



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS UAP

**FOTOACTIVACIÓN DEL ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO MEDIANTE
NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE CADMIO Y PEROXIDASA DE
RÁBANO CONFINADOS EN SBA-15: MONITOREO POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
FARMACIA

PRESENTA: GABRIEL SALAS GORDIANO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ.

ASESOR INTERNO:

DR. JOSÉ LUIS GARATE MORALES.

PUEBLA PUE.

FEBRERO 2015

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
CAPITULO 1	3
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 2	7
ANTECEDENTES.....	7
2.1 Nanopartículas semiconductoras.....	7
2.2 Semiconductor de sulfuro de cadmio	9
2.3 Enzimas	12
2.4 Peroxidasas.....	13
2.5 Activación Enzimática de profármacos.....	21
2.6 El ácido 3-Indolacético.....	31
2.7 Materiales mesoporosos y la inmovilización de enzimas.....	31
2.8 El potencial del Ácido 3-indolacético en su empleo como profármaco.....	35
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS	46
Objetivo General	46
Objetivos Particulares	46
CAPITULO 3	47
METODOLOGÍA	47
3.1 Reactivos	47
3.2 Metodología Experimental.....	48
3.2.1 Síntesis de nP-CdS	48
3.2.2 Caracterización de las nanopartículas	49
3.2.3 Actividad de las nP-CdS en solución	49
3.2.4 Actividad de la HRP en solución contra AIA	50
3.2.5 Modificación del material SBA-15	50
3.2.6 Inmovilización de la enzima HRP en el material SBA-15 modificado.....	51
3.2.7 Inmovilización de las nanopartículas de sulfuro de cadmio en el sistema SBA-15-HRP.....	51
3.2.8 Actividad del sistema híbrido de SBA-15-nP-CdS-HRP	52

3.2.9 Actividad del sistema SBA-15- nP-CdS	52
3.2.10 Pruebas de viabilidad celular.....	52
3.2.10.1 Cultivo celular	52
3.2.10.2 Estudio de viabilidad /proliferación celular con el reactivo WST-1	53
3.2.11 Obtención e identificación de los productos de la oxidación del AIA	56
3.3 Instrumentación analítica	57
CAPITULO 4	58
RESULTADOS	58
4.1 Síntesis de nP-CdS	58
4.2 Caracterización de las nanopartículas	58
4.2.1 Espectroscopía UV-Vis	58
4.2.2 Espectroscopia de fluorescencia.....	60
4.3 Actividad de las nP-CdS en solución	61
4.3.1 Determinación de las constantes cinéticas del sistema empleando HRP en solución y otras peroxidases contra AIA	63
4.4 Modificación del material mesoporoso SBA-15	70
4.5 Inmovilización de la enzima HRP en el material SBA-15NH ₂	74
4.6 Inmovilización de las nanopartículas en el material mesoporoso (sistema SBA-15-HRP)	75
4.7 Actividad del sistema híbrido de SBA-15-nP-CdS-HRP	76
4.8 Actividad del sistema SBA-15-nP-CdS	79
4.9 Productos de la oxidación del AIA empleando H ₂ O ₂ nP-CdS, identificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	81
4.10 Pruebas de viabilidad celular.....	84
CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Crecimiento de nanopartículas de CdS por el método de micelas inversas.</i>	9
<i>Figura 2. Estructuras del CdS: a. Fase cubica. b. Fase hexagonal.</i>	9
<i>Figura 3. Mecanismo de la generación de especies reactivas de oxígeno mediante la irradiación con luz ultravioleta, empleando nanopartículas de sulfuro de cadmio.</i>	10
<i>Figura 4. Monooxigenación del ácido mirístico (R= (CH₂)₁₀(CH₃)) usando C-P450/QDs.</i>	11
<i>Figura 5. Ciclo catalítico de las peroxidasas.</i>	15
<i>Figura 6. Algunas reacciones catalizadas por peroxidasas.</i>	16
<i>Figura 7. Estructura tridimensional del Citocromo C peroxidasa.</i>	17
<i>Figura 8. Estructura molecular de la microperoxidasa-11.</i>	19
<i>Figura 9. Estructura tridimensional de la enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo Caldariomyces fumago.</i>	20
<i>Figura 10. Representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos X de la peroxidasa de rábano picante. El grupo hemo (en color rojo) está situado entre los dominios distales y proximales, que contienen cada uno un átomo de calcio (mostrado como esferas azules).</i>	20
<i>Figura 11. Concepto esquemático de un profármaco.</i>	21
<i>Figura 12. Razones del fracaso en el desarrollo de un fármaco.</i>	22
<i>Figura 13. Concepto esquemático de un profármaco unido a un transportador.</i>	24
<i>Figura 14. Activación de omeprazol en el medio ácido del estómago.</i>	25
<i>Figura 15. Bioconversión de capecitabina a 5-FU.</i>	27

