



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Estudio de materiales nanoestructurados como potenciales radio-sensibilizadores para terapia de cáncer

María Isabel Galain Kelly

Programa de Maestría en Química

Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Estudio de materiales nanoestructurados como potenciales radio-sensibilizadores para terapia de cáncer

María Isabel Galain Kelly

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magister en Química.

Directoras de Tesis:

Dra. Ivana Aguiar Cantera

Dra. María Eugenia Pérez Barthaburu

Directora Académica:

Dra. Mariella Terán Gretter

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2019

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Eduardo Méndez

Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de
Ciencia, Universidad de la República, Uruguay

Dr. Gustavo Mougliá

Área Inmunología de la Facultad de Química,
Universidad de la República, Uruguay

Dr. Valtencir Zucolotto

Grupo de Nanomedicina y Nanotoxicología del
Instituto de Física de São Carlos, Universidad de
São Paulo, Brasil

Montevideo – Uruguay

Noviembre de 2019

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Mariella Terán, Ivana Aguiar y María Eugenia Pérez, mis directoras de tesis, por acompañarme a comenzar un tema de investigación nuevo, por apoyarme en cada propuesta, ayudarme en momentos complicados y recorrer este camino con tanto entusiasmo como lo recorrí yo.

Agradezco a mis compañeros de grupo por contribuir en distintas etapas del trabajo. A Álvaro Olivera por las imágenes de microscopías electrónicas de transmisión y a Heinkel Bentos Pereira por los diagramas de difracción de rayos X. A María Elena Cardozo y Emilia Tejería, por estar siempre dispuestas a colaborar con los ensayos in vitro. A Mauricio Rodríguez Chialanza tanto por los análisis de termogravimétricos y calorimetría diferencia de barrido, como por intervenir en la discusión de los resultados obtenidos, brindándome un punto de vista esencial para la interpretación de los mismos. A Ignacio Sierra por cooperar en la interpretación de los resultados de espectroscopía Raman. Y al resto de mis compañeros, tanto del Área Radioquímica de la Facultad de Química como del Departamento de Desarrollo Tecnológico del CURE-Rocha, especialmente a Maia Mombrú por todos esos momentos de discusiones y por ayudarme a resolver mis inquietudes.

Agradezco a Douglas Silva por su colaboración en las síntesis realizadas por el método hidrotérmico.

Asimismo agradezco a Ricardo Faccio de la Cátedra de Física de la Facultad de Química por los espectros Raman, a Andrea De León del Área de Físicoquímica de la Facultad de Química por el préstamo del accesorio para reflectancia difusa, a Marcelo Belluzzi por permitirme utilizar el espectrofotómetro UV-Vis, a Paula Arbildi y Gustavo Mougliá del Área de Inmunología de la Facultad de Química por proporcionarme el espacio para la realización de los ensayos in vitro y por las ayuda en la discusión de los resultados, a Walter Vicentino del Instituto de Donación y Trasplante por siempre ser tan servicial y hacer las irradiaciones de las muestras in vitro.

Leopoldo Suescun del Cryssmat-Lab de la Cátedra de Física de la Facultad de Química por la ayuda en la interpretación de los diagramas de difracción de rayos X.

También agradezco a Adislaine Mansano, Edson Comparetti y Valtencir Zucolotto del Grupo de Nanomedicina y Nanotoxicología del IFSC-USP, por permitirme realizar estudios toxicológicos en su laboratorio y compartir conmigo sus conocimientos.

Agradezco también a la ANII, a CSIC y a PEDECIBA por el apoyo económico que brindaron para realizar este trabajo.

Por último agradezco a mi familia y mis amigos por ese apoyo incondicional que me permite superar cualquier obstáculo, por acompañarme en todo momento y por mostrar siempre interés en los avances de mi trabajo, aunque el tema escape a su área de conocimiento.

Resumen

El objetivo de esta tesis de maestría fue el desarrollo de nanomateriales con propiedades aptas para ser utilizados como sensibilizadores en radioterapia. En principio, se estudió la síntesis de sulfuro de bismuto (Bi_2S_3) de tamaño nanométrico, y el recubrimiento de las partículas obtenidas por un agente biocompatible. Las síntesis se realizaron mediante dos métodos: el método hidrotérmico y el método “hot injection”. Mediante el método hidrotérmico se obtuvieron estructuras de Bi_2S_3 , de morfología de varilla fundamentalmente y que en algunos casos presentaron ancho de tamaño nanométrico. Las estructuras obtenidas con este método no presentaban las características morfológicas adecuadas para ser utilizadas como radiosensibilizadores, por lo tanto no se continuó por esta vía, no obstante los resultados obtenidos son alentadores para realizar futuras investigaciones. Por otro lado, con la síntesis por el método “hot injection” se lograron sintetizar nanopartículas de Bi_2S_3 de diferentes morfologías y tamaños variados. Además, las mismas fueron ligadas con un polímero (PVP), para mejorar su biocompatibilidad. Para estudiar la posibilidad de internalización de las nanopartículas por vía sanguínea, se estudió la estabilidad de las suspensiones de nanopartículas en distintos solventes, obteniéndose como resultado que las mismas son estables en aquellos solventes que presentaban contenidos proteicos, lo que permitiría ayudar a la circulación de las nanopartículas en el torrente sanguíneo. El estudio del uso de las nanopartículas se realizó evaluando dos grandes áreas. Por un lado se determinó la toxicidad de las nanopartículas mediante estudios de citotoxicidad en células de cáncer de mama MCF7 y estudios de ecotoxicidad aguda en cladóceros *Daphnia Magna*. Los resultados arrojados por estos estudios indicaron que las nanopartículas sintetizadas no presentan citotoxicidad hasta una concentración de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y hasta una concentración de 100 mg/L no presentaron ecotoxicidad aguda. Por otro lado se estudió la sensibilización de las células MCF7 a la radiación gamma en presencia de nanopartículas. Para ello primero se optimizaron los parámetros del análisis (dosis de irradiación y tiempo de lectura del resultado post-irradiación principalmente), y se obtuvo como resultado que con una dosis de 2 Gy y un tiempo de lectura post-irradiación de 48

hs se lograba obtener resultados adecuados para determinar la eficiencia de las nanopartículas como radiosensibilizadores. La segunda etapa se realizó incubando células MCF7 con y sin nanopartículas, las cuales fueron irradiadas con un irradiador que contenía una fuente de ^{60}Co . Los resultados obtenidos demostraron que las nanopartículas sintetizadas permiten obtener un 38% más de muerte celular que cuando las mismas no están presentes en el momento de la irradiación celular.

En suma, en esta maestría se logró completar todas las etapas referentes a la obtención de nanopartículas biocompatibles de Bi_2S_3 , y la evaluación primaria de su utilización como sensibilizador para radiación gamma en células de cáncer de mama. Al mismo tiempo, y por indicarse del primer trabajo en este tema que se desarrolla en el Área Radioquímica de la Facultad de Química, abre camino a nuevos trabajos de investigación, que pueden emplear nuevos materiales para esta aplicación o profundizar en cada uno de los ítems que este trabajo abordó, produciéndose así trabajos específicos, que permiten especializaciones temáticas.

Palabras clave:

Nanopartículas; sulfuro de bismuto; radiosensibilizadores; radioterapia.

Abstract

The aim of this postgraduate thesis was the development of nanomaterials, which can be used as sensitizers in radiotherapy treatment. The synthesis of bismuth sulfide (Bi_2S_3) particles, with nanometer size was studied, and their behavior when coated with a biocompatibility agent as well, through two synthesis methods: hydrothermal and hot injection. The hydrothermal method led to Bi_2S_3 structures, which presented mainly a rod morphology mainly, and some of them showed a nanometric width. The structures obtained by this method did not exhibit the morphological characteristic needed as radiosensitizers, therefore the work was not continued in this way. Nevertheless, the results obtained are encouraging for future investigations. The hot injection method allowed to synthesize, Bi_2S_3 nanoparticles with different morphology and sizes. Moreover, in order to improve their biocompatibility, these nanoparticles were coated to a polymer (PVP), with the purpose of studying the behaviour of nanoparticles by the bloodstream, their stability in diverse solvents was studied. The results indicated that the suspensions were more stable when the solvents had protein components, which may facilitate the blood circulation of the nanoparticles. The potential use of nanoparticles was evaluated two main areas namely, the toxicity of the nanoparticles and their radiosensitization. The toxicity of the nanoparticles was determined by breast cancer cells (MCF7) cytotoxicity studies and *Daphnia magna* cladoceras acute ecotoxicity. These results show that the synthesized nanoparticles evidenced neither cytotoxicity up to a concentration to 2500 $\mu\text{g/mL}$ and up to 100 mg/mL nor acute ecotoxicity. On the other hand, the sensitivity to gamma irradiation of MCF7 cells with and without nanoparticles in the culture was studied. In this case, the parameters were evaluated to determine the assay conditions (mainly irradiation doses and post-irradiation lecture time), and it was found that an adequate efficiency as radiosensitizers can be obtained using a dose of 2 Gy and post-irradiation lecture time of 48 hours. The second part of the experiment was incubating MCF7 cells with and without nanoparticles, afterwards they were irradiated with a ^{60}Co source. The results showed that the use of nanoparticles jointly with radiation achieve a 38% more cells death than the single cell culture.

In conclusion, it was possible to complete all the stages to obtain Bi_2S_3 biocompatible nanoparticles, and a primary evaluation of their use as sensitizers of breast cancer cells to gamma radiation. Meanwhile as this is the first work in this topic, performed in the Radiochemistry Area of Faculty of Chemistry, it leads a new path of research work, that can employ new materials for this use or strengthen items addressed in this postgrade, promoting thereby specific works, which can carry out in topic specializations.

Keywords:

Nanoparticles; bismuth sulfide; radiosensitizers; radiotherapy.

Tabla de Contenidos

Portada.....	1
Portadilla.....	2
Agradecimientos.....	3
Resumen y Palabras clave.....	5
Abstract and Keywords.....	7
Tabla de Contenidos.....	9
1- Introducción.....	13
1.1. El cáncer en el mundo y en Uruguay.....	13
1.1.1. Cifras generales.....	13
1.1.2. Cifras de cáncer mama.....	14
1.1.3. Cifras en Uruguay.....	16
1.2. Tratamiento de cáncer con radioterapia.....	18
1.2.1. Radioterapia como tratamiento de cáncer.....	18
1.2.2. Ventajas y desventajas del uso de la radioterapia.....	19
1.2.3. Principales mejoras en el tratamiento con radioterapia.....	21
1.3. Radiosensibilizadores	23
1.3.1. Generalidades de los radiosensibilizadores.....	23
1.3.2. Radiosensibilizadores nanoestructurados	26
1.4. Sulfuro de Bismuto (Bi_2S_3).....	27
1.4.1. Propiedades y generalidades del Bi_2S_3	27
1.4.2. Usos del Bi_2S_3 en medicina.....	29

2- Parte Experimental.....	31
2.1. Reactivos.....	31
2.2. Equipamiento utilizado.....	32
2.2.1. Caracterización de Nanopartículas.....	32
2.2.2. Lectura de viabilidad celular, irradiación de cultivos y caracterización de clodóceros.....	33
2.3. Síntesis de nanopartículas	34
2.3.1. Síntesis de nanopartículas por el método hidrotérmico.....	34
2.3.2. Síntesis de nanopartículas por el método “hot injection” en medio orgánico.....	36
2.3.2.1. Síntesis de nanopartículas por el método “hot injection” ..	36
2.3.2.2. Cambio de ligando.....	37
2.4. Estudios de estabilidad de nanopartículas en distintos medios.....	38
2.5. Estudios Celulares.....	39
2.5.1. Estudios de Citotoxicidad.....	39
2.5.1.1. Ensayo colorimétrico con MTT.....	39
2.5.1.2. Ensayo colorimétrico utilizando Tripan Blue.....	41
2.5.2. Estudio de Radiosensibilización.....	42
2.5.2.1. Optimización de las condiciones de ensayo.....	42
2.5.2.2. Ensayo empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas.....	43
2.6. Estudios ecotoxicológicos.....	44
3- Resultados y Discusión.....	46
3.1. Síntesis de Nanopartículas de Bi ₂ S ₃ por el método Hidrotérmico	46

3.1.1. Nanopartículas obtenidas por el método Hidrotérmico utilizando PVP como ligando.....	46
3.1.2. Nanopartículas obtenidas por el método Hidrotérmico utilizando PEG como ligando.....	50
3.2. Síntesis de Nanopartículas de Bi ₂ S ₃ por el método “hot injection” en medio orgánico.....	56
3.2.1. Identificación de la fase cristalina de las muestras.....	56
3.2.2. Determinación de la morfología de las muestras.....	62
3.2.3. Identificación del ligando en las muestras.....	72
3.2.3.1. Estudio de presencia de ligandos por medio de espectroscopía IR.....	72
3.2.3.2. Estudio de presencia de ligandos por medio de DSC-TGA.....	75
3.3. Estudio de Estabilidad de las nanopartículas obtenidas por el método “Hot Injection”.....	78
3.4. Ensayos Toxicológicos de las nanopartículas.....	84
3.4.1. Ensayos de citotoxicidad.....	84
3.4.2. Ensayos ecotoxicológicos.....	90
3.5. Estudios de nanopartículas como radiosensibilizadores.....	94
3.5.1. Optimización de parámetros de ensayos.....	94
3.5.2. Ensayo empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas....	97
4- Conclusiones.....	103
5- Trabajo a Futuro.....	105
6- Bibliografía.....	107

1- Introducción

1.1. El cáncer en el mundo y Uruguay

1.1.1. Cifras generales

El cáncer es una enfermedad causada por el crecimiento descontrolado de células producto de diversos estímulos [1]. Esta enfermedad es la segunda causa de muerte más común en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2]. Estas cifras se presentan en la Figura 1, donde se puede observar que en el 2016 las enfermedades no transmisibles (ENT) son la causa del 71% de las muertes mundiales, de las cuales el cáncer representa el 22% de todas las muertes por ENT.

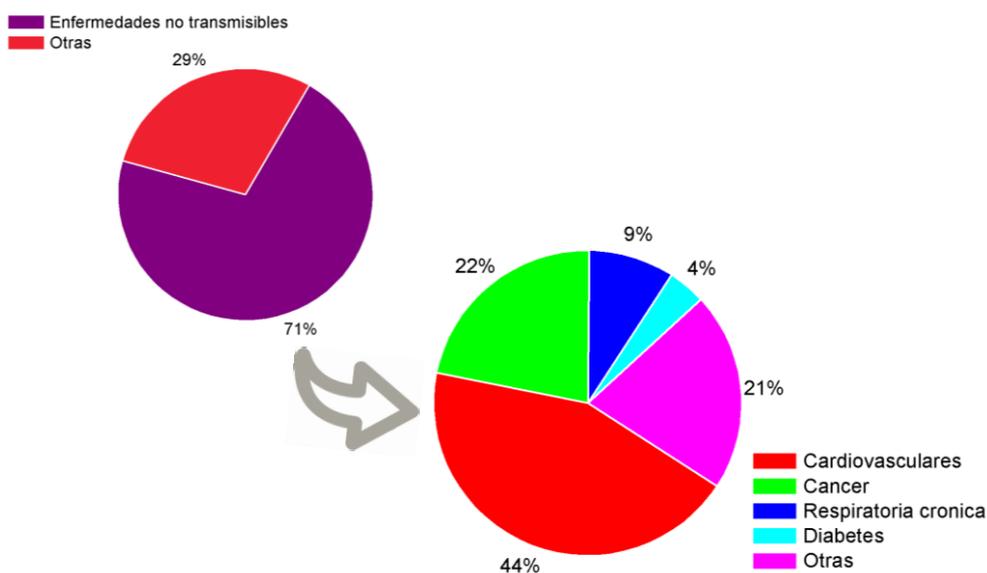


Figura 1: Cifras mundiales de enfermedades no transmisibles de acuerdo al reporte de la OMS realizado en el 2018 [2].

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por su nombre en inglés International Agency for Research on Cancer) en su último reporte estima que la incidencia del cáncer a nivel mundial es de uno de cada cinco hombres y una cada seis mujeres, y que es la causa de muerte de uno de cada ocho hombres y una de cada once

mujeres [3]. En cifras poblacionales esto correspondió a 8.2 millones de muertes por cáncer en el 2012 [4], 9.0 millones en el 2016 [2] y 9.6 millones en el 2018 [3] y se estima que este valor aumentará a 16.4 millones en el 2040. En el caso de la incidencia de cáncer a nivel mundial, correspondió a 14.1 millones de nuevos casos en el 2012 [4] y 18.1 millones en el 2018 [3], y se estima que la estará por encima de los 29 millones en el 2040 [5].

En términos globales los seis principales tipos de cáncer que mayor cifra de nuevos casos tienen son: pulmón, mama, colorrectal, próstata, estómago e hígado, los cuales correspondieron al 54.3% de incidencia y el 56.4% de muerte en el 2012 [4] y el 50.9% de incidencia y el 55.9% de muerte en el 2018 [6]. Estos valores se pueden comprobar en la Figura 2, donde se presentan las gráficas de número de nuevos casos (Figura 3.a) y de mortalidad (Figura 3.b) a nivel mundial para los cánceres más comunes, obtenidas de la base de datos del Observatorio de Cáncer Global (GCO por su nombre en inglés Global Cancer Observatory) de la IARC.

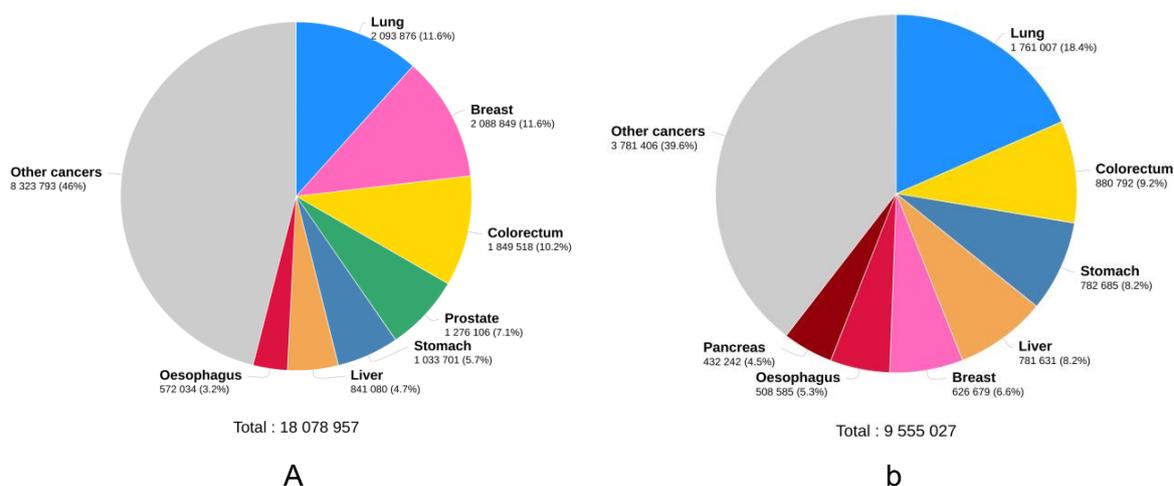


Figura 2: Datos de la GCO-IARC del porcentaje de incidencia (a) y mortalidad (b) de los principales tipo de cáncer a nivel mundial [6].

1.1.2. Cifras de cáncer mama

Como se mencionó anteriormente el cáncer de mama forma parte de los seis tipos de cáncer que mayor número de nuevos casos hay en el mundo. Más específicamente es el

segundo tipo de cáncer más influyente, con un 11.6% del total de los casos mundiales, y el quinto tipo de cáncer con más muertes, con un 6.6% de las muertes totales por cáncer a nivel mundial [7]. El cáncer de mama corresponde al cáncer con más influencia en el 56.2% de los países del mundo y con más mortalidad en el 22% de los países, incluido Uruguay. [8], [9].

Si se evalúa directamente los datos únicamente de mujeres, se observa que para el 84.3% de los países del mundo el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor influencia en mujeres, y en el 56.2% de los países es el causante de las mayorías de las muertes de mujeres por cáncer [10], [11].

El mismo impacto del cáncer de mama para la población femenina se puede observar al analizar el porcentaje de distintos tipos de cáncer que afectan esta población a nivel mundial (Figura 3). En este contexto, al 2018 un 24.2% de la población femenina es afectada por cáncer de mama, y un 15% de la misma muere por esta causa [3].

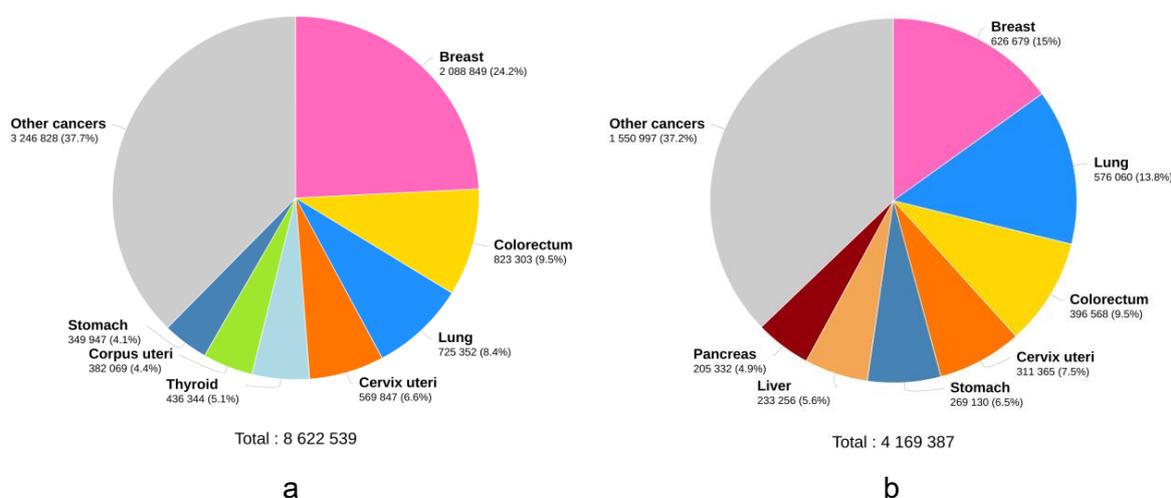


Figura 3: Datos de la GCO-IARC del porcentaje de nuevos casos (a) y de mortalidad (b) de los principales tipo de cáncer a nivel mundial para la población femenina [3].

1.1.3. Cifras en Uruguay

En Uruguay casi un cuarto de las muertes al año son debidas al cáncer, como se puede observar en la Figura 4, donde se presentan las cifras de mortalidad en Uruguay para el 2017 según los valores de estadística vitales del Ministerio de Salud Pública [12].

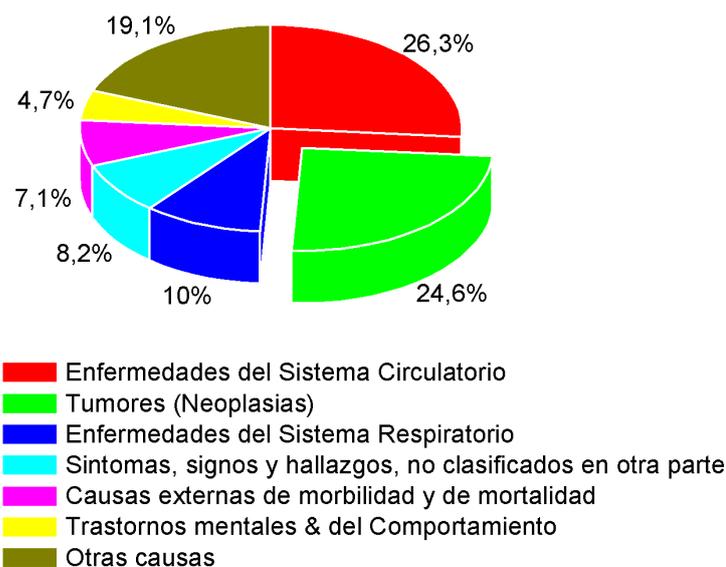


Figura 4: Datos Estadísticos de defunciones en Uruguay en el año 2017, de acuerdo a datos del Ministerio de Salud Pública [12].

Según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer en el período 2010-2014 en el Uruguay se registraron 79716 casos incidentes y se produjeron 39902 muertes por cáncer, lo que da un promedio de 15943 casos incidentes y 7980 muertes al año [13]. Si se compara estos valores con el resto del mundo se puede observar que Uruguay ocupa el quintil de mayor incidencia de la enfermedad, compartido con los países más desarrollados, pero también el de mayor mortalidad, agravando la cuestión aún más.

Si se tienen en cuenta ambos sexos, los tipos de cáncer que tienen más influencia en Uruguay son el cáncer de mama, próstata, pulmón y colorectal, que constituyen el 57% de los casos de muerte por cáncer en el país y corresponden al patrón epidemiológico de cánceres con mayor influencia en países más desarrollados, pero también presenta altos

valores en aquellos tipos de cáncer presentes en países poco desarrollados como son el de esófago, estómago y cuello de útero. En cuanto a la mortalidad en Uruguay el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte, seguido de cerca por el cáncer de mama [13], [14].

Al analizar exclusivamente los valores obtenidos para el sexo femenino (Figuras 5 y 6), se advierte que el tipo de cáncer más influyente en las mujeres uruguayas es el cáncer de mama, con una incidencia del 71.46% y un 20.02% de mortalidad para el período 2011-2015 [15], [16] bajando a 60.3% y 17.5% en el 2018 su influencia y mortalidad respectivamente [14]. Esto muestra un descenso tanto en la influencia como en los casos de mortalidad por este cáncer, pero continúa siendo un tema muy importante para la salud de los uruguayos, haciendo que sea de suma importancia tanto su prevención como su tratamiento.

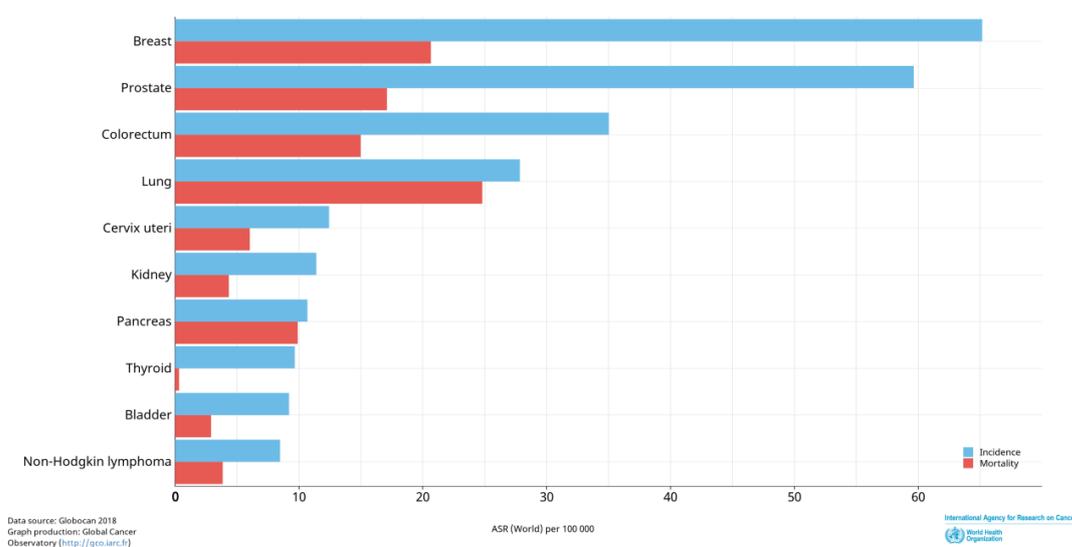


Figura 5: Estimativo de incidencia y mortalidad según los distintos tipos de cáncer en Uruguay, obtenido de la base de datos de la GCO-IARC [14].

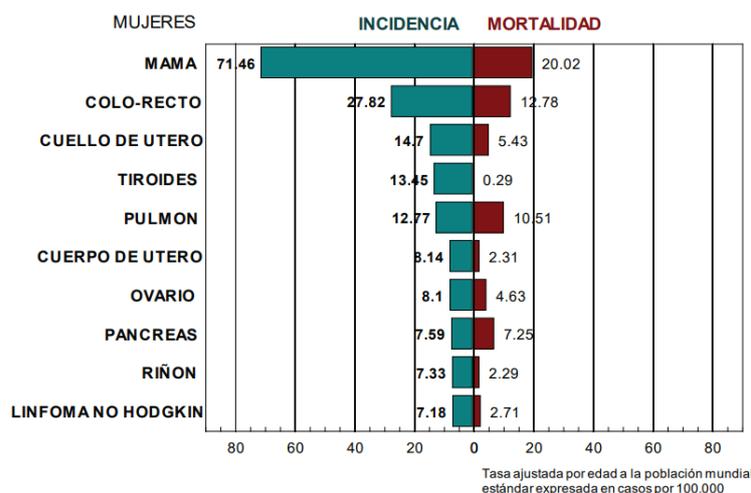


Figura 6: Estimativo de incidencia y mortalidad de mujeres en Uruguay en el período 2011-2015 [15], [16].

1.2. Tratamiento de cáncer con radioterapia

1.2.1. Radioterapia como tratamiento de cáncer

La radioterapia es el principal tratamiento y control para distintos tipos de cáncer, sobre todo aquellos tumores sólidos primarios o producidos por la metástasis de otros tumores, extensiones tumorales microscópicas o en ganglios linfáticos regionales [17]. En muchos casos no solo se utiliza como única herramienta, sino que se combina con otras modalidades para mejorar el efecto del tratamiento. En base a su eficiencia como tratamiento, la radioterapia es una herramienta sugerida como necesaria en el 50-60% de todos los casos de cáncer observados [18], [19], siendo esta estimación avalada por cálculos teóricos, donde el porcentaje de pacientes diagnosticados con cáncer que deberían recibir radioterapia como parte óptima de su tratamiento corresponde al 52,3% [20]. En el caso de Uruguay, la radioterapia es la primera opción de tratamiento para el cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, primeras etapas del cáncer de próstata, y más del 60% de las primeras etapas del cáncer de mama [21].

En el tratamiento por radioterapia el organismo afectado es directamente irradiado de forma externa con radiación que puede ser rayos X, rayos gamma, electrones, neutrones o partículas cargadas [22]. Su efecto se basa en el daño que se produce en moléculas

del sistema biológico por causa de interacción de la radiación con las mismas. Es posible producir la muerte celular de dos maneras distintas dependiendo de si la radiación interacciona directa o indirectamente con objetivos celulares críticos. Cuando el daño se produce en forma directa, la radiación interacciona con las moléculas que conforman las células como son ADN, proteínas, lípidos de membrana, entre otras, causando su ruptura y por ende la muerte celular. Entre todas estas moléculas, el blanco clave es el ADN, considerándose su lesión el principal mecanismo de muerte celular [22]–[24]. Dado que los organismos vivos contienen entre un 75 y 90% de agua, hay una gran probabilidad que la radiación interactúe con ésta, produciendo electrones libres, radicales libres, como H^\bullet y OH^\bullet , especies reactivas del agua, como $\text{H}_2\text{O}^\bullet$ y H_3O^+ , y superóxidos como O_2^\bullet . A esta acción se le denomina daño indirecto de las radiaciones, que también produce la muerte celular por la alta reactividad que poseen los compuestos generados. En la Figura 7 se muestra la diferencia entre el daño directo y daño indirecto de las radiaciones sobre la molécula del ADN.

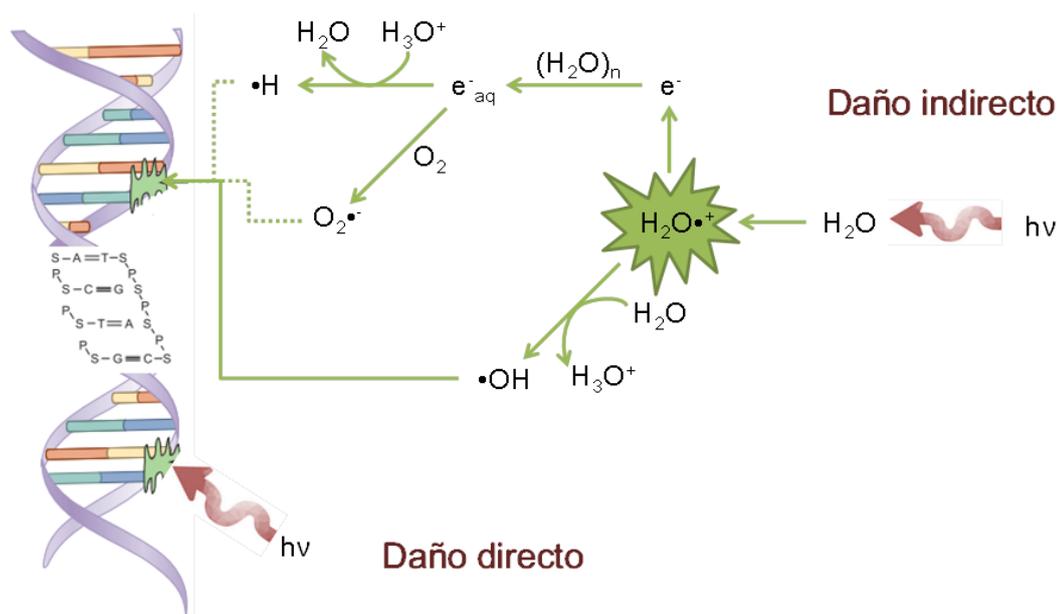


Figura 7: Ilustración de daño directo e indirecto de la radiación a la molécula de ADN.

Estos radicales libres, al ser altamente reactivos interaccionan con las moléculas de la célula y desencadenan una cascada de eventos celulares, incluido estrés oxidativo, daño

en la membrana celular, daño en el ADN y producción de citotoxicidad, que dañan la integridad celular, produciendo la muerte de la misma [22], [25]–[27].

1.2.2. Ventajas y desventajas del uso de la radioterapia

El objetivo de la radioterapia es eliminar las células cancerosas en el tumor, al tiempo que limita el daño a los tejidos normales [17]. El tratamiento con radioterapia proporciona un excelente control local del tumor, que no siempre se puede lograr con la cirugía, y conserva la forma y función de los tejidos normales [18]. Al mismo tiempo, la radioterapia es una modalidad de tratamiento local, evitando efectos sistémicos [23]. El efecto de la radioterapia como tratamiento se debe al hecho que las células presentan mayor sensibilidad a la radiación cuando las mismas están en estado de reproducción [28]. Para un mismo tejido, la mayor velocidad de reproducción de las células tumorales determina la mayor muerte de estas células frente a las sanas, pero aun así la radioterapia no es un método altamente selectivo, por lo tanto puede dañar las células de tejido sano circundante al tumoral, a veces produciéndose heridas que demoran en sanar [22], [29]. Además, en el caso de aquellos tumores que están localizados en zonas profundas del cuerpo, donde la distancia a la fuente de radiación es grande, el tejido neoplásico absorberá una menor dosis, dado que parte de la radiación se pierde por interacción de la misma con el tejido sano interpuesto entre la fuente de radiación y las células tumorales [18], [29].

La reproducción celular en células mamíferas se caracteriza por ser un conjunto de etapas, en las cuales ocurren diferentes procesos que se repiten en cada generación celular. Por esta razón, el conjunto de estos procesos se denomina ciclo de división celular, y el tiempo entre divisiones sucesivas se denomina tiempo de ciclo celular (T_c), que es característico de cada tejido. En la Figura 8 se presenta un esquema del ciclo celular identificando las diferentes etapas del mismo: G1, S, G2 y M. La etapa G1 se caracteriza por ser la más larga, y se caracteriza por la alta producción de proteínas y ARN que permite a la célula aumentar de masa y sintetizar nuevos organelos. Si no se cuenta con los nutrientes necesarios la célula entra en una etapa de no reproducción denominada G0. En la etapa S es donde se produce la replicación del ADN, y la

detección y reparación de daños en la replicación del mismo. La etapa G2 corresponde a una segunda etapa de crecimiento, donde la célula sintetiza las proteínas necesarias para la etapa de mitosis (M). En esta última etapa es donde la célula se divide en dos, cada una de ellas con una réplica de ADN idéntica al ADN de la célula original. [22], [30]

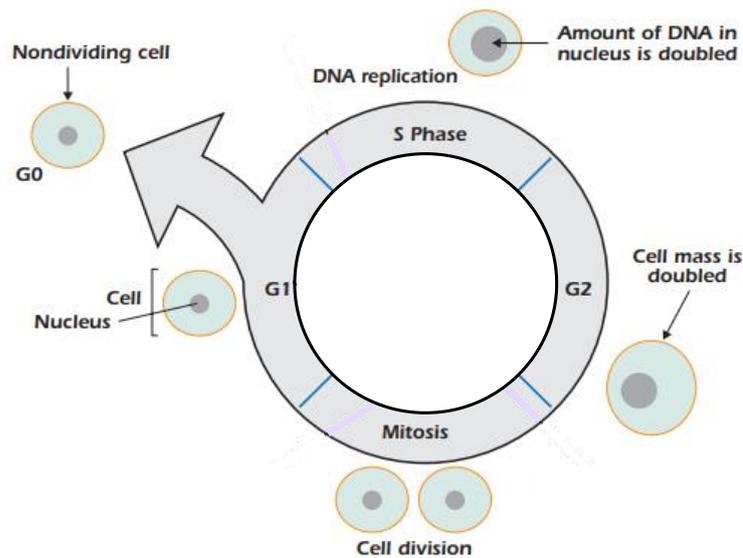


Figura 8: Esquema de ciclo de división celular en células mamíferas (Imagen modificada de [30]).

