

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**Escuela de Ciencias  
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas**



**Nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina: evaluación de actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama**

**Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta:**

**Antonio Minutti López Sierra  
Lic. Nanotecnología e Ingeniería Molecular  
ID: 149652**

**Directores:**

**Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas (UDLAP)  
Dra. Maricruz Anaya Ruiz (CIBIOR)**

**Santa Catarina Mártir, Puebla**

**Primavera 2018**

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**Escuela de Ciencias  
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas**



**Nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina: evaluación de actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama**

**Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta:**

**Antonio Minutti López Sierra  
Lic. Nanotecnología e Ingeniería Molecular  
ID: 149652**

**Jurado del examen profesional:**

**Dr. José Luis Sánchez Salas  
PRESIDENTE**

**Dra. Maricruz Anaya Ruiz  
SECRETARIO**

**Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas  
VOCAL**

**Santa Catarina Mártir, Puebla,**

**12 de Mayo del 2018**

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**Escuela de Ciencias  
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas**

Tesis presentada por Antonio Minutti López Sierra

como requisito para completar el Programa de Honores y obtener el título de Lic. en Nanotecnología e Ingeniería Molecular

Aceptada por el Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

**Presidente del Jurado y Asesor de Tesis**

**Secretario del Jurado y Co-director de Tesis**

---

Dr. José Luis Sánchez Salas

---

Dra. Maricruz Anaya Ruiz

**Vocal del Jurado y Director de Tesis**

**Jefe del Departamento**

---

Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas

---

Dr. Eugenio Sánchez Arreola

**Decano**

---

Dr. José Daniel Lozada Ramírez

## Dedicatorias

A mis padres, Antonio y Patricia por amarme tanto y apoyarme siempre. Por alentarme a seguir mis sueños y sacarme siempre una sonrisa. Gracias por su amor incondicional y por hacerme la persona que soy hoy en día. Gracias mamá por enseñarme qué es lo que de verdad importa en esta vida, por tu comprensión, por ser más que una mamá, por ser una amiga y por siempre consentirme tanto. Gracias papá por enseñarme que la vida, aún con todas sus dificultades, es hermosa y hay que vivirla, que todo se acomoda y que al final de cuentas siempre todo sale bien. Gracias papá por ser un gran amigo con el que puedo platicar de todo. Gracias por hacer esto posible, no hay palabras para agradecerles todo lo que hacen por mí, estoy muy orgulloso de ser su hijo.

A mi hermana Patricia, por siempre hacer una locura y hacernos reír, por siempre ser tan espontánea y cariñosa. Por darme tus consejos, por preocuparte por mí, por dejarme compartir tus alegrías y éxitos junto a ti. Gracias güera por ser una increíble hermana, la relación que llevamos no la cambiaría por nada, no pude haber tenido mejor hermana que tú.

A mi encantadora Pili, a quien amo con todo mí ser. Gracias mi vida por ser mi compañera de aventuras y hacerme reír, por apoyarme en momentos difíciles, por ser tan linda conmigo, por ser mi respaldo, por ser paciente conmigo. Por ser esa fabulosa persona que eres, por recordarme lo bonito que es la vida y por hacerme soñar grandes cosas junto a ti. Por seguirme mis locuras y morirnos de risa por cualquier tontería. En verdad no tengo palabras para expresar lo que siento por ti. ¡Te amo!

A mi cuñado Leopoldo, por estar ahí cuando lo he necesitado, por su gran amistad y por enseñarme a vivir la vida al máximo. Por su gran cariño y por dejarme ser más que un cuñado para él.

A Paty y Polo por darme el mejor regalo de graduación, con la noticia de que voy hacer tío. Por el nuevo integrante de la familia que nos llena de ilusión.

A mi tío Memo quién siempre será un ejemplo a seguir para muchos, en especial para mí, por enseñarme que, si quieres algo en la vida nadie, ni nada podrá impedírtelo. Por demostrarme que ante las adversidades siempre le puedes sonreír a la vida.

A todos los que están y los que no y que de alguna forma han marcado mi vida.

***MILITIA EST VITA***

Con todo mi amor,

Antonio Minutti López Sierra

## Agradecimientos

Le agradezco a mi escuela, la Universidad de las Américas Puebla por darme la oportunidad de realizar este proyecto, así como al Centro de Investigación Biomédica de Oriente por su apoyo y colaboración.

Al Dr. Miguel Méndez y a la Dra. Maricruz Anaya por sus enormes enseñanzas y su paciencia, por dejarme trabajar con ellos y por su gran amistad.

A Aurora por ayudarme en los ensayos de cultivos celulares y MTT, y por ser una gran amiga.

A mis compañeros del laboratorio por ayudarme y darme muy buenos momentos durante el trabajo.

A todos mis profesores de la UDLAP que formaron una parte importante de mi educación, pero sobre todo que formaron parte especial de mi vida, espero que nos volvamos a encontrar.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	3
1. ANTECEDENTES	5
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Nanotecnología	7
2.2. Nanopartículas magnéticas	9
2.3. Curcumina	10
2.4. Cáncer de mama	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos específicos	16
3.3. Justificación	16
3.4. Hipótesis	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Síntesis de nanopartículas	18
4.1.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita	18
4.1.2. Funcionalización superficial con curcumina	21
4.2. Caracterización	22
4.2.1. FTIR	22
4.2.2. TGA	22
4.2.3. DLS	23
4.2.4 SEM/STEM	23
4.3. Métodos de cultivos celulares	24
4.3.1. Línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)	24
4.3.2. Ensayo MTT	24
5. RESULTADOS	27
5.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita	27
5.1.1. FTIR	27
5.1.2. TGA	28
5.1.3. DLS	28
5.2. Funcionalización superficial con curcumina	29
5.2.1. FTIR	30

5.2.2. TGA-----	32
5.2.3. DLS-----	34
5.3. SEM -----	35
5.4. STEM-----	37
5.5. Ensayo MTT -----	37
5.6. Efecto de las nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @curcumina sobre la línea celular de cáncer de mama triple negativa MDA-MB-231-----	38
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	44
7. CONCLUSIONES-----	49
8. PERSPECTIVAS -----	50
9. REFERENCIAS-----	51
9. ANEXOS-----	53
9.1. Funcionalización superficial con curcumina por método mecánico -----	53
9.2. Funcionalización superficial con sal de curcumina -----	54
9.3. Ensayo MTT -----	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Escala de nanomateriales (Nanotecnología , 2013) .....	7
Figura 2: Resumen del número de trabajos sobre el tema de la nanotecnología en función del año y del tipo-1990 a 2010 (Linton, 2012) .....	8
Figura 3: Raíz de la Cúrcuma (Prokop, 2007).....	11
Figura 4: Estructura de la curcumina (González-Albadalejo, 2015).....	11
Figura 5: Mamograma demostrando un seno normal (izquierdo) y uno con cáncer de mama (derecho señalado con flechas) (Bakerstmd, 2015).....	13
Figura 6: Soluciones de $\text{FeCl}_3$ 0.2 M y $\text{FeCl}_2$ 0.1 M.....	19
Figura 7: Decantación del excedente por método de precipitación magnética utilizando un imán de neodimio.....	20
Figura 8: Magnetita seca .....	21
Figura 9: Sistema para síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina .....	21
Figura 10: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina recuperado por método de precipitación magnética .....	22
Figura 11: Muestras para análisis en el DLS, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (izquierda) y $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (derecha)....	23
Figura 12: Fundamento del ensayo MTT (Portillo Aguilera, 2014) .....	25
Figura 13: 1.902 g de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ obtenida .....	27
Figura 14: Espectro infrarrojo de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	27
Figura 15: TGA de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	28
Figura 16: DLS de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	29
Figura 17: Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina .....	30
Figura 18: Espectro infrarrojo de curcumina .....	31
Figura 19: Espectro infrarrojo de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina .....	32
Figura 20: TGA de curcumina .....	32
Figura 21: TGA de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina .....	34
Figura 22: DLS de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina .....	35
Figura 23: Análisis de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ por SEM. A, nanopartículas vistas a 70.6 Kx; B, nanopartículas vistas a 29.2 Kx.....	35
Figura 24: Análisis de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina por SEM a diferentes aumentos en diferentes campos. A, Observación a 5.73 Kx; B, Observación a 27.3 Kx; C, Observación a 27.3 Kx; D, Observación a 27.3 Kx .....	36
Figura 25: Imágenes STEM de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (izquierda) a 102 Kx y de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (derecha) a 178 Kx. ....	37
Figura 26: Efecto de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 24 horas de exposición; A (Control), B (2.5 $\mu\text{g/ml}$ ), C (5 $\mu\text{g/ml}$ ), D (10 $\mu\text{g/ml}$ ), E (20 $\mu\text{g/ml}$ ), F (40 $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X.....	38
Figura 27: Imágenes obtenidas después de 24 horas; A (Control), B (Magnetita 40 $\mu\text{g/ml}$ ), C (Curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ), D (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina 40 $\mu\text{g/ml}$ ), E (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X .....	39
Figura 28: Efecto de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 48 horas de exposición; A (Control), B (2.5 $\mu\text{g/ml}$ ), C (5 $\mu\text{g/ml}$ ), D (10 $\mu\text{g/ml}$ ), E (20 $\mu\text{g/ml}$ ), F (40 $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X.....	40

Figura 29 : Imágenes obtenidas después de 48 horas; A (Control), B (Magnetita 40 $\mu\text{g/ml}$ ), C (Curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ), D (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina 40 $\mu\text{g/ml}$ ), E (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X .....	41
Figura 30: Efecto de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 72 horas de exposición; A (Control), B (2.5 $\mu\text{g/ml}$ ), C (5 $\mu\text{g/ml}$ ), D (10 $\mu\text{g/ml}$ ), E (20 $\mu\text{g/ml}$ ), F (40 $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X.....	42
Figura 31: Imágenes obtenidas después de 72 horas; A (Control), B (Magnetita 40 $\mu\text{g/ml}$ ), C (Curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ), D (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina 40 $\mu\text{g/ml}$ ), E (nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina 80 $\mu\text{g/ml}$ ). 20X.....	43
Figura 32: TGA de la funcionalización superficial con curcumina por método mecánico.....	53
Figura 33: Espectro infrarrojo de la funcionalización superficial con curcumina por método mecánico .....	54
Figura 34: TGA de la funcionalización superficial con sal de curcumina .....	55
Figura 35: Espectro infrarrojo de la funcionalización superficial con sal de curcumina .....	56
Figura 36: Gráfica de viabilidad celular durante 24, 48 y 72 horas, a diferentes concentraciones de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80 $\mu\text{g/ml}$ ).....	57

## **1. ANTECEDENTES**

El hombre desde sus inicios ha utilizado la medicina para combatir padecimientos y enfermedades, o para mejorar la calidad de vida. Grandes civilizaciones son ejemplo del uso de la medicina desde hace muchos años, como Mesopotamia, China, el Antiguo Egipto e India (Laín Entralgo, 1978).

En la actualidad la medicina es un campo multidisciplinario que utiliza la ayuda de varias áreas de la ciencia y la tecnología para crear nuevas formas de terapias; es así que la Nanotecnología es un punto clave para seguir estudiando y desarrollando nuevas terapias y tratamientos para diversos padecimientos. El área de la Nanotecnología enfocada a la medicina se le conoce como Nanomedicina.

La nanomedicina es una ciencia que se destaca por el uso de materiales a nivel nanométrico, los cuales pueden utilizarse como herramientas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Hoy en día diversas enfermedades son tratadas con métodos muy invasivos, radiaciones o quimioterapias, dichos tratamientos en algunos casos son eficientes, pero en la mayoría de las veces los resultados no son suficientes, además de dejar ciertas secuelas.

El incremento de artículos publicados en el área de nanomedicina en los últimos años ha sido representativo. A manera de solución la nanomedicina ha creado materiales innovadores los cuales han presentado resultados favorables que podrían en un futuro cercano convertirse en aplicaciones reales para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades. La

mayoría de las veces estos materiales no son invasivos, son específicos y actúan de manera eficaz.

Por lo consiguiente, se han estudiado las propiedades de las nanopartículas como agentes acarreadores de fármacos u otros compuestos que ayudan a curar enfermedades, utilizando diversas vías de administración.

En el 2011 se sintetizaron nanopartículas de magnetita con curcumina y ácido dodecanoico adsorbidos en su exterior, las cuales probaron inhibir la proliferación de las células de melanoma humano SK-MEL-37. Además, esta formulación de nanopartículas de magnetita/curcumina demostró ser eficaz para mejorar la solubilidad de la curcumina en medio acuoso facilitando su disponibilidad (de Souza, 2011).

Estos resultados hacen que la investigación sobre nuevos sistemas para la preparación de nanopartículas de magnetita/curcumina sea de interés y con gran potencial para ser utilizados como agentes contra distintos tipos de cáncer, mejorando su selectividad y eficacia.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que estudia la manipulación de la materia a escala nanométrica, entre 1 y 100 nanómetros (Figura 1). Un nanomaterial puede presentar propiedades únicas o novedosas debido a sus dimensiones en la nanoescala (Méndez Rojas , 2010). Los nanomateriales son interesantes debido a los cambios en las propiedades respecto a los materiales macroscópicos (*bulk*), en parte debido al efecto de incremento de la relación área/volumen (Casero, 2014). Esto puede generar mayor reactividad e interacciones, con un menor uso de material; por otro lado, el nuevo comportamiento no es necesariamente predecible a partir de lo que conocemos del comportamiento del material en *bulk*.

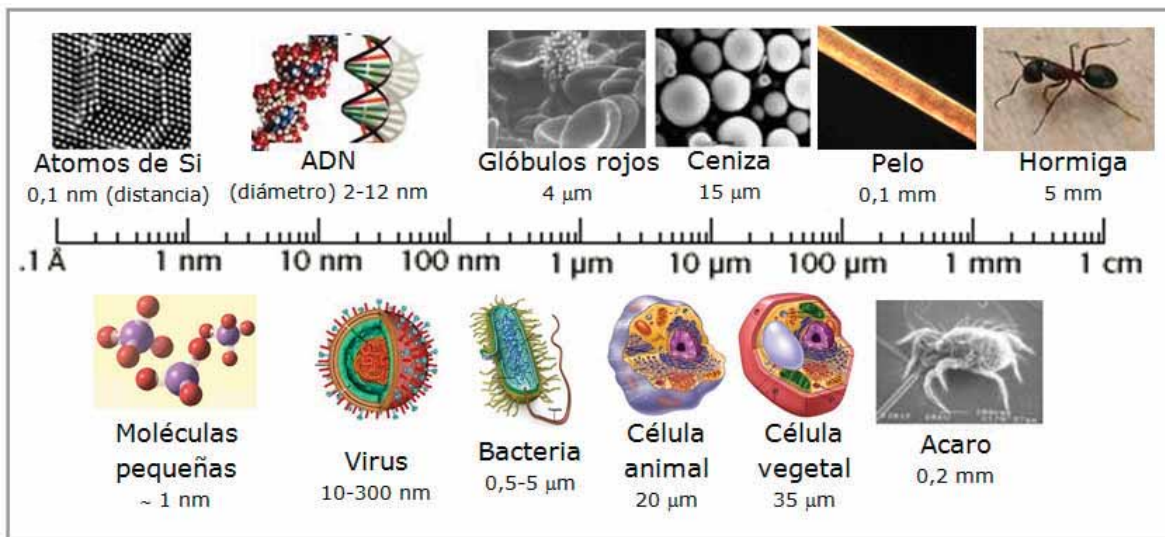


Figura 1: Escala de nanomateriales (Nanotecnología , 2013)

Aunque la palabra nanotecnología es relativamente nueva, la existencia de dispositivos y estructuras funcionales de dimensiones nanométricas no lo es; tales estructuras han existido en la Tierra, incluso antes del origen mismo de la vida. Un molusco denominado

*oreja de mar* construye conchas muy fuertes, cuyas superficies interiores son iridiscentes, mediante la organización del carbonato de calcio en forma de unidades nanoestructuradas unidas entre sí por un pegamento hecho de una mezcla de carbohidratos y proteínas (Poole, 2007).

En los últimos años la nanotecnología ha tenido un gran impacto en el mundo, varios países han apostado a favor de la nanotecnología y han invertido grandes sumas de dinero a esta área de la ciencia. Se ha visto un gran incremento en la investigación de la nanotecnología en los últimos años, como se puede ver en la figura 2 (Linton, 2012).

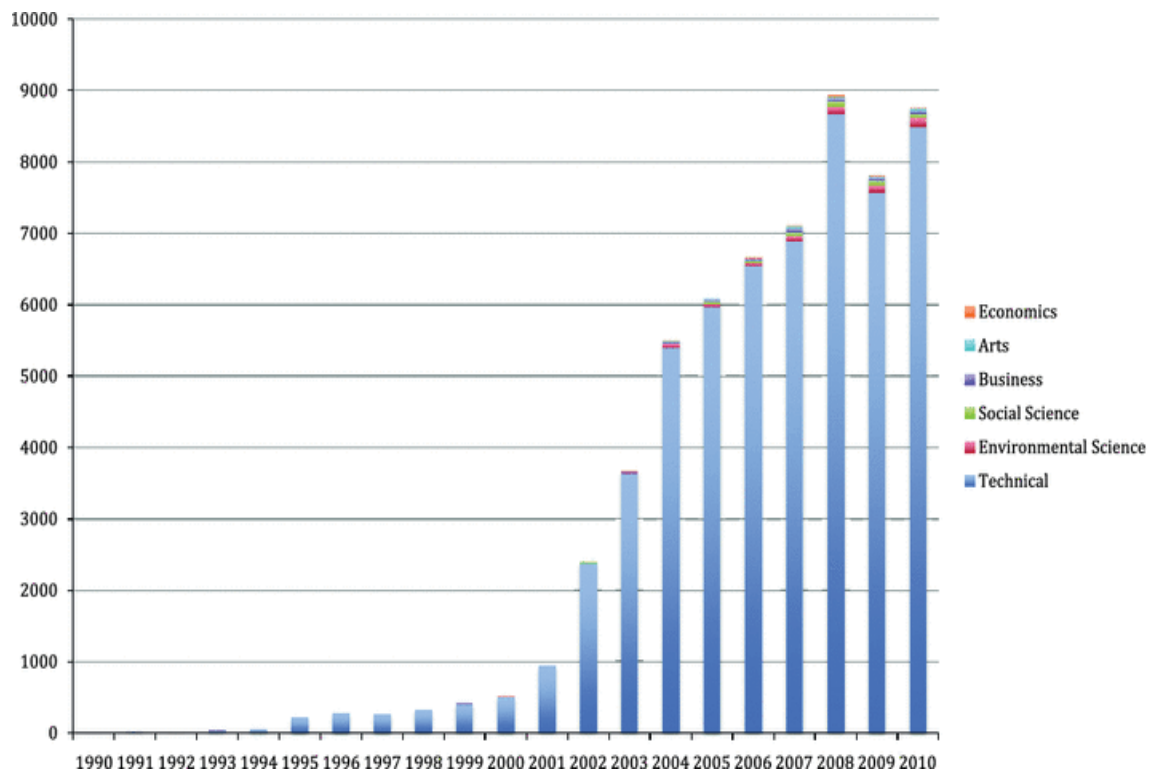


Figura 2: Resumen del número de trabajos sobre el tema de la nanotecnología en función del año y del tipo-1990 a 2010 (Linton, 2012)

Los Estados Unidos, Japón y la Unión Europea realizan aproximadamente la misma inversión gubernamental en investigación y desarrollo de la nanotecnología al destinar alrededor de 1,000 millones de dólares cada uno, seguidos por China, Corea y Taiwán. Para finales de 2006, se tienen registrados 17 países que cuentan con iniciativas y/o programas de desarrollo gubernamentales relacionados con la nanotecnología, de los cuales, ocho pertenecen a la Unión Europea, seis a la Región Asia-Pacífico, dos a América del Norte y una en América Latina. Sin embargo, se tiene conocimiento de que al menos 60 países han iniciado actividades en este campo (CIMAV, 2008).

## **2.2. Nanopartículas magnéticas**

La *nanomedicina* es el resultado del uso de nanomateriales en el área de la medicina, aprovechando sus propiedades adquiridas por su tamaño y su habilidad de traspasar barreras biológicas, así como su gran selectividad de acuerdo a sus características fisicoquímicas. La utilización de nanopartículas magnéticas dentro del campo de la biomedicina viene realizándose desde la década de los 90 del siglo XX y una de las grandes ventajas de usarlas es el hecho de que el hierro es fácilmente metabolizado dentro del cuerpo (García Jimeno, 2013).

Las nanopartículas magnéticas, como las de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), son de sumo interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones como: transporte de fármacos terapéuticos o de radioisótopos, como separadores magnéticos de células marcadas, para el catabolismo de tumores vía hipertermia y como agentes de contraste en aplicaciones de resonancia magnética (Grande, 2007).

Asimismo, estas nanopartículas también pueden mejorar la solubilidad de fármacos en agua, modificar la farmacocinética, aumentar la vida media del fármaco al reducir la inmunogenicidad, mejorar la biodisponibilidad y disminuir el metabolismo del fármaco. Del mismo modo, al reducir la dosis de los medicamentos, también es posible reducir los efectos secundarios y mejorar la calidad de vida del paciente (Dianzani, 2014).

Las nanopartículas de magnetita son consideradas como una buena opción para ser acarreadoras de fármacos ya que también se ha demostrado que las células eficazmente las internalizan por medio de endocitosis (de Souza, 2011).

### **2.3. Curcumina**

El interés por la curcumina como componente para el tratamiento de diferentes enfermedades, no deja de crecer como lo atestiguan las numerosas revisiones bibliográficas. Una búsqueda en *Google* arroja 1, 240,000 resultados (aunque muchos son de productos comerciales y de medicina natural); otra búsqueda en la base de datos *ScienceDirect* resultó en 11,750 artículos de investigación (para *curcuminoids* aparecen 1,422 citas) (González-Albadalejo, 2015).





Figura 3: Raíz de la Cúrcuma (Prokop, 2007)

La curcumina pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos los cuales son el principal componente de la Cúrcuma. La curcumina es extraída de la raíz de la planta Cúrcuma (*Curcuma longa*) la cual es nativa del sur y sureste de Asia tropical (Figura 3). Inicialmente la curcumina fue descubierta en 1870 y su estructura química fue caracterizada en 1910 (Figura 4) (Mollaei, 2017).

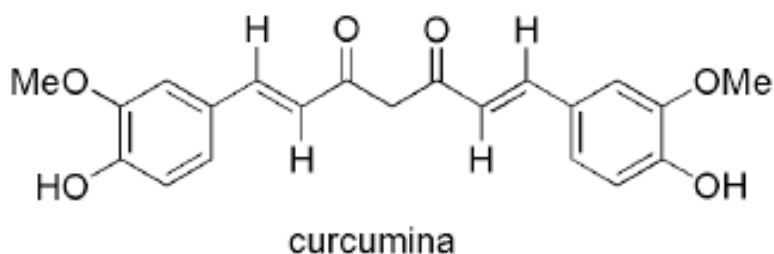


Figura 4: Estructura de la curcumina (González-Albadalejo, 2015)

La curcumina tiene una masa molar de 368,4 g/mol y está acompañado por pequeñas cantidades de otros compuestos, todos insolubles en agua. Se utiliza en condimentos, para teñir telas de amarillo-naranja y es el principal ingrediente del reconocido curry en polvo

(Alzate Ceballos, 2012). En la India se utiliza incluso como parte de ritos religiosos y en la medicina tradicional hindú se usa como ayuda digestiva, fiebres, infecciones, disentería, artritis y problemas hepáticos. Asimismo los griegos la utilizaban por sus beneficios para la salud (González-Albadalejo, 2015).

La curcumina es el principal compuesto de la Cúrcuma responsable de sus propiedades medicinales y farmacológicas. Ésta presenta un importante potencial terapéutico, debido a su unión a una gran diversidad de moléculas diana, sobre las que puede actuar y/o en padecimientos como: Alzheimer, Parkinson, epilepsia, traumatismo craneoencefálico, fibrosis pulmonar, cálculo biliar, SIDA, nefrotoxicidad, colitis, isquemia renal, cataratas, enfermedades metabólicas, esclerosis múltiple, psoriasis, esclerodermia, diabetes, asma, artritis, bronquitis, alergia, enfermedad intestinal inflamatoria, cáncer, cicatrización, cardiotoxicidad y enfermedades cardiovasculares (González-Albadalejo, 2015).

El principal mecanismo de acción de la curcumina sobre las células cancerígenas, es inducir la apoptosis de dichas células, se cree que esto lo puede lograr de tres formas diferentes: vías dependientes de ciclina, vías independientes del factor de transcripción p53 y vías dependientes del factor de transcripción p53; el factor p53 en manera resumida regula la apoptosis (Choudhuri T, 2005). La curcumina genera la inhibición irreversible de la enzima tioredoxina reductasa, debido a la unión covalente en el sitio catalíticamente activo de la enzima, llevando a cabo la apoptosis de las células cancerígenas (Fang J, 2005).