Figura 16. Estructura del ácido 3-Indolacético.	31
Figura 17. Imágenes (Ay B) de microscopia de transmisión electrónica del material SBA-15.	35
Figura 18. Idealización del funcionamiento del sistema del nanofotobiocatalizador inmovilizado en un material mesoporoso, a la izquierda se encuentra inmovilizada una nanopartícula semiconductor que provee de especies reactivas de oxígeno (ROS) a una enzima tipo peroxidasa que se encuentra inmovilizada al material para activar su acción catalítica.....	35
Figura 19. Principales vías implicadas en la reacción de activación oxidativa de AIA (IAA por sus siglas en inglés) a diversas especies tóxicas empleando a la HRP (Folkes y Wardman, 2001).	36
Figura 20. Fracción superviviente de células V79 tratadas con 0.1 mM 1-metil-IAA y 1.2 mg/ ml de HRP en solución salina equilibrada de Hanks libre rojo de fenol. Los valores son medias 6 SEM de 3 experimentos (Folkes et al, 1999).	38
Figura 21. Fracciones sobrevivientes de células V79, incubaciones 2-hr con derivados de indol 100 mM y 1.2 mg / mL de HRP en salina equilibrada de Hanks solución, en comparación con las constantes de velocidad para la reacción con 0.5 mM HRP compuesto I a pH 7. (a) IAA, (b) 1 metil-IAA, (c) 5-benciloxi-IAA, (d) 5-metoxi-IAA, (e) 2-metil-IAA, (f) 2-metil-5-metoxi-IAA, y (g) 2 metil-5,6-dimetoxi-IAA. Los valores son medias 6 SEM de 3 experimentos (Folkes et al, 1999).....	38
Figura 22. Citotoxicidad del AIA / HRP en células de carcinoma de vejiga urinaria humanos TCCSUP, después de la privación de suero, células TCCSUP fueron tratados con 1 mM de IAA en el ausencia y en presencia de HRP (1,2 µg / ml). Microfotografías de contraste de fase se tomaron a utilizando una cámara de video digital (Jeong et al, 2010).	39
Figura 23. Las células fueron tratadas con 0.5 o 1 mM de AIA en la ausencia o presencia de HRP (1.2 µg / ml). Después de 24 horas, se realizó un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).	40
Figura 24. Las células fueron tratadas con 1 mM de AIA en la ausencia o presencia de HRP (1,2 µg / mL o 2,4 µg / mL). Después de 24 horas, se realizó un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).	40
Figura 25. Las células fueron tratadas con AIA (1 mM) y HRP (1,2 µg / mL). A la hora indicada en los puntos después del tratamiento, la viabilidad celular se midió mediante un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).	40
Figura 26. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por anticuerpos (ADEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).	42