Las diferencias en las etapas del ciclo de división celular determinan que la célula en división presente diferente sensibilidad a la radiación dependiendo de la etapa del ciclo en el que esté en ese momento. Esto se puede observar al analizar las curvas de supervivencia celular luego de ser irradiadas en diversas etapas del ciclo celular como se muestra en la Figura 9. De esta Figura se desprende que las etapas más radiosensibles son las M y G2, donde están ocurriendo varios arreglos cromosómicos, y por lo tanto las células irradiadas en estas etapas no se lograrán dividir. Esto genera indirectamente una sincronización en el ciclo de división de todas las células, porque aquellas células que sobreviven están en etapas más resistentes a la radiación (S y G1), y por lo tanto las siguientes reproducciones celulares se harán a partir de estas. Además, hay que tener en cuenta que las células tienen mecanismos de reparación intrínsecos, sobre todo en la etapa S, donde se replica el ADN. [22]

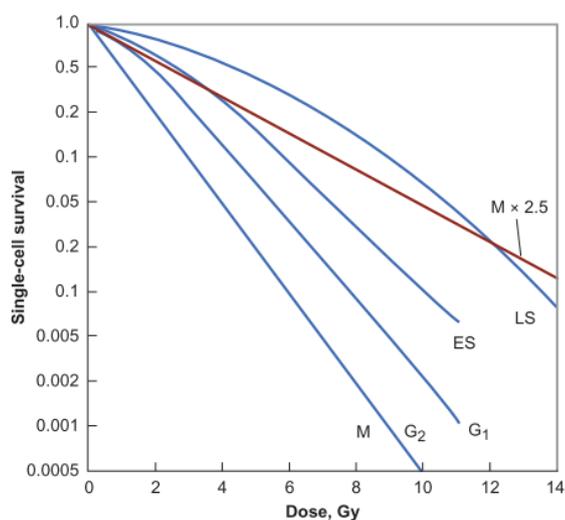


Figura 9: Curvas de supervivencia celular luego de ser irradiadas en diversas etapas del ciclo de división celular, donde “ES” (del inglés early S) corresponde al inicio de la etapa S y “LS” (del inglés late S) corresponde al final de la etapa S. La curva roja corresponde a un cálculo de cómo sería la etapa M si las células estuvieran bajo hipoxia [22].

Por lo tanto, en todos los casos la dosis de irradiación total en un tejido dependerá mayormente del tipo de tejido tumoral irradiado, de la etapa de la enfermedad que el individuo esté, del tamaño del tumor y de la localización del mismo. La velocidad a la que se desarrolla la respuesta a la radiación por parte del tejido varía ampliamente de un tejido a otro y, a menudo, depende de la dosis de radiación que reciba el mismo. Esto posibilita que las células desarrollen resistencia a la radiación que aumenta a lo largo de las sesiones [22]–[25], [28], [29], [31], [32].

1.2.3. Principales mejoras en el tratamiento con radioterapia

Todo lo desarrollado anteriormente pone en manifiesto que el tratamiento utilizando radiación ionizante se tiene que hacer bajo ciertos cuidados, sobre todo teniendo presente la limitada tolerancia tisular normal a la radiación. Una forma de limitar el daño es reducir la dosis de radiación y/o el volumen irradiado [17]. En muchos casos, para disminuir las lesiones en los tejidos sanos se utiliza el fraccionamiento de la dosis total en

el tejido tumoral. Esto significa la aplicación de bajas dosis de radiación (convencionalmente de 1.8 – 2Gy) por sesión durante un período extenso de tiempo, separando cada sesión por un intervalo de tiempo que permita no dañar el tejido normal, pero sin que se repare el daño ya producido al tejido tumoral [23], [29].

Por otro lado, los avances tecnológicos han ayudado a mejorar el tratamiento, principalmente por el aumento en la precisión de la dosis administrada y por las herramientas de imágenes. La utilización de aceleradores médicos lineales y la combinación con algunas de las modalidades de imágenes, como puede ser resonancia magnética nuclear (NMR), tomografía computarizada (CT) y/o tomografía de emisión de positrones (PET), permite seleccionar con gran exactitud la dosis a suministrar y focalizar la misma en volúmenes pequeños de un tejido específico [17], [22], [29], [31], [33].

Pese al gran control de la dosis de la radiación obtenida con el fraccionamiento y los avances tecnológicos, se continúa teniendo una gran variedad de obstáculos como son las células madre del cáncer, la heterogeneidad del tumor, la angiogénesis, la vasculogénesis, la radiorresistencia del tumor o la eliminación de daños a tejidos sanos, que continúan dificultando la aplicación del tratamiento [17], [29], [32], [34], [35]. Por esta razón, se ha estudiado el tratamiento de modalidad combinada de la radioterapia con varios desarrollos en radiobiología, como el empleo de biomarcadores, radioprotectores o radiosensibilizadores que conducen a mejoras en las tasas de control de tumores y la reducción de la mortalidad celular. En particular, el desarrollo de biomarcadores permite predecir, evaluar y gestionar la capacidad de respuesta a terapias específicas. En el caso de los radioprotectores, permiten el aumento de la resistencia del tejido normal y así reducir su tasa de mortalidad. Por otro lado los radiosensibilizadores son agentes que aumentan la sensibilidad de los tumores a la radiación ionizante. [17], [29], [35].

1.3. Radiosensibilizadores

1.3.1. Generalidades de los radiosensibilizadores

Como ya se mencionó, una posible estrategia para combatir los obstáculos de la radioterapia, es la utilización de radiosensibilizadores. Los mismos son agentes que tienen la habilidad de incrementar la susceptibilidad al daño por exposición a la radiación del tejido tumoral, diferenciándolo del tejido normal. Su utilización brinda la posibilidad de aumentar focalmente la dosis suministrada en las células tumorales por la fuente de radiación, sin necesidad de aumentar la dosis externa de la fuente, permitiendo así disminuir los efectos de la radiación en el tejido sano que rodea al tumor [34], [36].

Los radiosensibilizadores son moléculas o materiales que interaccionan con la radiación ionizante, que pueden ser clasificados como moléculas pequeñas, macromoléculas y nanomateriales [34], [37], [38]. Los radiosensibilizadores moleculares son mayormente fármacos que pueden producir daños por diferentes mecanismos. Uno de estos mecanismos es la fijación del daño que la radiación causa en el ADN utilizando la gran afinidad electrónica que presentan. Ejemplo de estos compuestos son el oxígeno molecular [39], el peróxido de hidrógeno [40], la nicotina [41] y el clofibrato [42] donde su grupo electrófilo es el oxo, y el misonidazol [43], el nimorazol [44] y el dinitroazetideno [45] cuyo grupo electrófilo es el nitro. Otro mecanismo es la utilización de agentes bioreductivos específicos de células hipóxicas, como puede ser la tirapazimina [46] o la AQ4N [47] que se reducen a metabolitos citotóxicos. Otro camino útil para radiosensibilizar con pequeñas moléculas es la utilización de pseudosubstratos que tienen influencia en la señalización celular y en la eliminación de sustancias radioprotectoras celulares. Estos compuestos van desde la utilización de análogos halogenados de las timinas que componen el ADN (por ejemplo bomodeoxiuridina, iododeoxiuridina o gemcitabina [38], [48]) a compuestos que inhiben la biosíntesis de tioles, por ejemplo con L-S-butionina sulfoximina [49].

Dados los múltiples objetivos en los cuales se puede actuar para regular la radiosensibilidad de las células, surgió el interés por las macromoléculas, las cuales poseen mayor especificidad que las moléculas simples [34], [50]. Las macromoléculas de

mayor interés son el microARN, las proteínas y los péptidos. Las mismas permiten controlar la radiosensibilidad a nivel pre-traslación, utilizando por ejemplo miR-205 [51] o microARN-34a [52] o inhibiendo la reparación del ADN, como cuando se utiliza el anticuerpo Sym004 [53]. Además permiten regular la expresión de genes con oligonucleótidos como el PS-ASODN [54] o con siARN, que interfieren en la expresión de genes específicos con los cuales se une complementariamente y permite así la degradación del ARN mensajero luego de la transcripción [55].

Pese a que las macromoléculas presentan mayor especificidad que las moléculas pequeñas, y solucionan así algunos efectos de vectorización que éstas presentan, aún hay obstáculos en la utilización de pequeñas y macro-moléculas como radiosensibilizadores debido a que muchas de ellas presentan impactos negativos locoregionales o muchas veces en zonas no blanco, como pueden ser en el sistema nervioso o a nivel cardíaco [34], [50].

Las nanopartículas surgieron recientemente como una nueva categoría de radiosensibilizadores por dos razones. Una de ellas es por su tamaño nanométrico (en el orden de 10^{-9} m), que le confiere propiedades fisicoquímicas específicas, diferentes a las que experimenta el compuesto que conforma la nanopartícula a nivel molecular o a nivel bulk, y que influyen en su farmacocinética, biodisponibilidad, biodistribución, así como en la focalización y el suministro intracelular. La otra razón fue debido a su composición química. Las nanopartículas que se desea utilizar como radiosensibilizadores están compuestas mayormente por elementos inorgánicos, que tienen un alto número atómico (Z). La elección de partículas compuestas por elementos pesados se debe a la gran absorción de la radiación X y gamma que estos materiales presentan. Esto se observó en primera instancia con moléculas destinadas a ser utilizadas como radiosensibilizadores que contenían iodo en su estructura [34], [56]. Al comparar los resultados obtenidos observaron que el uso de iodo permitía aumentar la radiosensibilización de las células debido a su mayor Z, comparándolo con el de las moléculas que conforman la célula. Esta idea luego se trasladó a las nanopartículas surgiendo así distintos estudios que muestran que las mismas presentan propiedades adecuadas para esta aplicación [35], [36], [57], [58]. Los primeros estudios se enfocaron en nanopartículas de oro (Au), basados en la baja toxicidad y reactividad que el material en bulk presenta [58]–[60]. Sin

embargo, estudios de toxicidad demostraron que el Au nanométrico puede presentar toxicidad dependiendo de su forma, tamaño y línea tumoral ensayada [57], [61]. Estos estudios abrieron el camino a la utilización de nanopartículas de otros metales, como plata (Ag), platino (Pt) y gadolinio (Gd) [35], [36], [62]. Posteriormente surgió el interés por estudiar nanopartículas de semiconductores para aprovechar al máximo las propiedades que los mismos presentan al interactuar con la radiación, especialmente por sus propiedades fotocatalíticas. Así es como se ha estudiado el empleo de quantum dots y óxidos y sulfuros metálicos como por ejemplo ZnS, CaF, LaF o ZnO [63], TiO₂ [64], HfO₂ [65] y Fe₃O₄ [66].

El aumento de la susceptibilidad de la radiación empleando materiales de alto Z se debe a que los mismos tienen un alto coeficiente de absorción de la radiación, lo que genera que absorban la radiación en mayor medida que el resto de las moléculas presentes en el tejido celular. La interacción de la radiación con estos materiales se puede dar por tres caminos distintos, y es dependiente de la energía de la radiación incidente. A bajas energías se da mayormente lo que se conoce como efecto fotoeléctrico, donde un electrón es expulsado de las capas más internas del átomo con una energía cinética igual a la diferencia de energía del haz incidente y de la energía de ligadura del electrón al nivel electrónico del cual es expulsado. La probabilidad que ocurra el efecto fotoeléctrico es proporcional a $(Z/E)^3$, donde Z es el número atómico del material sobre el que incide la radiación y E la energía de la misma. A energías intermedias se da mayormente la dispersión Compton, donde el fotón interactúa con electrones débilmente ligados al átomo, brindándole parte de su energía cinética (que puede variar entre 0 y 80%), y desviándose de su trayectoria original. Esto da como resultado la producción de un electrón rápido y un fotón de energía reducida, que puede continuar interactuando con otros átomos. En el caso de la dispersión Compton, la probabilidad del fenómeno depende de la cantidad de electrones disponibles para la interacción, siendo la misma linealmente con el número atómico del material. Para energías por encima de 1.02 MeV, el efecto que empieza a tomar importancia es la producción de pares. En este caso, la interacción de la radiación genera un par electrón-positrón con una probabilidad dependiente de Z^2 . Como resultado de la interacción de la radiación con el material se puede observar la presencia de fotoelectrones, electrones secundarios, electrones Auger

y fluorescencia, en un rango de distancia corto, lo que permite una liberación localizada de energía por unidad de masa, y por lo tanto un aumento considerable del efecto de la radiación donde el sensibilizador está presente, debido a la mayor generación de daño directo e indirecto sobre las moléculas biológicas.[22], [56]–[58], [67]–[69]

1.3.2. Radiosensibilizadores nanoestructurados

Las nanopartículas como radiosensibilizadores surgieron buscando disminuir los problemas de toxicidad, que muchas de las moléculas pequeñas y las macromoléculas presentan [34]. Los nanomateriales pueden presentar múltiples morfologías, pero su definición implica que por lo menos una de sus dimensiones sea menor a 100 nm [57]. Esto permite que las nanopartículas sean adecuadas para su utilización en medicina, especialmente para terapia de cáncer, donde el crecimiento acelerado de las células tumorales produce un rápido incremento de la vasculatura regional. Este aumento acelerado produce discontinuidades en el endotelio, que genera huecos del orden de los 100 - 200 nm, cuando en una vasculatura normal los mismos son de aproximadamente 10 nm [57], [70], [71]. A diferencia de los radiosensibilizadores moleculares, que pueden permear la vasculatura y alojarse en distintos tejidos, las nanopartículas permeabilizan selectivamente en los tejidos tumorales debido a las discontinuidades cercanas al tejido cancerígeno. Además, teniendo en cuenta la disfuncionalidad del sistema linfático en la zona del tumor, que no permite una correcta circulación de fluido, la eliminación de las partículas del espacio intersticial se ve enlentecida. El conjunto de estos dos fenómenos se conoce como efecto de aumento de la permeabilidad y retención (EPR, del inglés Enhanced Permeability and Retention effect) [34], [70], [71].

El diseñar las nanopartículas para su utilización como radiosensibilizador, implica el estrecho control de su tamaño y de la capa de ligando que la recubre. El control del tamaño se realiza debido a dos razones. En primer lugar, si las nanopartículas presentan un tamaño menor a 5 nm, pueden ser eliminadas rápidamente por vía renal, sin llegar a cumplir su función. En el otro extremo, el tamaño mayor de las nanopartículas está limitada por los poros de la vasculatura, pero a mayor tamaño de nanopartícula mayor es la probabilidad de que sea fagocitada por macrófagos y que sean eliminadas por vía

hepatobiliar rápidamente [72]. Por otro lado, cuando las nanopartículas entran al torrente sanguíneo interactúan con los componentes que conforman la sangre y forman lo que se denomina la biocorona. Esta biocorona es un arreglo de moléculas biológicas estable alrededor de la partícula, que está conformada principalmente por proteínas, pero también puede contener azúcares, ácidos nucleicos y lípidos, y que asegura la llegada de las nanopartículas al sitio de interés [72], [75], [76]. Como las nanopartículas utilizadas como radiosensibilizadores son en su mayoría compuestos inorgánicos de alto Z, son fácilmente reconocibles como cuerpos extraños para los macrófagos [72], [73]. En este punto es donde tiene gran influencia la capa de ligandos que recubre las nanopartículas que debe cumplir la función de proteger las mismas de los macrófagos. Para ello se utilizan polímeros biocompatibles, como por ejemplo el polietilenglicol (PEG) o la polivinilpirrolidona (PVP), entre otros [74], que al interactuar con los componentes de la sangre, se forma una biocorona que ayuda a las nanopartículas encontrar el sitio blanco, y que las mismas pueden ser fagocitadas por las células tumorales vía endocitosis pasiva, donde permanecen para cumplir su función, y luego de la muerte celular pueden ser eliminadas [70], [72].

1.4. Sulfuro de Bismuto (Bi_2S_3)

1.4.1. Propiedades y generalidades del Bi_2S_3

El sulfuro de bismuto (Bi_2S_3) pertenece al grupo de calcogenuros de metales $\text{A}_2\text{VB}_3\text{VI}$ (donde A puede ser: As, Sb, Bi, y B: S, Se, Te) [77]. Es un semiconductor directo, tipo n, que presenta en bulk un band gap de 1.3 eV [78].

Su estructura cristalina es ortorrómbica (grupo espacial: Pbnm, Figura 10), como todos los compuestos de su familia [79], y forma mayormente compuestos laminares [80], [81].

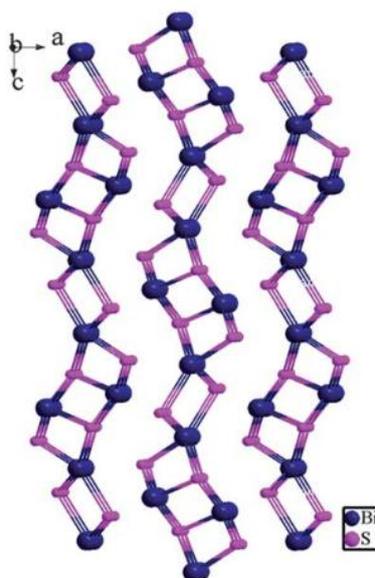


Figura 10: Estructura cristalina del Bi_2S_3 , donde se observan las cadenas a lo largo del eje c [82].

Esto genera que la mayoría de las nanopartículas obtenidas de este compuesto tengan morfología del tipo 1-D, como varillas [80], tubos [83], cintas [84], cables [79], flores [85], entre otros [81]. Por lo general este crecimiento se da en el eje cristalográfico c , obteniendo por lo tanto que la dirección de la familia de planos cristalográficos $[0\ 0\ 1]$ queden paralela al lado de mayor dimensión de las estructuras [77], [79]–[81].

Los métodos de síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 varían, habiéndose reportado síntesis por el método solvotérmico [86], hidrotérmico [87], en solución [83], [88], con microondas [89], etc. Las nanopartículas de Bi_2S_3 presentan propiedades eléctricas, térmicas y optoelectrónicas muy interesantes, por lo que sus posibles aplicaciones incluyen su utilización en dispositivos fotovoltaicos, termoeléctricos, fotocatalítisis, de detección de radiación X, entre otros [84], [85], [88]–[91].

El Bi_2S_3 es particularmente interesante debido a su alto coeficiente de absorción a la radiación X y gamma fundamentalmente ($5.74\text{ cm}^2/\text{kg}$ a 100 kV [92]). Este alto coeficiente se debe a la presencia del Bi ($Z=83$) en su fórmula, resultando en una alta sección eficaz para la absorción de la radiación de baja energía, donde se presenta preferencialmente el efecto fotoeléctrico. Además tiene una alta densidad de electrones, lo que aumenta la probabilidad de dispersión de Compton, que involucra a los electrones de la capa externa

[93]. Todo esto permite que las nanopartículas de Bi_2S_3 sean estudiadas también para ser utilizadas como agente de contraste o radiosensibilizador.

1.4.2. Usos del Bi_2S_3 en medicina

A pesar de su alto número atómico, el bismuto presenta una baja toxicidad, lo que hace de este metal un buen candidato para ser empleado en medicina, además de ser un elemento de bajo costo, comparado con los demás metales pesados [94], [95]. Las formulaciones farmacéuticas que contienen bismuto comprenden usos para desordenes estomacales [96], [97], erradicación de *Helicobacter pylori* en úlceras pépticas [98]–[100], sífilis, tumores [101] y la reducción de la toxicidad renal inducida por cisplatino [102].

Las aplicaciones en medicina de nanopartículas de Bi_2S_3 , que se han estudiado son en su mayoría como agentes de contraste para imagenología [103]–[107] y más recientemente se han realizado los primeros estudios para su utilización como radiosensibilizador [92], [93], [108]–[114]. En estos trabajos se ha reportado que el Bi_2S_3 presenta una baja toxicidad, obteniéndose por ejemplo una dosis letal 50 (LD50) de 100 mM en macrófagos y 114 mM en células hepáticas [104], pero dichos estudios de toxicidad se han realizado solamente en cultivos celulares, no habiendo hasta el momento otros estudios para nanopartículas de Bi_2S_3 . Si se conocen estudios realizados para el Bi metálico y algunos otros compuestos de bismuto. Para los mismos los valores de LC50 rondan en 221 mg/Kg para el bismuto (oral, humano), 22000 mg/Kg para el oxiclورو de bismuto (oral, rata), 484 mg/Kg para el trimetilbismuto (oral, conejo) y 11 mg/Kg para el trimetilbismuto (intravenoso, conejo) [95].

2- Objetivo de la Maestría

Debido a las características y antecedentes de los compuestos de bismuto, y en especial del Bi_2S_3 , esta tesis de Maestría, se centró en el estudio de la utilización del Bi_2S_3 como potencial radiosensibilizador, sobre todo por sus propiedades de absorción de radiación X y gamma. Como esta aplicación involucra la utilización de nanopartículas biocompatibles, se estudió la obtención de las mismas mediante dos métodos de síntesis que incluyen una o varias etapas de reacción. Para determinar si las nanopartículas obtenidas eran adecuadas para la aplicación final se realizaron estudios de suspensión de las mismas en diferentes medios, sobretodo biológicos, se estudió la citotoxicidad y toxicidad aguda de las misma, y por último se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la diferencia que presentaba la viabilidad celular al irradiar las células con y sin presencia de nanopartículas en el momento de la irradiación.

3- Parte Experimental

3.1. Reactivos

Para las síntesis de nanopartículas se utilizó como fuente de bismuto neodecanoato de bismuto ($\text{Bi}(\text{Neo})_3$) marca Aldrich de pureza 99% y cloruro de bismuto (BiCl_3) Merck de pureza > 98%. Como fuente de azufre se utilizaron tiourea ($\text{SC}(\text{NH}_2)_2$) grado para análisis marca Synth y azufre sólido (S) Aldrich de grado reactivo de tamaño de partícula de 100 mesh. Los ligandos utilizados fueron ácido oleico Aldrich de 90% de pureza, oleilamina (OLA) Aldrich de pureza >98%, polivinilpirrolidona (PVP) Sigma Aldrich de peso molecular medio de 10000 g/mol y polietilenglicol (PEG) Aldrich de peso molecular medio de 400 g/mol. Los solventes utilizados fueron: octadeceno (ODE) Aldrich de 90% de pureza, etanol absoluto anhidro (EtOH) y acetato de etilo (AcOEt) para análisis de Carlo Erba, y Tolueno y ácido clorhídrico (HCl) para análisis Dorwil. Para la suspensión de las nanopartículas en los ensayos de estabilidad y ecotoxicidad se utilizó goma Xantana para análisis.

Los ensayos de citotoxicidad y sensibilización se realizaron con la línea tumoral de adenocarcinoma humano adherente MCF7 - ATCC® HTB-22TM. El medio de cultivo empleado fue Dulbecco Modified Eagle Medium con alto contenido de glucosa (DMEM) PanReac AppliChem Reactivos ITW, suplementado con suero fetal bobino (SFB) Gibco-TermoFisher Scientific, penicilina 100 U mL^{-1} Sigma Aldrich y estreptomina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Sigma Aldrich. Las incubaciones se realizaron en frascos de cultivo de tejidos T75, placas de cultivo celular de 6 well y placas individuales Greiner bio-one, y en placas de 96 well Nest. Para la lectura de los resultados se utilizó buffer fosfato salino (PBS) INC Biomedicals 9.6 g/L, Tripsina-EDTA de Sigma Aldrich 2.5 g/L, dimetilsulfoxido (DMSO) Synth, Trypan Blue 0.4 % GibcoBRL y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) Sigma 1 mg/mL.

3.2. Equipamiento utilizado

3.2.1. Caracterización de Nanopartículas

La identidad de las nanopartículas se comprobó por medio de difracción de rayos X de polvo (XRD) utilizando un difractómetro PANalytical Empyrean diffractometer, a temperatura ambiente, con una radiación de Cu(K α) ($\lambda=1.5418$ Å), perteneciente al Centro Universitario Regional del Este-Udelar, y un Rigaku Ultima IV diffractometer, a temperatura ambiente, con una radiación de Cu(K α) ($\lambda=1.5418$ Å), perteneciente al Cadifrax-Facultad de Química-Udelar, ambos en configuración Bragg-Brentano. Asimismo, se realizó microscopía Raman confocal a la muestra en polvo, en un equipo WiTecAlpha 300R con láser de 532 nm, perteneciente al Polo Tecnológico de Pando.

La presencia de ligandos en las nanopartículas se determinó en un Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier (IR) Shimadzu IRPrestige-21 usando un accesorio DiffusIR Pike Technology para reflectancia difusa de la Facultad de Química-Udelar, empleando bromuro de potasio (KBr, $\geq 99\%$) como blanco, y la muestra en polvo sin prensar. Además, se evaluó la cantidad de ligando y los eventos térmicos implicados en su descomposición por medio de análisis térmico diferencial y termogravimetría utilizando un analizador térmico simultáneo STA/TG-DSC, Netzsch STA F5, en crisol de alúmina, flujo de 10 mL/cm³ y atmósfera de nitrógeno, del Centro Universitario Regional del Este-Udelar.

La morfología y tamaño de las nanopartículas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) JEOL 2100 de 200 kV, el cual cuenta con un accesorio de espectroscopía de dispersión de energía (EDS Oxford X-MAX 65T), perteneciente al Centro Universitario Regional del Este-Udelar. La preparación de la muestra se realizó por drop casting, utilizando una suspensión de nanopartículas en EtOH absoluto y grilla de cobre con film de carbono. El procesamiento de las imágenes obtenidas se realizó empleando el programa ImageJ 1.51w [115].

El análisis de dispersión dinámica de luz (Dynamic light scattering, DLS) y el potencial zeta (zeta potential, Z) para determinar el radio dinámico de las nanopartículas y su potencial superficial se realizó utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS de Malvern

Instruments, perteneciente al Grupo de Nanomateriales y Nanotoxicología (GNano) del Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidad de São Paulo (USP).

Las caracterizaciones espectrofotométricas UV-Vis se realizaron por medio de dos equipos. Los espectros de las suspensiones de nanopartículas fueron obtenidos utilizando un equipo UV-Vis Genesys 10S con lámpara de Xe, con paso de 0.2 nm a velocidad media. Las suspensiones fueron sonicadas utilizando un baño de ultrasonido Wisd WUC-A02H. Los espectros de las nanopartículas en sólido se realizaron en un Shimadzu UV 2600 con accesorio de esfera integradora, utilizando como blanco Spectralon. Todos estos equipos pertenecen a la Facultad de Química-Udelar.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software RStudio [116].

3.2.2. Lectura de viabilidad celular, irradiación de cultivos y caracterización de clodóceros

Cuando las suspensiones de nanopartículas para los ensayos celulares fueron sonicadas con sonicador de sonda, se utilizó un sonicador QSonica Q500 con una frecuencia de 20 KHz.

La lectura de viabilidad celular por ensayo con MTT se realizó en un espectrofotómetro con lector de placa SpectraMax M3, perteneciente al GNano-IFSC-USP, utilizando una longitud de onda de 530 nm.

El conteo celular utilizando Trypan Blue a 0.2 % se realizó en un Cellometer Automated Cell Counting K2 de Nexcelom del Área de Inmunología de la Facultad de Química, instalado en el Instituto de Higiene, empleando una dilución a la mitad con Trypan Blue y analizando la diferencia de brillo de la muestra.

La irradiación de los cultivos celulares se realizó empleando un Irradidor Gamma cell 220 Excel, perteneciente al Instituto Nacional de Donación y Trasplante del Ministerio de Salud Pública.

Las imágenes de los clodóceros en agua de cultivo del ensayo de ecotoxicología se tomaron en un microscopio óptico polarizado Nikon Elipse 50i con una cámara Nikon DS-

Ri1, con un aumento de 4x, perteneciente al GNano-IFSC-USP.

3.3. Síntesis de Nanopartículas

En esta tesis se buscó la obtención de nanopartículas de Bi_2S_3 recubiertas con ligandos biocompatibles, para una mejor distribución de tamaños de las mismas en medios biológicos. Para ello, se realizaron síntesis de nanopartículas mediante dos métodos, el método “hot injection” y el método hidrotérmico. El primero constó de una síntesis en solución en medio orgánico, que incluyó dos pasos: la síntesis de las nanopartículas propiamente dicha y el cambio de ligando que rodea las partículas. El segundo implicó un solo paso donde las nanopartículas obtenidas ya fueron sintetizadas con el ligando biocompatible deseado.

3.3.1. Síntesis de nanopartículas por el método hidrotérmico

Las síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 por el método hidrotérmico se realizaron empleando dos soluciones, denominadas precursor de bismuto y precursor de azufre. En la Figura 11 se presenta un esquema de las síntesis y en la Tabla 1 se especifican las condiciones variadas en cada una de ellas.



Figura 11: Esquema de síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 por el método hidrotérmico.

Esta síntesis se realizó tomando como referencia el trabajo de E. Hua, *et al.* [117], con el cambio sustancial del agregado de ácido clorhídrico en el precursor de bismuto. Esto se realizó debido a que los iones cloruro en medio ácido permiten la formación de complejos estables que mejoran la solubilidad de la fuente de bismuto (cloruro de bismuto -BiCl₃) [118]–[120].

En una síntesis típica, el precursor de bismuto se obtuvo de la mezcla de BiCl₃ y PVP o PEG-400 en 12.5 mL de agua y HCl. El precursor de azufre consistió en una solución SC(NH₂)₂ en 7.5 mL de agua, que fue agregado gota a gota al precursor de bismuto. La mezcla de soluciones se colocó en un contenedor de teflón de 30 mL, para ser luego introducido en un autoclave de acero inoxidable, donde se dejó reaccionar durante 4-6 h a 180 °C. Pasado este tiempo y llegado a temperatura ambiente, las nanopartículas obtenidas fueron separadas por medio de centrifugación durante 10 min a una velocidad de 8875 g. Después de la separación, las nanopartículas fueron lavadas tres veces empleando EtOH y centrifugando, para luego ser secadas en estufa a 60 °C.

Síntesis	[BiCl ₃] (mM)	[SC(NH ₂) ₂] (mM)	[PVP] (mM)	[PEG] (mM)	HCl (M)	Solvente	Tiempo (h)
H_Np1	128,0	427,0	4,0	-	3	H ₂ O	6
H_Np2	64,0	213,0	4,0	-	3	H ₂ O	6
H_Np3	128,0	427,0	-	-	3	H ₂ O	6
H_Np4	128,0	427,0	-	4,0	3	H ₂ O	6
H_Np5	128,0	427,0	-	40,0	3	H ₂ O	6
H_Np6	128,0	427,0	-	80,0	3	H ₂ O	6
H_Np7	128,0	427,0	-	40,0	3	H ₂ O	4
H_Np8	128,0	427,0	-	60,0	3	H ₂ O	4

Tabla 1: Condiciones de síntesis utilizadas para obtención de nanopartículas por el método Hidrotérmico.

3.3.2. Síntesis de nanopartículas por el método “hot injection” en medio orgánico3.3.2.1. *Síntesis de nanopartículas por el método “hot injection”*

Para las síntesis por este método se tomaron como referencia los trabajos realizados por M. Ibáñez, *et al.* [88] y K. Ai, *et al.* [103], adaptando las condiciones para nuestro propósito. Como se ilustra en la Figura 12, las síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 por el método “hot injection” se realizaron por medio de la mezcla de dos soluciones, denominadas precursor de bismuto y precursor de azufre.

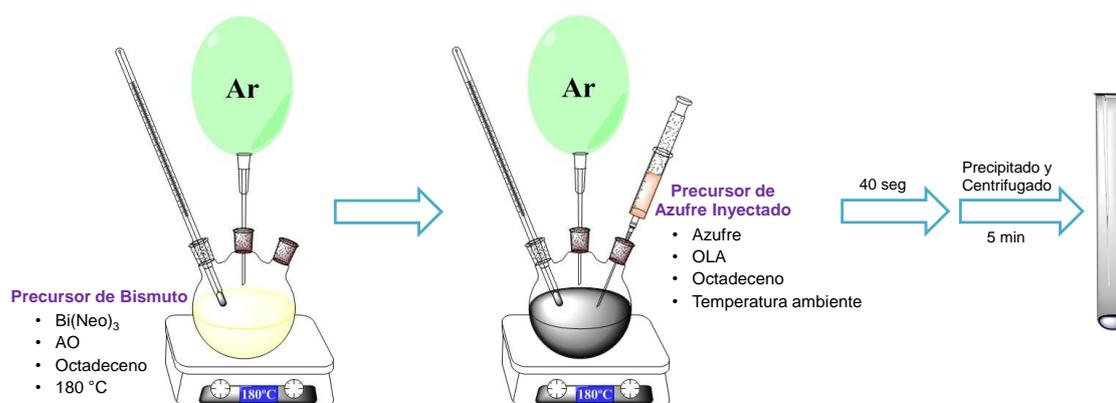


Figura 12: Esquema de síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 por método “hot injection” en medio orgánico.

El precursor de bismuto se obtuvo a partir de neodecanoato de bismuto ($\text{Bi}(\text{Neo})_3$) y 5 mL de ácido oleico (AO) en 20 mL de octadeceno (ODE). Esta mezcla fue calentada en atmósfera inerte a 180 °C. El precursor de azufre, que consistió en una mezcla a temperatura ambiente de azufre (S) y 2.5 mL de oleilamina (OLA) en 10 mL de ODE, fue inyectado al precursor de bismuto, dejándose reaccionar durante 40 segundos. Pasado este tiempo, las síntesis fueron detenidas utilizando 70 mL de tolueno enfriado a 4 °C y aire comprimido. Las condiciones variadas en cada síntesis se especifican en la Tabla 2.

Síntesis	[Bi(Neo) ₃] (mM)	Bi:S	Escala
S_Np1	10	1:5	x 1
S_Np2	10	1:1	x 1
S_Np3	61	1:5	x 1
S_Np4	82	1:5	x 1
S_Np1_x10	10	1:5	x 10

Tabla 2: Condiciones de síntesis utilizadas para obtención de nanopartículas por el método “hot injection”.

La separación de las nanopartículas obtenidas de la solución se realizó mediante precipitación y centrifugado. Para la precipitación se utilizó una mezcla 1:1 de acetato de etilo y etanol absoluto (AcOEt:EtOH), empleando un volumen igual al volumen total de reacción. Las centrifugaciones se realizaron durante 5 minutos a una velocidad de 18520 g. Después de la separación, las nanopartículas fueron lavadas dos veces empleando AcOEt:EtOH 1:1 y centrifugado, para luego ser secadas en estufa a 40 °C.

3.3.2.2. Cambio de ligando

En la siguiente etapa de síntesis se realizó el intercambio de los ligandos apolares de cadena alifática, que contenían las nanopartículas obtenidas según lo descrito en el punto 3.3.2.1., por un compuesto polar, la polivinilpirrolidona (PVP). Para realizar este cambio se tomó como punto de partida el trabajo de M. Algethami, *et al.* [93], cambiando algunos pasos del procedimiento. El cambio de ligando consistió en el reflujo a 130°C (con excepción de la muestra Np1_s/r) de una suspensión 5 mM de nanopartículas y 17.5 mM de PVP en una mezcla de acetato de etilo y etanol (AcOEt:EtOH 2:1), durante un tiempo determinado. Pasado este tiempo, la suspensión se enfrió con AcOEt a 4 °C, utilizando un volumen igual al volumen de reacción, y aire comprimido. En la Tabla 3 se especifican las condiciones de intercambio utilizadas, incluyendo la nueva codificación de las muestras luego de realizar esta última etapa.

