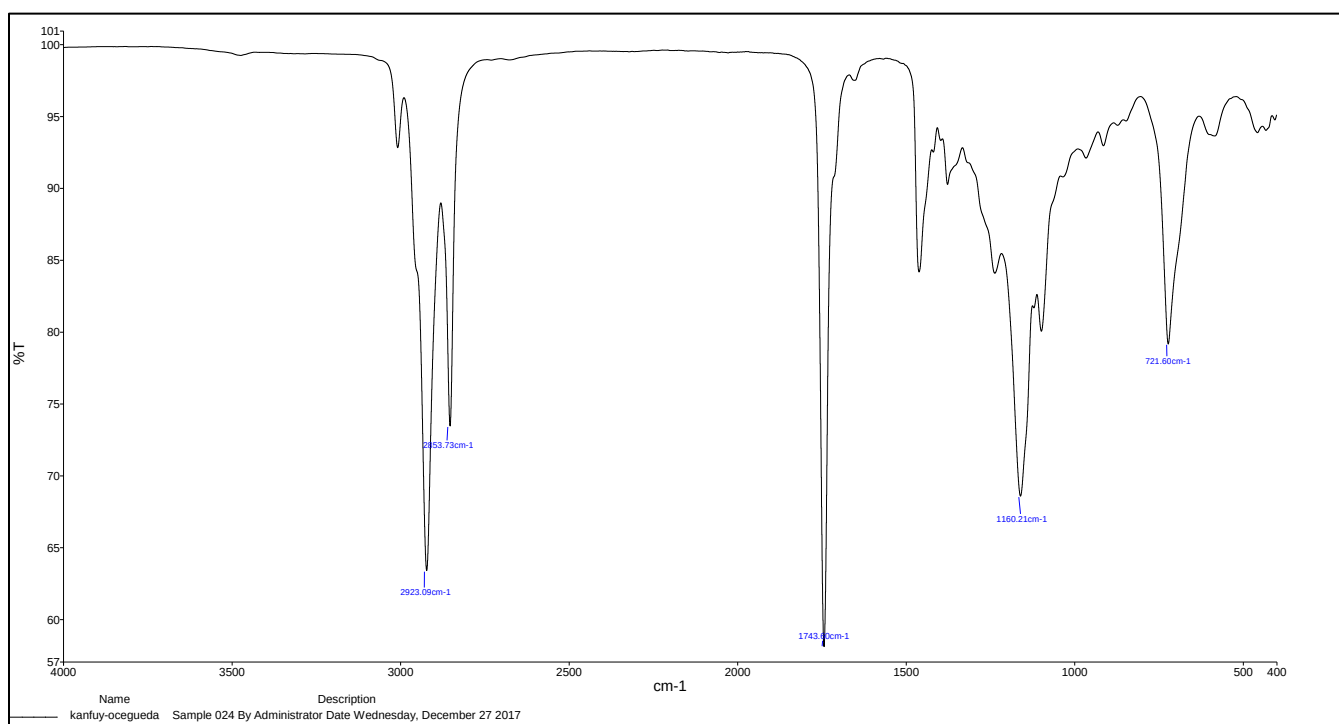
Se realizaron análisis de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) utilizando un espectrómetro Frontier de Perkin Elmer equipado con Atenuador de Reflectancia Total (ATR).



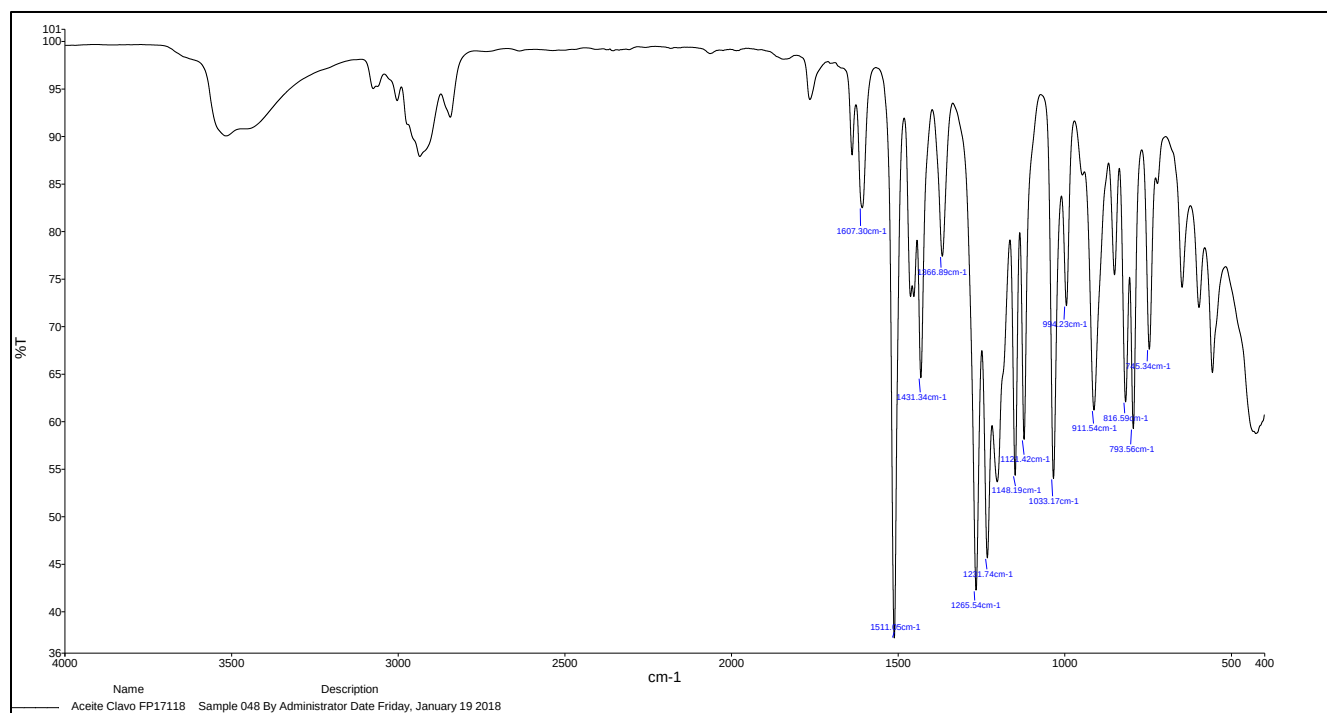
Las muestras fueron colocadas directamente sobre el dispositivo de selenuro de zinc y los barridos fueron realizados previa calibración de las condiciones de laboratorio en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} . En general los resultados muestran desplazamientos en los picos de grupos funcionales tipo amino ($-\text{NH}$) y carbonilo ($-\text{CO}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{COO}^-$) por la coordinación de las nanopartículas metálicas con los distintos extractos naturales utilizados.

Los compuestos predominantes son, Flavonoides, saponinas carotenos, alcaloides, terpenoides, además de otros componentes en menor proporción.

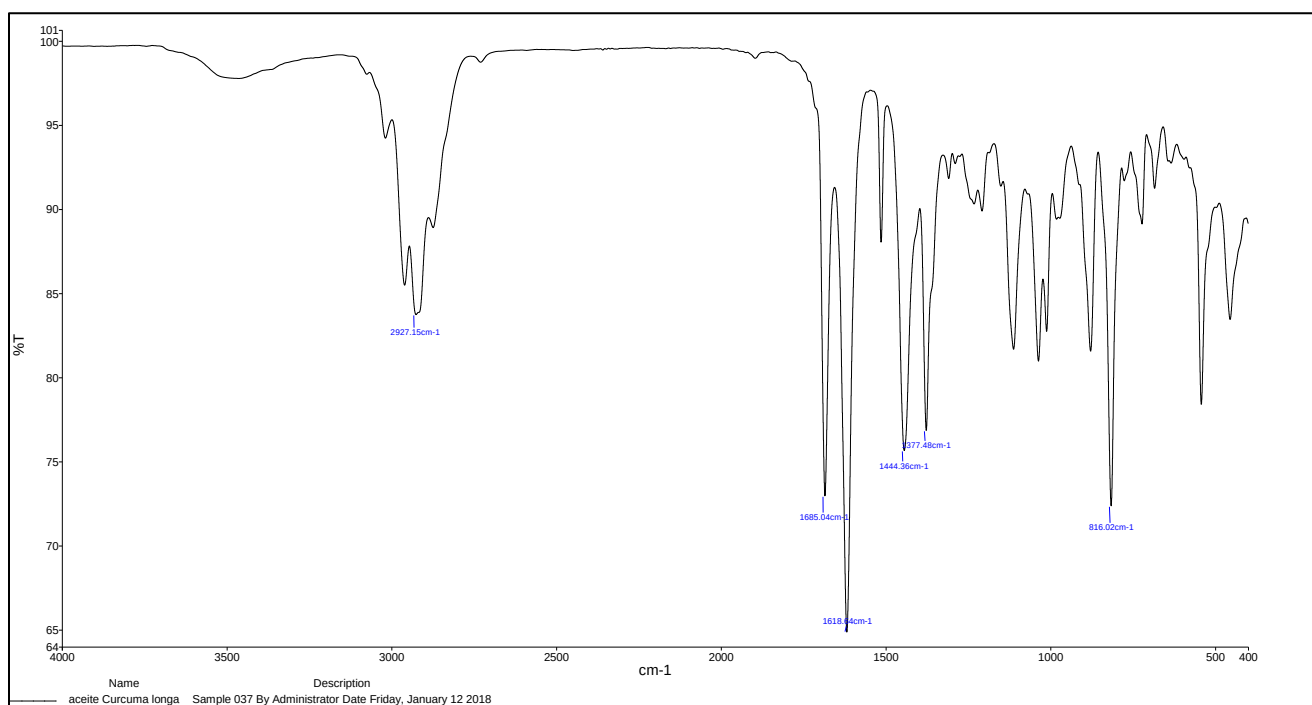
Los complejos funcionalizados fueron realizados en sistemas coloidales acuosos de nanopartículas metálicas con y sin recubrimiento estabilizador (caped). Así mismo, se prepararon mezclas con dos fases: extracto natural oleoso y solución acuosa coloidal con minerales nanoparticulados. En ninguno de los dos casos se utilizaron sustancias surfactantes para estabilizar las soluciones. En el caso partículas de las mezclas acuoso-oleosas la solución homogénea final se logró por efecto tenso activo de las mismas saponinas contenidas en el extracto natural. La homogenización fue mejor cuando se manejaron extractos producto de procesos de fermentación, debido probablemente a la generación de metabolitos secundarios o de orden superior.



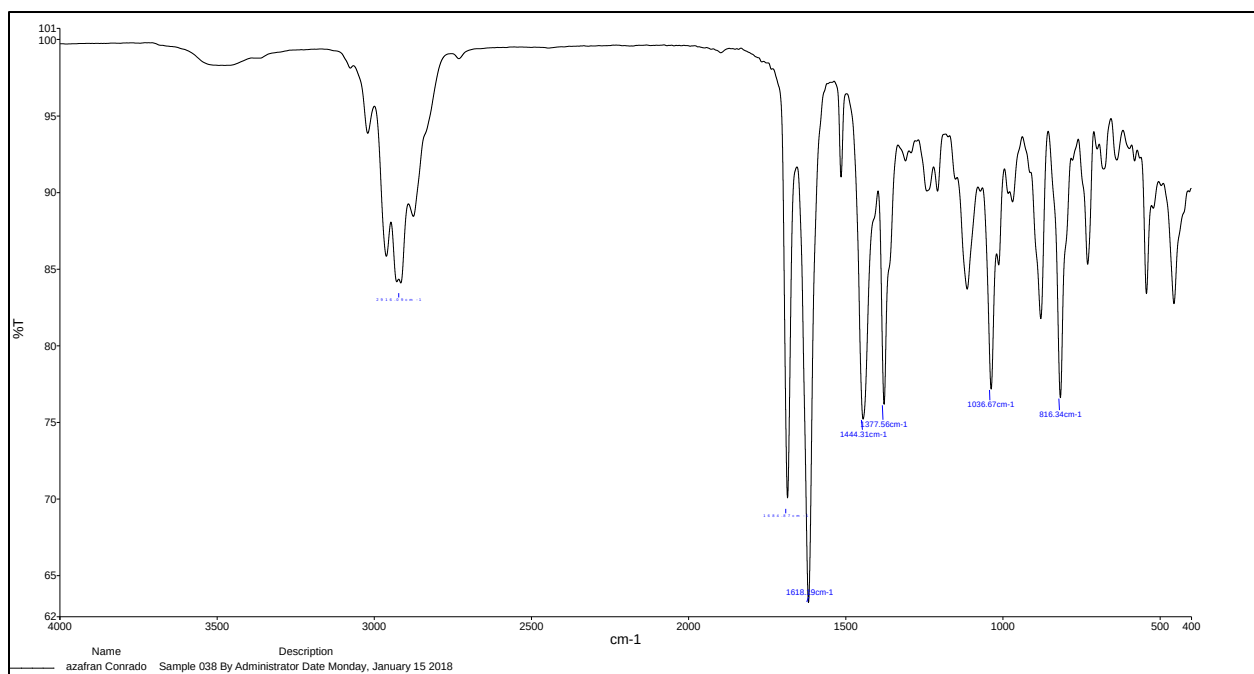
Espectro FTIR de aceite de maíz.



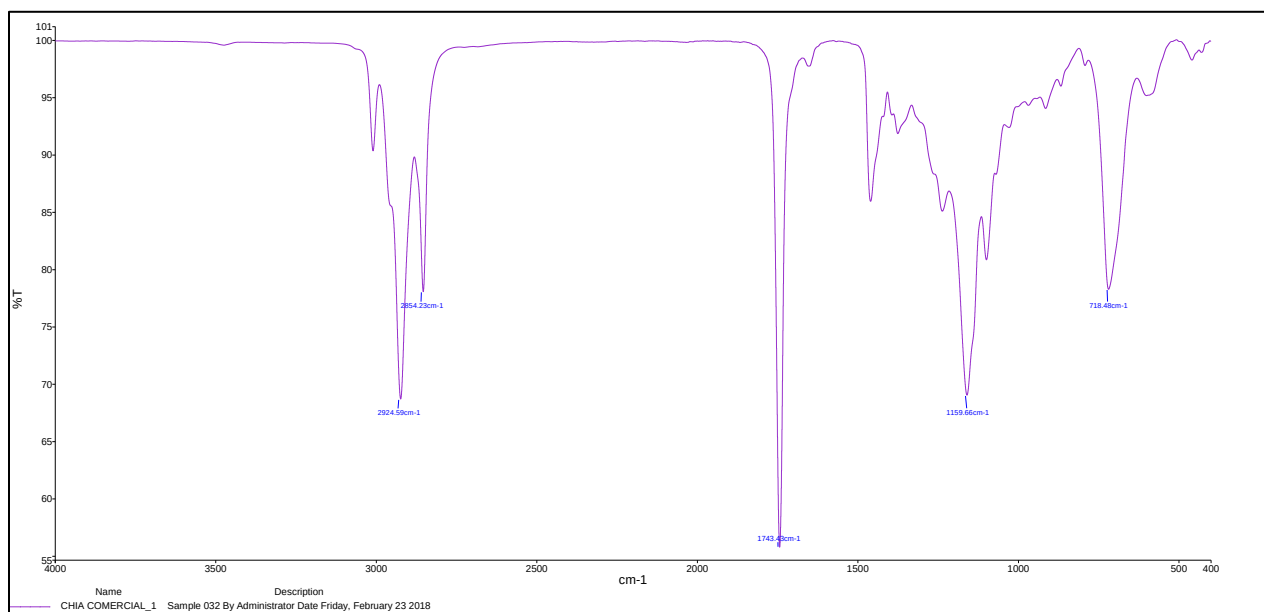
Espectro FTIR de aceite de clavo de olor



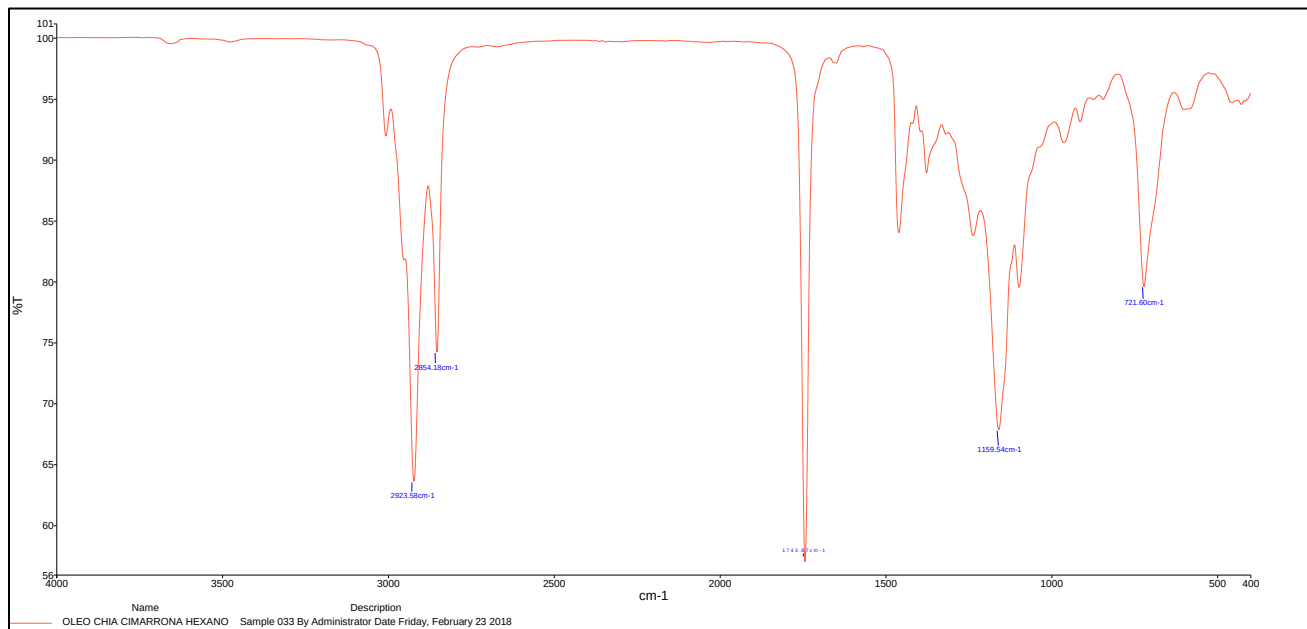
Espectro FTIR de aceite de Cúrcuma Longa



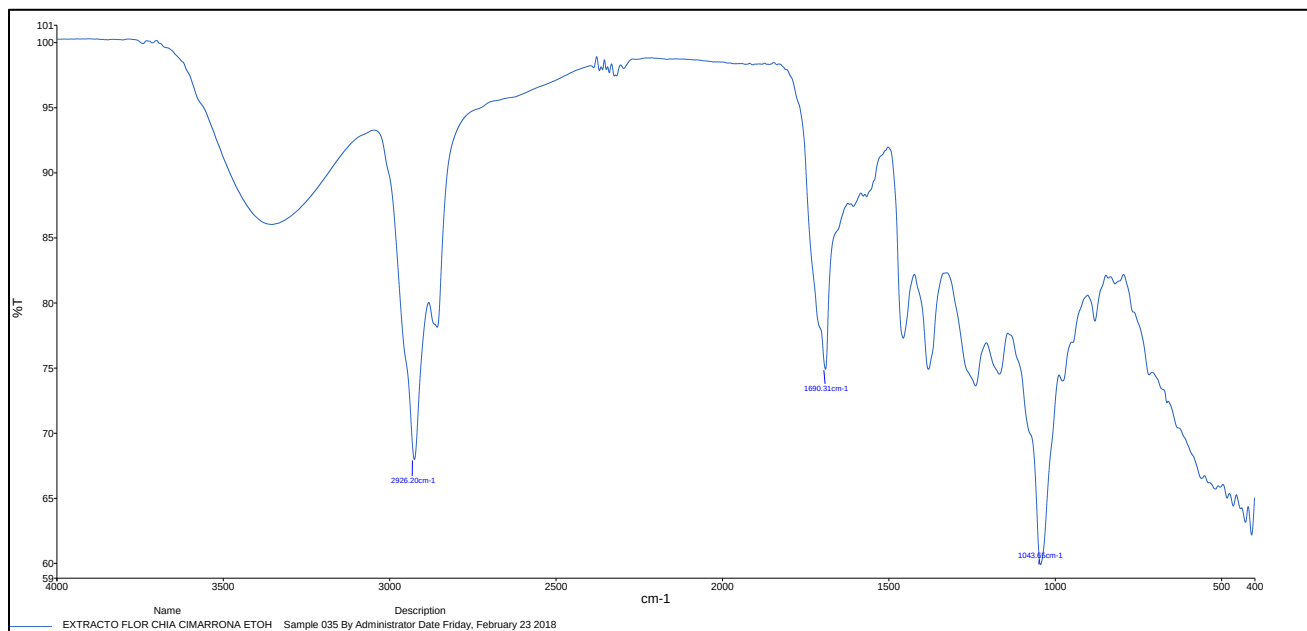
Espectro FTIR de aceite de Azafrán



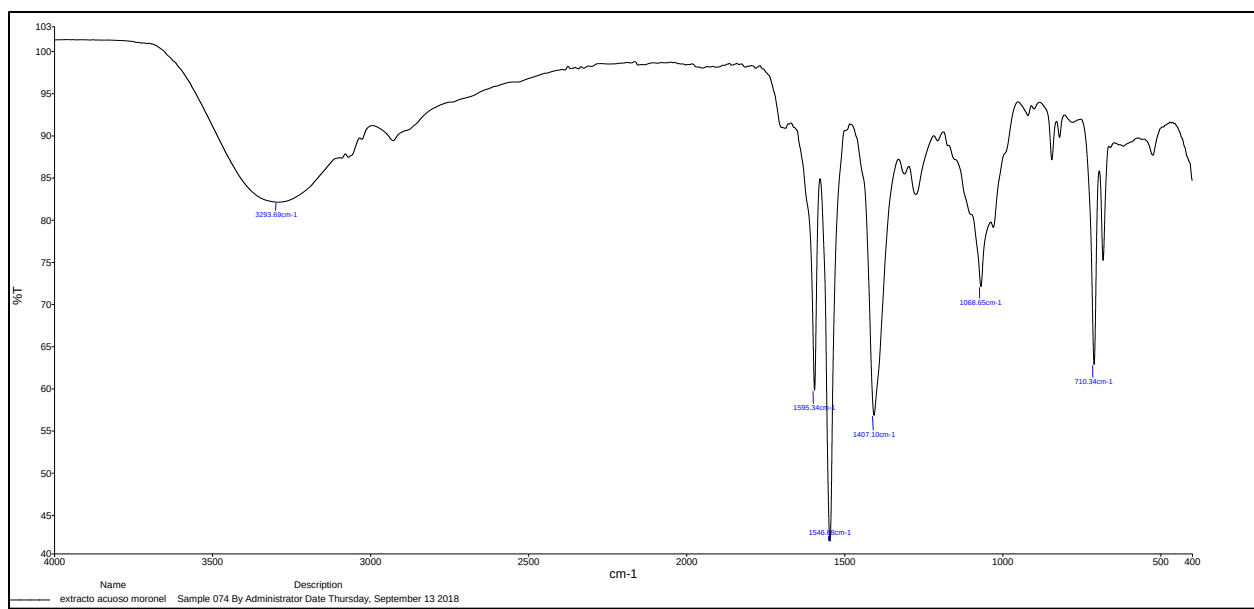
Espectro FTIR de Extracto Acuoso de Chía Cimarrona



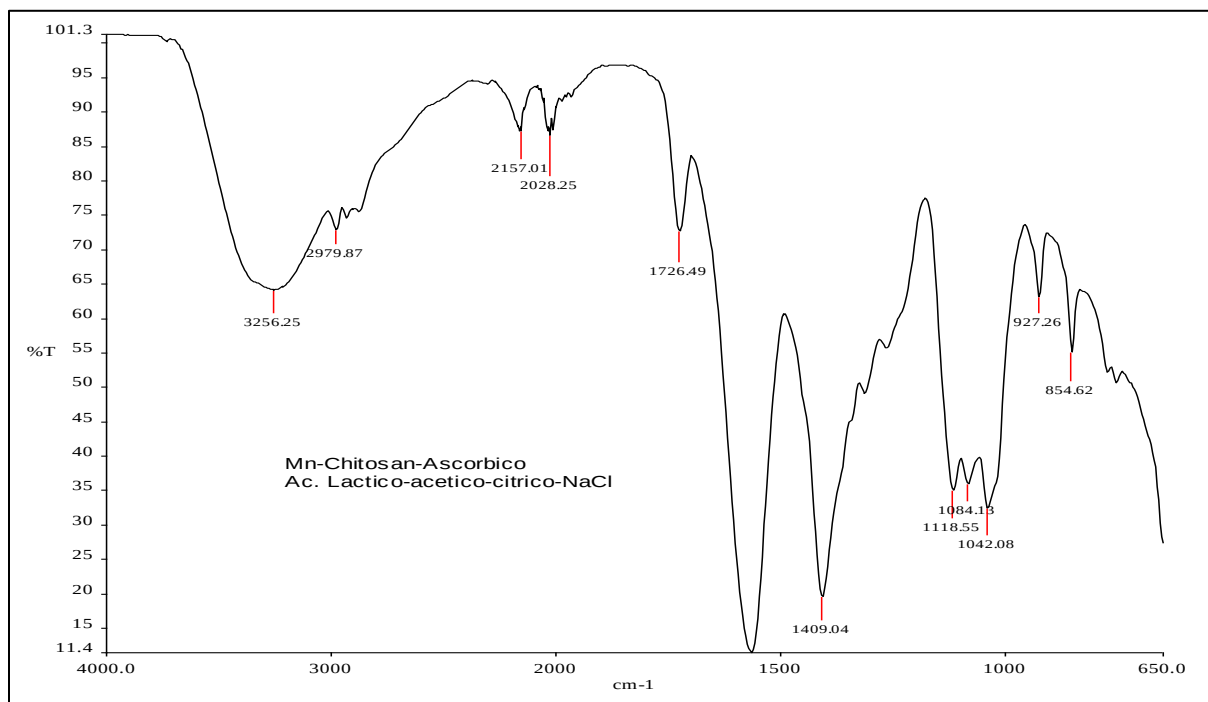
Espectro FTIR de Extracto obtenido con ciclohexano de Chía Cimarrona



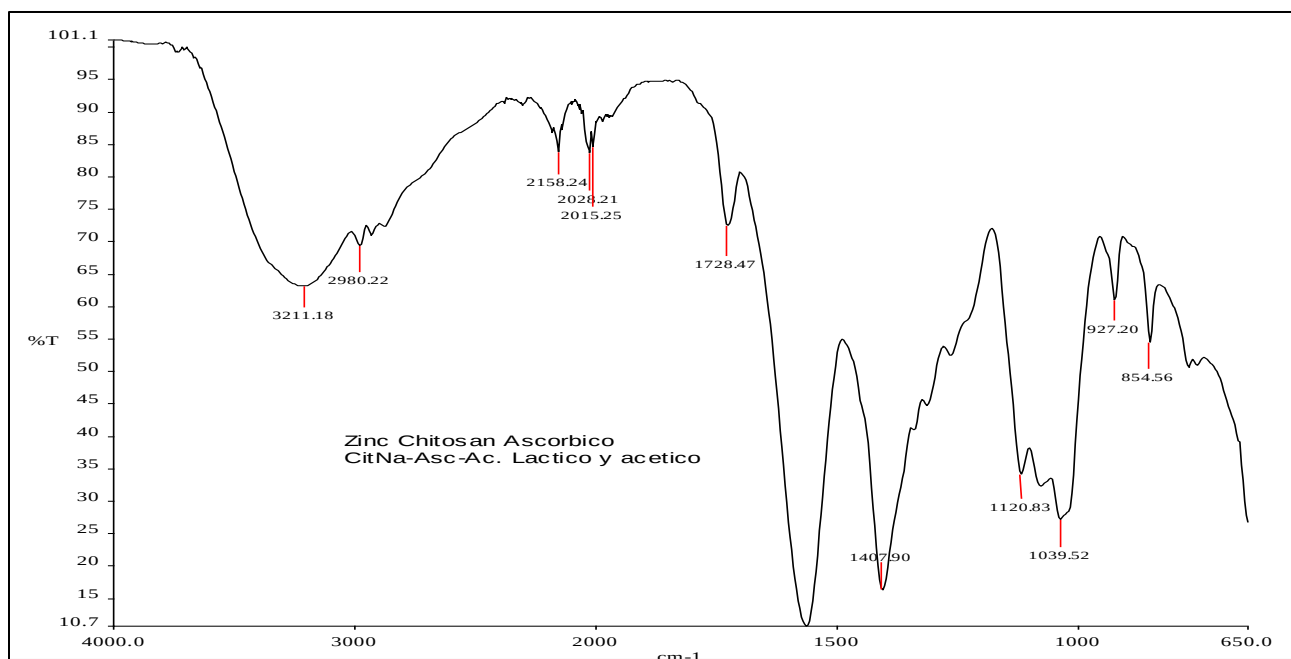
Espectro FTIR de Extracto etanólico de Chía Cimarrona



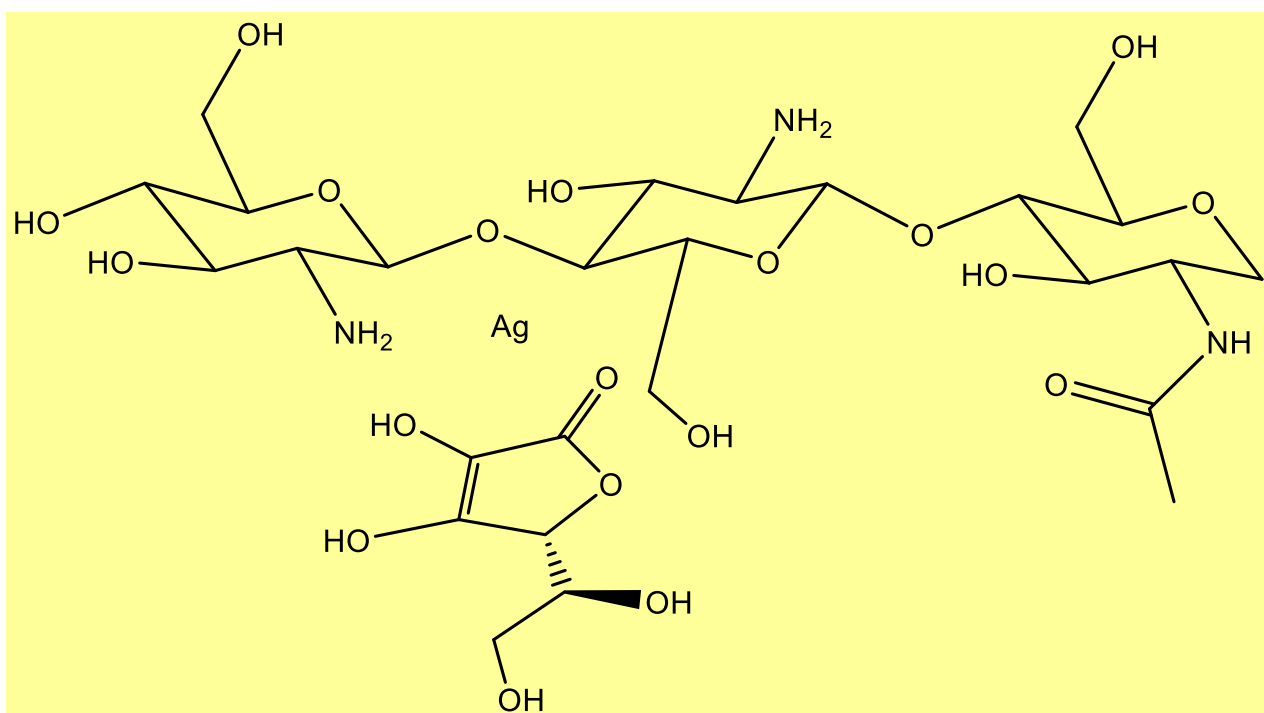
Espectro FTIR de Extracto Acuoso de Moronei



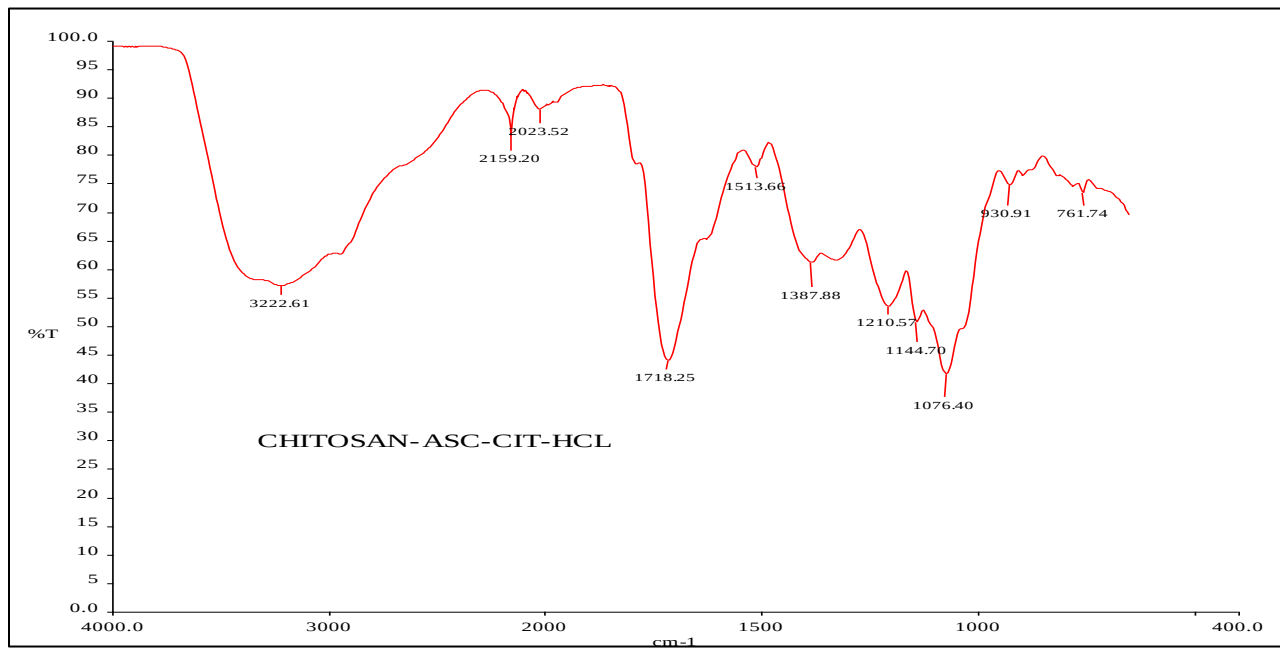
Complejo de nanopartículas de manganeso con Quitosán