Otra característica importante que ha presentado la curcumina es que tiene la habilidad de unirse a ciertos iones metálicos divalentes como Fe, Cu, Mn y Zn formando complejos con alto potencial farmacológico (González-Albadalejo, 2015).

#### 2.4. Cáncer de mama

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8.8 millones de defunciones, y en específico 571,000 al cáncer de seno (OMS, Cáncer, 2017).

El cáncer de seno (o cáncer de mama) se origina cuando las células en el seno comienzan a crecer en forma descontrolada. Estas células normalmente forman un tumor que a menudo se puede observar en una radiografía o se puede palpar como una protuberancia (masa o bulto) como se observa en la figura 5. El tumor es maligno (cáncer) si las células pueden crecer penetrando (invadiendo) los tejidos circundantes o propagándose (metástasis) a áreas distantes del cuerpo. El cáncer de seno ocurre casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres también lo pueden padecer (Society, 2017).



Figura 5: Mamograma demostrando un seno normal (izquierdo) y uno con cáncer de mama (derecho señalado con flechas) (Bakerstmd, 2015)

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que en 2004 murieron 519,000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en vías de desarrollo (OMS, Cáncer de mama: prevención y control, 2008).

Aproximadamente 75-80% de los cánceres son invasivos o infiltrantes, esta característica, les da a las células la capacidad de penetrar alrededor de los canales linfáticos y vasculares ocasionando metástasis. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasor que representa el 70 al 80%, el segundo más común es el lobulillar invasor (5-10%), el cual es difícil de diagnosticar por su diseminación difusa en vez de formar una masa, su tasa de multifocalidad y bilateralidad es alta (Castellanos, 2009).

En México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres de entre 30 y 54 años y desde 2006 constituye la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, por encima del cáncer cervicouterino. En los últimos años, el número de muertes por cáncer de mama ha mostrado un crecimiento anual de 3.5%, y 30% del total de los casos se concentra en cinco estados del norte del país (López-Carrillo, 2014).

De manera general el cáncer de mama se puede clasificar de la siguiente manera, de acuerdo a su etapa de desarrollo:

- 1) **Etapa I:** Estos cánceres de mama aún son relativamente pequeños y no se han propagado a los ganglios linfáticos o existe solo un área diminuta de propagación

del cáncer en el ganglio linfático centinela (el primer ganglio linfático a donde probablemente se propagó el cáncer).

- 2) **Etapa II:** Estos cánceres de mama son más grandes que los cánceres en etapas I y/o se han propagado a unos pocos ganglios linfáticos adyacentes.
- 3) **Etapa III:** El tumor es más grande o invade los tejidos cercanos (la piel sobre el seno o el músculo que está debajo), o se ha propagado a muchos ganglios linfáticos adyacentes.
- 4) **Etapa IV:** Se ha propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos adyacentes hasta alcanzar otras partes del cuerpo (Rodríguez, 1998).

La detección tardía es común. Según el Sistema de Información de Cáncer de la Mujer (Sicam), en el periodo 2003-2008, 70.2% de los casos de cáncer de mama se detectó en etapas avanzadas (II, 32.8%; III, 30.0%; y IV, 7.4%), incluyendo un 20.6% de casos que no fueron clasificables. Esta situación no sólo disminuye la sobrevivencia de las mujeres afectadas sino que implica la utilización de tratamientos más agresivos y costosos que no garantían la curación (López-Carrillo, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Sintetizar, funcionalizar y caracterizar nanopartículas de magnetita con recubrimiento de curcumina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina), y evaluar su actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- a. Sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina por el método de co-precipitación y caracterizarlas por FTIR y TGA.
- b. Mejorar la solubilidad de la curcumina utilizando nanopartículas de magnetita.
- c. Evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina en cultivos de células de cáncer de mama (células MDA-MB-231).

#### **3.3. Justificación**

El cáncer de mama es un padecimiento que afecta a muchas mujeres del mundo, y una gran cantidad de éstas tienen un mal pronóstico debido a que se les diagnostica después de mucho tiempo. Uno de los principales problemas es cuando el cáncer de mama se extiende a los ganglios linfáticos o a otros tejidos que se encuentran alrededor del tumor, generando metástasis y disminuyendo la probabilidad de vida del paciente. No obstante, cabe aclarar que el cáncer de mama no solo lo presentan las mujeres, esta enfermedad también puede ser encontrada en hombres. En la actualidad el tratamiento que se les da a los pacientes con cáncer de mama va desde quimioterapia, radioterapia y hasta la extirpación de la mama; el tipo de tratamiento depende de qué tan avanzado se encuentre el cáncer. Debido a estos

métodos los pacientes tratados pueden quedar con secuelas o pueden empeorar su calidad de vida, por eso es necesario encontrar otra manera de atacar el cáncer de mama sin deteriorar la calidad de vida del paciente. Una opción, es aprovechar la Nanotecnología en el ámbito médico ya que nos puede ayudar a crear sistemas específicos, no invasivos y más eficaces. Así la síntesis de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina) constituye un vehículo ideal para este padecimiento, siendo un sistema biocompatible, el cual ha demostrado anteriormente dar buenos resultados contra otros cánceres, demostrando que el sistema en conjunto mejora la solubilidad de la curcumina en un medio acuoso y haciendo posible el acarreo de la curcumina para utilizarla como un compuesto anticancerígeno.

### **3.4. Hipótesis**

La funcionalización de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con curcumina mejora la solubilidad de la curcumina en medio acuoso y además presenta un grado de citotoxicidad en cultivos de células de cáncer de mama.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados fueron los siguientes:

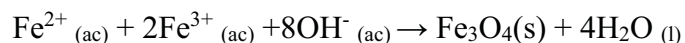
Curcumina (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>/Sigma-Aldrich), ≥65% (HPLC), CAS (458-37-7); Cloruro férrico hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O/Sigma-Aldrich), ≥98%, CAS (10025-77-1); Cloruro ferroso tetrahidratado (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O/Sigma-Aldrich), 98%, CAS (13478-10-9); Etanol absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH/Química Mercurio), 99.25%, CAS (64-17-5); Hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH/J. T. Baker), 28-30%, CAS (1336-21-6); Suero fetal bovino (Biowest), Cat. N° 51650-500; Dimetilsulfóxido (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS/Sigma-Aldrich), ≥99.5% (GC), CAS (67-68-5); Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S/Sigma-Aldrich), 98%, CAS (298-93-1); Penicilina/estreptomicina (10,000 unidades penicilina y 10 mg estreptomicina/ ml), Sigma-Aldrich; DMEM/F12 (Sigma-Aldrich).

La síntesis y caracterización de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina se realizó en la UDLAP, en el laboratorio de investigación en nanotecnología (CI-010) y en el laboratorio de análisis instrumental (CI-110A). Los estudios de viabilidad celular se realizaron en el laboratorio del CIBIOR IMSS.

### 4.1. Síntesis de nanopartículas

#### 4.1.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita

Se utilizó el método de síntesis de nanopartículas de magnetita por co-precipitación de acuerdo a lo reportado por Portillo-Aguilera (2014). A continuación, se presenta la reacción de síntesis de magnetita:





El proceso se describe brevemente: se preparó una solución de  $\text{FeCl}_3$  0.2 M pesando 4.332 g de cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en un vidrio de reloj; luego se agregó la sal en un vaso de precipitado de 150 ml y se le agregaron 80 ml de agua destilada, después se puso a agitar a 1000 rpm utilizando un agitador magnético durante 30 minutos. Asimismo, se preparó una solución de  $\text{FeCl}_2$  0.1 M pesando 1.596 g de cloruro ferroso tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en un vidrio de reloj; se adicionó la sal en un vaso de precipitado de 150 ml y después se le agregó 80 ml de agua destilada, también se agitó a 1000 rpm utilizando un agitador magnético durante 30 minutos (Figura 6).



Figura 6: Soluciones de  $\text{FeCl}_3$  0.2 M y  $\text{FeCl}_2$  0.1 M

Después de agitar ambas soluciones 30 minutos se mezclaron y se pusieron en un vaso de precipitado de 250 ml y se continuó la agitación a 1000 rpm por 5 minutos, desde este paso se trabajó en la campana de extracción. En seguida se agregó 20 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30%) gota a gota rápidamente utilizando una bureta de 25 ml. Terminada la adición, se notó

el cambio brusco de color a negro, lo cual confirma la presencia de magnetita (Figura 7). Se dejó agitándose la solución por 1 hora y media y después se decantó el excedente de la solución a través del método de precipitación magnética utilizando un imán de neodimio.



Figura 7: Decantación del excedente por método de precipitación magnética utilizando un imán de neodimio

Se hicieron 7 lavados con agua destilada hasta que las aguas de lavado alcanzaron un pH 7 y el último lavado se hizo con etanol absoluto. Posterior a esto, se introdujo el vaso de precipitado con la magnetita al horno con vacío a 60°C, y se dejó ahí por 72 horas. Se consiguió un sólido negro en forma de agregados grandes.



Figura 8: Magnetita seca

#### 4.1.2. Funcionalización superficial con curcumina

De los agregados obtenidos en la síntesis de la magnetita se trituraron 64 mg del producto sólido negro en el mortero ágata agregándole unas dos gotas de etanol absoluto para evitar oxidación durante la trituración; asimismo se pesaron 65 mg de curcumina utilizando un vidrio de reloj. Después ambos compuestos se introdujeron en un matraz bola de 50 ml, este se cubrió de aluminio para evitar fotoxidación/fotodegradación de la curcumina, y se les agregó 10 ml de agua. Se montó un sistema utilizando un matraz de bola de 50 ml, una columna lisa y se tapó la columna con un tapón de corcho. Se sellaron las uniones del sistema utilizando parafilm. Posteriormente se introdujo un agitador magnético al matraz bola, el cual estaba forrado con parafilm. El matraz de bola se sumergió en un vaso de precipitado conteniendo



Figura 9: Sistema para síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina

250 ml con agua, todo el sistema se puso en una parrilla, se puso a calentar a 40°C y se agitó a 1000 rpm durante 3 días.

Después el material resultante se recuperó por el método de precipitación magnética utilizando un imán de neodimio; dicho material presentaba un color café/naranja. El material se introdujo al horno con vacío a 60°C, y se dejó ahí durante 24 horas.



Figura 10:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina recuperado por método de precipitación magnética

## 4.2. Caracterización

### 4.2.1. FTIR

Se caracterizaron los compuestos y las muestras utilizando un Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). El FTIR que se empleó es un Agilent Cary 630. Las muestras se tomaron en un intervalo espectral de  $650\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.2.2. TGA

Se caracterizaron los compuestos y las muestras haciendo un Análisis Termogravimétrico (TGA), utilizando un equipo de análisis termogravimétrico con análisis diferencia térmico (TGA/DTA) Netzsch STA 2500 Regulus. Las muestras que contenían

magnetita se corrieron desde 25°C hasta 800°C y la muestra de curcumina se corrió desde 25°C hasta 400°C. En todas las caracterizaciones se usó entre 5-7 mg de las muestras. Todas las muestras se hicieron en una atmósfera de nitrógeno.

#### 4.2.3. DLS

Se determinó el tamaño y la distribución de las partículas utilizando un equipo para determinación de distribución de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS) NANO-flex 180° de la compañía Microtac. Previamente ambas muestras, tanto las de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> como las de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina, se pusieron en un eppendorf con agua, después se pusieron a sonicar durante 10 minutos en el sonicador BRANSON 1510 y finalmente se homogeneizaron las muestras utilizando el vortex LSE Corning.

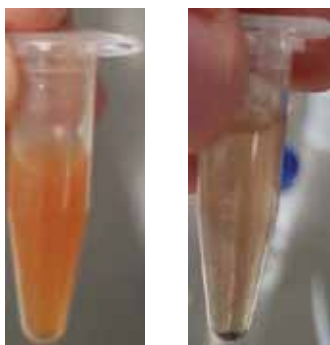


Figura 11: Muestras para análisis en el DLS, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (izquierda) y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina (derecha)

#### 4.2.4 SEM/STEM

Se obtuvieron micrografías SEM y STEM utilizando un microscopio electrónico de barrido de ultra alta resolución, el equipo empleado fue el MAIA3 de la marca TESCAN. Este equipo tiene la capacidad de lograr una resolución de 1 nm a 1 keV.

### **4.3. Métodos de cultivos celulares**

#### **4.3.1. Línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)**

Esta línea celular es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del cáncer de mama hormono-independiente. Estas células fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de un derrame pleural de un paciente con cáncer de mama que falleció de esta enfermedad (Cailleau, 1974). Esta línea celular tiene un rápido crecimiento en medios de cultivo poco enriquecidos, en parte por una regulación autócrina a partir de factores de crecimiento celular que ellas mismas secretan al medio. Además presentan una forma redondeada y una gran adhesión a las células vecinas (Martínez-Carpio, 2003).

#### **4.3.2. Ensayo MTT**

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que mide la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la succinato deshidrogenasa mitocondrial; esto parte del hecho de que la reducción del MTT puede ocurrir únicamente en células metabólicamente activas, por lo tanto, representa una medida de la viabilidad celular. El MTT entra a la mitocondria donde se reduce a formazán, un producto color púrpura e insoluble (Figura 12). Las células se tratan con un solvente orgánico, con lo que se libera y solubiliza el formazán; así, este producto se mide espectrofotométricamente a través de la absorbancia como función de la concentración del tinte púrpura (Portillo Aguilera, 2014).

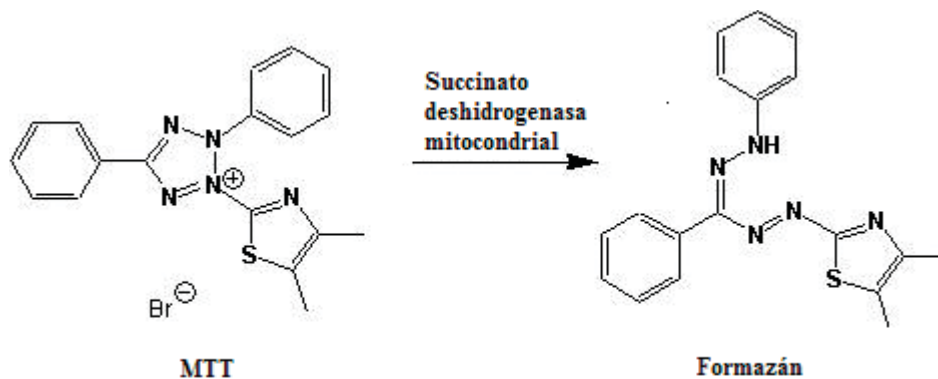


Figura 12: Fundamento del ensayo MTT (Portillo Aguilera, 2014)

Se utilizó el análisis MTT para medir la citotoxicidad de las nanopartículas tomando en cuenta que un alto grado de formación de cristales de formazán implica una alta viabilidad celular.

Para el ensayo MTT se sembraron 3 placas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células MDA-MB-231 por pozo con medio DMEM/F12 completo-10% Suero Fetal Bovino (SFB), en una atmósfera a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 24 horas de cultivo, el medio en los pozos se sustituyó con medio fresco el cual contenía magnetita, curcumina y diferentes concentraciones de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente y cada pozo se llevó a 200  $\mu\text{l}$  utilizando más medio de cultivo. Después se incubaron 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se les agregó 50  $\mu\text{l}$  de PBS (Phosphate-Buffered Saline) por pozo para lavar las células. Se observaron las células y se tomaron fotografías de cada pozo con un microscopio de contraste de fases con el objetivo 20X (Nikon). Inmediatamente se retiró el PBS y se agregaron 37  $\mu\text{l}$  de una solución de trabajo a cada pozo para realizar el ensayo MTT; ésta solución contiene 10% de MTT (5 mg/ml), SFB

7%, antibiótico (penicilina/estreptomicina) y el resto de PBS. Se dejaron incubar las células durante 3 horas a oscuras en una atmósfera a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Después se agregó 70 µl de DMSO a cada pozo y se agitaron durante 5 minutos a 475 rpm. Posteriormente se midió la absorbancia a 550 nm y 620 nm en el espectrofotómetro. A las absorbancias de 550 nm se les restó el valor de las absorbancias de 620 nm para obtener el valor real del formazán que se metabolizó. Todos los pasos anteriores se repitieron para las placas de 48 y 72 horas.

La viabilidad celular (%) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left( \frac{\text{valor problema} - \text{valor del blanco}}{\text{valor control}} \right) \times 100$$



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Síntesis de nanopartículas de magnetita

Después de secar el material (Figura 13), se pesó utilizando un vidrio de reloj y se obtuvo 1.902 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , es decir que se obtuvo un rendimiento del 101%. El rendimiento teórico es de 1.871 g lo cual nos indica que el material ganó peso por su propiedad higroscópica.



Figura 13: 1.902 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obtenida

#### 5.1.1. FTIR

Como podemos observar en la figura 14, el espectro infrarrojo de la magnetita, tenemos una banda cerca de  $650\text{ cm}^{-1}$ , la cual continúa, esta banda es el pico característico de la vibración Fe-O en la magnetita que aparece en  $590\text{ cm}^{-1}$ .

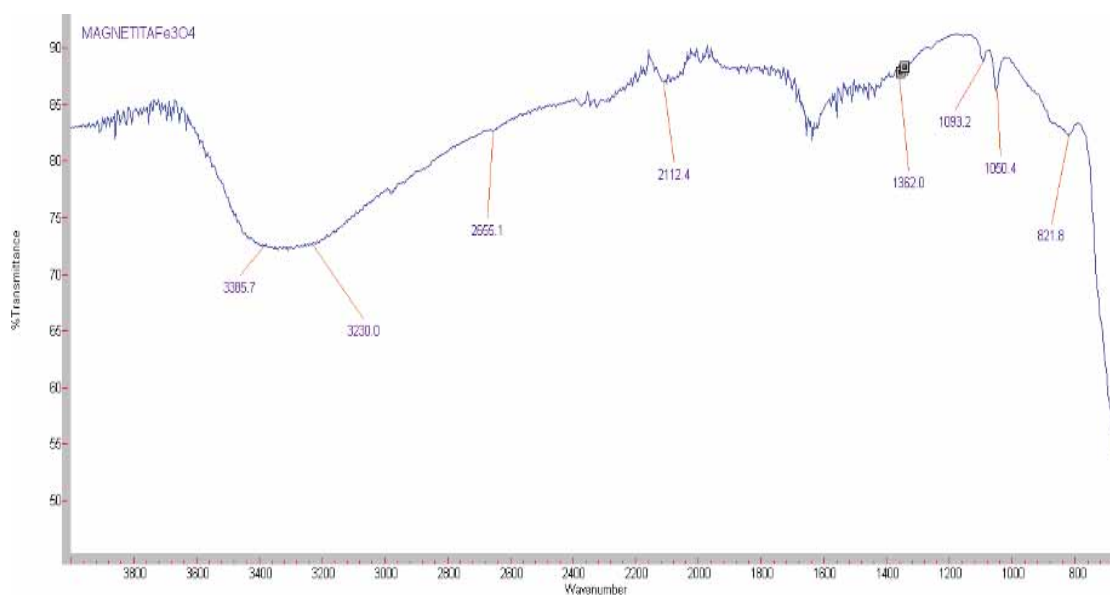


Figura 14: Espectro infrarrojo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

### 5.1.2. TGA

Al obtener el análisis Termo-gravimétrico (TGA) de la magnetita pudimos darnos cuenta que la termo-gravimetría (TG) es una línea casi recta, lo cual era lo esperado debido a que la magnetita no sufre una pérdida de masa en ese rango de temperatura.

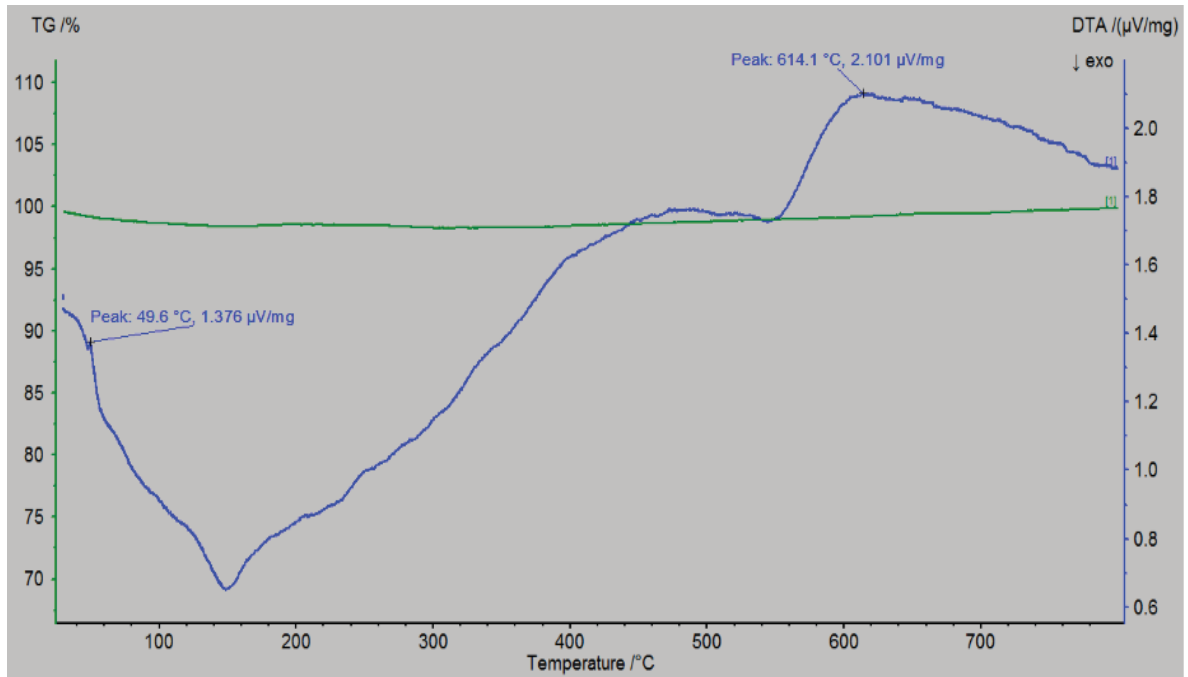


Figura 15: TGA de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

### 5.1.3. DLS

Analizando la figura 16, donde se muestra la dispersión de los tamaños relativos de las partículas obtenida con el equipo DLS, nos damos cuenta que el diámetro del pico principal de las partículas de magnetita es de alrededor de 88.6 nm, pero como sabemos que en este tipo de análisis mide el diámetro hidrodinámico, podemos pensar que de hecho las partículas son aún más pequeñas.

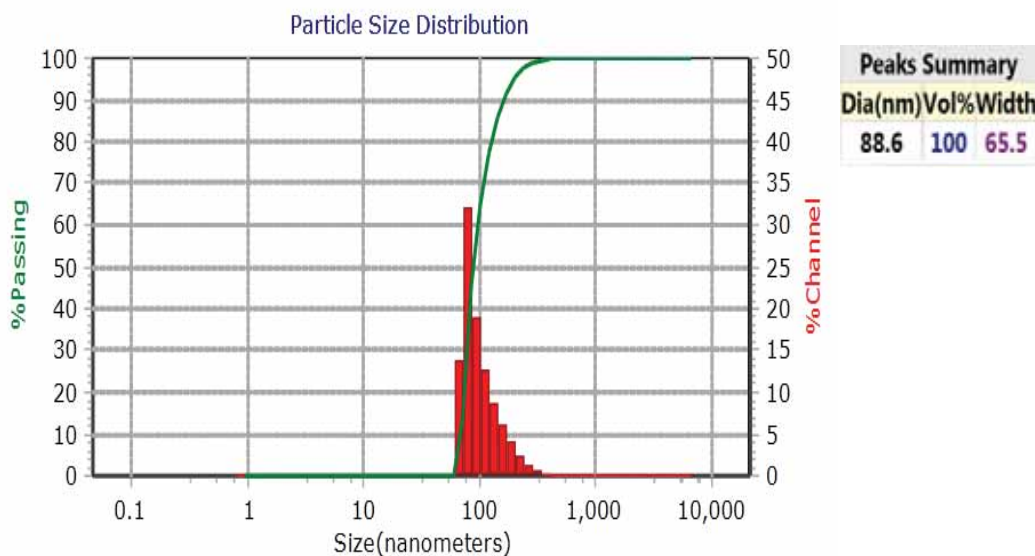


Figura 16: DLS de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

## 5.2. Funcionalización superficial con curcumina

Después del proceso de adsorción y secar el material, se pesó utilizando un vidrio de reloj y se obtuvieron 118 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina, lo cual representa un rendimiento del 91%, siendo esto un muy buen rendimiento. Las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina exhiben una forma de hojas delgadas color café oscuro y además presentan propiedades magnéticas (Figura 17).