Cambio de Ligando	Muestra	Tiempo (h)	Reflujo
S_Np1_s/r	S_Np1	4	X
S_Np1_c/r_4	S_Np1	4	✓
S_Np1_c/r_12	S_Np1	12	✓
S_Np1_x10_c/r_4	S_Np1_x10	4	✓

Tabla 3: Condiciones de síntesis utilizadas para el paso de Cambio de Ligando.

La separación de las nanopartículas luego del cambio de ligando se realizó mediante precipitación y centrifugado. Para la precipitación se utilizó con una mezcla 1:1 de AcOEt:EtOH. Las centrifugaciones se realizaron durante 5 minutos a una velocidad de 18520 g. Después de la separación, las nanopartículas fueron lavadas empleando EtOH y centrifugado, para luego ser secadas en estufa a 40 °C.

3.4. Estudios de estabilidad de nanopartículas en distintos medios

Con este análisis se buscó estudiar si las nanopartículas de Bi₂S₃ se disolvían en los posibles medios donde las mismas se incorporarían para su aplicación final, y la examinación de la estabilidad que presentaban las suspensiones. Los estudios de solubilidad y estabilidad se realizaron con la muestra obtenida por el método “hot-injection” S_Np1_x10_c/r_4, utilizando un ensayo de turbidimetría, donde se observa el cambio de la concentración de las nanopartículas suspendidas al correr del tiempo [121], [122]. Este cambio de concentración se determina a partir de los cambios observados en los espectros de transmisión UV-Vis de las suspensiones de nanopartículas en diferentes medios obtenidos cada 15 minutos, empleando como blanco los solventes de suspensión. Para convertir la medida de absorbancia obtenida en los espectros a concentración se realizó una curva de calibración, empleando concentraciones conocidas de nanopartículas en el rango de 5 a 500 µg/mL, a una longitud de onda de 650 nm, en la cual ninguno de los medios empleados presentaban absorción.

Los medios utilizados fueron agua miliQ (con y sin agregado de goma Xantana), medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium con alto contenidos de glucosa (DMEM, con y sin agregado de suero fetal bobino), suero fetal bobino (SFB) y plasma sanguíneo. Las concentraciones testeadas variaron de acuerdo a los ensayos realizados. Para los ensayos de solubilidad se utilizó una concentración de nanopartículas de 100 µg/mL, y las medidas se realizaron con previo sonicado de las suspensiones de nanopartículas. Para los ensayos de estabilidad la concentración varió entre 5 y 100 µg/mL y las medidas se realizaron sin previo sonicado de las suspensiones de nanopartículas.

3.5. Estudios Celulares

Los estudios celulares se realizaron con la línea de células humanas de adenocarcinoma mamario (MCF7). La incubación de las células se realizó en estufa a 37 °C, bajo atmósfera con 5 % de CO₂, en medio de cultivo con alto contenido de glucosa DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina 100 U/mL y 1% de estreptomycin 100 µg/mL (denominado medio completo). Los estudios celulares se realizaron con dos fines: evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas y su aplicación como radio-sensibilizador.

3.5.1. Estudios de Citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas se realizó utilizando dos ensayos colorimétricos: tinción con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) y tinción con Trypan Blue.

3.5.1.1. Ensayo colorimétrico con MTT

El MTT es una sal que se reduce metabólicamente a cristales de formazan (cristales azules) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, reflejando así la actividad de células vivas, por lo tanto es utilizado como indicador de viabilidad de las células cultivadas. En este ensayo, se incubó en placa de 96 pozos de fondo plano 1x10⁴ células

MCF7/pozo en un volumen de 100 µL, durante 48 h. Pasado dicho tiempo, se retiró el medio de cultivo y se adicionó una suspensión de nanopartículas en medio de cultivo DMEM (S_Np1_x10_c/r_4) con una concentración de 5, 20, 40, 60, 80 o 100 µg/mL, sin lavado realizar un lavado entremedio. Por cada condición se realizó tres réplicas por cada condición y dejando un blanco sin adición de nanopartículas. El cultivo se continuó incubando durante 6 y 24 horas y luego se procedió a la lectura con MTT. Para ello, las células vivas adheridas a la placa fueron incubadas con una solución de MTT (1.0 mg/mL) durante 4 h, incubando además células con DMSO (Dimetilsulfóxido) como control negativo del ensayo (lisis máxima). Inmediatamente, el sobrenadante fue removido y los cristales de formazan formados en el interior de las células en actividad fueron solubilizados con DMSO, para posterior lectura de la densidad óptica (DO) en espectrofotómetro a 580 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se obtiene: $\%Viabilidad = \frac{DO_{células\ con\ MTT}}{DO_{células\ control}} \times 100$

En la Figura 13 se puede observar un esquema de todo el proceso del ensayo de citotoxicidad empleando MTT para la lectura final.

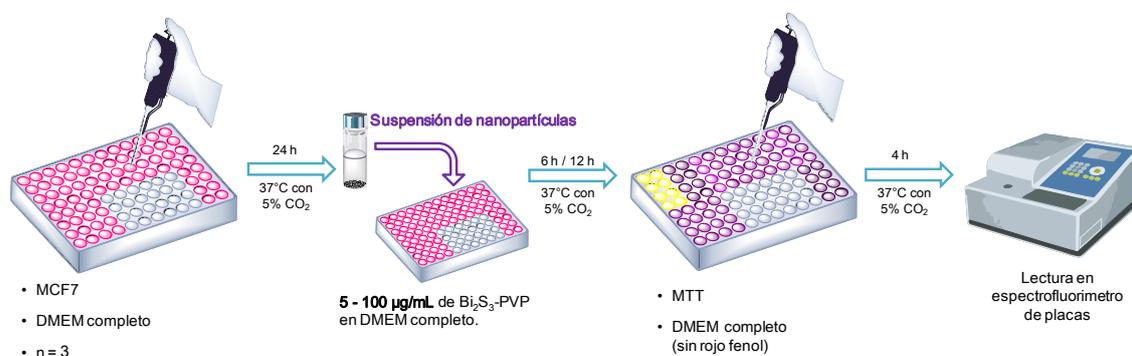


Figura 13: Esquema de ensayo de citotoxicidad con lectura por tinción con MTT.

Este ensayo se realizó en el Grupo de Nanomedicina y Nanotoxicología (GNano) del Instituto de Física de São Carlos (IFSC) de la Universidad de São Paulo (USP), Brasil.

3.5.1.2. Ensayo colorimétrico utilizando Trypan Blue

El Trypan Blue, o ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico), es una diamina derivada de la toluidina que se utiliza como colorante para tinción celular. Esto es posible porque las células cuya membrana está intacta no permiten el pasaje de este compuesto. Por el contrario, en células cuya membrana se encuentra dañada, como cuando han sufrido o están sufriendo necrosis o apoptosis, el colorante es capaz de atravesar dicha membrana y permanecer en el interior celular. Es por eso que permite indicar la viabilidad celular por medio de exclusión de este colorante, reflejando así la muerte celular. En este ensayo, se incubaron en placa de 6 pozos de fondo plano 0.25×10^6 células MCF7/pozo en 2 mL, durante 24 h. Pasado dicho tiempo, se cambió el medio por 2 mL de una suspensión en medio celular de nanopartículas (S_Np1_x10_c/r_4) con una concentración 1, 10, 100, 1000, 2500 o 5000 $\mu\text{g/mL}$, sin previo lavado. Para cada condición, se realizaron tres réplicas por cada condición y dejando una serie sin adición de nanopartículas, tomada como blanco. Las células se incubaron con las nanopartículas durante 72 horas, cambiando el medio de cultivo solo a las 24 h sin lavado intermedio, y luego se procedió al lavado con buffer fosfato salino (PBS) y el despegue de las células utilizando Tripsina-EDTA y a la lectura con Trypan Blue, utilizando un contador automático que indica el número total de células por mililitro y el porcentaje de viabilidad de dichas células. La incubación de las células se realizó en el Instituto de Higiene en colaboración con el Área de Inmunología de la Facultad de Química.

El resultado de este ensayo se expresó como porcentaje de células vivas en la muestra con respecto al número de células vivas que contiene el blanco del ensayo. El mismo se calculó de la siguiente manera:

$$\%N^{\circ} \text{ celulas vivas respecto al blanco} = \frac{(N^{\circ} \text{ células totales} \times \text{Viabilidad})_{\text{muestra}}}{(N^{\circ} \text{ células totales} \times \text{Viabilidad})_{\text{blanco}}} \times 100$$

En la Figura 14 se puede observar un esquema de todo el proceso del ensayo de citotoxicidad empleando Trypan Blue para la lectura final.

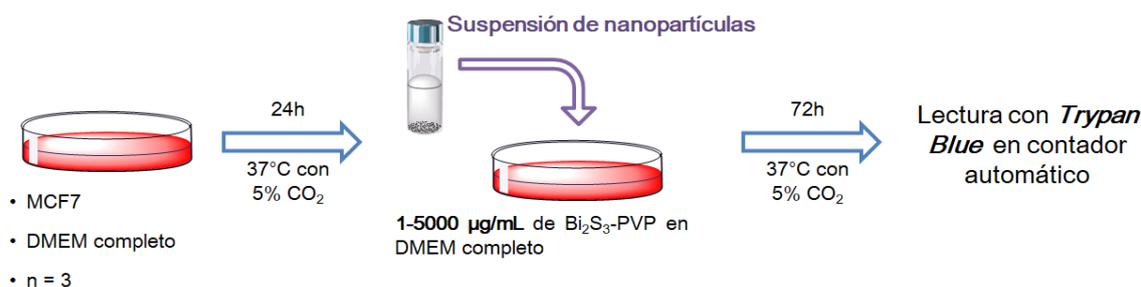


Figura 14: Esquema de ensayo de citotoxicidad con lectura por tinción con Trypan Blue.

3.5.2. Estudios de Radiosensibilización

En esta etapa, se realizó la irradiación de muestras celulares con y sin nanopartículas. Dicha irradiación se realizó utilizando equipamiento perteneciente al Instituto de Donación y Trasplante. El mismo cuenta con una fuente de ⁶⁰Co, cuya dosis se varió entre 2 y 8 Gy. La incubación celular en esta etapa se realizó en el Instituto de Higiene en colaboración con el Área de Inmunología de la Facultad de Química.

3.5.2.1. *Optimización de las condiciones de ensayo*

Para realizar este ensayo, primero se probaron varias condiciones para optimizar el proceso de irradiación, como fueron: la dosis de irradiación adecuada para observación de muerte celular sin que la misma fuera completa (variada entre 2 y 8 Gy), las horas de espera para observación de muerte celular en el conteo final con Trypan Blue (variada entre 3 y 96 h), y por último se probó la influencia en el resultado final del cambio del medio previo o posterior a la irradiación.

Para evaluar los dos primeros parámetros se incubaron células en placas individuales de fondo plano de 35 mm de diámetro. En las mismas se sembraron 0.25x10⁶ células MCF7/pozo en 2 mL, que fueron incubadas durante 48 h, cambiando el medio de cultivo cada 24 h, sin lavado intermedio. Se realizaron tres réplicas por cada condición ensayada. Pasadas las 48 h, las células incubadas fueron expuestas a diferentes dosis (2, 5 y 8 Gy) de radiación ionizante. Las placas fueron nuevamente incubadas durante 24, 48, 72 o 96 h y luego se procedió al lavado con PBS y al despegue de las células

utilizando Tripsina-EDTA y a la lectura con Trypan Blue, utilizando un contador automático.

En el caso de la evaluación del momento de cambio de medio, el procedimiento fue el mismo con la diferencia que el cambio de medio de cultivo, pasadas las primeras 48 h de incubación, se realizó antes o después del paso de irradiación. En ambos casos no se realizó un lavado intermedio. Dicha irradiación se realizó con una dosis de 2 Gy y luego de la misma las células fueron incubadas 48 h más antes de la lectura de los resultados.

3.5.2.2. Ensayo empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas

En esta etapa se realizaron incubaciones de células MCF7 con y sin nanopartículas (S_Np1_x10_c/r_4) y posteriormente se procedió a la irradiación de las mismas. En la Figura 15 se puede observar un esquema de todo el proceso de este ensayo. La muestra de nanopartículas utilizada fue ensayada bajo tres condiciones. Una de ellas implicó la previa diálisis de las nanopartículas para eliminar posibles impurezas y el exceso de PVP (denominada S_Np1_x10_c/r_4_d). La diálisis se realizó utilizando una membrana de cut off de 500 D, en agua destilada. La segunda condición fue la utilización de las nanopartículas obtenidas en la síntesis sin diálisis previa, cuya muestra se continúa denominando S_Np1_x10_c/r_4. En los dos casos nombrados anteriormente las suspensiones de las nanopartículas, previas a su incubación conjunta en las células, se realizaron utilizando un baño de ultrasonido. La última condición testeada fue la utilización de un sonicador de sonda para realizar la suspensión de las nanopartículas (denominada S_Np1_x10_c/r_4_s).

Se incubaron células en placas individuales de fondo plano de 35 mm de diámetro. En las mismas se sembraron 0.25×10^6 células/pozo en 2 mL, y fueron incubadas durante 24 h. Pasado dicho tiempo, se cambió el medio por 2 mL de suspensión de 50 µg/mL de nanopartículas en medio de cultivo celular DMEM, incubando nuevamente las células durante 24 h. Por cada condición se realizaron tres réplicas y se dejó una serie sin adición de nanopartículas, tomada como blanco. Pasado dicho tiempo, las células fueron expuestas a radiación ionizante con una dosis de 2 Gy, cambiando previamente el medio celular. El cultivo se continuó incubando durante 48 horas y luego se procedió al lavado

con PBS y al despegue de las células utilizando Tripsina-EDTA y a la lectura con Trypan Blue, utilizando un contador automático. La incubación de las células se realizó en el Instituto de Higiene en colaboración con el Área de Inmunología de la Facultad de Química.

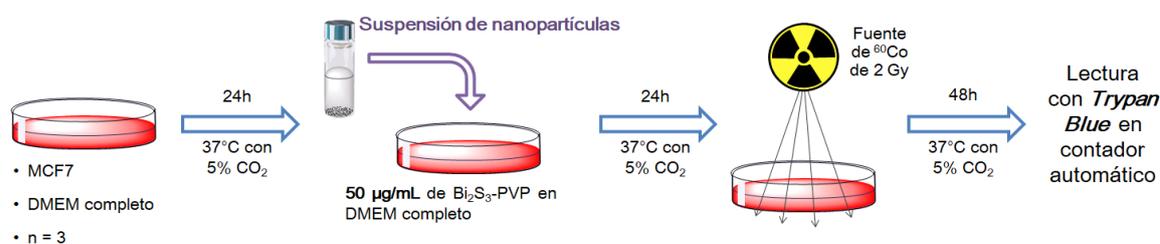


Figura 15: Esquema de ensayo empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas.

3.6. Estudios ecotoxicológicos

Se realizó un test de toxicidad aguda en cladóceros *Daphnia magna* con una suspensión de nanopartículas S_Np1_x10_c/r_4 en agua miliQ, siguiendo la norma de la OECD (2004) [123]. Las nanopartículas fueron testeadas con y sin el agregado de goma Xantana a la suspensión. La concentración de goma Xantana fue de 100 mg/L, dado que a esta concentración las suspensiones de nanopartículas eran estables por más de 24 h.

Los cladóceros utilizados para los ensayos fueron neonatos de entre 2 - 24 h de nacidos de la tercera a la quinta postura, mantenidos en condiciones de temperatura de 20 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h de claridad y 8 h de oscuridad. Los mismos permanecieron en agua de cultivo reconstituida del tipo dura, con pH de $7,6 \pm 0,3$ y dureza de 160 - 180 mg de CaCO₃/L (según normas (OECD 2004 y ASTM 2001 [123], [124]). El agua de cultivo fue renovada tres veces por semana, y la alimentación de los organismos fue con la misma frecuencia. La alimentación se realizó con el alga *Raphidocelis Subcapitata* en una concentración de 3×10^5 células/mL (según norma ABNT 2009 [125]).

Para cada condición testada se realizaron cuatro réplicas con cinco cladóceros en cada una (n=20). El mismo se llevó a cabo exponiendo los cladóceros a diferentes

concentraciones de nanopartículas (entre 0,05 - 100 mg/L), con y sin goma Xantana, teniendo siempre como control positivo agua de cultivo. La incubación fue realizada con 16/8h de claridad/oscuridad. La duración del test fue de 48 h, realizando una lectura de inmovilidad/mortalidad de los organismos a las 24 y 48 h de comenzado el ensayo. Estos ensayos fueron realizados en el Grupo de Nanomedicina y Nanotoxicología del Instituto de Física de São Carlos, de la Universidad de São Paulo, Brasil.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis de Nanopartículas de Bi_2S_3 por el método Hidrotérmico

Por medio de este método se buscó obtener nanopartículas de Bi_2S_3 recubiertas con un ligando polar biocompatible, en un solo paso de síntesis. Para ello se trabajó utilizando dos ligandos poliméricos. En primera instancia se utilizó PVP, donde se realizaron variaciones en las concentraciones de los reactivos. En segundo lugar se utilizó PEG como ligando, pero en este caso, las condiciones de síntesis que se variaron fueron la concentración del ligando y el tiempo de síntesis.

4.1.1. Nanopartículas obtenidas por el método Hidrotérmico utilizando PVP como ligando

En el caso donde se utilizó PVP como ligando, se observó la formación del Bi_2S_3 exclusivamente, como se muestra en el difractograma de la Figura 16 para la muestra H_Np1.

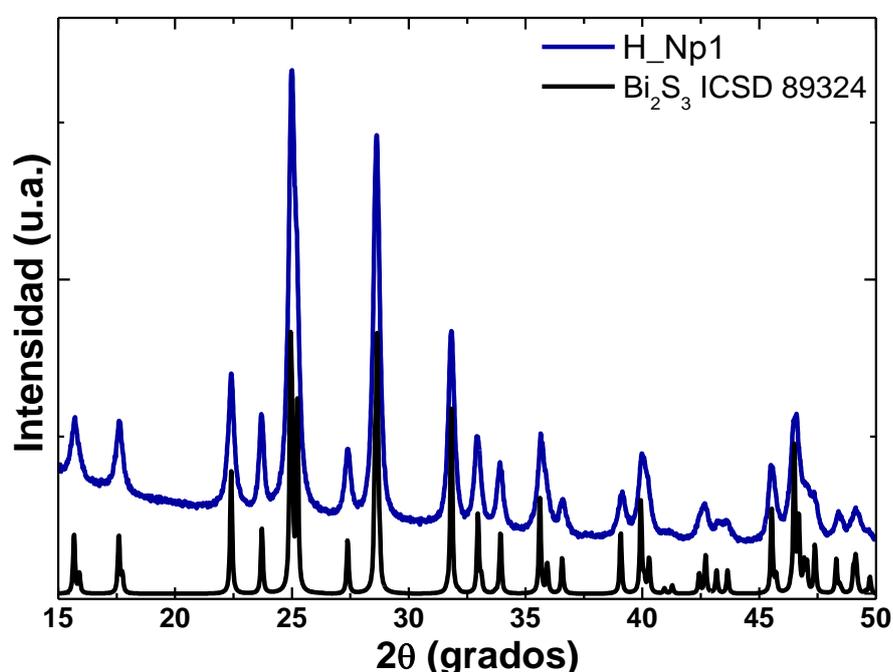


Figura 16: XRD de la muestra H_Np1, comparados con la Ficha ICSD 89324 de Bi_2S_3 .

Como se nombró anteriormente, en el caso donde se utilizó PVP como ligando, se varió la concentración de los reactivos. Esta variación fue exclusivamente de la concentración de la fuente de bismuto y de azufre. El BiCl_3 se disuelve en medio ácido, especialmente utilizando HCl, porque de lo contrario se produce su hidrólisis y la consecuente formación de oxiclورو de bismuto (BiOCl) [126]. Además se debe de evitar la alta concentración de ácido en la mezcla que, en estas condiciones, el Bi_2S_3 se disuelve. En nuestro caso, se observó experimentalmente que el pH óptimo de trabajo debía de estar en el rango de 2 a 3.5. Por esta razón, el HCl utilizado para disolver el BiCl_3 se mantuvo en un pH de 3. La concentración de PVP tampoco fue variada porque dicho cambio implicaría una variación en la viscosidad de la solución [127].

Para identificar cuál era la ventaja de incorporar PVP a las síntesis se realizó una sin la presencia del mismo (síntesis H_Np3). En las Figuras 17-19 se pueden observar las imágenes de HRTEM y la distribución de tamaño de partículas de esta síntesis y de las síntesis H_Np1, H_Np2 y H_Np3.

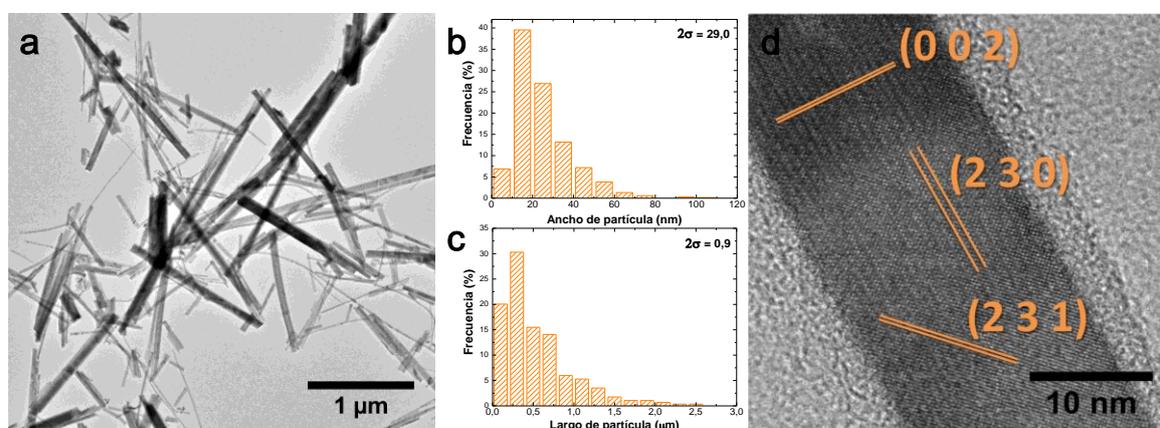


Figura 17: Imagen de TEM (a), distribución de tamaño de partículas (b y c) e imagen de HRTEM (d) con el correspondiente análisis de planos cristalinos de la muestra H_Np1.

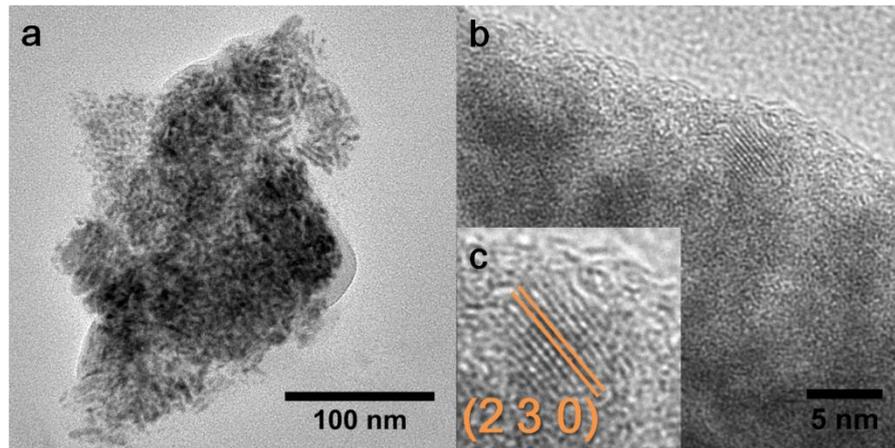


Figura 18: Imagen de TEM (a), imagen de HRTEM (c) con el correspondiente análisis de planos cristalinos (c) de la muestra H_Np2.

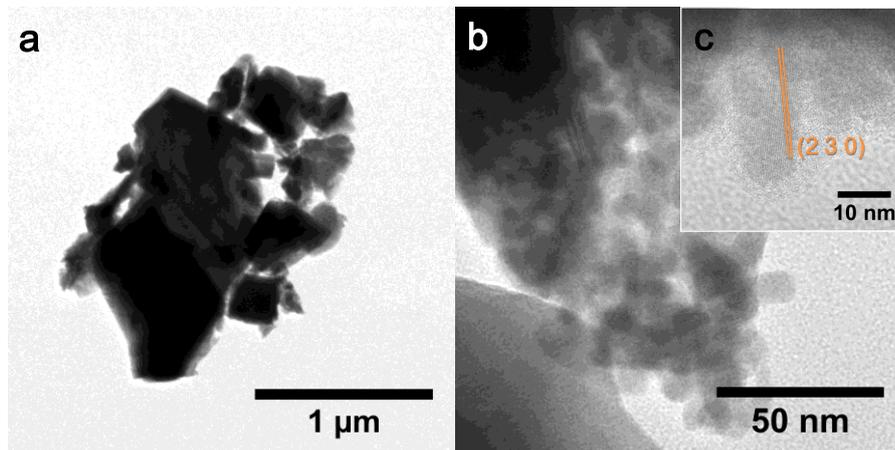


Figura 19: Imagen de TEM (a y b) e imagen de HRTEM con el correspondiente análisis de planos cristalinos (c) de la muestra H_Np3.

En las imágenes de TEM de la muestra H_Np1, se observa la presencia de nanopartículas con morfología de varillas, que presentaron un ancho medio de 21 nm y un largo medio de 381 nm, con una gran distribución de tamaños. El análisis de los planos cristalinos de esta muestra evidencia que las varillas corresponden al Bi_2S_3 , donde se observa que el plano (2 3 0) se encuentra en la dirección del lado más largo de las varillas, siendo este plano además el de mayor intensidad del XRD del Bi_2S_3 (Figura 16), lo cual es concordante con la estructura cristalina del compuesto [83]. Respecto a la muestra H_Np2, la morfología de la misma corresponde a partículas redondeadas de 5

nm aproximadamente, no pudiendo presentarse un análisis sistemático del tamaño de las mismas dada la aglomeración que presenta la muestra. En este caso, es posible observar en las partículas la presencia del plano cristalino (2 3 0) como en la anterior muestra analizada. Al comparar las muestras H_Np1 y H_Np2, donde la diferencia en la síntesis de las mismas fue la concentración de los reactivos empleada, se puede deducir que la misma tiene influencia en la morfología de las nanopartículas obtenidas. Si comparamos estas dos muestras con la H_Np3, donde no se utilizó PVP como ligando, se puede deducir que el PVP tiene un gran influencia en el control del tamaño de partícula y la distribución del mismo, dado que en el caso de la síntesis sin PVP (H_Np3), las partículas presentan tamaños que van desde 10 nm a 1 μm , presentando morfología de varillas las partículas que tienen menor tamaño y morfología irregular las de tamaño mayor.

Para corroborar que el ligando estuviera presente en las partículas obtenidas, se realizó espectroscopía IR a las muestras. El resultado del mismo se presenta en la Figura 20, donde se comprueba que en ambas muestras el PVP se encuentra en el producto final. En este caso, se puede afirmar que el PVP interacciona con las nanopartículas debido a los cambios en las bandas correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-O y C-N. En particular se logra apreciar un leve corrimiento hacia menor número de onda en la vibración de deformación C=O, lo que indica una menor fuerza de enlace, que puede estar dada por la interacción del oxígeno con las nanopartículas [128].

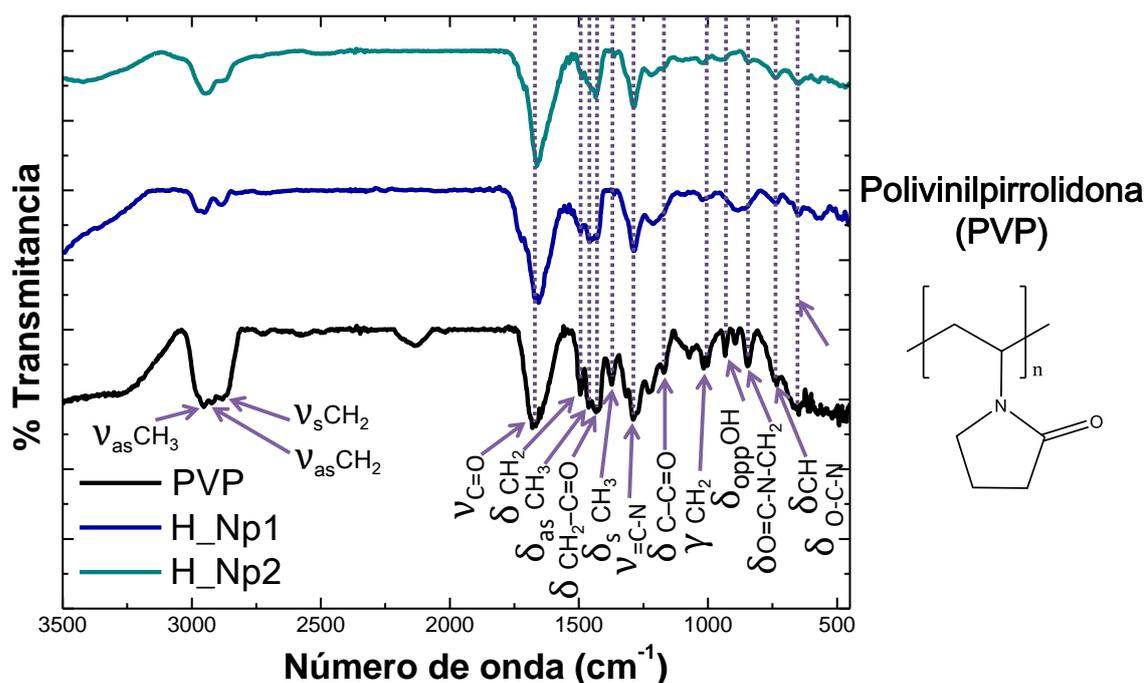


Figura 20: Espectros IR de las muestras H_Np1 y H_Np2 comparada con PVP.

4.1.2. Nanopartículas obtenidas por el método Hidrotérmico utilizando PEG como ligando.

En la mayoría de las síntesis realizadas utilizando este ligando (muestras H_Np4 a H_Np8) se obtuvieron partículas de Bi_2S_3 . Esto se comprobó por medio de XRD o HRTEM. En la Figura 21 se pueden observar los difractogramas de las síntesis H_Np7 y H_Np8, y en la Figuras 22 y 24 el análisis de los planos cristalinos de las muestras H_Np5.

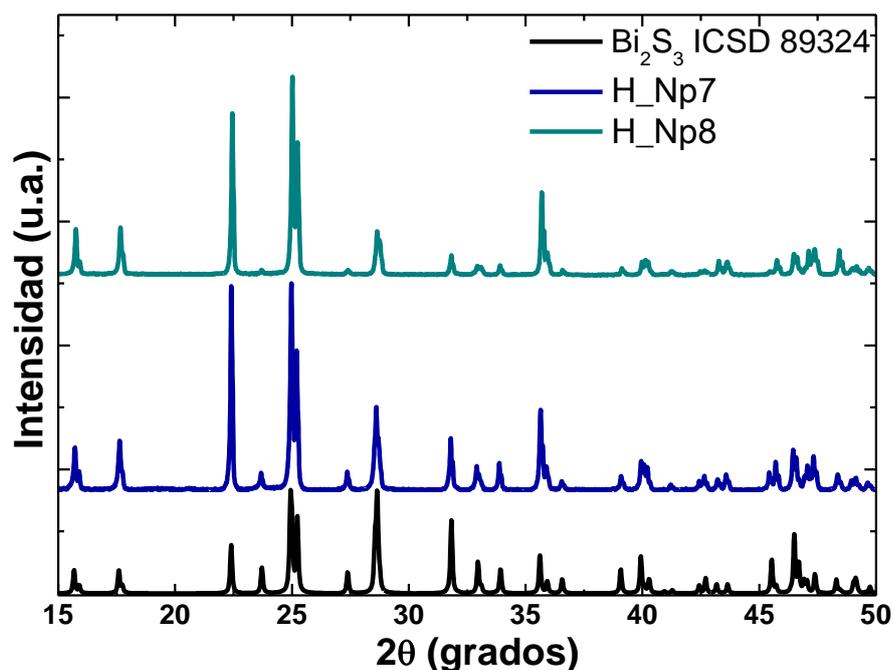


Figura 21: XRD de las muestras H_Np7 y H_Np8, comparados con la Ficha ICSD 89324 de Bi₂S₃.

A concentraciones de PEG bajas (H_Np4), la incorporación del ligando no tiene efecto sobre el control del tamaño de partícula de la muestra, como se evidencia a simple vista por el brillo característico de muestras micrométricas. Al aumentar la concentración de PEG 10 veces (H_Np5) la morfología obtenida son varillas de 7 nm de ancho en promedio, que se aglomeran para formar estructuras cuyo tamaño varía desde 13 nm a 2 μm de ancho por 20 nm a 6 μm de largo. En el caso de esta muestra, el plano cristalino que se distingue en el lado más largo de las varillas es el (3 1 0), lo que se puede correlacionar con un crecimiento a lo largo del eje c, propio del Bi₂S₃, como se discutió anteriormente.

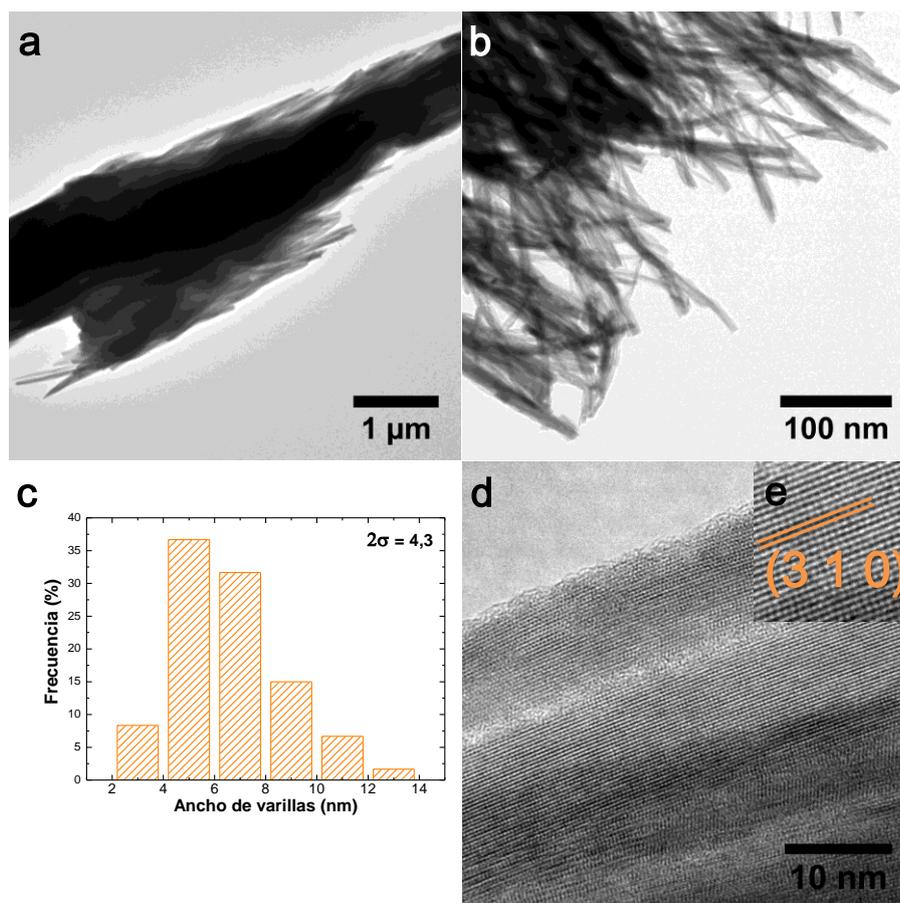


Figura 22: Imagen de TEM (a y b) e imagen de HRTEM (e) de la muestra H_{Np5}, con el correspondiente análisis de planos cristalinos (e), y la distribución de tamaño del ancho de las varillas (c).