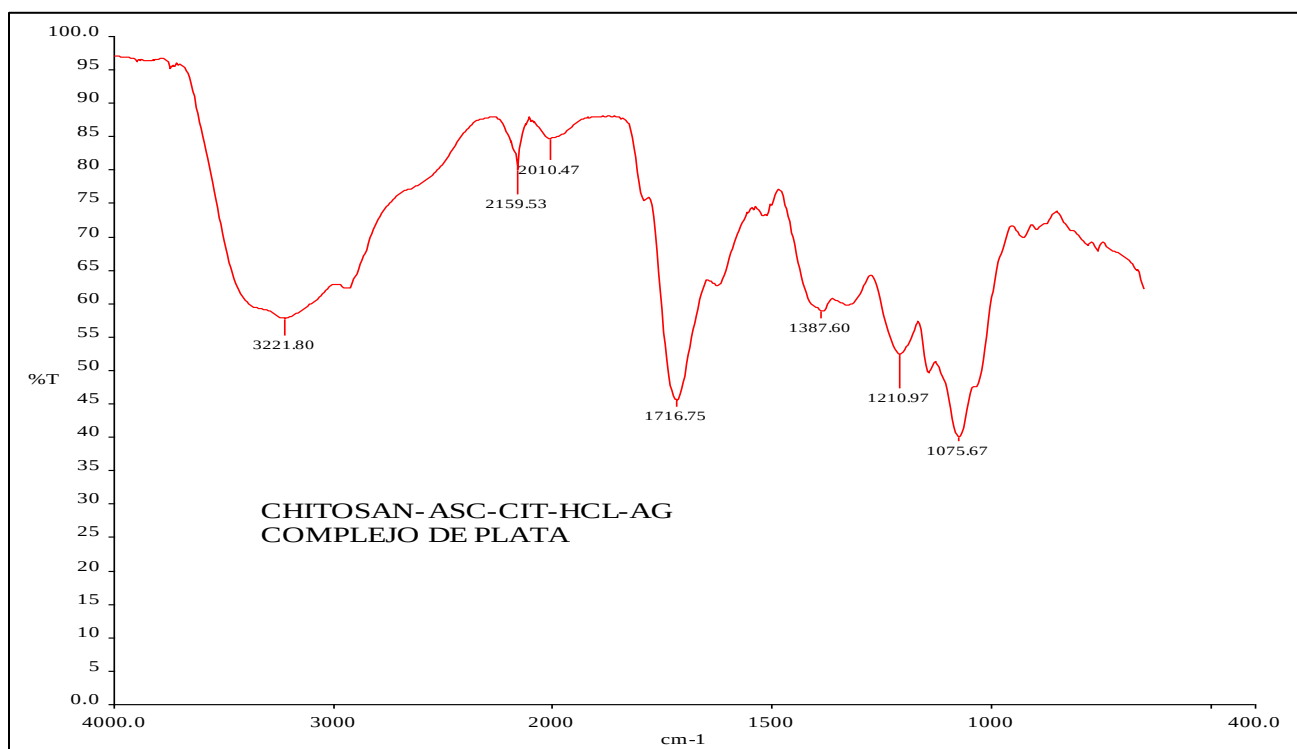
Complejo de nanopartículas de zinc con Quitosán



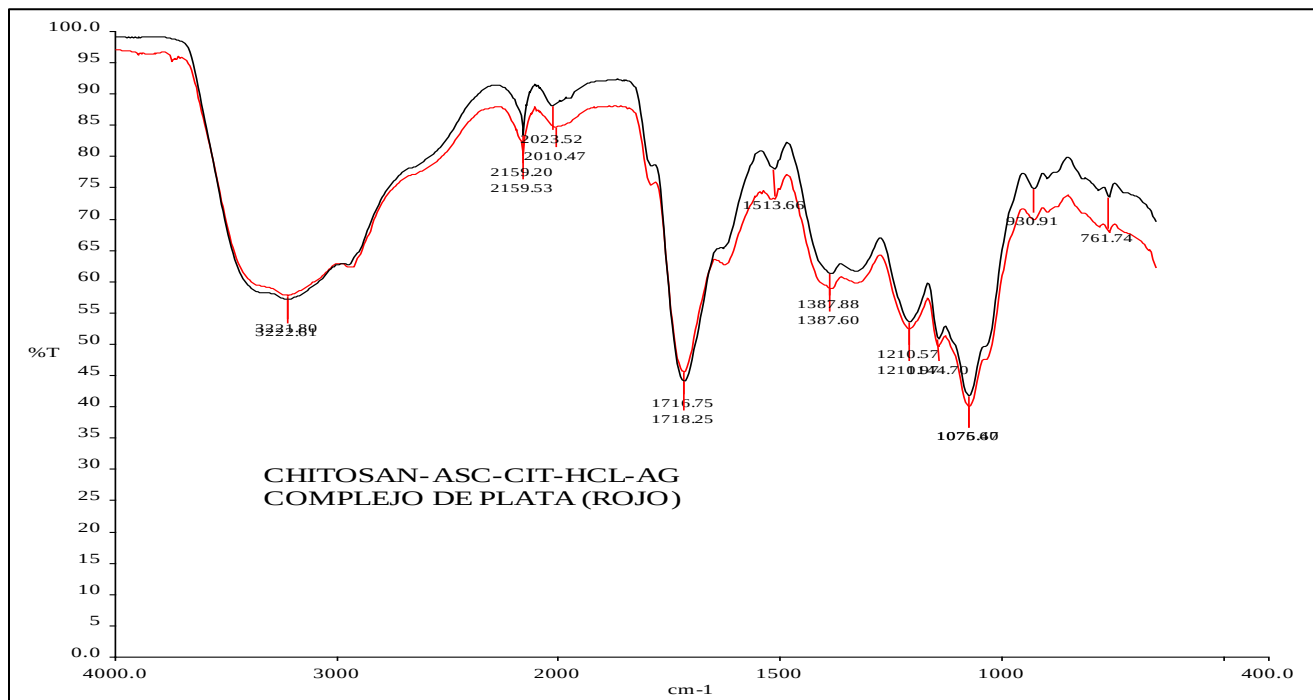
Estructuras de Quitosán y ácido ascórbico



Espectro FTIR de una película de Quitosán-ácido ascórbico-citrato



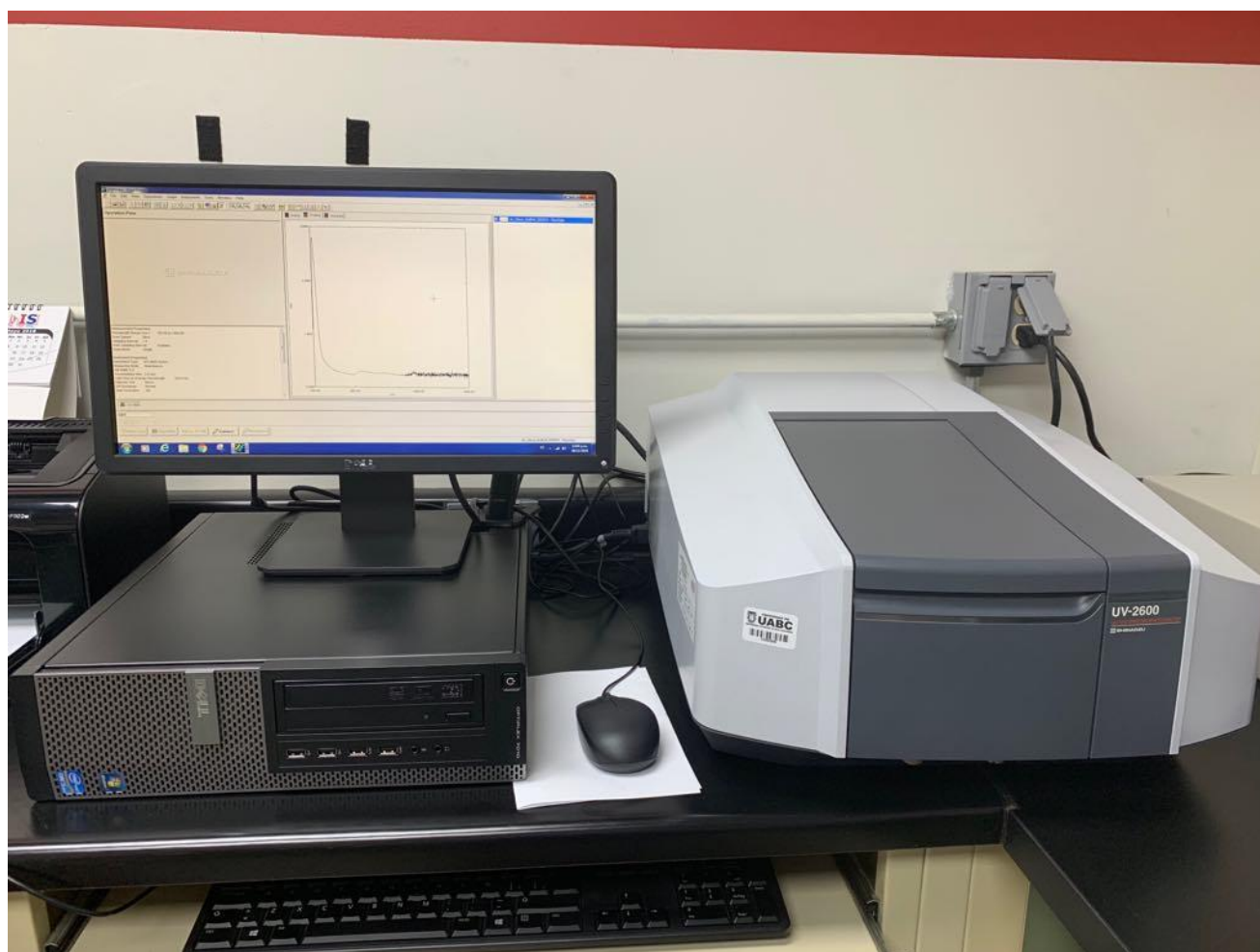
Espectro FTIR de una película de Quitosán-ácido ascórbico-citrato formando complejo con nanopartículas de Plata



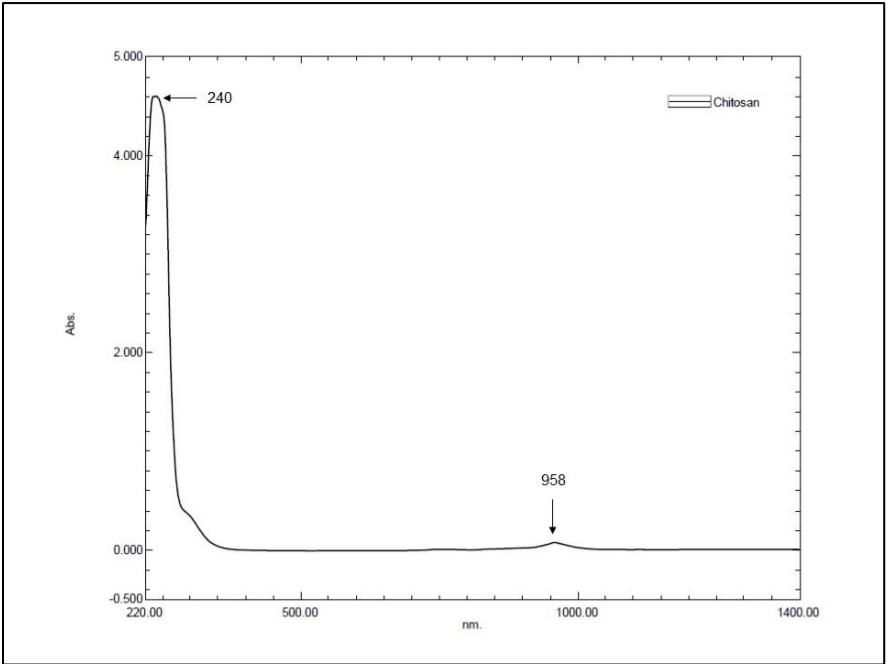
Espectros FTIR de comparativo de una película de Quitosán-ácido ascórbico-citrato y su complejo con nanopartículas de Plata. Se observa el desplazamiento de grupos amino por la interacción con la plata metálica nanoparticulada.

4.2. Espectroscopia UV-Visible

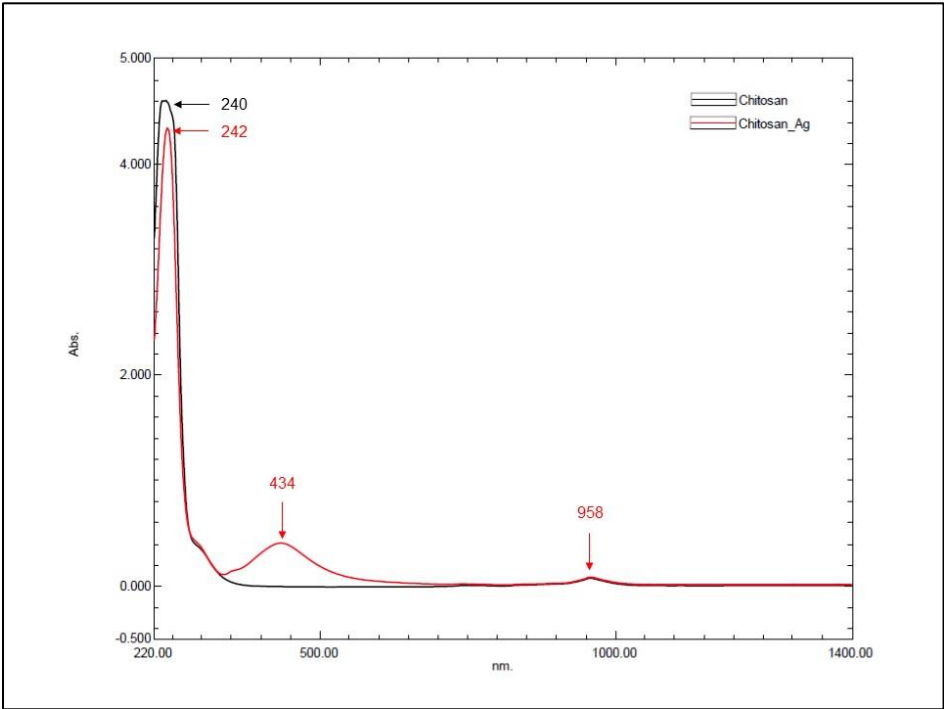
El comportamiento de resonancia de plasmón de las nanopartículas fue analizado por medio de espectroscopia ultravioleta visible utilizando un espectrómetro Shimadzu UV-2600 en un rango de 200 a 1400 nm. Todas las soluciones fueron analizadas en solución acuosa. Las absorbancias de los picos de plasmón más representativos de las distintas nanopartículas sintetizadas fueron obtenidos en soluciones acuosas estabilizadas con sustancias orgánicas solubles en agua o en forma de complejos como las que se funcionalizaron con Quitosán.



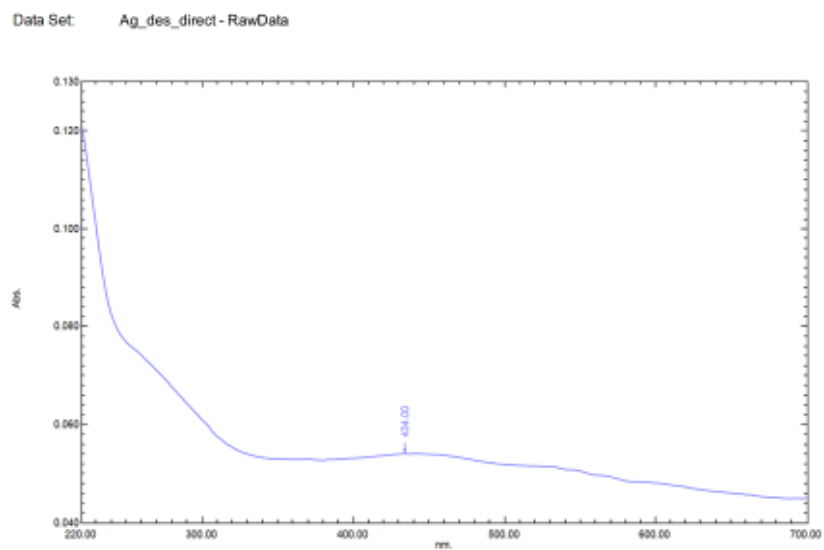
Espectrómetro Shimadzu UV-2600



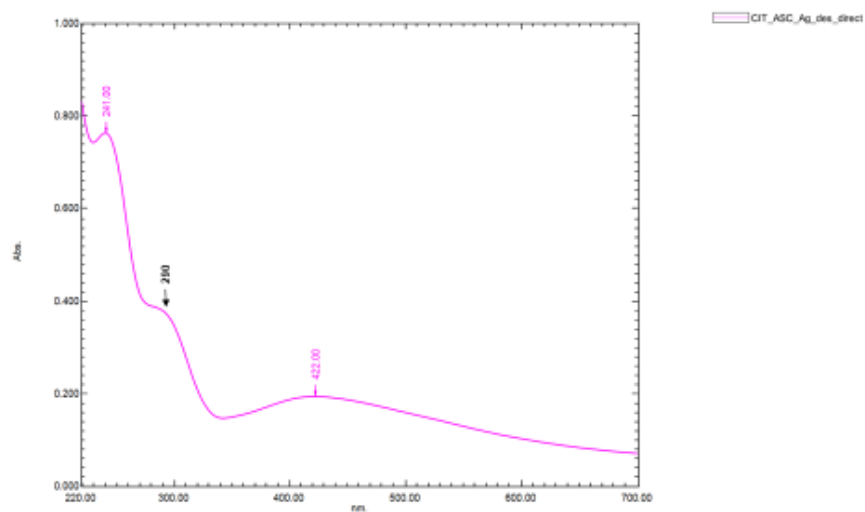
Espectro UV de Quitosán



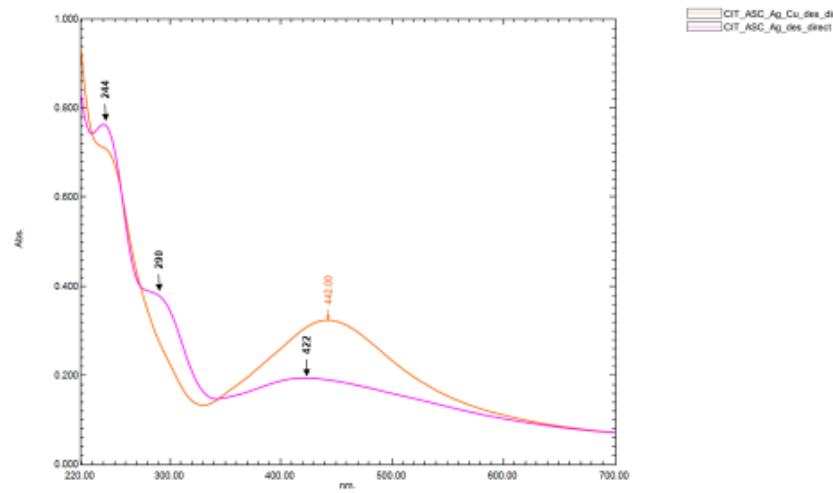
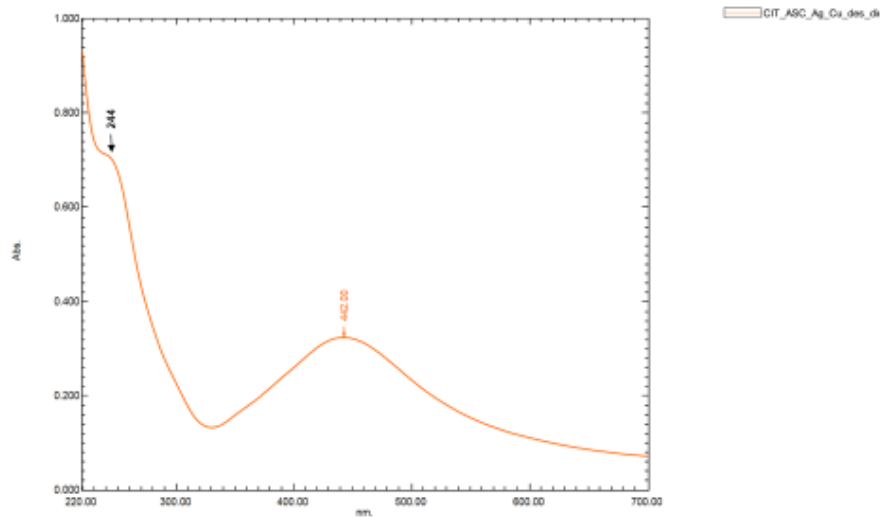
Espectro UV de Quitosán Plata (resonancia de plasmón para plata a 434 nm, curva en rojo)



(a)



Espectros de UV-VIS para nanopartículas de Plata no funcionalizadas (a) y (b) Plata estabilizada



Espectros de UV-VIS para nanopartículas de plata y Plata-cobre estabilizados en una misma solución

Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction

Yaqiong Qin, Xiaohui Ji, Jing Jing, Hong Liu, Hongli Wu, Wensheng Yang*

State Key Laboratory for Nanomaterials Structure and Materials, College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, PR China

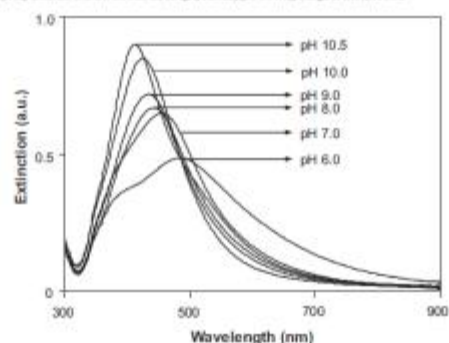
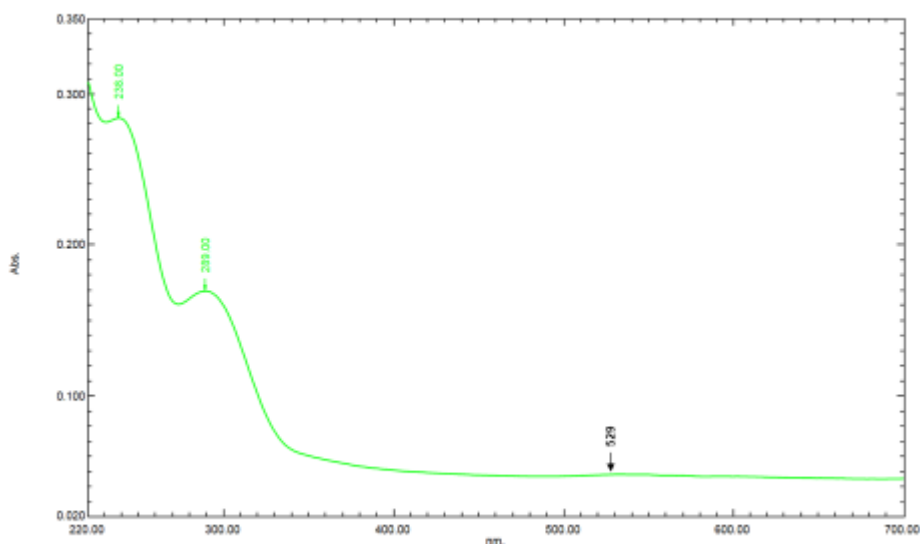


Fig. 1. UV-vis spectra of the silver nanoparticles synthesized at pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, and 10.5 at 30 °C.

The silver nanoparticles synthesized at pH of 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 and 10.5 presented absorption peaks at 480, 453, 442, 433, 422, and 412 nm

Data Set: Au_A_des_direct - RawData



Espectros de UV-VIS para nanopartículas de Oro estabilizadas

Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method

Agnieszka Zuber^{a,c,*}, Malcolm Purdey^{a,b}, Erik Schartner^{a,b}, Caroline Forbes^c, Benjamin van der Hoek^c, David Giles^c, Andrew Abell^{a,b}, Tanya Monro^{a,b,d}, Heike Ihrendorf-Hodegrem^{a,b}

^aSchool of Physics and Advanced Imaging, School of Physical Sciences, The University of Adelaide, Adelaide 5005, SA, Australia

^bCentre of Excellence for Advanced Bioimaging, The University of Adelaide, Adelaide 5005, SA, Australia

^cDeep Exploration Technologies Cooperative Research Centre, School of Physical Sciences, The University of Adelaide, Adelaide 5005, SA, Australia

^dUniversity of South Australia, Mawson 5095, SA, Australia

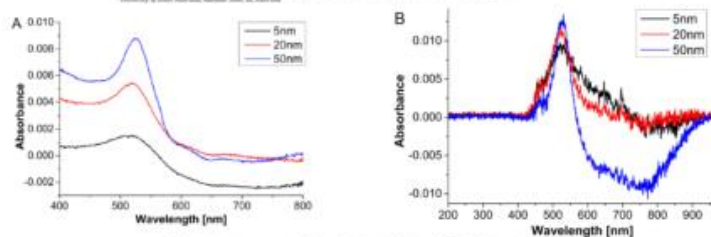
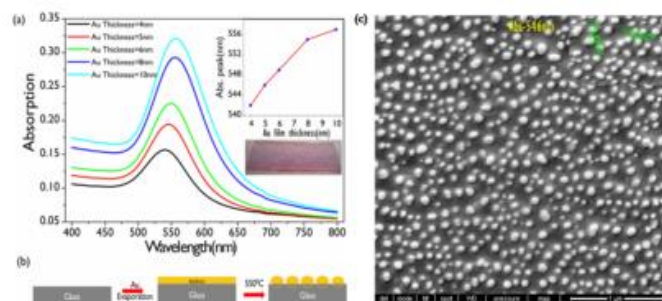


Fig. 5. Absorption spectrum of 5 nm, 20 nm and 50 nm gold NP solutions in cuvette: (A) for 236 ppb of gold and using laboratory Cary spectrometer, (B) for 738 ppb of gold and using portable spectrometer.

The peak maximum shifted from 514 nm for 5 nm NPs, through 519 nm for 20 nm NPs to 526 nm for 50 nm NPs. SPR peak of NPs made of different metal is shifted significantly, e.g. silver NPs 10–395 nm, 20–400 nm, 50–420 nm



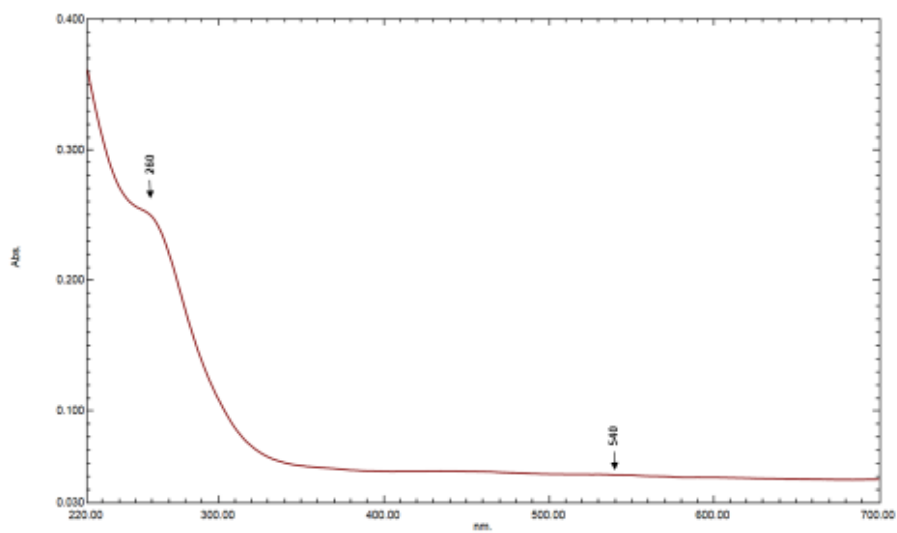
Citation

Rakesh Singh Moirangthem, Mohammad Tariq Yaseen, Pei-Kuen Wei, Ji-Yen Cheng, Yia-Chung Chang, "Enhanced localized plasmonic detections using partially-embedded gold nanoparticles and ellipsometric measurements," Biomed. Opt. Express **3**, 899-910 (2012);

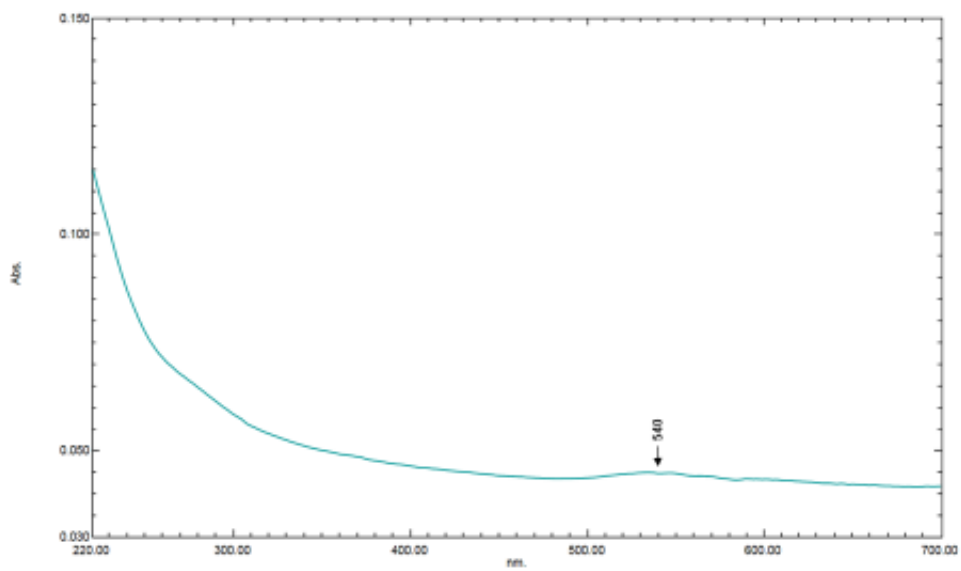
<https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-3-5-899>

image

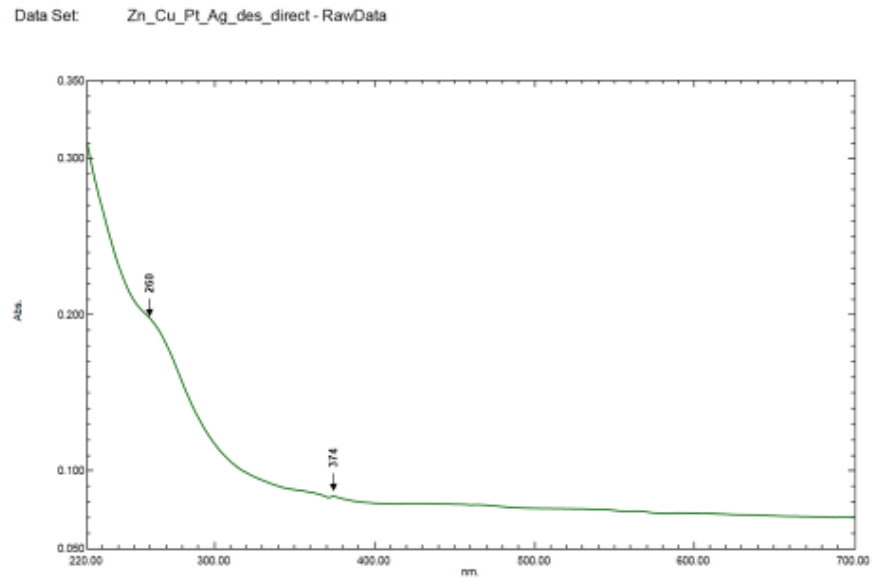
Data Set: Cu_des_direct - RawData



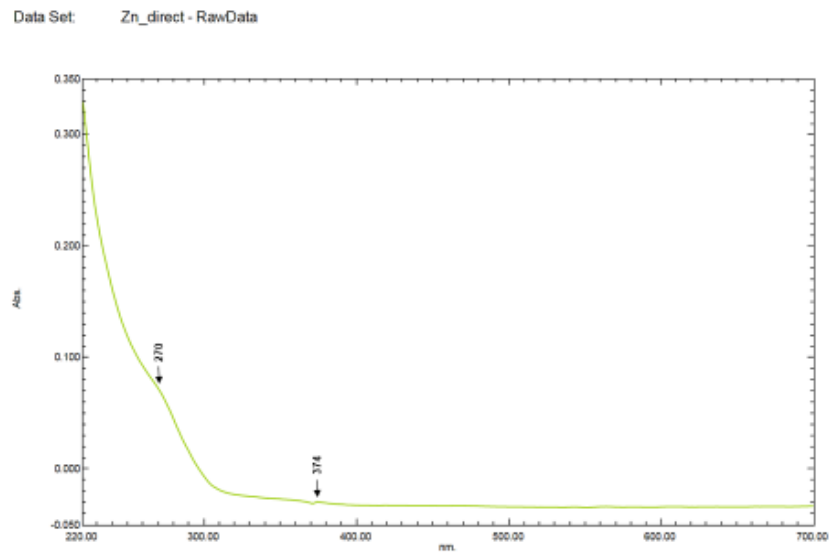
Data Set: Cu_A_des_Direct - RawData



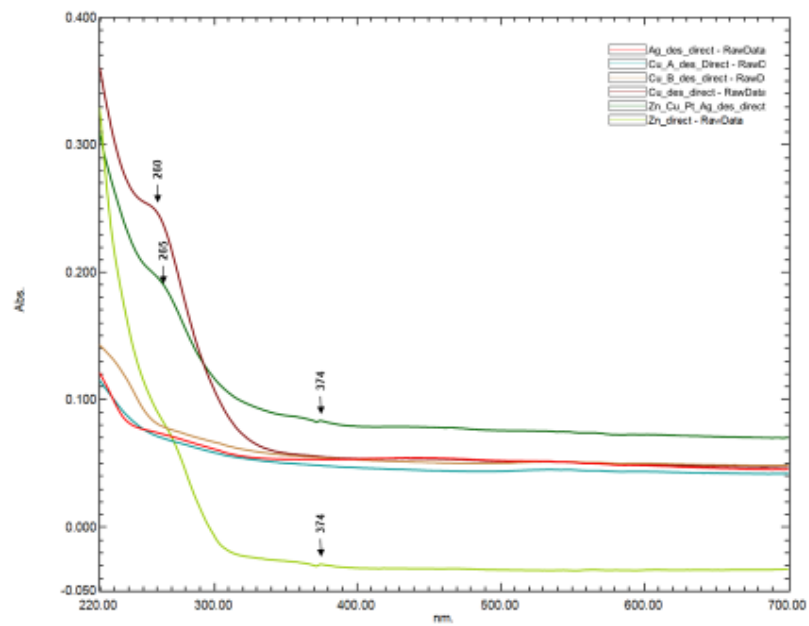
Espectros de UV-VIS para nanopartículas de cobre estabilizadas



Espectros de UV-VIS para una mezcla de nanopartículas de Plata-Zinc-Cobre-Platino estabilizada

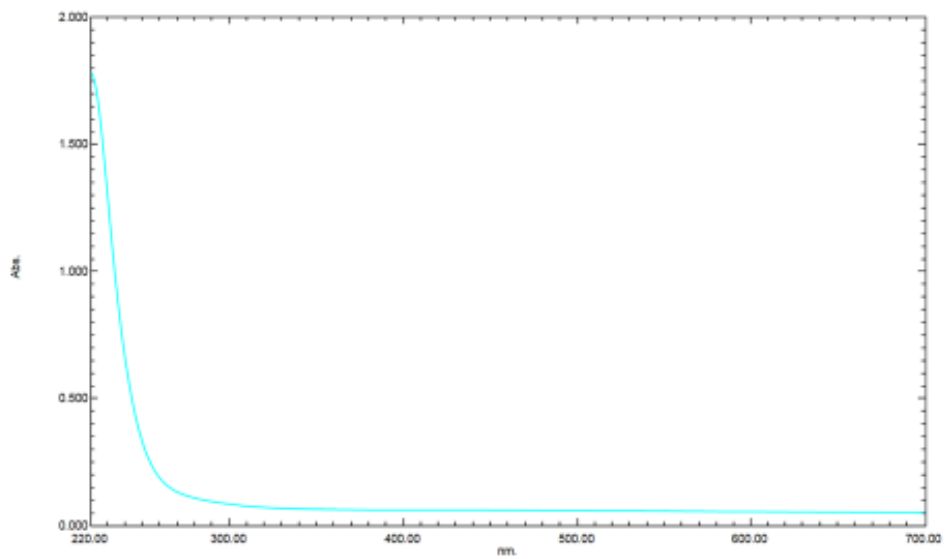


Espectros de UV-VIS para nanopartículas de Zinc funcionalizadas y estabilizadas

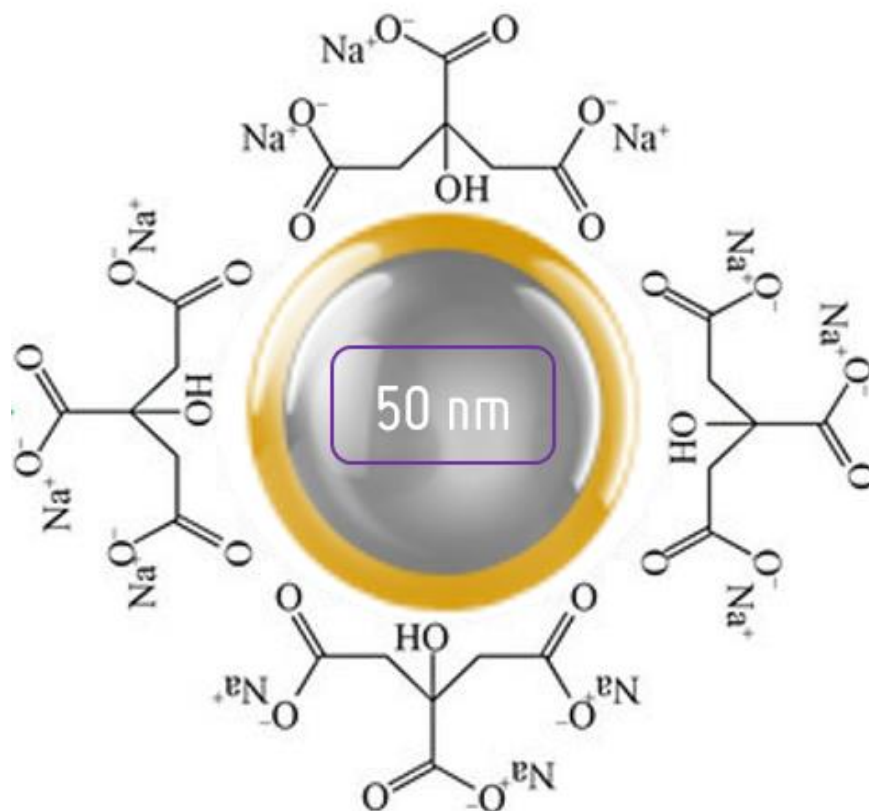


Espectros de UV-VIS para nanopartículas de Plata, cobre, platino y zinc estabilizadas

Data Set: Pb_des_direct - RawData



Espectros de UV-VIS para nanopartículas de Plomo no funcionalizadas



Representación esquemática de una nanopartículas de oro formando complejo con citrato de sodio (Caped) en una solución coloidal.