Figura 17: Nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina

### 5.2.1. FTIR

En el espectro infrarrojo (Figura 18) de la curcumina podemos observar varios picos, uno ubicado en  $3504.4\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde al grupo funcional O-H de los fenoles que están presentes en su estructura. También podemos ver dos picos uno en  $1600.9\text{ cm}^{-1}$  y otro en  $1505.6\text{ cm}^{-1}$  los cuales corresponden a C-C en un aromático. En la región de la huella dactilar del espectro infrarrojo se puede observar el perfil de un grupo aromático trisustituido (dos bandas alrededor de  $800\text{ cm}^{-1}$  y  $850\text{ cm}^{-1}$ ).

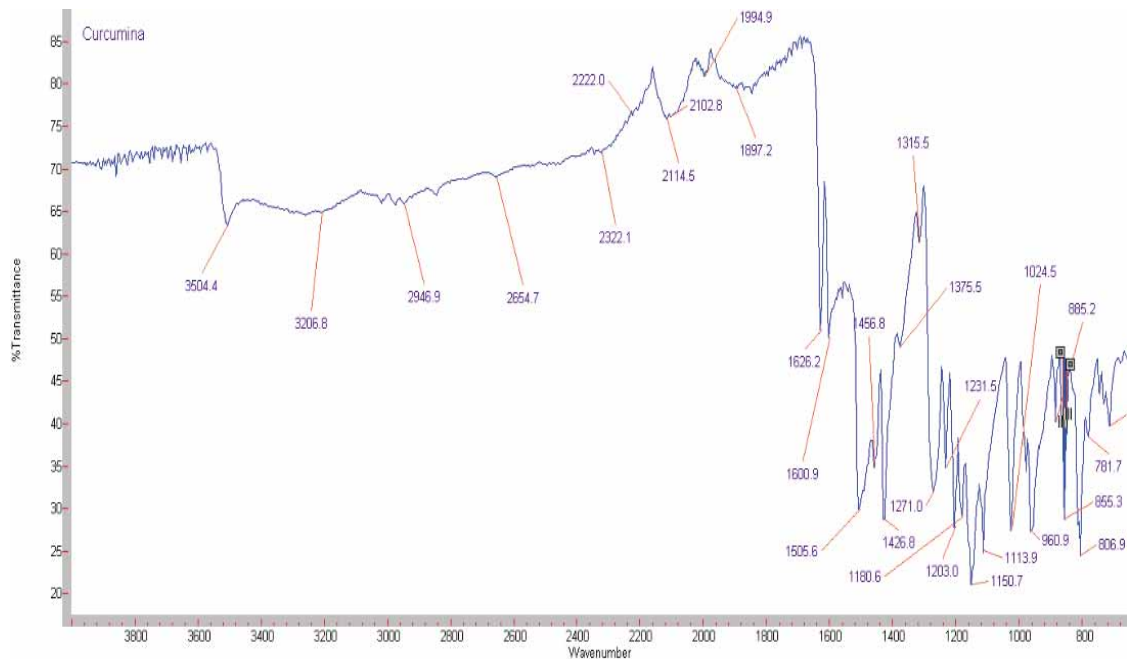


Figura 18: Espectro infrarrojo de curcumina

Al observar el espectro de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina (Figura 19) podemos darnos cuenta que las bandas características de la curcumina siguen presentes como la de los fenoles, la cual aparece en  $3504.1 \text{ cm}^{-1}$ . También podemos ver que hay una banda cerca de  $650 \text{ cm}^{-1}$ , la cual parece que continua, y esta banda es característica de la magnetita, como previamente se había mencionado.

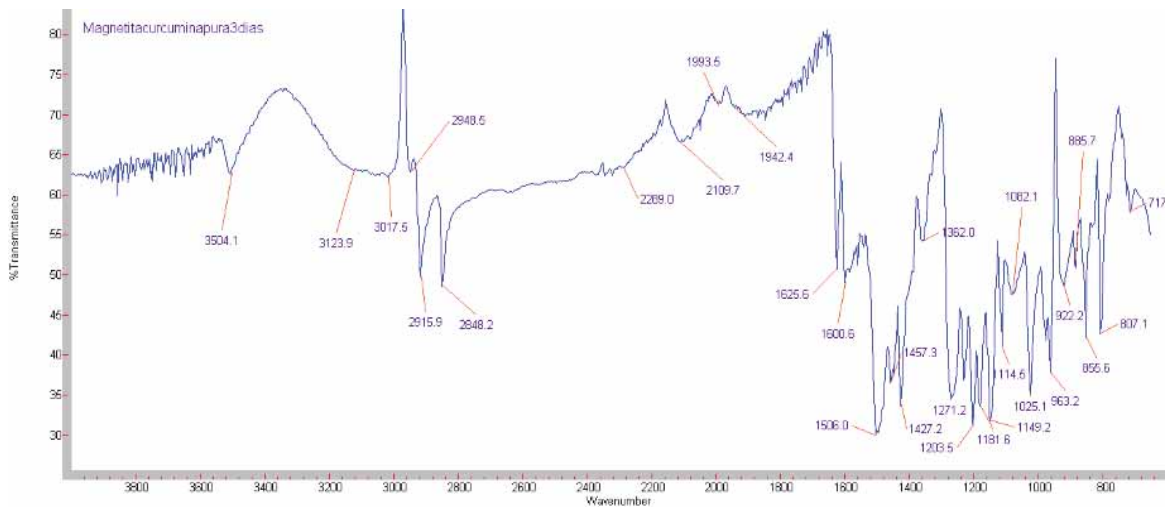


Figura 19: Espectro infrarrojo de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina

### 5.2.2. TGA

Al observar el espectro TGA de la curcumina (Figura 20), nos damos cuenta que empieza a haber una pérdida de masa alrededor de  $170^\circ\text{C}$ , lo cual concuerda con el punto de fusión de la curcumina ( $173^\circ\text{C}$ ). Además, el análisis térmico diferencial (DTA) nos muestra un pico intenso en esta zona indicativo de un proceso exotérmico, lo que nos hace pensar que la curcumina se empieza a descomponer desde este punto hasta el final de la corrida.

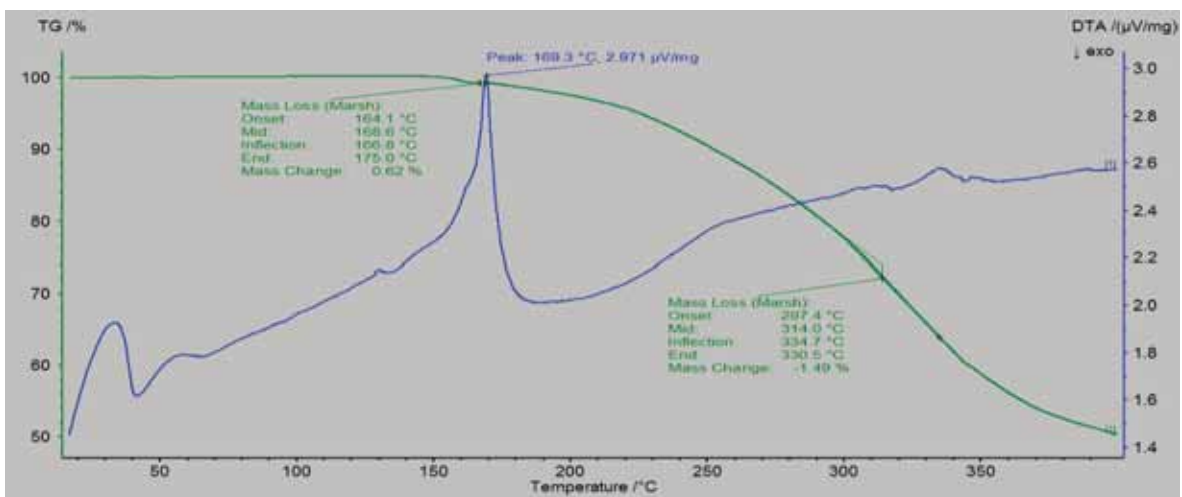


Figura 20: TGA de curcumina

En la figura 21, se muestra el espectro de TGA de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina; aquí podemos ver que en la línea del TG hay tres caídas correspondientes a una pérdida de masa, en este caso ésta pérdida de masa se asocia a la curcumina debido a que la magnetita, como pudimos ver anteriormente, no presenta este comportamiento en este rango de temperatura.

La primera caída de la línea del espectro de TG podemos pensar que es una curcumina que esta de manera muy superficial, ya que está en el rango del punto de fusión de la curcumina y podemos apreciar un pico en la línea del DTA, el cual corresponde a un proceso exotérmico, corroborando así que lo que estamos perdiendo en ese punto, es curcumina.

Por otro lado, las otras dos caídas de la línea del TG nos hacen pensar que la curcumina si se funcionalizó de manera correcta con la magnetita, y que está unida de cierto modo a ella, debido a que la pérdida de masa de estas dos caídas rebasa el punto de fusión de la curcumina y además se presenta un porcentaje importante de pérdida de masa, el cual solo puede relacionarse con la curcumina.

Así mismo, en la última caída de nuestra línea del TG ( $623^\circ\text{C}$ ) podemos observar un pico intenso en la línea del DTA, el cual es representativo a un proceso exotérmico, este proceso nos indica la descomposición total de la curcumina quedando solamente la magnetita.

Como podemos observar el porcentaje total de masa de curcumina perdida es de 18.71%, pero si omitimos la curcumina que esta de manera superficial, obtenemos una

pérdida de 16.22%, lo cual es un resultado muy bueno ya que podemos decir que hay una muy buena cantidad de curcumina unida a nuestras nanopartículas de magnetita.

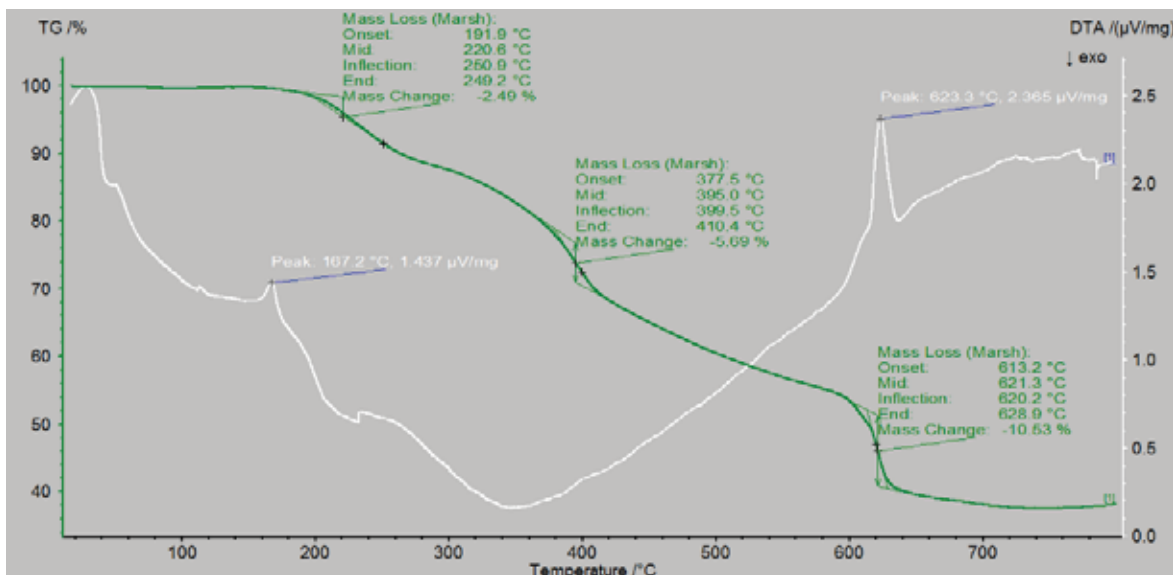


Figura 21: TGA de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina

### 5.2.3. DLS

Analizando la gráfica obtenida con el DLS (Figura 22), nos damos cuenta que el diámetro de las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina va desde 101.8 nm hasta 1,213 nm, si tomamos en cuenta que estamos midiendo el diámetro hidrodinámico podemos decir que el tamaño de estas puede ser aún más pequeño. Podemos ver también que las que hay en mayor cantidad son las de 190.9 nm.



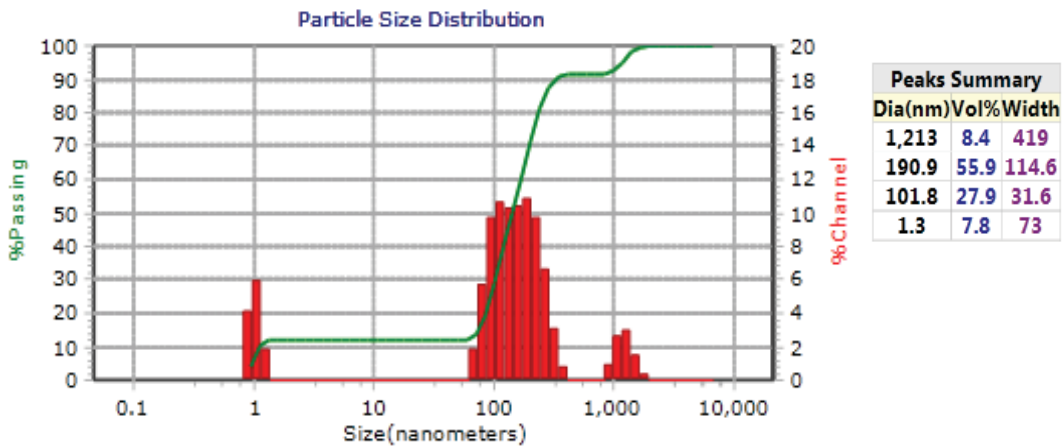


Figura 22: DLS de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina

### 5.3. SEM

Al ver las micrografías de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figura 23) podemos apreciar ciertas estructuras esféricas que tienen un tamaño aproximadamente por debajo de 50 nm (figura de la izquierda). Por otro lado, podemos ver ciertas aglomeraciones de nuestras nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (figura de la derecha).

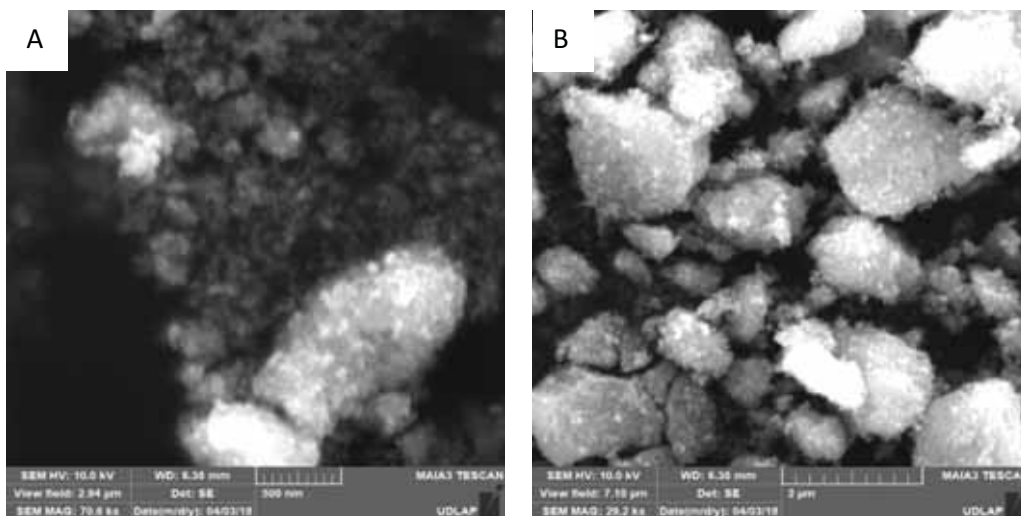


Figura 23: Análisis de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por SEM. A, nanopartículas vistas a 70.6 Kx; B, nanopartículas vistas a 29.2 Kx

A continuación, se muestran 4 micrografías (Figura 24) obtenidas de nuestras nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina. Al analizar las micrografías se piensa que la curcumina de algún modo está envolviendo a las nanopartículas ya que se ven estructuras más grandes y no se pueden distinguir la forma característica esférica de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

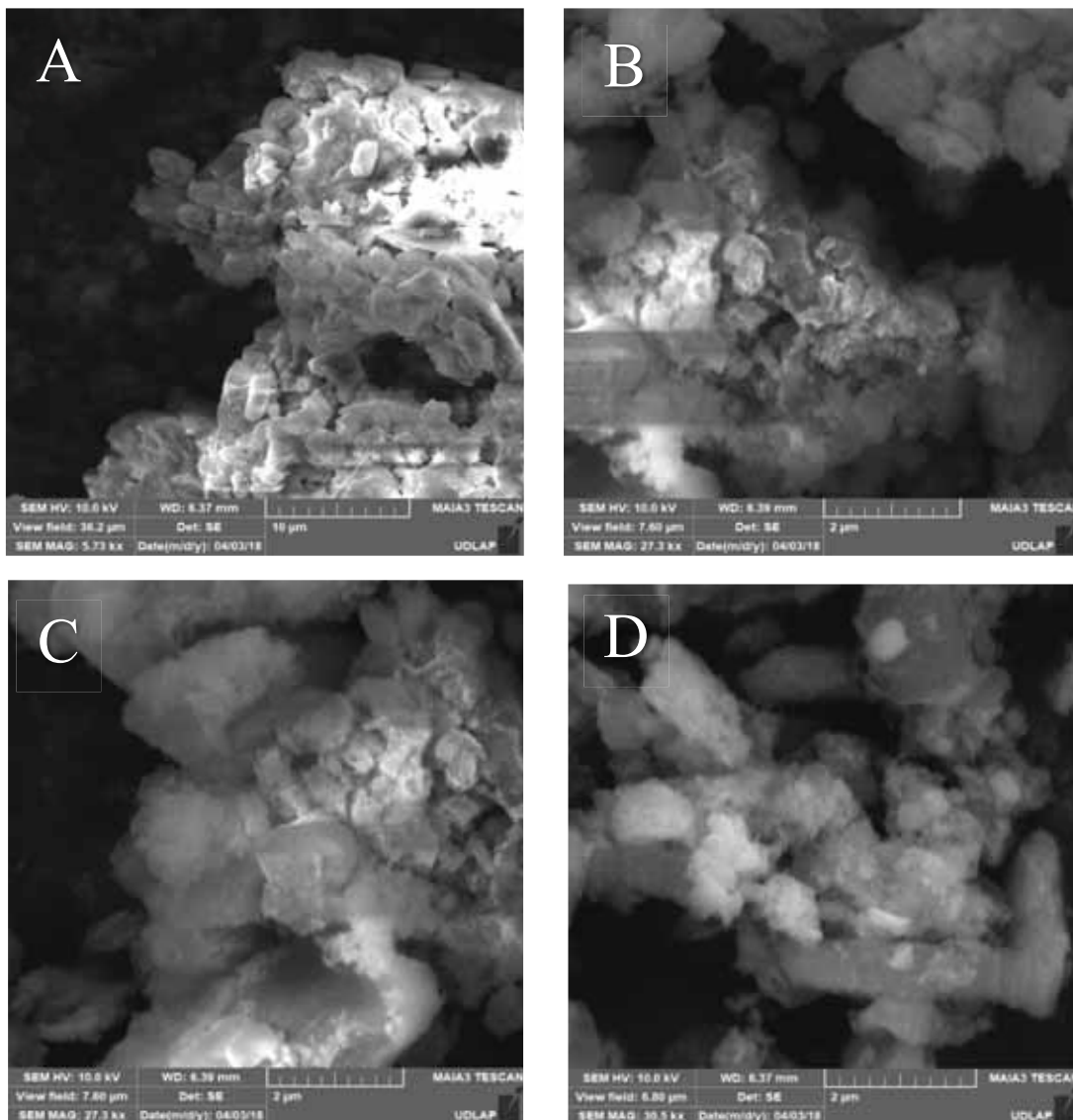


Figura 24: Análisis de nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina por SEM a diferentes aumentos en diferentes campos. A, Observación a 5.73 Kx; B, Observación a 27.3 Kx; C, Observación a 27.3 Kx; D, Observación a 27.3 Kx

## 5.4. STEM

A continuación, se muestran imágenes STEM de las nanopartículas de magnetita y de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina:

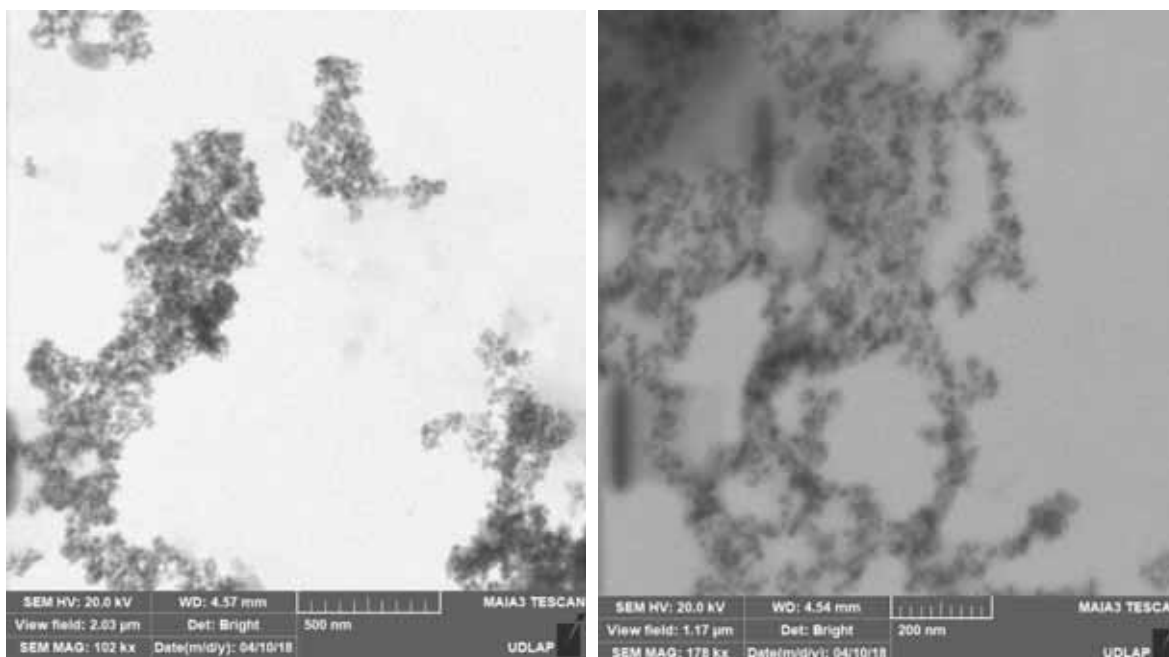


Figura 25: Imágenes STEM de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (izquierda) a 102 Kx y de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (derecha) a 178 Kx.

## 5.5. Ensayo MTT

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT se mostrarán en anexos, debido a que las grandes concentraciones de curcumina acoplada a las nanopartículas de magnetita interfirieron con los datos, dando resultados no confiables. A continuación, se mostrarán imágenes que se obtuvieron durante el ensayo MTT con las diferentes concentraciones

de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80  $\mu\text{g/ml}$ ), a los diferentes tiempos estudiados (24,48 y 72 horas).