Al aumentar 20 veces la concentración de PEG (H_{Np6}), se obtuvo un precipitado que fue analizado por XRD. El difractograma no fue concluyente porque contiene pocos picos característicos, como se puede observar en la Figura 23, y estos no pudieron asignarse al producto de interés o a los reactivos de la síntesis. De esta observación se deduce que la concentración de PEG juega un papel fundamental en la formación del producto de interés.

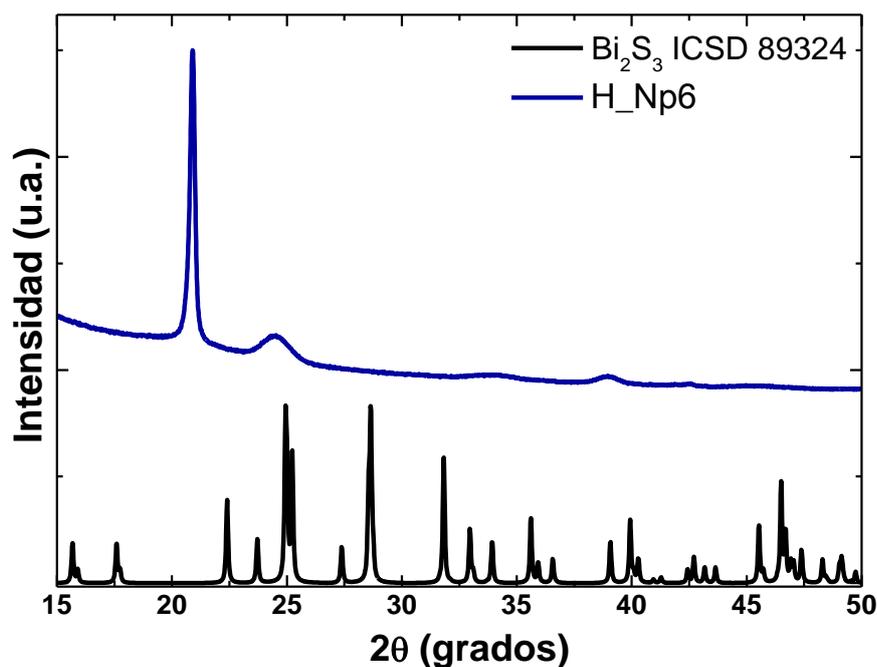


Figura 23: XRD de la muestra H_Np6, comparado con la Ficha ICSD 89324 de Bi_2S_3 .

Para lograr un menor tamaño de partícula que la obtenida en la síntesis H_Np5, se disminuyó el tiempo de síntesis de 6 h a 4 h, obteniéndose así la síntesis H_Np7. En la Figura 24 se pueden observar las imágenes de TEM obtenidas para esta muestra. La morfología de las partículas predominante fue de varillas, como en la muestra H_Np5, obteniéndose además morfologías irregulares. El tamaño de las mismas varió entre 21 nm y 36 μm , presentándose la mayoría de ellas en el rango de 50 a 550 nm, con la mediana en 339 nm, y cuyo crecimiento se presentó en el eje c como en el caso de las otras partículas de Bi_2S_3 obtenidas. Si comparamos estos tamaños con los obtenidos en la muestra H_Np5 observamos que el menor tiempo de síntesis permite obtener partículas con menor largo, pero más anchas y con morfología más irregular. En cambio en la síntesis H_Np8 (Figura 25), donde se había aumentado la concentración de PEG con respecto a la H_Np7, buscando mejorar la distribución de tamaños, se presentaron muy pocas partículas de morfología irregular, y el tamaño medio de las partículas fue de 1.2 μm de ancho por 2.1 μm de largo. Por lo tanto, el aumento de la concentración de PEG para mejorar la uniformidad de morfología de la muestra H_Np7 no es un camino posible, ya que se obtienen partículas de dimensiones en el orden de los micrómetros.

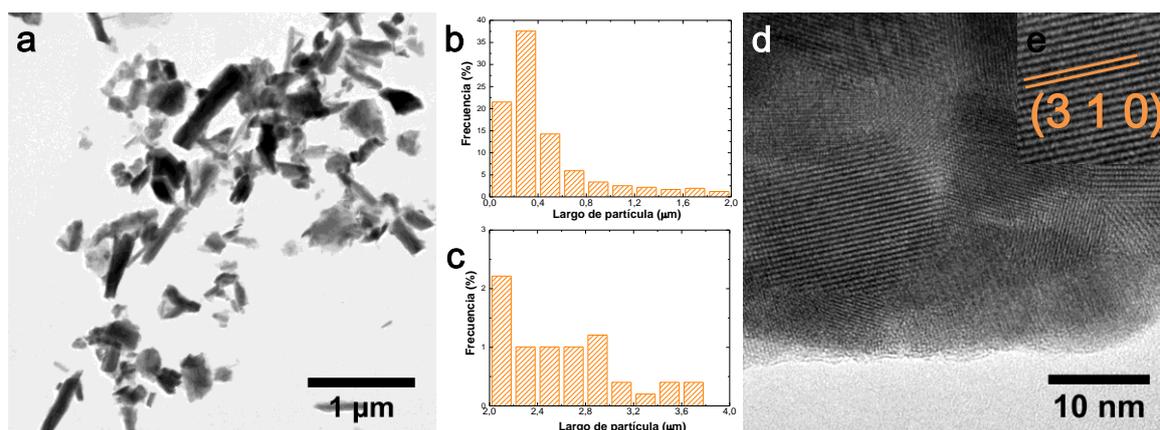


Figura 24: Imagen de TEM (a), distribución del largo de las partículas (b y c) e imagen de HRTEM (d) de la muestra H_Np7, con el correspondiente análisis de planos cristalinos (e).

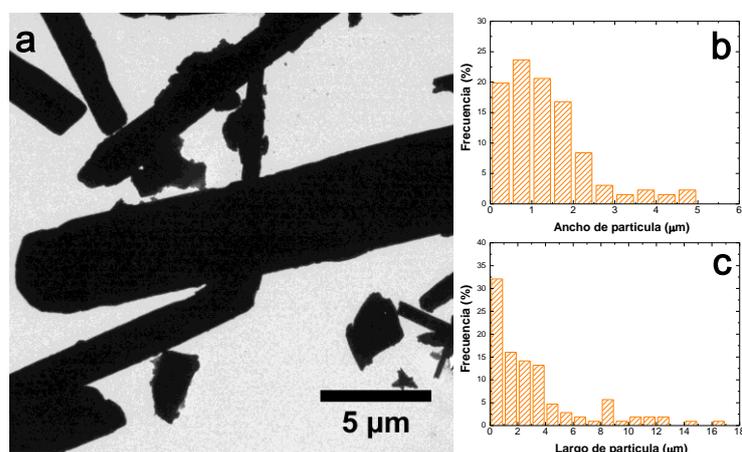


Figura 25: Imagen de TEM (a) y distribución de tamaño del ancho (b) y largo (c) de las partículas de la muestra H_Np8.

Considerando la muestra H_Np5 la que dio mejores resultados por el método hidrotérmico utilizando PEG como ligando, se analizó la misma por espectroscopía IR, comprobando la presencia de PEG en las partículas obtenidas (Figura 26). Se puede observar que las bandas correspondientes a las vibraciones O-H, C-O-C, C-C y del esqueleto carbonado (γ_{CH_2}) disminuyen su intensidad relativa. En particular es de destacar la gran disminución de intensidad de la banda de estiramiento de los enlaces de hidrógeno C-O...H que se forman intramolecularmente. Sumado a estos cambios se encuentra el leve corrimiento hacia menor número de onda de la deformación C-O y del

estiramiento asimétrico $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$. Además, la banda ancha del estiramiento asimétrico $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ del PEG solo se desdobra a tres bandas en la muestra [128].

Todos estos indicios permiten determinar que las partículas obtenidas en la síntesis H_Np5 contienen moléculas de PEG ligadas a ellas, y que esta unión no solo se da por los OH terminales preferentemente, sino que también hay interacción con el resto de los oxígenos del polímero.

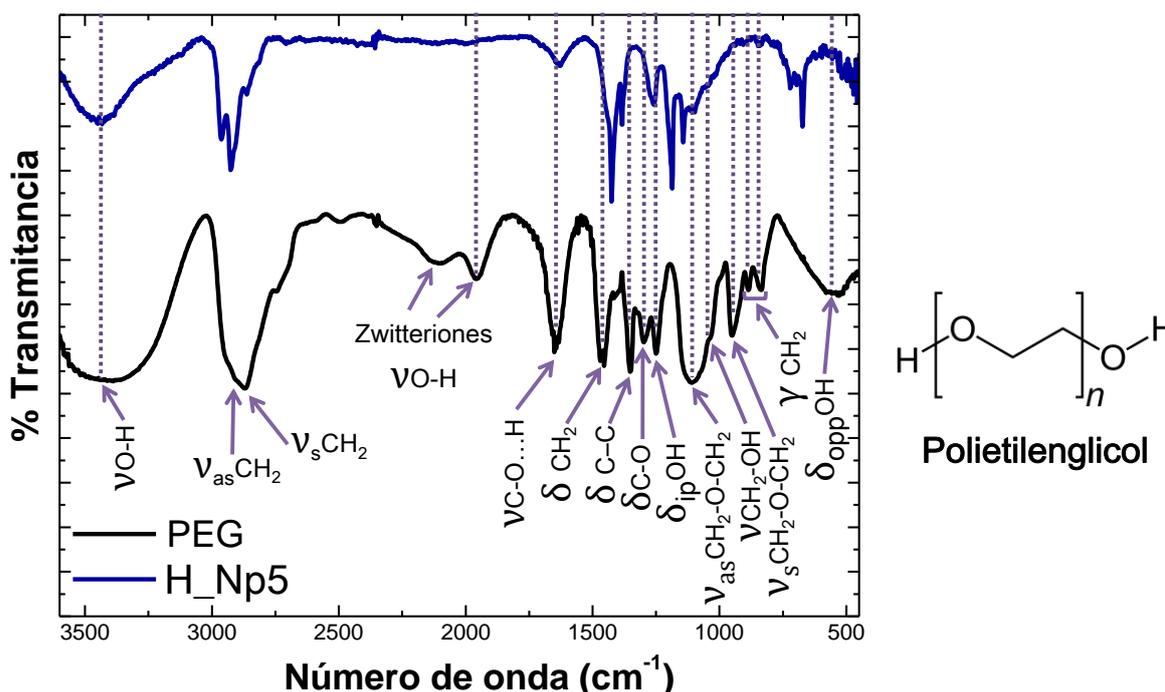


Figura 26: Espectro IR de la muestra H_Np5 comparada con PEG.

Analizando todos los resultados, es posible observar que las partículas obtenidas en éste trabajo utilizando el método hidrotérmico presentaron propiedades similares a las obtenidas en otros trabajos utilizando este mismo método [77], [129]–[131]. Pese al gran tamaño de las partículas, en los trabajos referenciados las partículas presentaron excelentes propiedades de acuerdo a la aplicación deseada en los mismos. En nuestro caso se concluye que por medio de este método de síntesis no se consiguió obtener partículas apropiadas para los ensayos celulares, por lo que se descartan las partículas obtenidos para continuar con los estudios. Igualmente los esfuerzos realizados sirven como base para trabajos a futuro ya que se obtuvo un gran conocimiento del sistema de

síntesis y permite conocer en qué focalizar futuros esfuerzos para lograr nanopartículas de Bi₂S₃ biocompatibles con un solo paso de síntesis.

4.2. Síntesis de Nanopartículas de Bi₂S₃ por el método “hot injection” en medio orgánico

Como se mencionó anteriormente, en el caso del método “hot injection” se realizaron dos pasos de síntesis para obtener nanopartículas recubiertas con un ligando biocompatible. Primero se realizó la síntesis de las nanopartículas en medio orgánico, utilizando OLA como ligando, en la cual se varió la concentración de las fuentes de bismuto y azufre, y posteriormente el escalado de la reacción. Luego de este paso, se realizó el cambio de ligando a las nanopartículas que se consideraron las más apropiadas, de acuerdo a posterior análisis por diferentes técnicas de caracterización. El cambio de ligando se realizó con el fin de alterar la polaridad de las nanopartículas obtenidas por el método “hot injection”, modificando la capa de externa de las nanopartículas de manera de quitar el ligando apolar (OLA) y unir el polímero polar PVP. Los parámetros que se variaron para lograr el objetivo fueron la utilización o no de reflujo y el tiempo de intercambio.

4.2.1. Identificación de la fase cristalina de las muestras

La fase cristalina de las nanopartículas sintetizadas se determinó por XRD de polvo. En la Figura 27 se muestran los difractogramas obtenidos para las muestras. Al comparar las reflexiones de los difractogramas de la muestra con los de la ficha ICSD 89324 del Bi₂S₃, se confirma la presencia de este compuesto como única fase obtenida en todas las muestras. Además, en los mismos se puede apreciar el ensanchamiento característico de los picos de difracción para muestras nanoparticuladas.

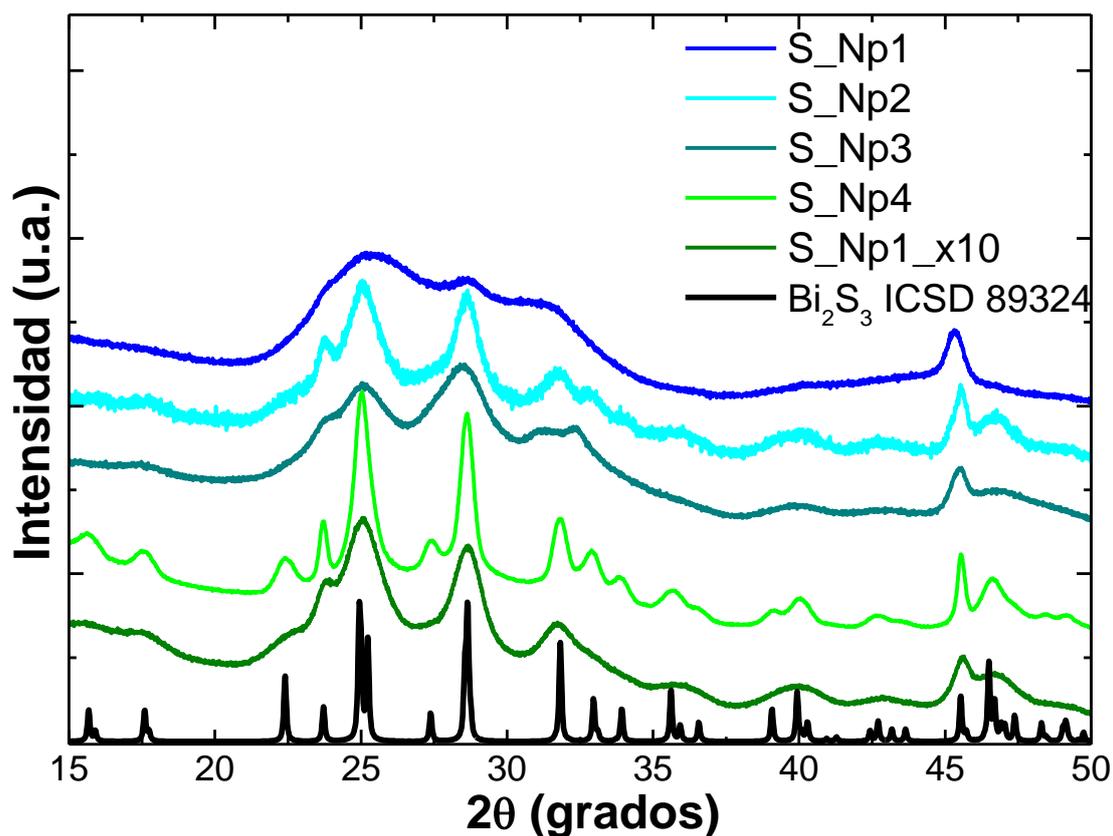


Figura 27: Difractogramas de muestras de Bi₂S₃ obtenidas comparadas con la ficha ICSD 89324.

Se buscó identificar los componentes que pudieran estar presentes en las muestras mediante espectrometría Raman, la cual es una técnica que permite obtener información de la parte inorgánica y orgánica. Para ello se seleccionaron las muestras S_Np1_x10 y S_Np1_x10_c/r_4 como casos representativos, debido a que la muestra S_Np1_x10_c/r_4 fue la elegida para los estudios *in vitro* que se realizaron posteriormente. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 28, y en la Tabla 4 se detallan los valores máximos de número de onda de las bandas obtenidas.

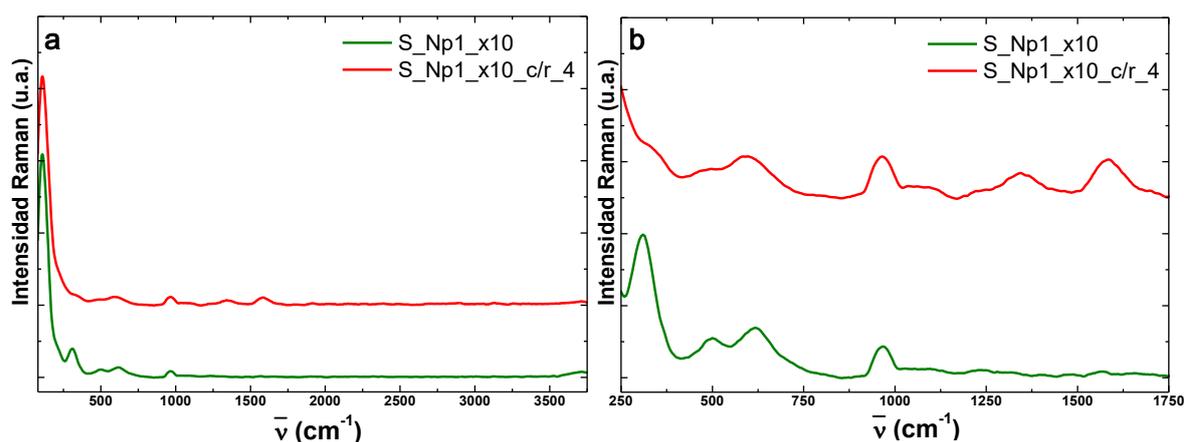


Figura 28: Espectro Raman desde 80 cm⁻¹ a 3750 cm⁻¹ de las muestras S_Np1 y S_Np1_x10_c/r_4 (a) y zoom del espectro en el rango 80-1750 cm⁻¹(b).

Número de onda (cm ⁻¹)	
S_Np1_x10	S_Np1_x10_c/r_4
120	120
310	310
500	500
614	591
968	964
1072	1071
1237	1241
-	1345
-	1582

Tabla 4: Bandas Raman de las muestras analizadas.

Como se puede observar en la Tabla 5, los modos vibracionales Raman teóricos del Bi₂S₃ deben de salir por debajo de 280 cm⁻¹ [132], [133]. En los datos obtenidos experimentalmente (Tabla 4) solo aparece una banda ancha entre 80 cm⁻¹ (valor mínimo obtenido por el filtro del equipo) y aproximadamente 300 cm⁻¹, con un máximo en 120 cm⁻¹ en ambas muestras. Se han reportado ya casos en los cuales las bandas Raman del

Bi_2S_3 se solapan por la generación de calor en la muestra inducido por el láser empleado en el ensayo, dando como resultado bandas anchas [134]. Por otro lado, a números de onda muy bajos tenemos la influencia de la cola del pico Rayleigh, lo que dificulta aún más el análisis de los resultados obtenidos. Conjuntamente, es posible observar que aparecen bandas a números de onda mayores que 300 cm^{-1} , las cuales no se corresponden con los valores teóricos de las bandas del Bi_2S_3 .

Modo	Número de onda (cm^{-1})
Ag	100
B1g	173
Ag	184
Ag	195
Ag	211
B3g	228
Ag	237
Ag	253
B1g	260
B1g	277

Tabla 5: Bandas Raman teóricas del Bi_2S_3 [132].

Se debe destacar que la intensidad del láser posibilita la oxidación de la muestra en el momento de realizar la caracterización, debido a que la misma fue realizada en atmósfera de aire. Si analizamos los número de onda a los cuales aparecen las vibraciones Raman del Bi_2O_3 y del $\text{Bi}_2\text{O}_2(\text{SO}_4)$ extraídos de bibliografía (Tabla 6), y teniendo en cuenta que la formación del compuesto $\text{Bi}_2\text{O}_2(\text{SO}_4)$ es posible a partir de Bi_2S_3 y una fuente de alta potencia [135]–[138], se pueden correlacionar las bandas obtenidas experimentalmente a estos compuestos.

Número de onda (cm ⁻¹)	
Bi ₂ O ₃	Bi ₂ O ₂ (SO ₄)
117-118	-
310-314	300-340
430-432	410-470
519-525	-
-	580-630
-	950-1200

Tabla 6: Bandas Raman de los compuestos Bi₂O₃ y Bi₂O₂(SO₄) [135]–[138].

Sumado a esto, se debe recordar que por medio de espectroscopía Raman es posible la identificación del ligando presente en las muestras. Sin embargo, en el caso de esta tesis no fue posible debido a la gran intensidad del láser empleado para la caracterización. Esta intensidad fue tal que consiguió degradar los ligandos de la muestra, quedando como carbono amorfo, cuya formación se puede identificar con la aparición de dos bandas Raman a 1350 cm⁻¹ y 1580 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones de deformación del carbono A_{1g} y E_{2g2}, denominadas comúnmente como pico D y G respectivamente [139].

En la Tabla 7 se muestra la asignación de las bandas obtenidas experimentalmente para ambas muestras. Ésta fue realizada teniendo en cuenta que la composición inicial de la muestra corresponde a Bi₂S₃ y que la misma es oxidada durante la caracterización, además de producirse la degradación de los ligandos a carbono amorfo.

Número de onda (cm ⁻¹)		Compuesto			
S_Np1_x10	S_Np1_x10_c/r_4	Bi ₂ S ₃	Bi ₂ O ₃	Bi ₂ O ₂ (SO ₄)	C
120	120	X	-	-	-
310	310	-	X	X	-
500	500	-	-	X	-
614	591	-	-	X	-
968	964	-	-	X	-
1072	1071	-	-	X	-
1237	1241	-	-	X	-
-	1345	-	-	-	X
-	1582	-	-	-	X

Tabla 7: Designación de las Bandas Raman experimentales a los distintos compuestos.

Es de destacar que la muestra S_Np1_x10 no presenta bandas bien definidas correspondientes al C, pero si se observa con detención en la Figura 28, es posible ver pequeñas bandas cercanas a 1320 cm⁻¹ y 1570 cm⁻¹. Esto se puede correlacionar con el largo de los ligandos presentes en las muestras. Teniendo en cuenta que la muestra S_Np1_x10 contendría OLA, la cual es una cadena alifática de 18 carbonos, y que la muestra S_Np1_x10_c/r_4 contendría PVP, el cual es un polímero cuyo largo está ligado a su peso molecular, es de esperar que la formación de C se deen mayor medida en el PVP que en la OLA, lo que concuerda con lo obtenido experimentalmente.

Adicionalmente, durante las observaciones en TEM se realizó EDS a las nanopartículas observadas. El análisis reveló la presencia de Bi y S en las muestras, además de señales de Cu, Cr, Au, C y Si, pertenecientes al porta muestra y al detector [140]. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 29.

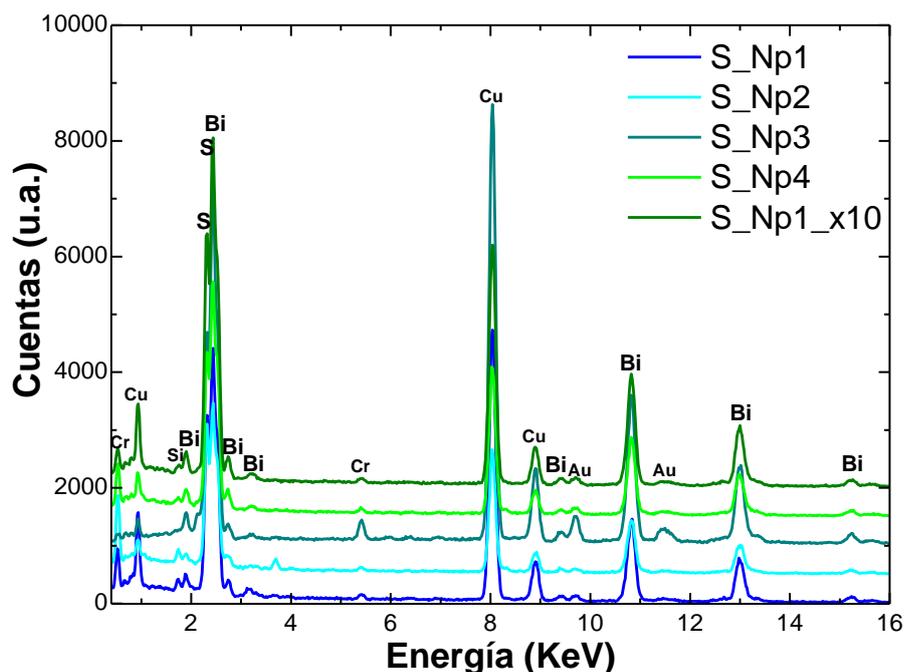


Figura 29: Espectroscopía de Dispersión de Energía de las muestras sintetizadas por el método de “hot injection”.

4.2.2. Determinación de la morfología de las muestras

Las nanopartículas obtenidas por medio de la síntesis “hot injection” se observaron por microscopía electrónica de transmisión de baja y alta resolución (TEM y HR-TEM), antes y después de realizar el cambio de ligando. En las Figuras 30-34 se muestran imágenes representativas de las partículas obtenidas antes del cambio de ligando, con sus respectivos histogramas de distribuciones de tamaño, y en las Figuras 35-38 se muestran los resultados luego de realizar el cambio de ligando.

Al analizar las muestras obtenidas antes del cambio de ligando se pueden destacar varias observaciones. Primero, la diferencia en la morfología que presentan estas muestras. En la muestra S_Np1 se obtuvieron nanopartículas cristalinas con morfología de tipo disco. En la muestra S_Np2 las nanopartículas presentaban una morfología similar a la obtenida en la síntesis S_Np1, pero con una forma no definida. En el caso de las síntesis S_Np3 y S_Np4 las nanopartículas obtenidas presentan morfología de varillas cristalinas, pero con diferencias entre sí. En el caso de la síntesis S_Np3 las varillas presentaron forma similares a agujas cristalinas, pero en la síntesis S_Np4 se obtuvo una

mezcla de varillas cristalinas de sección cuadrada y partículas amorfas de morfología de disco, como es posible observar en la esquina superior a la izquierda en la Figura 33.

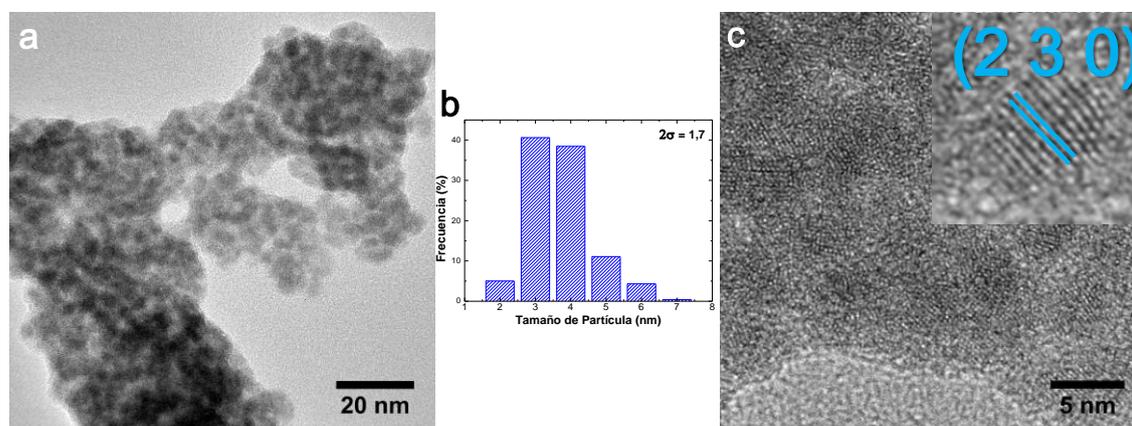


Figura 30: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y el análisis de planos cristalinos (inserto en c) de la muestra S_Np1.

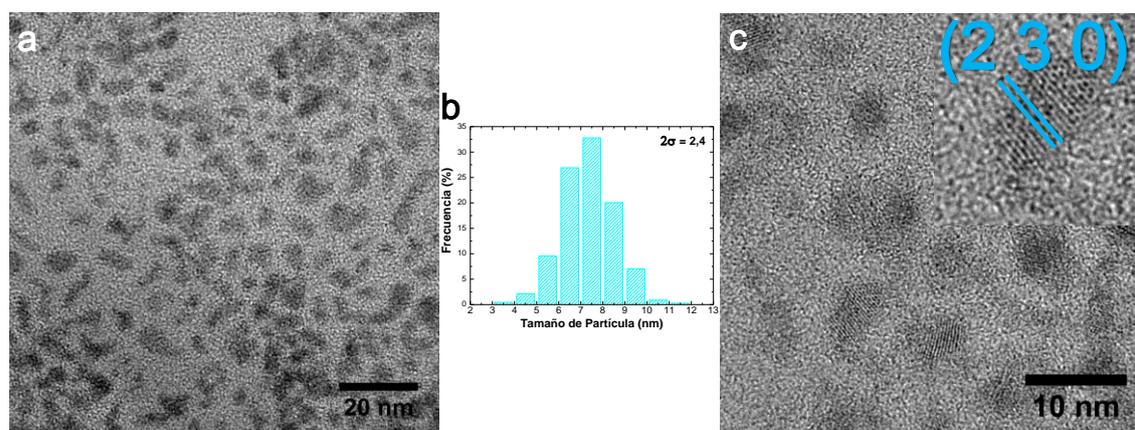


Figura 31: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y el análisis de planos cristalinos (inserto en c) de la muestra S_Np2.

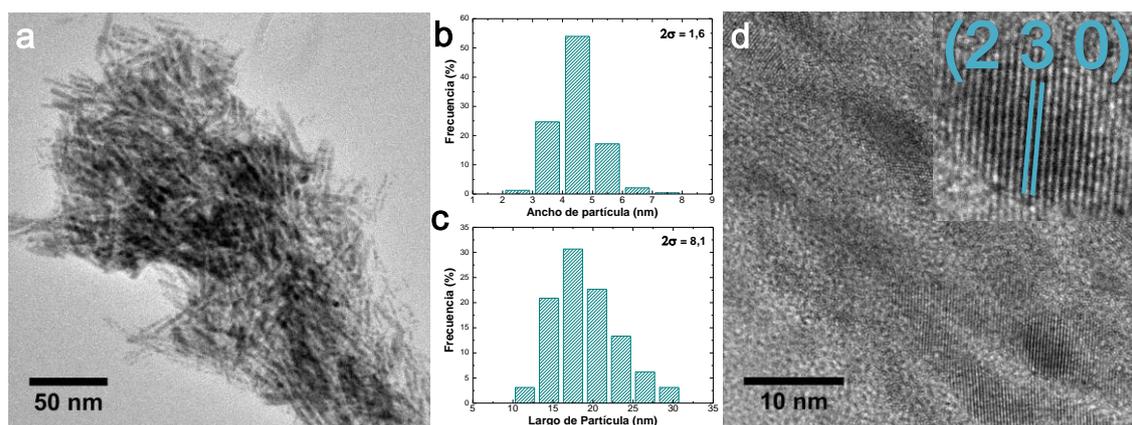


Figura 32: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (d), con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (b-c) y el análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np3.

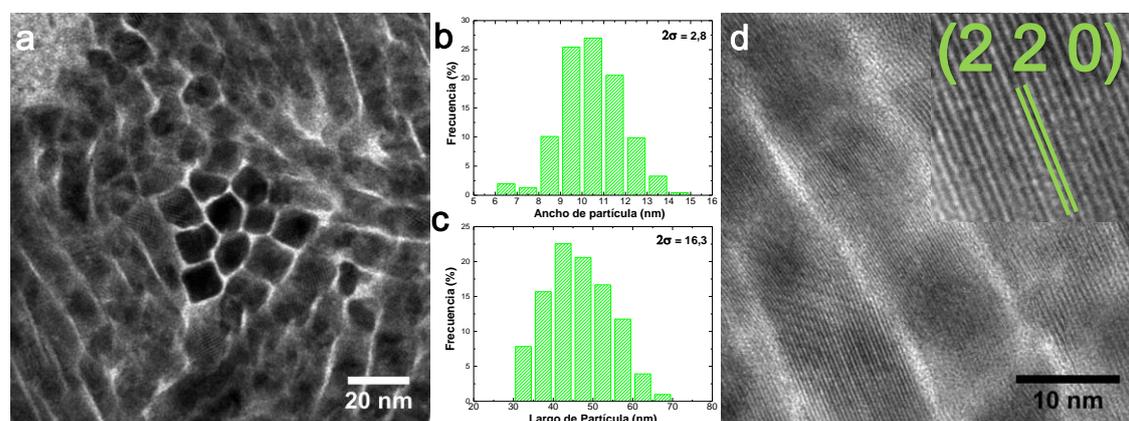


Figura 33: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (d), con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (b-c) y el análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np4.

En el caso de la síntesis S_Np1 el tamaño promedio de partícula obtenido fue de 3.6 ± 1.7 nm, mientras que en las nanopartículas obtenidas en la síntesis S_Np2 el tamaño promedio fue de 7.3 ± 2.4 nm. Por lo tanto, al comparar los tamaños obtenidos al variar la concentración de la fuente de azufre, es posible observar que se obtienen nanopartículas de menor tamaño al emplear mayor concentración de azufre. Esto concuerda con lo observado en bibliografía, donde se ha reportado que el azufre actúa como puntos de nucleación a partir de los cuales crecen las partículas [88], [141]. Su mayor concentración permitiría un aumento del número de partículas que nuclean y crecen, generando que

para la misma cantidad de bismuto en solución, no sea factible un gran aumento de su tamaño.

Otra observación importante a destacar, es el incremento del tamaño y el cambio en la morfología que se observa en las nanopartículas obtenidas al aumentar la concentración de la fuente de bismuto. Como se nombró anteriormente, la síntesis S_Np1 presenta partículas de morfología tipo disco con un tamaño de partícula promedio de 3.6 ± 1.7 nm, mientras que en el caso de las síntesis S_Np3 y S_Np4 la morfología predominante es tipo varillas. En la muestra S_Np3, el ancho promedio de las varillas es de 4.4 ± 1.6 nm y su largo de 19.1 ± 8.1 nm, y en la síntesis S_Np4 las nanovarillas presentan un ancho promedio de 10.4 ± 2.8 nm y un largo promedio de 46.2 ± 16.3 nm. En este último caso también se logró observar partículas amorfas cuyo tamaño promedio es de 2.6 ± 0.8 nm. Estos datos se resumen en la Tabla 8, donde además se agregan los resultados obtenidos para la síntesis S_Np1_x10.

Muestra	[Bi(Neo) ₃] (mM)	Bi:S	Morfología	Tamaño medio (nm/ nm x nm)
S_Np1	10	1:5	Disco	3.6
S_Np2	10	1:1	Disco	7.3
S_Np3	61	1:5	Varillas	4.4 x 19.1
S_Np4	82	1:5	Varillas	10.4 x 46.2
S_Np1_x10	10	1:5	Varillas	4.1 x 20.2

Tabla 8: Morfologías y tamaños obtenidos en las síntesis realizadas previo al cambio de ligando.

Los resultados obtenidos para la muestra S_Np1_x10 revelan que el escalado cambia el tamaño y la morfología de las nanopartículas, al comparar las nanopartículas obtenidas en esta síntesis con los obtenidos en la muestra S_Np1, destacando nuevamente que la única diferencia entre ambas es el escalado de la síntesis. Al examinar las Figuras 30 y 34 se puede verificar el cambio de morfología obtenido, pasando de nanopartículas tipo disco de 3.5 ± 1.6 nm a nanovarillas cuyo tamaño promedio es de 4.1 ± 1.2 nm de ancho por 20.2 ± 7.0 nm de largo. El resultado obtenido se justifica considerando las

condiciones de enfriamiento, aunque fueron las mismas para ambas muestras, la nueva geometría del balón de reacción utilizada fue distinta (balón de 100 mL en la muestra S_Np1 y de 250 mL en la S_Np1_x10). Esto influye en la conducción de temperatura en el paso de enfriamiento, ocasionando que la velocidad de transferencia de calor sea más lenta. Teniendo en cuenta que este paso es clave para el control del tamaño de las nanopartículas, dado que su función es detener la reacción, que disminuya la velocidad de enfriamiento ocasiona que las nanopartículas puedan continuar creciendo. La morfología de varilla obtenida concuerda con estudios reportados, donde se observa que a mayor tiempo de síntesis el Bi_2S_3 crece más rápidamente en su eje axial que en su eje radial, obteniéndose como resultado la presencia de morfología tipo varilla [88].