4.3. Análisis de contenido elemental Por Emisión Óptica de Plasma de Microondas MP-AES.

Las soluciones de esta investigación, fueron preparadas convenientemente en medio acuoso y de esta forma también para su análisis de su contenido elemental, lo cual se hizo en todas esas soluciones coloidales diseñadas para este trabajo. Los análisis se hicieron utilizando un instrumento de plasma de microondas, que consiste de un espectrómetro de emisión atómica de plasma de microondas marca Agilent, Modelo MP-AES 4200. El cual es un instrumento diseñado para analizar el contenido elemental de soluciones que utilizan espectroscopia de emisión. La espectroscopia de emisión es una técnica de medición basada en la observación

de la intensidad de las longitudes de onda discretas de la luz que emiten los átomos cuando se excitan a altas temperaturas: la longitud de onda de las líneas de emisión individuales está asociada con un elemento en particular.

Un MP-AES 4200 tiene la capacidad para generar la excitación suficiente de los átomos para estimular la emisión, la que se produce dentro de un plasma de microondas que comprende materia parcialmente ionizada en un estado extremadamente caliente, excitado a una temperatura de más de 5 000 °C. Este plasma acoplado magnéticamente se inicia mediante una chispa eléctrica a través de un pulso corto de argón que luego se mantiene dentro de la antorcha de cuarzo con la introducción continua de nitrógeno en la cavidad de microondas. Este gas se obtuvo del aire de forma continua desde un generador de nitrógeno Agilent Modelo 4107.

El plasma dentro de un aparato MP-AES 4200 atomiza y ioniza parcialmente una corriente de nitrógeno gaseoso cargada con un aerosol de la solución que se está analizando. Por consiguiente, el espectro de luz que irradia el plasma contiene longitudes de onda que son emitidas por el plasma de nitrógeno y el solvente vaporizado, que produce la señal de fondo; y también aportes de los solutos y sólidos suspendidos que incluyen los elementos de interés.

La luz del plasma es dirigida por un conjunto de espejos al compartimiento óptico del espectrómetro. Los componentes de precisión del mismo separan el espectro en función de la longitud de onda, los que, al separarse mediante una rejilla, permite la detección de líneas de emisión individuales contenidas dentro de un espectro discontinuo. En comparación con los valores obtenidos para soluciones de concentración conocida como soluciones de referencia estándar. La medición de la intensidad de la luz en diferentes longitudes de onda se puede utilizar para determinar la cantidad de un elemento en una solución de composición desconocida como en las muestras originales de este trabajo.

Los resultados obtenidos en estos análisis son:

8/9/2017 - Muestra coloidal: Ag-NPS

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag-NPS	8.54 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
8/9/2017	Ag-NPS	Ag (328.068 nm)	8.54	1064946.50	0.99958	0.039

8/9/2017 - Muestra coloidal: SOLUC 17

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
SOLUC 17	0.05 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
8/9/2017	SOLUC 17	Ag (328. 068 nm)	0.05	3676.98	0.99958	6.52

8/9/2017 - Muestra coloidal: SOLUC 20

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
SOLUC 17	0.07 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
8/9/2017	SOLUC 20	Ag (328.068 nm)	0.02	1177.78	0.99958	2.46

10/31/2017 - Muestra coloidal: Au1

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
Au1	1.03 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/31/2017	Au1	Au (267.595 nm)	1.03	9602.77	1.00000	0.34

10/31/2017 - Muestra coloidal: Au2

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
Au2	10.19 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/31/2017	Au2	Au (267.595 nm)	10.19	94663.58	1.00000	0.77

11/03/2017 - Muestra coloidal: Au-Coloidal

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
Au-Coloidal	113.90 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/03/2017	Au-Coloidal	Au (267.595 nm)	113.90	2249027	1.00000	0.67

11/03/2017 - Muestra coloidal: Pd-Coloidal

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Pd (340.458) nm)
Pd-Coloidal	28.41 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%R SD
11/03/2017	Pd-Coloidal	Pd (340.458 nm)	28.41	1470158.6	1.00000	0.14

11/22/2017 - Muestra coloidal: Au-Cu

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
Au-Cu	19.33 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%R SD
11/22/2017	Au-Cu	Au (267.595 nm)	19.33	179.47	1.00000	6.10

11/22/2017 - Muestra coloidal: Au-Cu

Elemento: Cobre (Cu)

Nombre de la Solución	Cu (324.754 nm)
Au-Cu	139.44 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%R SD
11/22/2017	Au-Cu	Cu (324.754nm)	139.44	34975.49	1.00000	1.36

01/04/2018 - Muestra coloidal: 1-4-2018

Elemento: Selenio (Se)

Nombre de la Solución	Se (196.026 nm)
1-4-2018	28.13 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
01/04/2018	1-4-2018	Se (196.026 nm)	28.13	139.75	0.99996	15.63

04/26/2018 - Muestra coloidal: 4-26-2018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
4-26-2018	18.27 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
4/26/2018	4-26-2018	Ag (328. 068 nm)	18.27	22774.39	0.99958	0.58

04/26/2018 - Muestra coloidal: 4-26-2018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
4-26-2018	18.27 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
4/26/2018	4-26-2018	Ag (328. 068 nm)	18.27	22774.39	0.99958	0.58

04/26/2018 - Muestra coloidal: 4-26-2018

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
4-26-2018	20.62 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
4/26/2018	4-26-2018	Au (267.595 nm)	20.62	22774.39	1.00000	2.71

04/26/2018 - Muestra coloidal: 4-26-2018

Elemento: Cobre (Cu)

Nombre de la Solución	Cu (324.754 nm)
4-26-2018	13.68 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
4/26/2018	4-26-2018	Cu (324.754 nm)	13.68	34316.83	1.00000	2.56

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Calcio (Ca)

Nombre de la Solución	Ca (445.478 nm)
MoroAgua	31.76 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
09/14/2018	MoroAgua	Ca (445.478 nm)	31.76	811.75	1.00000	0.53

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Cobre (Cu)

Nombre de la Solución	Cu (324.754 nm)
MoroAgua	0.07 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	Cu (324.754 nm)	0.07	158.05	1.00000	36.42

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Hierro (Fe)

Nombre de la Solución	Fe (371.993 nm)
MoroAgua	1.29 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	Fe (371.993 nm)	1.29	229.37	0.99998	8.44

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Potasio (K)

Nombre de la Solución	K (766.491 nm)
MoroAgua	63.97 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	K (766.491 nm)	63.97	194350.86	1.00000	0.86

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Litio (Li)

Nombre de la Solución	Li (670.784 nm)
MoroAgua	0.03 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	Li (670.784 nm)	0.03	762.81	1.00000	1.17

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Fósforo (P)

Nombre de la Solución	P (213.18 nm)
MoroAgua	109.28 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	P (213.18 nm)	109.28	607.37	1.00000	1.33

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Zinc (Zn)

Nombre de la Solución	Zn (213.857 nm)
MoroAgua	0.20 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	Zn (213.857 nm)	0.20	44.68	1.00000	68.13

09/14/2018 - Muestra coloidal: MoroAgua

Elemento: Magnesio (Mg)

Nombre de la Solución	Mg (279.553 nm)
MoroAgua	11.3 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/14/2018	MoroAgua	Mg (279.553 nm)	11.3	3146460.6	1.00000	0.08

09/15/2018 - Muestra coloidal: 9-15-2018

Elemento: Platino (Pt)

Nombre de la Solución	Pt (265.945 nm)
-----------------------	-----------------

9-15-2018	69.21 (ppm)
------------------	-------------

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/15/2018	9-15-2018	Pt (265.945 nm)	0.006	48.873	0.99999	69.40

09/15/2018 - Muestra coloidal: 9-15-2018

Elemento: Sodio (Na)

Nombre de la Solución	Na (588.995 nm)
9-15-2018	43.84 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-15-2018	Na (588.995 nm)	43.84	661811.66	1.00000	0.87

09/19/2018 - Muestra coloidal: 9-19-2018

Elemento: Platino (Pt)

Nombre de la Solución	Pt (265.945 nm)
9-19-2018	69.21 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/19/2018	9-19-2018	Pt (265.945 nm)	69.21	1086.36	0.99999	0.43

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Calcio (Ca)

Nombre de la Solución	Ca (445.478 nm)
9-20-2018	42.72 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Ca (445.478 nm)	42.72	1086.36	1.00000	0.57

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Cobre (Cu)

Nombre de la Solución	Cu (324.754 nm)
9-20-2018	0.02 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Cu (324.754 nm)	0.02	4134.83	1.00000	1.35

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Hierro (Fe)

Nombre de la Solución	Fe (371.993 nm)
9-20-2018	2.77 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Fe (371.993 nm)	2.77	496.20	0.99994	1.59

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Potasio (K)

Nombre de la Solución	K (766.491 nm)
9-20-2018	69.68 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	K (766.491 nm)	69.68	211685.16	1.00000	1.43

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Litio (Li)

Nombre de la Solución	Li (670.784 nm)
9-20-2018	0.021 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Li (670.784 nm)	0.021	59280.90	1.00000	2.26

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Fósforo (P)

Nombre de la Solución	P (213.18 nm)
9-20-2018	53.77 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	P (213.18 nm)	53.77	298.82	1.00000	22.23

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Azufre (S)

Nombre de la Solución	S (181.972 nm)
9-20-2018	3.67 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	S (181.972 nm)	3.67	4.13	1.00000	85.12

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Zinc (Zn)

Nombre de la Solución	Zn (213.857 nm)
9-20-2018	0.05 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD

9/20/2018	9-20-2018	Zn (213.857 nm)	0.05	1131.05	1.00000	2.78
-----------	------------------	-----------------	------	---------	---------	------

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Magnesio (Mg)

Nombre de la Solución	Mg (279.553 nm)
9-20-2018	20.3 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Mg (279.553 nm)	20.3	58598.9	1.00000	0.33

09/20/2018 - Muestra coloidal: 9-20-2018

Elemento: Sodio (Na)

Nombre de la Solución	Na (588.995 nm)
9-20-2018	44.19 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
9/20/2018	9-20-2018	Na (588.995 nm)	44.19	667113.26	1.00000	0.09

10/03/2018 - Muestra coloidal: 10-03-2018

Elemento: Platino (Pt)

Nombre de la Solución	Pt (265.945 nm)
10-03-2018	8.81 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/03/2018	10-03-2018	Pt (265.945 nm)	8.81	660.90	0.99999	3.53

10/10/2018 - Muestra coloidal: 10-10-2018

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
10-10-2018	43.54 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/10/2018	10-10-2018	Au (267.595 nm)	43.54	11277.07	1.00000	2.17

10/22/2018 - Muestra coloidal: 10-22-2018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
10-22-2018	51.00 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/22/2018	10-22-2018	Ag (328.068 nm)	51.00	75460.77	1.00000	1.59

10/22/2018 - Muestra coloidal: 10-22-2018

Elemento: Cobre (Cu)

Nombre de la Solución	Cu (324.754 nm)
10-22-2018	944.91 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/22/2018	10-22-2018	Cu (324.754 nm)	944.91	207123.44	1.00000	0.60

10/26/2018 - Muestra coloidal: As-Pt-10-26-2018

Elemento: Arsénico (As)

Nombre de la Solución	As (193.695 nm)
-----------------------	-----------------

As-Pt-10-26-2018	663.50 (ppm)
-------------------------	--------------

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/26/2018	As-Pt-10-26-2018	As (193.695 nm)	663.50	476.31	1.00000	5.16

10/26/2018 - Muestra coloidal: As-Pt-10-26-2018

Elemento: Platino (Pt)

Nombre de la Solución	Pt (265.945 nm)
As-Pt-10-26-2018	46.63 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
10/26/2018	As-Pt-10-26-2018	Pt (265.945 nm)	46.63	349.83	0.99999	8.96

11/02/2018 - Muestra coloidal: Ag-Galon-11012018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag-Galon-11012018	177.27 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/02/2018	Ag-Galon-11012018	Ag (328.068 nm)	177.27	2622.74	1.00000	0.62

11/02/2018 - Muestra coloidal: Ag-Tubo 1-11012018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag-Tubo 1-11012018	6249.45 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/02/2018	Ag-Tubo 1-11012018	Ag (328.068 nm)	6249.45	92461.23	1.00000	0.85

11/02/2018 - Muestra coloidal: Ag-Tubo 2-11012018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag-Tubo 2-11012018	28342.16 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/02/2018	Ag-Tubo 2-11012018	Ag (328.068 nm)	28342.16	41932.50	1.00000	1.11

11/12/2018 - Muestra coloidal: Ag-615mL-11122018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag-615mL-11122018	6.29 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/12/2018	Ag-615mL-11122018	Ag (328.068 nm)	6.29	9300.23	1.00000	1.47

11/12/2018 - Muestra coloidal: Ag-AgNPs-11122018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag- AgNPs -11122018	91.03 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/12/2018	Ag- AgNPs - 11122018	Ag (328.068 nm)	91.03	13468.29	1.00000	1.65

11/13/2018 - Muestra coloidal: Ag-AgNPsY-11132018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag- AgNPs -11132018	743.06 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/13/2018	Ag- AgNPsY - 11132018	Ag (328.068 nm)	743.06	109935.97	1.00000	0.74

11/13/2018 - Muestra coloidal: Ag-Tubo 4-11132018

Elemento: Plata (Ag)

Nombre de la Solución	Ag (328.068 nm)
Ag- Tubo 4-11132018	17.67 (ppm)

Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/13/2018	Ag-Tubo 4- 11132018	Ag (328.068 nm)	17.67	26148.04	1.00000	1.35

11/23/2018 - Muestra coloidal: 11-23-2018-directo

Elemento: Oro (Au)

Nombre de la Solución	Au (267.595 nm)
11-23-2018-directo	5.86 (ppm)

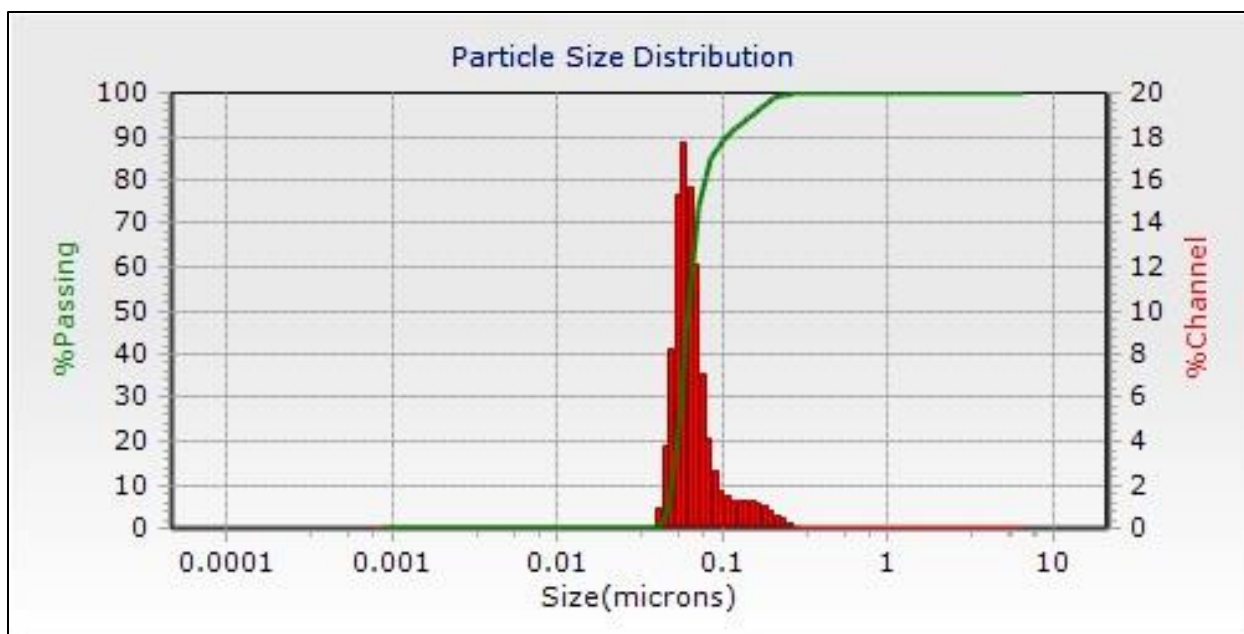
Fecha	Nombre	Elemento/nm	Conc. (ppm)	Intensidad	Coeficiente de correlación	%RSD
11/23/2018	11-23-2018-directo	Au (267.595 nm)	5.86	151865.53	1.00000	0.65

4.4. Determinación de tamaño de partícula nanométrica por Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

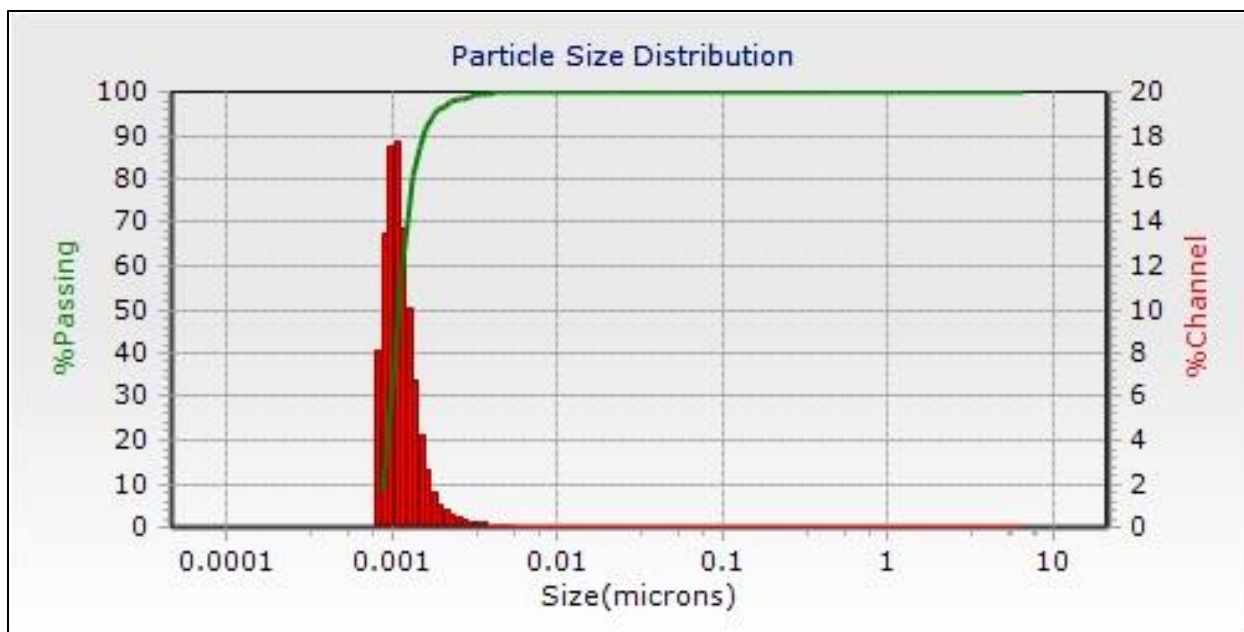
La dispersión de luz dinámica (DLS), a la que a veces se hace referencia como dispersión de luz cuasi elástica (QELS), es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica, y con la última tecnología, inferiores a 1 nm.

Las aplicaciones típicas de la dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein.

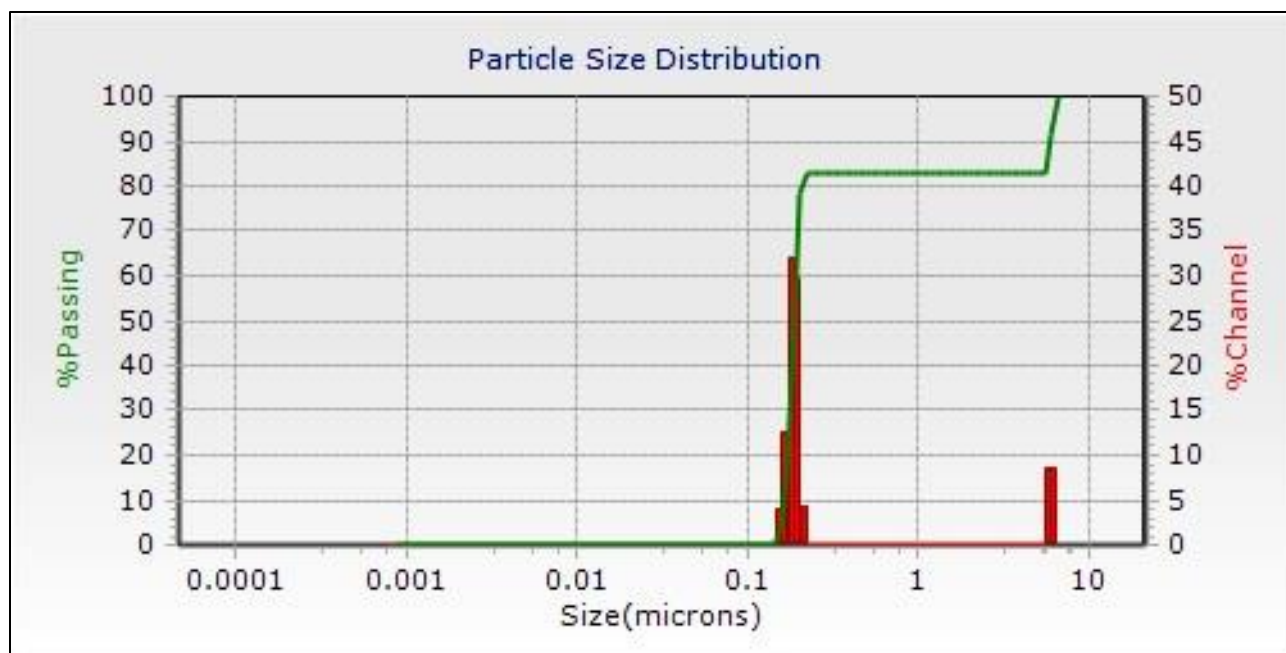
Se utilizó un equipo Nanotracs Wave II para llevar a cabo mediciones de tamaño de partícula y el potencial Zeta en soluciones coloidales de las partículas sintetizadas objeto del presente estudio.



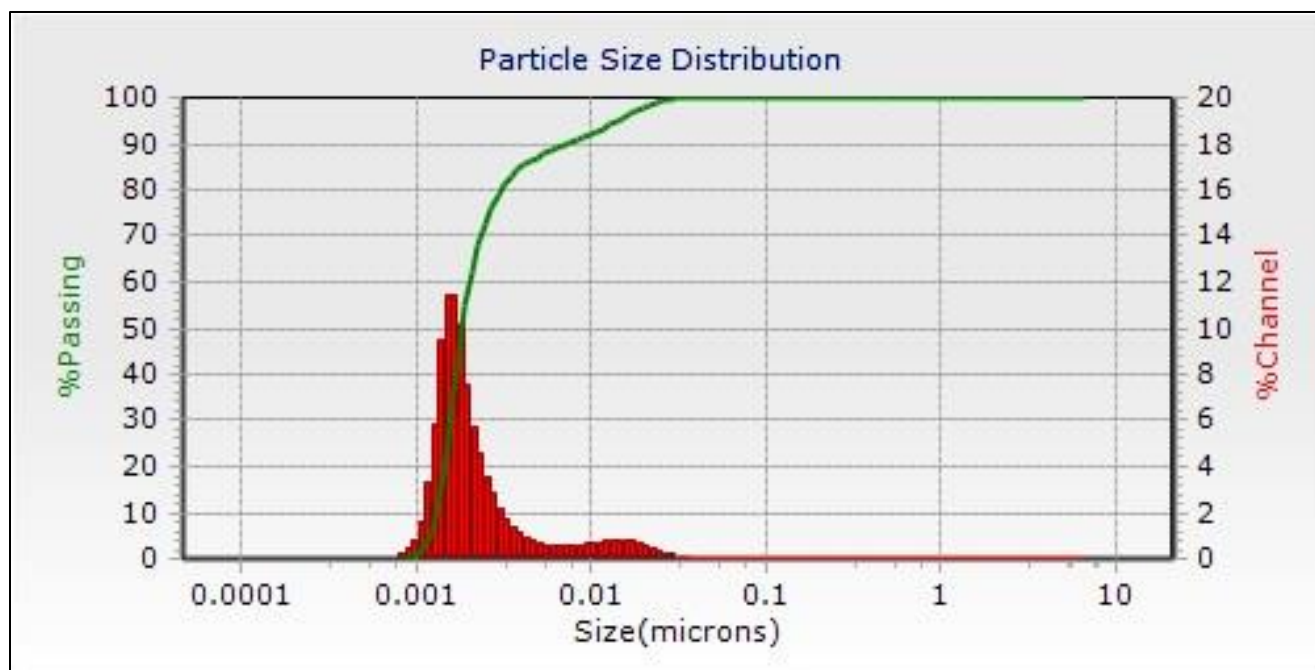
Distribución de tamaño de nanopartículas de oro coloidal sintetizadas por método electroquímico.



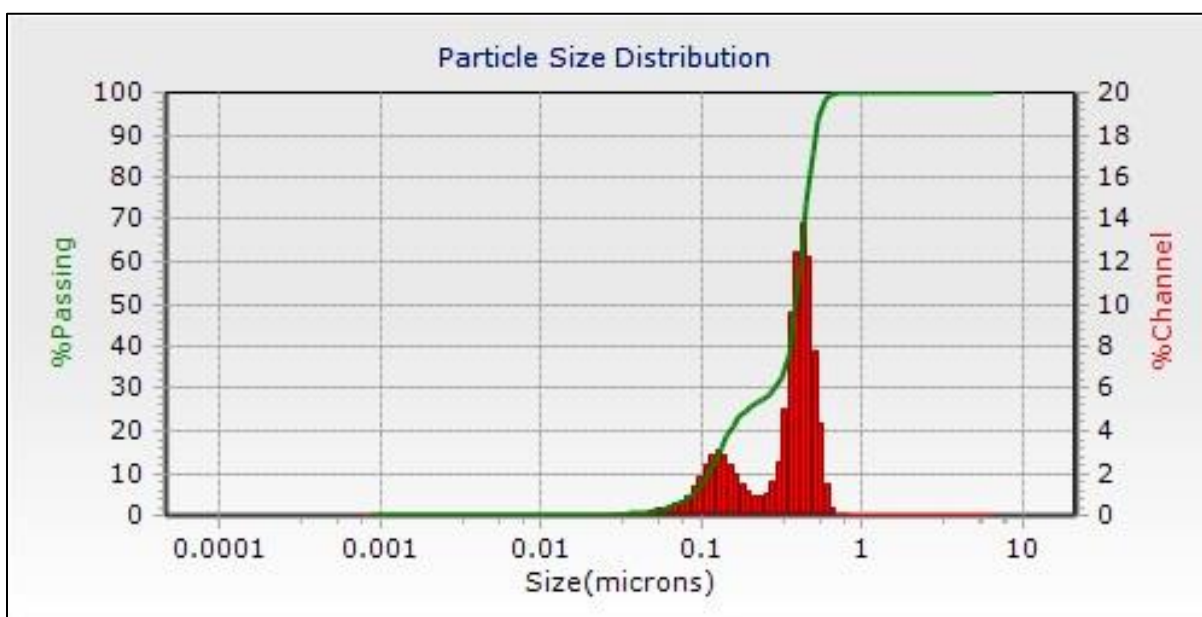
Distribución de tamaño de nanopartículas de paladio coloidal sintetizadas por método electroquímico.



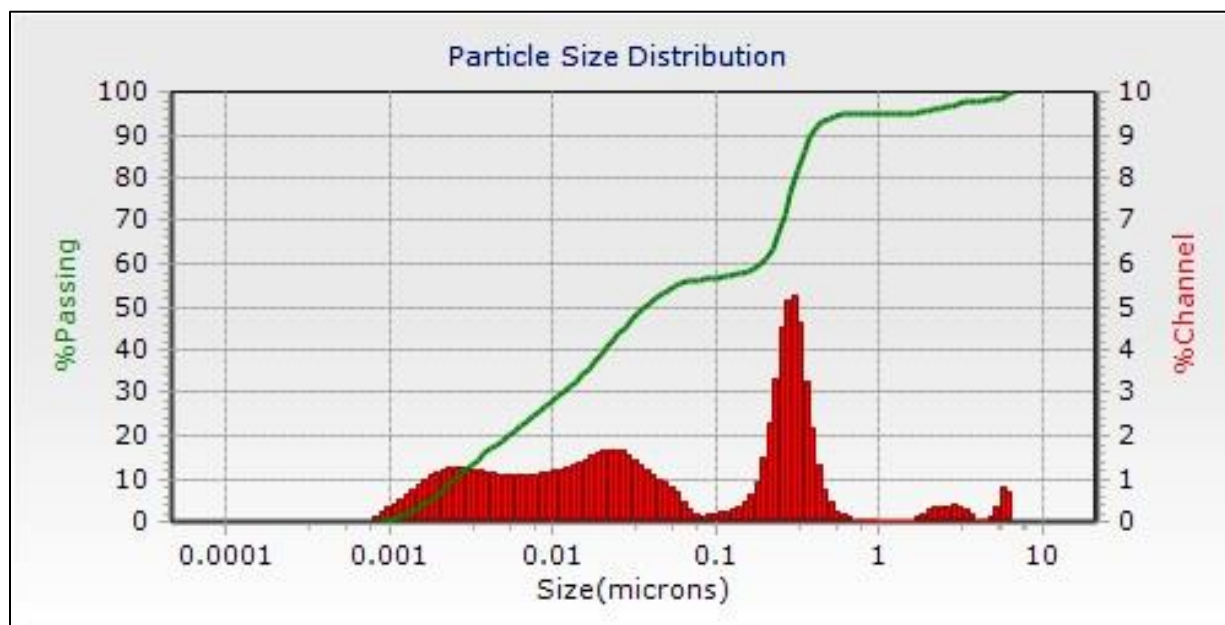
Distribución de tamaño de nanopartículas de Platino coloidal sintetizadas por método electroquímico.



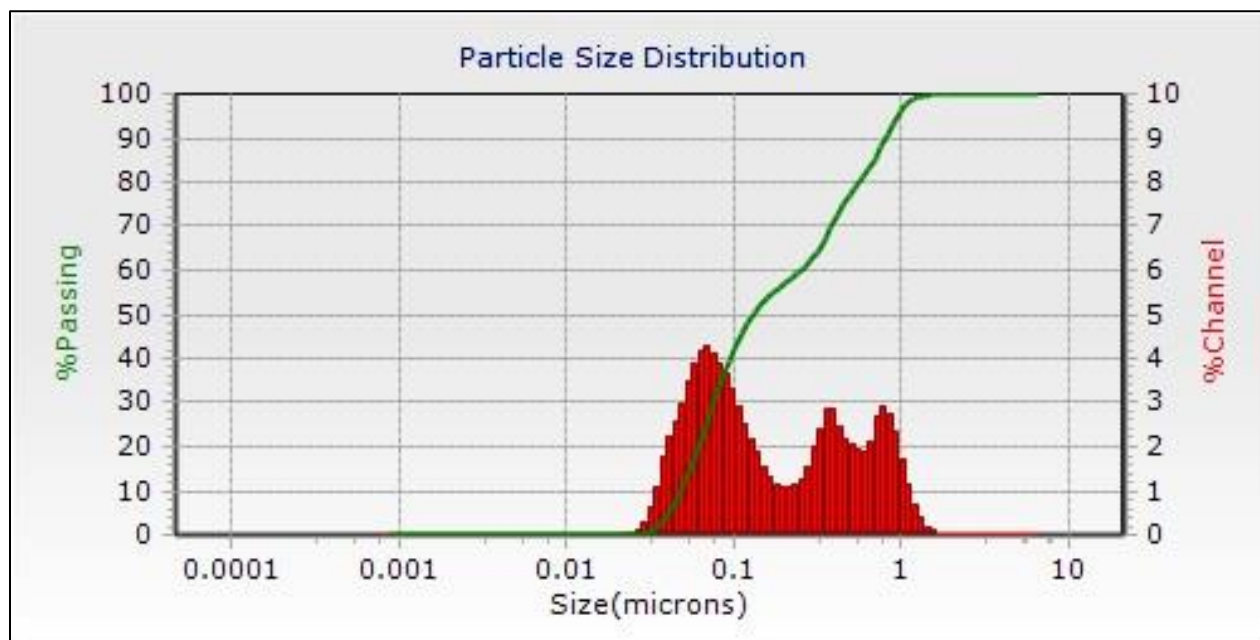
Distribución de tamaño de nanopartículas de plata coloidal sintetizadas por método electroquímico.



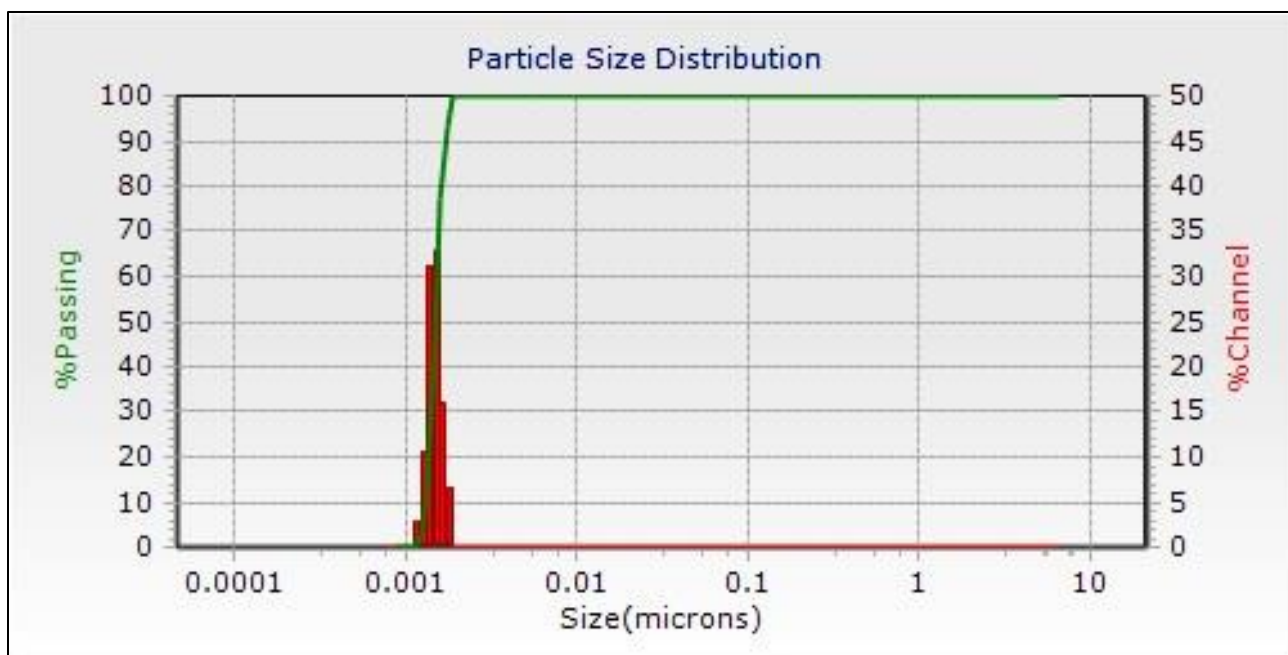
Distribución de tamaño de nanopartículas de cobre coloidal sintetizadas por método electroquímico.