### 5.6. Efecto de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre la línea celular de cáncer de mama triple negativa MDA-MB-231

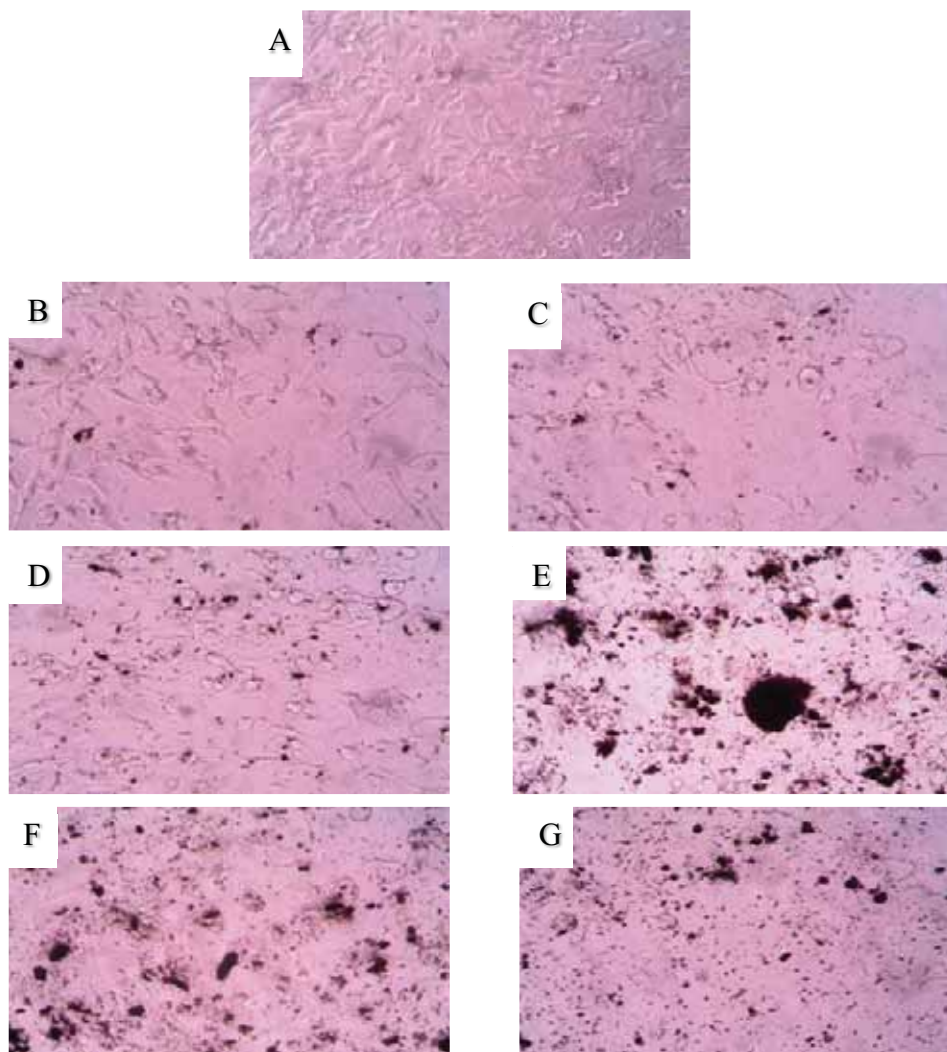


Figura 26: Efecto de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 24 horas de exposición; A (Control), B (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), C (5  $\mu\text{g/ml}$ ), D (10  $\mu\text{g/ml}$ ), E (20  $\mu\text{g/ml}$ ), F (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80  $\mu\text{g/ml}$ ). 20X.

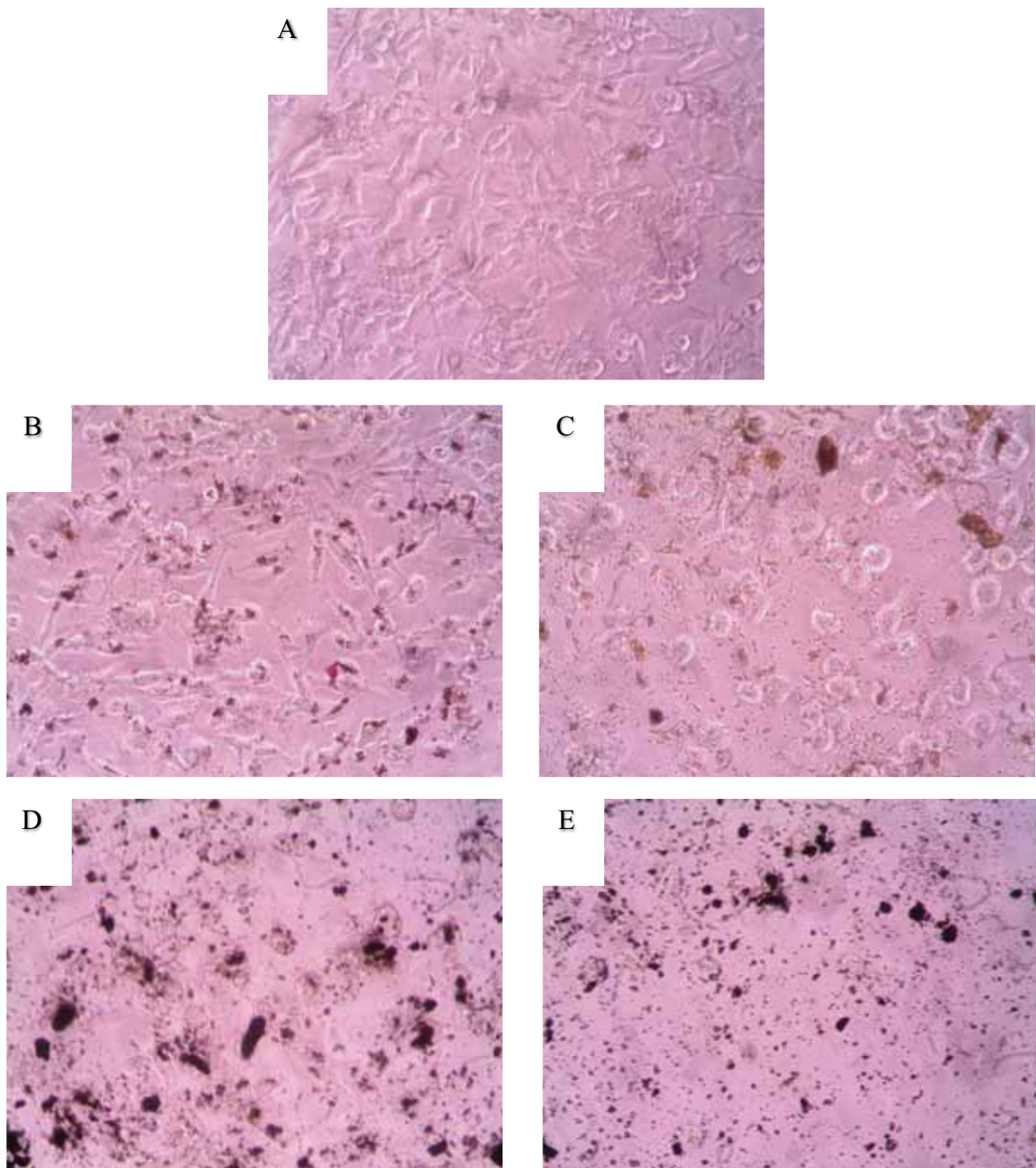


Figura 27: Imágenes obtenidas después de 24 horas; A (Control), B (Magnetita 40 µg/ml), C (Curcumina 80 µg/ml), D (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 40 µg/ml), E (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 80 µg/ml). 20X

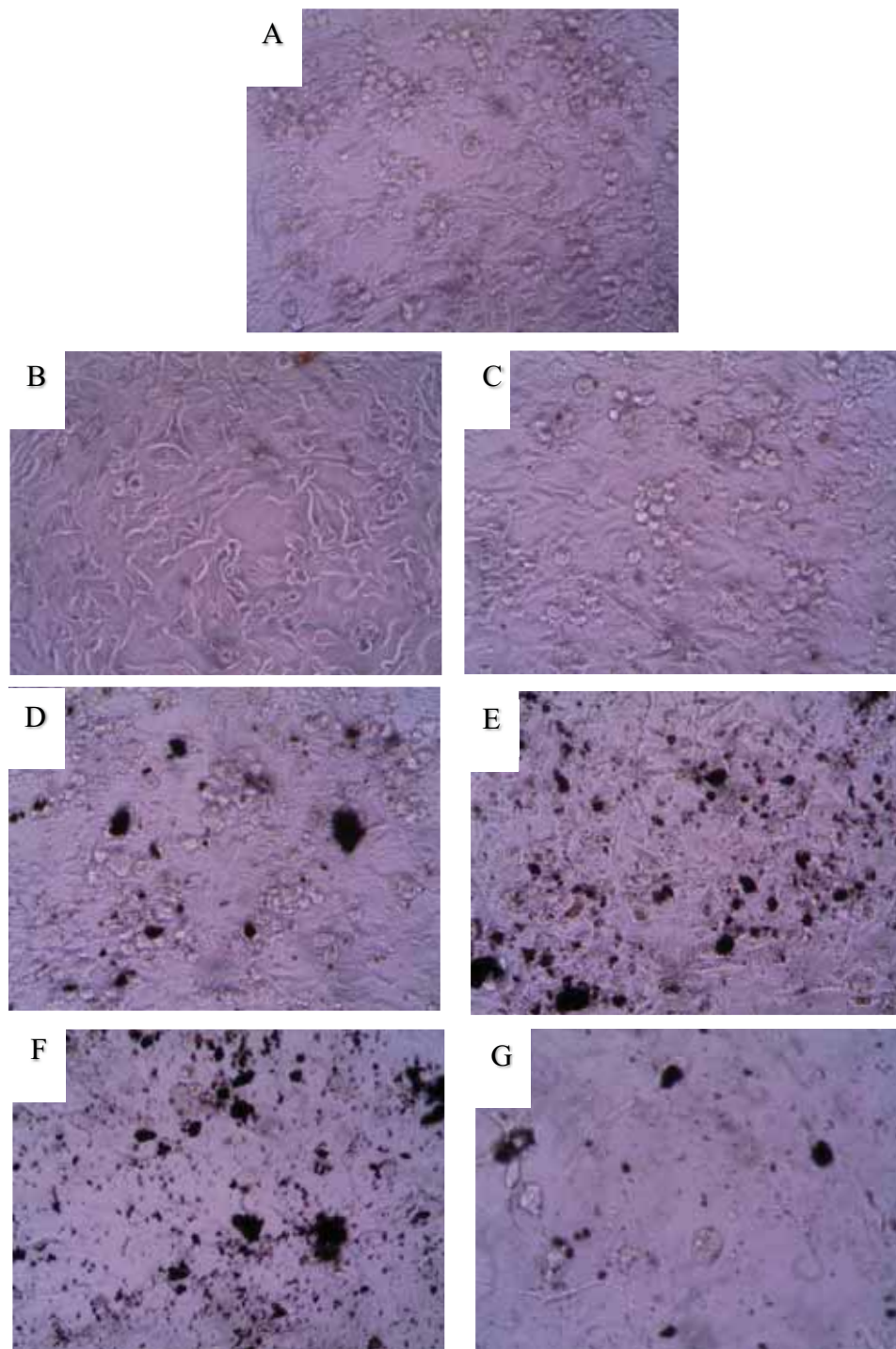


Figura 28: Efecto de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 48 horas de exposición; A (Control), B (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), C (5  $\mu\text{g/ml}$ ), D (10  $\mu\text{g/ml}$ ), E (20  $\mu\text{g/ml}$ ), F (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80  $\mu\text{g/ml}$ ). 20X

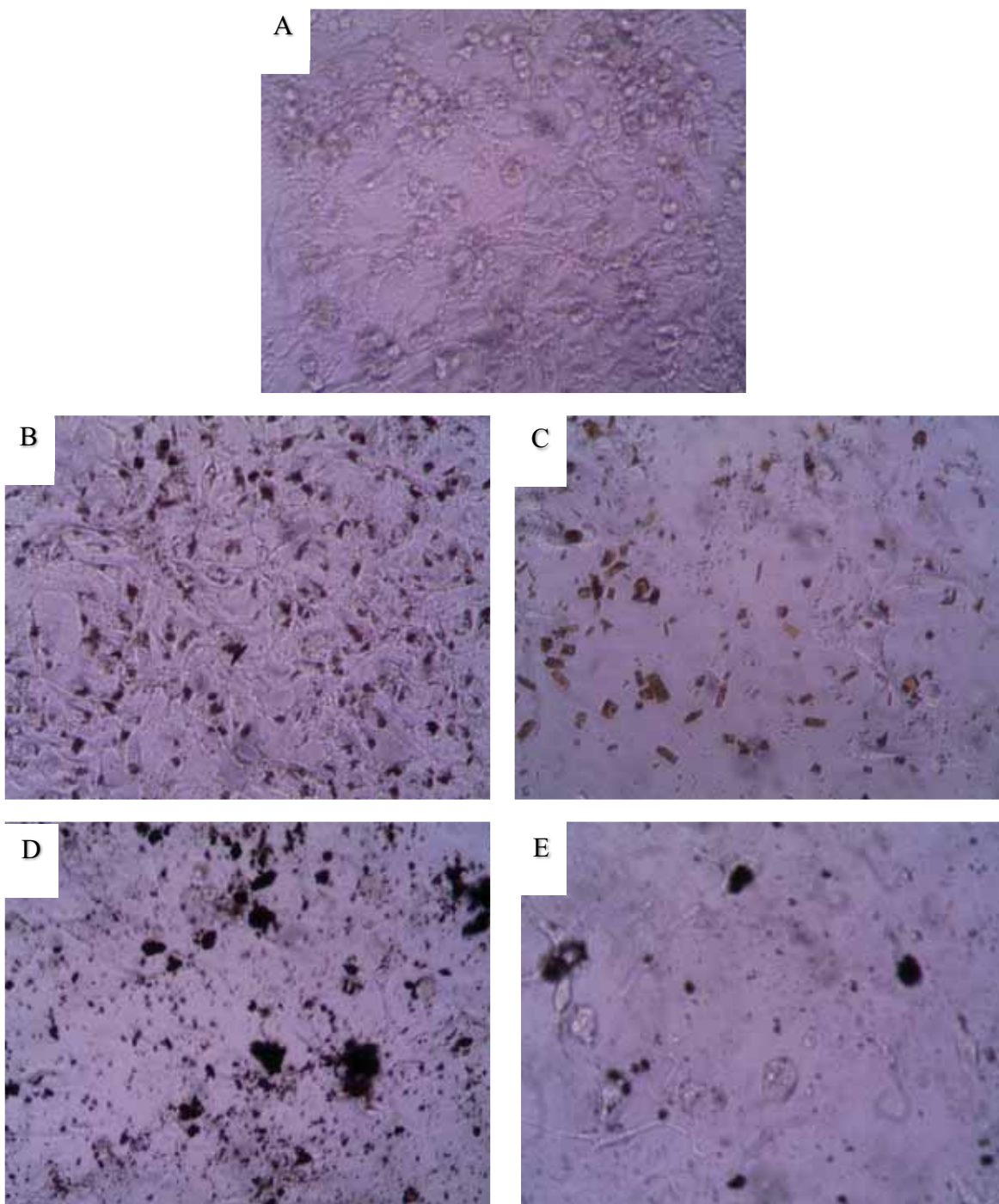


Figura 29 : Imágenes obtenidas después de 48 horas; A (Control), B (Magnetita 40 µg/ml), C (Curcumina 80 µg/ml), D (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 40 µg/ml), E (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 80 µg/ml). 20X

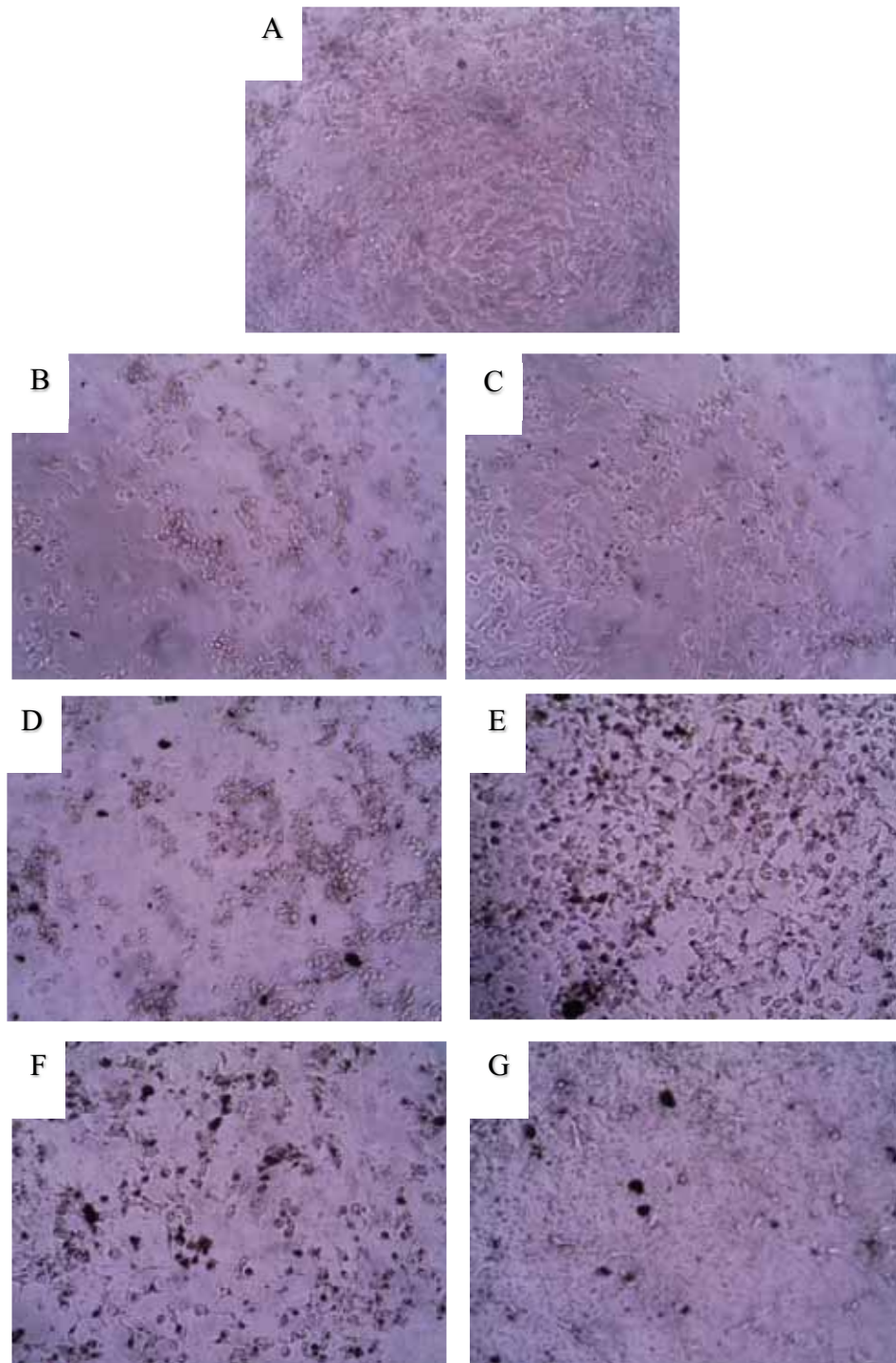


Figura 30: Efecto de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina sobre las células MDA-MB-231 a las 72 horas de exposición; A (Control), B (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), C (5  $\mu\text{g/ml}$ ), D (10  $\mu\text{g/ml}$ ), E (20  $\mu\text{g/ml}$ ), F (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y G (80  $\mu\text{g/ml}$ ). 20X



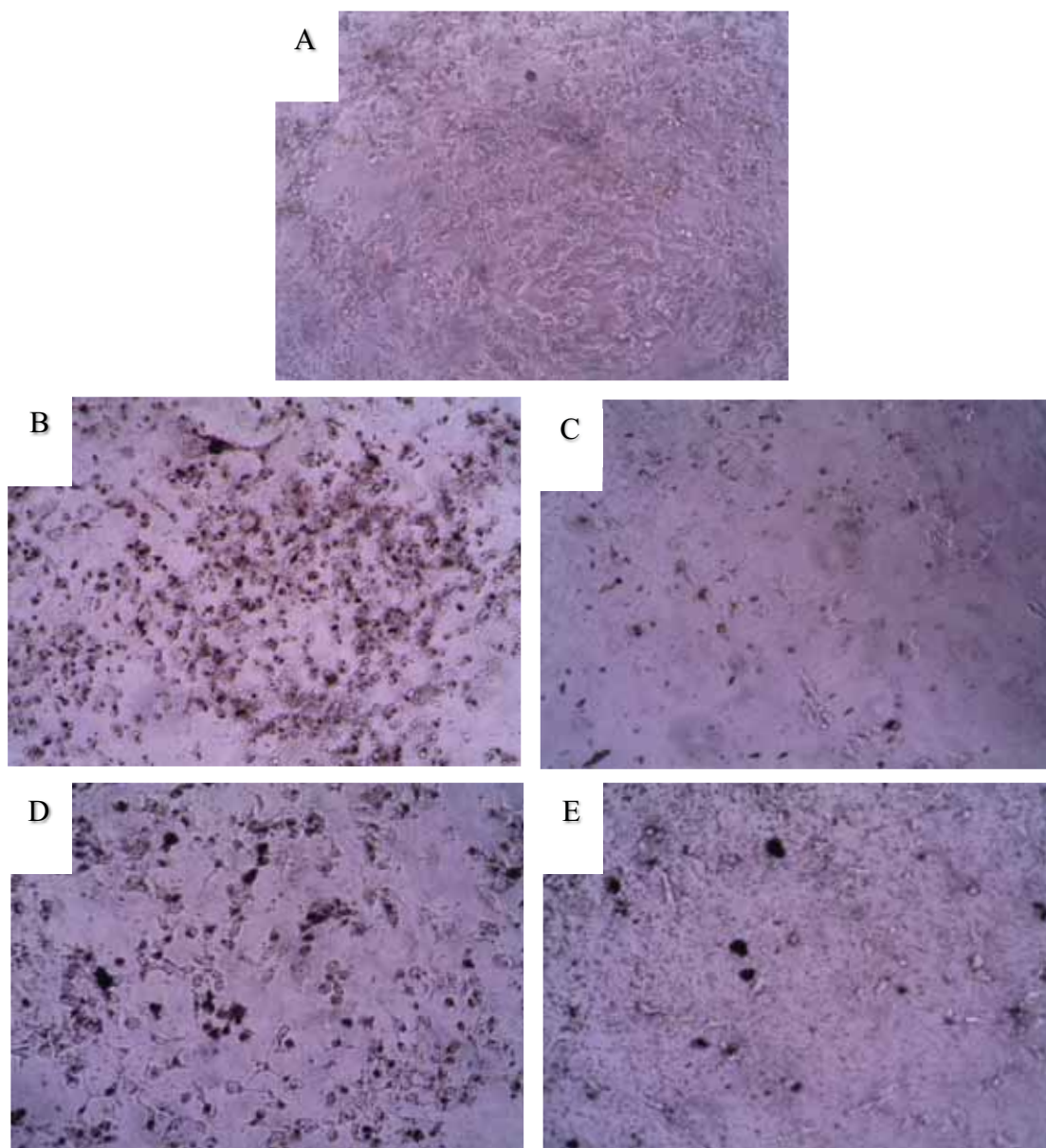


Figura 31: Imágenes obtenidas después de 72 horas; A (Control), B (Magnetita 40 µg/ml), C (Curcumina 80 µg/ml), D (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 40 µg/ml), E (nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina 80 µg/ml). 20X

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al realizar la síntesis de nanopartículas de magnetita por el método de coprecipitación se obtuvo 1.902 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , es decir que se obtuvo un rendimiento cuantitativo. La magnetita obtenida se presentaba como aglomerados de color negro brillante, y además tenía propiedades magnéticas (Figura 13). Después de realizar la funcionalización de la magnetita con la curcumina, se obtuvo 118 mg de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina, lo cual representa un rendimiento del 91%. Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina exhiben una forma de hojas delgadas color café oscuro, además presentan propiedades magnéticas dándonos una idea de que la magnetita está presente en el material obtenido (Figura 17).

Al hacer los espectros infrarrojos de la magnetita (Figura 14), curcumina (Figura 18) y de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina (Figura 19) observamos que en el espectro infrarrojo de la magnetita tenemos una banda cerca de  $650\text{ cm}^{-1}$ , la cual continúa; esta banda es el pico característico de la vibración Fe-O en la magnetita que aparece en  $590\text{ cm}^{-1}$ . Asimismo, al observar el espectro infrarrojo de la curcumina se observan varios picos, uno ubicado en  $3504.4\text{ cm}^{-1}$ , el cual corresponde al grupo funcional O-H de los fenoles que están presentes en su estructura. También podemos ver dos picos uno en  $1600.9\text{ cm}^{-1}$  y otro en  $1505.6\text{ cm}^{-1}$  los cuales corresponden a C-C en un aromático. En la región de la huella dactilar del espectro infrarrojo se puede observar el perfil de un grupo aromático trisustituido (dos bandas alrededor de  $800\text{ cm}^{-1}$  y  $850\text{ cm}^{-1}$ ). Y, por último, al ver el espectro infrarrojo de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina podemos darnos cuenta que las bandas características de la curcumina siguen presentes como la de los fenoles, la cual aparece en  $3504.1\text{ cm}^{-1}$ .

También podemos ver que hay una banda cerca de  $650\text{ cm}^{-1}$ , la cual parece que continua, y esta banda es característica de la magnetita, como previamente se había mencionado.