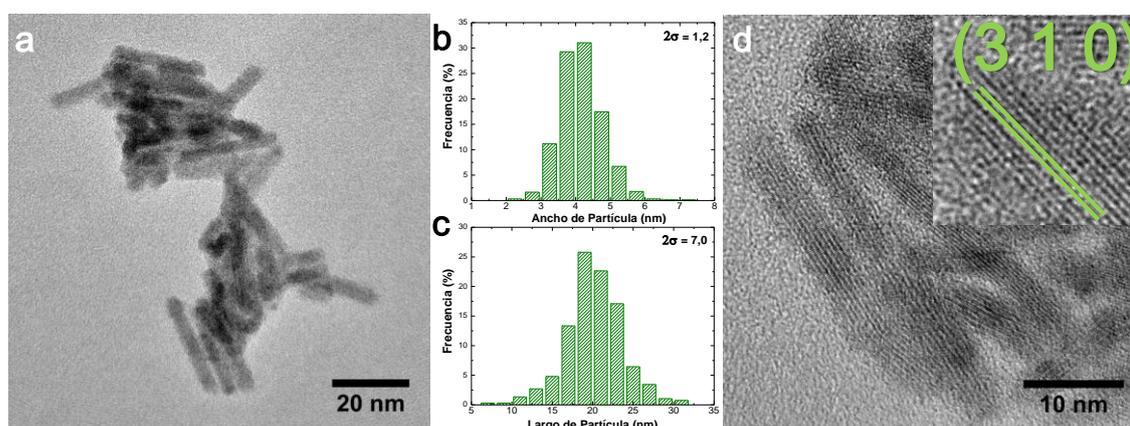


Figura 34: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y el análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np1_x10.

Analizando los resultados obtenidos de bibliografía, se puede observar que en algunos casos particulares se han obtenido por “hot injection” nanopartículas cuyo tamaño varía entre 4-10 nm utilizando como combinación de fuentes de Bi y S: $\text{BiI}_3\text{-H}$ [142], $\text{BiCl}_3\text{-S}$ [143], $\text{BiCl}_3\text{-NaS}_2\text{CNET}_2$ ($\text{NaS}_2\text{CNET}_2$: trihidrato de dietilditiocarbamato de sodio) [144] y $\text{Bi}(\text{Neo})_3\text{-TAA}$ (TAA: tioacetamida) [103]. Pero la morfología que más se ha reportado en trabajos previos son nanovarillas que varían entre 5 – 35 nm de ancho y 14 – 900 nm de largo, utilizando como fuente de Bi el BiCl_3 [80], [84], [143]–[146], $\text{Bi}(\text{Ac})_3$ (acetato de bismuto) [147], o $\text{Bi}(\text{Neo})_3$ [141], y como fuente de S la TAA [80], [141], S sólido [84],

[143], [145], [146], $((\text{CH}_3)_3\text{Si})_2\text{S}$ (sulfuro de bis(trimetilsililo)) [147] o $\text{NaS}_2\text{CNET}_2$ [144]. En la Tabla 9 se resumen las morfologías, los tamaños y las condiciones de síntesis empleadas en algunos de los trabajos referenciados anteriormente.

Fuente		Bi:S	T (°C)	t (min)	Morfología	Tamaño (nm/ nm x nm)	Ref	
Bi	S							
BiI_3	H	1:10	25	40	Disco	4.1	[142]	
BiCl_3	S	5:1	130	30	Disco	9.5	[143]	
					Varillas	5 x 35		
BiCl_3	$\text{NaS}_2\text{CNET}_2$	1:3	220	2	Disco	7	[144]	
			180	120	Varillas	35 x 450-900		
$\text{Bi}(\text{Neo})_3$	TAA	1:1	105	1	Disco	3–5	[103]	
BiCl_3	S	5:1	130	10	Varillas	7 x 14	[145]	
						2:3		25 x 170
						2:1		80 x 480
						4:1		50 x 123
BiCl_3	S	1:3	170	5	Varillas	16 x 145	[84]	
						2:1		80 x 480
						4:1		50 x 123
						1:3		16 x 145
BiCl_3	S	1:5	130	60	Varillas	20 x 100	[146]	
BiCl_3	TAA	1:1	180	5-10	Varillas	7 x 37,5	[80]	
						2:3		7 x 37,5
						2:1		8.5 x 14,5
						1:1.7		4.5/17 x 104
$\text{Bi}(\text{Ac})_3$	$((\text{CH}_3)_3\text{Si})_2\text{S}$	5:1	100	120	Varillas	7 x 22	[147]	
$\text{Bi}(\text{Neo})_3$	TAA	1:1	160	20	Varillas	9 x 28	[141]	
						2:3		5 x 17
						2:1		7 x 45
						4:1		6 x 68

Tabla 9: Condiciones de síntesis, morfologías y tamaños obtenidos en síntesis de nanopartículas de Bi_2S_3 reportadas.

Teniendo en cuenta los datos de la Tabla 9, para condiciones de síntesis similares a las empleadas en este trabajo, la morfología de varillas es la más común. En los casos donde se empleó una mayor concentración de S que la estequiométrica (relación Bi:S mayor a 2:3), se obtuvieron nanopartículas con morfología de varillas (referencias [144] y [80], [84], [146] de la Tabla 9). Observando los tamaños de esas estructuras se puede señalar que todas ellas son de mayor tamaño que las obtenidas en esta Maestría. Esto se puede deber a que en este trabajo se utilizaron tiempos de síntesis más cortos (40 segundos frente a 5-120 minutos en algunos de los trabajos referenciados), lo que reduce el tiempo de crecimiento de las estructuras obtenidas, y en algunos casos permitiendo tener morfología de disco, la cual a tan alta temperatura de síntesis (180 °C) es raro obtener [88], [141]. En el caso donde la concentración de bismuto es mayor a la estequiométrica, la morfología mayormente obtenida también es de varilla. Cuando la relación Bi:S fue 1:1, como la empleada en la síntesis S_Np2, se obtuvieron partículas con formas de disco usando una temperatura de 105 °C por 1 min (referencia [103]). En síntesis cuando la temperatura empleada es mayor (referencias [80] y [141]) la morfología cambia a varillas, destacando que a 180 °C el ancho de las mismas son del orden a las obtenidas en esta Maestría, teniendo en cuenta el mayor tiempo de síntesis empleado en las referencias (5-10 min de síntesis).

Si nos centramos en los resultados obtenidos luego del cambio de ligando, se puede observar en los histogramas de las Figuras 35-38 y los resultados en la Tabla 10 que este paso contribuye al crecimiento de las partículas. La primera observación a destacar es que solamente en la síntesis S_Np1_s/r se obtuvo morfología de disco, obteniéndose un crecimiento promedio aproximado de apenas 1 nm (crecimiento aparente desde 3.6 ± 1.7 nm a 4.5 ± 1.5 nm). En este caso la muestra S_Np1_s/r fue obtenida sin aplicar reflujo, por lo tanto no fue expuesta a un tratamiento a alta temperatura, que le impartiera la energía necesaria para continuar creciendo. Comparando los valores de tamaño obtenidos para las demás síntesis luego del cambio de ligando se puede observar que el ancho de varilla en todas ellas es equivalente, habiendo únicamente una variación en el largo de las mismas. Esta variación es notoria al comprar las muestras S_Np1_c/r_4 y S_Np1_c/r_12 con la muestra S_Np1_x10_c/r_4, observándose una variación de casi 10 nm. Si se tiene en cuenta que las dos primeras fueron obtenidas a partir de S_Np1 cuya

morfología era de disco de 3.6 ± 1.7 nm, se puede observar un aumento marcado del largo de las partículas, pasando de 3.6 nm a 15.5 nm y 17.0 nm de largo promedio. Como el ancho de las varillas obtenidas es aproximadamente el mismo para todas, e incluso a la muestra S_Np1, se puede deducir que las varillas obtenidas en el proceso de cambio de ligando fueron producto de la coalescencia de las nanopartículas de la muestra S_Np1, uniéndose de tal forma de mantener su preferencia de crecimiento a lo largo del eje cristalográfico c, como se ha visto en las imágenes de TEM en este trabajo. En contraposición al marcado crecimiento de estas dos síntesis, se encuentra el caso del crecimiento longitudinal de tan solo 7 nm de la síntesis S_Np1_x10_c/r_4, recordando que la misma se obtiene a partir de varillas de 4.1×20.2 nm de ancho y largo promedio. Estos resultados son otro indicio de la preferencia del Bi_2S_3 en crecer como varillas, dejando casi invariante el ancho de las mismas.

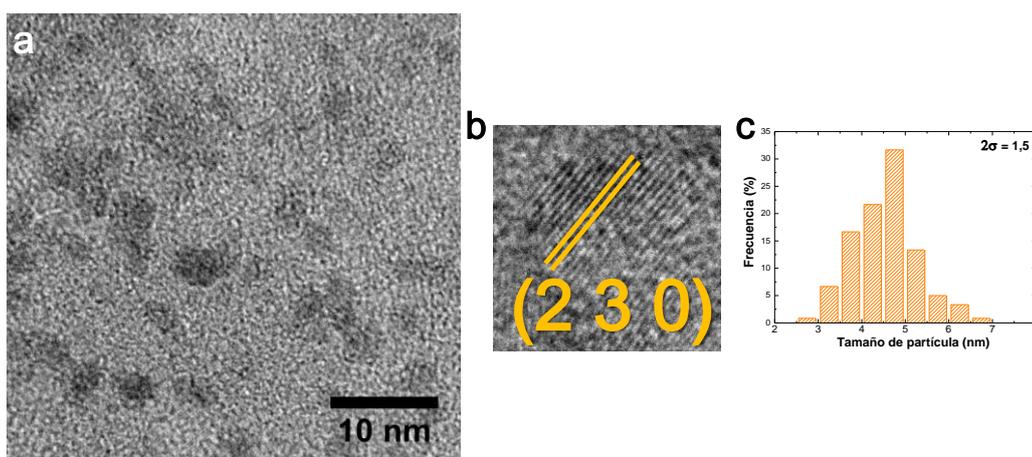


Figura 35: Imágenes de TEM (a) con el correspondiente histograma de distribución de tamaño de partícula (c) y el análisis de planos cristalinos (b) de la muestra S_Np1_s/r.

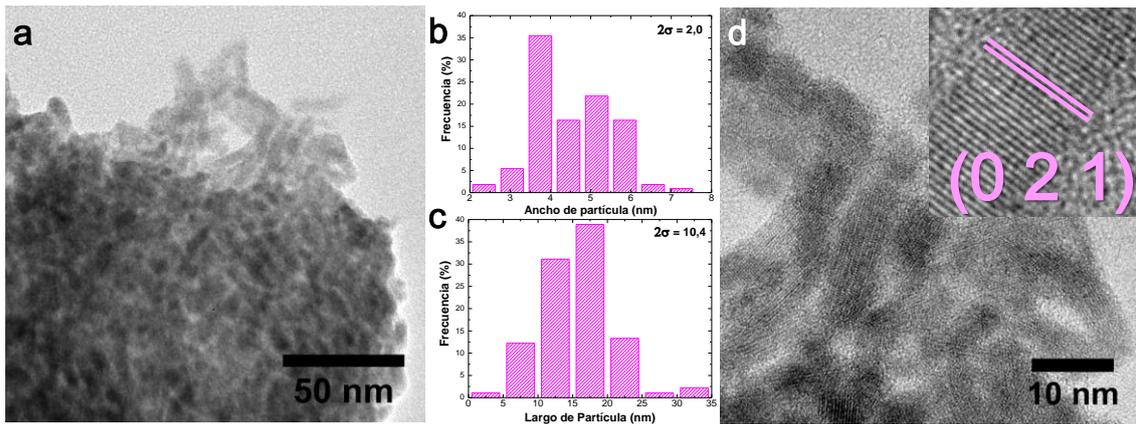


Figura 36: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np1_c/r_4.

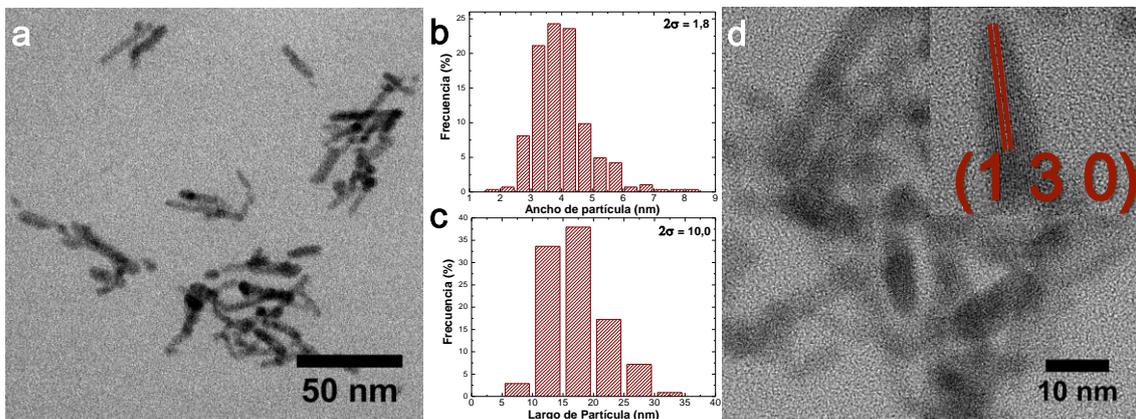


Figura 37: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np1_c/r_12.

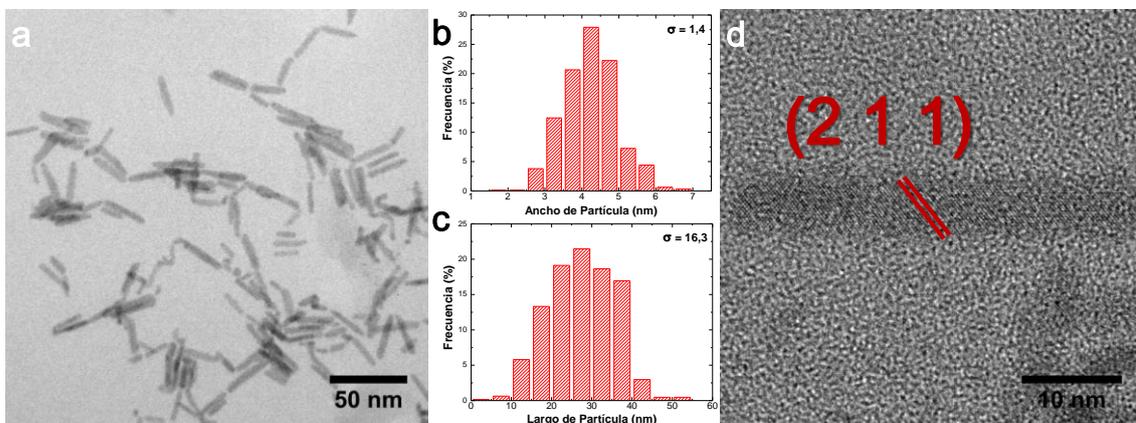


Figura 38: Imágenes de TEM (a) y HR-TEM (c), histograma de distribución de tamaño de partícula (b) y análisis de planos cristalinos (inserto en d) de la muestra S_Np1_x10_c/r_4.

Muestra	Morfología	Tamaño partícula	
		Ancho (nm)	Largo (nm)
S_Np1_s/r	Disco	4.5 ± 1.5	-
S_Np1_c/r_4	Varillas	4.0 ± 1.8	17.0 ± 10.0
S_Np1_c/r_12	Varillas	4.5 ± 2.0	15.5 ± 10.4
S_Np1_x10_c/r_4	Varillas	4.2 ± 1.4	27.5 ± 16.3

Tabla 10: Morfologías y tamaños obtenidos en las síntesis realizadas luego al cambio de ligando.

Como se puede observar en las Figuras 34-38, todas las muestras fueron caracterizadas por medio de HRTEM, donde se verificó su cristalinidad, observándose planos cristalinos en todas ellas. Para todas las muestras donde se obtuvo partículas con morfología de discos, el plano cristalino que se reconoció en las partículas fue el corresponde al (2 3 0). Para las síntesis donde se obtuvo morfología de varillas, se lograron distinguir varios planos cristalinos, destacándose la aparición de los que correspondan a la familia (h k 0), cuya dirección es paralela a la dirección de crecimiento longitudinal de las partículas. Otros planos distintivos son el (0 2 1) que aparece en la muestra S_Np1_c/r_4, y cuya dirección es perpendicular a la dirección de crecimiento longitudinal de las partículas, y el plano (2 1 1), correspondiente a la muestra S_Np1_x10_c/r_4, el cual se presenta de forma oblicua a la dirección de crecimiento longitudinal. Todos estos resultados demuestran que las nanopartículas obtenidas crecen en la dirección del *eje c*, a expensas del alargamiento continuo de los planos (h k 0). Este resultado concuerda con todo lo discutido en las otras caracterizaciones realizadas a estas partículas y con datos similares obtenidos en trabajos reportados [80], [84], [88], [141], [148].

Se ha reportado ya la funcionalización de las partículas de Bi₂S₃ con polímeros compatibles, como son el poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) [149], Tween 20 [78], Pluronic F127 [107], polivinilpirrolidona (PVP) [104] y óxido de silicio junto a polietilenglicol (SiO₂-PEG) [145] para lograr que las mismas fueran biocompatibles. En estos casos se obtuvieron nanocompuestos de 754.6 nm utilizando PLGA, nanoesferas de

50 nm utilizando tanto Tween 20 como SiO₂-PEG y platelet de 10 nm x 50 nm x 3-4 nm utilizando PVP. En todos los casos nombrados, las partículas obtenidas son de mayor tamaño que las funcionalizadas con PVP en este trabajo.

4.2.3. Identificación del ligando en las muestras

4.2.3.1. Estudio de presencia de ligandos por medio de espectroscopía IR

La presencia de OLA en el entorno de las nanopartículas se determinó mediante espectroscopia infrarroja de reflectancia difusa (IR-difusa). En la Figura 39 se muestran los espectros de las síntesis obtenidas, antes de realizar el cambio de ligando, donde se comparan los mismos con el espectro de OLA (obtenido en las mismas condiciones).

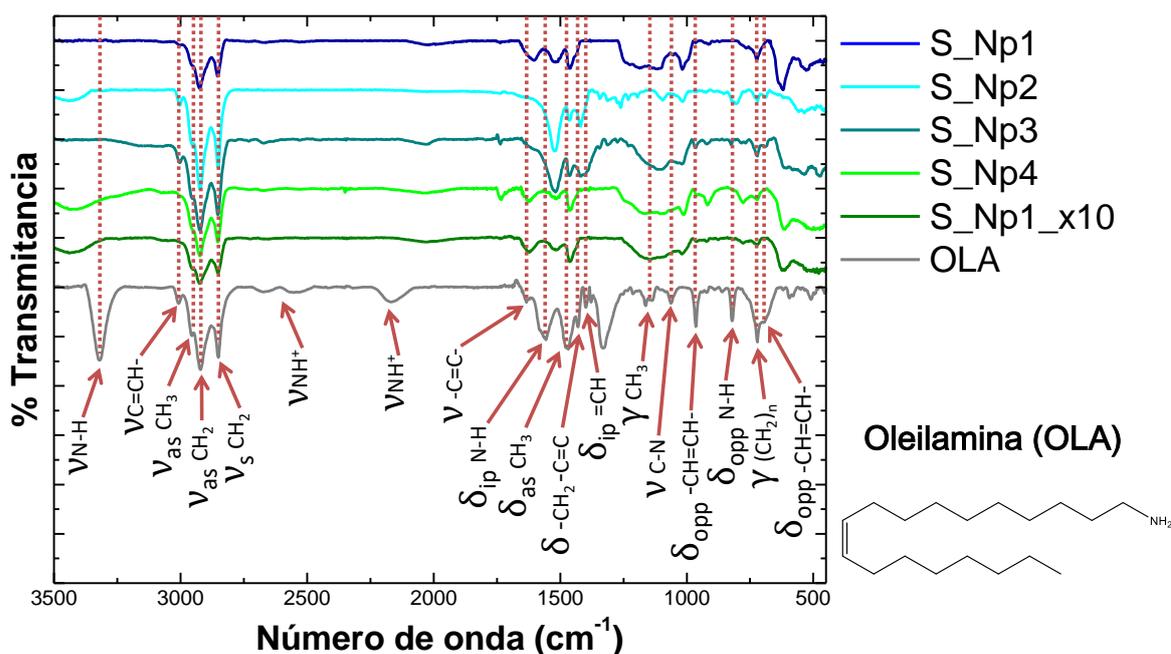


Figura 39: Espectros IR de las muestras de Bi₂S₃ antes del cambio de ligando.

Analizando los espectros se pueden identificar varios cambios entre el espectro de OLA puro y el obtenido para las partículas de Bi₂S₃. El más notorio es la desaparición de la banda a 3320 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de estiramiento N-H y de su banda de deformación en el plano a 1580 cm⁻¹. Sumado a esto, se encuentra el corrimiento de la

banda de deformación fuera del plano a 820 cm^{-1} en los espectros de las muestras. Además, es notable la aparición de una banda a 1520 cm^{-1} en todas las muestras, cercana a la banda de deformación en el plano del N-H que desaparece. Esta banda sale en el rango del grupo funcional $\text{N}^+\text{-H}_2$, lo que sería un indicativo que la OLA se liga a las nanopartículas por medio del N sin perder los hidrógenos, y por esta razón desaparece la banda de estiramiento N-H. Otro cambio a destacar involucra la vibración de estiramiento C-N. Esta vibración aparece cerca de los 1330 cm^{-1} en la OLA sola, pero se corre a mayores números de onda en los espectros de las muestras. Este corrimiento a mayores número de onda nos indica que el enlace C-N tiene una mayor constante de enlace, posiblemente debido a la coordinación del N a las nanopartículas, y el cambio en el grupo funcional de la amina [128], [150].

Se puede apreciar además, que en algunos de los espectros de las muestras se pueden identificar vibraciones correspondientes al AO, como son las bandas de estiramiento del C=O a 1707 cm^{-1} y del C-O a 1288 cm^{-1} , y la banda de deformación O-H a 933 cm^{-1} . Estas observaciones se muestran en la Figura 40. [128], [151]

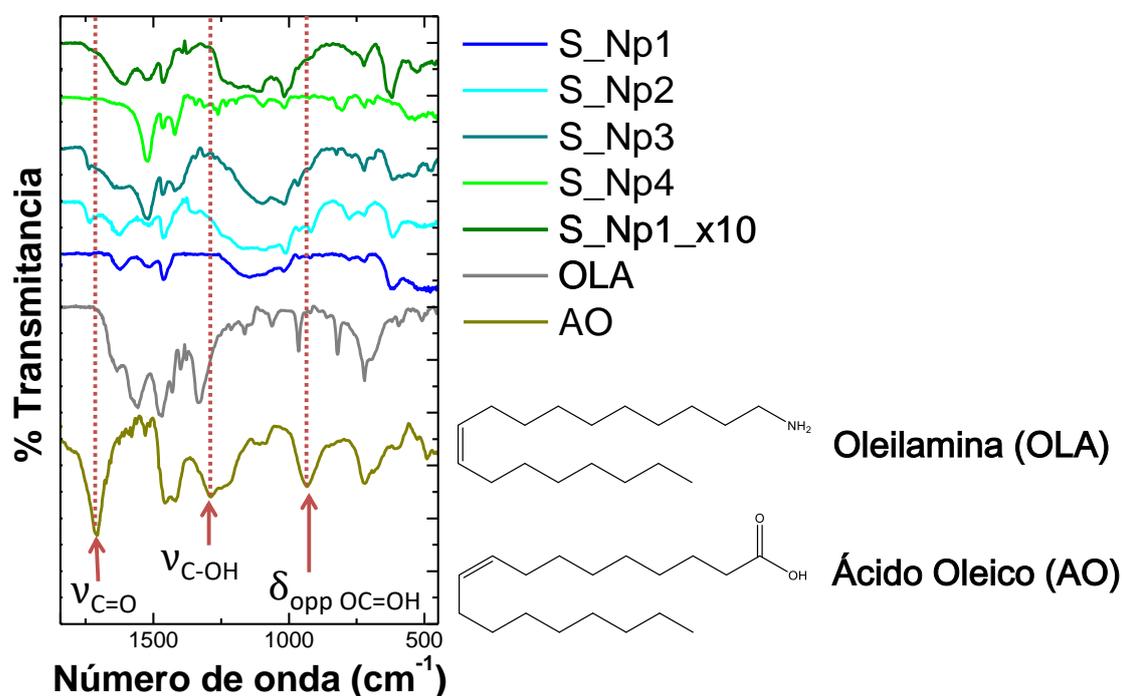


Figura 40: Bandas IR de $\nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{C-OH}}$ y $\delta_{\text{opp OC=OH}}$ correspondientes al AO, presentes en las muestras de Bi_2S_3 antes de realizar el cambio de ligando.

En base a los resultados obtenidos, podemos asegurar que en las muestras se presenta excusivante OLA o una mezcla de OLA/AO actuando conjuntamente como ligando (este último caso es visible en las muestras S_Np1, S_Np3 y S_Np4). Esto ya se ha observado en síntesis de nanopartículas semiconductoras obtenidas en solución utilizando OLA y AO conjuntamente. En estos casos los ligandos se presentan como complejo acido–base $\text{RCOO}^- - \text{RNH}_3^+$ unidas a las nanopartículas por interacción de este complejo, donde puede unirse mono- o bi-dentado a las nanopartículas, o moléculas “libres”, unidas a las nanopartículas por separado (RCOOH y RNH_2) [150], [152]–[154].

Analizando los espectros IR de las síntesis luego del cambio de ligando, mostrados en la Figura 41, se puede apreciar claramente la presencia de PVP en las muestras. Un cambio en las bandas de vibración es el corrimiento hacia menores números de onda de la banda de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del PVP en las muestras, lo que nos permite sospechar una interacción entre el ligando y las nanopartículas [128], [155].

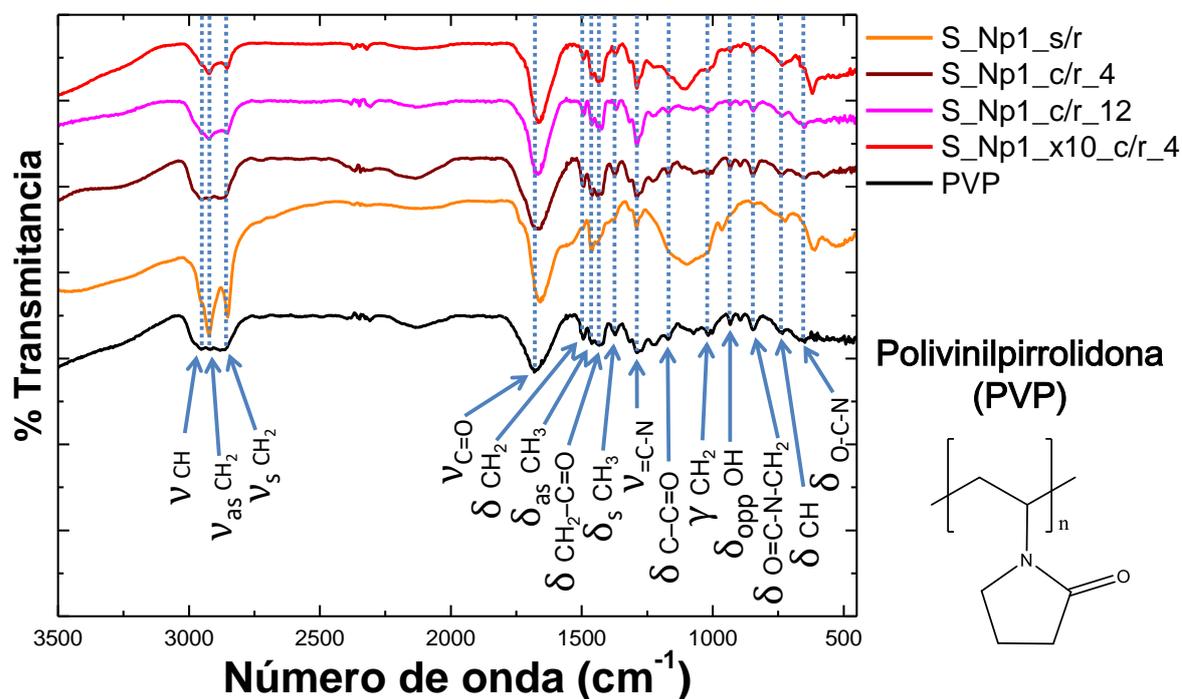


Figura 41: Espectros IR de las muestras de Bi_2S_3 luego del cambio de ligando.

Otra observación es la presencia de OLA en la síntesis S_Np1_s/r. Esta afirmación se puede observar en la Figura 42, donde se muestran las principales bandas de OLA en la muestra S_Np1_s/r. En las otras muestras se observó sólo la presencia de PVP. Por lo tanto, se deduce que el reflujo es indispensable para que se dé el intercambio completo de ligando.

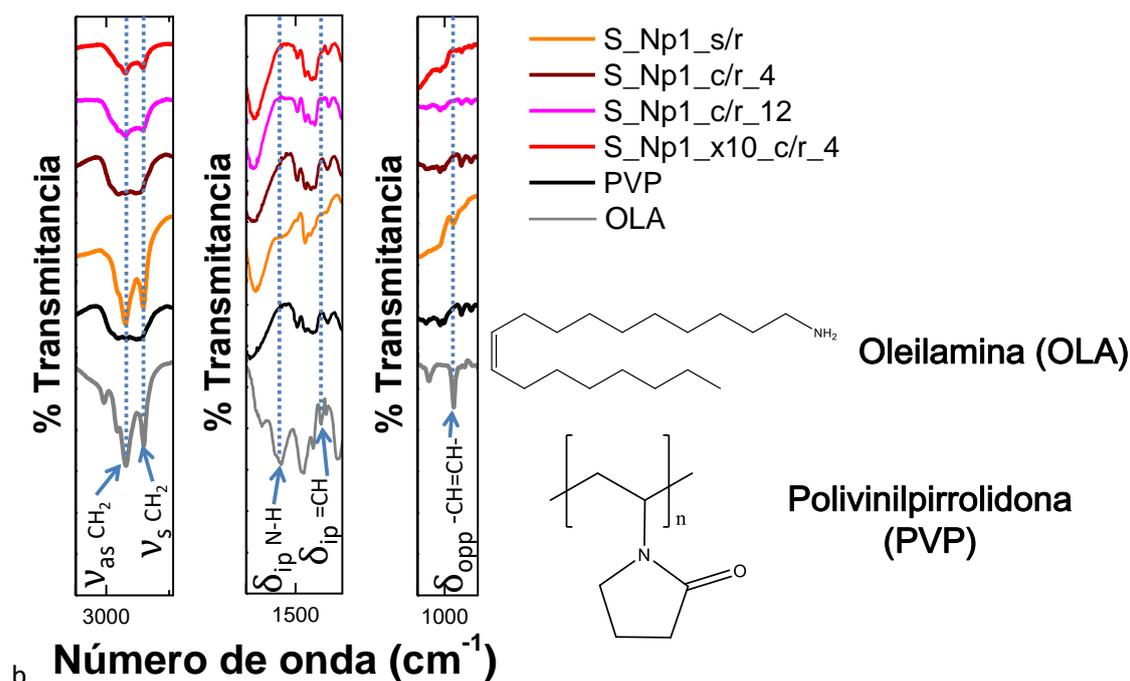


Figura 42: Bandas IR de $\nu_{as}CH_2$, $\nu_{s}CH_2$, $\delta_{ip}N-H$, $\delta_{ip}=CH$ y $\delta_{opp}-CH=CH-$ correspondientes a la OLA, presentes en las muestras de Bi₂S₃ luego de realizar el cambio de ligando.

Estos resultados confirman que el cambio de ligando fue exitoso cuando se utilizó reflujo, por lo que habilita la utilización de las nanopartículas sintetizadas en los posteriores ensayos *in vitro*.

4.2.3.2. Estudio de presencia de ligandos por medio de DSC-TGA

En las Figuras 43 y 44 se muestran a modo representativo los diagramas de DSC y TGA obtenidos para las muestras S_Np1_x10 y S_Np1_x10_c/r_4. En la Tabla 11 se resumen los resultados de pérdida de masa del ligando.

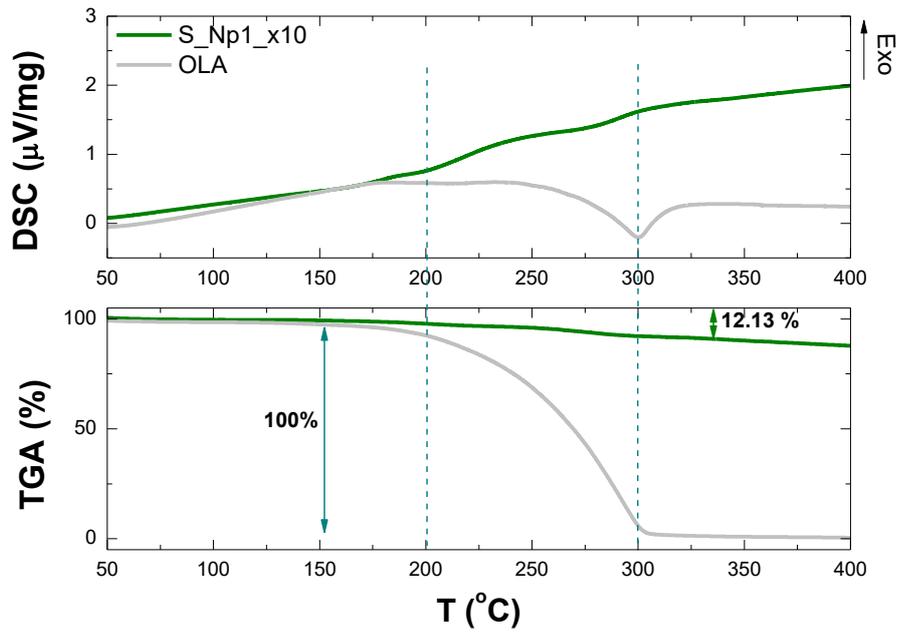


Figura 43: DSC y TGA obtenidos para la muestra S_Np1_x10 , comparado con el ligando OLA.

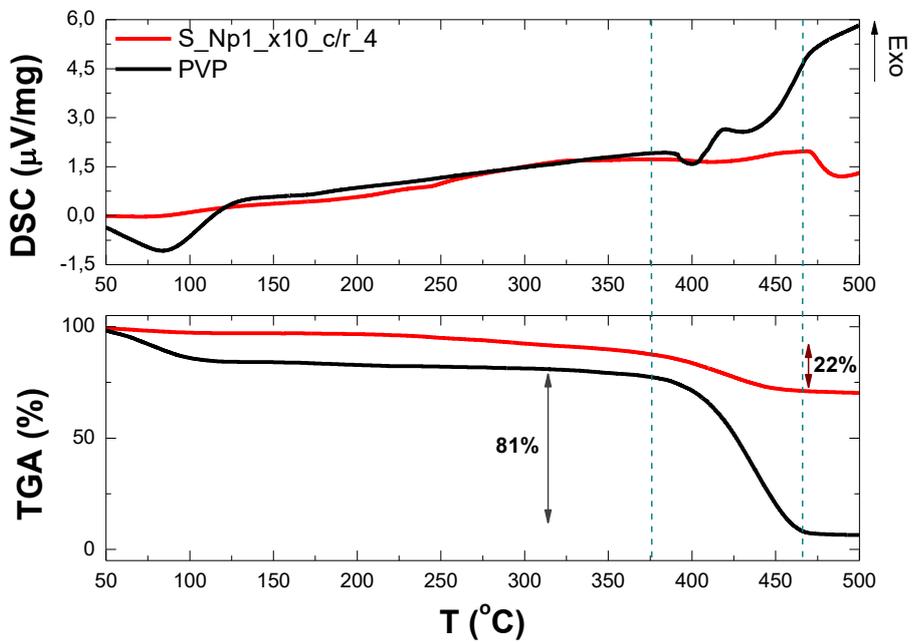


Figura 44: DSC y TGA obtenidos para la muestra S_Np1_x10_c/r_4 , comparado con el ligando PVP.