Distribución de tamaño de nanopartículas de Zinc coloidal sintetizadas por método electroquímico.



Distribución de tamaño de nanopartículas de arsénico coloidal sintetizadas por método químico electroquímico.



Distribución de tamaño de nanopartículas de Plomo coloidal sintetizadas por método electroquímico.

4.5. Análisis de superficie por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM). Análisis químico por Espectroscopia de Energía Dispersada por Rayos-X EDS

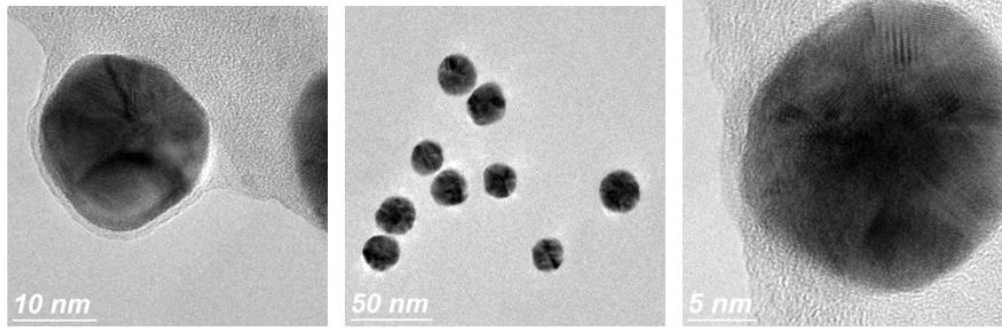
Las imágenes de microscopia electrónica fueron utilizadas para corroborar la naturaleza morfológica, estructural y química de las muestras y/o nano estructuras estudiadas. Haciendo uso de un conjunto de detectores y módulos de acoplamiento en los dos equipos de microscopia utilizados, se logró obtener información a través de imágenes y espectros que le agregan un valor adicional al presente documento de tesis. Los equipos utilizados son el JEOL JSM-5300 (SEM) y el JEOL JEM-2010 (TEM), ambos con un moderno sistema de adquisición de imágenes digitales del fabricante GATAN.

A través de microscopia electrónica de barrido SEM (por sus siglas del inglés, Scanning Electron Microscopy), se pudieron observar de primera mano las imágenes de las nanopartículas metálicas obtenidas. Para esto fue necesario soportar dichas nanopartículas sobre soportes conductivos base carbón, dándole la estabilidad de carga necesaria a la muestra y la porta muestra para la interacción con el haz de electrones, y así, obtener las imágenes más representativas utilizando altas amplificaciones. Estableciendo los parámetros de barrido del haz de electrones adecuados, fue posible obtener información de la composición química en forma selectiva para conocer el contenido elemental presente en cada nanopartícula. Utilizando un detector acoplado al SEM para realizar espectroscopia de energía dispersada por rayos-X EDS (por sus siglas del inglés, Energy Dispersive Spectroscopy), podemos inferir la naturaleza elemental de la muestra, como puede ser observado en los espectros que se muestran en el presente documento de tesis. Se configuraron voltajes de aceleración de electrones de entre 5 y 15 kV para obtener los contrastes adecuados en el análisis presentado, así como, el volumen de interacción y la profundidad de la señal obtenida. El detector de electrones secundarios fue utilizado para las imágenes SEM que se presentan en el presente documento.

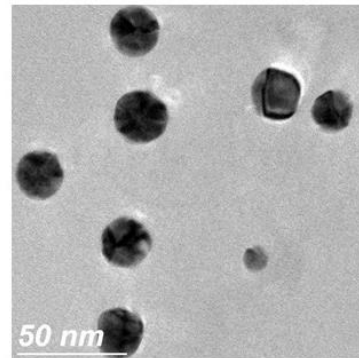
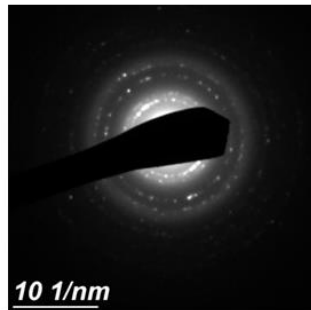
Se utilizó microscopía electrónica de transmisión TEM (por sus siglas del inglés, Transmisión Electron Microscopy), para conocer la naturaleza estructural/cristalográfica de la muestra y poder obtener imágenes de alta resolución evidenciando los espaciamientos interatómicos de las nanopartículas asociadas a su naturaleza química. Para el soporte de las muestras fue necesario utilizar rejillas de cobre mesh 200 recubiertas con una fina película de carbón, permitiendo soportar físicamente las partículas metálicas y ayudar con el contraste obtenido por la transmisión de electrones. El voltaje de aceleración de electrones utilizados fue de 200 kV para obtener imágenes de alta resolución, estabilizando las muestras después de 2 hrs de interacción con el haz. De las imágenes TEM aquí presentadas, se pudo realizar una estimación de la densidad de partículas por unidad de área, así como, la pureza de las mismas mediante la estructura cristalográfica asociada al elemento metálico correspondiente.



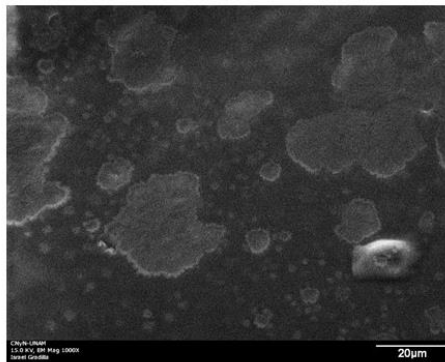
Microscopios electrónicos de barrido y haz de iones enfocado.



Nanopartículas de Oro (Au) Coloidal
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de transmisión

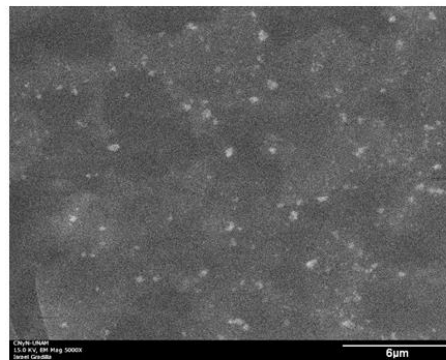


Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro.

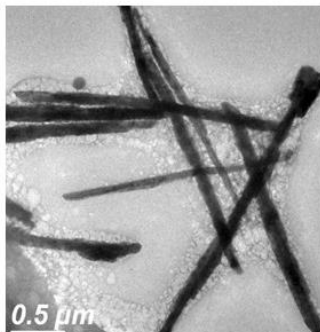
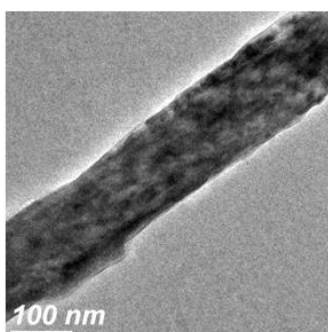
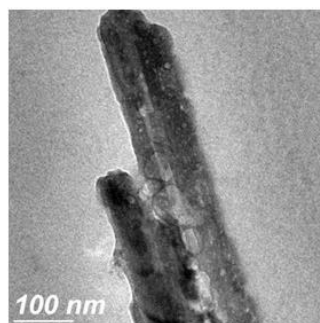
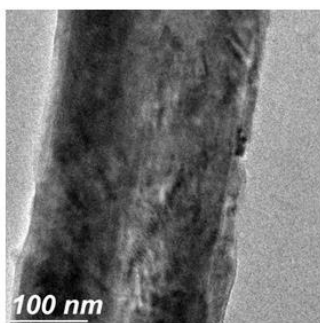
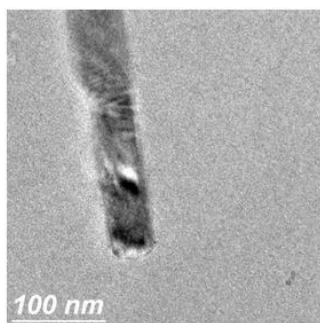


Nanopartículas de Selenuro de cadmio (SeCd) coloidal
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de Barrido

Nanopartículas de platino (Pt)coloidal funcionalizadas
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de Barrido

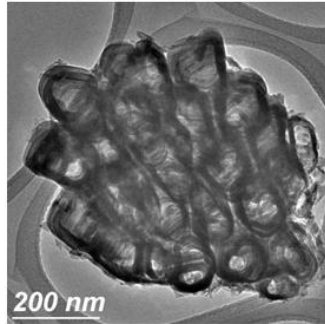
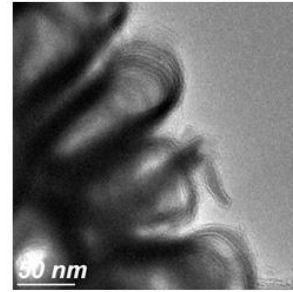
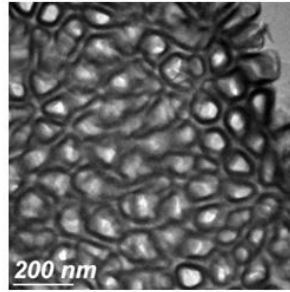
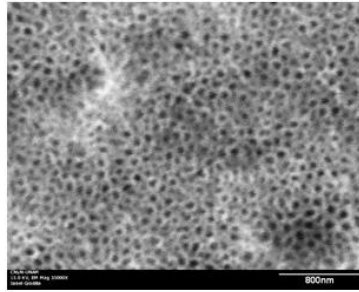


Microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de Selenuro de Cadmio y Platino funcionalizadas.

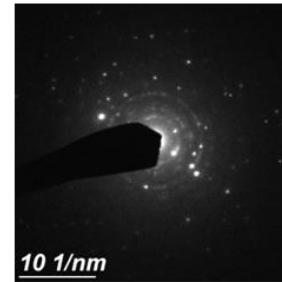


Selenio (Se) Coloidal
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de
transmisión

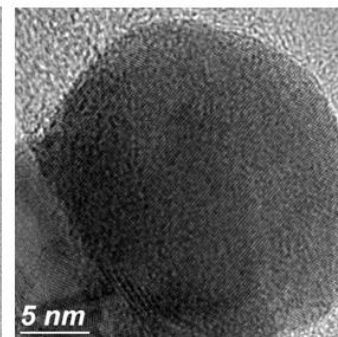
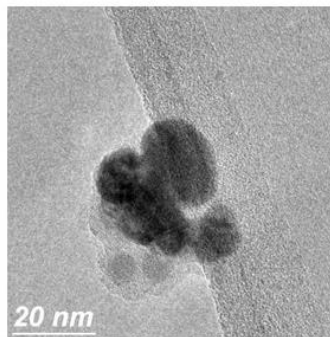
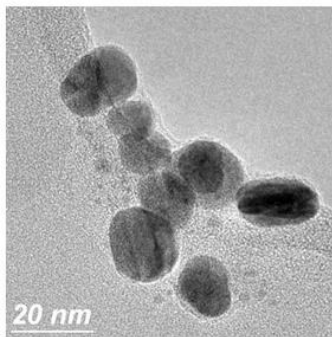
Microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de Selenio



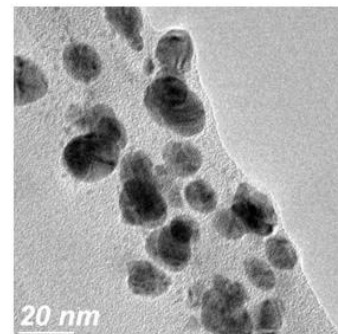
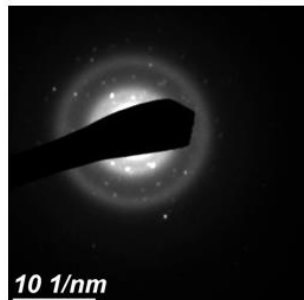
Nanotubos de Titanio (Ti)
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica
de transmisión



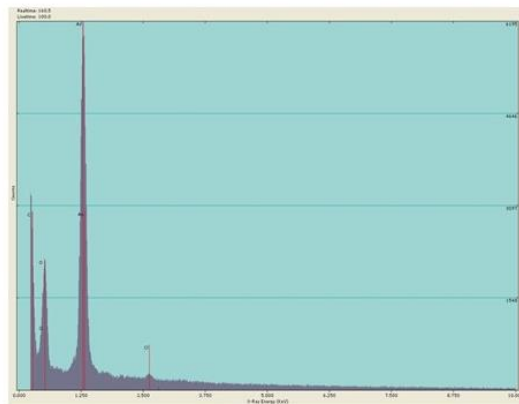
Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de titanio (Nanotubos)



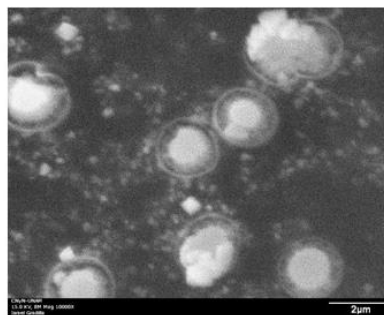
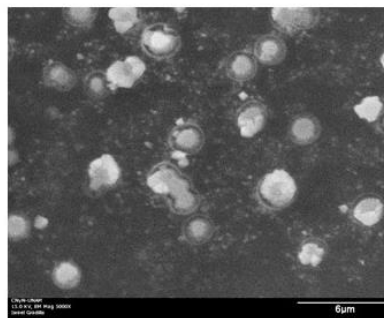
Nanopartículas de Plata (Ag) Coloidal
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de transmisión



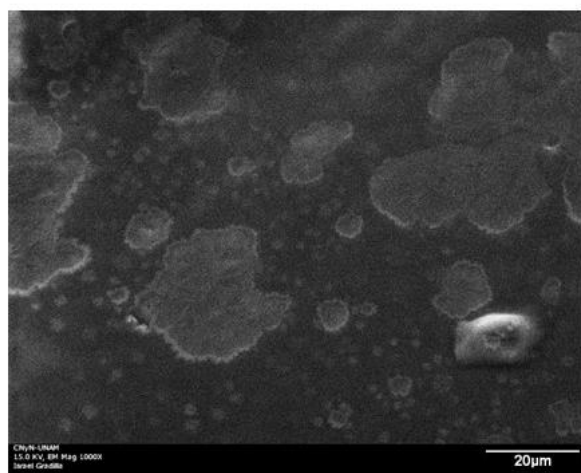
Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de Plata



Arsénico Coloidal Funcionalizado
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de Barrido - EDX

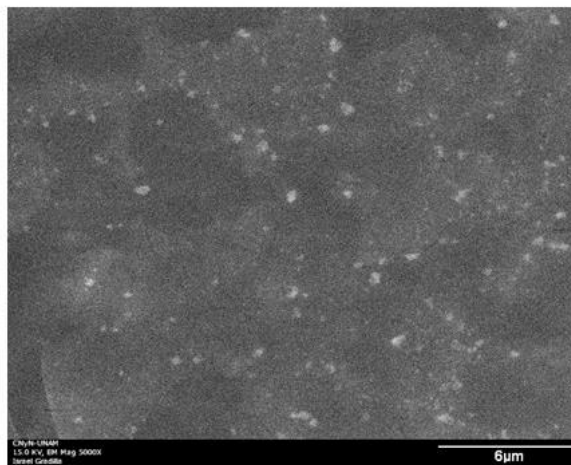


Microscopia electrónica de Barrido y EDS de nanopartículas de Arsénico funcionalizadas.

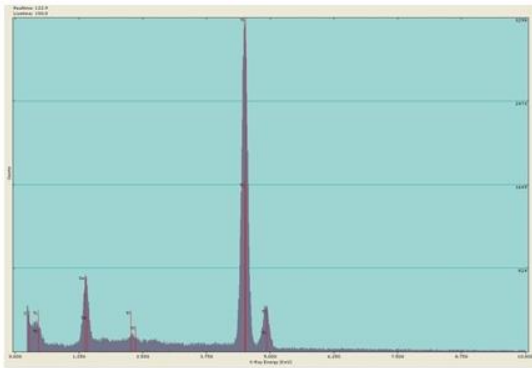
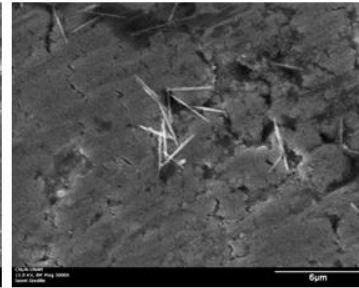
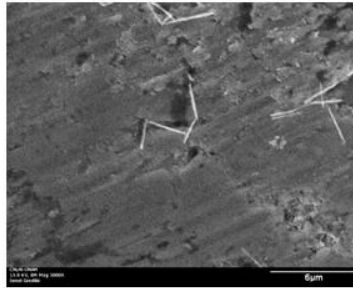
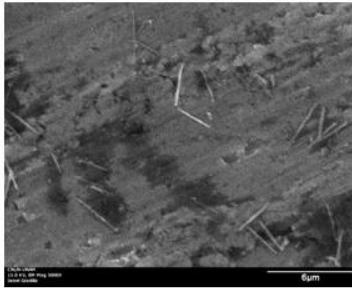


Nanopartículas de Selenuro de cadmio (SeCd) coloidal
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de Barrido

Nanopartículas de platino (Pt)coloidal funcionalizadas
Síntesis electroquímica
Microscopía electrónica de Barrido

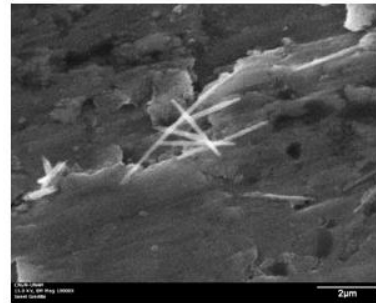


Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de Selenuro de Cadmio y Platino funcionalizadas.



Selenio Coloidal Síntesis electroquímica

SEM-EDX

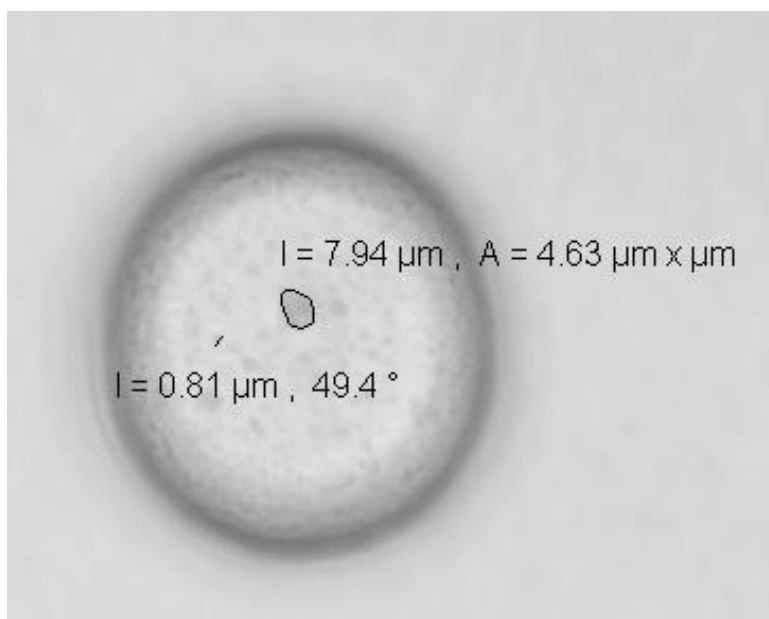


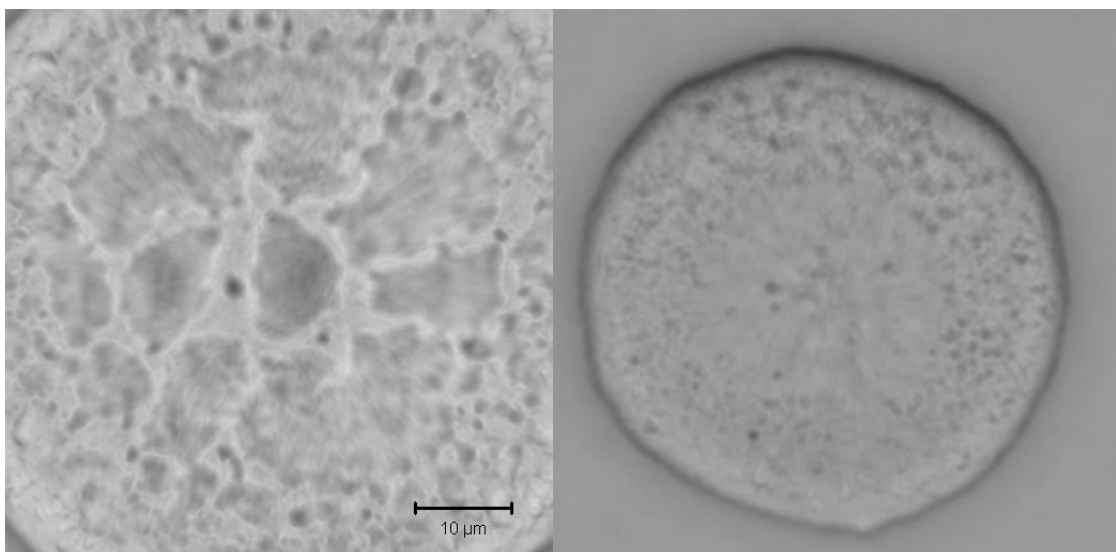
Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de Selenio

4.6. Análisis de microscopia óptica confocal.

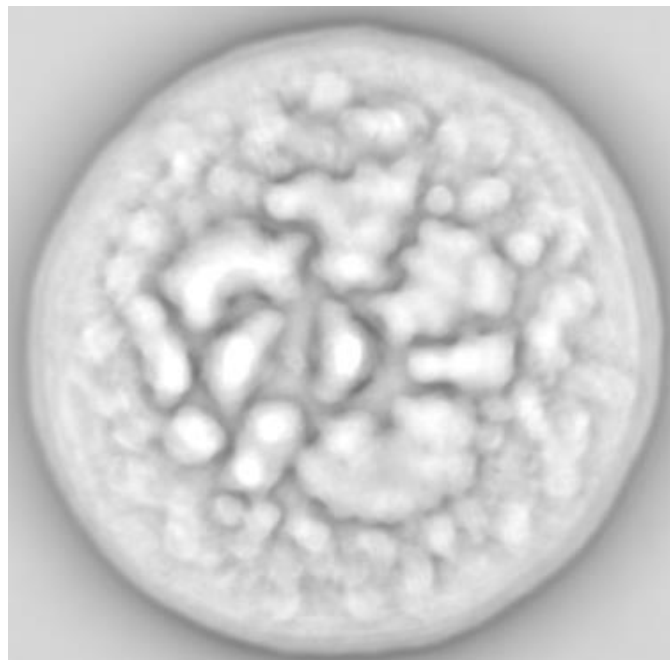
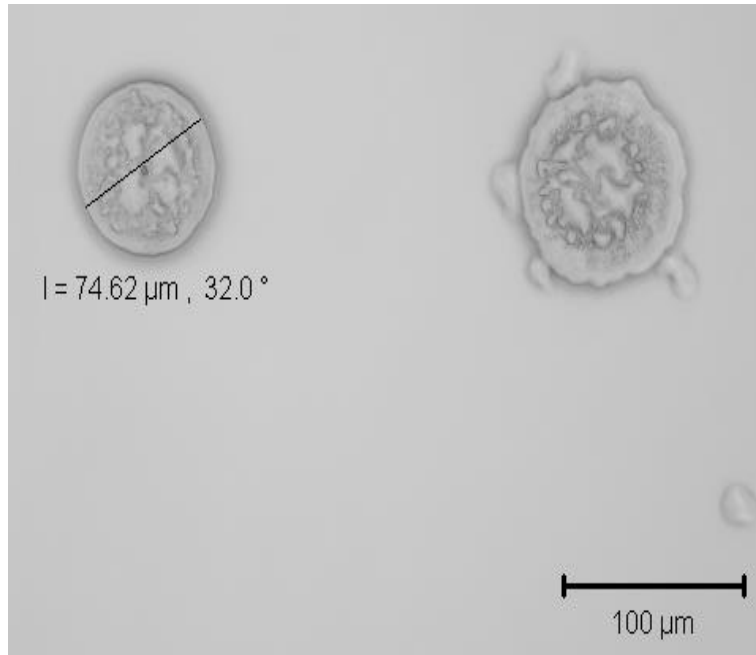
Con el apoyo de la Dra. Lucien Veleza se llevaron a cabo análisis con microscopio confocal. Como se podrá observar las nanopartículas ahora funcionalizadas con estructura de liposoma son de tamaño micrométrico al formar el clúster.

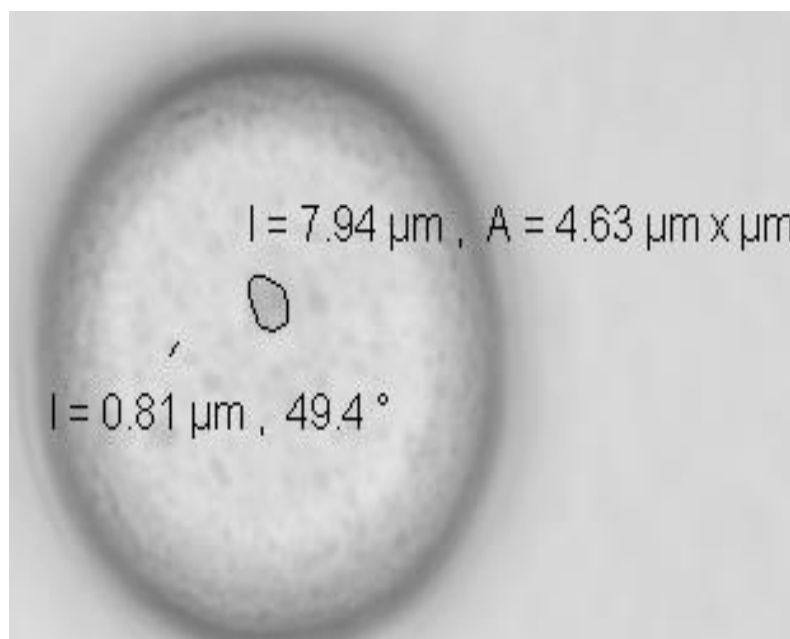
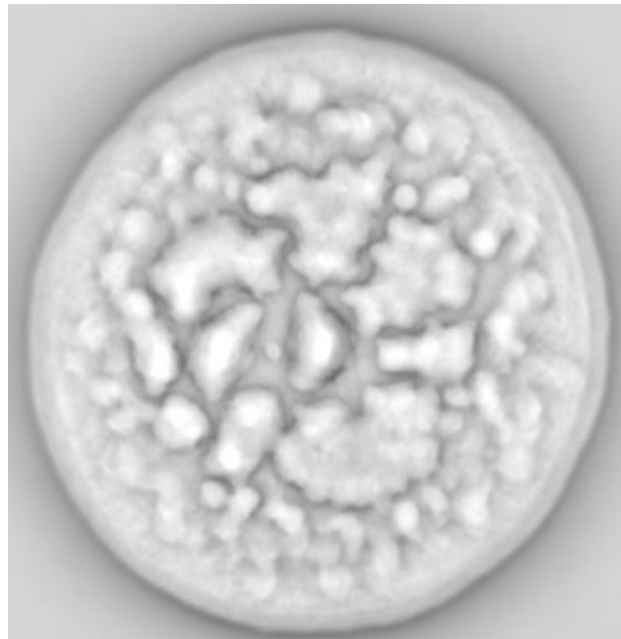
Zn microscopio óptico Confocal (2)

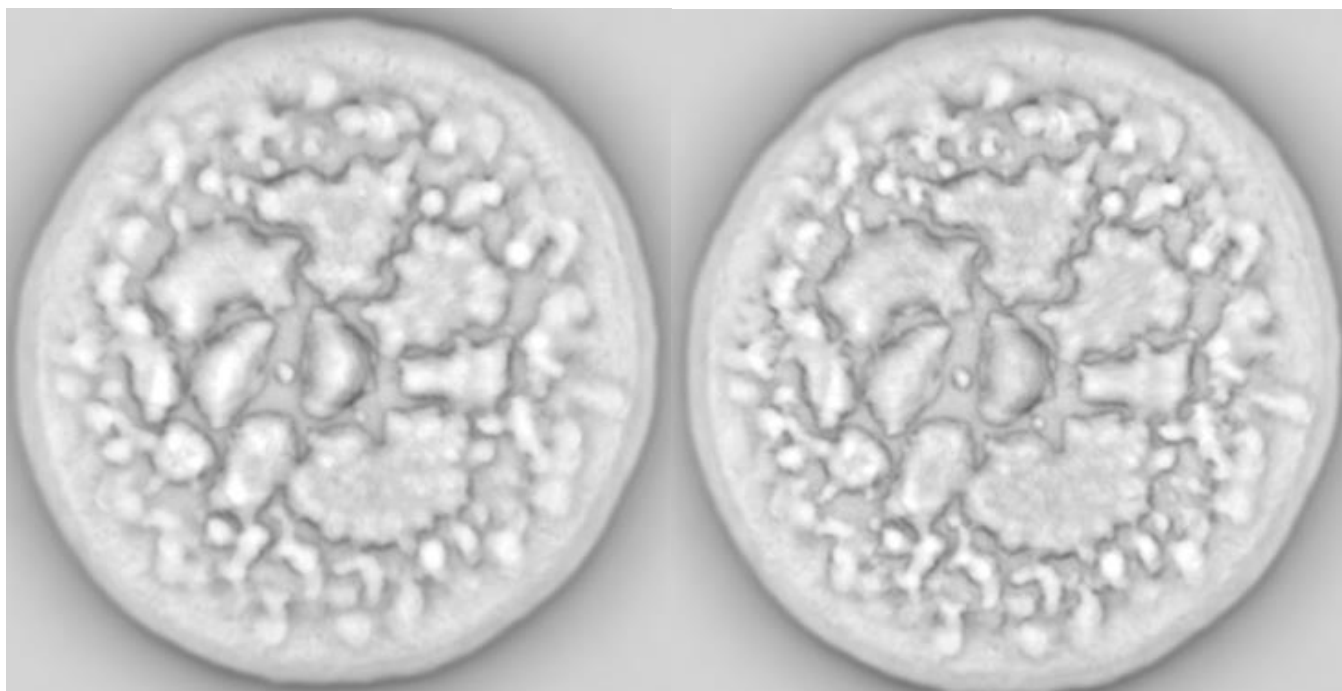




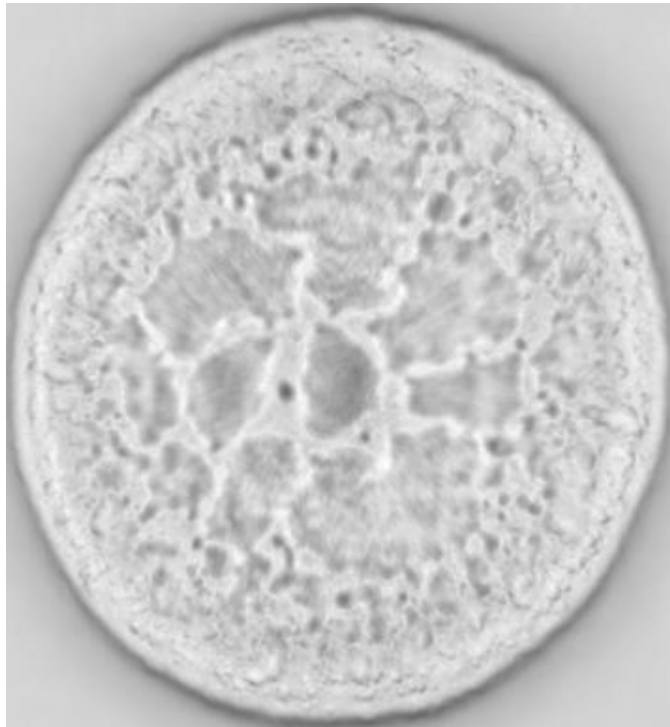
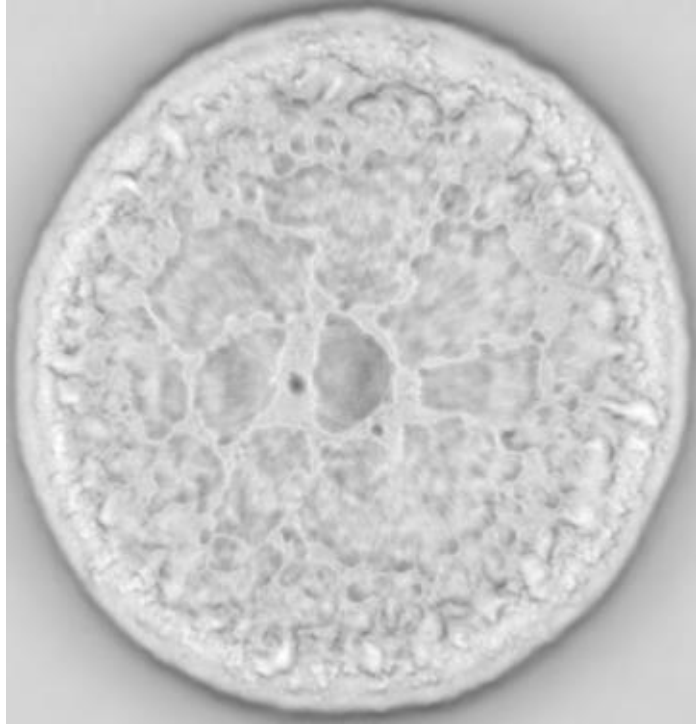
Aquí, a partir de Zn40x zoom 2,5-8 serie 0 (la superficie) inicien los cortes revelando el acomodo estructural del liposoma.