Al realizar los TGA de la magnetita podemos darnos cuenta que el TG es una línea casi recta, resultado esperado, ya que la magnetita no sufre una pérdida de masa en ese rango de temperatura (Figura 15). Al observar el TGA de la curcumina (Figura 20), nos damos cuenta que empieza a haber una pérdida de masa alrededor de  $170^{\circ}\text{C}$ , lo cual concuerda con el punto de fusión de la curcumina ( $173^{\circ}\text{C}$ ). Además, el DTA nos muestra un pico intenso en esta zona indicativo de un proceso exotérmico, lo que nos hace pensar que la curcumina se empieza a descomponer desde este punto y hasta el final de la corrida. Por último, al ver el TGA de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina (Figura 21), podemos ver que en nuestra línea del TG hay tres caídas correspondientes a una pérdida de masa, en este caso esta pérdida de masa se asocia a la curcumina debido a que la magnetita, como pudimos ver anteriormente, no presenta este comportamiento en este rango de temperatura. En relación a la primera caída de nuestra línea del TG especulamos que se trata de una curcumina que se encuentra de manera muy superficial, ya que está en el rango del punto de fusión de la curcumina y podemos apreciar un pico en la línea del DTA, el cual corresponde a un proceso exotérmico, corroborando así que lo que estamos perdiendo en ese punto sea curcumina. Por otro lado las otras dos caídas de nuestra línea del TG nos hacen pensar que la curcumina si se funcionalizó de manera correcta con la magnetita, y que está unida de cierto modo a ella, debido a que la pérdida de masa de estas dos caídas rebasan el punto de fusión de la curcumina y además de que se presenta un porcentaje importante de pérdida de masa, el cual solo puede relacionarse con la curcumina ya que la magnetita no presenta este comportamiento en este rango de

temperatura como se mencionó anteriormente. Asimismo, en la última caída de nuestra línea del TG (623°C) podemos observar un pico intenso en la línea del DTA, el cual es representativo de un proceso exotérmico, este proceso nos indica la descomposición total de la curcumina quedando solamente la magnetita. Como se puede observar el porcentaje total de masa de curcumina pérdida es del 18.71%, pero si omitimos la curcumina que esta de manera superficial, obtenemos una pérdida del 16.22%, lo cual es un resultado muy bueno ya que es un reflejo de que existe buena cantidad de curcumina unida a nuestras nanopartículas de magnetita.

Al obtener la gráfica de magnetita del DLS (Figura 16) nos damos cuenta que el diámetro de las partículas de magnetita es de alrededor de 88.6 nm, pero como sabemos que en este tipo de análisis se mide el diámetro hidrodinámico, podemos pensar que de hecho las partículas son aún más pequeñas, aproximadamente 50 nm. Asimismo, analizando la gráfica de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina obtenida con el DLS (Figura 22) nos damos cuenta que el diámetro de nuestro material va desde 101.8 nm hasta 1,213 nm.

Al ver las micrografías SEM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figura 23) podemos apreciar ciertas estructuras esféricas que tienen un tamaño aproximadamente por debajo de 50 nm (Figura 13/izquierda). Además, se pueden observar ciertas aglomeraciones de nuestras nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figura 13/derecha). Por otro lado, al observar las micrografías SEM de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (Figura 24), pensamos que la curcumina de algún modo está envolviendo a las nanopartículas ya que se ven estructuras más grandes y no se puede distinguir la forma esférica característica de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Al ver las micrografías STEM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (Figura 25), podemos darnos cuenta que las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tienen un tamaño aproximadamente de 20 nm, además estas se encuentran muy aglomeradas a comparación con las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina, ya que estas están más dispersas. También podemos ver que en la micrografía STEM de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina se aprecia un contorno gris oscuro alrededor de las partículas, se cree que esto debe a que la curcumina está alrededor de las partículas y está actuando como un surfactante, es por eso también que las partículas funcionalizadas con la curcumina se encuentran más dispersas que las de magnetita.

Al ver las imágenes tomadas durante el ensayo MTT podemos darnos cuenta a primera vista que la magnetita es internalizada por las células de alguna manera, se piensa que las células están fagocitando la magnetita, la curcumina y nuestro sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina; esto pasa en los diferentes tiempos examinados (24, 48 y 72 horas), además cabe mencionar que en todos los tiempos la magnetita pura (Figura 27-B, Figura 29-B y Figura 31-B) no presenta una actividad anticancerígena ya que no disminuye la cantidad de células, lo único que sucede es que las células se estresan y esto es ocasionado debido a que la magnetita es un agente extraño para las células (se observa un cambio de la morfología normal alargada de las células a una morfología circular, indicativa del estrés celular; Figura 27-B, Figura 29-B y Figura 31-B). A las 24 horas de incubación con nuestro material (Figura 26-A) vemos que nuestro pozo control presenta varias células cancerígenas MDA-MB-231 con su morfología correspondiente, pero al ver el pozo de curcumina con 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figura 27-C) podemos observar que nuestras células están un poco estresadas y que ha disminuido

un poco la cantidad de células con respecto a nuestro pozo control, además en la imagen se ven cristales de color naranja que han precipitado, estos cristales son nuestra curcumina que al no ser soluble precipita en el pozo. A las 24 horas de incubación podemos observar que en el pozo conteniendo nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina ( $80 \mu\text{g/ml}$ ; Figura 27-E) ya casi no hay células presentes, esto nos hace sospechar que nuestro material ( $80 \mu\text{g/ml}$ ; Figura 27-E) está siendo internalizado por las células, induciendo la muerte de dichas células de alguna manera. Por otro lado podemos ver que a mayor concentración de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina más células mueren (Figura 26, Figura 28 y Figura 30), esto se puede observar en los tres diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Asimismo al ver las 3 imágenes de los tres diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas; Figura 27-C, Figura 29-C y Figura 31-C), de los pozos que contienen curcumina ( $80 \mu\text{g/ml}$ ), podemos observar que también el número de células disminuye, y que entre más tiempo pasa más células mueren, se cree que esto sucede debido a que la curcumina precipita, como se mencionó anteriormente, y entre más pasa el tiempo se vuelve un poco más soluble, y al ser más soluble está más disponible para las células, ocasionando la muerte de algunas que adquieren la curcumina como nutriente.

## 7. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar nanopartículas de magnetita, con un tamaño aproximado de 20 nm por el método de co-precipitación.

Se logró funcionalizar nanopartículas de magnetita con curcumina, debido a los resultados obtenidos en el TGA, STEM, SEM, y FTIR.

Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por si solas no lograron tener actividad anticancerígena, aunque sí lograron estresar a las células.

Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina mostraron actividad anticancerígena, siendo ésta una muy interesante característica de este material, ya que fueron capaces de disminuir el número de células en tan solo 24 horas; cabe recalcar que esta línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231, es triple negativa y es altamente invasiva, por lo que los resultados obtenidos son sumamente interesantes.

Asimismo, cabe recalcar que se realizaron ensayos de MTT, pero los resultados (probablemente por interferencias con la curcumina y/o magnetita) no son útiles para interpretar de ellos la viabilidad celular, dichos resultados se encuentran en la sección de Anexos en la página 62.

Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina al parecer presentan propiedades anticancerígenas interesantes, por lo que sería relevante continuar con la investigación.

## 8. PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina sobre las células MDA-MB-231 en el equipo IncuCyte para observar en tiempo real como las células internalizan las partículas, así como también para tener resultados cuantitativos sobre el efecto de dicho material en la proliferación celular.
- Analizar si el efecto de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina es específico de las células tumorales MDA-MB-231 y no tóxico para las células normales de mama (MCF-10A).
- Realizar más controles en los ensayos celulares.
- Realizar los ensayos celulares en tiempos más cortos y quizás cambiando el medio de cultivo.
- Verificar que factores favorecen la supervivencia de las células en los sistemas tratados.
- Medir que concentración es la que se internaliza en las células en diferentes tiempos.
- Verificar que otros factores favorecen la muerte celular en nuestros experimentos.



## 9. REFERENCIAS

- Alzate Ceballos, J. A.-P. (2012). Obtención del complejo ciclodextrina-curcumina y su uso como reemplazante de tartrazina. *Revista Lasallista de Investigación*.
- Bakerstmd. (27 de Marzo de 2015). *Wikipedia*. Obtenido de Breast cancer: [https://en.wikipedia.org/wiki/Breast\\_cancer](https://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer)
- Cailleau, R. Y. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, 661-674.
- Casero, E. e. (2014). *El nanomundo en tus manos : las claves de la nanociencia y la nanotecnología*. Barcelona: Grupo Planeta (GBS).
- Castellanos, S. H. (2009). Cáncer de mama. *Anales de Radiología*.
- Choudhuri T, P. S. (2005). Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 20059-20068.
- CIMAV. (Febrero de 2008). *Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México*. Obtenido de <http://nanored.org.mx/documentos/Diagnostico%20y%20Prospectiva%20Nanotecnologia%20en%20Mexico.pdf>
- de Souza, F. F. (2011). Curcumin associated magnetite nanoparticles inhibit in vitro melanoma cell growth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7603-7610.
- Dianzani, C. Z. (2014). Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *BioMed Research International*.
- Fang J, L. J. (2005). Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *Journal of Biological Chemistry*, 25284-25290.
- García Jimeno, S. (2013). Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas (Tesis Doctoral). Barcelona: Universitat de Barcelona.
- González-Albadalejo, J. S. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 278-310.
- Grande, A. H. (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La física actual en lucha contra la enfermedad. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 321-327.
- Laín Entralgo, P. (1978). En *Historia de la medicina* (pág. 2). Barcelona: Salvat Editores, S.A.
- Linton, J. D. (2012). Introduction to the field of nanotechnology ethics and policy. *Journal of Business Ethics*, 547-549.

- López-Carrillo, L. T.-S.-M.-R. (2014). Utilización correcta de las técnicas de detección de cáncer de mama en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, 538-564.
- Martínez-Carpio, P. A. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de Oncología*, 184-191.
- Méndez Rojas , M. (2010). Nanomateriales: propiedades, síntesis y caracterización.
- Mollaei, H. &. (2017). Therapeutic Potential of Novel Nano-Based Curcumin Compounds In Vitro and In Vivo. *Pacific Journal of Cancer Prevention: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 885.
- Nanotecnología* . (21 de Octubre de 2013). Obtenido de <http://quezada234.blogspot.mx/2013/10/los-nanomedes-el-genio-ganador-del.html>
- OMS. (2008). *Cáncer de mama: prevención y control*. Obtenido de <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
- OMS. (Febrero de 2017). *Cáncer*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Poole, C. P. (2007). *Introducción a la nanotecnología*. Reverté.
- Portillo Aguilera, G. (2014). Evaluación de la biocompatibilidad y capacidad de transporte de L-Dopa de nanopartículas magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) recubiertas de carboximetilcelulosa (CMC) (Tesis de Maestría). Puebla: UDLAP.
- Prokop, U. (11 de Febrero de 2007). *Wikipedia*. Obtenido de [https://es.wikipedia.org/wiki/Curcuma\\_longa#/media/File:Turmeric\\_\(Curcuma\\_longa\).jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Curcuma_longa#/media/File:Turmeric_(Curcuma_longa).jpg)
- Rodríguez, V. J. (1998). Cáncer de mama. *Revista Peruana de Radiología*, 38-40.
- Society, A. C. (21 de Septiembre de 2017). *Cáncer de Seno* . Obtenido de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>

## 9. ANEXOS

Se realizaron varias pruebas de síntesis para funcionalizar de manera adecuada las nanopartículas de magnetita. Se utilizaron en todos los casos las nanopartículas de magnetita obtenidas por el método co-precipitación previamente descrito. A continuación, se describirán las diferentes síntesis y se presentarán sus correspondientes caracterizaciones:

### 9.1. Funcionalización superficial con curcumina por método mecánico

Primero se pesó 50 mg de magnetita utilizando un vidrio de reloj y se trituroó en el mortero ágata, al trituroarlo se le adiciónó dos gotas de etanol. Después se pesó 5 mg de curcumina utilizando nuevamente un vidrio de reloj. Posteriormente se agregó los 5 mg de curcumina en el mortero ágata junto con los 50 mg de magnetita previamente trituroados, se adiciónó 3 gotas de etanol y se trituroó todo junto por 10 minutos hasta lograr que el material obtuviera un color café. Después se caracterizó el material por FTIR y TGA. Los resultados del TGA nos muestran que las nanopartículas de magnetita no se funcionalizaron de manera correcta debido a que no hay una pérdida de masa significativa de la curcumina.

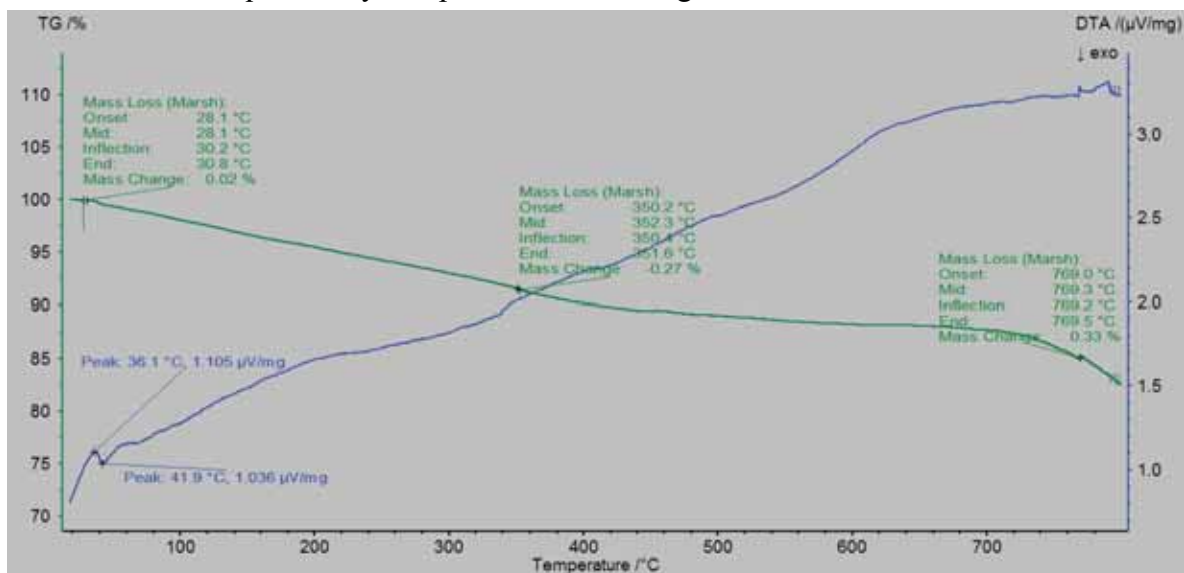


Figura 32: TGA de la funcionalización superficial con curcumina por método mecánico

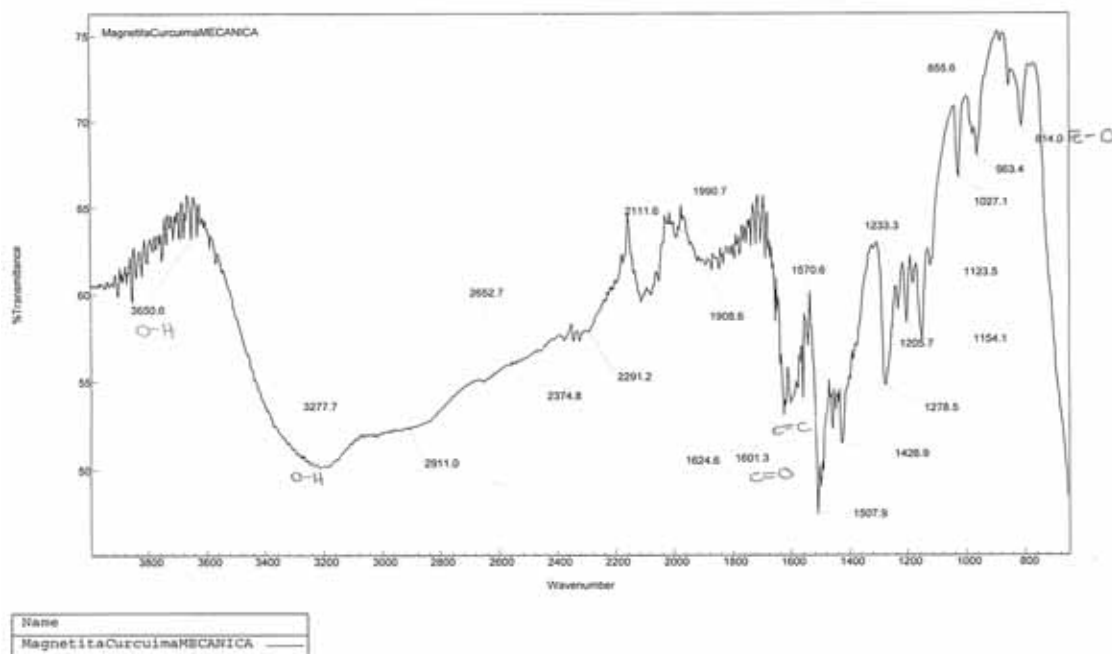


Figura 33: Espectro infrarrojo de la funcionalización superficial con curcumina por método mecánico

## 9.2. Funcionalización superficial con sal de curcumina

Para preparar la sal de curcumina primero se pesó 30 mg de curcumina utilizando un vidrio de reloj, después se agregó la curcumina en un matraz aforado de 10 ml y se aforó utilizando agua destilada. Posterior a esto se puso la solución de curcumina en un vaso de precipitado de 20 ml y se puso agitar a 800 rpm utilizando un microagitador. Luego se adicionaron 400  $\mu$ l de NaOH 5 M, cambiando la solución a un color rojo. Después se pesaron 102 mg de magnetita y se trituró en el mortero ágata adicionando dos gotas de etanol. Posteriormente se agregó la magnetita previamente triturada en un vaso de precipitado de 50 ml, se agregó 10 ml de agua destilada y 2 ml de nuestra solución de sal de curcumina. Se dejó agitando 24 horas utilizando un agitador mecánico. Terminando las 24 horas se recuperó

el material por el método de precipitación magnética utilizando un imán de neodimio y se retiró el sobrenadante. Luego se puso a secar el material a 60°C en un horno con vacío y se dejó 24 horas. Después de secarse se pesó el material obtenido y se obtuvo 62 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina. Posteriormente se caracterizó el material por FTIR y TGA. Los resultados del TGA nos muestran que las nanopartículas de magnetita no se funcionalizaron de manera correcta debido a que no hay una pérdida significativa de masa correspondiente a la curcumina.

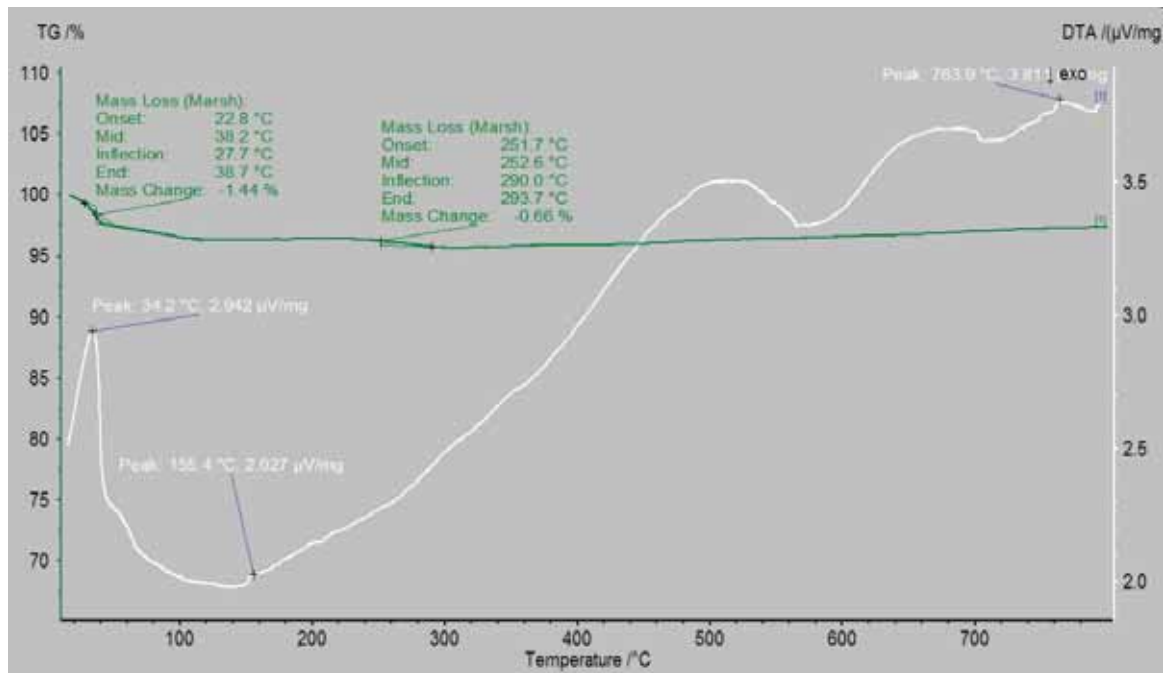


Figura 34: TGA de la funcionalización superficial con sal de curcumina

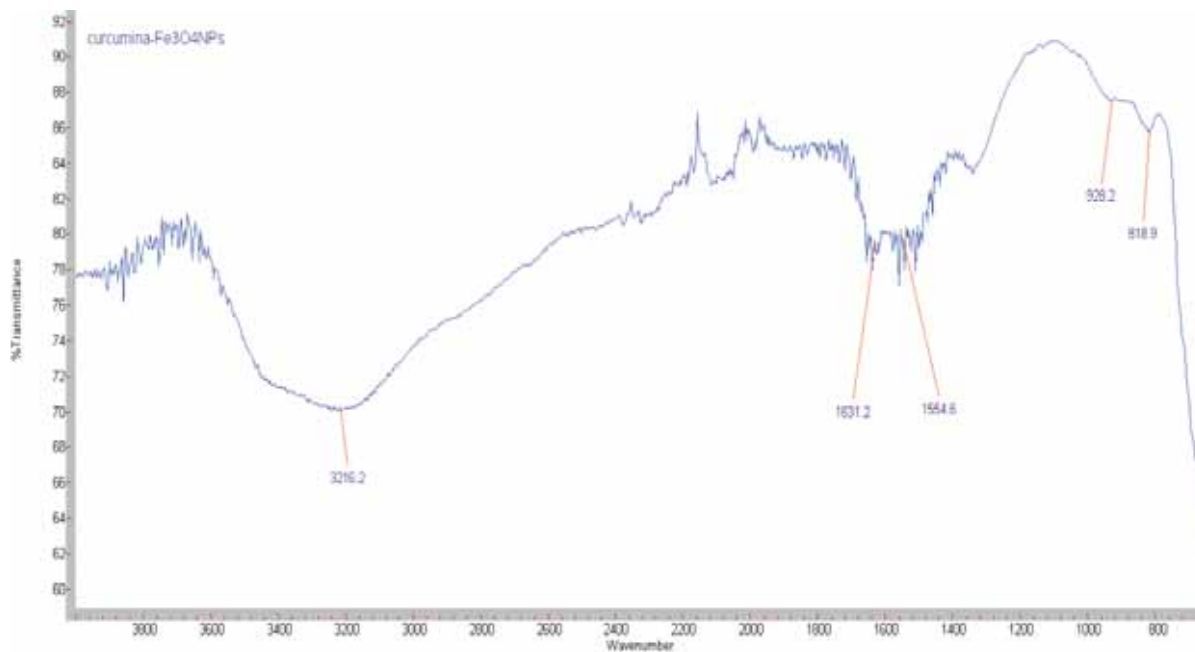


Figura 35: Espectro infrarrojo de la funcionalización superficial con sal de curcumina

### 9.3. Ensayo MTT

Después de realizar los ensayos MTT con las diferentes concentraciones de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80  $\mu\text{g/ml}$ ), a diferentes tiempos (24,48 y 72 horas), se hicieron los cálculos correspondientes y se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 36). Los resultados obtenidos durante el ensayo MTT no son confiables debido a que probablemente por interferencias con la curcumina y/o magnetita, dichos datos no son útiles para interpretar de ellos la viabilidad celular, ya que como podemos ver algunos datos obtenidos no tienen sentido, ya que obtenemos mucho más del 100% de viabilidad y al observar el pozo con el microscopio de contraste de fases nos muestra lo contrario, viendo que ya casi no hay células vivas.