Muestra	Morfología	Tamaño partícula		Superficie (nm ²)	% pérdida de masa
		Ancho (nm)	Largo (nm)		
S_Np1	Disco	3.5 ± 1.6	-	38	17.5
S_Np2	Disco	7.3 ± 2.4	-	167	13.38
S_Np3	Varillas	4.4 ± 1.4	18.2 ± 7.4	282	21.74
S_Np4	Varillas	10.2 ± 2.8	45.9 ± 20.2	2126	7.38
S_Np1_x10	Varillas	4.1 ± 1.2	20.2 ± 5.7	287	12.13
OLA	-	-	-	-	-
S_Np1_s/r	Disco	4.5 ± 1.5	-	64	14.8
S_Np1_c/r_4	Varillas	4.0 ± 1.8	17.0 ± 10.0	214	64
S_Np1_c/r_12	Varillas	4.5 ± 2.0	15.5 ± 10.4	219	73
S_Np1_x10_c/r_4	Varillas	4.2 ± 1.4	27.5 ± 16.3	363	22
PVP	-	-	-	-	-

Tabla 11: Pérdida de masa para las muestras analizadas por TGA.

La primera observación a destacar es que en todos los casos los eventos de la curva de los DSC se presentan en el rango de temperatura correspondiente a los ligandos, tanto para antes como para después del cambio de ligando. En el caso de la muestra S_Np1_s/r, además del evento correspondiente al PVP es posible observar que en el rango 200-300°C también hay presencia de eventos térmicos. En este rango se encuentra la descomposición de la OLA, y dado el resultado obtenido al analizar el espectro IR de esta muestra, se puede afirmar que efectivamente se observa la descomposición de la OLA a dicho rango de temperatura.

En la Tabla 11 se presenta la pérdida de masa correspondiente a cada una de las muestras analizadas, donde se determinó además su superficie de acuerdo a los tamaños obtenidos por TEM. Se puede observar que a mayor tamaño de partícula menor es la cantidad de ligando OLA, cuando se compara igual morfología. En el caso de las muestras S_Np3 y S_Np1_x10, donde ambas tienen similar tamaño, superficie y

morfología, se observa que la primera tiene casi un 80% más ligando que segunda. La diferencia entre ambas radica en el modo de obtención de las mismas, por lo tanto en puede determinar que el volumen de reacción empleado es un factor determinante en la cantidad de ligando unido a las partículas luego de la reacción.

Por otro lado, cuando el ligando es PVP, se logra observar que a mayor tiempo de reflujo mayor es la cantidad de ligando unido a la nanopartícula, siendo esto otro indicio que el reflujo es un factor clave en el eficiente proceso de cambio de ligando.

4.3. Estudio de Estabilidad de las nanopartículas obtenidas por el método “Hot Injection”

Con este estudio se evaluó si las nanopartículas de Bi_2S_3 sintetizadas se disolvían en los medios donde se incorporarían para su aplicación final, y se examinó la estabilidad que presentaban sus suspensiones. La determinación de esta estabilidad es muy importante porque nos brinda un acercamiento al comportamiento de las nanopartículas, sobre todo en medios biológicos. Para este estudio se emplearon las nanopartículas obtenidas en la síntesis S_Np1_x10_c/r_4, cuyo resultado fue el más prometedor para emplearlas luego en estudios *in vivo*. La elección de los medios se basó principalmente en las diferentes viscosidades que presentaban y en la presencia de agentes que puedan generar interacciones no específicas con las nanopartículas. Los medios utilizados fueron agua miliQ (con y sin agregado de 5% de goma Xantana), medio de cultivo celular DMEM (con y sin agregado de suero fetal bovino (SFB)), SFB solo y plasma sanguíneo.

Para testear la estabilidad de las nanopartículas primero se realizó un análisis de la solubilidad de las nanopartículas en agua miliQ y en medio DMEM sin SFB. El resultado de este primer ensayo se puede observar en la Figura 45.

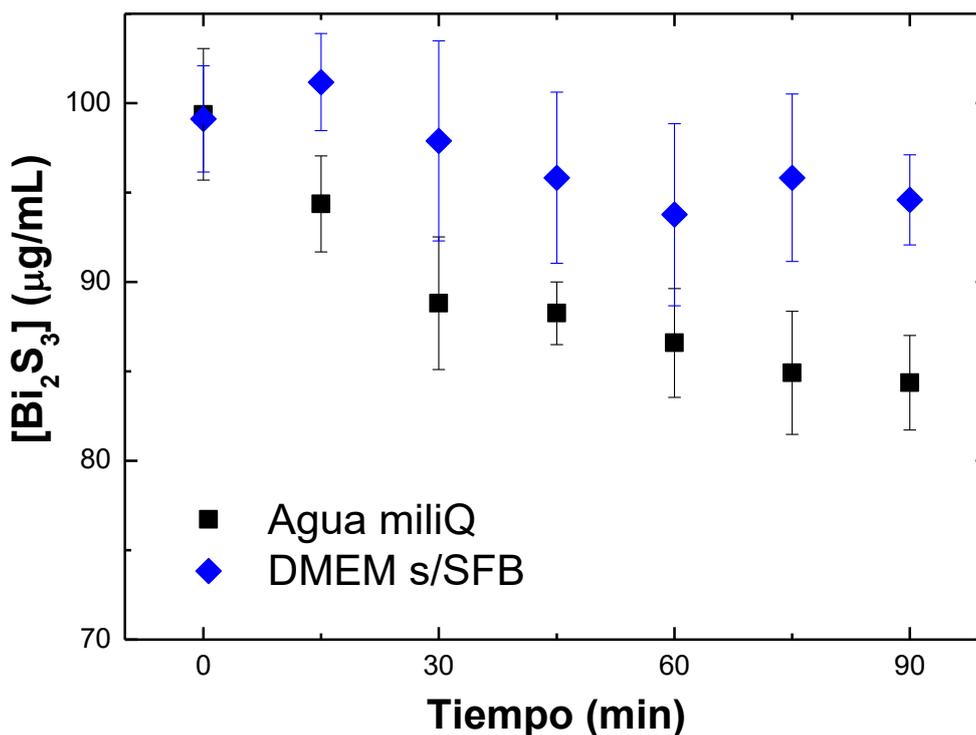


Figura 45: Concentración de la suspensión en función del tiempo de la muestra S_Np1_x10_c/r_4 en agua y medio de crecimiento celular DMEM sin SFB.

Mediante los resultados obtenidos en este ensayo de solubilidad se puede considerar que no existe una disolución significativa de nanopartículas en el tiempo, principalmente en medio de cultivo DMEM. Este resultado nos asegura que tanto en el ensayo de estabilidad como en los ensayos *in vitro* a realizar el compuesto no se disolverá. La diferencia entre el resultado de solubilidad obtenido para el agua miliQ y para el DMEM puede deberse a la alta solubilidad que el PVP presenta en agua [127] y que en el medio DMEM preferentemente se generaría una corona protectora que ayude a la estabilidad de las partículas y a su no disolución.

Como siguiente paso se evaluó la estabilidad en diferentes medios de las nanopartículas. El estudio se dividió en la evaluación de dos parámetros: estabilidad de diferentes concentraciones de nanopartículas, y comparación de la estabilidad de una concentración fija de nanopartículas en distintos medios. La determinación de la estabilidad de distintas concentraciones de nanopartículas se realizó en agua miliQ (con y sin agregado de goma Xantana) y en medio celular DMEM (con SFB). El resultado de esta determinación se

muestra en la Figura 44, donde se especifica la estabilidad en función del tiempo de la muestra S_Np1_x10_c/r_4. En la Tabla 12 se presentan las velocidades de decantación de las nanopartículas en los distintos medios, calculada como la pendiente de las curvas mostradas en la Figura 46. Las concentraciones empleadas para el ensayo fueron de 5, 20, 60 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos solventes.

- | | | |
|------------------------------------|---|------------------------------------|
| ■ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua | □ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua+Goma | ■ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMEM |
| ● 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua | ○ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua+Goma | ● 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMEM |
| ▲ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua | △ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua+Goma | ▲ 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMEM |
| ◆ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua | ◇ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agua+Goma | ◆ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMEM |

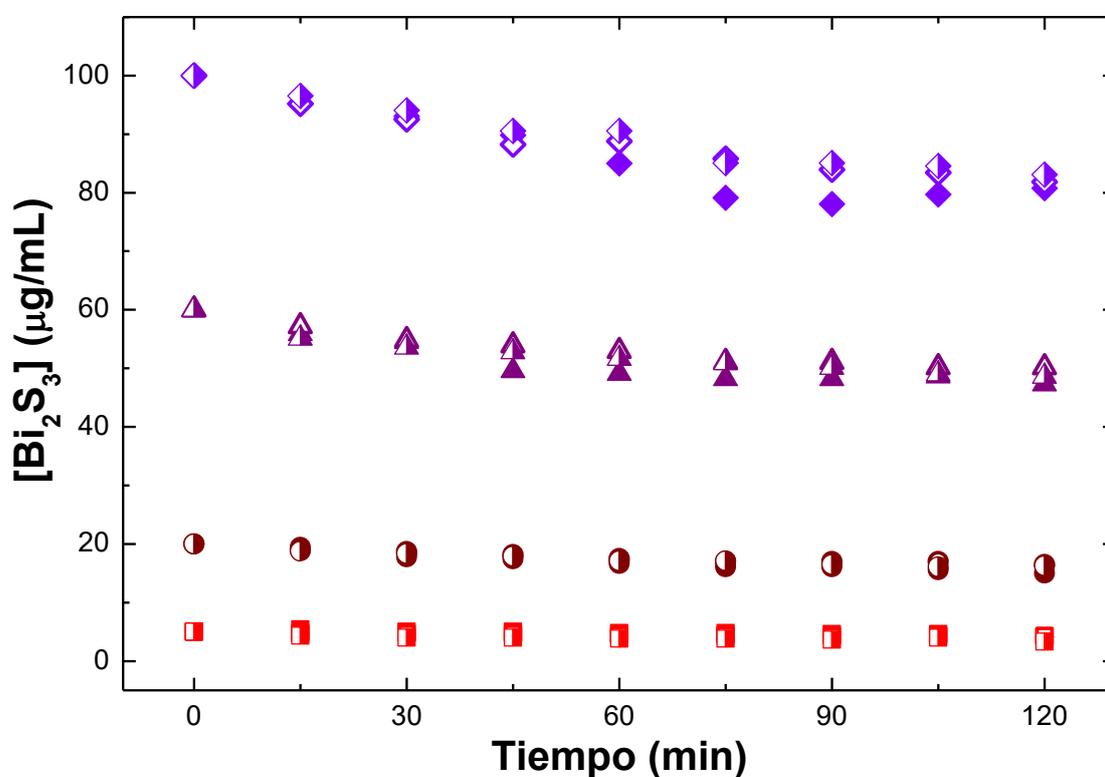


Figura 46: Curvas de Estabilidad en función del tiempo para la muestra S_Np1_x10_c/r_4, a concentraciones entre 5 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua (con y sin goma Xantana) y medio de cultivo DMEM.

Concentración µg/mL	Velocidad de decantación µg/(min*mL)		
	Agua	Agua + 5% Xantana	DMEM
5	0.0018 (±0.0022)	0.0050 (±0.0026)	0.0056 (±0.0038)
20	0.0248 (± 0.0044)	0.0220 (± 0.0050)	0.0246 (± 0.0036)
60	0.068 (±0.028)	0.067 (±0.014)	0.066 (±0.010)
100	0.124 (±0.048)	0.109 (±0.024)	0.103 (±0.022)

Tabla 12: Velocidad de decantación de nanopartículas

Los resultados demostraron que las suspensiones de nanopartículas son menos estables en el tiempo a medida que la concentración de la suspensión aumenta, en todos los solventes ensayados. Además a medida que la viscosidad del medio aumenta, las suspensiones son más estables. Es de destacar que para concentraciones bajas, como es el caso de 5 µg/mL, la decantación de las nanopartículas en el tiempo del ensayo es casi nula.

Para la comparación de la estabilidad de las nanopartículas en una mayor variedad de medios se eligió la concentración de 60 µg/mL. Los medios que se compararon fueron agua miliQ (con y sin goma Xantana), medio de crecimiento celular DMEM (con y sin SFB), SFB solo y plasma sanguíneo. El resultado obtenido se puede observar en la Figura 47.

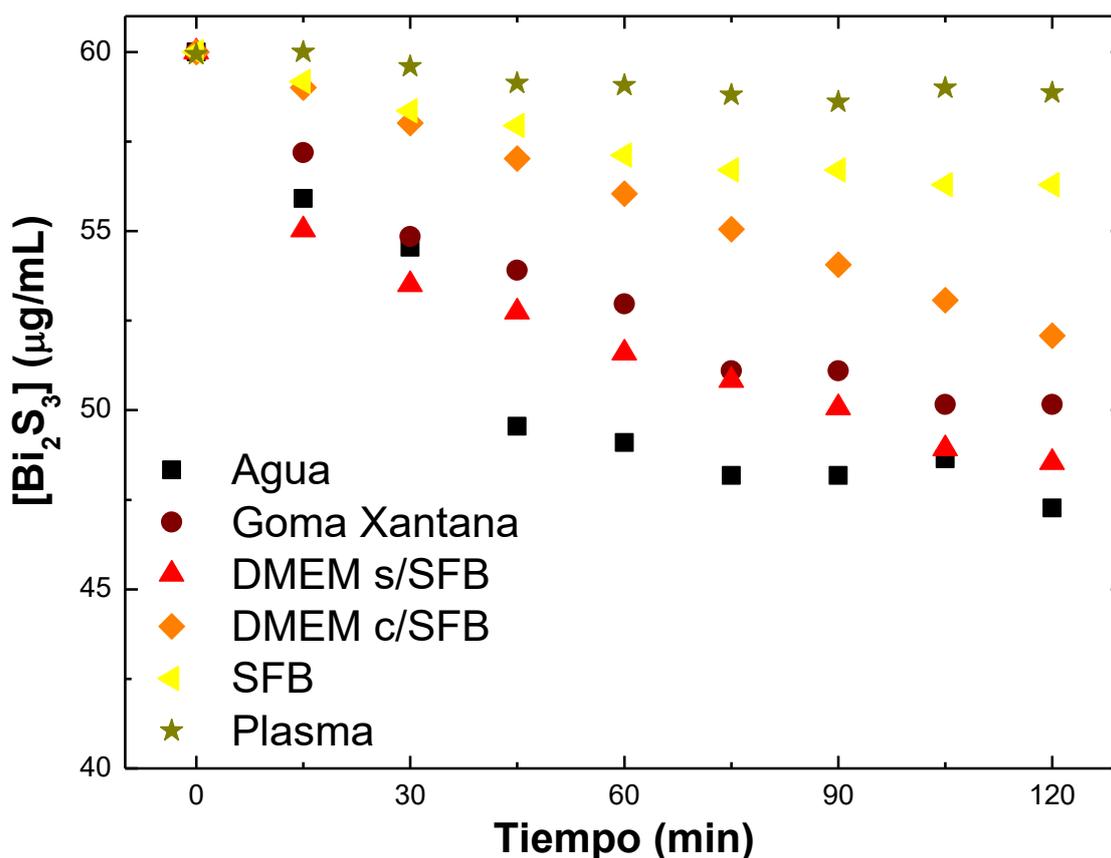


Figura 47: Curvas de Estabilidad en función del tiempo para suspensiones de la muestra S_Np1_x10_c/r_4 en distintos medios, a una concentración de 60 $\mu\text{m}/\text{mL}$.

Este estudio permitió comprobar nuevamente que a medida que aumentamos la viscosidad del medio la suspensión de las nanopartículas se hace cada vez más estable. Además, se observa que con la presencia de proteínas en el medio ésta estabilidad también aumenta. Este fenómeno se puede deber a la generación de la biocorona que protege las nanopartículas. Es sabido que las nanopartículas en medios biológicos, como es la sangre, interaccionan con las proteínas y demás componentes del medio. En estos casos se pueden dar dos posibilidades. Si la adsorción de proteínas a las partículas es grande, la alta presencia de proteínas produce la aglomeración y desestabilización de las nanopartículas, ocasionando su rápida liberación via retículo-endotelial. La otra posibilidad se presenta al tener ligandos poliméricos en las nanopartículas. Estos ligandos ayudan que la biocorona disminuya su tamaño y pueda ayudar a la estabilización de las nanopartículas [75], [76], [156]. En nuestro caso, la estabilidad que

presentan las nanopartículas en plasma sanguíneo es un indicativo que ocurre el segundo caso, y que las mismas podrían llegar al órgano blanco al ser inyectadas por vía sanguínea.

Se realizó además la evaluación de la carga de la capa de biocompatibilidad de las nanopartículas. Dicha capa actúa como enmascarante de las nanopartículas, dado que es quien interacciona con la membrana celular y en algunos casos permite la entrada de las nanopartículas a las células. En el caso del PVP, el grupo carboxílico da a las nanopartículas una carga negativa, resultado que se puede observar en la Tabla 13, donde se muestran los potenciales Z realizados a distintas concentraciones de nanopartículas en agua y en medio de cultivo DMEM.

Concentración de nanopartículas ($\mu\text{g/mL}$)	Medio	Potencial Z (mV)	Desviación estándar de Z (mV)
100	Agua	-34.5	5.73
100	DMEM completo	-18.1	7.59
1000	Agua	-28.5	3.35

Tabla 13: Resultados de Potencial Z de nanopartículas S_Np1_x10_c/r_4, en distintas concentraciones y diferentes medios de dispersión.

Es posible observar en los resultados obtenidos que para un mismo solvente, a mayor concentración de nanopartículas más neutro es el potencial superficial de las mismas. Esto posiblemente se deba a la aglomeración de las nanopartículas, que venciendo la carga de repulsión se aglomeran para evitar interacciones con el ambiente. Además se puede observar que en medio de cultivo DMEM completo, la carga superficial se torna considerablemente más neutra. Esto es una prueba de la interacción que las nanopartículas tienen con los componentes del medio de cultivo, especialmente las proteínas, que ayudan a neutralizar la carga superficial e influyen en la interacción nanopartículas-células [76]. De esta forma la carga negativa que presenta permitiría la

entrada de las nanopartículas a las células, proceso que es deseado para la aplicación final.

4.4. Ensayos Toxicológicos de las nanopartículas

Se estudió la citotoxicidad y la ecotoxicidad de las nanopartículas de la síntesis S_Np1_x10_c/r_4. La citotoxicidad se evaluó en ensayos *in vitro* utilizando células humanas de cáncer de mama (MCF7), cuyos resultados fueron determinados por dos técnicas colorimétricas diferentes, utilizando los indicadores MTT y Trypan Blue. En el caso del ensayo de ecotoxicidad, se realizaron ensayos *in vivo* de toxicidad aguda utilizando como organismos test clodóceros *Daphnia Magna*, determinando su viabilidad mediante la observación de su inmovilidad/mortandad.

4.4.1. Ensayos de Citotoxicidad

La evaluación de la viabilidad de las células MCF7 se realizó utilizando distinto rango de concentraciones para cada uno de las técnicas de evaluación. En el caso de la evaluación utilizando Trypan Blue el rango fue de 1 µg/mL a 5000 µg/mL, pero en el caso donde se utilizó MTT como colorante fue de 5 µg/mL y 100 µg/mL. Esta elección se basó en que a mayores concentraciones las nanopartículas, que presentan una coloración negra, pueden influenciar en la medida de fluorescencia del indicador en el ensayo con MTT, ocasionando así una sobreestimación de viabilidad celular. En las Figuras 48, 49 y 50 se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad obtenidos con cada una de las técnicas.

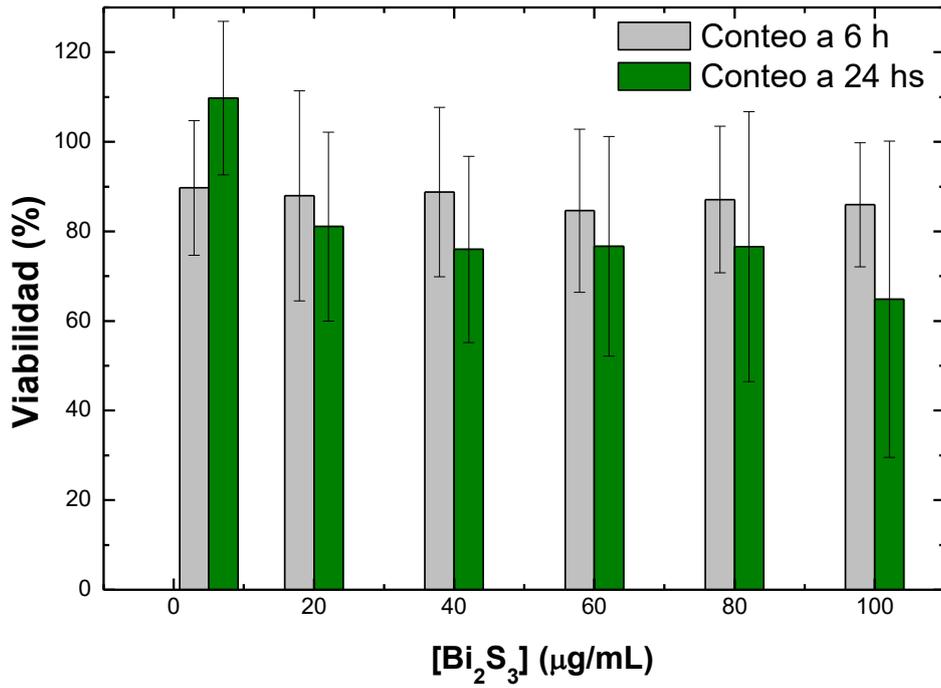


Figura 48: Viabilidad de células MCF7 incubadas con distintas concentraciones de nanopartículas obtenida mediante lectura con MTT luego de 6 y 24 h de incubación.

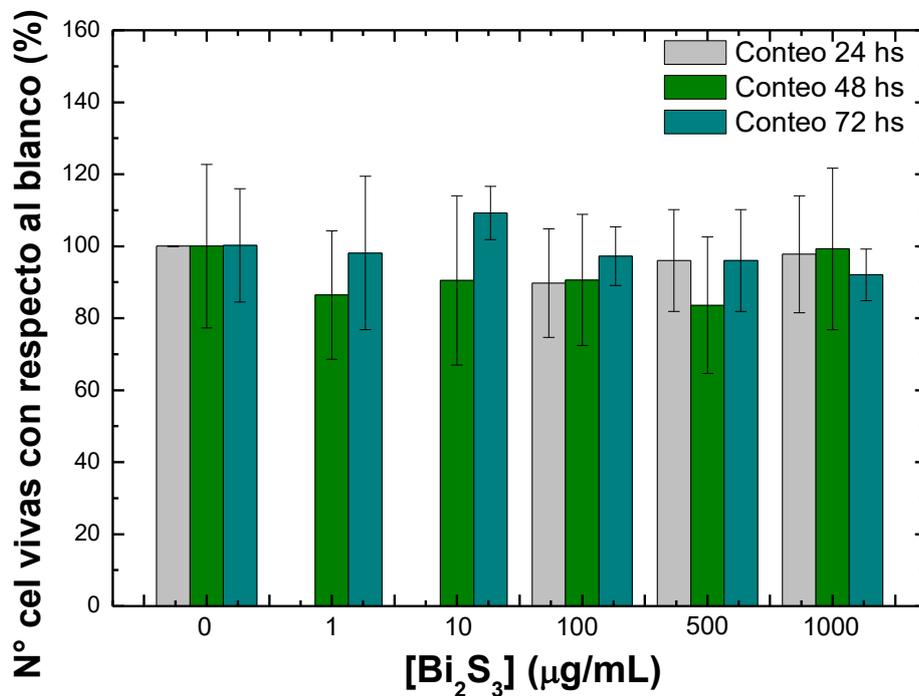


Figura 49: Número de células MCF7 vivas con respecto al blanco incubadas con concentraciones de nanopartículas entre 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ obtenida mediante lectura con Trypan Blue luego de 24, 48 y 72 h de incubación.

En el caso de la medida de viabilidad utilizando MTT (Figura 48), el resultado luego de 6 h de incubación de las células con nanopartículas es constante para todas las concentraciones testeadas, pero el resultado no es tan directo cuando se observa la viabilidad celular luego de 24 h de incubación. En este último caso hay una tendencia a la disminución de la viabilidad con el aumento de la concentración de las nanopartículas si solo analizamos los valores medios de los resultados. Pero si tomamos en cuenta los errores de las medidas no podemos asegurar que hay una disminución de la viabilidad en función de la concentración, dado que los intervalos de confianza de los datos se solapan en todos los casos, lo que nos permite afirmar que no hay cambios visibles en las viabilidades para las concentraciones testeadas. La alta desviación estándar de los valores se puede deber al error en la técnica utilizada dado que, como se discutió anteriormente, las nanopartículas presentan una coloración que puede influir en la medida de fluorescencia, en la que se basa la obtención de resultados de la técnica. Como las medidas de viabilidad realizada con el ensayo de MTT corresponden a viabilidades obtenidas con 6 y 24 h de incubación conjunta de células con nanopartículas, se evaluó los resultados de viabilidad a mayor tiempo de incubación (Figura 49), en este caso la viabilidad se evaluó mediante medida con TrypanBlue luego de 24, 48 y 72 h de incubación. En el caso de 24 h, las concentraciones de nanopartículas testeadas corresponden a las mayores concentraciones medidas mediante el ensayo con MTT (Figura 46) debido al alto error que se presentó en el ensayo.

Para estudiar la viabilidad de las células incubadas con nanopartículas a tiempos mayores, se utilizó la lectura por tinción con Trypan Blue, debido al alto error que presentó el ensayo de MTT en el conteo luego de 24 h de incubación de células con nanopartículas. Como se puede observar en la Figura 49, el porcentaje de células vivas obtenido son comparables con los valores obtenidos para los blancos ($[\text{Bi}_2\text{S}_3] = 0 \mu\text{g/mL}$), para todos los casos testeados. Esto nos permite afirmar que las nanopartículas obtenidas no son citotóxicas en las concentraciones testeadas, al incubar células cancerígenas MCF7 conjuntamente con estas nanopartículas durante 24, 48 o 72 h.

Dado los resultados obtenidos, y con el fin de encontrar el rango de concentraciones a las cuales las nanopartículas no signifiquen un daño para las células, se amplió el rango de

concentraciones de nanopartículas testeadas, utilizándose en este caso un rango de 0 a 5000 $\mu\text{g/mL}$. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 50.

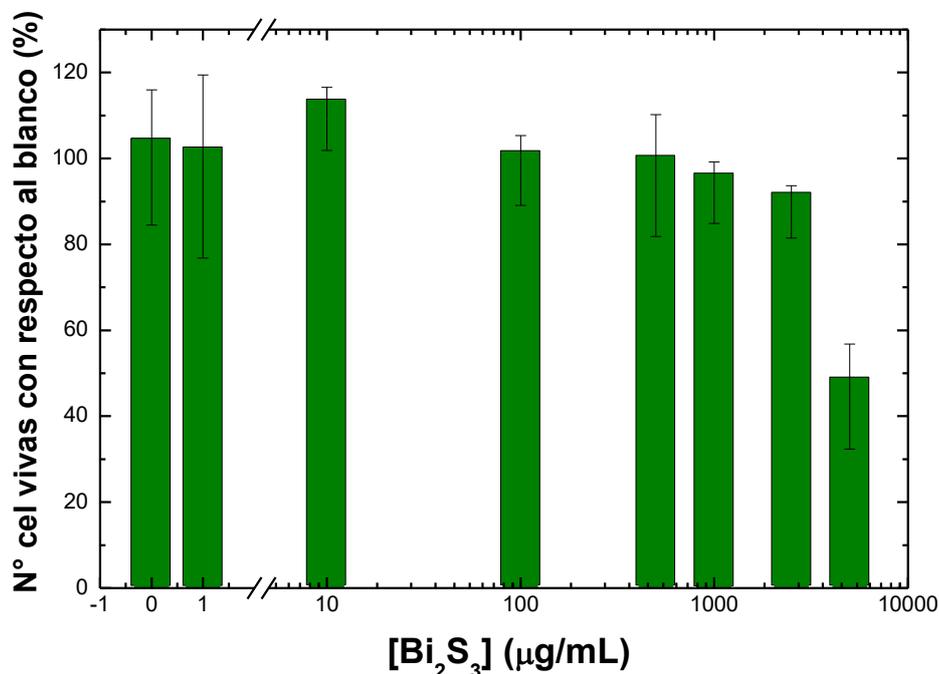


Figura 50: Número de células MCF7 vivas con respecto al blanco incubadas con concentraciones de nanopartículas entre 0-5000 $\mu\text{g/mL}$ obtenida mediante lectura con Trypan Blue luego de 72 h de incubación.

Los resultados obtenidos en este ensayo, nos muestran que el porcentaje de células vivas medidas con TrypanBlue de las células incubadas con nanopartículas fueron cercanos a los valores obtenidos para el blanco (células sin agregado de nanopartículas), salvo para la mayor concentración testada, que corresponde a una concentración de 5000 $\mu\text{g/mL}$. En este último caso la viabilidad celular decae un 55%, comparada con el blanco. Por lo tanto, por medio de este ensayo se puede asegurar que para concentraciones entre 1 y 2500 $\mu\text{g/mL}$, las nanopartículas de Bi_2S_3 ensayadas no son citotóxicas para las células humanas de cáncer de mama MCF7, pudiéndose utilizar cualquier concentración dentro de ese rango para los ensayos posteriores.

En trabajos reportados por varios autores, especialmente aquellos donde se estudia la utilización de nanopartículas de Bi_2S_3 en medicina, se ha estudiado la citotoxicidad de las

nanopartículas sintetizadas por sus autores en varias líneas celulares. Dentro de las más utilizadas se destacan las líneas murinas 4T1, RAE264.7 y L929, y las humanas HK-2, PC3, HeLa y MCF-7, como se puede observar en la Tabla 14.

Línea celular	Np	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de incubación (h)	Resumen de resultados de Citotoxicidad		Ref.	
				Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Viab (%)		
4T1	Bi ₂ S ₃ -Tween 20	0 – 300	24	50	90	[78], [109]	
				100	85		
				200	80		
RAE264.7	Murina	Bi ₂ S ₃ -PF127	0 – 3200	24	1.6	80	[107]
L929	Bi ₂ S ₃ @BCA	100 – 1000	24	No citotóxicas		[157]	
			48	No citotóxicas			
			72	1000	85		
HK-2	Bi ₂ S ₃ @SiO ₂	25 – 200	24	No citotóxicas		[110]	
			48	No citotóxicas			
PC3	Humana	Bi ₂ S ₃ -PVP	12	1000	80	[93]	
			24	1000	80		
			48	500	95		
HeLa		Bi ₂ S ₃ -PVP	0 –	3000	80	[103]	
			3000				
MCF-7		Bi ₂ S ₃ @SiO ₂	0 – 25	24	No citotóxicas		[110]

Tabla 14: Resumen de ensayos de citotoxicidad con Bi₂S₃ con diversos ligandos y cubiertas, especificando las distintas condiciones empleadas en el ensayo, como el tipo de células en las cuales se evaluó, el rango de concentración de nanopartículas utilizado, las horas de incubación de las células con las nanopartículas, y los principales resultados obtenidos en el análisis.

Los resultados obtenidos por los autores indican la baja toxicidad de las partículas sintetizadas para las concentraciones testeadas, obteniéndose en los casos más desfavorables cerca de 80% de viabilidad celular [93], [103], [107], [109]. Es de destacar que el tiempo de incubación de las células junto a las nanopartículas fue en la mayoría solo 24 h, y que la concentración de nanopartículas superó 1000 $\mu\text{g/mL}$ solo en pocos trabajos [103], [107], [149]. En aquellos casos donde se utilizaron nanopartículas de Bi_2S_3 con PVP como ligando se llegó a un 80% de viabilidad celular a las concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 3000 $\mu\text{g/mL}$ en células humanas de cáncer de próstata PC3 [93] y de cáncer cérvico-uterino HeLa [103] respectivamente. En el único caso donde se comprobó la citotoxicidad en células humanas de cáncer de mama MCF7, las partículas de Bi_2S_3 contenían una capa de sílica mesoporosa recubriéndolas, y la máxima concentración testada fue 25 $\mu\text{g/mL}$ [110]. Por lo tanto los ensayos realizados en este trabajo, corresponden al primer trabajo que evalúa la citotoxicidad de partículas de Bi_2S_3 con PVP como ligando en células MCF7, hasta concentraciones tan altas como 5000 $\mu\text{g/mL}$ durante 72 h.

Una observación a destacar fue la presencia de aglomerados de nanopartículas en el medio celular, que se logran ver por microscopio óptico, como se pueden observar en la Figura 51. Por lo tanto, la elección de la concentración de nanopartículas en los siguientes ensayos fue escogida en base a la disminución de estos aglomerados en el medio celular, como forma de prevenir la posible interferencia en la medida de viabilidad, dado que las nanopartículas presentan color negro y las medidas de viabilidad con Trypan Blue se obtienen por medio de análisis de contraste en un contador automático.

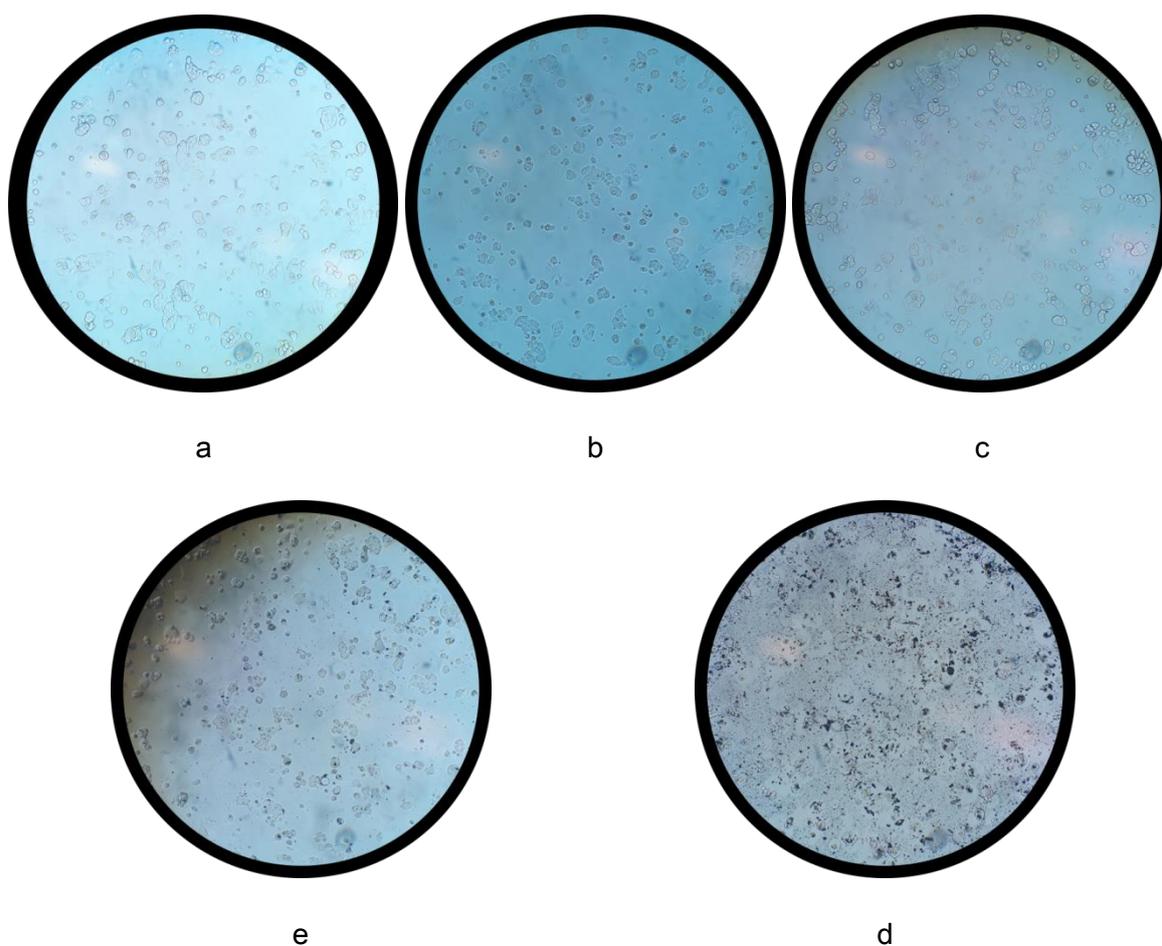


Figura 51: Imágenes de microscopía óptica de células MCF7 luego de 72 h de incubación conjunta con concentraciones de 0 (a), 1 (b), 10 (c), 100 (d) y 1000 (e) $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de Bi_2S_3 .