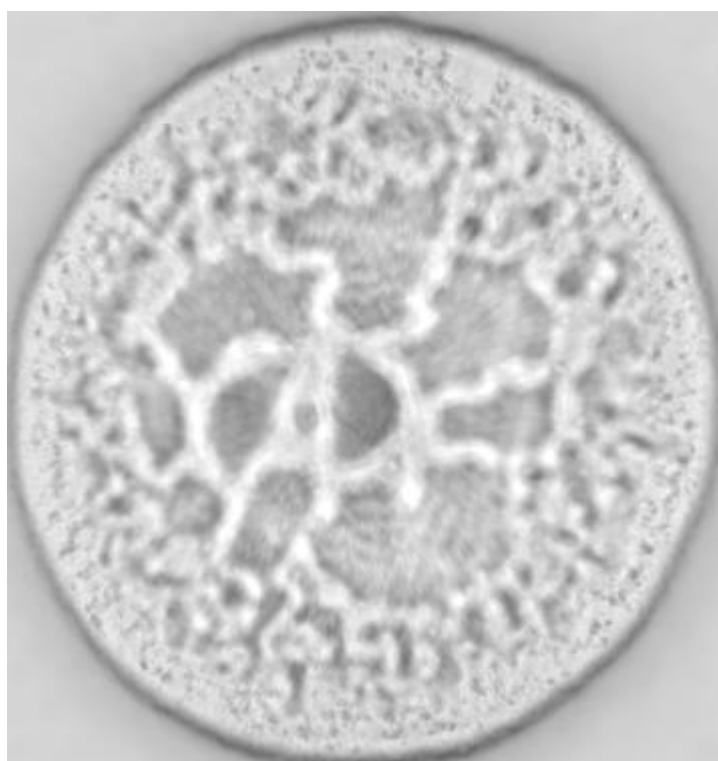
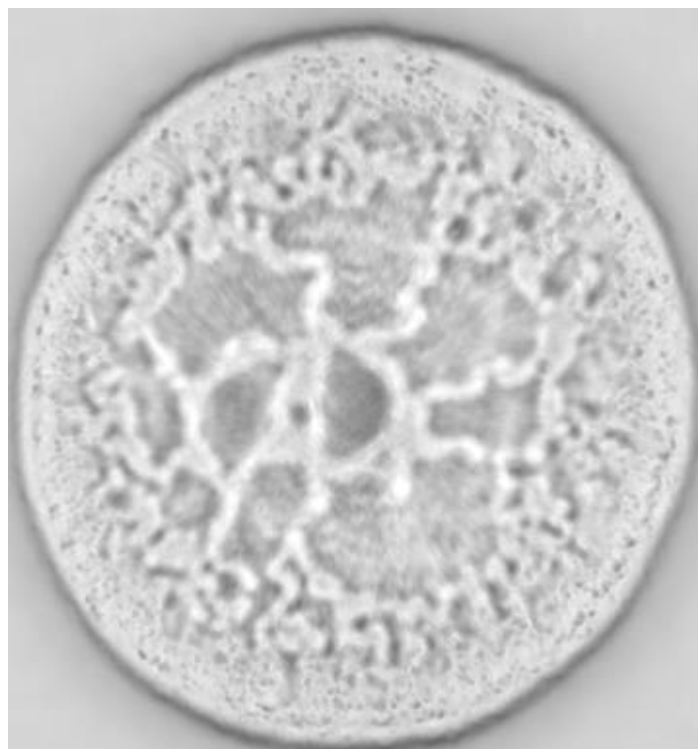




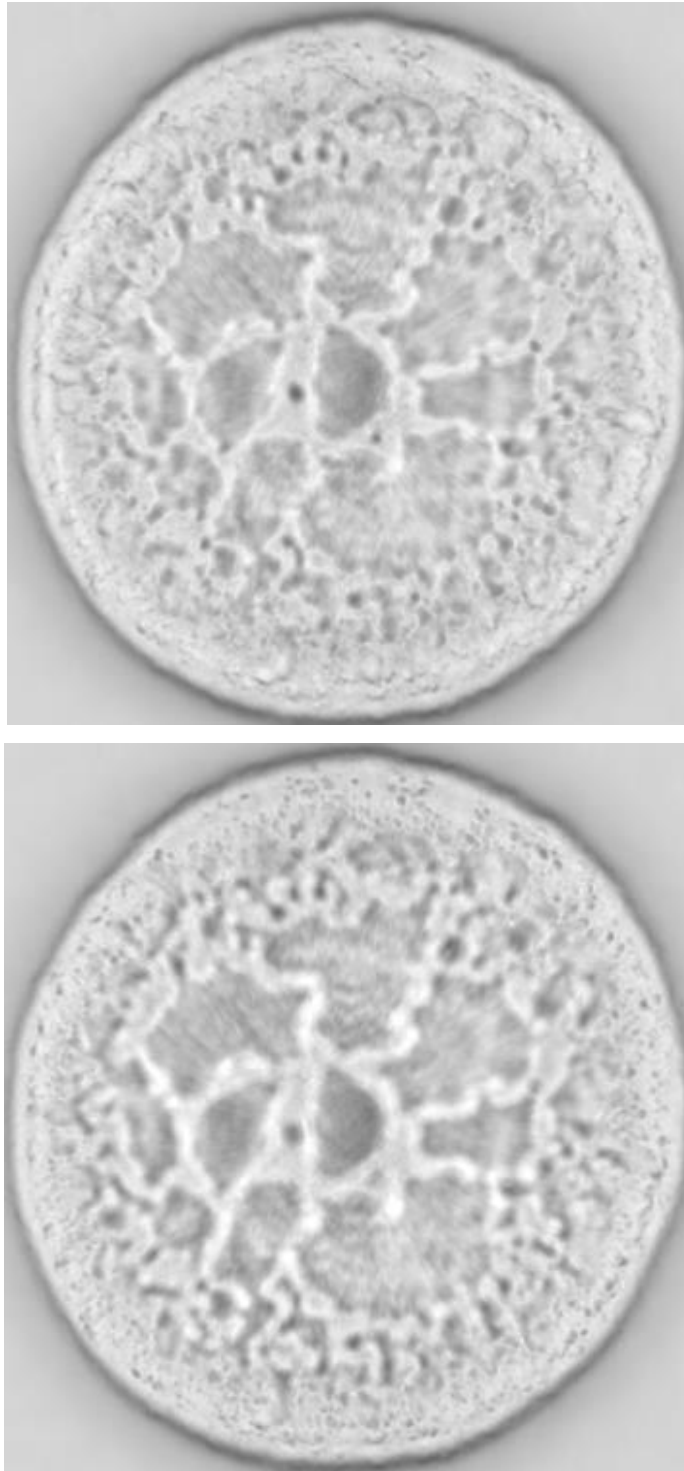




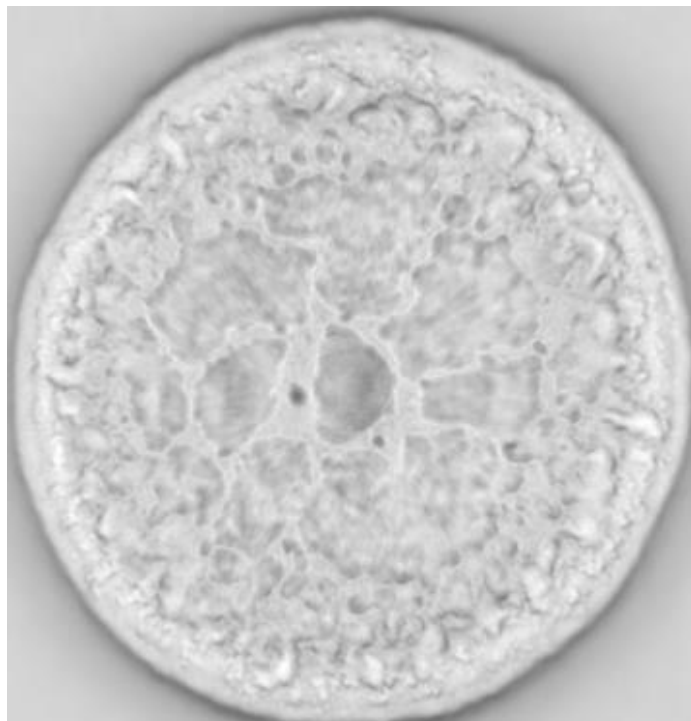


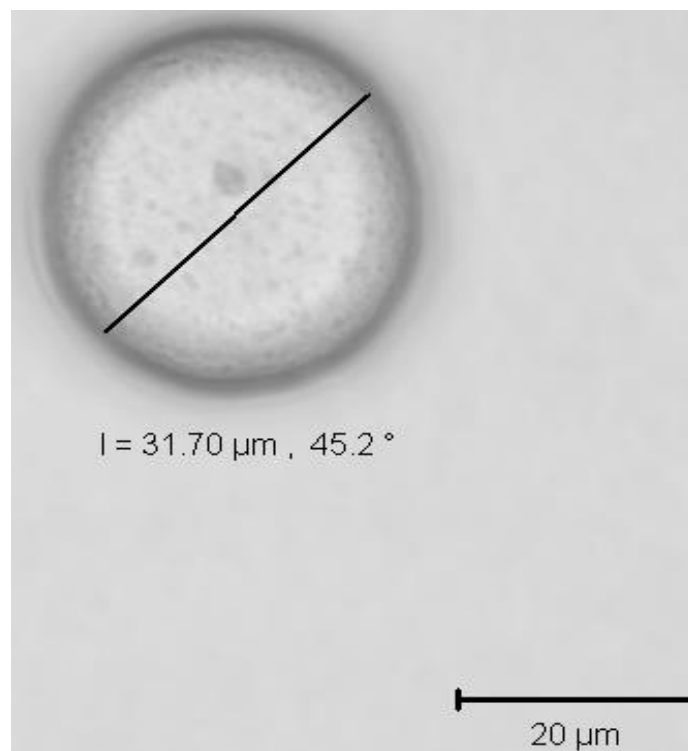
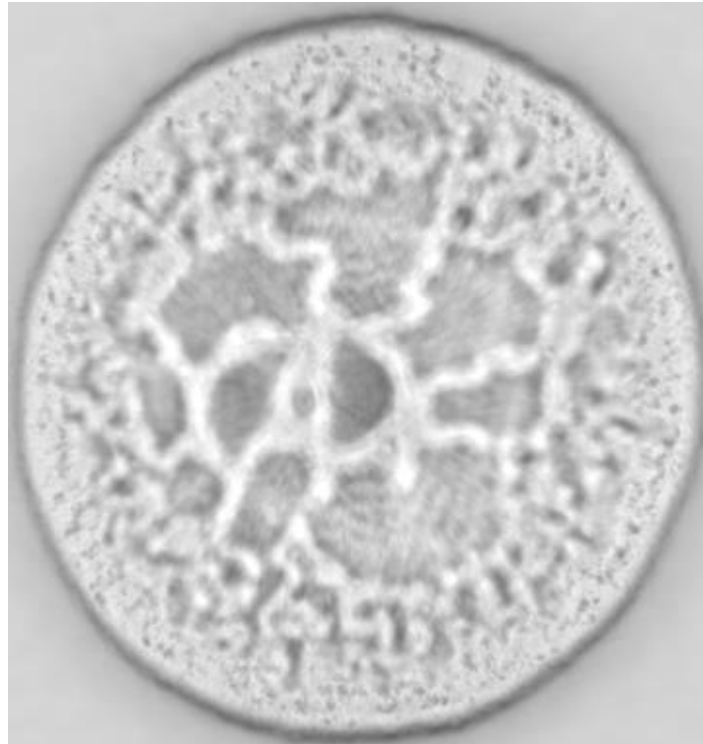


Zn Cortes finales hacia la profundidad de las esferas - microscopio confocal



Cortes: Zn 40x y Zn63x





Zn, esfera ultimo corte Zn 63x (la capa más baja)

4.7. Discusión del análisis de resultados

Mediante el estudio de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier se observó la interacción de las nanopartículas con grupos funcionales del tipo amino y carbonilo, este hecho puede explicar el por qué el efecto terapéutico de un sustrato vegetal se ve magnificado cuando se utiliza acompañado a un elemento que produce una respuesta similar al ser administrado. Por otra parte, deja ver que los componentes orgánicos del sustrato, cumplen una función importante en el proceso de funcionalización de partículas. Favoreciendo la transportación y entrega de la misma, siempre que sea posible debemos buscar ligandos con propiedades afines a la partícula en función, bajo este concepto el ligando además de ser una vía de transportación, también impacta en la terapéutica. El análisis de interacción elemento ligando permite generar una terapéutica direccionada con alto índice de selectividad, lo que nos explica el por qué del incremento de la efectividad y la disminución tan evidente de los efectos colaterales. Bajo este entendimiento el direccionamiento puede ser generado desde el ligando o desde la partícula dependiendo de cuál de los dos tenga afinidad por el sitio receptor. Finalmente, el resultado obtenido en la espectroscopia infrarroja es una prueba fiel del por qué utilizar extractos vegetales y nanopartículas de elementos esenciales puede resultar una buena opción para producir un efecto benéfico ante la condición de enfermedad.

Al realizar el análisis de espectroscopia UV–visible nos percatamos que la absorbancia de los picos de plasmón más representativos, fueron aquéllos en los que las nanopartículas metálicas fueron estabilizadas con sustancias orgánicas. Este hecho es de suma importancia ya que nos permitió valorar la presencia nanopartículas en nuestras soluciones a la vez que nos aporta el dato preciso del tipo de luz cuya longitud de onda resulta apropiada para generar el efecto de

plasmón de superficie. Esto es muy importante desde un punto de vista teranóstico ya que abre nuestro pensamiento para el mejor aprovechamiento de aquellos momentos en los que pacientes son expuestos a fuentes de luz externa (diferentes tipos de radiación). También resulta muy útil en terapéuticas simultáneas basadas en la utilización de fuentes de luz y nanopartículas. El efecto terapéutico final lo produce el aumento del campo eléctrico de la luz a la que se expone la partícula, ya que se aumenta en varios órdenes su magnitud.

Para el estudio de composición elemental fue utilizada espectroscopia por emisión de plasma de micro ondas, la cual nos aportó el dato de concentración en ppm del elemento función de estudio. También resultó una técnica excelente en soluciones de composición desconocida como es el caso de los fitoextractos en fase acuosa. Esta información es importante porque nos permitió establecer una correlación entre las propiedades que se atribuyen a cada solución motivo de estudio y su composición elemental. Por otra parte, permite su dosificación en forma confiable.

Para determinar el tamaño de nuestras partículas, se utilizó la metodología de dispersión de la luz dinámica, la cual basa su principio, en las desviaciones que sufre la luz láser por efecto del movimiento browniano, de tal forma que el estudio de dispersión de la luz dinámica, nos proporciona dos parámetros muy importantes como son, la velocidad del movimiento browniano y el tamaño de partícula, en la terapéutica es bien conocido que cuando se trabaja con soluciones de nanopartículas con movimientos browniano alto, la magnitud de la respuesta será proporcional al mismo e inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Este efecto se presenta cuando se utiliza como vía de administración la intravenosa. Esto fue reconocido por

el Dr. Jaques Loeb desde principios del siglo pasado. Cuando se utiliza la vía oral de administración este efecto pierde importancia, ya que las partículas son transportadas unidas a proteínas, lípidos etc.

Mediante el estudio de microscopia electrónica de transmisión, se logró medir el tamaño de nanopartículas en soluciones acuosas obtenidas a través de método electroquímico, encontrándola en el rango de 10 nm a 20nm, al interior de la nano partícula se logró visualizar formaciones lineales de átomos de oro, de igual forma, se pudo constatar la presencia de nanopartículas de platino funcionalizadas. Estas partículas mostraron una forma al igual que las partículas de selenuro de cadmio. Las nanopartículas de selenio fueron analizadas, por microscopia de transmisión y mostraron forma de varillas, los diámetros de las varillas estuvieron en el rango de 30 a 100 nm mientras que a longitud pudo alcanzar hasta varios cientos de nanómetros. Se analizaron nanopartículas de óxido de titanio mediante microscopia electrónica de transmisión, encontrando formas tubulares (nano tubos de titanio), el diámetro de los nano tubos estuvo en el rango de 50 a 70 nm aproximadamente.

La microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de plata, mostró formas esféricas con tamaños que fluctuaron en el rango de los 10 a 20nm, al interior de la nano partícula se observó una distribución concéntrica de átomos de plata a diferencia de las nanopartículas de oro que mostraron hacia su interior distribución lineal de los átomos de oro.

Las nanopartículas de Arsénico coloidal funcionalizados, obtenido por síntesis electroquímica, fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido, se observaron formas circulares con

tamaño en rango menor a 100 nm hasta conglomerados de partículas que alcanzan las 2 micras.

Las soluciones acuosas de nanopartículas de selenuro de cadmio y platino funcionalizadas, obtenidas por método electroquímico, fueron analizadas por microscopia electrónica de barrido. Encontrando evidencia de partículas de platino en forma de esféricas de tamaño nanométrico, por otra parte, las partículas de selenuro de cadmio presentaron formas esféricas de tamaño nanométrico.

Nanopartículas bimetálicas de zinc manganeso funcionalizadas con quitosan y ácido ascórbico y obtenidas por síntesis electroquímica fueron analizadas por microscopia confocal. Con esto fue posible observar formaciones esféricas de composición lamelar en la cual las nanopartículas bimetálicas se acomplejaron con el quitosan formando una red. Por otro lado, el ácido ascórbico permitió la formación de láminas esféricas responsables de la forma final observada.

Capítulo 5

Discusiones y conclusiones

4.8. Discusiones finales

El concepto de esencialidad se amplió gracias a los conocimientos adquiridos acerca de las propiedades de los elementos, y participación en las diversas rutas metabólicas, su interacción con otros elementos, la participación de microorganismos con el propósito de que lo considerado esencial cumpla su función, de tal forma que actualmente cuesta trabajo mencionar no esencial lo que antes era considerado sin relevancia. Por otra parte, el tema de utilización de nanopartículas sigue siendo controversial en cuanto a la dosificación y vía de administración. Poco a poco, se han introducido al mercado fármacos cargados en nano esferas y se han utilizado nanopartículas de manera simultánea con terapias de primera línea para direccionar y potenciar su efecto benéfico, así como, reducir los efectos colaterales de estas últimas. La utilización de materia a escala nanométrica exige el conocimiento pleno de las propiedades fisicoquímicas de la materia en estas dimensiones, el no hacerlo conlleva a resultados muy diferentes a lo esperado.

5.2. Conclusiones

- La nanotecnología aplicada al campo de la medicina deja ver un futuro prometedor en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en las cuales la medicina actual presenta limitaciones. Sin duda alguna el uso de terapéuticas simultáneas con conocimiento de los mecanismos de acción de cada una de ellas permite la interacción de las mismas, con el fin de lograr un efecto sinérgico que puede dar como resultado, menor tiempo de tratamiento, menos efectos colaterales y direccionamiento del tratamiento.

- El uso de fuentes de energía externa y nanopartículas representa un apartado muy especial ya que su efecto supera el orden manométrico, además tiene la facultad de generar daño celular hasta el punto de causar la muerte de la misma, sin que la extirpe celular represente algún problema. Con ello se vuelve una herramienta extraordinaria en el tratamiento de cáncer.
- El uso de nanopartículas permite repercutir un sistema biológico hasta el orden molecular, ya sea para mejorarlas condiciones celulares como sucede en los tratamientos de regeneración o bien produciendo muerte celular como sucede con el uso de elementos tóxicos, que tienen como blanco de acción el ADN, como lo es platino, cromo etc., el uso de elementos esenciales así como las biomoléculas que se utilizan para generar sus recubrimientos ofrece gran seguridad en el manejo ya que nos aleja de la posibilidad de que se produzcan gran cantidad de reacciones tipo redox y con esto generación excesiva de especies reactivas.
- Sin duda alguna el control de tamaño de partícula, debe ser tomado en cuenta, ya que se ha comprobado que partículas de 2 nm pueden ser aclaradas por el riñón. Además a menor tamaño de partícula el número de átomos de superficie aumenta exponencialmente al igual que la superficie de contacto.
- En cuanto a la metodología de síntesis, el trabajar con diferentes métodos permite ampliar el conocimiento acerca del comportamiento del elemento, además de utilizar una metodología más limpia (sin metabolitos secundarios tóxicos).
- La obtención de nanopartículas por método electroquímico resultó ser el más eficiente y por ello se debe considerar como la primera opción.

- El proceso de validación y caracterización se realizó con equipo de última generación lo cual nos permitió conocer fielmente datos relevantes de la nanopartícula como son, la presencia, afinidad con grupos funcionales, tamaño, comportamiento ante la exposición a luz con longitud de onda adecuada a la partícula en función como se pudo observar en la caracterización de plasmones.
- El entendimiento de los principios en que se basan los equipos utilizados para validar y caracterizar nanopartículas, ayuda entender como repercuten las nanopartículas a los sistemas biológicos.
- Por último, es probable que el éxito para el que incursiona en este campo esté supeditado a ser parte de un equipo multidisciplinario, con laboratorios equipados con la tecnología requerida para objetivar la información, mientras que cada caso en la práctica médica representa un escenario que exige del clínico, elaborar la logística que cubra las variables que el caso incluye, tal como si fuera un traje hecho a la medida que requiere ajuste día a día.

5.3. Perspectiva a futuro

La idea principal de este trabajo es generar nanopartículas de alta pureza (grado médico), con la finalidad de aplicarlas en el desarrollo de otras líneas de investigación, que integran la totalidad del proyecto. El proyecto contempla el repercutir estados patológicos a través del uso de nanopartículas funcionalizadas, no funcionalizadas, cargadas en biopelículas, transportadas en nano esferas, sensibilizadas con luz con longitud de onda adecuada, manipuladas a través de procesos biotecnológicos. Este proyecto encuentra su viabilidad en la capacidad para

generar cada uno de los componentes que se requieren para interactuar o en su defecto, la certidumbre de poder generarlos.

Referencias bibliográficas

1. Fraga CS. 2005 Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspects Med.* 26,235-244 (doi:10.1016/j.mam.2005.07.013)
2. Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS. 1984 The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother. Oncol.* 2, 343-366. (doi:10.1016/S0167-8140(84)80077-8)
3. Mindell JA 2012 Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 69-86. (doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317)
4. Shannon R. 1976 Revised effective ionic radii and systematic studies in of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. A* 32, 751-767. (doi:10.1107/S0567739476001551)
5. Dawson EB. 1991 The relationship of tap water and physiological levels of lithium to mental hospital admission and homicide in Texas. In *lithium in biology and medicine* (eds GN Schrauzer, KF Klippel), pp. 171-187. Weinheim, Germany: VCH.
6. Gould TD, Manji HK. 2005 Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* 30, 1223-1237. (doi:10.1038/sj.npp.1300731)
7. Phol HR, Wheeler JS, Murray HE. 2013 Sodium and potassium in health and disease. In *Interrelations between essential metal ions and human diseases* (eds A Sigel, H Sigel, RKO Sigel), pp. 29-47. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science and Business Media B.V.
8. Wang Y, Dai S. 2013 Structural basis of metal hypersensitivity. *Immunol. Res.* 5, 83-90. (doi:10.1007/s12026-012-8351-1)
9. Cohen JL. 2000 Epstein-Barr virus infection. *N Engl. J. Med.* 343, 481-492. (doi: 10.1056/NEJM200008173430707)
10. Stahl K, Frankaer CG, Raffalt AC, Sorensen SR, Andersen JET. 2011 Polymeric strontium ranelate nonahydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct Rep. Online* 67, m471-m472. (doi:10.1107/S1600536811010099)

11. Fuster D, Herranz D, Vidal-Sicart S, Muñoz M, Conill C, Mateos JJ, Martin F, Pons F. 2000 Usefulness of strontium-89 for bone pain palliation in metastatic breast cancer patients. Nucl. Med. Commun. 21, 623-626.(doi:10.1097/00006231-200007000-00004)
12. Gunawardana DH, Lichtenstein M, Better N, Rosenthal M. 2004 Results of strontium-89 therapy in patients with prostate cancer resistant to chemotherapy. Clin. Nucl. Med. 29, 81-85. (doi:10.1097/01rlu.0000109721058471.44)
13. Bruland OS, Nilsson S, Fisher DR, Larsen RH. 2006 High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the α -emitter ²²³Ra: adjuvant or alternative to conventional modalities? Clin. Cancer Res. 12, 6250s-6257s. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-060841)
14. London RE, Toney G, Gabel SA, Funk A. 1989 Magnetic resonance imaging studies of the brains of anesthetized rats treated with manganese chloride. Brain es. Bull. 23, 229-235. (doi:10.1016/036-9230(89)90152-4)
15. Crichton RR. 2009 Iron metabolism-from molecular mechanisms to clinical consequences, 3rd edn. Chichester, UK: Wiley.
16. Top S, Vessieres A, Leclercq G, Quivy J, Vaissermann J, Huche M, Jaouen G. 2003 Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. Chem. Eur. J. 9, 5223-5236.(doi:10.1002/chem.200305 of topical cobalt chelate CTC-96 against adenovirus in a cell culture model and against adenovirus keratoconjunctivitis in a rabbit model. BMC Ophthalmol. 6, 22. (doi:10.1186/1471-2415-622)
17. Zambelli B, Ciurli S. 2013 Nickel an human health. in Interrelations between essential metal ions and human diseases (eds A Sigel, H Sigel, RKOSigel), pp. 332-358. Dordrecht, the Netherlands: Springer Science and busuness media B.V.
18. Desguin B, Goffin P, Viaene E, Kleerebezem M, Martin-Diaconescu V, Maroney MJ, Declercq JP, Soumillion P, Hols P, 2014 Lactate racemase is a nickel-dependent

- enzyme activated by a widespread maturation system. *Nat. Commun.* 5, 3615.(doi:10.1038/ncomms4615)
19. De Reuse H, Vinella D, Cavazza C. 2013 Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 3, 94.(doi:10.3389/fcimb.2013.00094)
 20. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. 2006 Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res* 5, 196-201.(doi:10.1021/pr05036lj)
 21. Auld DS. 2001 Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *BioMetals* 14, 271-313.(doi:10.1023/a:1012976615056)
 22. Maret W. 2013 Zinc and human disease. In *Interrelations between essential metal ions and human diseases* (Eds. A Sigel, h sigel, RKO Sigel), pp. 389-414. Dordrecht, The Netherlands Springer Science and Business Media B.V.
 23. Berglof FE. 1959 Osmic acid in arthritis therapy. *Acta Rheumatol. Scand.* 5, 70-74.(doi:10.3109/rhel.1959.5.issue-1-4.11)
 24. Bessant R, Steuer A, Rigby S, Gumpel M. 2003 Osmic acid revisited: factors that predict a favourable response. *Rheumatology* 42, 1036-1043. (doi10.1093/rheumatology/keg283)
 25. SNoeffke AL, Habtemariam A, Pizarro AM, Sadler PJ. 2012 Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chem Commun.* 48, 5219-5246. (doi:10.1039/c2cc30678f)
 26. Raubenheimer HG, Schmidbaur H. 2014. The late start and amazing upswing in gold chemistry. *J. Chem. Educ.* 91, 2024-2036.(doi:10.1021/ed400782p)
 27. Bertini I, Gray HB, Lippard SJ, Valentine JS. 1994 *Bioinorganic chemistry*. Mill valley, CA: University Science books.
 28. Baker JP. 2008 Mercury, vaccines, and autism one controversy, three histories. *Am. J. Public Health* 98, 244-253. (doi:10.2105/AJPH.2007.113159)
 29. Kumar V, Gill KD. 2014 Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review. *NeuroToxicology* 41, 154-166. (doi:10.1016/j.neuro.2014.02.004)

30. Wills MR, Savory J. 1983 Aluminium poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, and anaemia. *Lancet* 322, 29-34. (doi:10.1016/S0140-6736(83)90014-4)
31. Chitambar CR. 2010 Medical applications and toxicities of gallium compounds. *Int. J. Environ. >Res. Public Health* 7, 2337-2361. (doi:10.3390/ijerph7052337)
32. Gallium nitrate in treating children with brain tumor, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, non-Hodgkin's lymphoma, or refractory solid tumors. See <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00002543> (accessed 10 November 2014).
33. Warrell Jr RP, Coonley CJ, Straus DJ, Young CW. 1983 Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using gallium nitrate administered as a seven-day continuous infusion. *Cancer* 51, 1982-1987. (doi:10.1002/1097-0142(19830601)51:11<1982::AID-CNCR2820511104>3.0.CO;2-L)
34. Romao CC, Blattler WA, Seixas JD, Bernardes GJL. 2012 developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chem. Soc. Rev* 41, 3571-3583. (doi:10.1039/C2CS15317C)
35. Jugdaohsingh R. 2007 Silicon and bone health. *J. Nutr. Health Aging* 11, 99-110.
36. Price CT, Koval KJ, Langford JR. 2013 Silicon: a review of its potential role in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 316783. (doi:10.1155/2013/316783)
37. Baron ED et al. 2010 silicon phthalocyanine (pc 4) photodynamic therapy is a safe modality for cutaneous neoplasms: results of a phase 1 clinical trial. *Lasers Surg. med.* 42, 888-895. (doi:10.1002/lsm.20984)
38. Menchikov LG, Ignatenko MA. 2013 Biological activity of organogermanium compounds (a review) *Pharm. Chem. J.* 46, 635-638. (doi:10.1007/s11094-013-0860-2)
39. Tiwari S, Tripathi IP, Tiwari HL. 2013 Lead poisoning--a review. *Res. J. chem. Sci.* 3, 86-88.
40. Flora G, Gupta D, Tiwari A. 2012 Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 47-58. (doi:10.2478/v10102-012-0009-2)

41. Amanzadeh J, Reilly RF. 2006 Hypophosphatemia: an evidence-based approach to its clinical consequences and management. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2, 136-148. (doi:10.1038/ncpneph0124)
42. Kaim W, Rall J. 1996 Copper--a 'modern' bioelement. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 43-60. (doi:10.1002/anie.199600431)
43. Gaggelli E, Kozłowski H, Valensin D, Valensin G, 2006 Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem. Rev.* 106, 1995-2044 (doi:10.1021/cr040410w)
44. Hodgkinson V, Petris MJ. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem.* 2012, 287(17):13549-13555. (PubMed)
45. Johnson MA, Fischer JG, Kays SE. Is copper an antioxidant nutrient? *Crit Rev Food Sci nutr.* 1992, 32(1):1-31
46. Birch NJ. 1995 lithium in medicine. In *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids* (ed. G Berthoin), pp. 1274-1281. New York, NY: Marcel Dekker.
47. Aryal S, Hu C-MJ, Zhang L. 2009 Polymer-cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery. *ACS Nano* 4, 251-258. (doi:10.1021/nn9014032)
48. Todd RC, Lippard SJ, 2009 Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1, 280-291. (doi:10.1039/b907567d)
49. Hartwig A. 2001 Role of magnesium in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 113-121. (doi:10.1016/s0027-5107(01)00074-4)
50. Klein DJ, Moore PB, Steitz TA. 2004 The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit RNA. *RNA* 10, 1366-1379. (doi:10.1261/rna.7390804)
51. Martínez-Finley EJ, Gavin CE, Aschner M, Gunter TE. 2013 Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 62, 65-75 (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.032)
52. Foradori AC, Bertinchamps A, Gulibon JM, Cotzias GC. 1967 Discrimination between magnesium and manganese by serum proteins. *J. Gen. Physiol.* 50, 2255-2266 (doi:10.1085/jgp.50.92255)

53. Takeda A, Akiyama T, Sawashita J, Okada S. 1994 Brain uptake of trace metals, zinc and manganese, in rats. *Brain Res.* 640, 341-344 (doi:10.1016/0006-8993(94)91891-0)
54. Johnson MK, Smith AD. 2011 Iron-sulfur proteins. In *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry*. Hoboken, NJ: Wiley. (doi:10.1002/9781119951438.eibc0109)
55. Beinert H. 2000 iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 2-15. (doi:10.1007/s007750050002)
56. Chen W et al. 2009 Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 16263-16268 (doi:10.1073/pnas.0904519106)
57. Friederich JA, Butterworth JF. 1995 Sodium nitroprusside: twenty years and counting, *Anesth. Analg.* 81, 152-162 (doi:10.1213/00000539-199507000-00031)
58. Yamada K. 2013 Cobalt: its role in health and disease. In *Interrelations between essential metal ions and human diseases* (eds A Sigel, H Sigel, RKO Sigel), pp. 295-320. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science and Business Media B.V.
59. Kozyraki R, Cases O. 2013 Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie* 85, 1002-1007. (doi:10.1016/j.biochi.2012.11.004)
60. Surdacka A, Stopa J. 2007 In situ effect of strontium toothpaste on artificially decalcified human enamel. *Biol. Trace Elem. Res.* 116, 147-153 (doi:10.1007/BF02685927)
61. Goldstein S, Czapski G, Heller A. 2005 Osmium tetroxide, used in the treatment of arthritic joints, is a fast mimic of superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 839-845 (doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.027)
62. Price Ct, Langford JR, Liporace FA. 2012 Essential nutrients for bone health and a review of their availability in the average North American diet. *Open Orthop. J.* 6, 143-143 (doi:10.2174/1874325001206010143)
63. Sabbioni E, Fortaner S, Bosisio S, Farina M, Del Torchio R, edel J, Fisbach M. 2010 Metabolic fate of ultratrace levels of *GeOCl4* in the rat and in vitro studies on its basal cytotoxicity and carcinogenic potential in Balb/3T3 and HaCaT cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 30, 34-41. (doi:10.1002/jat.1469)

64. Tao SH, Bolger PM. 1997 Hazard assessment of germanium supplements. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25, 211-219. (doi:10.1006/rtph.1997.1098)
65. Menchicov LG, Ignatenko MA. 2013 Biological activity of organogermanium compounds (a review). *Pharm. Chem.J.* 46, 635-638. (doi:10.1007/s11094-013-0860-2)
66. Patrick L. 2006 Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* 11, 2-22.
67. Farrugia G, Szurszewski JH. 2014 Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 147, 303-313. (doi:10.1053/jgastro.2014.04.041)
68. Roszer T. 2012 *The Biology of succellular nitric oxide*, pp. 3-16. Dordrecht, The Netherlands::Springer.
69. Paul BD, Snyder SH. 2012 *H₂ S* signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 499-507. (doi:10.1038/nrm3391)
70. Wollman EE et al. 1988 Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 263, 15506-15512
71. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata VD, Casini AF. 2003 The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499-1503. (doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5)
72. Mustafa AK et al. 2009 *H₂ S* signals through protein S-sulfhydration. *Sci. signal.* 2, ra72. (doi:10.1126/scisignal.2000464)
73. Kurokawa S, Berry MJ. 2013 selenium. Role of the essential metalloid in health. In *interrelations between essential metal ions and human diseases* (eds A Sigel, H Sigel, RKO Sigel), pp. 499-534. dordrecht, The Netherlands: Springer Science and Business Media B.V.
74. Parish L, Parish J, Routh H. 2008 Selenium Sulfide in the 21st century. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, AB72. (doi:10.1016/j.jaad.2007.10.319)
75. Rocha RA, Devesa V, Velez D. 2013 In vitro study of intestinal transport of fluoride using the Caco-2 cell line. *Food Chem. Toxicol.* 55, 146-163 (doi:10.1016/j.fct.2012.12.037)

76. Samikkannu T, Chen C-H, Yih L-H, Wang ASS, Lin S-Y, Chen T-C, Jan K-Y. 2003 Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 409-414.(doi:10.1021/tx025615j)
77. Mani S et al. 2013 Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation* 127, 2523-2534. (doi:10.116/CIRCULATIONAHA.113.002208)
78. Xu S, Liu P. 2014 Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *Int. j. Cardiol.* 172, 313-317.(doi:10.1016/j.ijcard.2014.01.068)
79. Michiels C. 2004 Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am.J: Pathol.* 164,1875-1882.(doi:10.1016/S0002-9440(10)63747-9)
80. Whard <jpt.2008 Oxygen sensors in contex. *Biochim. Biophys.Acta* 1777, 1-14 (doi:10.1016/j.bbabbio.2007.10.010)
81. Mach WJ, Timmeesch AR,Pierce JT, Pierce JD.2011 Consequences of hyperoxia and the toxicity of oxigen in the lung. *Nurs. Res. Prac.* 2011, 260482.(doi:10.1155/2011/260482)
82. Ingenbleek Y, Kimura H. 2013 Nutritional essetiality of sulfor in health and sisease. *Nutr. Rev.*71, 413-432.(doi:10.1111/nure.12050)
83. Wilcox DE. 2013 Arsenic. Can this toxic metalloid sustain life? In *Interrelations between essential metal ions and human diseases* (eds A Sigel, H Sigel, RKO Sigel), pp. 475-498. Dordrecht, The Netherlands: springer.
84. McCleverty J, Meyer T, Eds, en *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier Pergamon, New York (2004)
85. J. Huheey, *Química Inorgánica. Principios de Estructura y Reactividad*", 4 Ed., Harla, México D.F. (1997)
86. Baran E, "Química Bioinorgánica", McGraw-Hill, Madrid (1995)
87. Sadler P. *Inorg Chem* (1991) 36:1.
88. Guo Z, Sadler P. *Med Inorg Chem* (1999) 49: 183–306
89. Halliwell B. *Free Rad Res Commun* (1990) 9: 1-32
90. Aaseth J. *Hum Toxicol* (1983) 257-272
91. Gómez Ruiz, S. *An Quím* (2010) 106: 13–21