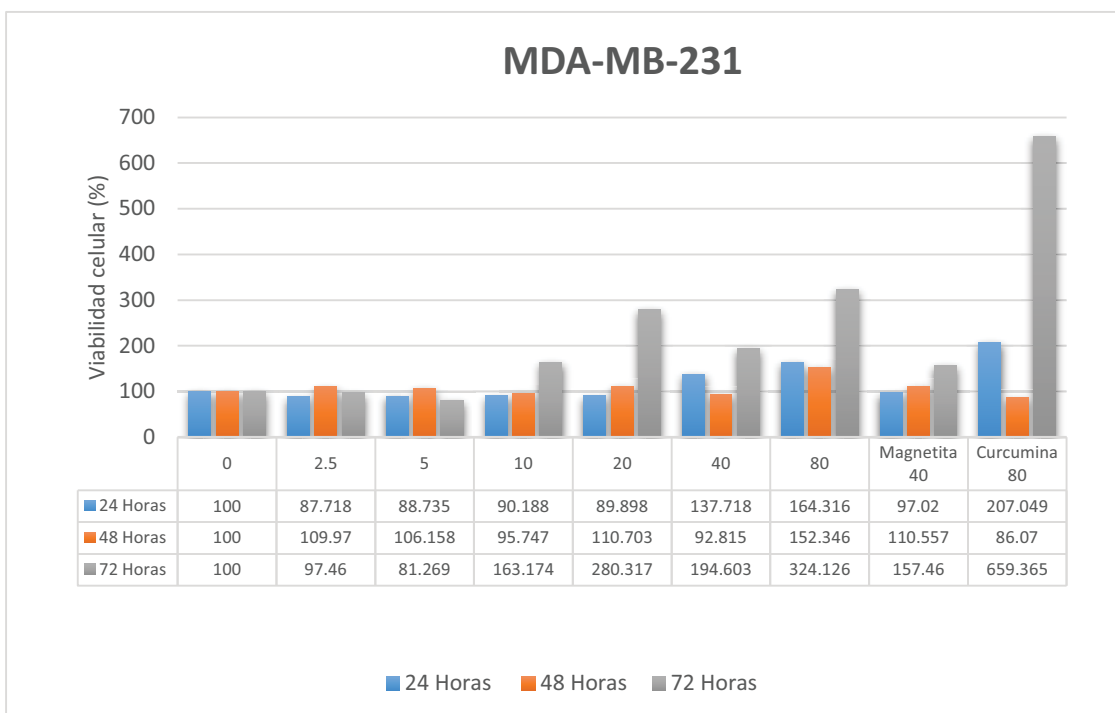


Figura 36: Gráfica de viabilidad celular durante 24, 48 y 72 horas, a diferentes concentraciones de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80  $\mu\text{g/ml}$ )



# Nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina: evaluación de actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama

ANTONIO MINUTTI LÓPEZ SIERRA

---

LIC. EN NANOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA MOLECULAR

**Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas**

**Dr. Dra. Maricruz Anaya Ruiz**

**Dr. Jose Luis Sánchez Salas**

**Dra. Jessica Rosaura Campos Delgado**

12 de Mayo de



# Objetivo general

---

Sintetizar, funcionalizar y caracterizar nanopartículas de magnetita con recubrimiento de curcumina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina) y evaluar su actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer de mama.

# Introducción

---

- La curcumina pertenece a la familia de los curcuminoides, pigmentos polifenólicos los cuales son el principal componente de la Cúrcuma.
- La curcumina es extraída de la raíz de la planta Cúrcuma (*Curcuma longa*) nativa del sur y sureste de Asia tropical.
- La curcumina es muy poco soluble en agua.



(Mollaei, 2017)

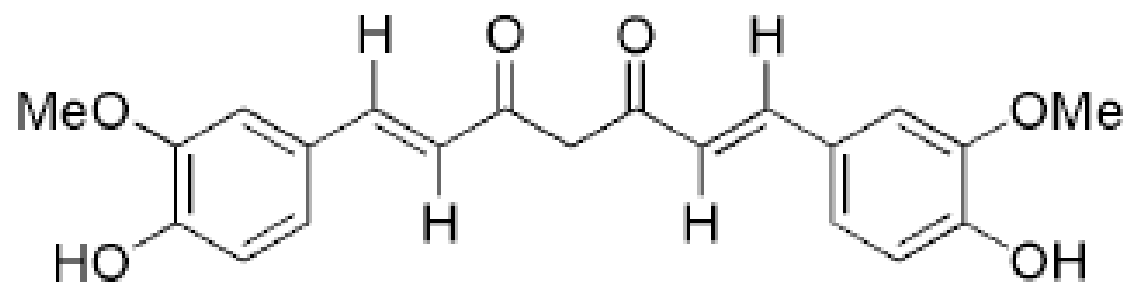
Se utiliza en:

- ❖ Condimentos (curry)
- ❖ Teñir telas de amarillo-naranja (Alzate Ceballos, 2012).

India:

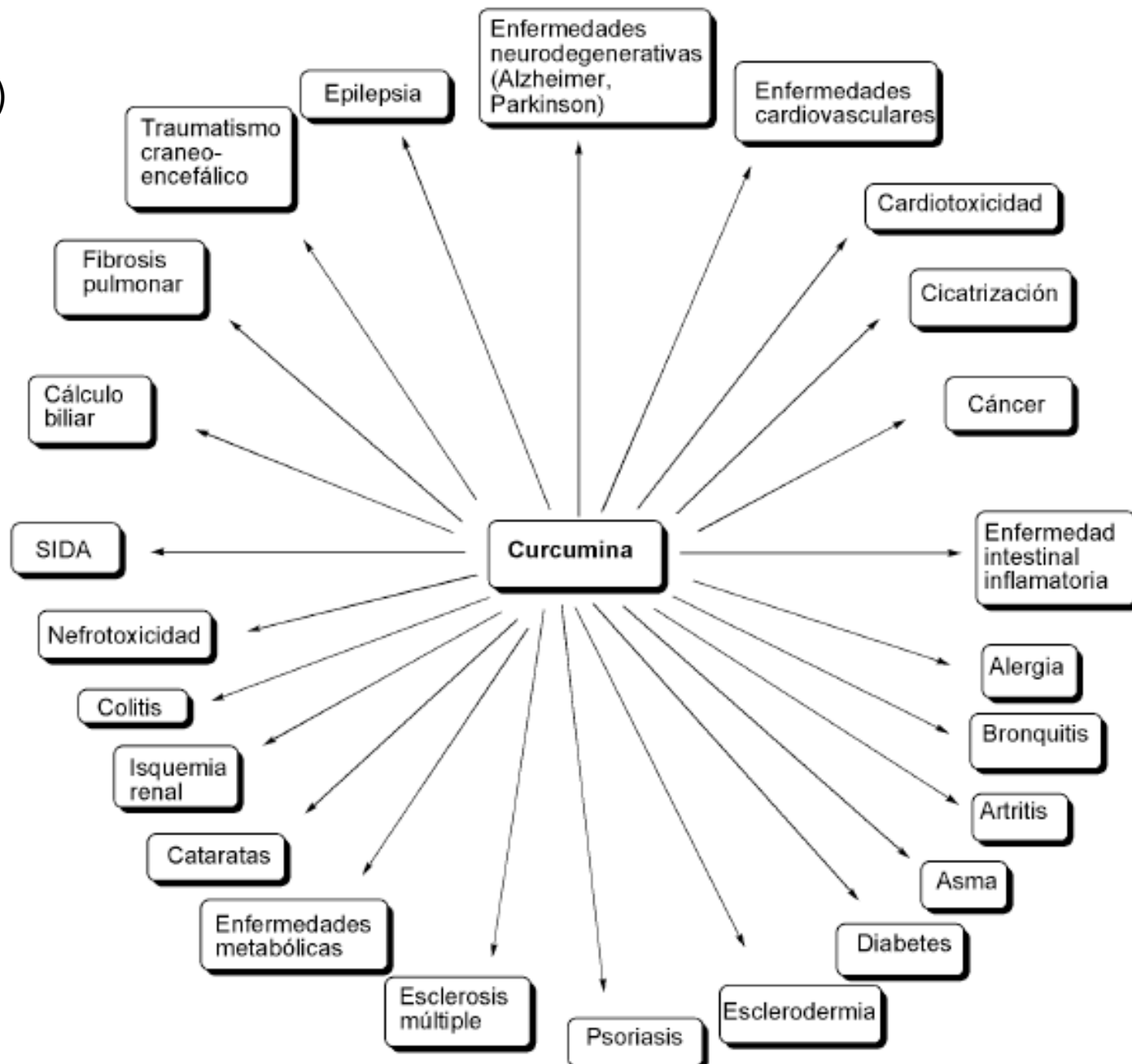
- ❖ Ritos religiosos
- ❖ Medicina tradicional (fiebres, artritis, infecciones y ayuda digestiva)

Asimismo, los griegos la utilizaban por sus beneficios para la salud (González-Albadalejo, 2015)



curcumina

ez-Albadalejo, 2015)



# Mecanismo propuesto de curcumina sobre células cancerígenas

---

- El principal mecanismo de acción de la curcumina sobre las células cancerígenas, es inducir la apoptosis; se cree que esto lo puede lograr de tres formas diferentes:
  - ❖ Vías dependientes de ciclina
  - ❖ Vías independientes del factor de transcripción del factor p53
  - ❖ Vías dependientes del factor de transcripción del factor p53
- El factor p53 en manera resumida regula la apoptosis (Choudhuri T, 2005).
- La curcumina genera la inhibición irreversible de la enzima **tioredoxina reductasa**, debido a la unión covalente en el sitio catalíticamente activo de la enzima, llevando a cabo la apoptosis de las células cancerígenas (Fang J, 2005).

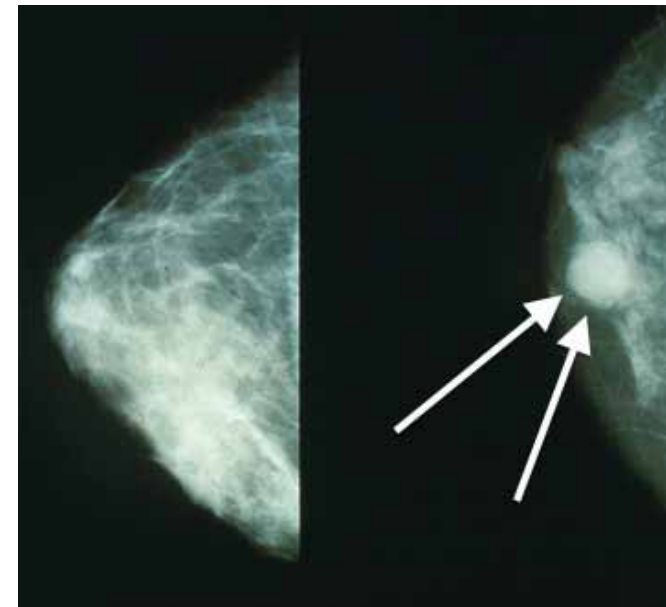
# Cáncer de mama

---

5 → 8.8 millones de defunciones por cáncer y 571,000  
cáncer de seno.

cer de mama → 16% de todos los cánceres femeninos  
mundo (OMS, Cáncer, 2017).

México, es la segunda causa de muerte en mujeres de  
e 30 y 54 años y desde 2006 constituye la principal  
a de muerte por cáncer en mujeres (López-Carrillo,  
4).



# Antecedentes

---

La búsqueda en la base de datos *ScienceDirect* resultó en 11,750 artículos de investigación (González-Albadalejo, 2015).

En el 2011 se sintetizaron nanopartículas de magnetita con curcumina y ácido dodecanoico adsorbidos en su exterior, las cuales probaron inhibir la proliferación de las células de melanoma humano A-MEL-37 (de Souza, 2011).



Nanopartículas magnéticas como las de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) son de gran interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones:

Transporte de drogas terapéuticas

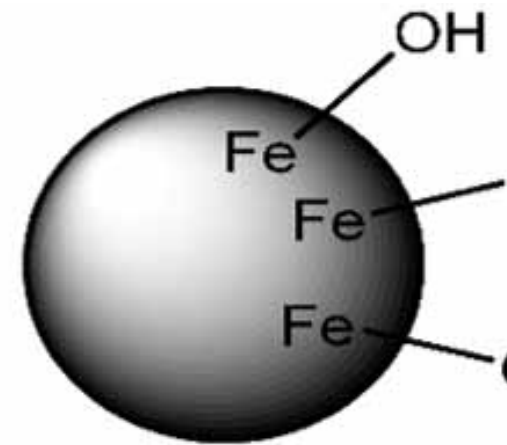
Mejorar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua

Modificar la farmacocinética

Aumentar la vida media del fármaco al reducir la inmunogenicidad

Mejorar la biodisponibilidad

Consideradas como una buena opción para ser acarreadoras de fármacos ya que también se ha demostrado que las células fácilmente las absorben por medio de la endocitosis (de Souza, 2008).





# Justificación

---

tratamiento cáncer de mama: quimioterapia, radioterapia y extirpación de la mama.

secuelas o pueden empeorar su calidad de vida.

Nanopartículas de magnetita funcionalizadas con curcumina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina) constituye un vehículo ideal para este padecimiento, siendo un sistema biocompatible.



# Objetivos

---

1. Sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina por el método de co-precipitación y caracterizarlas por FTIR, TGA, SEM, STEM y DLS.
2. Mejorar la solubilidad de la curcumina utilizando nanopartículas de magnetita.
3. Evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina en cultivos de células de cáncer de mama (células MDA-MB-231).

# Procedimiento general

---

Sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina por el método de co-precipitación

Caracterizar las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina por FTIR, TGA, SEM, STEM y DLS.

Evaluar la actividad citotóxica de las nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina en cultivos de células de cáncer de mama (células MDA-MB-231).

# Materiales y Métodos

# Síntesis de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina

1. Fe<sup>2+</sup> 0.2 M a 1000 rpm durante 30 minutos

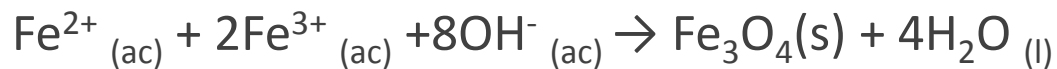
2. Fe<sup>3+</sup> 0.1 M a 1000 rpm durante 30 minutos

3. Fe<sup>2+</sup> 0.2 M + FeCl<sub>2</sub> 0.1 M a 1000 rpm por 5 minutos → 20 ml de NH<sub>4</sub>OH (10%) → agitación a 1000 rpm durante 1 hora y media

4. Precipitar magnéticamente

5. Lavar con agua y etanol

6. Secar al horno de vacío a 60°C durante 72 hrs



(Portillo Aguilera, 2010)

4 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  + 65 mg curcumina + 10 ml agua  $\rightarrow$  matraz bola de 50 ml

Matraz bola  $\rightarrow$  baño maría en vaso de precipitado con 250 ml de agua a 40°C

agitación durante 3 días a 1000 rpm

precipitar magnéticamente

secar al horno de vacío a 60°C durante 24 hrs



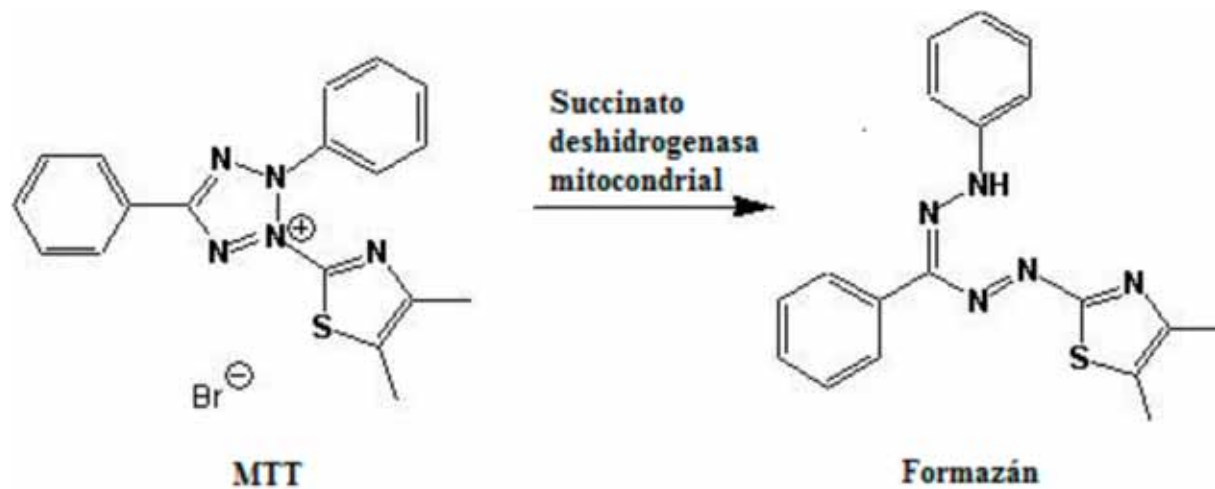
# Caracterización

- FTIR
- TGA/DTA
- DLS
- SEM/STEM



# Principio Ensayo MTT

- Ensayo colorimétrico que mide la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la succinato deshidrogenasa mitocondrial.
- El MTT entra a la mitocondria donde se reduce a formazán, un producto color púrpura e insoluble (Portillo Aguilera, 2014).





# Ensayo MTT

---

- Línea celular MDA-MB-231
- 3 placas de 96 pozos →  $1 \times 10^4$  células por pozo → atmósfera a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>
- Después de 24 hrs → medio con magnetita, curcumina y nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@curcumina (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80 µg/ml) → cada pozo se llevó a 200 µl
- 3 diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas
- Después de cada tiempo → se retira el medio y se lavan las células con 50 µl de PBS → se tomaron fotografías de cada pozo con un microscopio de contraste de fases con el objetivo 20X
- Se retira el PBS y se agrega 37 µl de una solución de trabajo [10% MTT (5 mg/ml), suero fetal bovino 7%, antibiótico (penicilina/estreptomicina) y el resto de PBS]

- Incubar las células por 3 hrs a oscuras en una atmósfera a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>
- Después se agregó 70 µl de DMSO a cada pozo y se agitaron durante 5 minutos a 475 rpm
- Posteriormente se midió la absorbancia a 550 nm y 620 nm en el espectrofotómetro
- La viabilidad celular (%) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left( \frac{\text{valor problema} - \text{valor del blanco}}{\text{valor control}} \right) \times 100$$

# Resultados

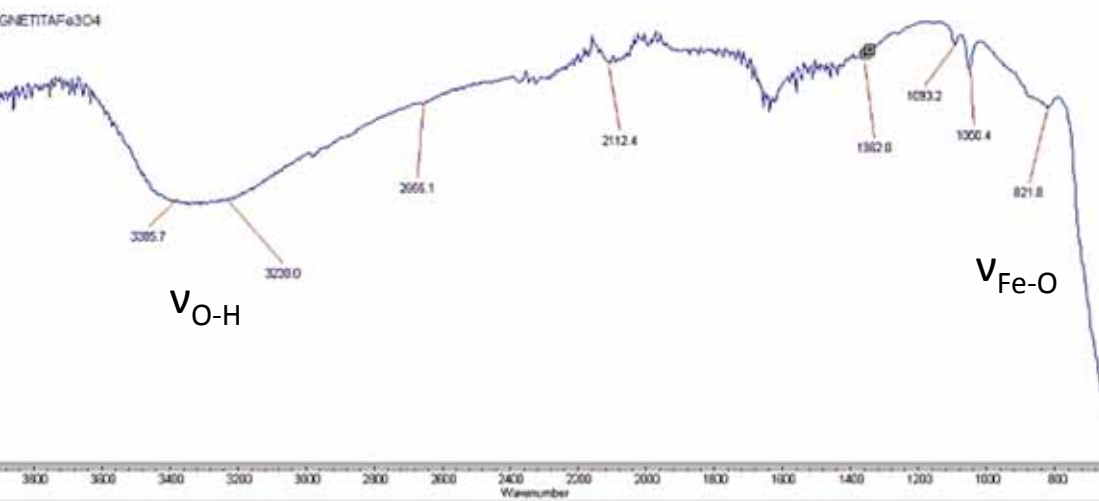
# Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina

---

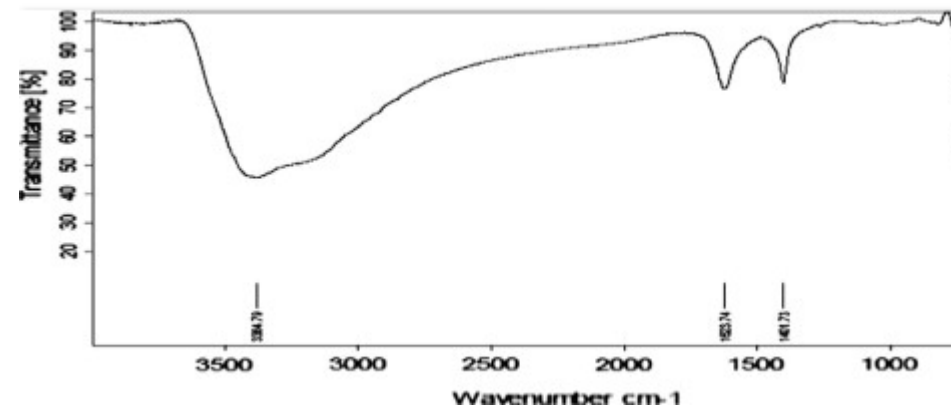
- 118 mg de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ curcumina, lo cual representa un rendimiento del **91%**