4.4.2. Ensayos Ecotoxicológicos

Como se mencionó anteriormente, los ensayos de toxicidad aguda se realizaron en cladóceros *Daphnia Magna*, evaluando su inmovilidad/mortalidad a las 24 y 48 h como lectura final. Para realizar el ensayo se varió la concentración de nanopartículas entre 0,05 - 100 mg/L, de forma de abarcar el mayor rango de toxicidad para organismos acuáticos, y teniendo en cuenta que las sustancias que presenten un efecto letal para los organismos acuáticos en concentraciones mayores a 100 mg/L se consideran no tóxicas [158]. Teniendo en cuenta la velocidad de decantación calculado en 3.3 (Estudio de Estabilidad de las nanopartículas obtenidas por el método “hot injection”), es posible tener suspensiones estables de nanopartículas en agua solo hasta 13.5 h. Por lo tanto, los

ensayos de ecotoxicológicos se realizaron por un lado solo suspendiendo las nanopartículas en agua MiliQ, y por otro lado suspendiendo las nanopartículas en una solución de Goma Xantana en agua, con una concentración de 100 % (m/v). Este último caso se realizó para simular la presencia de los agentes dispersantes de nanopartículas que se conocen que existen en el medio acuático, como puede ser la materia orgánica o minerales [159], [160].

En todos casos testeados, no se presentaron casos de inmovilidad/mortalidad de *Daphnia magna* a las 24 y 48 h para las concentraciones de S_Np1_x10_c/r_4 entre 0,05 - 100 mg/L, tanto cuando se utilizó o no goma Xantana como dispersante. Esto indica que las nanopartículas S_Np1_x10_c/r_4 no presentan toxicidad aguda en dichas concentraciones para el organismo testado.

Sin embargo, se logró observar el depósito de nanopartículas en el fondo del vaso donde fue realizado el test. Este depósito fue irregular en todos los casos, dándose un mayor depósito a medida que las concentraciones aumentaban, en concordancia con el ensayo de estabilidad realizado. Con adición de goma Xantana se mejoró la suspensión de las nanopartículas. En los casos donde se utilizaron concentraciones entre 0,05 y 10 mg/L no se observaron depósitos en el fondo del vaso. Sin embargo, a concentraciones mayores a 10 mg/L sí se percibió el depósito. A modo comparativo, en la Figura 52 se muestran fotografías tomadas al fondo de los recipientes utilizados para el análisis luego de 24 h de incubación de los coldóceros junto a las nanopartículas.

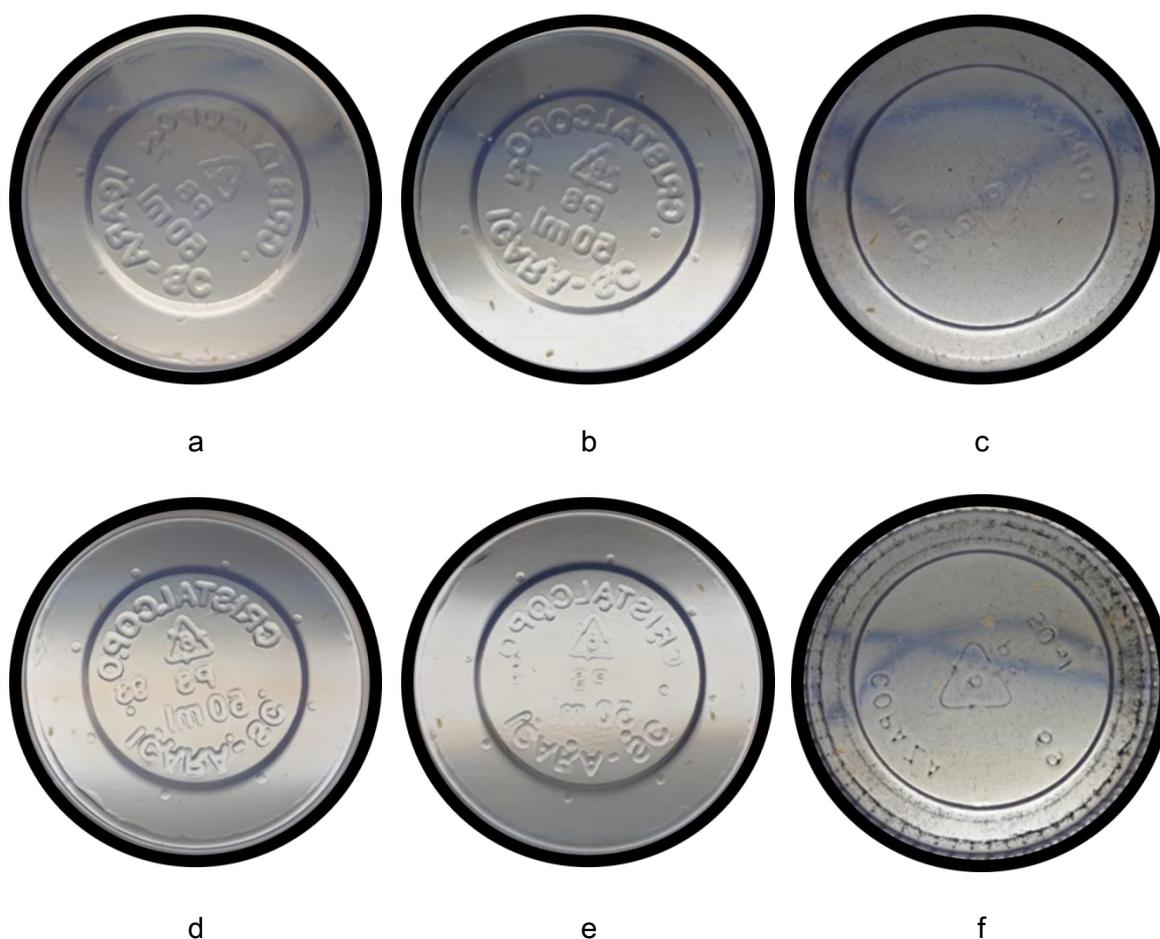


Figura 52: Recipientes del ensayo de ecotoxicidad aguda de *Daphnia magna* con concentraciones de nanopartículas de 0, 10 y 100 mg/L en agua miliQ (a, b y c) y una solución acuosa de goma Xantana (d, e y f).

En este ensayo también se observó el tracto digestivo de los cladóceros mediante observación visual y microscopía óptica. En todos los casos, menos en aquellos de menor concentración de goma Xantana (entre 0,05 y 10 mg/L de S_Np1_x10_c/r_4), se observó la incorporación de las nanopartículas al tracto digestivo, identificado por la coloración a negro del mismo, que se mantuvo en todo el ensayo. En la Figura 53 se muestran imágenes de microscopía óptica de los organismos analizados para algunas concentraciones testeadas. En algunos casos donde fue empleada goma Xantana, la franja negra del tracto digestivo estaba interrumpida, posiblemente debido a la ingesta de goma, cuya coloración es más clara que la de las nanopartículas. La ingesta de nanopartículas puede ser peligrosa para los organismos por ocasionar una disminución

en su ritmo de alimentación, ocasionando un déficit de energía, que tiene como consecuencia una disminución en la reproducción, y por ende un decrecimiento de la población de dichos organismos [161]. Pese a la ingesta de las nanopartículas, por medio de las microscopías ópticas se puede observar que las mismas aún continúan en el tracto digestivo a las 48 h. Esto nos indica que las nanopartículas no fueron internalizadas en otros órganos, especialmente en la cámara incubadora de crías en la que puede influenciar en la reproducción de los organismos, y que no hay una ruptura visible de la membrana del tracto digestivo [162].

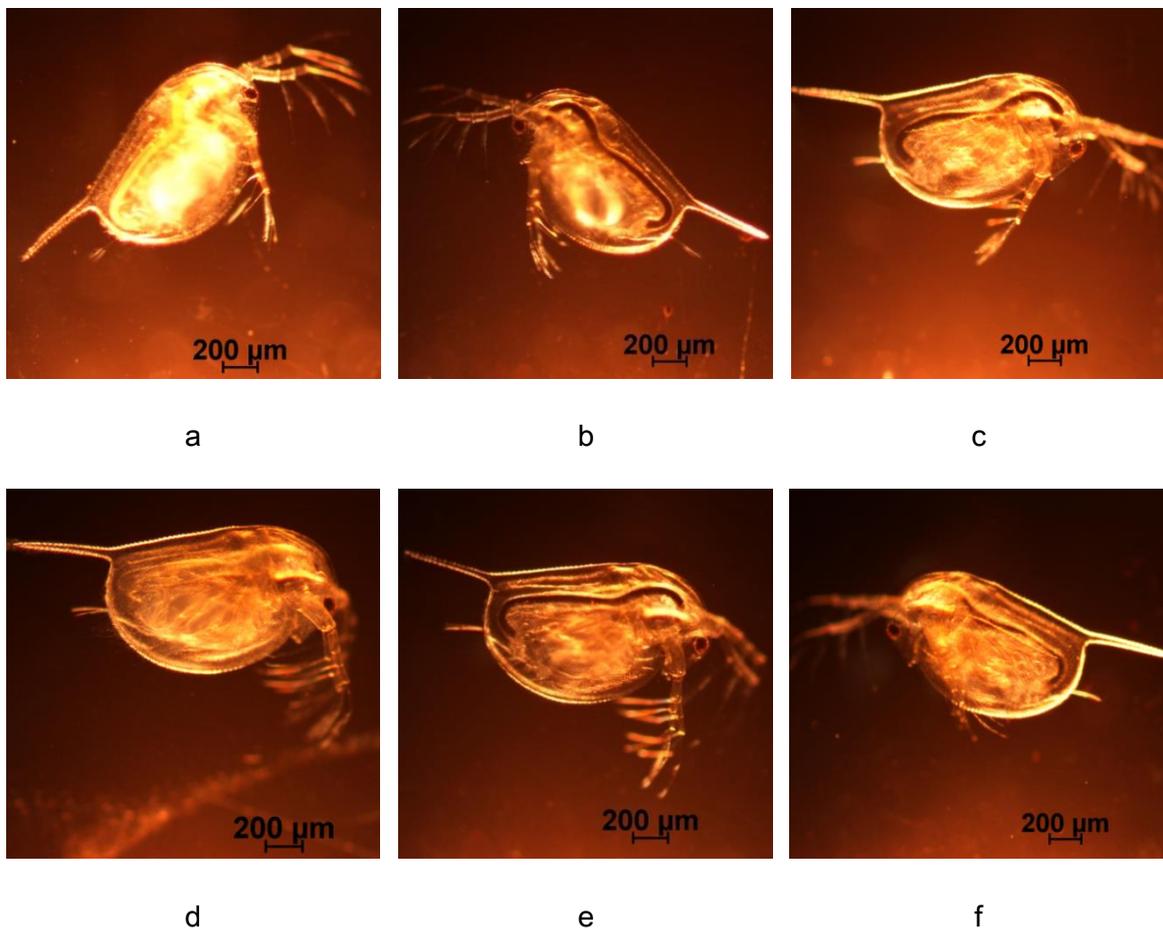


Figura 53: Imágenes de Microscopía óptica de *Daphnia magna* del Ensayo de Test Agudo para: a- Control con agua, b- 6,25 mg/L de CL4 en agua, c- 10 mg/mL en agua, d- control de goma Xantana, e- 6,25 mg/L en agua con goma Xantana y f- 10 mg/L en agua con goma Xantana.

Es de destacar que ni las nanopartículas ni la goma Xantana quedaron adheridas a las antenas del cladócer. Esto es importante debido a que la *Daphnia magna* es un organismo que utiliza las mismas con fines alimenticios y de movilidad. Su alimentación se realiza a partir de filtración de los alimentos con el movimiento de las antenas, que crea un flujo constante para mantener el alimento fluyendo hacia el sistema digestivo, a la vez que le permite el desplazamiento necesario para continuar con su ciclo de vida [163]. En el caso contrario, si hubiera presencia de estos compuestos en las antenas, podrían impedir tanto la alimentación como el movimiento de los organismos en el agua, lo que produciría la muerte de los mismos.

4.5. Estudios de nanopartículas como radiosensibilizadores

Los estudios de radiosensibilización se realizaron en células MCF7, incubadas durante 24 h en placas individuales de 35 mm. En estas placas se sembraron 0.25×10^6 células y se incubaron durante 24 h antes de realizar los ensayos correspondientes.

En una primera instancia se optimizaron los parámetros de dosis de irradiación, tiempo de espera post-irradiación para la lectura del resultado, y cambio de medio de cultivo celular.

4.5.1. Optimización de parámetros de ensayos

La idea de optimizar los parámetros de los ensayos celulares es lograr tener las condiciones a las cuales se da un daño en las células MCF7, pero al mismo tiempo que no ocasione la muerte de todas las células. De esta forma se lograría ver un cambio en la viabilidad celular cuando se evalúe el empleo de las nanopartículas como radiosensibilizadores. Para optimizar la dosis a suministrar a las células y lograr detectar muerte celular se irradiaron las células con dosis que variaron entre 2 y 8 Gy, y se midió el resultado de dicha irradiación en tiempos post-irradiación que variaron entre 24 y 96 h. Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Figura 54, donde se muestra la

viabilidad celular obtenida para las distintas dosis y los distintos tiempos de conteo post-irradiación.

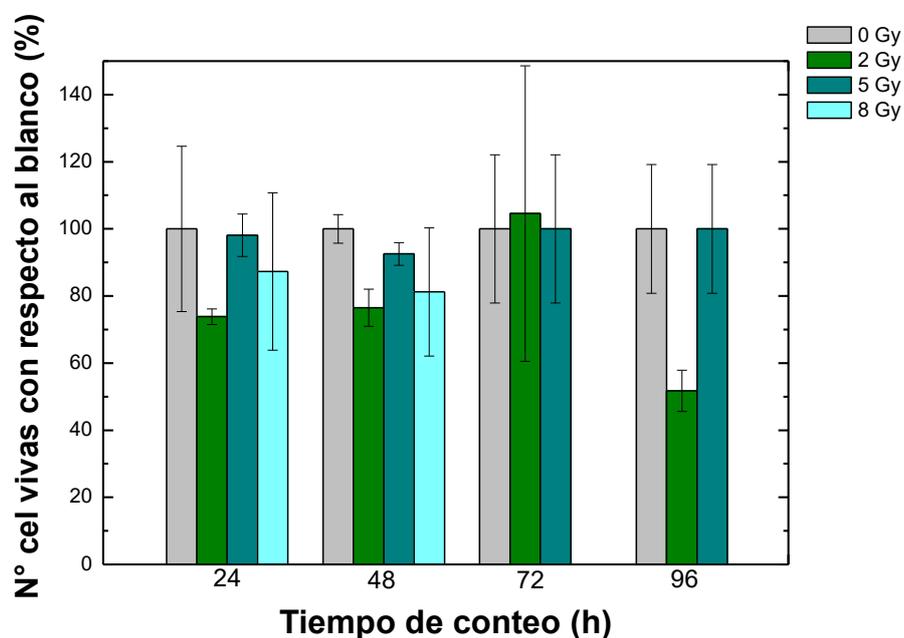


Figura 54: Viabilidad de células MCF7 irradiadas a distintas dosis (en Gy) cuyo resultado fue leído a diferentes tiempos luego del paso de irradiación.

Este ensayo demostró que los mejores resultados se obtienen para dosis de 2 Gy, dado que para esta dosis se puede apreciar muerte celular, mientras que para el resto de las dosis ensayadas no se logró observar un cambio apreciable de éste parámetro. Es de destacar que esta dosis corresponde a la utilizada en tratamientos fraccionados que se emplean en pacientes tratados con radioterapia, por lo tanto corresponden a dosis tolerables por las células sanas, y es un buen punto de comparación con otros estudios [22], [23], [37]. Con referencia al tiempo de conteo post-irradiación se estudiaron tiempos que varían desde uno a cuatro días después del procedimiento. Como resultado se observa una mayor disminución del número de células vivas con respecto al blanco a las 48 h post-irradiación. A las 72 h el número de células vivas aumenta, posiblemente debido al crecimiento celular en los espacios libres que quedaron por la anterior muerte celular. El último tiempo testado corresponde a 96 h, en cuyo caso el número de células vivas con respecto al blanco es mucho menor al obtenido para 72 h. Esto es producto del

continuo crecimiento celular durante todo este tiempo, que produce un desprendimiento de la capa celular y la pérdida de la monocapa inicial necesaria para el correcto análisis, como se comprobó por microscopía óptica. Como resultado se obtiene el conteo de las células vivas solamente pegadas y se pierde la información de células que se encuentran libres en el medio de cultivo.

Debido a los resultados obtenidos, todos los siguientes ensayos se realizaron irradiando las muestras con una dosis de 2 Gy y la lectura de los resultados se realizó en un tiempo post-irradiación de 48 h.

A la hora de realizar los ensayos que involucran nanopartículas, hay que tener en cuenta el cambio de medio de las células luego de colocar las nanopartículas, paso clave que puede involucrar un cambio en la concentración de las nanopartículas que efectivamente están presentes en el momento de la irradiación. Este paso se evaluó considerando tres condiciones. Las dos primeras corresponden a un cambio de medio antes de realizar el paso de irradiación, el cual se correspondió a 2 mL o 3 mL. La tercera condición evaluada fue el agregado de medio post-irradiación, cuyo volumen correspondió a 1 mL. En la Figura 55 se pueden observar los resultados obtenidos en esta etapa.

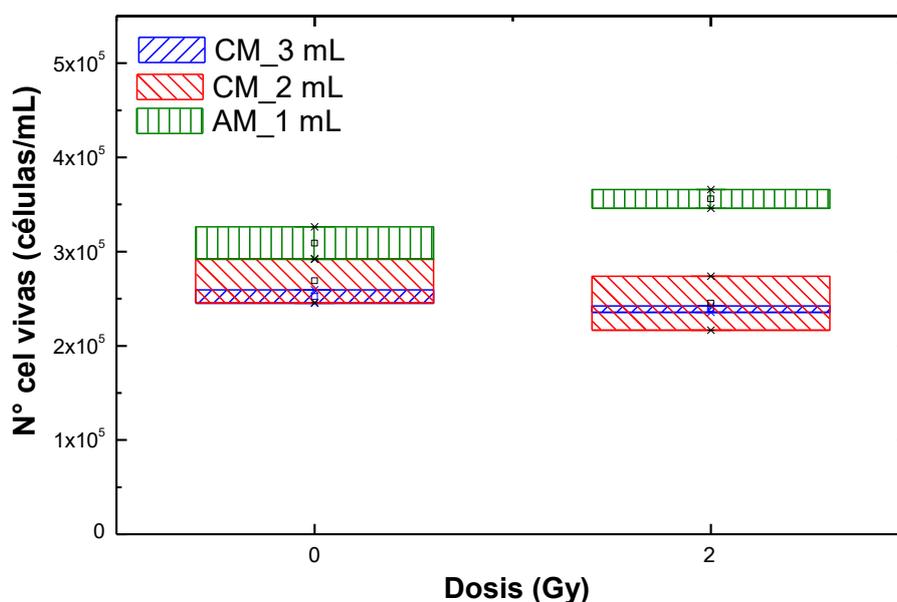


Figura 55: Evaluación de la diferencia entre el agregado de medio (AM) post-irradiación y el cambio de medio (CM) pre-irradiación en el número de células vivas.

En esta etapa se observa que el agregado de medio post-irradiación provoca un crecimiento mayor de las células, lo que puede ser producto del agregado de nutrientes que no fueron modificados por la irradiación y por la disolución de especies reactivas producidas en el momento de la irradiación. Por este motivo en los siguientes pasos se realizó la evaluación de los resultados realizando el cambio de medio pre-irradiación, con un volumen de 2 mL. Como se ve además que no hay diferencia al realizar el cambio de medio utilizando 2 o 3 mL, los siguientes ensayos cuando fue necesario el cambio de medio se utilizó 2 mL.

4.5.2. Ensayo empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la etapa de optimización de parámetros de ensayo, en esta etapa se analizaron dos condiciones claves que podían influir en el resultado de radiosensibilización de las nanopartículas a las células MCF7. Uno de ellos corresponde a la purificación de las nanopartículas por medio de diálisis. En este caso se estudió la viabilidad celular con el agregado de nanopartículas con y sin dializar, para células irradiadas y no irradiadas. La otra condición a analizar correspondió a al sonicado de la muestra, donde se varió la fuente de sonicado, comparando un baño de ultrasonido y una sonicador con sonda. Esta evaluación se realizó enfocándose en la dispersión que las nanopartículas podrían tener en la suspensión con medio de cultivo como solvente. Considerando que este medio contiene proteínas que pueden unirse a las nanopartículas y tener un efecto aglutinante, es necesario determinar si es indispensable evitar la aglomeración de las nanopartículas para que las mismas tengan un mayor impacto en la radiosensibilización de las células. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 56.

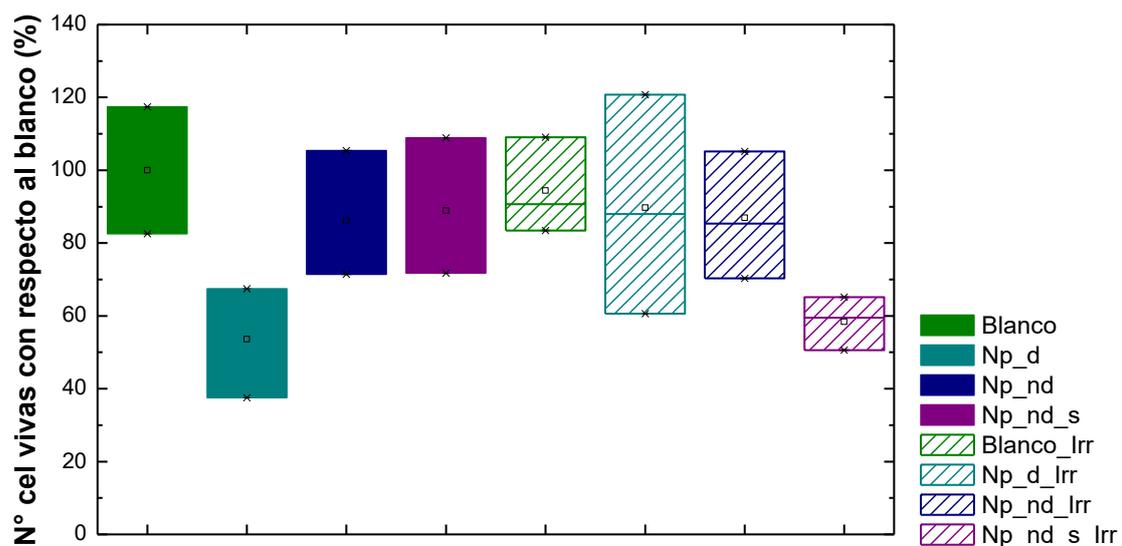


Figura 56: Número de células vivas con respecto al blanco de ensayos empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas. Estas muestras se comparan en distintas condiciones, donde “d” indica que la muestra fue dializada, “nd” que la muestra no fue dializada, “s” corresponde a que la muestra fue sonicada con sonicator con sonda (las que no se indican con “s” fueron sometidas a baño de ultrasonido), e “Irr” indica que las muestras fueron irradiadas.

De acuerdo a los valores de viabilidad obtenidos se puede observar que dializar la muestra incrementa la citotoxicidad de las nanopartículas. Esto posiblemente se deba a la pérdida de polímero biocompatible que recubre las mismas durante la dialización. Luego de la irradiación el número de células vivas para el caso de las nanopartículas dializadas es prácticamente el mismo que el blanco. Esto puede deberse al hecho de tener menor cantidad de células en la placa previo a la irradiación, lo que determina que el efecto de la irradiación no sea equivalente en ambos casos, con y sin nanopartículas presentes. Al comparar el número de células vivas respecto al blanco previo a la irradiación, utilizando nanopartículas no dializadas, se observa que en ambos casos (con y sin sonicado con sonda) no hay una diferencia apreciable respecto al valor obtenido para el blanco. Esto era de esperar teniendo en cuenta el previo ensayo de citotoxicidad realizado, donde a la concentración utilizada en este ensayo (50 $\mu\text{g/mL}$) las nanopartículas no tenían efecto citotóxico en las células MCF7. Luego de la irradiación de las células conteniendo nanopartículas solo se observó efecto de la irradiación en el caso donde las nanopartículas fueron suspendidas utilizando un sonicator de sonda. Este

hecho no es trivial, dado que la mejor suspensión de las nanopartículas permite evitar los aglomerados de las mismas, y de esta forma que se mantengan como partículas de tamaño nanométrico durante más tiempo, permitiendo así la internalización celular de las partículas. Esta incorporación al interior celular es necesaria para que los fenómenos secundarios, producidos por las nanopartículas al eliminar la energía absorbida, tengan efecto en las adecuadas moléculas blanco, como son el agua citosólica, el ADN o las moléculas de membrana, entre otras.

Por lo tanto, el mejor resultado obtenido fue cuando se utilizó conjuntamente irradiación y nanopartículas no dializadas y suspendidas utilizando sonicador de sonda. En este caso se observó que el número de células vivas con respecto al blanco, a las 48 h luego de irradiar la muestra con una fuente de ^{60}Co con una dosis de 2 Gy, decayó 38% al compararla con el blanco. Los mejores resultados se resumen en la Figura 57, donde se presenta el número de células vivas con respecto al blanco para células con y sin nanopartículas antes y después de la irradiación.

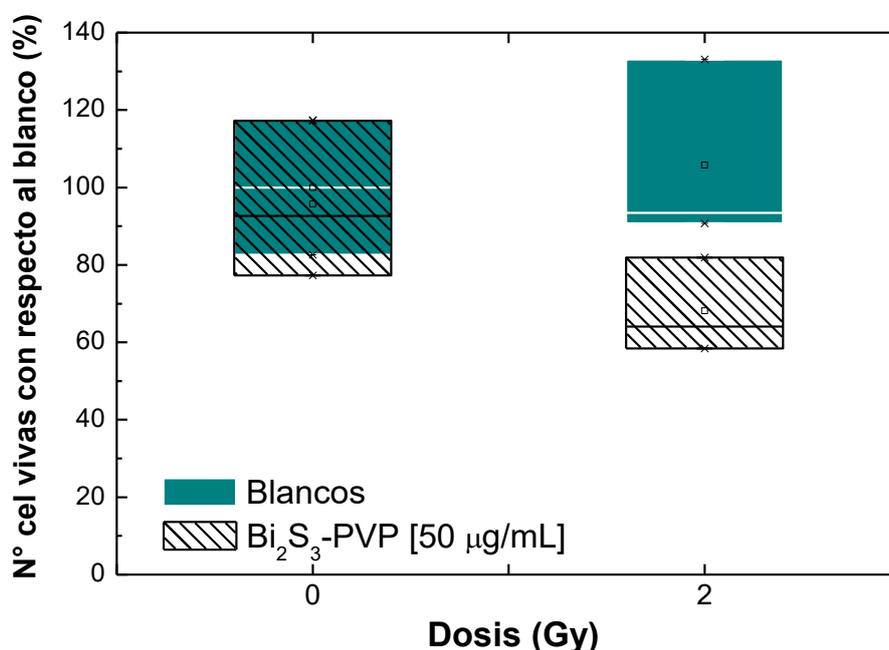


Figura 57: Número de células vivas con respecto al blanco de ensayos empleando conjuntamente irradiación y nanopartículas a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Si se desea comparar este resultado con los obtenidos por otros autores en trabajos similares, dicha comparación resulta muy difícil debido a que las condiciones de los ensayos son muy variables y los resultados se expresan empleando diferentes parámetros. Un parámetro relevante a calcular es la relación de mejora del efecto mediada por la presencia de las nanopartículas (NER, del inglés NP-mediated enhancement ratio) [67], cuyo cálculo se realiza de la siguiente manera:

$$\text{NER} = \frac{\text{Viabilidad obtenida a una dosis determinada}}{\text{Viabilidad obtenida a la misma dosis empleando np}}$$

Este parámetro debe de ser lo más alto posible para lograr obtener un aumento en la muerte celular empleando nanopartículas, junto con irradiación. Si se calcula el NER para la condición de la Figura 57, se obtiene un valor de 0.58. En ensayos *in vitro*, donde se estudia la viabilidad celular a múltiples dosis, es posible obtener una curva de supervivencia, pudiendo definir dos parámetros principales a partir de ella. El primero es el factor de mejora de la dosis (DEF del inglés dose enhancement factor), el cual se define como la dosis requerida para disminuir la supervivencia celular a 80% en presencia y ausencia de nanopartículas [93]. El otro parámetro es la relación de mejora de sensibilización (SER del inglés sensitisation enhancement ratio) [109], el cual se obtiene del modelado lineal-cuadrático de la curva de supervivencia, definida como:

$$y = e^{-(ax+bx^2)}$$

Donde y es la fracción de supervivencia, x la dosis suministrada y $1/a$ la dosis letal media (D_0). A partir de esto se calcula SER como:

$$\text{SER} = \frac{D_0 \text{ (sin nanopartículas)}}{D_0 \text{ (con nanopartículas)}}$$

Una forma de determinar el daño celular, es mediante el ensayo clonogénico, donde se determinan las unidades de formación de colonias (CFU del inglés colony forming unit), las cuales se pueden representar en unidades porcentuales. Otra forma de observar el daño por radiación en ensayos *in vitro* es el estudio del índice de apoptosis (IA), que da un indicio del aumento de la muerte celular programada debido al daño celular [110].

En la Tabla 15 se resumen los resultados obtenidos en trabajos reportados donde se utilizan nanopartículas de Bi_2S_3 como radiosensibilizadores.

Condiciones de irradiación	Línea celular		Np	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Resumen de resultados		Ref.								
					Parámetro	Res.									
Rayos X	150 kV	Fantoma	-	Bi ₂ S ₃ -PVP	128	DEF	1.41	[92]							
	80 kVp	PC3	Humana	Bi ₂ S ₃ -PVP	257	DEF	1.6	[93]							
					514	DEF	3.07								
					514	DEF	2.24								
	4 Gy	4T1	Murina	Bi ₂ S ₃ -Tween20	100	SER	1.22	[109]							
									3 Gy	PC3	Humana	Bi ₂ S ₃ -PLGA	500	54.23	[149]
													1000	50	
													2500	26.92	
	6 Gy				5000	IA	2.06								
P-32	0.03 mCi	PC3	Humana	Bi ₂ S ₃ @SiO ₂	50	Aumento de muerte respecto al blanco	57%	[110]							

Tabla 15: Resumen de resultados de estudios de radiosensibilización utilizando nanopartículas de Bi₂S₃ con diversos ligandos, especificando las distintas condiciones empleadas en el ensayo, como el tipo de radiación y dosis utilizadas, la línea tumoral ensayada, las concentraciones utilizadas, y los principales resultados obtenidos en el análisis.

Considerando que en todos los ensayos realizados en las referencias citadas, donde se indica la dosis y la concentración de nanopartículas empleadas, la concentración utilizada fue mayor a la empleada en esta Maestría, y que además la dosis en todos los casos también lo fue, se puede determinar que el resultado obtenido en este trabajo fue muy

satisfactorio. Incluso en el caso donde se utilizó la misma concentración de nanopartículas, se obtuvo tan solo 57% más muerte celular empleando una inyección intratumoral de una fuente de un isótopo de fósforo ($P-32$), el cual es emisor beta, con una energía de 1.71 MeV. Al ser emisor beta la radiación emitida por este radionucleido puede penetrar muy poco los tejidos, siendo su aplicación únicamente factible si se inyecta junto con la suspensión de nanopartículas. Por lo tanto, las nanopartículas obtenidas en este trabajo, cuyo tamaño y recubrimiento permiten que las mismas sean estables en suspensiones biológicas y puedan ser incorporadas por las células cancerígenas, demuestran tener una gran eficiencia de sensibilización de células de cáncer de mama MCF7, utilizando una fuente gamma externa de irradiación, como lo la fuente de ^{60}Co .

4- Conclusiones

En este trabajo se lograron sintetizar nanopartículas de Bi_2S_3 con distintas morfologías y mediante el empleo de distintas técnicas se logró determinar la identidad del compuesto, la presencia y cuantificación de ligando, el tamaño de partícula y la distribución del mismo.

Particularmente, mediante el método hidrotérmico las partículas obtenidas presentaron tamaños que se escapan de los necesarios para la aplicación final, pero los resultados obtenidos son alentadores para continuar explorando otras alternativas que permitan obtener nanopartículas adecuadas.

Mediante el método “hot injection” en medio orgánico se obtuvieron morfologías que variaron principalmente por la concentración de la fuente de bismuto, obteniéndose partículas de mayor tamaño a medida que la concentración de la fuente de bismuto aumentaba, cambiando la morfología de circular a varillas. A su vez se logró obtener nanopartículas recubiertas con PVP, debido al efectivo cambio de ligando que se realizó, que permite que las mismas sean compatibles con solventes polares. Esta compatibilidad se comprobó mediante ensayos de la estabilidad de las suspensiones de las nanopartículas sintetizadas en distintos medios, cuya diferencia entre ellos principalmente se debía a la viscosidad de la solución y a la presencia de agentes estabilizantes. Los resultados permitieron asegurar que las nanopartículas son estables en medios biológicos, como por ejemplo plasma sanguíneo, debido a su casi nula velocidad de decantación. Esto permite que las nanopartículas obtenidas puedan ser utilizadas en posteriores análisis in vitro e in vivo. Es de destacar que el proceso de cambio de ligando trajo aparejado un crecimiento del tamaño de las nanopartículas, posiblemente por la aplicación de calor en el proceso.

Los estudios de toxicidad realizados en este trabajo permiten concluir que las nanopartículas obtenidas presentan una baja toxicidad, debido a la ausencia de toxicidad aguda en el ensayo ecotoxicológico en *Daphnia magna* (concentraciones testeadas hasta

100 mg/L) y el gran rango de concentraciones a la cual no se obtuvo citotoxicidad en células cancerígenas MCF7 (hasta una concentración de 2500 µg/mL).

Se evaluó además la aplicación como radiosensibilizador de las nanopartículas de Bi_2S_3 con PVP como ligando. Para poder llegar a la evaluación correcta se obtuvieron primero los parámetros adecuados de ensayo, los cuales correspondieron a una aplicación de una dosis de 2 Gy y la observación de los resultados pasadas 48 h del momento de la irradiación, teniendo en cuenta que el cambio de medio de cultivo se debe de realizar antes del paso de irradiación. Los resultados de radiosensibilización obtenidos dependieron de la manipulación de la suspensión de nanopartículas. En el caso de nanopartículas previamente dializadas, cuyo fin fue la eliminación de compuestos contaminantes, presentó los peores resultados, observándose un aumento de la citotoxicidad celular en casi un 35 % y sin lograrse obtener un resultado afirmativo del beneficio en la radiosensibilidad de las células al emplear estas partículas. Cuando las nanopartículas fueron suspendidas empleando un sonicador de baño de agua, no se obtiene una citotoxicidad marcada, pero tampoco así un aumento en la eficiencia de radiosensibilización. El caso en el cual sí se observa un aumento marcado de la sensibilización celular es al emplear nanopartículas cuya suspensión fue sonicada con sonicador de punta, en cuyo caso se obtuvo una disminución casi del 40 % en la viabilidad celular.

En resumen, en este trabajo se logró poner en marcha una línea de investigación nueva en el Área Radioquímica, obteniéndose resultados alentadores en cada una de las etapas claves que la línea abarca. Aunque el resultado final de esta tesis presenta un excelente porcentaje de disminución de viabilidad celular, lo que indica que se cumplió el objetivo inicial de esta tesis, de aumentar la sensibilización de células de cáncer de mama a la radiación utilizando nanopartículas de Bi_2S_3 , se abren nuevos puntos de discusión en cada etapa de la línea que deben de ser enfocados en trabajos futuros.