92. Sorenson, J. University of Arkansas for Medical Sciences (1982), Little Rock, Arkansas
93. Singh A, Kaushik N, Verma A, Gupta R. Indian J Chem (2011) 50 A: 474-483
94. Macarulla M, Marcos R, Martínez J, Larralde J. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Farmacia y Productos Fitosanitarios. Monografías Técnicas N° 8. VII Jornadas Toxicológicas Españolas. Madrid (1989) 261-265
95. Barberá R, Farré R. Rev Esp Cienc Tecnol Alim (1992) 34:381-399
96. Cunningham B, Bass S, Fuh G, Wells J. Science (1990) 250:1709-1712
97. Truong-Tran A, Ho L, Chai F, Zalewski P. J Nutr. (2000) 130:1459S-1466S
98. O'Dell B. J Nutr. (2000) 130:1432S-1436S
99. Cousins R. Physiol Rev (1985) 65:238-309
100. Goyer R. Annu Rev Nutr (1997) 17:37-50
101. Arab A, Barr S, Becking G. National Academy Press, Washington, DC (2001) 442–501
102. Prasad A. J Trace Elem Med Biol (2012) 26:66-69
103. Hambidge M. J Nutrit (2000) 130:1344S-1349S
104. Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Progr Neurobiol (2005) 75:367-390
105. Ramirez A. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2002) 63:51-64
106. Klaassen C. En: Brunton L, Lazo J, Parker K, editores. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. Nueva York: McGraw Hill (2008) 1766-1768
107. Manahan S. Environmental chemistry. 7ª ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers(2000)
108. Pasquali R. Química ambiental. Buenos Aires: Akadia, (2003)
109. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Estudio sobre los posibles efectos en la salud humana y el medio ambiente en América Latina y el Caribe del comercio de productos que contienen cadmio, plomo y mercurio. México: PNUMA (2010) 40-41
110. Hu H. En: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, editores. Principios de Medicina Interna de Harrison. 16ª edición online. México: McGrawHill Interamericana, (2005) 1636,8291,9171,13276,13284

111. Kjellstrom T, Nordberg G. *Environ Res* (1978) 16:248–69
112. Wätjen W, Beyersmann D *Biometals* (2004) 17:65-78
113. U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries. Washington: United States Government Printing Office (2008)
114. Dallinger R, M.P. Cajaraville, *Cell biology in environmental toxicology* (1995) 135-154. Bilbao: University of the Basque Country Press Service
115. Dallinger R, Egg M, Köck G, Hofer R. *Aq Toxicol* (1997) 38:47–66
116. Bagot D, Lebeau T, Jezequel K, Fabre B. *Environmental Chemistry* (2005) 215-222
117. Pazos, H. VIII Seminario Internacional de Terapias Alternativas, Caracas (1996)
118. Chopra I. 2007 <the increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J, Antimicrob. Chemother.* 59, 587-590. (doi:10.1093/jac/dkm006)
119. Soumya RS, Hela PG. 2013 Nano silver based targeted drug delivery for treatment of cancer. *Der Pharmacia Lettre* 5, 189-197.
120. Chellan P, Land KM, Shokar A, Au A, An SH, Taylor D, Smith PJ, Chibale K, Smith GS. 2013 Di- and trinuclear ruthenium-, rhodium-, and iridium-functionalized pyridyl aromatic ethers: a new class of antiparasitic agents. *Organometallics* 32, 4793-4804. (doi:10.1021/om400493k)
121. Geldmacher Y, Oleszak M, Sheldrick WS. 2012 Rhodium (III) and iridium(III) complexes as anticancer agents. *Inorg. Chim. Acta* 393, 84-102 (doi:10.1016/j.ica2012.06.046)
122. Kohno J et al. 1996 Boromycin, an anti-HIV antibiotic. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1036-1037. (doi:10.1271/bbb.60.1036)
123. Gerik S, Maypole J. 2008 Overview of biologically based therapies in rehabilitation. In *Complementary therapies for physical therapy* (eds JE Deutsch, EZ anderson), pp. 156-175. Saint Louis, MO: W.B. Saunders.
124. Vollmer J, Weltzien HU, Gamerdinger K, Lang S, Choleva Y, Moulon C. 2000 Antigen contacts by Ni-reactive TCR: typical alpha chain cooperation versus alpha chain-dominated specificity. *Int. Immunol.* 12, 1723-1731. (doi:10.1093/intimm/12.12.1723)

125. Garcia A, de Sanctis JB. 2014 An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS* 122, 257-267.(doi:10.1111/apm.12143)
126. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. 2008 Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847-856. (doi:10.1038/ni.1631)
127. Halpert G, Eitan T, Voronov E, Apte RN, RTH-wOLFSON I, aLBECK m, Kalechman Y, Sredni B, 2014 Multifunctional activity of a small tellurium redox immunomodulator compound, AS101, on dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *J.Biol. Chem.* 289, 17215-17227. (doi:10.1074/jbc.M113.536664)
128. Suttle NF. 2012 Copper imbalances in ruminants and humans: unexpected common ground. *Adv. Nutr.* 3. 666-674. (doi:10.3945/an.112.002220)
129. Brun PM, Bucking M, DeGroot JL, Farahani M, Pottier RH.2004 Neutron activation and liquid scintillation analysis of tissue samples containing palladium bacteriochlorophyll derivative, a potential photochemotherapeutic agent. *Can. J. Anal.Sci. Spectrosc.* 49, 55-63. (doi: 10.1016/j.brachy.2013.04.001)
130. Suzuki CA, Ohta H, Albores A, Koropatnick J, Cherian MG, 1990 Induction of metallothionein synthesis by zinc in cadmium pretreated rats. *Toxicology* 63, 273-284. (doi:10.1016/0300-483X(90)90191-R)
131. Pottier A, Borghi E, Levy L.2014 New use of metals as nanosized radioenhancers. *Anticancer Res.* 34, 443-453.
132. Ando A, Ando I, Tonami N, Kinuya S, Okamoto N, Sugimoto M, Fukuda N, Matsumoto S. 2000 Production of ¹⁰⁵Rh-EDTMP and its bone accumulation . *Appl.Radiat.Isot.* 52, 211-215.(doi:10.101
133. Bratsos I, Jedner S, Gianferrara T, Alessio E. 2007 ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. *Chimia* 61, 692-697. (doi:10.2533/chimia.2007.692)
134. Dizayi N, Konrad L, Bjartell AS, Wu H, Gadaleanu V, Hansso J, Helboe L, Abrahamsson PA. 2002 Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urol. Oncol.* 7, 91-98. (doi:10.1016/S1078-1439(01)00173-9)

135. Kumar U, Grigorakis SI, Watt HL, Sasi R, Snell L, Watson P, Chaudhari S. 2005 Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1-5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology. *Breast Cancer Res. Treat.*92, 175-186. (doi:10.07/s10549-005-2414-0)
136. Lambert B, de Klerk JM. 2006 Clinical applications of ¹⁸⁸Re-labelled radiopharmaceuticals for radionuclide therapy. *Nucl. Med, Commun.* 227, 223-229. (doi:10.1097/00006231-200603000-00004)
137. Correa-Gonzalez L, Arteaga de Murphy C, pichardo-Romero P, Pedraza-Lopez M, Moreno-Garcia C, Correa-hernandez L. 2014 sm-EDTPM for pain relief of bone metastases from prostate and breast cancer and other malignancies. *Arch. Med. Res.* 45, 301-308.(doi:10.1016/j.arcmed.2014.03.006)
138. Fujita T, Yamaji Y, Sato M, Murao K, Takahara J. 1994 Gene expression of somatostatin receptor subtypes, SSTR1 and SSTR2, in human lung cancer cell lines. *Life Sci.* 55, 1797-1806. (doi:10.1016/0024-3205(94)90090-6)
139. O'Byrne KJ, Schally AV, Thomas A, Carney DN, Steward WP. 2001 Somatostatin, its receptor and analogs in lung cancer. *Chemotherapy* 47, 78-108. (doi:10.1159/000049163)
140. Radioactive homium microspheres for thr treatment of unresectable liver metastases (HEPAR2). See <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01612325> (accessed 10 November 2014).
141. Radiation therapy and gadolinium texaphyrin in treating patients with supratentorial glioblastoma multiforme. See <https://clinicaltrals.gov/ct2/show/NCT00004262> (accesses 10 November 2014)
142. Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Muktar H. 2000Involvement of Fast (APO-1CD-95)during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Invest.Dermatol.* 115, 1041-1046.(doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00147.x)
143. Ke MS et al..2008 Apoptosis mechanisms related to the increased sensitivity of jurkat T cells vs A431 epidermoid cells to photodynamic therapy with the phthalocyanine Pc4. *Photochem. Photobiol.* 84, 407-414. (doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00278.x)

144. Silicon phthalocyanine 4 and photodynamic therapy in stage IA-IIA cutaneous T-cell non-Hodgkin lymphoma. See <https://clinicaltrials.gov-ct2/show/NCT01800838> (accessed 10 November 2014)
145. Blower PJ. 2004 30 Inorganic pharmaceuticals. *Annu. Rep. Prog.Chem. Sect. A* 100, 633-658. (doi:10.1039/B312109G)
146. Fang J, Chen S-J, Tong J-H, Wang Z-G,, Chen G-Q, Chen Z. 2002 Treatment of acute promyelocytic leukemia with ATRA and *As203*. *Cancer Biol. Ther.* 1, 614-620. (doi:10.4161/cbt.308)
147. Jurcic JG et al. 2002 Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 100, 1233-1239.
148. Tazebay UH et al. 2000 mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat. Med.* 6, 871-878.(doi:10.1038/78630)
149. Sredni B, Albeck M, Tichler T, Shani A, Shapira J, Bruderman I, Catane R, Kaufman B, Kalechman Y. 1995 Bone marrow-sparing and prevention of alopecia by AS101 in non-small-cell lung cancer patients treated with carboplatin and etoposide. *J.Clin. Oncol.* 13, 2342-2353.
150. Yan S, Wong ILK, Chow LMC, Sun H. 2003 Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. *Chem. Commun.* 266-267.(doi:10.1039/B210240D)
151. Thomas F, Bialek B, Hensel R. 2011 Medical use of bismuth: the two sides of the coin. *J. Clin.Toxicol.* S3:004.(doi:10.4172/2161-0495.S3-004)
152. Phase I/II trial of rhenium 188-P2045 in small cell lung cancer and other advanced neuroendocrine carcinomas. See <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02030184>. (Accesses 10 November 2014).
153. Combination of external beam radiotherapy with ¹⁵³Sm-EDTMP to treat high risk osteosarcoma. See <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01886105> (accessed 10 November 2014)
154. Samarium Sm ¹⁵³ lexidronam pentasodium combinet with zoledronic acid or pamidronate in treating patients with relapsed or refractory multiple myeloma and bone

- pain. See <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00482378> (accessed 10 November 2014)
155. Albrecht U, Eichele G. 2003. The mammalian circadian clock. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 13, 271-277. (doi:10.1016/S0959-437X(03)00055-8)
 156. Forman HJ, Maiorino M, ursini F. 2010 Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49, 835-842.(doi:10.1021/bi9020378)
 157. Laden K. 1988 Introduction and history of antiperspirants and deodorants. In *Antiperspirants and deodorants* (eds K. Laden, CB Felger), pp. 1-13. New York, NY: Marcel Decker.
 158. Schauss AG. 1991 Nephrotoxicity in human by the ultratrace element germanium. *Ren. Fail.* 13, 1-4. (doi:10.3109/08860229109022139)
 159. Aznar E, Marcos MD, Martínez-Máñez R, et al. pH- and photo-switched release of guest molecules from mesoporous silica supports. *J Am Chem Soc.* 2009; 131(19):6833–6843.
 160. Dong YD, Boyd BJ. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *Int J Pharm.* 2011; 417(1–2):101–111.
 161. Chang JH, Shim CH, Kim BJ, Shin Y, Exarhos GJ, Kim KJ. Bicontinuous, thermoresponsive, L3-phase silica nanocomposites and their smart drug-delivery applications. *Adv Mater.* 2005;17(5):634–637.
 162. Wen CJ, Zhang LW, Al-Suwayeh SA, Yen TC, Fang JY. Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. *Int J Nanomedicine.* 2012;7: 1599–1611.
 163. Yaghmur A, Glatter O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009;147–148:333–342.
 164. Bae KH, Lee JY, Lee SH, Park TG, Nam YS. Optically traceable solid lipid nanoparticles loaded with siRNA and paclitaxel for synergistic chemotherapy with in situ imaging. *Adv Healthc Mater.* 2013;2(4):576–584.
 165. Gaisin NK, Gnezdilov OI, Pashirova TN, et al. Micellar and liquid-crystalline properties of bicyclic fragment-containing cationic surfactant. *Colloid J.* 2010;72(6):764–770.

166. Andrade F, das Neves J, Gener P, et al. Biological assessment of self-assembled polymeric micelles for pulmonary administration of insulin. *Nanomedicine*. 2015; 11(7):1621–1631.
167. Yang Q, Wang S, Fan P, et al. pH-responsive carrier system based on carboxylic acid modified mesoporous silica and polyelectrolyte for drug delivery. *Chem Mater*. 2005; 17(24):5999–6003.
168. Chen F, Zhu Y. Chitosan enclosed mesoporous silica nanoparticles as drug nanocarriers: sensitive response to the narrow pH range. *Microporous Mesoporous Mater*. 2012; 150:83–89.
169. Brar SK, Verma M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends Analyt Chem*. 2011;30(1):4–17.
170. Beloglazova NV, Shmelin PS, Speranskaya ES, et al. Quantum dot loaded liposomes as fluorescent labels for immunoassay. *Anal Chem*. 2013;85(15):7197–7204
171. Carugo D, Bottaro E, Owen J, Stride E, Nastruzzi C. Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Sci Rep*. 2016;6:25876
172. Pattri BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev*. 2015;115(19):10938–10966
173. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):36–48.
174. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*. 1964;8:660–668
175. Bangham AD, Hill MW, Miller NG. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: Korn ED, editor. *Methods in Membrane Biology*. Vol. 1. New York: Plenum; 1974. pp. 1–68.
176. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine*. 2013;9:1–14.
177. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;41:178–195.

178. Fanciullino R, Ciccolini J. Liposome-encapsulated anticancer drugs: still waiting for the magic bullet? *Curr Med Chem*. 2009;16:4361–4373.
179. Euliss LE, DuPont JA, Gratton S, DeSimone J. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 2006;35:1095–1104.
180. Papahadjopoulos D, Kimelberg HK. *Progress in Surface Science*. Oxford: Pergamon; 1973. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins; pp. 141–149.
181. Frolov VA, Shnyrova AV, Zimmerberg J. Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004747.
182. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006;1:297–315
183. Betageri GV, Parsons DL. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int J Pharm*. 1992;81:235–241.
184. Niven RW, Speer M, Schreier H. Nebulization of liposomes. II. The effects of size and modeling of solute release profiles. *Pharm Res*. 1991;8:217–221.
185. Schechter E. Aspects structuraux et fonctionnels. In: Schechter E, Rossignol B, editors. *Biochimie et Biophysique des Membranes*. Paris: Dunod; 2002.
186. Hosta-Rigau L, Zhang Y, Teo BM, Postma A, Städler B. Cholesterol – a biological compound as a building block in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2013;5:89–109.
187. Gómez-Hens A, Fernández-Romero JM. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends Analyt Chem*. 2006;25:167–178.
188. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res*. 2008;18:309–327.
189. Wagner A, Vorauer-Uhl K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv*. 2011;2011:591325.
190. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*. 1976;443:629–634

191. Woodbury DJ, Richardson ES, Grigg AW, Welling RD, Knudson BH. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J Liposome Res.* 2006;16:57–80
192. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure – characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane-potential. *Biochim Biophys Acta.* 1985;812:55–65.
193. MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BP, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR. Small volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1061:297–303.
194. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature.* 2006;442:368–373
195. Fahr A, van Hoogevest P, May S, Bergstrand N, Leigh ML. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: consequences for drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2005;26:251–265.
196. Johnston MJ, Edwards K, Karlsson G, et al. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *J Liposome Res.* 2008;18:145–157
197. Zamboni WC. Concept and clinical evaluation of carrier mediated anticancer agents. *Oncologist.* 2008;13:248–260.
198. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:131–135
199. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995;55:3752–3756.
200. Brown S, Khan DR. The treatment of breast cancer using liposome technology. *J Drug Deliv.* 2012;2012:212965.
201. Asai T, Oku N. Angiogenic vessel-targeting DDS by liposomalized oligopeptides. *Methods Mol Biol.* 2010;605:335–347.
202. Ogiso T, Yamaguchi T, Iwaki M, Tanino T, Miyake Y. Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *Drug Target.* 2001;9:49–59.

Anexo: Publicaciones

1. Erandi Rivera Reyna, Benjamín Valdez Salas, Mónica Carrillo Beltrán, Nicola Nedev, Mario Curiel Alvarez, **Ernesto Valdez Salas**, Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Biosynthesized from Staphylococcus Aureus, International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, (ISSN 2250-2459), Volume 5, Issue 1, pp. 54-58, January 2015.
2. Ernesto Beltrán-Partida, Aldo Moreno-Ulloa, Benjamín Valdez-Salas, Cristina Velasquillo, Monica Carrillo, Alan Escamilla, **Ernesto Valdez-Salas** and Francisco Villarreal, Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution. Materials 2015, 8, (3) 867-883; doi:10.3390/ma8030867, ISSN 1996-1944, 2 marzo, 2015.
3. Ernesto Beltrán-Partida, Benjamin Valdez-Salas, Alan Escamilla, Aldo Moreno-Ulloa, Larysa Burtseva, **Ernesto Valdez-Salas**, Mario Curiel Alvarez, and Nicola Nedev., "The Promotion of Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO₂ Nanotubes Using a Superoxidized Solution," Journal of Nanomaterials, vol. 2015, Article ID 818565, 9 pages, 2015. doi:10.1155/2015/818565 ISSN: 1687-4110 (Print) 20 de abril 2015.
4. Ernesto Beltrán-Partida, Benjamín Valdez-Salas, Alan Escamilla, Mario Curiel, **Ernesto Valdez-Salas**, Nicola Nedev, Jose M. Bastidas, Disinfection of titanium dioxide nanotubes using super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior, Materials Science & Engineering C 60 (2016) 239–245, ISSN:0928-4931.
5. Michael Schorr, Benjamín Valdez, **Ernesto Valdez**, Noah Lothan, Amparo Oliveros, Mónica Carillo, Ricardo Salinas, and Amir Eliezer, Comparative study: ethanol metabolism in the human body vs. Gasoline combustion in a vehicle motor, Journal of Materials Education Vol. 38 (1-2): 15-24 (2016) A issn: 0738-7989.
6. Ernesto Beltrán-Partida, Benjamín Valdez-Salas, **Ernesto Valdez-Salas**, Guillermo Pérez Cortéz, Nicola Nedev. Synthesis, characterization, *in situ* antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid capped copper nanoparticles, Journal of Nanomaterials, 2018, 5287632 (Research Article) In Press.

Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Biosynthesized from *Staphylococcus Aureus*

Erandi Rivera Reyna¹, Benjamín Valdez Salas², Mónica Carrillo Beltrán³, Nicola Nedev⁴, Mario Curiel Alvarez⁵, Ernesto Valdez Salas⁶

^{1,2,3,4,5,6} Institute of Engineering, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C., Mexico

Abstract— Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by reduction of Ag⁺ ions using a cell-free culture supernatant derived from *Staphylococcus aureus* and silver nitrate solution as a precursor. Under UV light exposure the process was completed within 1 minute after the silver nitrate came in contact with the supernatant. The UV-Visible spectrum of aqueous colloidal solution showed a peak at 420 nm indicating a formation of AgNPs. Further characterization by Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, Transmission Electron Microscopy and Dynamic Light Scattering proved the synthesis of AgNPs and showed that they are spherical in shape and as small as 2 nm.

Keywords— Silver nanoparticles, bacteria, *Staphylococcus aureus*, synthesis, green method, antibacterial activity.

I. INTRODUCTION

The nanoparticles (NPs) have various applications in medical, environmental and pharmaceutical industries and biotechnology due to their unique chemical and physical properties, such as optical, magnetic, electronic, biological and catalytic activity [1-4].

Chemical and physical methods have been used to synthesize silver nanoparticles (AgNPs) but most of these techniques are environmentally hazardous. Efforts for developing low-cost, non-toxic and environmentally friendly technologies for the synthesis of AgNPs has been realized by researchers around the world [5, 6].

Some metallic ions occurring in the nature are non-biodegradable and are capable to inhibit microbial growth, but they also tend to cause toxicity in biological organisms. Despite this toxicity, extremophilic microorganisms are capable of tolerating and flourishing at high metal concentrations by reducing or oxidizing the metal ions [7]. These microorganisms can be considered as “microscopic factories” that perform biosynthesis of metallic nanoparticles due to their ability to chemically alter certain metallic ions.

Silver nanoparticles exhibiting antimicrobial activity have been synthesized using several microorganisms, both unicellular (bacteria, viruses, actinomycetes) and multicellular (plants, fungi) through intracellular and/or extracellular mechanisms [8-10].

The extracellular biosynthesis of AgNPs employing a cell-free culture supernatant of *Staphylococcus aureus* was studied in the present work. A bacterial system was used for nanoparticle synthesis because of the relative simplicity to work with and because of the well-defined size and shape of the resulting AgNPs. The latter are key factors determining essential properties of nanoscale materials [11-12].

The metabolites from bacterial act as reducing and capping agents during biosynthesis. Metallic ion reduction is achieved through the collaborative action of biomolecules found in the bacterial culture supernatant such as enzymes, polysaccharides and vitamins.

The cumulative surface area of the nanoparticle ensemble becomes greater as the particle size decreases, which in turn increases the total surface available for contact with bacteria, increasing the antibacterial efficiency of AgNPs. Despite its negative effects in bacteria it has been previously reported that low concentrations of silver are non-toxic to human cells opening up new opportunities for medical applications [13-15].

II. MATERIALS AND EXPERIMENTAL PROCEDURE

A. Bacteria and chemicals

The test strain used was *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aerobically maintained in Trypticase Soy agar media, which was subcultured every 24 hours in order to regulate its viability during the study period. All the chemicals used were purchased from Fermont with analytical grade and meeting the specifications of the American Chemical Society (ACS).

B. Preparation of solutions

A volume of 40 ml of Trypticase soy broth were inoculated with five colonies of a fresh 24 hours culture of *Staphylococcus aureus* and incubated for 2 to 3 hours, until the absorbance reading at 600 nm of this inoculum reached 0.3 in a UV-VIS spectrophotometer. After the incubation period, the culture was centrifuged at 12,000 rpm and the supernatant was used for further experiments.

TEM and SEM showed that most of the particles were well-defined in shape and with size as small as 2 nm that meets the requirements of several industrial and medical applications. The present study places emphasis on the use of AgNPs as an antibacterial agent inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, a nosocomial strain that has been found to be resistant to a wide range of broad-spectrum antibiotics.

Acknowledgement

Rivera gratefully acknowledges the financial support of CONACYT Mexico through the *Doctoral Fellowship* Program and the Autonomous University of Baja California.

REFERENCES

- [1] Shivaji S, Madhu S, Singh S (2011) Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry* 46: 1800-1807.
- [2] Zaki S, El Kady M, Abd-El-Haleem D (2011) Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. *Materials Research Bulletin* 46: 1571-1576.
- [3] Sun L et al. (2011) A green method for synthesis of silver nanodendrites. *J. Mat. Sci.* 46: 839-845.
- [4] Ahmad A et al. (2003) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28: 313-318.
- [5] Thakkar K.N, Mhatre S.S, Parikh R.Y (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6: 257-262.
- [6] Inbakandan D, Venkatesan R, Ajmal Khan S (2010) Biosynthesis of gold nanoparticles utilizing marine sponge *Acanthella elongata*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81: 634-639.
- [7] Bruins M.R, Kapil S, Oehme F.W (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 45: 198-207.
- [8] Zhao C. et al. (2013) Preparation and antibacterial activity of titanium nanotubes loaded with Ag nanoparticles in the dark and under the UV light. *Appl. Surf. Sci.* 280: 8-14.
- [9] Mirzajani F et al. (2011) Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in microbiology* 162: 542-549.
- [10] Shahverdi A.R et al. (2007) Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria* : A novel biological approach. *Process Biochemistry* 42: 919-923.
- [11] Tsuji M et al. (2006) Effects of chain length of polyvinylpyrrolidone for the synthesis of silver nanostructures by a microwave-polyol method. *Mat. Lett.* 60: 834-838.
- [12] Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán L.M (2000) Reduction of silver nanoparticles in DMF. Formation of monolayers and stable colloids. *Pure Appl. Chem.* 72: 83-90.
- [13] Kim J.S et al. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnol., Biology and Medicine* 3: 95-101.
- [14] Gurunathan S et al. (2009) Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74: 328-335.
- [15] Balaji D et al. (2009) Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 68: 88-92.

Article

Improved Osteoblast and Chondrocyte Adhesion and Viability by Surface-Modified Ti6Al4V Alloy with Anodized TiO₂ Nanotubes Using a Super-Oxidative Solution

Ernesto Beltrán-Partida ^{1,2,3,4,†}, Aldo Moreno-Ulloa ^{3,5}, Benjamín Valdez-Salas ^{2,†,*}, Cristina Velasquillo ⁴, Monica Carrillo ², Alan Escamilla ², Ernesto Valdez ⁶ and Francisco Villarreal ³

¹ Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Av. Zotoluca y Chinampas, s/n, Mexicali C.P. 21040, Baja California, Mexico; E-Mail: beltrane@uabc.edu.mx

² Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. B. Juárez y Calle de la Normal s/n, Mexicali C.P. 21280, Baja California, Mexico; E-Mails: monica@uabc.edu.mx (M.C.); alan.escamilla@uabc.edu.mx (A.E.)

³ School of Medicine, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA; E-Mails: aldiux_1@yahoo.com.mx (A.M.-U.); fvillarr@ucsd.edu (F.V.)

⁴ Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. México Xochimilco, No. 289, Arenal de Guadalupe, México C.P. 14389, D.F., Mexico; E-Mail: mvelasquillo@ciencias.unam.mx

⁵ Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México C.P. 11340, D.F., Mexico

⁶ Centro Medico Ixchel, Bravo y Obregón, Mexicali C.P. 21000, Baja California, Mexico; E-Mail: ixchelcentromedico@hotmail.com

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: benval@uabc.edu.mx; Tel./Fax: +52-686-566-4150.

Academic Editor: Carla Renata Arciola

Received: 12 December 2014 / Accepted: 17 February 2015 / Published: 2 March 2015

Abstract: Titanium (Ti) and its alloys are amongst the most commonly-used biomaterials in orthopedic and dental applications. The Ti-aluminum-vanadium alloy (Ti6Al4V) is widely used as a biomaterial for these applications by virtue of its favorable properties, such as high tensile strength, good biocompatibility and excellent corrosion resistance.

TiO₂ nanotube (NTs) layers formed by anodization on Ti6Al4V alloy have been shown to improve osteoblast adhesion and function when compared to non-anodized material. In his study, NTs were grown on a Ti6Al4V alloy by anodic oxidation for 5 min using a super-oxidative aqueous solution, and their *in vitro* biocompatibility was investigated in pig periosteal osteoblasts and cartilage chondrocytes. Scanning electron microscopy (SEM), energy dispersion X-ray analysis (EDX) and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the materials. Cell morphology was analyzed by SEM and AFM. Cell viability was examined by fluorescence microscopy. Cell adhesion was evaluated by nuclei staining and cell number quantification by fluorescence microscopy. The average diameter of the NTs was 80 nm. The results demonstrate improved cell adhesion and viability at Day 1 and Day 3 of cell growth on the nanostructured material as compared to the non-anodized alloy. In conclusion, this study evidences the suitability of NTs grown on Ti6Al4V alloy using a super-oxidative water and a short anodization process to enhance the adhesion and viability of osteoblasts and chondrocytes. The results warrant further investigation for its use as medical implant materials.

Keywords: titanium; TiO₂ nanotubes; chondrocyte; osteoblasts; adhesion; tissue engineering

1. Introduction

An imperative goal in bone and cartilage regeneration is the refinement of biomaterials with physicochemical and biological properties that better resemble the native architecture of human tissues to regenerate. Thus far, Ti and its alloys have frequently been used for dental and orthopedic implants because they offer good biocompatibility, low toxicity, corrosion resistance and favorable mechanical properties [1–8]. In this regard, the Ti6Al4V alloy offers superior physical and mechanical properties than commercially pure Ti (Cp-Ti), as well as excellent biocompatibility [9]. However, Ti- and its alloy-based implants occasionally loosen and fail [10]. Some of the factors that appear to lead to clinical failure are incomplete integration of the surrounding bone (*i.e.*, osseointegration) and cartilage with the material implanted [11,12]. Interestingly, it has been suggested that by improving the osseointegration on the material, long-term implant failures will decrease [13]. The manipulation of cell-surface material interactions can have a profound effect in osseointegration. To enhance this process, several techniques focused on the biomaterial surface have been investigated, such as grit blasting, acid etching, anodic oxidation, molecule immobilization, sol-gel and calcium phosphate coating [3,14–19]. It is well known that anodic oxidation has been shown to provide a strong adherence of an NTs layer to the material surface [20,21], increasing material corrosion resistance [22–24], surface area [25–27] and, more importantly, bone growth [25] and cartilage adhesion [22].

Various studies suggest that nanostructured biomaterials may provide physical/chemical properties that resemble the native bone structure and, thus, may offer ideal substrates to support bone regeneration [28]. It is worth noting that the NTs' diameter on the material surface has a significant effect on bone and cartilage integration [8,20,23]. For example, it has been reported that cultured preosteoblasts on NTs with a 70–100 nm diameter elicit good cell adhesion and selective

differentiation into osteoblast-like cells when compared to smaller NTs (~30 nm) [29]. Moreover, NTs of 70–100 nm in diameter exhibit higher alkaline phosphatase activity levels, suggesting greater bone-forming ability with a superior filopodia elongation than smaller NTs [30]. Filopodia are highly dynamic structures containing actin filaments [31]. They play an important role in osteoblasts adhesion and act as a sensory organelle for cellular spreading and actin polymerization [32,33]. Nonetheless, previous reports suggest that the anodization process using fluoride as an electrolyte to obtain NTs of 80–100 nm diameter requires periods of 1 h [34,35] and perhaps 2 h [20]. According to this fact, we hypothesize that using a fluoride solution dissolved in super-oxidative water will accelerate the fabrication of NTs, which, in turn, will positively impact adhesion, proliferation and viability of primary osteoblasts and chondrocytes.

To our knowledge, this is the first study aimed at fabricating and characterizing NTs on the Ti6Al4V surface by anodic oxidation using a novel short process constituted by a commercial super-oxidative water used for medical instrument disinfection [36,37], containing ammonium fluoride, and studying its biological effects on primary pig periosteal osteoblast (PPO) and elastic cartilage pig chondrocytes (PCC). Cell morphology was examined by SEM and AFM. Cell adhesion and viability were evaluated by means of fluorescence microscopy.

2. Results

2.1. Surface Characterization

2.1.1. SEM Material Characterization

The non-anodized Ti6Al4V alloy surface features are displayed in Figure 1a, which shows, as expected, the smooth texture of the material. Following electrolytic anodization, a nanotubular and uniformly distributed layer was formed over the Ti6Al4V alloy surface, as noted by SEM examination (Figure 1b). The estimated diameter of the nanotubes was between 80 and 90 nm.

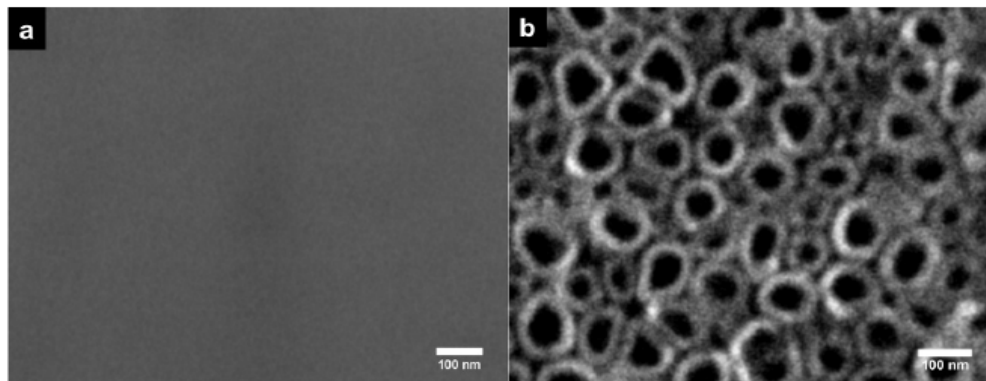


Figure 1. SEM micrographs of the experimental Ti6Al4V alloys. (a) Non-anodized flat Ti6Al4V alloy; (b) anodized Ti6Al4V alloy with NTs.

Author Contributions

The process design, experimental work and writing of the first draft of the manuscript were all carried out by Ernesto Beltrán-Partida and Benjamín Valdez-Salas. Alan Escamilla collaborated with the anodization process. Aldo Moreno-Ulloa and Francisco Villarreal worked on the draft corrections. Monica Carrillo and Ernesto Valdez contributed with constructive suggestions. Benjamín Valdez-Salas and Cristina Velasquillo supervised every step of the entire work.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **2000**, *21*, 667–681.
2. Hao, Y.Q.; Li, S.J.; Hao, Y.L.; Zhao, Y.K.; Ai, H.J. Effect of nanotube diameters on bioactivity of a multifunctional titanium alloy. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *268*, 44–51.
3. Chen, Z.X.; Takao, Y.; Wang, W.X.; Matsubara, T.; Ren, L.M. Surface characteristics and *in vitro* biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, doi:10.1088/1748-6041/4/6/065003.
4. Tavangar, A.; Tan, B.; Venkatakrishnan, K. Synthesis of bio-functionalized three-dimensional titania nanofibrous structures using femtosecond laser ablation. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2726–2732.
5. Das, K.; Bose, S.; Bandyopadhyay, A. TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *J Biomed. Mater. Res A* **2009**, *90*, 225–237.
6. Chiapasco, M.; Gatti, C. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: A 3- to 8-year prospective study on 328 implants. *Clin. Implant Dent. Relat Res.* **2003**, *5*, 29–38.
7. Rosa, A.L.; Beloti, M.M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. *Clin. Oral Implants Res.* **2003**, *14*, 43–48.
8. Sun, S.; Yu, W.; Zhang, Y.; Zhang, F. Increased preosteoblast adhesion and osteogenic gene expression on TiO₂ nanotubes modified with KRSR. *J Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1079–1091.
9. Giordano, C.; Saino, E.; Rimondini, L.; Pedferri, M.P.; Visai, L.; Cigada, A.; Chiesa, R. Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *88*, 648–655.
10. Junker, R.; Dimakis, A.; Thoneick, M.; Jansen, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: A systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20*, 185–206.
11. Qu, D.; Mosher, C.Z.; Boushell, M.K.; Lu, H.H. Engineering complex orthopaedic tissues via strategic biomimicry. *Ann. Biomed. Eng.* **2014**, doi:10.1007/s10439-014-1190-6.
12. Grenier, S.; Donnelly, P.E.; Gittens, J.; Torzilli, P.A. Resurfacing damaged articular cartilage to restore compressive properties. *J. Biomech.* **2014**, *48*, 122–129.
13. Sundfeldt, M.; Carlsson, L.V.; Johansson, C.B.; Thomsen, P.; Gretzer, C. Aseptic loosening, not only a question of wear: A review of different theories. *Acta Orthop.* **2006**, *77*, 177–197.