# Caracterización FTIR



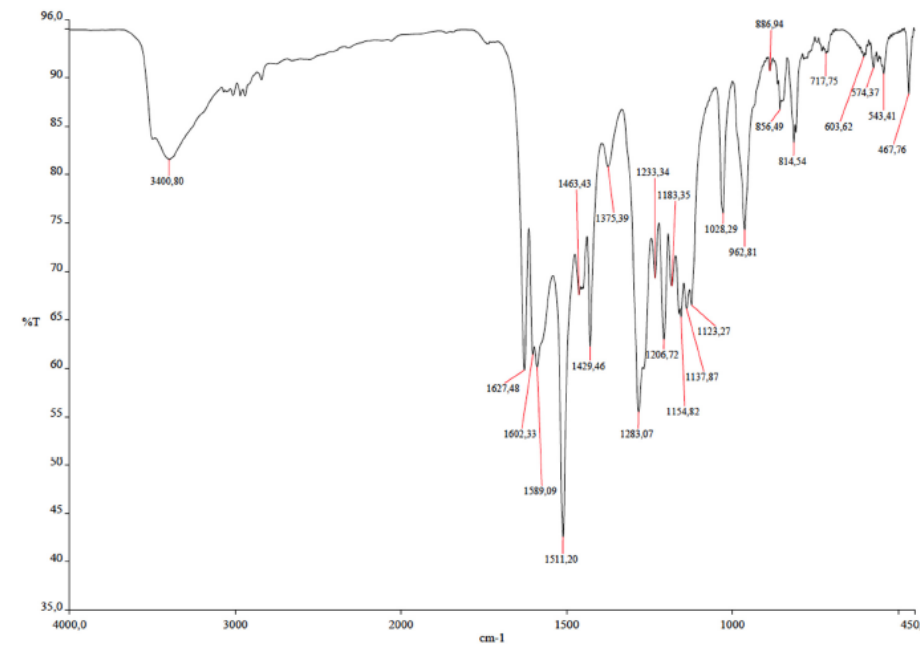
Magnetita



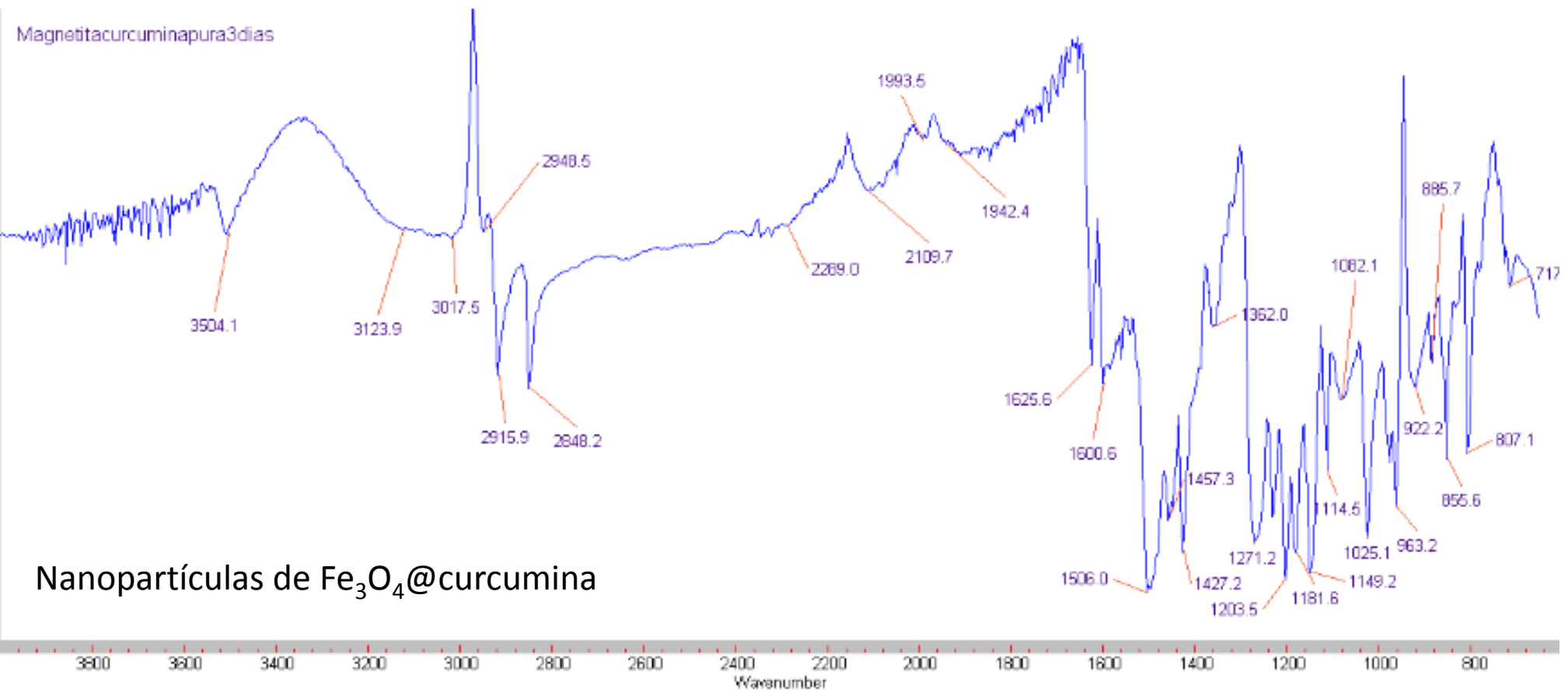
# Caracterización FTIR



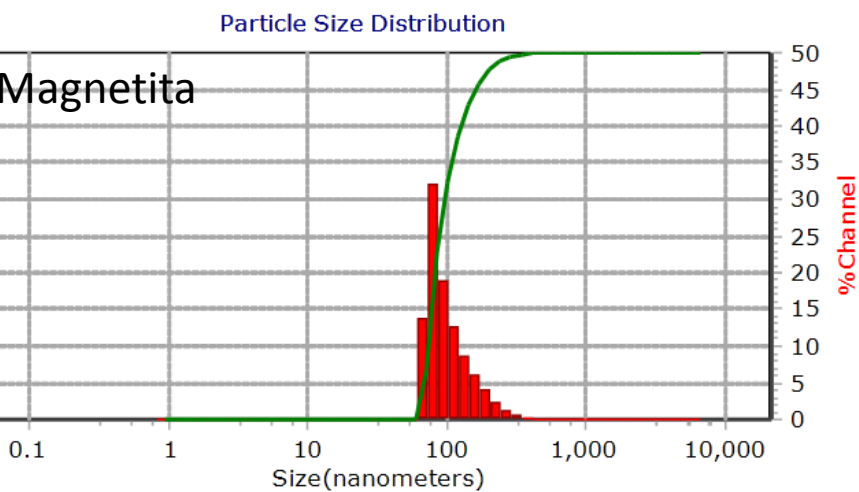
Curcumina



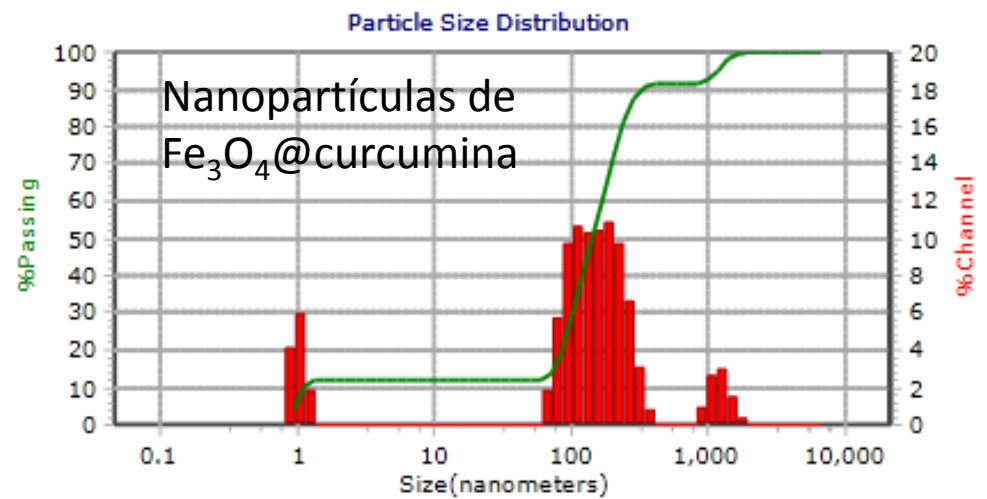
# Caracterización FTIR



# Caracterización DLS



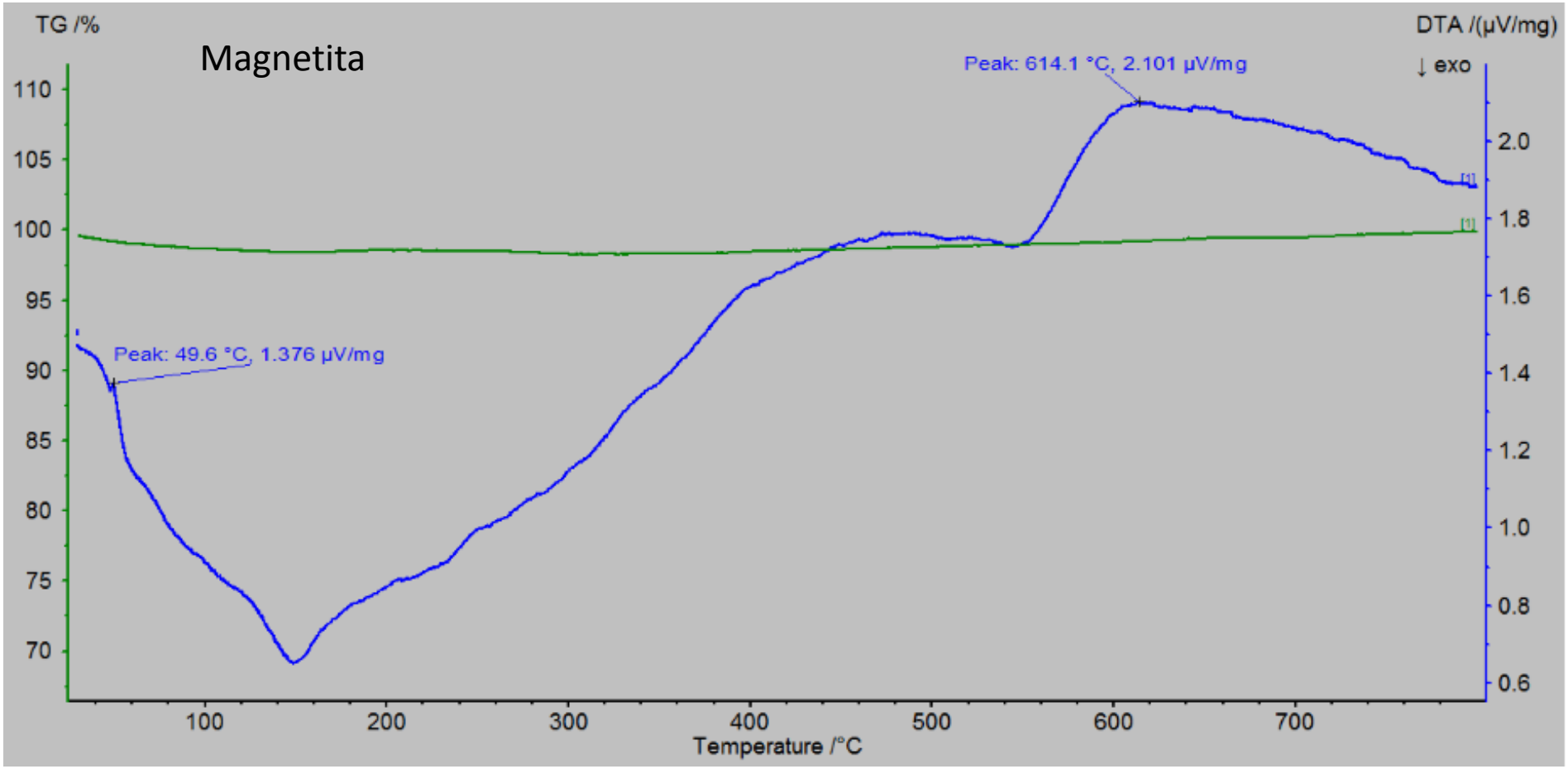
Peaks Summary		
Dia(nm)	Vol%	Width
88.6	100	65.5



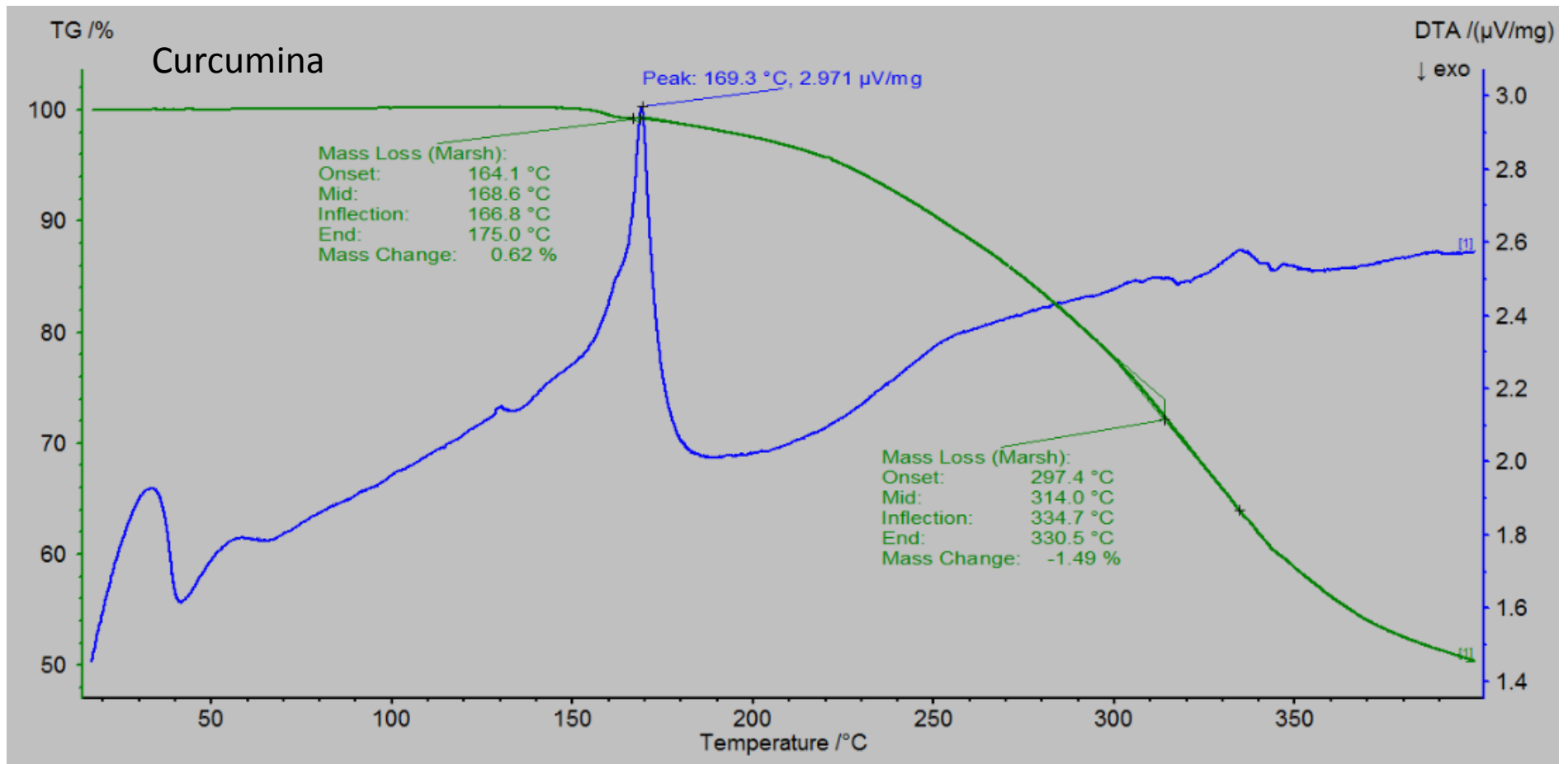
Peaks Summary		
Dia(nm)	Vol%	Width
1,213	8.4	
190.9	55.9	
101.8	27.9	
1.3	7.8	



# Caracterización TGA/DTA

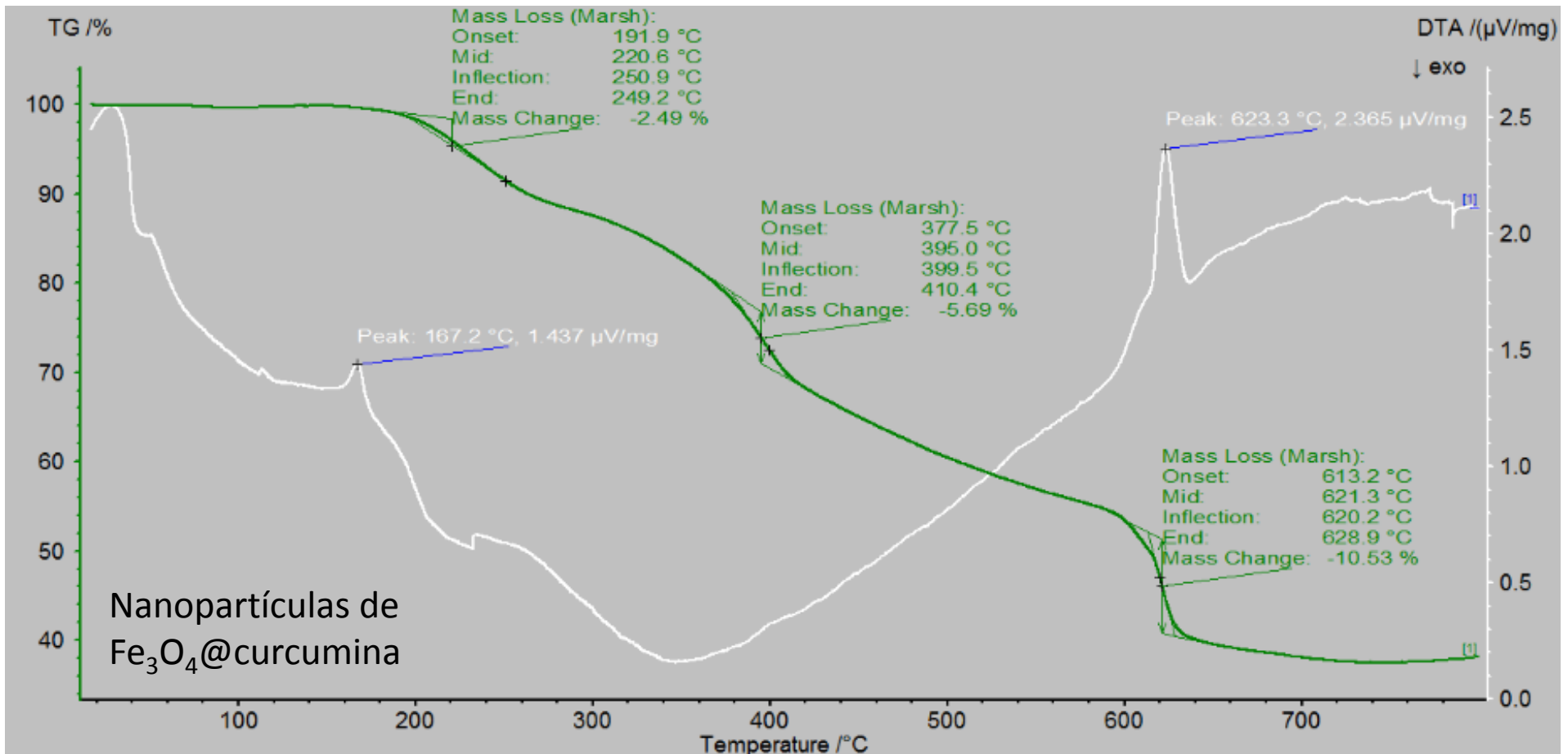


# Caracterización TGA/DTA



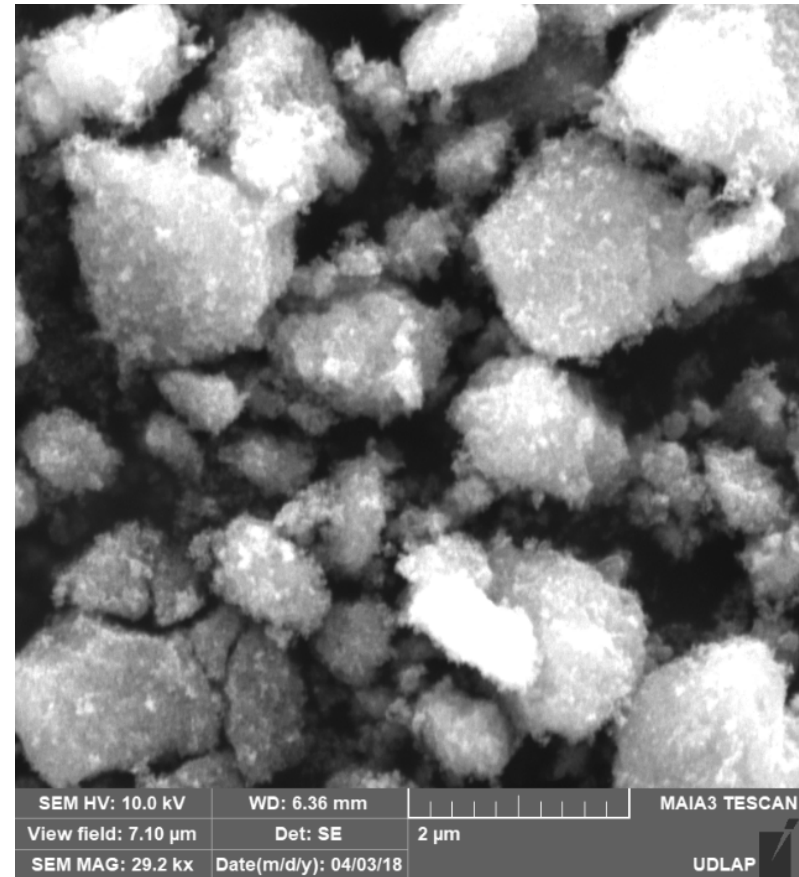
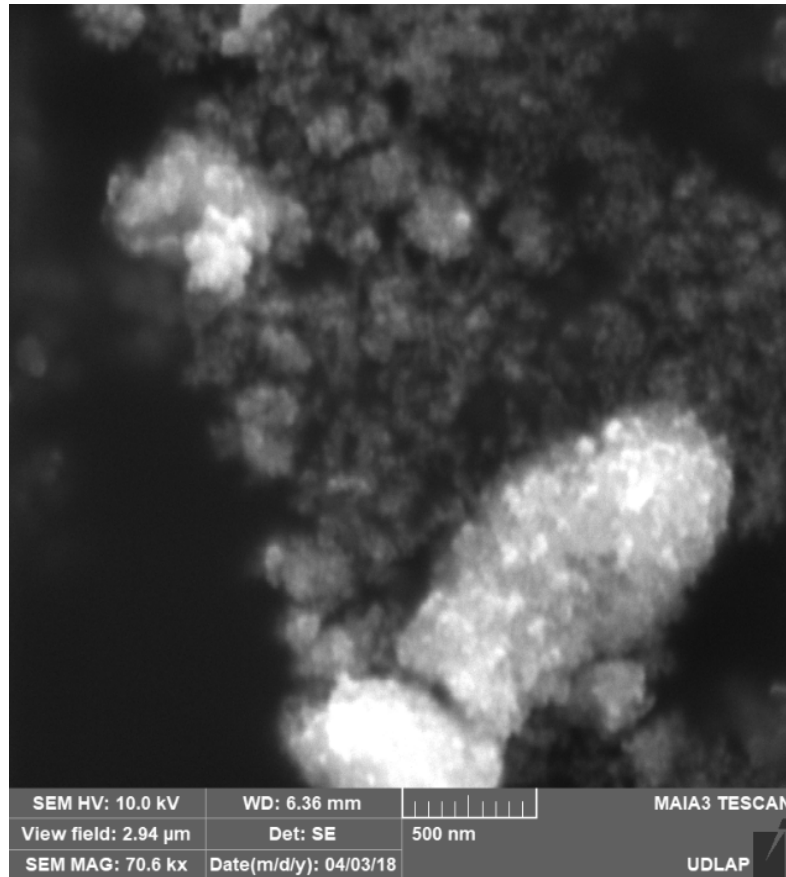
# Caracterización TGA/DTA

Total curcumina  
pérdida es de 18.71%,  
superficial 16.22%



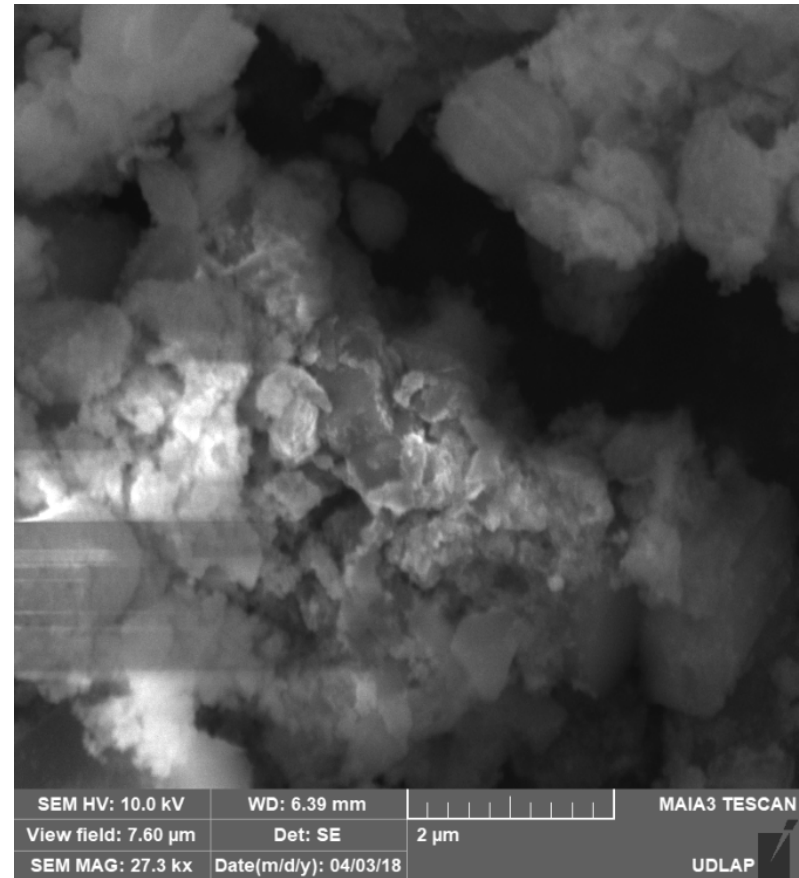
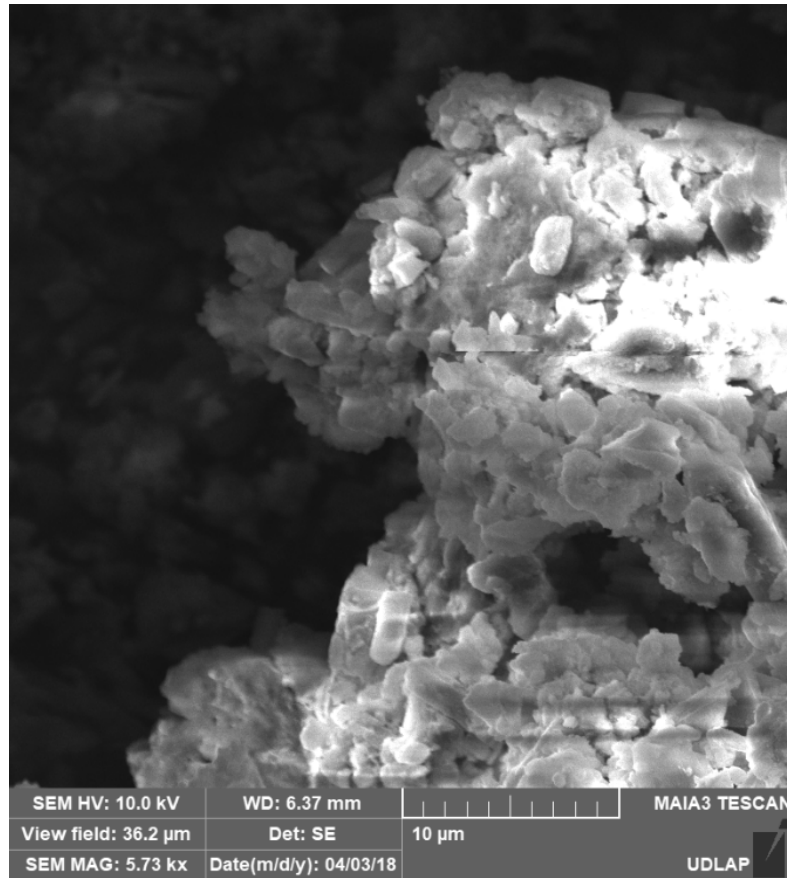
# Caracterización SEM