5- Trabajo a futuro

Este trabajo abre varias vías de investigación donde se puede profundizar en los beneficios de utilizar las nanopartículas de sulfuro de bismuto como radiosensibilizadores.

Debido a que no se logró obtener nanopartículas adecuadas para la aplicación final por el método hidrotérmico, la facilidad práctica que éste método permite, se deberá continuar variando las condiciones de síntesis con el fin de lograr nanopartículas capaces de actuar como radiosensibilizadores.

Un camino inmediato a tomar es explorar la disminución de la concentración de nanopartículas en los ensayos *in vitro*. Esto permitirá determinar hasta que concentración es posible observar un efecto de radiosensibilización en las células estudiadas.

Con el fin de comprender si la clave del resultado obtenido es la internalización de las nanopartículas en las células, se deberá estudiar la misma a partir de microscopía confocal con diferentes biomarcadores y por medio de microscopía electrónica de transmisión.

Asimismo se deberá comprobar si los efectos obtenidos en este trabajo son propios de células cancerígenas o también son experimentados por las células normales, por lo tanto se deberá realizar ensayos *in vitro* con células normales, como pueden ser las células normales de mama MCF10, células normales de pulmón MRC5, utilizadas comúnmente como células control, o linfocitos sanguíneos, que poseen una alta sensibilidad a la radiación.

Para comprender el mecanismo de acción de las nanopartículas en la muerte celular, se deberán realizar distintos métodos de análisis de daño celular como estudio de apoptosis celular, observación de aberraciones cromosómicas y estrés oxidativo primario en ADN mediante el ensayo Cometa. En relación a este estudio, se deberá también estudiar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, estudiando la concentración total de radicales de oxígeno generados y discriminando el efecto de cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos son válidos para la energía correspondiente al ^{60}Co , se deberá evaluar la aplicación final de las nanopartículas para diferentes energías, como por ejemplo la del ^{137}Cs .

Debido a que las nanopartículas obtenidas presentan una capa de biocompatibilidad exclusivamente, se deberá estudiar la funcionalización de la misma con moléculas cuyos receptores sean sobre-expresados en células cancerígenas, como puede ser ácido fólico o estrógeno. Esta funcionalización implica un factor extra clave en la estabilidad de las nanopartículas, su internalización en las células y en el efecto de sensibilización a la radiación, por lo tanto se deberán evaluar todos los puntos discutidos anteriormente para las nanopartículas funcionalizadas.

Por último se deberá continuar con los estudios ecotoxicológicos de las nanopartículas, principalmente su toxicidad crónica, su influencia en la alimentación de los organismos acuáticos y la generación de daños por estrés oxidativo tanto durante su dispersión en el medio acuático, como en la internalización de las nanopartículas en dichos organismos. Este estudio se deberá realizar en distintos extractos de organismos, como son algas, cladóceros y peces.

6- Bibliografía

- [1] N. E. Day y C. C. Brown, «Multistage models and primary prevention of cancer», *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 64, n.º 4, pp. 977-989, 1980.
- [2] World Health Organization, *World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. 2018.
- [3] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Globocan 2018 World Report», 2019. [En línea]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
- [4] J. Ferlay *et al.*, «Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012», *Int. J. Cancer*, vol. 136, n.º 5, pp. E359-E386, 2015.
- [5] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, both sexes, all ages», *Globocan*, 2018. [En línea]. Disponible en: http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-bar?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0.
- [6] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «All cancers incidence and mortality statistics worldwide and by region», *Globocan*, 2018. [En línea]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=207840&Text-p=United+States+of+America&selection_cancer=290&Text-c=All+cancers+excl.+non-melanoma+skin+cancer&pYear=3&type=0&>window=1&submit=Execute.
- [7] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages», *Globocan*, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today>.
- [8] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Top cancer per country, estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, both sexes, all ages», *Globocan*, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis->

- map?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_ca.
- [9] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Top cancer per country, estimated age-standardized mortality rates (World) in 2018, all cancers, both sexes, all ages», *Globocan*, 2018.
- [10] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Top cancer per country, estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, females, all ages», *Globocan*, 2018. [En línea]. Disponible en: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_ca.
- [11] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Top cancer per country , estimated age-standardized mortality rates (World) in 2018 , females , all ages», 2018. .
- [12] Instituto Nacional de Estadística de Uruguay, «Cuadro Mortalidad por causa, sexo y edad. Uruguay, año 2017», 2017.
- [13] Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, «Situacion Epidemiologica del Uruguay en relacion al Cancer», 2018.
- [14] World Health Organization - International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory, «Uruguay, Incidence and Mortality Registry, Cancer Country-specific», 2019. .
- [15] Registro Nacional de Cáncer Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, «INCIDENCIA DEL CANCER EN URUGUAY. Periodo 2011-2015. Tasas Especificas por intervalo de edad, tasa cruda y tasa ajustada. MUJERES», 2015.
- [16] Registro Nacional de Cáncer Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, «MORTALIDAD POR CANCER EN URUGUAY. Periodo 2011-2015. Tasas Especificas por intervalo de edad, tasa cruda y tasa ajustada. MUJERES», 2015.
- [17] M. Baumann *et al.*, «Radiation oncology in the era of precision medicine», *Nat.*

- Rev. Cancer*, vol. 16, n.º 4, pp. 234-249, 2016.
- [18] R. Atun *et al.*, «Expanding global access to radiotherapy», *Lancet Oncol.*, vol. 16, n.º 10, pp. 1153-1186, 2015.
- [19] M. B. Barton, M. Frommer, y J. Shafiq, «Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries.», *Lancet. Oncol.*, vol. 7, n.º 7, pp. 584-95, 2006.
- [20] K. Nosaki y T. Seto, «The Role of Radiotherapy in the Treatment of Small-Cell Lung Cancer», *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 16, n.º 12, 2015.
- [21] B. Amendola y M. Amendola, «Status of Radiation Therapy in Uruguay: Past, Present, and Future», *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 94, n.º 3, pp. 428-434, 2016.
- [22] E. J. Hall y A. J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*, 7th editio. Philadelphia, USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2012.
- [23] H. Willers y K. D. Held, «Introduction to clinical radiation biology», *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 20, n.º 1, pp. 1-24, 2006.
- [24] E. J. Hall, «Radiation biology for pediatric radiologists», *Pediatr. Radiol.*, vol. 39, n.º SUPPL. 1, 2009.
- [25] B. Halliwell y O. L. Aruoma, «DNA damage by oxygen-derived species», *FEBS Lett.*, vol. 281, pp. 9-19, 1991.
- [26] A. Costa, A. Scholer-Dahirel, y F. Mechta-Grigoriou, «The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment», *Semin Cancer Biol*, vol. 25, pp. 23-32, 2014.
- [27] G.-Y. Liou y P. Storz, «Reactive oxygen species in cancer», *Free Radic. Res.*, vol. 44, n.º 5, pp. 479-496, 2010.
- [28] D. M. Christensen, C. J. Iddins, y S. L. Sugarman, «Ionizing radiation injuries and illnesses», *Emerg. Med. Clin. North Am.*, vol. 32, n.º 1, pp. 245-265, 2014.
- [29] M. Joiner y A. van der Kogel, Eds., *Basic Clinical Radiobiology*, 4th ed. Great Britain: Hodder Arnold, 2009.
- [30] C. A. KELSEY, P. H. HEINTZ, D. J. SANDOVAL, G. D. CHAMBERS, N. L. ADOLPHI, y K. S. PAFFETT, *Radioation Biology of Medical Imaging*. John Wiley & Sons, 2014.

- [31] L. Marcu, E. Bezak, y B. Allen, *Biomedical Physics in Radiotherapy for Cancer*, 1a Ed. Australia: CSIRO Publishing, 2012.
- [32] H. G. J. Beik, A. T. S. R. Mahdavi, y H. Abdollahi, «New physical approaches to treat cancer stem cells : a review», *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 20, n.º 12, pp. 1502-1521, 2018.
- [33] M. Guckenberger *et al.*, «Safety and efficacy of stereotactic body radiotherapy as primary treatment for vertebral metastases: a multi-institutional analysis», *Radiat. Oncol.*, vol. 9, p. 226, 2014.
- [34] H. Wang, X. Mu, H. He, y X. D. Zhang, «Cancer Radiosensitizers», *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, n.º 1, pp. 24-48, 2018.
- [35] Y. Liu *et al.*, «Metal-based NanoEnhancers for future radiotherapy: Radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells», *Theranostics*, vol. 8, n.º 7, pp. 1824-1849, 2018.
- [36] D. Kwatra, A. Venugopal, y S. Anant, «Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer», *Transl. Cancer Res.*, vol. 2, n.º 4, pp. 330-342, 2013.
- [37] Y. Mi, Z. Shao, J. Vang, O. Kaidar-Person, y A. Z. Wang, «Application of nanotechnology to cancer radiotherapy», *Cancer Nanotechnol.*, vol. 7, n.º 1, 2016.
- [38] P. Wardman, «Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy», *Clin. Oncol.*, vol. 19, pp. 397-417, 2007.
- [39] J. Overgaard y M. R. Horsman, «Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers», *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 6, n.º 1, pp. 10-21, 1996.
- [40] T. Hypoxia, N. Hayashi, Y. Ogawa, K. Kubota, K. Okino, y R. Akima, «Computed Tomography Demonstration of the Production and Distribution of Oxygen Gas Following Intratumoral Injection of a New Radiosensitizer (KORTUC) for Patients with Breast Cancer — Is Intratumoral Injection Not an Ideal Approach to Solve the Major Prob», *Cancers (Basel)*, vol. 43, pp. 1-8, 2016.
- [41] G. O. Janssens *et al.*, «Accelerated Radiotherapy With Carbogen and Nicotinamide for Laryngeal Cancer: Results of a Phase III Randomized Trial», *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, n.º 15, pp. 1777-1783, 2019.

- [42] J. Xue *et al.*, «Activation of PPAR α by clofibrate sensitizes pancreatic cancer cells to radiation through the Wnt/ β -catenin pathway», *Oncogene*, vol. 37, n.º 199, pp. 953-962, 2018.
- [43] R. Hammer, M. Sc, y M. Pedersen, «Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx: Report from the DAHANCA 2 study», *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 16, n.º October 1988, pp. 1065-1068, 1989.
- [44] P. J. Overgaard *et al.*, «Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial», *Lancet Oncol.*, vol. 6, n.º 10, pp. 757-764, 2005.
- [45] B. Oronsky *et al.*, «RRx-001, A novel dinitroazetidine radiosensitizer», *Invest. New Drugs*, vol. 34, pp. 371-377, 2016.
- [46] A. Maroz, S. Shinde, y M. P. Hay, «Characterisation of radicals formed by the triazine 1,4-dioxide hypoxia-activated prodrug, SN30000», *Organis Biomol. Chem.*, vol. 12, pp. 3386-3392, 2014.
- [47] L. Ming *et al.*, «Androgen deprivation results in time-dependent hypoxia in LNCaP prostate tumours : Informed scheduling of the bioreductive drug AQ4N improves treatment response», *Int. J. Cancer*, vol. 1332, pp. 1323-1332, 2013.
- [48] H. Deoxyuridines, S. Wang, P. Zhao, C. Zhang, y Y. Bu, «Mechanisms Responsible for High Energy Radiation Induced Damage to Single-Stranded DNA Modified by Radiosensitizing 5-Halogenated Deoxyuridines», *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, pp. 2649-2657, 2016.
- [49] A. A. Chowdhury, J. Chaudhuri, N. Biswas, y A. Manna, «Synergistic Apoptosis of CML Cells by Buthionine Sulfoximine and Hydroxychavicol Correlates with Activation of AIF and GSH-ROS-JNK-ERK-iNOS Pathway», vol. 8, n.º 9, 2013.
- [50] Z. R. Reichert, D. R. Wahl, y M. A. Morgan, «Translation of Targeted Radiation Sensitizers into Clinical Trials», *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 26, n.º 4, pp. 261-270, 2016.
- [51] P. Zhang *et al.*, «miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13», *Nat. Commun.*, n.º May, pp. 1-10, 2014.
- [52] A. V Kofman *et al.*, «microRNA-34a promotes DNA damage and mitotic

- catastrophe», *Cell Cycle*, vol. 12, n.º 22, pp. 3500-3511, 2013.
- [53] S. Fukuoka, T. Kojima, Y. Koga, y M. Yamauchi, «Preclinical efficacy of Sym004, novel anti-EGFR antibody mixture, in esophageal squamous cell carcinoma cell lines», *Oncotarget*, vol. 8, n.º 7, pp. 11020-11029, 2017.
- [54] F. E. I. Cao *et al.*, «Phosphorothioate - modified antisense oligonucleotides against human telomerase reverse transcriptase sensitize cancer cells to radiotherapy», *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, pp. 2089-2094, 2017.
- [55] M. Mehta, K. Basalingappa, J. N. Griffith, y D. Andrade, «HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy», *Oncotarget*, vol. 7, n.º 40, 2016.
- [56] E. Brun y C. Sicard-Roselli, «Actual questions raised by nanoparticle radiosensitization», *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 128, pp. 134-142, 2016.
- [57] J. W. J. Berghs *et al.*, «The role of recent nanotechnology in enhancing the efficacy of radiation therapy», *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1856, n.º 1, pp. 130-143, 2015.
- [58] A. Mesbahi, «A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer», *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 15, n.º 6, pp. 176-180, 2010.
- [59] B. Jeremic, A. R. Aguerri, y N. Filipovic, «Radiosensitization by gold nanoparticles», *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 15, n.º 8, pp. 593-601, 2013.
- [60] X.-D. Zhang *et al.*, «Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy», *Biomaterials*, vol. 33, n.º 27, pp. 6408-6419, 2012.
- [61] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, y M. V. Russo, «How toxic are gold nanoparticles? The State-of-the-Art», vol. 1, pp. 1-29, 2015.
- [62] J. Swanner *et al.*, «Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells», *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 3937-3953, 2015.
- [63] P. Juzenas *et al.*, «Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer», *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, n.º 15, pp. 1600-1614, 2008.
- [64] C. Mirjolet *et al.*, «The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool

- in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept», *Radiother. Oncol.*, vol. 108, n.º 1, pp. 136-142, 2013.
- [65] L. Maggiorella *et al.*, «Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles», *Futur. Oncol.*, vol. 8, n.º 9, pp. 1167-1181, 2012.
- [66] S. Klein, A. Sommer, L. V. R. Distel, W. Neuhuber, y C. Kryschi, «Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 425, n.º 2, pp. 393-397, 2012.
- [67] P. Retif *et al.*, «Nanoparticles for radiation therapy enhancement: The key parameters», *Theranostics*, vol. 5, n.º 9, pp. 1030-1044, 2015.
- [68] D. M. Herold, I. J. Das, C. C. Stobbe, R. V Iyer, y J. D. Chapman, «Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement.», *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 76, n.º 10, pp. 1357-1364, 2000.
- [69] G. F. Knoll., *Radiation Detection and Measurement*, 3rd ed. 2000.
- [70] S. Barua y S. Mitragotri, «Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects», *Nano Today*, vol. 9, n.º 2, pp. 223-243, 2014.
- [71] T. Stylianopoulos, «EPR-effect: utilizing size-dependent nanoparticle delivery to solid tumors», *Ther. Deliv.*, vol. 4, pp. 421-423, 2013.
- [72] E. Blanco, H. Shen, y M. Ferrari, «Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery», *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, n.º 9, pp. 941-952, 2015.
- [73] R. Bazak, M. Hourri, S. E. L. Achy, W. Hussein, y T. Refaat, «Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature», pp. 904-908, 2014.
- [74] M. Wang y M. Thanou, «Targeting nanoparticles to cancer», *Pharmacol. Res.*, vol. 62, n.º 2, pp. 90-99, 2010.
- [75] L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, y N. Pazos-Perez, «Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids», *Materials (Basel)*, vol. 11, n.º 7, pp. 1-28, 2018.
- [76] C. Corbo, R. Molinaro, A. Parodi, N. E. Toledano Furman, F. Salvatore, y E.

- Tasciotti, «The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery», *Nanomedicine*, vol. 11, n.º 1, pp. 81-100, 2016.
- [77] Y. Wang, J. Chen, P. Wang, L. Chen, Y. B. Chen, y L. M. Wu, «Syntheses, growth mechanism, and optical properties of [001] growing Bi₂S₃ nanorods», *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, n.º 36, pp. 16009-16014, 2009.
- [78] J. Liu *et al.*, «Bismuth Sulfide Nanorods as a Precision Nanomedicine for in Vivo Photothermal Therapy of Tumor», *ACS Nano*, vol. 9, n.º 1, pp. 696-707, 2015.
- [79] Y. Yu, C. H. Jin, R. H. Wang, Q. Chen, y L. Peng, «High-Quality Ultralong Bi₂S₃ Nanowires: Structure, Growth, and Properties», pp. 18772-18776, 2005.
- [80] T. Wu, X. Zhou, H. Zhang, y X. Zhong, «Bi₂S₃ nanostructures: A new photocatalyst», *Nano Res.*, vol. 3, n.º 5, pp. 379-386, 2010.
- [81] H. Zhang, J. Huang, X. Zhou, y X. Zhong, «Single-crystal Bi₂S₃ nanosheets growing via attachment-recrystallization of nanorods.», *Inorg. Chem.*, vol. 50, n.º 16, pp. 7729-34, 2011.
- [82] J. Ma *et al.*, «Ionic liquids-assisted synthesis and electrochemical properties of Bi₂S₃ nanostructures», *CrystEngComm*, vol. 13, n.º 8, pp. 3072-3079, 2011.
- [83] D. Wang *et al.*, «Bi₂S₃ Nanotubes: Facile Synthesis and Growth Mechanism», *Nano Res.*, vol. 2, pp. 130-134, 2009.
- [84] J. Jin y T. He, «Facile synthesis of Bi₂S₃ nanoribbons for photocatalytic reduction of CO₂ into CH₃OH», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 394, n.º 2017, pp. 364-370, 2017.
- [85] S. Nambiar, E. K. Osei, y J. T. W. Yeow, «Bismuth Sulfide Nanoflowers for Detection of X-rays in the Mammographic Energy Range», *Sci. Rep.*, vol. 5, n.º 9440, p. 9440, 2015.
- [86] L. Synthesis y U. Bi, «Large-Scale Synthesis of Ultralong Bi₂S₃ Nanoribbons via a Solvothermal Process», n.º 11, pp. 936-940, 2003.
- [87] A. Helal, F. A. Harraz, A. A. Ismail, T. M. Sami, y I. A. Ibrahim, «Controlled synthesis of bismuth sulfide nanorods by hydrothermal method and their photocatalytic activity», *Mater. Des.*, vol. 102, pp. 202-212, 2016.
- [88] A. Maria Ibanez, Pablo Guardia, Alexey Shavel, Doris Cadavid, Jordi Arbiol, Joan Ramon Morante y A. Cabot, «Growth Kinetics of Asymmetric Bi₂S₃ Nanocrystals: Size Distribution», *J. Phys. Chem. C*, pp. 7947-7955, 2011.

- [89] T. Thongtem, A. Phuruangrat, S. Wannapop, y S. Thongtem, «Characterization of Bi₂S₃ with different morphologies synthesized using microwave radiation», *Mater. Lett.*, vol. 64, n.º 2, pp. 122-124, 2010.
- [90] S. M. de la Parra-Arciniega, N. A. Garcia-Gomez, L. L. Garza-Tovar, D. I. García-Gutiérrez, y E. M. Sánchez, «Ultrasonic irradiation-assisted synthesis of Bi₂S₃ nanoparticles in aqueous ionic liquid at ambient condition», *Ultrason. Sonochem.*, vol. 36, pp. 95-100, 2017.
- [91] J. Arumugam, A. Dhayal Raj, y A. Albert Irudayaraj, «Solvent effects on the properties of Bi₂S₃ nanoparticles: photocatalytic application», *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 28, n.º 4, pp. 3487-3494, 2017.
- [92] M. Alqathami, A. Blencowe, M. Geso, y G. Ibbott, «Quantitative 3D determination of radiosensitization by bismuth-based nanoparticles», *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 12, n.º 3, pp. 464-471, 2016.
- [93] M. Algethami *et al.*, «Radiation Dose Enhancement Using Bi₂S₃ Nanoparticles in Cultured Mouse PC3 Prostate and B16 Melanoma Cells», *Nano World J.*, vol. 1, n.º 3, pp. 97-102, 2015.
- [94] R. Mohan, «Green bismuth», *Nat. Publ. Gr.*, vol. 2, n.º 4, p. 336, 2010.
- [95] J. Krüger, P. Winkler, E. Lüderitz, M. Lück, y H. U. Wolf, «Bismuth, Bismuth Alloys, and Bismuth Compounds», *Encycl. Ind. Chem.*, vol. 6, pp. 113-132, 2010.
- [96] T. A. Udalova, O. A. Logutenko, E. V. Timakova, L. I. Afonina, E. S. Naydenko, y Y. M. Yukhin, «Bismuth compounds in medicine», *Proc. IFOST-2008 - 3rd Int. Forum Strateg. Technol.*, pp. 137-140, 2008.
- [97] D. W. Bierer, «Bismuth subsalicylate: History, chemistry, and safety», *Rev. Infect. Dis.*, vol. 12, n.º FEBRUARY, pp. S3-S8, 1990.
- [98] P. C. Andrews, R. L. Ferrero, C. M. Forsyth, P. C. Junk, J. G. MacLellan, y R. M. Peiris, «Bismuth(III) saccharinate and thiosaccharinate complexes and the effect of ligand substitution on their activity against helicobacter pylori», *Organometallics*, vol. 30, n.º 22, pp. 6283-6291, 2011.
- [99] J. P. Gisbert, «Helicobacter pylori eradication: A new, single-capsule bismuth-containing quadruple therapy», *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 8, n.º 6, pp. 307-309, 2011.

- [100] P. Malfertheiner *et al.*, «Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: A randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial», *Lancet*, vol. 377, n.º 9769, pp. 905-913, 2011.
- [101] T. L. Rosenblat *et al.*, «Sequential cytarabine and α -particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia», *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, n.º 21, pp. 5303-5311, 2010.
- [102] B. T. Leussink *et al.*, «Renal epithelial gene expression profile and bismuth-induced resistance against cisplatin nephrotoxicity», *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 22, n.º 10, pp. 535-540, 2003.
- [103] K. Ai, Y. Liu, J. Liu, Q. Yuan, Y. He, y L. Lu, «Large-Scale Synthesis of Bi₂S₃ Nanodots as a Contrast Agent for In Vivo X-ray Computed Tomography Imaging», *Adv. Mater.*, vol. 23, n.º 42, pp. 4886-4891, 2011.
- [104] O. Rabin, J. M. Perez, J. Grimm, G. Wojtkiewicz, y R. Weissleder, «An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles», *Nat. Mater.*, vol. 5, n.º 2, pp. 118-122, 2006.
- [105] N. Lee, S. H. Choi, y T. Hyeon, «Nano-sized CT contrast agents», *Adv. Mater.*, vol. 25, n.º 19, pp. 2641-2660, 2013.
- [106] M. Algethami, B. Feltis, y M. Geso, «Bismuth Sulfide Nanoparticles as a Complement to Traditional Iodinated Contrast Agents at Various X-Ray Computed Tomography Tube Potentials», *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, vol. 06, n.º 04, pp. 2-10, 2017.
- [107] J. Chen *et al.*, «In vitro and in vivo CT imaging using bismuth sulfide modified with a highly biocompatible Pluronic F127», *Nanotechnology*, vol. 25, n.º 29, 2014.
- [108] M. H. Yao *et al.*, «Multifunctional Bi₂S₃/PLGA nanocapsule for combined HIFU/radiation therapy», *Biomaterials*, vol. 35, n.º 28, pp. 8197-8205, 2014.
- [109] C. X. *et al.*, «Enhanced radiotherapy using Bismuth sulfide nanoagents combined with photo-thermal treatment», *Theranostics*, 2017.
- [110] M. Ma *et al.*, «Bi₂S₃-embedded mesoporous silica nanoparticles for efficient drug delivery and interstitial radiotherapy sensitization», *Biomaterials*, vol. 37, pp. 447-455, 2015.

- [111] Y. Wang *et al.*, «BSA-Mediated Synthesis of Bismuth Sulfide Nanotheranostic Agents for Tumor Multimodal Imaging and Thermoradiotherapy», *Adv. Funct. Mater.*, vol. 26, n.º 29, pp. 5335-5344, 2016.
- [112] X. Wang *et al.*, «Enhanced Generation of Non-Oxygen Dependent Free Radicals by Schottky-type Heterostructures of Au-Bi₂S₃ Nanoparticles via X-ray-Induced Catalytic Reaction for Radiosensitization», *ACS Nano*, vol. 13, n.º 5, pp. 5947-5958, 2019.
- [113] S. Wang *et al.*, «A facile one-pot synthesis of a two-dimensional MoS₂/Bi₂S₃ composite theranostic nanosystem for multi-modality tumor imaging and therapy», *Adv. Mater.*, vol. 27, n.º 17, pp. 2775-2782, 2015.
- [114] Z. Guo *et al.*, «Synthesis of BSA-Coated BiOI@Bi₂S₃ Semiconductor Heterojunction Nanoparticles and Their Applications for Radio/Photodynamic/Photothermal Synergistic Therapy of Tumor», *Adv. Mater.*, vol. 29, n.º 44, pp. 1-12, 2017.
- [115] J. Schindelin *et al.*, «Fiji: An open-source platform for biological-image analysis», *Nat. Methods*, vol. 9, n.º 7, pp. 676-682, 2012.
- [116] RStudio, «RStudio: Integrated development environment for R». July 19th, 2018, Boston, MA.
- [117] E. Hu, X. Gao, A. Etogo, Y. Xie, Y. Zhong, y Y. Hu, «Controllable one-pot synthesis of various one-dimensional Bi₂S₃ nanostructures and their enhanced visible-light-driven photocatalytic reduction of Cr(VI)», *J. Alloys Compd.*, vol. 611, pp. 335-340, 2014.
- [118] L. Johnsson, «The Complex Formation of Bismuth (III) with Chloride in Aqueous Solution. A Solubility Study», *Acta Chem. Scand.*, vol. 23, n.º 2, pp. 548-556, 1969.
- [119] A. A. Noybs, F. W. Hall, y J. A. Bbattis, «The solubility of bismuth oxychloride in hydrochloric acid and its relation to complex formation», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 39, n.º 12, pp. 2526-2532, 1917.
- [120] F. Nelson y K. A. Kraus, «Anion-exchange Studies. XI. Lead(II) and Bismuth(III) in Chloride and Nitrate Solutions», *Contrib. from Oak Ridge Natl. Lab. Chem. Div.*, vol. 76, n.º 4, pp. 5916-5920, 1954.
- [121] Z. G. Estephan, H. H. Hariri, y J. B. Schlenoff, «One-pot, exchange-free, room-temperature synthesis of Sub-10 nm aqueous, noninteracting, and stable

- zwitterated iron oxide nanoparticles», *Langmuir*, vol. 29, n.º 8, pp. 2572-2579, 2013.
- [122] M. Wiśniewska, T. Urban, A. Nosal-Wiercińska, V. I. Zarko, y V. M. Gun'ko, «Comparison of stability properties of poly(acrylic acid) adsorbed on the surface of silica, alumina and mixed silica-alumina nanoparticles - Application of turbidimetry method», *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 12, n.º 4, pp. 476-479, 2014.
- [123] OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, «Acute Immobilisation Test and Reproduction Test on *Daphnia* sp.», vol. OECD 202, 2004.
- [124] ASTM -American Society for Testing and Materials, «Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians», vol. 96, pp. E729–E796, 2002.
- [125] ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, «Aquatic ecotoxicology-Acute toxicity-Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea)», vol. NBR12713, 2016.
- [126] G. G. Briand y N. Burford, «Bismuth Compounds and Preparations with Biological or Medicinal Relevance», *Chem. Rev.*, vol. 99, n.º 9, pp. 2601-2658, 1999.
- [127] R. Sadeghi y M. T. Zafarani-Moattar, «Thermodynamics of aqueous solutions of polyvinylpyrrolidone», *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 36, n.º 8, pp. 665-670, 2004.
- [128] E. Pretsch, P. Buhlmann, y M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, Fourth Edi. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [129] A. Li *et al.*, «Topotactic transformation of single-crystalline precursor discs into disc-like Bi₂S₃ nanorod networks», *Adv. Funct. Mater.*, vol. 18, n.º 8, pp. 1194-1201, 2008.
- [130] Z. Liu, J. Fang, W. Xu, X. Xu, S. Wu, y X. Zhu, «Low temperature hydrothermal synthesis of Bi₂S₃ nanorods using BiOI nanosheets as self-sacrificing templates», *Mater. Lett.*, vol. 88, pp. 82-85, 2012.
- [131] Y. Xu, Z. Ren, G. Cao, W. Ren, K. Deng, y Y. Zhong, «A template-free route to prepare Bi₂S₃ nanostructures», *Phys. B Condens. Matter*, vol. 405, n.º 5, pp. 1353-1358, 2010.
- [132] Y. Zhao *et al.*, «Phonons in Bi₂S₃ nanostructures: Raman scattering and first-principles studies», *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 84, n.º 20,

- pp. 1-8, 2011.
- [133] Y. Liu, K. Ting, E. Chua, T. C. Sum, y C. K. Gan, «First-principles study of the lattice dynamics of Sb₂S₃», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, pp. 345-350, 2014.
- [134] I. Zumeta-Dubé, J. L. Ortiz-Quiñonez, D. Díaz, C. Trallero-Giner, y V. F. Ruiz-Ruiz, «First order raman scattering in bulk Bi₂S₃ and quantum dots: Reconsidering controversial interpretations», *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, n.º 51, pp. 30244-30252, 2014.
- [135] J. In *et al.*, «Polymorph-tuned synthesis of α - and β -Bi₂O₃ nanowires and determination of their growth direction from polarized raman single nanowire microscopy», *Chem. - A Eur. J.*, vol. 17, n.º 4, pp. 1304-1309, 2011.
- [136] V. N. Denisov, A. N. Ivlev, A. S. Lipin, B. N. Mavrin, y V. G. Orlov, «Raman spectra and lattice dynamics of single-crystal α -Bi₂O₃», *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 9, n.º 23, pp. 4967-4978, 1997.
- [137] G. C. Capitani *et al.*, «The Bi sulfates from the Alfenza Mine, Crodo, Italy: An automatic electron diffraction tomography (ADT) study», *Am. Mineral.*, vol. 99, n.º 2-3, pp. 500-510, 2014.
- [138] V. S. Johnson, R. J. White, S. E. Dann, y K. Hellgardt, «Structural investigation of the high-temperature oxidation of bismuth sulfide using TPO-MS and in situ X-ray diffraction techniques», *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 43, n.º 12, pp. 3127-3132, 2004.
- [139] J. Schwan, S. Ulrich, V. Batori, H. Ehrhardt, y S. R. P. Silva, «Raman spectroscopy on amorphous carbon films», *J. Appl. Phys.*, vol. 80, n.º 1, pp. 440-447, 1996.
- [140] J. A. Bearden, *X-Ray Wavelengths and X-Ray Atomic Energy Levels*, vol. 31, n.º 1. National Standard Reference Data Series- National Bureau of Standards 14, 1967.
- [141] P. Han, A. Mihi, J. Ferre-Borrull, J. Pallarés, y L. F. Marsal, «Interplay between morphology, optical properties, and electronic structure of solution-processed Bi₂S₃ colloidal nanocrystals», *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, n.º 19, pp. 10693-10699, 2015.
- [142] D. J. Riley, J. P. Waggett, y K. G. Upul Wijayantha, «Colloidal bismuth sulfide nanoparticles: A photoelectrochemical study of the relationship between bandgap and particle size», *J. Mater. Chem.*, pp. 704-708, 2004.
- [143] R. Malakooti, L. Cademartiri, Y. Akçakir, S. Petrov, A. Migliori, y G. A. Ozin,

- «Shape-controlled Bi₂S₃ nanocrystals and their plasma polymerization into flexible films», *Adv. Mater.*, vol. 18, n.º 16, pp. 2189-2194, 2006.
- [144] J. Huang, H. Zhang, X. Zhou, y X. Zhong, «Dimensionality-dependent performance of nanostructured bismuth sulfide in photodegradation of organic dyes», *Mater. Chem. Phys.*, vol. 138, n.º 2-3, pp. 755-761, 2013.
- [145] H. H. Huang *et al.*, «Synthesis and characterization of Bi₂S₃ composite nanoparticles with high X-ray absorption», *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, n.º 10, pp. 3800-3804, 2013.
- [146] S. K. Han, C. Gu, M. Gong, y S. H. Yu, «A Trialkylphosphine-driven chemical transformation route to Ag- and Bi-based chalcogenides», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, n.º 16, pp. 5390-5396, 2015.
- [147] G. Konstantatos, L. Levina, J. Tang, y E. H. Sargent, «Sensitive Solution-Processed Bi₂S₃ Nanocrystalline Photodetectors», *Nano Lett.*, vol. 8, n.º 11, pp. 4002-4006, 2008.
- [148] V. Calzia *et al.*, «Atomistic Modeling of Morphology and Electronic Properties of Colloidal Ultrathin Bi₂S₃ Nanowires», *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, n.º 29, pp. 16913-16919, 2015.
- [149] M. H. Yao *et al.*, «Multifunctional Bi₂S₃/PLGA nanocapsule for combined HIFU/radiation therapy», *Biomaterials*, vol. 35, n.º 28, pp. 8197-8205, 2014.
- [150] S. Mourdikoudis y L. M. Liz-Marzán, «Oleylamine in nanoparticle synthesis», *Chem. Mater.*, vol. 25, n.º 9, pp. 1465-1476, 2013.
- [151] L. Zhang, R. He, y H. C. Gu, «Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 253, n.º 5, pp. 2611-2617, 2006.
- [152] M. Klokkenburg, J. Hilhorst, y B. H. Erne, «Surface analysis of magnetite nanoparticles in cyclohexane solutions of oleic acid and oleylamine», *Vib. Spectrosc.*, vol. 43, n.º 1, pp. 243-248, 2007.
- [153] R. A. Harris, P. M. Shumbula, y H. Van Der Walt, «Analysis of the interaction of surfactants oleic acid and oleylamine with iron oxide nanoparticles through molecular mechanics modeling», *Langmuir*, vol. 31, n.º 13, pp. 3934-3943, 2015.
- [154] J. Liu, H. Yu, Z. Wu, W. Wang, J. Peng, y Y. Cao, «Size-tunable near-infrared PbS nanoparticles synthesized from lead carboxylate and sulfur with oleylamine as

- stabilizer», *Nanotechnology*, vol. 19, n.º 34, 2008.
- [155] K. M. Koczkur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, y S. E. Skrabalak, «Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis», *Dalt. Trans.*, vol. 44, pp. 17883-17905, 2015.
- [156] A. N. Kuskov *et al.*, «Self-assembled amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for hydrophobic drugs: Stability aspects», *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 135, n.º 1, pp. 1-12, 2018.
- [157] Q. Zou, F. Hou, H. Wang, Y. Liao, Q. Wang, y Y. Yang, «Microfluidic one-step preparation of alginate microspheres encapsulated with in situ-formed bismuth sulfide nanoparticles and their photothermal effect», *Eur. Polym. J.*, vol. 115, n.º March, pp. 282-289, 2019.
- [158] A. Kahru y H. C. Dubourguier, «From ecotoxicology to nanoecotoxicology», *Toxicology*, vol. 269, n.º 2-3, pp. 105-119, 2010.
- [159] Gonçalo Vale, K. Mehennaouic, S. Cambierc, G. Libralatod, S. Jominie, y R. F. Domingosa, «Manufactured nanoparticles in the aquatic environment – Biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview», *Aquat. Toxicol.*, vol. 170, pp. 162-174, 2015.
- [160] R. D. Handy, R. Owen, y E. Valsami-Jones, «The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs», *Ecotoxicology*, vol. 17, n.º 5, pp. 315-325, 2008.
- [161] S. B. Lovern, J. R. Strickler, y R. Klaper, «Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C 60HxC70Hx)», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, n.º 12, pp. 4465-4470, 2007.
- [162] J. P. Souza, F. P. Venturini, F. Santos, y V. Zucolotto, «Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide», *Chemosphere*, vol. 190, pp. 218-224, 2018.
- [163] S. Rehse, W. Kloas, y C. Zarfl, «Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*», *Chemosphere*, vol. 153, pp. 91-99, 2016.