49. Frandsen, C.J.; Brammer, K.S.; Noh, K.; Johnston, G.; Jin, S. Tantalum coating on TiO₂ nanotubes induces superior rate of matrix mineralization and osteofunctionality in human osteoblasts. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *37*, 332–341.
50. Adams, S.L.; Cohen, A.J.; Lasso, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *213*, 635–641.
51. Mobasheri, A.; Kalamegam, G.; Musumeci, G.; Batt, M.E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* **2014**, *78*, 188–198.
52. Tan, A.W.; Dalilotojari, A.; Pingguan-Murphy, B.; Ahmad, R.; Akbar, S. *In vitro* chondrocyte interactions with TiO₂ nanofibers grown on Ti-6Al-4V substrate by oxidation. *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 8301–8304.
53. Smith, B.S.; Yoriya, S.; Johnson, T.; Papat, K.C. Dermal fibroblast and epidermal keratinocyte functionality on titania nanotube arrays. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2686–2696.
54. Hong, Y.; Yu, M.; Weng, W.; Cheng, K.; Wang, H.; Lin, J. Light-induced cell detachment for cell sheet technology. *Biomaterials* **2013**, *34*, 11–18.
55. Sasagawa, T.; Shimizu, T.; Sekiya, S.; Haraguchi, Y.; Yamato, M.; Sawa, Y.; Okano, T. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1646–1654.
56. Kim, Y.S.; Kim, K.S.; Han, I.; Kim, M.H.; Jung, M.H.; Park, H.K. Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0038242.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Research Article

The Promotion of Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO₂ Nanotubes Using a Superoxidized Solution

Ernesto Beltrán-Partida,^{1,2} Benjamin Valdez-Salas,² Alan Escamilla,² Aldo Moreno-Ulloa,^{3,4} Larysa Burtseva,² Ernesto Valdez-Salas,⁵ Mario Curiel Alvarez,² and Nicola Nedeve²

¹Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Avenida Zotoluca y Chinampas, s/n, 21040 Mexicali, BC, Mexico

²Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Boulevard B. Juárez y Calle de la Normal s/n, 21280 Mexicali, BC, Mexico

³University of California San Diego, School of Medicine, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093, USA

⁴Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, 11340 México, DF, Mexico

⁵Centro Médico Ixchel, Bravo y Obregón, 21000 Mexicali, BC, Mexico

Correspondence should be addressed to Benjamin Valdez-Salas; benval@uabc.edu.mx

Received 18 February 2015; Revised 9 April 2015; Accepted 20 April 2015

Academic Editor: P. Davide Cozzoli

Copyright © 2015 Ernesto Beltrán-Partida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The purpose of the present study was to synthesize 80 nm diameter TiO₂ nanotubes (NTs) on Ti6Al4V alloy using a commercially superoxidized water (SOW) enriched with fluoride to reduce anodization time and promote the antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The alloy discs were anodized for 5 min and as a result, NTs of approximately 80 nm diameters were obtained with similar morphology as reported in previous studies using longer anodization times (1-2 h). Field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were used to characterize the materials surfaces. The NTs showed significantly decreased *S. aureus* viability after 1, 3, and 5 days of culture in comparison to nonanodized alloy. Likewise, SEM analysis also suggested lower bacterial adhesion on the NTs surface. No differences in bacterial morphology and topography were observed on both materials, as analyzed by SEM and atomic force microscopy (AFM). In conclusion, 80 nm diameter NTs were grown on Ti6Al4V alloy in 5 min by using a SOW solution enriched with fluoride, which resulted in a material with promoted antibacterial efficacy against *S. aureus* for up to 5 days of in vitro culture when compared to nonanodized alloy.

1. Introduction

Despite strict sterilization procedures biomaterials associated infection (BAI) is a common complication associated with any implanted biomaterial [1]. Once infection arises, bacteria tend to aggregate into a polymeric matrix forming a biofilm on the biomaterial surface, which is difficult for the host defense and antimicrobial therapy to destroy [2, 3]. Such BAI may lead to removal of the implant, revision surgery, and even amputation, all of which are associated with high medical costs [4, 5]. One of the most common causes of BAI is related to *S. aureus*, which has become an important protagonist in metallic materials, bone joints, orthopedic implants, and

soft tissue infections [6–11]. Therefore, there is the need for biomaterials with improved antibacterial properties in order to increase the success of dental and orthopedic implants.

Bacterial adhesion to the implanted material is known to be the first and most critical step in the pathogenesis of the infection, in part because nonadhered bacteria are rapidly phagocytized by the immune system [12, 13]. Thus, prevention of bacterial adhesion exerts a fundamental role in preventing the implant infection [14]. Currently, bacterial infection has been safeguarded through the chemoprophylactic use of antimicrobial agents before surgery, primarily when they are systematically administered and in some cases even locally released from the biomaterial. Nevertheless, this latter

TABLE 1: Surface elemental composition by EDX analysis.

Surface	Atomic concentration (%)					
	C	V	Al	Ti	O	F
Non-anodized alloy	5.96	5.67	5.37	83.00	0.00	0.00
NTs	4.00	0.00	5.40	61.91	25.51	3.18

37°C to allow adhesion in a static model. Thereafter, 2 mL of warm TSB was deposited, and the incubation time continues for D1, D3, and D5. After the corresponding incubation days, the specimens were rinsed twice with phosphate saline buffer (PBS; pH 7.0) to remove any unbounded cells. The substrates were transferred into sterile conical tubes (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) with 5 mL of fresh TSB medium. The tubes were placed in an ultrasonic bath and sonicated for 15 minutes at 120 W to release the attached cells from the biomaterial [36, 37]. Next the materials were removed and the remaining suspensions were diluted with PBS (pH 7.0) and cultured at 37°C for 24 hours in TSA plates. Bacterial viability was assessed by CFU counting in TSA plates. The above procedure was performed 20 times for each material [36]. The viability was expressed as $\log_{10}$ CFU/mL $\pm$ SD.

2.6. Bacterial Density and Morphology on the Samples by SEM.

In order to determine the bacterial density and morphology at the end of each incubation period, the samples were prepared for SEM (JSM-6010LA, JEOL, Tokyo, Japan) analysis according to the following procedure: the discs were rinsed in PBS (pH 7.0) to wash away nonadhered bacteria and then fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO) in 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) for 2 h at 25°C. Next, samples were washed three times with PBS (10 minutes each wash), dehydrated in a graded series of ethanol solutions (50, 60, 70, 80, 90, and 100% v/v), and finally sputter-coated with 10 nm gold layer for the analysis.

2.7. Bacterial Topography on the Samples by AFM. To assess any changes on bacteria's topography incubated on the materials, we used AFM analysis. However, we only analyzed D1 in order to obtain a more precise analysis of only a subset of bacteria's surface instead of layers of bacteria. Thus, following D1 of bacterial growth, the samples were prepared in the same way as for SEM, as described above [38]. A Quesant Q-Scope 350 AFM (AMBIOS, Agura Hills, California, USA) was used because of its high-resolution probe with an acceptable resolution in the subnanometer range [39]. The analyses were carried out at room temperature using an antiaoustic box to prevent noises, which can affect measurements. The system was operated in the contact mode, using a 40 μ m X-Y and 4 μ m Z scanner equipped with a silicon tip and 10 nm tip curvature. The scan speed was 0.5 Hz/sec. The experiment scan area was 25 μ m².

2.8. Statistical Analysis. At least three independent experiments were performed, each in triplicate. Numerical data

were analyzed using GraphPad Prism 6 (San Diego, California, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's test was used to determine statistical significance. A *P* value below 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Surface Characterization. Nonanodized Ti6Al4V alloy surface morphology is depicted in Figure 1(a), denoting a smooth texture as expected. Following anodization, a uniform layer of NTs was fabricated over the Ti6Al4V alloy surface, as observed in Figure 1(b). Cross section view is presented in Figure 1(c). The NTs diameter was estimated to be 80 nm and the length 380 nm.

The EDX analyses suggest the formation of NTs based on an increased percentage of oxygen in the chemical composition analysis compared to the nonanodized alloy (see Table 1). Moreover, a trace amount of fluoride can be detected on the NTs surface as shown by an increased percentage of fluoride content (Table 1).

3.2. Bacterial Viability on the Samples by CFU Analysis. The *S. aureus* viability on the samples is shown in Figure 2. At day 1 (D1) of bacterial incubation, the NTs showed 35.4% (*P* < 0.05) decreased viable bacteria when compared to nonanodized material. At day 3 (D3), the number of viable bacteria increased on both materials; nonetheless, a lower bacterial viability was observed on the NTs surface, that is, a 31.5% bacterial growth inhibition (*P* < 0.05) in comparison to the nonanodized material. Finally at day 5 (D5), the NTs surface showed 25% (*P* < 0.05) reduced viable bacteria compared to nonanodized alloy. Also, at D5 no significant changes in bacterial viability were observed compared to D3 on both samples.

3.3. Bacterial Density and Morphology on Samples by SEM. The morphology of the bacterial colonies on the anodized and nonanodized alloys did not vary, as tested by SEM (Figure 3). However, at D1 of incubation we detected an increased cellular colonization and agglomeration on the nonanodized alloy surface (Figure 3(a)) compared to the NTs (Figure 3(b)). At D3, the bacterial colonization increased in both samples (Figures 3(c) and 3(d)), despite being to a lower extent on the NTs surface (Figure 3(d)). Similarly, at D5 adhered bacteria were higher on the nonanodized alloy (Figure 3(e)) when compared to the NTs surface (Figure 3(f)); nevertheless, no apparent increase was found on bacterial density when compared to D3.

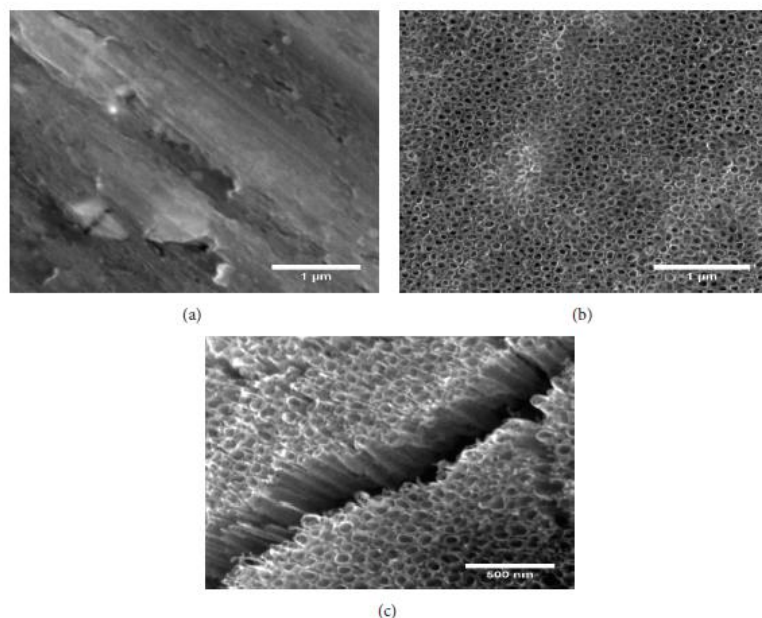


FIGURE 1: FE-SEM micrographs of the samples. The nonanodized and anodized Ti6Al4V alloy surfaces were characterized and compared. (a) Nonanodized alloy, (b) NTs, and (c) cross section view of NTs.

3.4. Bacterial Topography. The *S. aureus* topography after DI of culture on anodized and nonanodized alloys is displayed in Figure 4. There were no apparent bacterial topographic changes on nonanodized (Figure 4(a)) and anodized alloys (Figure 4(b)). Thus, the bacterial topography was not altered by the NTs formed on the anodized alloy.

4. Discussion

Infections of dental and orthopedic devices are strongly associated with bacterial adhesion to the material surface [1, 40]. Once bacteria adhere to the material surface the colony proliferates forming a biofilm [14]. There are two stages involved in the mechanism of the biofilm formation. The first stage comprises the bacterial attachment to the surface by physicochemical interactions [3, 14], while in the second stage, there are cellular and molecular interactions between bacteria that provide an adequate environment for bacterial growth [3, 41]. Thus, according to this fact, by inhibiting the bacterial adhesion one could avoid the biofilm development and therefore reduce the probability of BAI. Previous investigations evaluating changes of bacterial adhesion on the surface of modified commercial implants have shown promising results; that is, Cochis et al. suggested decreased bacterial growth for up to 72 h using Ti surfaces grafted with gallium ions [42]; Jin et al. reported increased in vitro antibacterial performance of Zn/Ag nanoparticles immersed by plasma ion implantation on a Ti surface [43]. In this regard, implants with nanostructured surfaces have

been widely investigated for their capacity to enhance the biocompatibility of orthopedic and dental materials, which may also have improved their antibacterial properties [44–47].

In the present study, we built self-organized and ordered NTs (80 nm of diameter) using a SOW containing fluoride by anodization on Ti6Al4V alloy surface, requiring just only 5 min of anodization to obtain similar morphology NTs as reported by Wang et al. who anodized Ti6Al4V for 1 h [28] and Narayanan et al. for 2 h [21] using fluoride and deionized water as electrolyte. This trend could be explained by the presence of the oxidized components that with fluoride synergistically may act promoting a faster oxidation which leads to a nanostructured morphology and significantly impacting the adhesion and colonization of *S. aureus* up to 5 days of incubation. As previously mentioned, the NTs were successfully obtained by the anodization process with traces of fluoride and a decrease in Al due to an increment of oxygen as illustrated by the EDX analysis (Table 1), data which are in accordance with previous reports [3, 26, 48].

Hitherto, the eradication of biofilms-associated infections on orthopedic and dental implants has been an elusive goal [49]. Several approaches have been undertaken to treat those infections, such as the prophylactic and prolonged use of antimicrobial therapy, as well as the use of biomaterials loaded with drugs [50, 51]. However, such options individually possess limitations due to antibiotic-resistance, fast delivery of the immobilized drug, and toxicity or failure that ultimately leads to removal of the implanted biomaterial

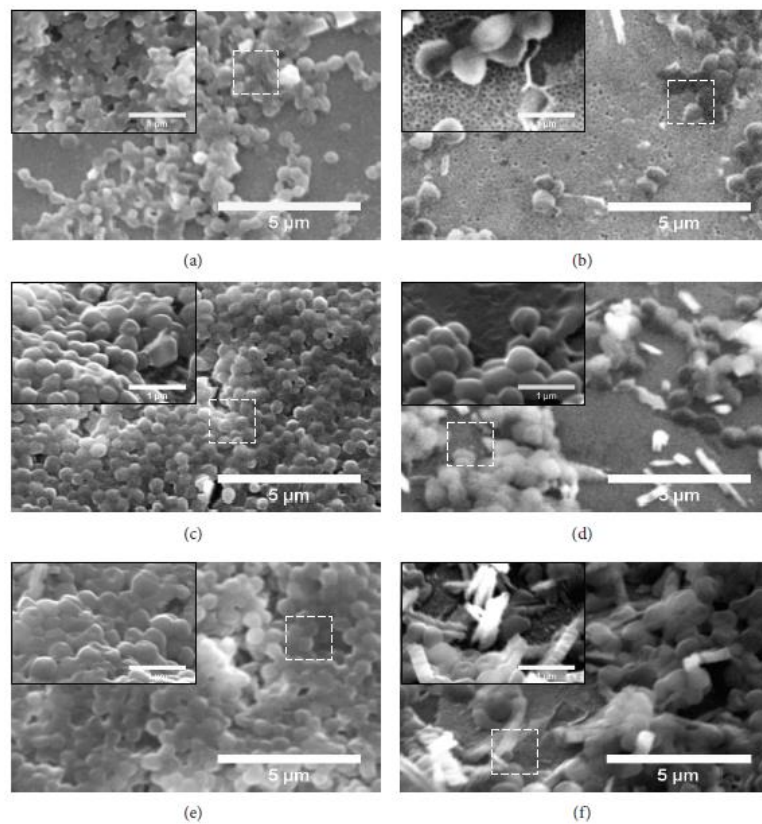


FIGURE 3: SEM micrographs of *S. aureus* adhered on the experimental substrates. (a) Nonanodized alloy and (b) NTs after D1; (c) nonanodized alloy and (d) NTs after D3; and (e) nonanodized alloy and (f) NTs after D5.

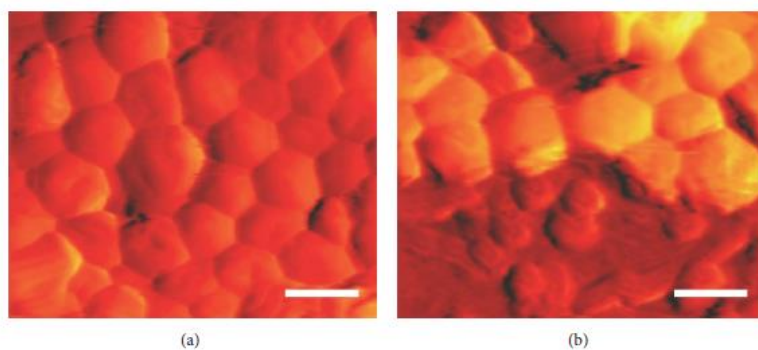


FIGURE 4: AFM images of *S. aureus* on the surfaces. Differences between bacterial topography were assessed at D1 of culture on the experimental samples. (a) Nonanodized alloy and (b) NTs. Scale bar is 5 μm.

All these results prove that anodization process can be performed using a SOW solution with fluoride as an electrolyte to dramatically reduce the time of anodization and to promote antibacterial properties. Most likely the observed effects are due to the presence of fluoride, the nanostructured surface morphology, and the oxidizing species of the SOW.

5. Conclusions

Surface modification of Ti6Al4V alloy with 80 nm diameter NTs obtained using SOW and fluoride as electrolyte enhances the antibacterial effects of the material against *S. aureus*. We suggest that bacterial inhibition of the NTs can be due to the presence of fluoride derived from the anodization process, modification of the surface morphology, and the oxidized species present in the SOW. The obtained results indicate that NTs fabricated by anodic oxidation using SOW solution enriched with fluoride can be used as a means for the development of biomedical implants with promoted antibacterial properties. However, more investigation regarding the interactions between *S. aureus* and NTs is required in order to corroborate those findings.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Ernesto Beltrán-Partida and Benjamin Valdez-Salas contributed equally to this work.

Acknowledgment

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CVU 348737, 114359) for a Ph.D. scholarship.

References

- [1] M. Riool, L. de Boer, V. Jaspers et al., "Staphylococcus epidermidis originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5202–5212, 2014.
- [2] M.-Y. Lan, C.-P. Liu, H.-H. Huang, and S.-W. Lee, "Both enhanced biocompatibility and antibacterial activity in Ag-decorated TiO₂ nanotubes," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e75364, 2013.
- [3] C. Pérez-Jorge, A. Conde, M. A. Arenas et al., "In vitro assessment of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus adhesion on TiO₂ nanotubes on Ti-6Al-4V alloy," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 100, no. 7, pp. 1696–1705, 2012.
- [4] K. M. D. Merollini, R. W. Crawford, and N. Graves, "Surgical treatment approaches and reimbursement costs of surgical site infections post hip arthroplasty in Australia: a retrospective analysis," *BMC Health Services Research*, vol. 13, article 91, 2013.
- [5] K. J. Bozic, S. M. Kurtz, E. Lau et al., "The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the united states," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 468, no. 1, pp. 45–51, 2010.
- [6] J. Rivadeneira, A. L. Di Virgilio, M. C. Audisio, A. R. Boccacini, and A. A. Gorustovich, "Evaluation of antibacterial and cytotoxic effects of nano-sized bioactive glass/collagen composites releasing tetracycline hydrochloride," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, no. 6, pp. 1438–1446, 2014.
- [7] C. Soundrapandian, S. Datta, and B. Sa, "Drug-eluting implants for osteomyelitis," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 24, no. 6, pp. 493–545, 2007.
- [8] M.-T. Tsai, Y.-Y. Chang, H.-L. Huang, J.-T. Hsu, Y.-C. Chen, and A. Y.-J. Wu, "Characterization and antibacterial performance of bioactive Ti–Zn–O coatings deposited on titanium implants," *Thin Solid Films*, vol. 528, pp. 143–150, 2013.
- [9] M. Mattioli-Belmonte, S. Cometa, C. Ferretti et al., "Characterization and cytocompatibility of an antibiotic/chitosan/cyclodextrins nanocoating on titanium implants," *Carbohydrate Polymers*, vol. 110, pp. 173–182, 2014.
- [10] J. S. Moskowitz, M. R. Blaisse, R. E. Samuel et al., "The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of Staphylococcus aureus infection in a rabbit bone model," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 6019–6030, 2010.
- [11] M. Ma, M. Kazemzadeh-Narbat, Y. Hui et al., "Local delivery of antimicrobial peptides using self-organized TiO₂ nanotube arrays for peri-implant infections," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100, no. 2, pp. 278–285, 2012.
- [12] J. Esteban and J. Cordero-Ampuero, "Treatment of prosthetic osteoarticular infections," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 12, no. 6, pp. 899–912, 2011.
- [13] M. A. Arenas, C. Pérez-Jorge, A. Conde et al., "Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 105, pp. 106–112, 2013.
- [14] J. D. Bryers, "Medical biofilms," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, no. 1, pp. 1–18, 2008.
- [15] D. M. Livermore, "Has the era of untreatable infections arrived?" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, no. 1, pp. 129–136, 2009.
- [16] A. M. Gallardo-Moreno, M. A. Pacha-Olivenza, L. Saldaña et al., "In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 1, pp. 181–192, 2009.
- [17] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, 2004.
- [18] R. R. Maddikeri, S. Tosatti, M. Schuler et al., "Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modified titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces," *Journal of Biomedical Materials Research Part: A*, vol. 84, no. 2, pp. 425–435, 2008.
- [19] S. Ferraris, A. Venturello, M. Miola, A. Cochis, L. Rimondini, and S. Spriano, "Antibacterial and bioactive nanostructured titanium surfaces for bone integration," *Applied Surface Science*, vol. 31, pp. 279–291, 2014.
- [20] C. Giordano, E. Saino, L. Rimondini et al., "Electrochemically induced anatase inhibits bacterial colonization on Titanium Grade 2 and Ti6Al4V alloy for dental and orthopedic devices,"



Disinfection of titanium dioxide nanotubes using super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior



Ernesto Beltrán-Partida^{a,b}, Benjamín Valdez-Salas^{b,*}, Alan Escamilla^b, Mario Curiel^b, Ernesto Valdez-Salas^c, Nicola Nedev^b, Jose M. Bastidas^d

^a Department of Biomaterials, Dental Materials and Tissue Engineering, Faculty of Dentistry Mexicali, Autonomous University of Baja California, Av. Zotoluca and Chinampas St., 21040 Mexicali, Baja California, Mexico

^b Department of Corrosion and Materials, Engineering Institute, Autonomous University of Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal St., 21280 Mexicali, Baja California, Mexico

^c Ixchel Medical Centre, Av. Bravo y Obregón, 21000 Mexicali, Baja California, Mexico

^d National Centre for Metallurgical Research, CSIC, Av. Gregorio del Amo 8, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2015

Received in revised form 20 October 2015

Accepted 16 November 2015

Available online 17 November 2015

Keywords:

Titanium

Nanostructures

Sterilization

Bacterial viability

Super-oxidized water

ABSTRACT

Amorphous titanium dioxide (TiO₂) nanotubes (NTs) on Ti6Al4V alloy were synthesized by anodization using a commercially available super-oxidized water (SOW). The NT surfaces were sterilized by ultraviolet (UV) irradiation and disinfected using SOW. The adhesion and cellular morphology of pig periosteal osteoblast (PPO) cells and the behavior of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) cultured on the sterilized and disinfected surfaces were investigated. A non-anodized Ti6Al4V disc sterilized by UV irradiation (without SOW) was used as control. The results of this study reveal that the adhesion, morphology and filopodia development of PPO cells in NTs are dramatically improved, suggesting that SOW cleaning may not disrupt the benefits obtained by NTs. Significantly decreased bacterial viability in NTs after cleaning with SOW and comparing with non-cleaned NTs was seen. The results suggest that UV and SOW could be a recommendable method for implant sterilization and disinfection without altering osteoblast behavior while decreasing bacterial viability.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Titanium (Ti) and Ti-based alloys are among the most widely used clinical materials for orthopedic and dental implants [1], due to their mechanical strength, light weight, corrosion resistance by the formation of a protective TiO₂ layer, and biocompatibility [1,2]. However, bacterial adhesion on the implant surface is a complication that can critically affect the success of biomaterials due to the ability of bacteria to form biofilms which lead to implant failure [3–5]. To address these problems, this study considers NTs produced by anodization, as they can be synthesized with controlled order, improved corrosion resistance, increased surface roughness, a lower water contact angle, and excellent biocompatibility compared to non-modified Ti surfaces [2,6,7]. It has also been suggested that a 70–100 nm NT diameter promotes alkaline phosphatase activity levels and increased calcium deposition compared to non-anodized Ti and smaller NT diameters [8], information that propose 80 nm NTs as a bone forming-functional coating. On the other hand, Ercan et al., reported decreased *Staphylococcus aureus* viability on amorphous 80 nm NTs after comparing to minor diameter NTs (20, 40 and 60 nm) and non-anodized Ti [9]. Likewise, Arenas et al.,

described that amorphous 100 nm NTs built on Ti6Al4V by anodization promotes superior antibacterial effects against *S. aureus* after comparing to non-anodized Ti6Al4V [10]. As well, they suggested a reduced colonization rate of a clinically *S. aureus* strain (isolated from an infected hip prosthesis) cultured on NT surfaces after comparing to 20 nm diameter TiO₂ nanopores and non-anodized Ti6Al4V [10]. Moreover, in a recent study we observed an elevated and sustained antibacterial performance against *S. aureus* for up to 5 days on amorphous 80 nm NTs fabricated on Ti6Al4V using SOW for anodization, but not for surface disinfection [11]. This information advocates the use of 80–100 nm NTs as an appropriate antibacterial nanostructured coating.

Sterilization is defined as a process that completely eradicates or destroys bacterial life, being widely performed by physical or chemical processes [12], and has been reported to play an important role in the biological behavior (e.g. cellular adhesion or bacterial viability) of implant surfaces [2,13–15], especially Ti. In recent studies autoclaving has commonly been used as a sterilizing technique for Ti surfaces [2], but autoclaving has shown that is capable to reduced hydrophilicity of Ti surfaces through the deposition of hydrophobic contaminants on the material surface [13], resulting in reduced cytocompatibility. Furthermore, sterilization by autoclaving has led to significantly decreased MG63 human osteoblast and MC3T3-E1 mouse osteoblast responses on NTs and non-anodized Ti [13,16]. Moreover, Kummer et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: benval@uabc.edu.mx (B. Valdez-Salas).

suggested increased *S. aureus* growth on 80 and 20 nm diameter NTs and on non-anodized Ti surfaces sterilized by autoclaving, compared to ethanol and UV sterilization methods [2].

SOW is an electrolyzed water that contains oxidizing species such as H_2O_2 , oxidizing radical (i.e. hypochlorous species) and chlorine molecules like hypochlorite [17,18]. It has been widely used as a disinfectant for medical instruments and inanimate surfaces [17]. Furthermore, it has been reported to be effective in the treatment of infectious diseases such as skin defects or ulcers, peritonitis and intraperitoneal abscesses [17,19], suggesting that SOW acts as a potent antibacterial agent with a broad-spectrum antibacterial efficacy [20]. In this manner, it has been proposed that SOW works destroying the covalent bonds of the nucleic acid chains, as well as the protein chains in *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 [21,22]. Moreover, an AFM study showed that SOW in contact with *E. coli* for 30 s was able to induce cellular swelling and at the end of 5 min of exposure it was observed that the cells were completely destroyed [23]. These data suggested that SOW acts as an antibacterial agent that negatively interferes with the metabolic activity and membrane integrity of bacteria. On the other hand, SOW has also been recommended for handwashing by medical personnel [17], being proposed as a non-cytotoxic substance. However, the promising effects of SOW as a disinfectant agent have not been investigated on nanostructured Ti. On the basis of the above it is hypothesized that Ti6Al4V NT surfaces sterilized with UV and disinfected by SOW rinsing will offer lower bacterial viability without altering osteoblast adhesion and morphology.

The present study evaluates for the first time the bacterial behavior of 80 nm TiO_2 NTs on Ti6Al4V alloy sterilized by UV and disinfected using a commercially available super-oxidized solution. Osteoblast behavior is explored by evaluating cell adhesion, cellular morphology and the formation of filopodia, as well as cytoplasmic stress fibers. The surface morphology of the material was analyzed by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), the chemical composition by

energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and the surface roughness by atomic force microscopy (AFM). *S. aureus* viability on the surfaces was assessed by colony-forming unit (CFU) calculation and bacteria morphology was analyzed using scanning electron microscopy (SEM). Osteoblast behavior was also examined by SEM and fluorescence microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of NTs

NTs were synthesized as described in a previous study [24]. Discs of Ti6Al4V (ASTM F-136; Supra Alloys Inc., Camarillo, CA, USA) with 150 mm diameter and 5 mm thickness were polished using SiC emery paper (100 to 2000 grit) and 1- μ m alumina to achieve a mirror finish. The discs were then mounted on a special flat 125 mL cell and electrolytically anodized using Microdacyn 60® super-oxidized water (Oculus Technologies, Guadalajara, JAL, MEX) at pH 6.8, containing 10 mg/L of NH_4F (Sigma-Aldrich, USA) and 100 mg/L NaCl (Sigma-Aldrich, USA). A 20 V potential was applied using a DC power supply for 5 min and a platinum mesh as counter electrode. The process was carried out at room temperature (defined here as RT). Finally, the discs were cleaned in an ultrasonic bath with distilled water for 5 min to eliminate residues of fluoride salts [25], rinsed with isopropyl alcohol, and dried in a desiccator for 12 h. All experimental substrates were sterilized by UV irradiation (285 nm UVB light source) for 30 min on each side [2,13]. In order to systematically evaluate the effect of SOW rinsing, an anodized-Ti6Al4V NTs and non-anodized Ti6Al4V materials (namely here as NT-SOW and Ti6Al4V-SOW respectively) were disinfected by immersion in 20 mL of SOW for 1 h and finally dried at RT before use. A non-anodized Ti6Al4V alloy disc (denoted here as Ti6Al4V) was used as control. Finally, an anodized-Ti6Al4V NT (NT) surface was used as a negative control.

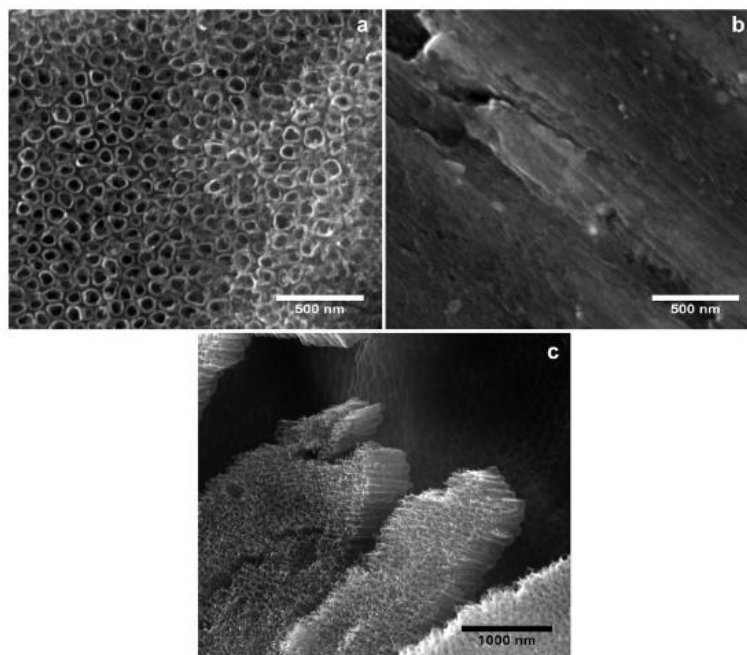


Fig. 1. FE-SEM micrographs of the experimental surfaces cleaned by SOW: (a) anodized Ti6Al4V alloy illustrating the presence of NTs, (b) Ti6Al4V surface showing a flat surface, (c) A cross-section view of NTs.

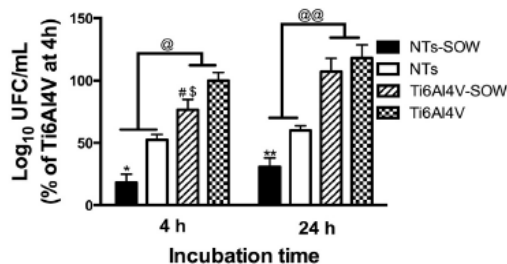


Fig. 6. Viability evaluation of *S. aureus* cultured on the surface specimens after 4 and 24 h of incubation: The bar graphs show the mean $\pm$ SD error bars, $N = 3$, * and ** illustrate significance between NT-SOW and NTs at 4 h and 24 h respectively. @ and @@ denote significance between NT-SOW and NT group surfaces when comparing them to Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V after 4 h and 24 h of culture respectively. Next, # indicates statistical difference between Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface at 4 h of bacterial growth. Finally, \$ expresses divergence among Ti6Al4V-SOW at 4 h and Ti6Al4V at 24 h of colonization.

of ethanol solutions (50, 60, 70, 80, 90 and 100% v/v), and finally sputter-coated with 10-nm gold for the analysis.

2.5. Statistical analysis

At least three independent experiments were performed, each in triplicate. For the microscopic analysis, at least five random fields were analyzed for each experimental group. Numerical data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The significance of differences between group means was determined using two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test when appropriate. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

The surface morphologies of the experimental materials are presented in Fig. 1. Interestingly, Fig. 1a shows FE-SEM micrographs of the anodized NTs, indicating the presence of a nanotubular and uniformly distributed layer over the alloy surface as previously reported [24]. In contrast, Fig. 1b suggests a smooth and flat surface with no evidence of nanostructured morphology, as expected [30]. Fig. 1c offers a cross-section view of the NTs. The NT diameter was estimated to be 80 nm and the length 400 nm.

The chemical composition of the material surfaces is compared in Table 1. The difference between the experimental samples consists of an increased oxygen content (24%) on the NTs and NT-SOW (20.3%) surface and the presence of trace amounts of fluoride (4.51 and 2.91%, respectively) due to anodization, information that strongly suggests the formation of a thick nanostructured layer which is not present on

the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface, in agreement with other studies [24,25,31,32]. Indeed, this information advocates that SOW rinsing may not negatively disturb the chemical properties of the nanostructured surface.

Surface roughness represents an important parameter in the biological behavior of nanostructured surfaces [33]. Interestingly, it has been widely reported that rougher surfaces may potentially increase cellular adhesion while promoting osteoblast functionality, so attention has been paid to the surface topography of the experimental materials (Fig. 2). Fig. 2a indicates an increased surface roughness (9.19 ± 0.22 nm) on anodized NTs, as denoted by the increased formation of highly ordered nanostructured dots, data which correlates with the nanotubular morphology illustrated by FE-SEM images (Fig. 1a). The Ti6Al4V control surface topography is presented in Fig. 2b, indicating a flat and smooth surface (3.71 ± 0.68 nm) as expected, results that are in concordance with the nanotextured and flat surfaces reported in the literature [2,24,25,31,32].

Fig. 3 depicts the cell adhesion process of the PPO cells stained with DAPI on the experimental materials. The cellular adhesion process on the NT and NT-SOW surface increases dramatically with each incubation time (4 h, 12 h and 24 h) compared to the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface groups. Moreover, a cellular proliferation trend over the NT-SOW and NT surface could be elicited after analyzing with ANOVA (at each culture time), as a similar tendency was denoted on the Ti6Al4V-SOW and Ti6Al4V control surface, though with improved differences on the NT-SOW surface, suggesting that SOW disinfection may not disrupt the osteoblast adhesion process [7,8,31]. Interestingly, increased adhesion and proliferation of primary pig osteoblast cultured on anodized NT surfaces sterilized with UV was evidenced in a previous study [24]. Similarly, Zhao et al. suggested increased primary rat osteoblast adhesion and proliferation on anodized NTs sterilized with UV and ethanol versus an autoclaving process and polished Ti [13]. This trend was explained by the author as being due to the formation of abundant Ti–OH functional groups [34] and the removal of surface hydrophobic contaminants, especially hydrocarbons, by the UV irradiation [34,35]. They also reported increased surface energy for NTs and polished Ti surfaces sterilized by means of UV and ethanol, whereas the autoclaving process did not influence the surface energy [13]. This finding is in agreement with a recent study that described increased surface energy and MG63 osteoblast adhesion on Mg and MgCa alloys sterilized by means of ethanol immersion [12]. According to the aforementioned reports, our results suggest a similar trend to these previously reported, but more studies regarding the chemical behavior of the nanostructured surface after SOW disinfection as well as comparison with different sterilization techniques will be required in order to elucidate these trends.