Micrografías SEM de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$



# Caracterización SEM

Micrografías SEM de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina

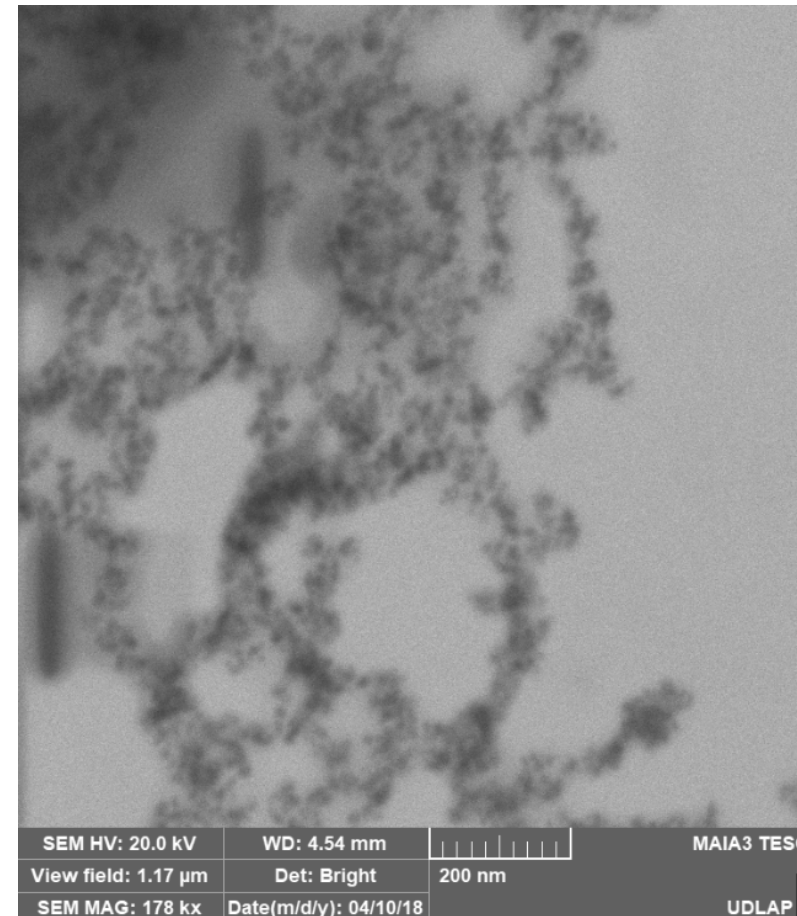
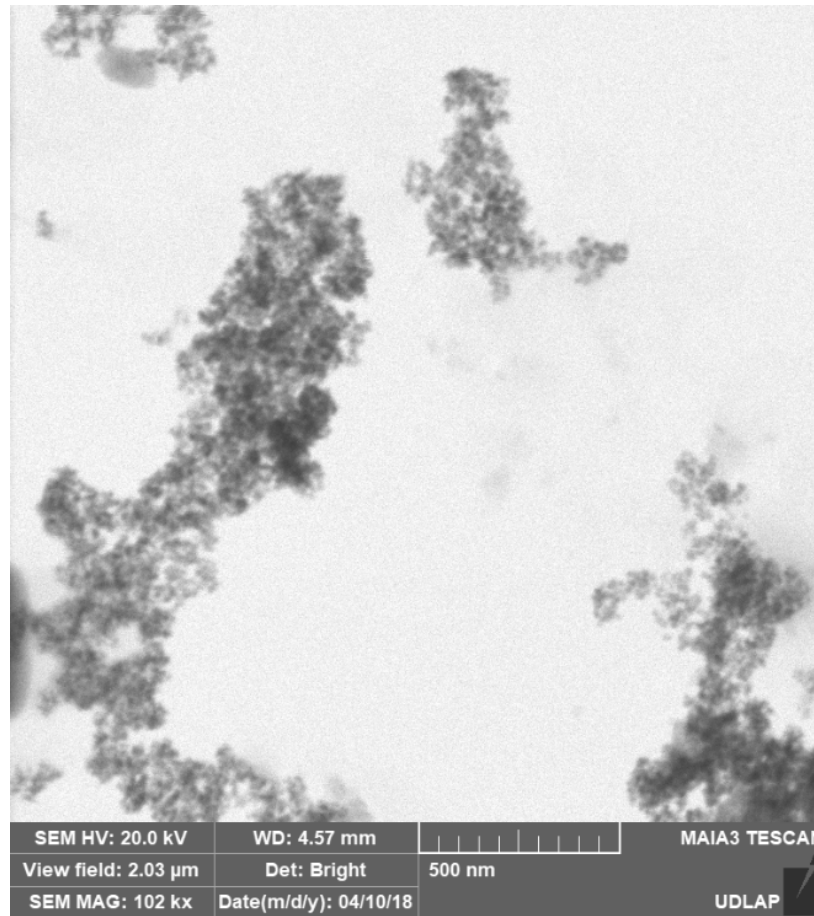


# Caracterización STEM

Imágenes STEM de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (izquierda) y de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina (derecha)

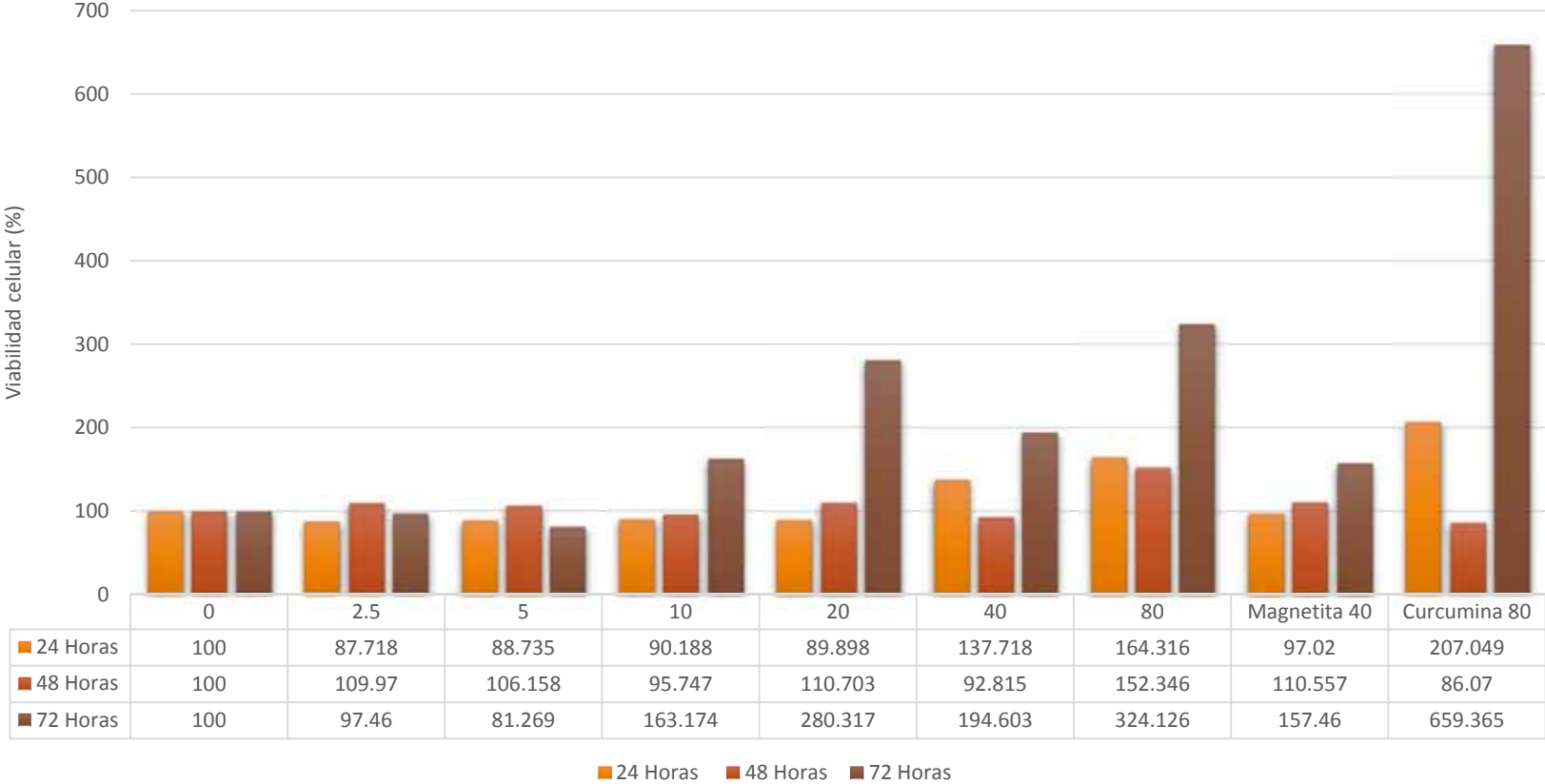
partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  < 20 nm

partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina  $\approx$  40 nm

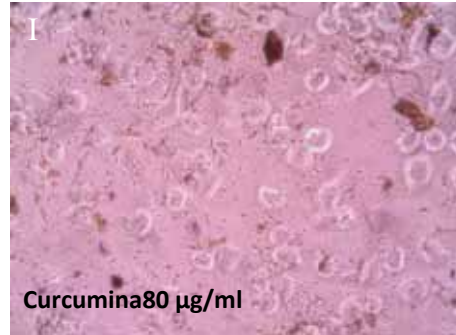
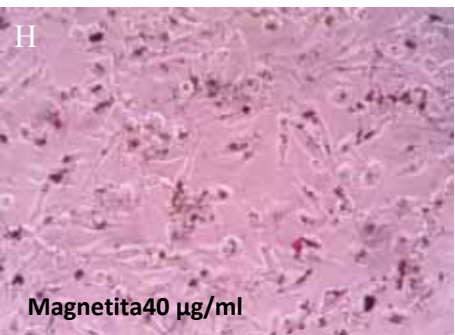
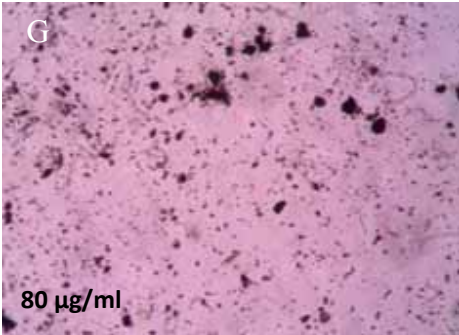
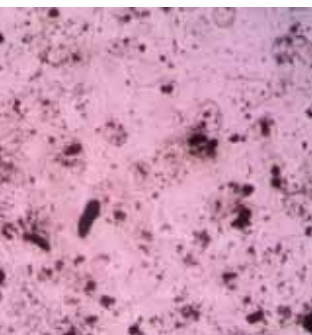
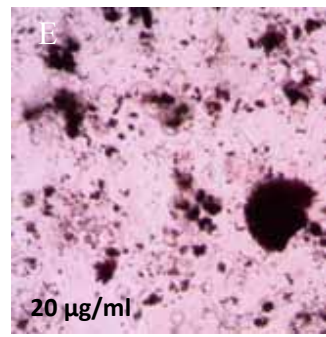
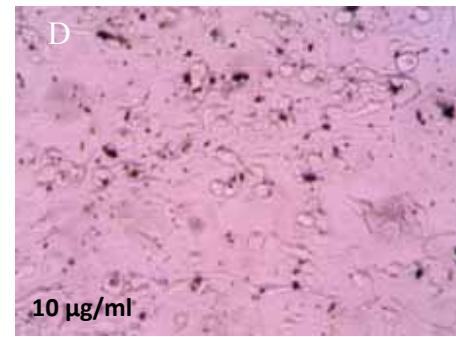
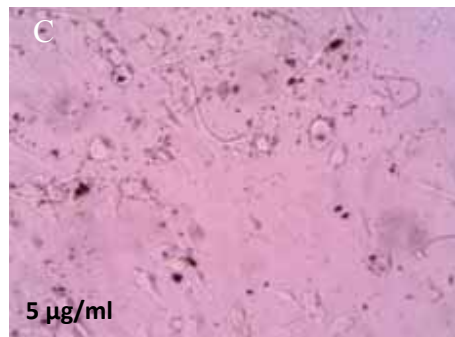
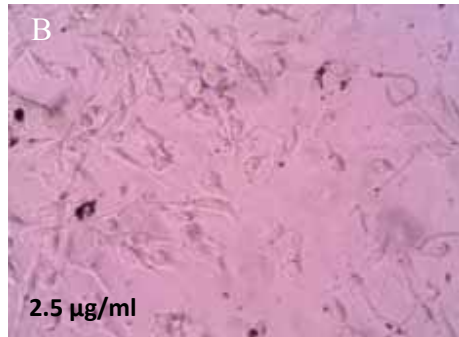


# Ensayo MTT

## MDA-MB-231

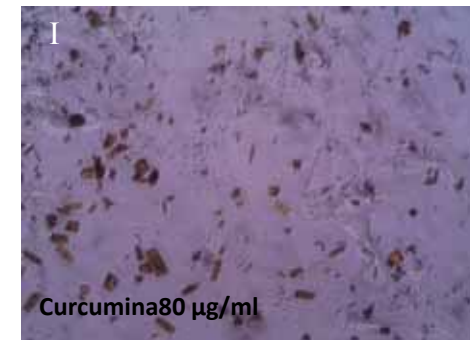
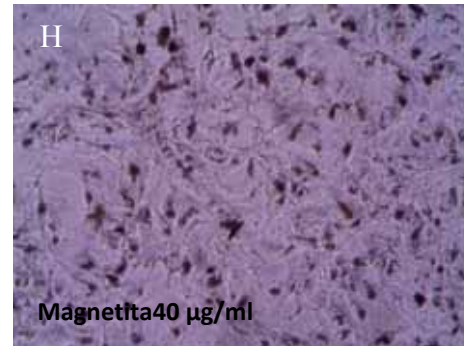
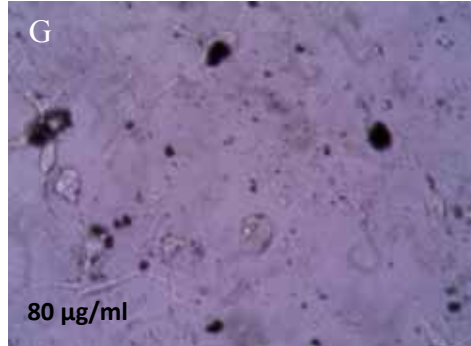
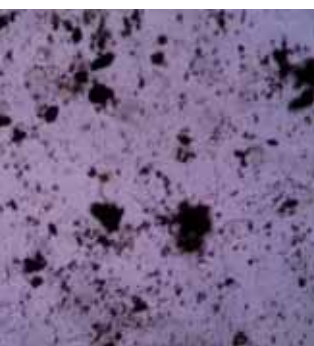
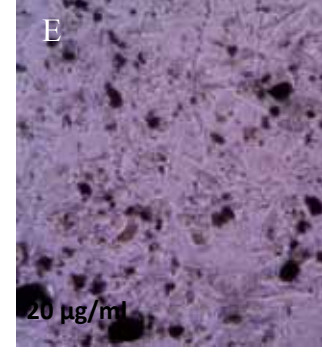
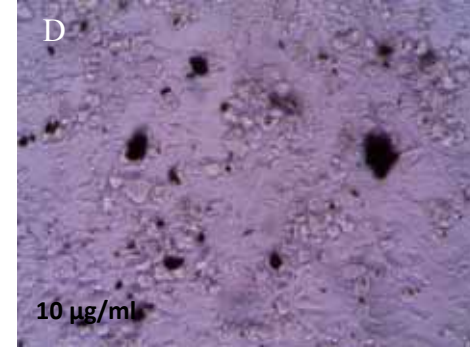
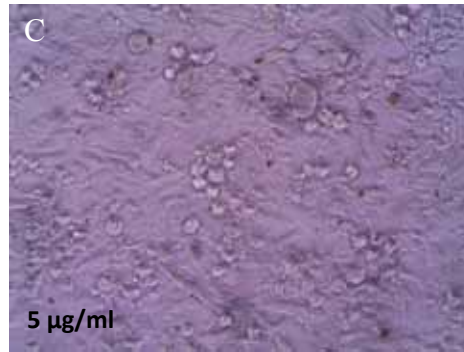
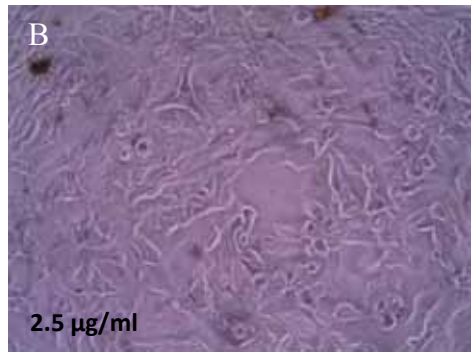
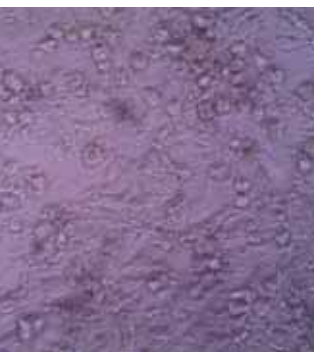


# Células MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de magnetita@curcumina a las 24 horas

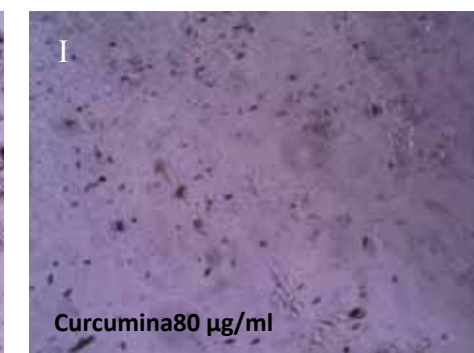
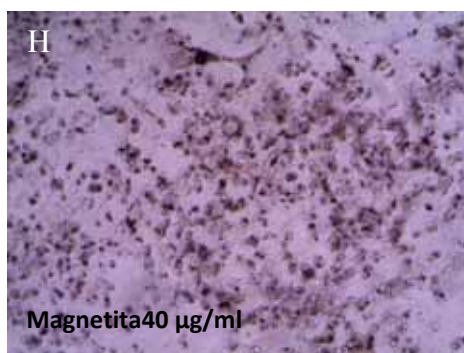
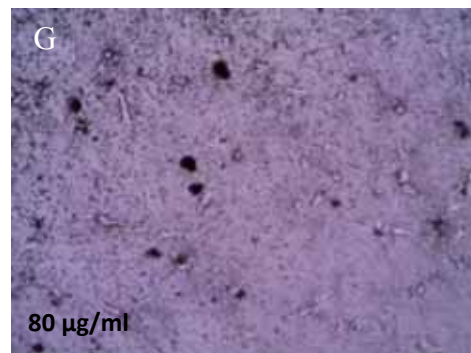
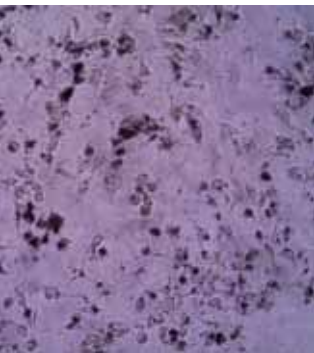
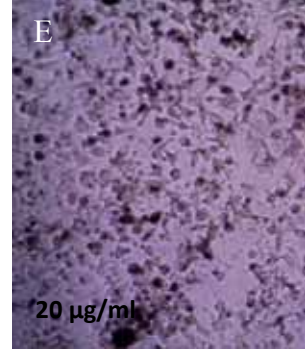
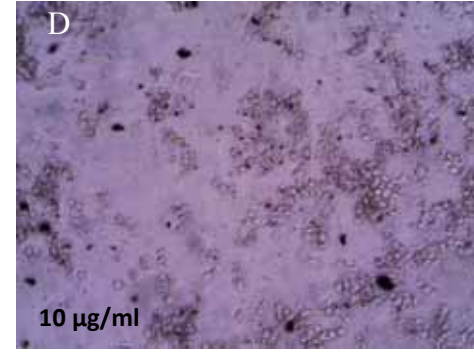
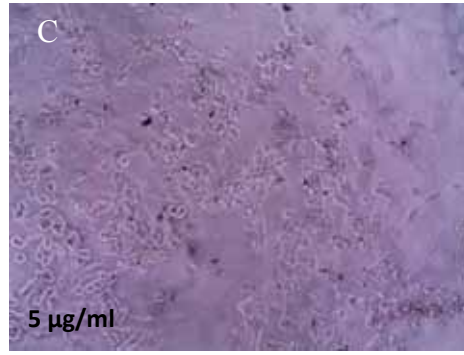
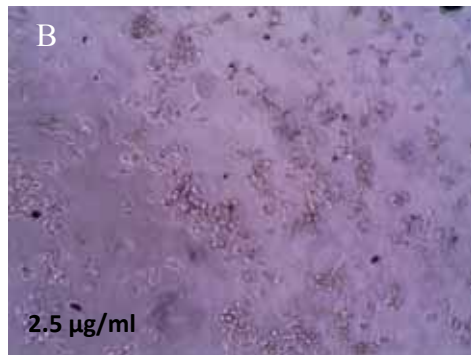




# Células MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de magnetita@curcumina a las 48 horas



# Células MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de magnetita@curcumina a las 72 horas



# Conclusiones

---

Se logró sintetizar magnetita funcionalizada con curcumina.

Se obtuvo un rendimiento de 91% de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina.

Se caracterizó el material sintetizado por FTIR, DLS, TGA, SEM Y STEM.

Se logró mejorar la solubilidad de la curcumina al hacer un sistema de magnetita@curcumina.

Mayor biodisponibilidad de la curcumina.

Actividad anticancerígena de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @curcumina sobre la línea celular MDA-MB-

# Perspectivas

---

- ❖ Realizar más controles en los ensayos celulares.
- ❖ Realizar los ensayos celulares en tiempos más cortos y quizás cambiando el medio de cultivo.
- ❖ Verificar que factores favorecen la supervivencia de las células en los sistemas tratados
- ❖ Medir que concentración es la que se internaliza en las células en diferentes tiempos.
- ❖ Verificar que otros factores favorecen la muerte celular en nuestros experimentos.
- ❖ Realizar un experimento en el IncuCyte para observar en tiempo real como las células internalizan las partículas, así como tener resultados cuantitativos de la proliferación celular.
- ❖ Ver si el material sintetizado es específico ante las células cancerígenas y si es tóxico para células normales (fibroblastos).

# Bibliografía

---

Alzate Ceballos, J. A.-P. (2012). Obtención del complejo ciclodextrina-curcumina y su uso como reemplazante de tartrazina. *Revista Lasallista de Investigación*.

de Souza, F. F. (2011). Curcumin associated magnetite nanoparticles inhibit in vitro melanoma cell growth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7603-7610.

González-Albadalejo, J. S. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 278-310.

López-Carrillo, L. T.-S.-M.-R. (2014). Utilización correcta de las técnicas de detección de cáncer de mama en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*, 538-564

Mollaei, H. &. (2017). Therapeutic Potential of Novel Nano-Based Curcumin Compounds In Vitro and In Vivo. *Pacific Journal of Cancer Prevention: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 885.

OMS. (Febrero de 2017). *Cáncer*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Portillo Aguilera, G. (2014). Evaluación de la biocompatibilidad y capacidad de transporte de L-Dopa de nanopartículas magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) recubiertas de carboximetilcelulosa (CMC) (Tesis de Maestría). Puebla: UDLAP.

# Agradecimientos

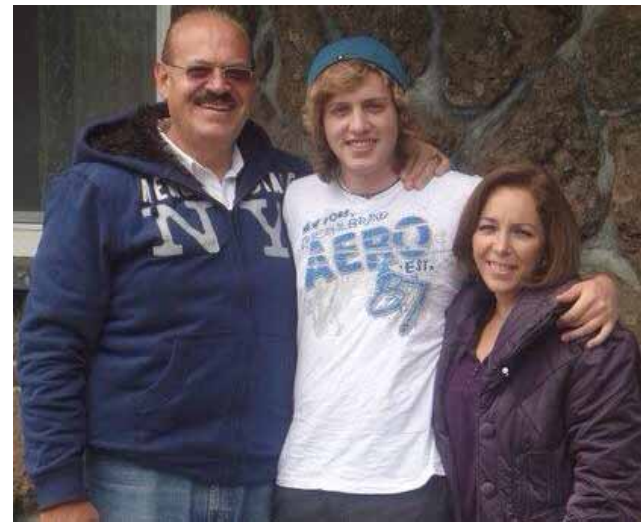
---

**UDLAP**®



# Agradecimientos

---



# Agradecimientos





# Mecanismo propuesto de curcumina sobre células cancerígenas