Cytoskeletal actin organization and cell morphology were also analyzed by means of fluorescence microscopy, showing remarkable differences between the disinfected substrates, as depicted in Fig. 4. Initially, PPO cells cultured on the NT-SOW surfaces (Fig. 4a) showed an

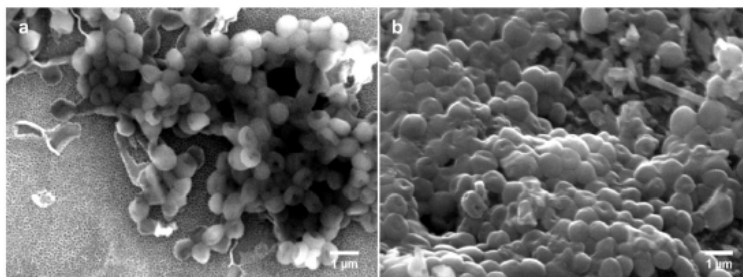


Fig. 7. SEM micrographs of adhered bacteria on the SOW-treated surfaces at 24 h of incubation: (a) Bacteria observed on the NT-SOW surface, illustrating a spherical morphology. (b) Bacteria adhered on the Ti6Al4V-SOW substrate, showing an evident biofilm formation. Denoted similar cell morphology on both experimental substrates.

that SOW could potentially be used as a disinfecting agent for nanostructured implant biomaterials without compromising their performance.

5. Disclosures

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-CVU 348737, 114359), Mexico, for a PhD Scholarship. The authors also want to acknowledge to UABC due to the grant number 2058 from 1ra Convocatoria Especial Para PTC Contratados en 2013 y 2014.

References

- [1] F. Ordikhani, A. Simchi, *Appl. Surf. Sci.* 317 (2014) 56–66.
- [2] K.M. Kummer, E.N. Taylor, N.G. Durmas, K.M. Tarquinio, B. Ercan, T.J. Webster, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 101 (2013) 677–688.
- [3] A. Winkler, W. Dempwolf, E. Gellermann, M. Slusznjak, S. Grade, W. Heuer, M. Eisenburger, H. Menzel, M. Stiesch, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 4327–4342.
- [4] A.M. Gallardo-Moreno, M.A. Pacha-Olivenza, M.-C. Fernández-Calderón, C. Pérez-Giraldo, J.M. Bruque, M.-L. González-Martín, *Biomaterials* 31 (2010) 5159–5168.
- [5] M.A. Arenas, C. Perez-Jorge, A. Conde, E. Matykina, J.M. Hernandez-Lopez, R. Perez-Tanoira, J.J. de Damborenea, E. Gomez-Barrena, J. Esteba, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 105 (2013) 106–112.
- [6] W.Q. Yu, X.Q. Jiang, L. Xu, Y.F. Zhao, F.Q. Zhang, X. Cao, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 99 (2011) 207–216.
- [7] S. Oh, C. Daraio, L.H. Chen, T.R. Pisanic, R.R. Finones, S. Jin, *J. Biomed. Mater. Res. A* 78 (2006) 97–103.
- [8] K.S. Brammer, S. Oh, C.J. Cobb, L.M. Bjursten, H.v.d. Heyde, S. Jin, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3215–3223.
- [9] B. Ercan, E. Taylor, E. Alpaslan, T.J. Webster, *Nanotechnology* 22 (2011) 295102.
- [10] C. Perez-Jorge, A. Conde, M.A. Arenas, R. Perez-Tanoira, E. Matykina, J.J. de Damborenea, E. Gomez-Barrena, J. Esteban, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100 (2012) 1696–1705.
- [11] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, A. Escamilla, A. Moreno-Ulloa, L. Burtseva, E. Valdez-Salas, M. Curiel Alvarez, N. Nedev, *J. Nanomater.* 2015 (2015) 1–9.
- [12] X.L. Liu, W.R. Zhou, Y.H. Wu, Y. Cheng, Y.F. Zheng, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 4144–4154.
- [13] L. Zhao, S. Mei, W. Wang, P.K. Chu, Z. Wu, Y. Zhang, *Biomaterials* 31 (2010) 2055–2063.
- [14] S. Oh, K.S. Brammer, K.-S. Moon, J.-M. Bae, S. Jin, *Mater. Sci. Eng. C* 31 (2011) 873–879.
- [15] M. Hirano, T. Kozuka, Y. Asano, Y. Kakuchi, H. Arai, N. Ohtsu, *Appl. Surf. Sci.* 311 (2014) 498–502.
- [16] J.H. Park, R. Olivares-Navarrete, R.E. Baier, A.E. Meyer, R. Tannenbaum, B.D. Boyan, Z. Schwartz, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1966–1975.
- [17] C. Landa-Solis, D. Gonzalez-Espinosa, B. Guzman-Soriano, M. Snyder, G. Reyes-Teran, K. Torres, A.A. Gutierrez, *J. Hosp. Infect.* 61 (2005) 291–299.
- [18] J. Medina-Tamayo, E. Sánchez-Miranda, H. Balleza-Tapia, X. Ambriz, M.E. Cid, D. González-Espinosa, A.A. Gutiérrez, C. González-Espinosa, *Int. Immunopharmacol.* 7 (2007) 1013–1024.
- [19] S. Sekiya, K. Ohmori, K. Harii, *Artif. Organs* 21 (1997) 32–38.
- [20] M.E. Velazquez-Meza, M. Hernandez-Salgado, M.A. Sanchez-Aleman, *Microb. Drug Resist.* (Larchmont, N.Y.) 21 (2015) 367–372.
- [21] V. Zinkevich, I.B. Beech, R. Tapper, I. Bogdarina, *J. Hosp. Infect.* 46 (2000) 153–156.
- [22] T.-Y. Chen, S.-H. Kuo, S.-T. Chen, D.-F. Hwang, *Food Chem.* 194 (2016) 529–537.
- [23] R.M.S. Thorn, S.W.H. Lee, G.M. Robinson, J. Greenman, D.M. Reynolds, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2012) 641–653.
- [24] E. Beltrán-Partida, A. Moreno-Ulloa, B. Valdez-Salas, C. Velasquillo, M. Carrillo, A. Escamilla, E. Valdez, F. Villarreal, *Materials* 8 (2015) 867–883.
- [25] C. Yao, E.B. Slamovich, T.J. Webster, *J. Biomed. Mater. Res. A* 85 (2008) 157–166.
- [26] G. Lan, M. Li, Y. Tan, L. Li, X. Yang, L. Ma, Q. Yin, H. Xia, Y. Zhang, G. Tan, C. Ning, *J. Mater. Sci. Technol.* 31 (2015) 182–190.
- [27] C.J. Frandsen, K.S. Brammer, K. Noh, G. Johnston, S. Jin, *Mater. Sci. Eng. C* 37 (2014) 332–341.
- [28] G. Bjerkan, E. Witso, K. Bergh, *Acta Orthop.* 80 (2009) 245–250.
- [29] I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda, M. Osaki, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 234.
- [30] B. Ercan, T.J. Webster, *Int. J. Nanomedicine* 3 (2008) 477–485.
- [31] K. Burns, C. Yao, T.J. Webster, *J. Biomed. Mater. Res. A* 88 (2009) 561–568.
- [32] B. Ercan, K.M. Kummer, K.M. Tarquinio, T.J. Webster, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3003–3012.
- [33] R. Olivares-Navarrete, S.E. Rodil, S.L. Hyzy, G.R. Dunn, A. Almaguer-Flores, Z. Schwartz, B.D. Boyan, *Biomaterials* 51 (2015) 69–79.
- [34] W. Att, N. Hori, F. Iwasa, M. Yamada, T. Ueno, T. Ogawa, *Biomaterials* 30 (2009) 4268–4276.
- [35] Y. Han, D. Chen, J. Sun, Y. Zhang, K. Xu, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1518–1529.
- [36] S. Faghihi, F. Azari, A.P. Zhilyaev, J.A. Szpunar, H. Vali, M. Tabrizian, *Biomaterials* 28 (2007) 3887–3895.
- [37] J.A. Wilkins, S. Lin, *Cell* 28 (1982) 83–90.
- [38] G. Daculsi, P. Pilet, M. Cottrel, G. Guicheux, *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999) 228–233.
- [39] J.W. Lee, K.B. Lee, H.S. Jeon, H.K. Park, *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 27 (2011) 369.
- [40] S.D. Puckett, E. Taylor, T. Raimondo, T.J. Webster, *Biomaterials* 31 (2010) 706–713.
- [41] W.T. Lin, H.L. Tan, Z.L. Duan, B. Yue, R. Ma, G. He, T.T. Tang, *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 1215–1230.
- [42] H. Zhang, Y. Sun, A. Tian, X.X. Xue, L. Wang, A. Alquhali, X. Bai, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 4379–4389.
- [43] T.E. Cloete, M.S. Thantsha, M.R. Maluleke, K. Kirkpatrick, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 379–384.

A COMPARATIVE STUDY: ETHANOL METABOLISM IN THE HUMAN BODY VS. GASOLINE COMBUSTION IN A VEHICLE MOTOR

Michael Schorr ^a, Benjamín Valdez ^a, Ernesto Valdez ^b, Noah Lothan ^c, Amparo Oliveros ^d, Mónica Carillo ^a, Ricardo Salinas ^a, and Amir Eliezer ^e

^aLaboratorio de Materiales, Minerales y Corrosión, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, C.P. 21280, Mexicali, México. *mschorr2000@yahoo.com*

^bCentro de Investigación Médica "Ixchel", Mexicali, México.

^cDepartment of Biomedical Engineering, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

^dUniversidad Politécnica de Baja California, Mexicali, México.

^eCorrosion Research Center, Sami Shamoon College of Engineering, Beer Sheva, Israel.

ABSTRACT

Comparative studies facilitate interaction between students and teachers, to explain and understand the similarities and differences that exist in the fundamentals, processes and events of nature, based on oxidation-reduction reactions such as animal and plant respiration¹, combustion of fuels, corrosion of metals^{2,8}. The present article compares the metabolism of ethanol in the human body with the combustion of gasoline in a vehicle motor. It considers the natural, soft functional materials of the body and the man-made, hard structural materials of a motor as the respective reactor vessels. The characteristics of the reactant fluids involved: ethanol, a beverage and gasoline, a fuel and their chemical reactions are described. The damage to the human organs and tissues and to the motor mechanical components by these interactions between reacting fuel and reactor structures is evaluated. The preventive and curative protection methods are assessed. At the end, a section on the pedagogical aspects of comparative studies is provided, including teaching of Science Technology and Society (STS) to postgraduate students of engineering^{9,10}.

Keywords: *Materials, STS, human body, vehicle motor, ethanol, gasoline.*

1. INTRODUCTION

Comparative studies on STS arouse a deep motivation for teachers and students in the pursuit of knowledge. They promote cognitive, professional and spiritual development of people thereby strengthening their comprehensive training, allowing them to achieve future events

and approaches to solving their particular problems⁶. The application of scientific and technological knowledge in a humanistic framework, allow addressing the problems of society and economy. Figure 1 presents a graphic display of the relationship between STS for the benefit of mankind^{10,11}.

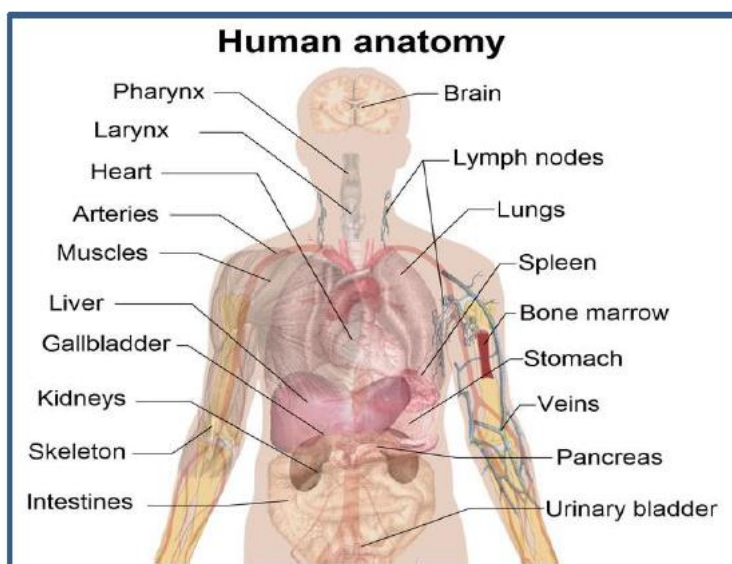


Figure 2. Human body anatomy.

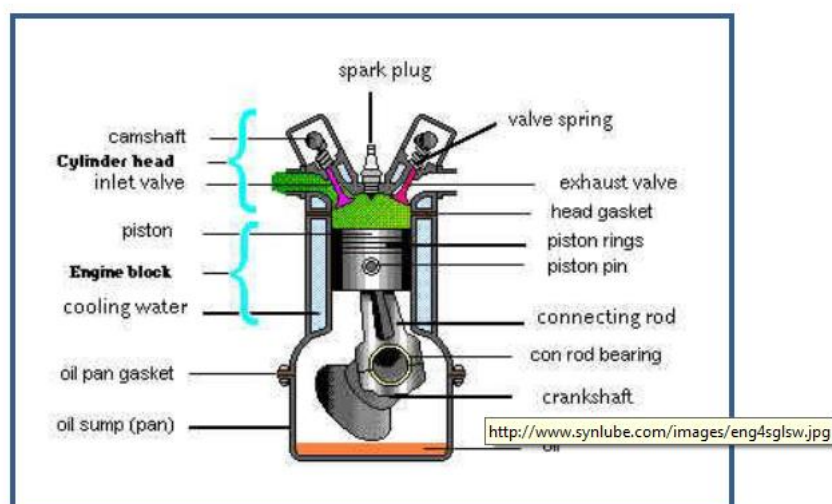


Figure 3. Internal combustion engine/ICE.

Comparative studies of educational systems in emerging countries are made to incorporate the positive experiences developed in other countries. International organizations, especially UNESCO, have contributed to the creation of global educational data banks that contribute to such studies³⁹. The purpose of these studies on science, technology and education is to promote knowledge and understanding of the similarities and disparities of their basic and applied features. They have a high impact on educational attainment, improving the quality and diversity of teaching.

A workshop was held, with the active participation of postgraduate students of engineering, belonging to the Institute of Engineering and the Faculty of Engineering both institutions pertaining to the University of Baja California. The central concept of STS, to motivate and develop their capacity for independent, critical thinking and for inculcating humanistic values, was emphasized. Comparative studies were assessed as a didactic tool for acquiring education, culture and knowledge^{12,13}.

One popular meticulous and influential comparison dealing with education is the program for International Students Assessment (PISA) which is published every three years by the organization for Economic Cooperation and Development (OECD). It rates 15 years old school pupils performance in dozens of countries⁴⁰.

Our studies have been published in various sources of information, that require knowledge of engineering, science and technology, as: Corrosion of metals and biological respiration; hard and soft structural and functional materials; tubular transport of water and blood; pollution and atmospheric corrosion in arid regions and in the marine environments; degradation of silver and copper in electronic components, were developed by researchers at the Institute of Engineering of the Autonomous University of Baja California (UABC) and Universidad Politécnica de Baja California (UPBC). The methodology includes appropriate research

methods in the field of materials science and engineering, biology and the environment, physicochemical and mechanical properties; behavior in different environments and industries, deterioration processes and practices of preventive and curative maintenance applied to ensure materials and structures long-term service. Talented and devoted students are rewarded according to their achievements.

In conversations and classroom discussions, students of science and technology expressed interest in comparative studies, because they are curious and like to expand their knowledge and understanding in different fields: from field of metallurgy into the biology of the human body. These studies have a high cognitive and educational value because they allow the teacher to explain the principles of chemistry, physics and thermodynamics, and students to understand and capture these fundamentals. In this way, students will learn advanced areas such as cell biology, molecular engineering, materials science, degradation and rehabilitation processes of the human body and maintenance and repair of industrial equipment.

The students' interest in this endeavor was demonstrated in the framework of a course entitled "Methodology of Publications" for postgraduate students of the "Program for M.Sc. and D.Sc. in Science and Engineering" organized and managed by the Institute of Engineering, University of Baja California, Mexicali, Mexico. The course aim is to teach the participants to write and publish suitable articles based on their advanced research theses.

The passion of teachers and students for teaching and learning, to achieve wisdom will make themselves better persons and the world a better place.

7. CLOSURE

This study describes and analyses two machines: the human body and the vehicle motor, made of different structural and functional materials, which generate energy by chemical oxidation of

two carbon-based fluids: ethanol and gasoline. The damage caused by diseases in the body and the deterioration of the motor are treated by preventive and curative methods: body rehabilitation and car repair, maintaining both machines in permanent, healthy operation.

REFERENCES

1. S. Mader *et al.*, *Biology*, McGraw-Hill Education, Boston, 2010.
2. R. Raichev, L. Veleva, B. Valdez, *Corrosión de metales y degradación de materiales*, Editor M. Schorr, Universidad Autonoma de Baja California, 2009, pp. 216-223(Spanish)
3. A. Moncmanova, Environmental Factors that Influence the Deterioration of Metals, in *Environmental Deterioration of Materials*, ed. A. Moncmanova, WIT Press, 2007.
4. E.D. Verink Jr., Economic appraisal of corrosion control measures. *J. Mater. Ed.* **3**, 239 (1981).
5. S.P. Trasatti, F. Mazza and G. Bianchi, Crevice corrosion of stainless steels in near neutral chloride containing medium: A phenomenological tree, *J. Mater. Ed.* **18**, 245 (1996).
6. A. Burewicz and N. Miranowicz, Kinetics of corrosion in Chemistry teaching, *J. Mater. Ed.* **20**, 7 (1998).
7. K. N. Strafford, Fireside corrosion of boilers, *J. Mater. Ed.* **8**, 823 (1986).
8. P.J. Guichelaar and M.W. Williams, A simple demonstration of corrosion cells, *J. Mater. Ed.* **12**, 331 (1990).
9. A. Oliveros, L. Vargas, B. Valdez, M. Schorr, J. Sevilla, E. Cabrera, R. Nedved, The importance of teaching science and technology in early education levels in emerging economy, *Bulletin of Science, Technology and Society*, Sage, 2014.
10. A. Oliveros, J. Sevilla, M. Schorr, A study on the attitudes and opinions of engineering students from the University of Baja California, Mexico, on Science, Technology, and Society. *Bulletin of Science, Technology and Society* **30**, 2 (2010), ISSN 0270-4676.
11. B. Valdez, M. Schorr, A. Oliveros, Estudios comparativos: aspectos científicos, tecnológicos y educacionales, Ciencia, *Tecnología e Innovación para el Desarrollo de México*, Año 5, No. 105, ISSN 2007-1310.
12. M. Schorr, N. Lotan, B. Valdez, A. Eliezer, M. Carrillo, Metals corrosion and biological respiration: similarities and disparities: an overview, *J. Mater. Ed.* **33**, 59 (2011).
13. M. Schorr, B. Valdez, E. Valdez, A. Eliezer, N. Lotan, M. Carrillo, Water pipelines and blood vessels: a comparison of hard and soft materials, *J. Mater. Ed.* **34**, 59 (2012).
14. D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Co., 2007, pp. 900-905.
15. D. Voet and J. G. Voet, *Biochemical*, Wiley, Hoboken, New York, 2012.
16. G. B. Forbes, *Human body composition: growth, aging, nutrition, and activity*, Springer-Verlag, New York, 2012.
17. A. C. Guyton, *Function of the Human Body*, W.B. Saunders, USA, 1974.
18. P. Luque, D. Álvarez and C. Vera, *Ingeniería del Automóvil: Sistemas y Comportamiento Dinámico*, Thomson, Madrid, Spain, 2008.
19. J.M. Alonso, *Técnicas del Automóvil: Equipo Eléctrico*, Thomson, Madrid, Spain, 2007.
20. W.W. Pulkrabek, *Engineering Fundamentals of the Internal Combustion Engine*, Prentice Hall, New Jersey, 2003
21. A. Allard, *Turbocharging and Supercharging*, Motorbooks International, 1986.
22. B. Valdez, M. Schorr, N. Lothan, A. Eliezer, Wineries: Equipment, Materials, and Corrosion, *Materials Performance* **54**, 8 (2015).
23. M. Schorr, B. Valdez, M. Carrillo, B. Arellano, A. Martinez, Chemistry, Materials, Equipment in Wineries: An Overview on the Guadalupe Valley, Congress "The Ocean, the Wine and the Valley", Ensenada, November 2009.

24. H. Riedel *et al.*, 'Wine as food and medicine', in *Scientific, Health and Social Aspects in the Food Industry*, Edited by B. Valdez, M. Schorr and R. Zlatev, INTECH, 2012, pp. 399-418
25. C. Capello, U. Ficher, and K. Hungerbühler, What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry* **9**, 9 (2007).
26. J. A. Quintero, M. I. Montoya, O. J. Sánchez, O. H. Giraldo, and C. A. Cardona, Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, **33**, 3 (2008).
27. R. B. Fell, H. F. Hostetler, Laboratory Octane Ratings What do they Mean?, (No. 570099). SAE Technical Paper. doi:10.4271/570099 pp. 1-16. (1957).
28. U.S. Environmental Protection Agency, <http://www2.epa.gov/gasoline-standards>
29. European Commission-Environment, <http://ec.europa.eu/environment/air/transport/fuel.htm>
30. R. Hummel, *Alternative futures for corrosion and degradation research*, Potomac Institute Press, 2014.
31. C. M. Langton, 'Osteoporosis: case of skeletal biocorrosion, *Corr. Eng. Sci. and Technology*, **42**, 339 (2007).
32. H. A. Krebs, The Effects of Ethanol on the Metabolic Activities of the Liver. *Advances in enzyme regulation* **6**, 1 (1968).
33. A. Silverstein, V. Silverstein, *Alcoholism*, Harper-Collins Publishers, New York, 1975.
34. B. Valdez, M. Schorr, R. Zlatev, M. Carrillo, M. Stoytcheva, L. Alvarez, A. Eliezer, and N. Rosas, Corrosion in industry, in "Environmental and industrial corrosion", Editors B. Valdez, M. Schorr, INTECH, 2012, pp. 39-43.
35. P.R. Roberge, *Corrosion Engineering, Principles and Practice*, McGraw Hill, New York, 2008.
36. C. Greenwood *et al.*, Corrosion Office Issues Report on the Impact of Corrosion on Military Facilities, Summer 2013, Vol. 9, No. 2, www.corrdefense.nace.org
37. G. M. Hunt, N. H. Azrin, A Community-Reinforcement approach to Alcoholism, *Behaviour Research and Therapy*, **11**, 1 (1973).
38. J. R. Santander, *Técnico en Mecánica y Electrónica Automotriz*. Diseli, Colombia, 2003.
39. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, <http://www.uis.unesco.org/Pages/default.aspx>
40. ANONYMOUS, Ranking the rankings, The Economist, November 8th, 2014, p. 62-63



5287632.v3 (Research Article)

Title	 Synthesis, characterization, in situ antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid capped copper nanoparticles
Journal	Journal of Nanomaterials
Issue	Regular
Additional Files	 Reply to review reports
Manuscript Number	5287632 (Research Article)
Resubmitted On	2018-10-12
Author(s)	  Ernesto Beltrán-Partida ,   Benjamin Valdez-Salas,   Ernesto Valdez-Salas,   Guillermo Pérez-Cortéz,   Nicola Nedev
Editor	 Simo-Pekka Hannula
Status	In Press

Manuscript History

- ▶ [View Version 2](#)
- ▶ [View Version 1](#)

Synthesis, characterization, *in situ* antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid capped copper nanoparticles

Ernesto Beltrán-Partida¹, Benjamín Valdez-Salas^{1*}, Ernesto Valdez-Salas¹, Guillermo Pérez-Cortéz², Nicola Nedev¹

¹ Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California.

² Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California.

* Corresponding author: Tel. +52-686-566-41-50; Fax: +52-686-566-41-50 E-mail: benva1@uabc.edu.mx

Abstract

The design route, synthesis and characterization of spherical copper nanoparticles with antifungal potential is reported in the present work. Copper nanoparticles were synthesized by a novel, inexpensive and eco-friendly chemical reduction method using ascorbic acid as a reductant and stabilizer under reflux conditions. The characterization results showed the formation of homogeneous, dispersed and stable spherical ascorbic acid capped copper nanoparticles (CuNPs) with a diameter of 250 nm. The CuNPs exhibited sustained antifungal activity against *Candida albicans* (C. albicans) after 24 h and even 48 h of incubation. Using enhanced dark-field microscopy we presented the *in situ* interaction between CuNPs and C. albicans. Here, is discussed part of the interaction of CuNPs among the C. albicans, studied without the use of any chemical and/or physical fixing method. The results indicates that part

Materials and methods

Synthesis of CuNPs

The synthesis of CuNPs was performed by a novel, ecofriendly, cost-effective, simple and reproducible chemical reduction method without the need of inert atmospheric conditions. As Cu precursor, an aqueous solution of copper carbonate (CuCO_3 0.134 M, Sigma-Aldrich, USA) was heated at 80°C under atmospheric conditions with slow stirring and a solution of ascorbic acid (0.037 M, Sigma-Aldrich, USA) was subsequently added as a reducing and capping agent under moderate stirring (generating a dark brown solution). Then, the reaction mixture was heated to 95°C in order to start a reflux, which was left for only 30 min under vigorous stirring, resulting in a red intensive color solution (which suggested a promoted reduction of Cu ions). The reaction solution was then slowly cooled to room temperature (RT) under moderate stirring for 1h. Afterward, the reacted solution was allowed to precipitate overnight. The supernatant was carefully removed, and the CuNPs precipitated were washed in absolute ethanol and dried overnight in a desiccator.

Physicochemical characterization of CuNPs

In order to evaluate the structural morphology, homogeneity, size and degree of dispersion of the synthesized CuNPs, 10 μL of CuNPs suspended in absolute ethanol were sampled on a double-sided adhesive carbon conductive tape, allowed to dry at RT and characterized by means of Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM; Tescan LYRA 3, Brno Czech Republic), at 10 kV accelerating voltage using a secondary electron detector. For the chemical composition analysis, energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX, Tescan)

Figure 54

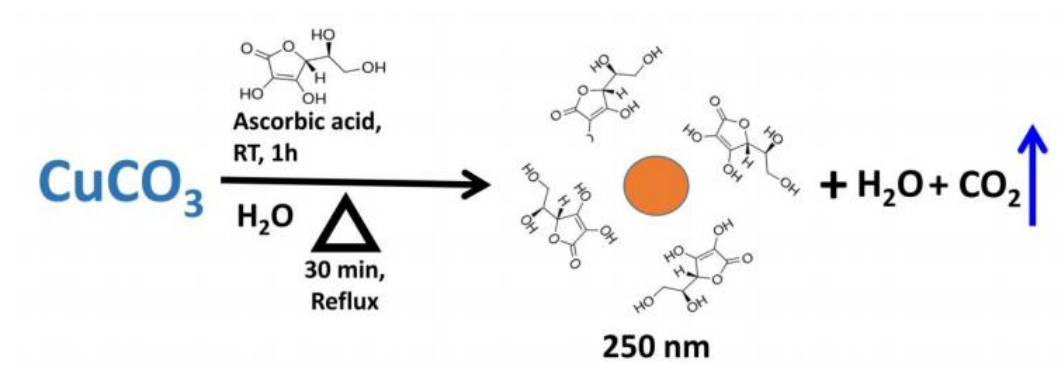


Figure 87

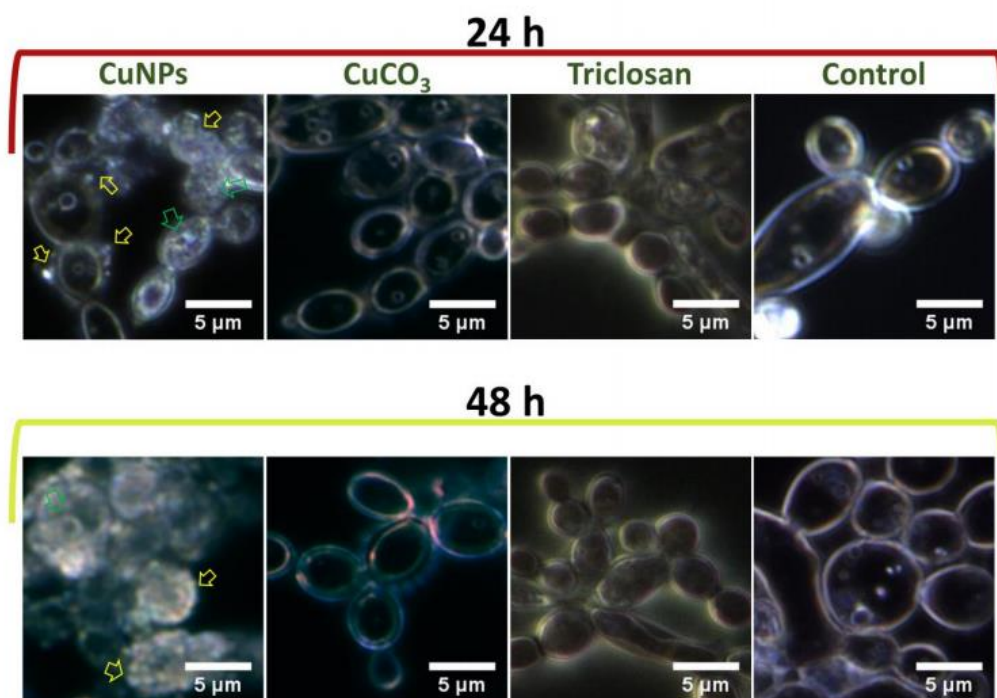
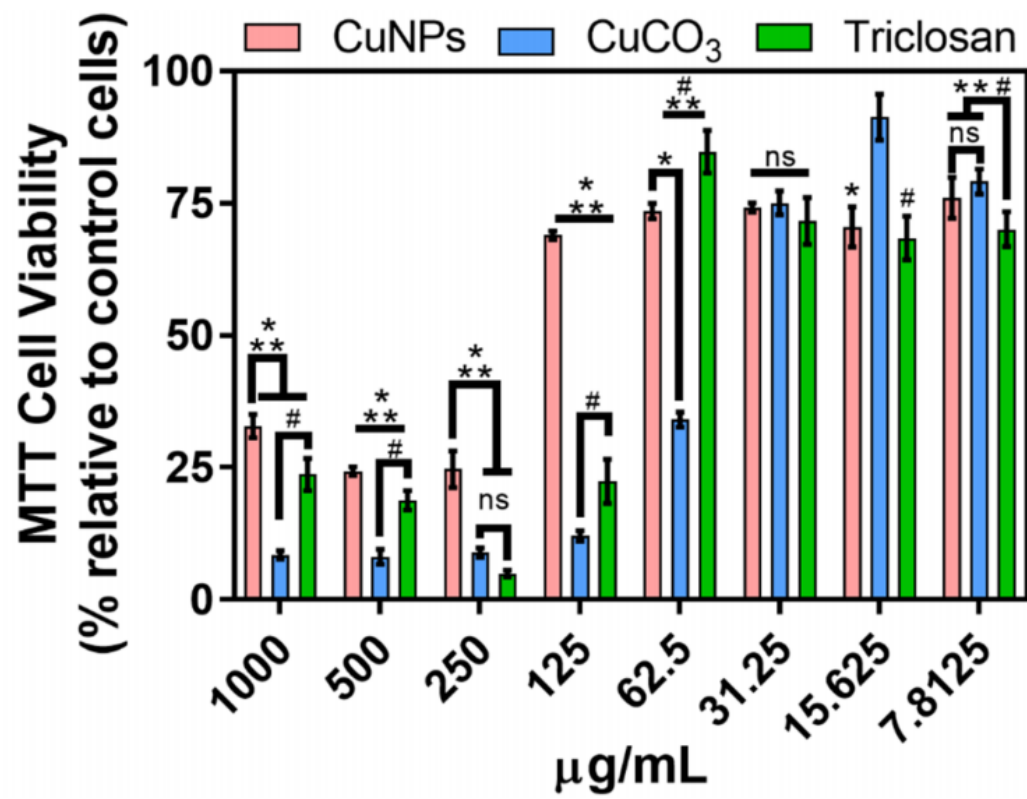


Figure 109



References

1. N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu, "Antibiotic resistance of bacterial biofilms," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 35, no. 4, pp. 322-332, 2010.
2. H. Koo, R. N. Allan, R. P. Howlin, P. Stoodley and L. Hall-Stoodley, "Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 15, pp. 740, 2017.
3. A. K. Thabit, J. L. Crandon and D. P. Nicolau, "Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials," *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, vol. 16, no. 2, pp. 159-177, 2015.
4. A. K. Guitor and G. D. Wright, "Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections," *Chest*, 2018.
5. M. Selvaraj, P. Pandurangan, N. Ramasami, S. B. Rajendran, S. N. Sangilimuthu and P. Perumal, "Highly Potential Antifungal Activity of Quantum-Sized Silver Nanoparticles Against *Candida albicans*," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 173, no. 1, pp. 55-66, 2014.
6. M. B. Lohse, M. Gulati, A. D. Johnson and C. J. Nobile, "Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, pp. 19, 2017.
7. S. Rasch, U. Mayr, V. Phillip, R. M. Schmid, W. Huber, H. Algül and T. Lahmer, "Increased risk of candidemia in patients with necrotising pancreatitis infected with *Candida* species," *Pancreatology*, 2018.
8. M. Kollef, S. Micek, N. Hampton, J. A. Doherty and A. Kumar, "Septic Shock Attributed to *Candida* Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 12, pp. 1739-1746, 2012.
9. J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar and A. A. Rahuman, "Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles," *Materials Letters*, vol. 71, pp. 114-116, 2012.
10. A. Khan, A. Rashid, R. Younas and R. Chong, "A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles," *International Nano Letters*, vol. 6, no. 1, pp. 21-26, 2016.
11. J. Yu, J. Nan and H. Zeng, "Size control of nanoparticles by multiple-pulse laser ablation," *Applied Surface Science*, vol. 402, pp. 330-335, 2017.
12. T.-Y. Lin, Y.-L. Chen, C.-F. Chang, G.-M. Huang, C.-W. Huang, C.-Y. Hsieh, Y.-C. Lo, K.-C. Lu, W.-W. Wu and L.-J. Chen, "In Situ Investigation of Defect-Free Copper Nanowire Growth," *Nano Letters*, vol. 18, no. 2, pp. 778-784, 2018.
13. P. Gurav, S. S. Naik, K. Ansari, S. Srinath, K. A. Kishore, Y. P. Setty and S. Sonawane, "Stable colloidal copper nanoparticles for a nanofluid: Production and application," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 441, pp. 589-597, 2014.
14. N. A. Dhas, C. P. Raj and A. Gedanken, "Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles," *Chemistry of Materials*, vol. 10, no. 5, pp. 1446-1452, 1998.
15. M. Ben-Sasson, K. R. Zodrow, Q. Genggeng, Y. Kang, E. P. Giannelis and M. Elimelech, "Surface Functionalization of Thin-Film Composite Membranes with Copper Nanoparticles for Antimicrobial Surface Properties," *Environmental Science & Technology*, vol. 48, no. 1, pp. 384-393, 2014.
16. M. Raffi, S. Mehrwan, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar and M. M. ul Hasan, "Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*," *Annals of Microbiology*, vol. 60, no. 1, pp. 75-80, 2010.