Figura 27. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por polímero (PDEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).....	44
Figura 28. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por genes (GDEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).....	45
Figura 29. Mecanismo general de la reacción para identificar células viables empleando el ensayo WST-1.	54
Figura 30. Sistemas: a) SBA-15-nP-CdS, b) SBA-15-nP-CdS-HRP y c) SBA-15NH ₂ , bajo irradiación con luz ultravioleta (365 nm).	55
Figura 31. A la Izquierda se muestra el equipo Thermo Scientific Multiskan FC: fotómetro de microplacas, a la derecha soporte para colocar las placas de 96 pocillos para las lecturas en el equipo.	56
Figura 32. a) Precitado obtenido al final de la síntesis de nP-CdS por el método de microemulsiones inversas y b) Solución de nanopartículas de sulfuro de cadmio obtenida a partir de la solvatación con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 60 mM.	58
Figura 33. Espectro UV-Vis de las nP-CdS.....	59
Figura 34. Espectro de emisión de las nanopartículas de CdS.....	61
Figura 35. Conversión de Ampliflu™ Red en resorufina por la HRP.....	62
Figura 36. Actividad catalítica del sistema nP-CdS-Enzima-Sustrato.....	62
Figura 37. Cinética por intervalos de conversión del sustrato (Ampliflu™ Red) con nP-CdS en solución.	63
Figura 38. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato para el sistema, empleando H ₂ O ₂	65
Figura 39. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato para el sistema, empleando nP-CdS.	66
Figura 40. Ilustración esquemática de la funcionalización del SBA-15 (Z. Wang et al 2012.).	70

Figura 41. Espectro FT-IR del material mesoporoso SBA-15.....	71
Figura 42. Espectro FT-IR del material mesoporoso SBA-15 silanizado con APTES.	72
Figura 43. A la derecha se muestra al SBA-15-NH ₂ en coloración morada indicio de la confirmación de la presencia de grupos –NH ₂ . A la izquierda se muestra al SBA-15N sin presencia de coloración antes de agregar la ninhidrina.	73
Figura 44. Antes y después, de la reacción con ninhidrina, 1) SBA-15-NH ₂ , 2) SBA-15-NH ₂ secado bajo atmosfera de nitrógeno, 3) SBA-15-NH ₂ secado a 100° C, 4) SBA-15-NH ₂ después de una hora de reacción, 5) SBA-15 sin condiciones de reacción, 7) SBA-15 control sin funcionalizar, 8) APTES.	74
Figura 45. A la derecha se muestra el material modificado con APTES. A la izquierda, se muestra el material después del proceso de inmovilización de nP-CdS.	75
Figura 46. Espectro de FT-IR del material mesoporoso con nP-CdS inmovilizadas.	75
Figura 47. Cinética de conversión del sustrato (Ampliflu™ Red) con el sistema híbrido SBA-15-nP-CdS-HRP de manera discontinua.	77
Figura 48. Espectro de emisión del sustrato antes de agregar el sistema SBA-15-nP-CdS-HRP (línea azul) y disminución de la señal de intensidad después de agregar el sistema híbrido (línea roja).	78
Figura 49. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato (AIA) para el sistema pre irradiado SBA-15-nP-CdS.	80
Figura 50. Cromatograma obtenido tras la inyección de la mezcla de los productos de reacción del AIA, empleando a la HRP y H ₂ O ₂ , en el cual se localizan cinco picos de posibles productos de reacción.	82
Figura 51. Espectros de masas obtenidos tras el análisis de las fracciones 2 y 3 de la LC, de la muestra M1. Para la fracción 2 se determino que la sustancia obtenida es el 3-indolaldehido y para el caso de la fracción 3 se determino que la sustancia obtenida es la 4-hidroxiquinolona.	83

Figura 52. Controles de cada uno de los componentes de los diferentes sistemas, a diferentes concentraciones empleadas durante las pruebas a 24 horas (A) y 48 horas (B) después a su exposición a estos..... 84

Figura 53. Actividad metabólica relativa de la línea celular MCF-7, después de 24 horas después del tratamiento nP-CdS activadas por luz UV. 86

Figura 54. Actividad metabólica relativa de la línea celular MCF-7, después de 48 horas después del tratamiento con nP-CdS activadas por luz UV. 86

Figura 55. Resultados de viabilidad de las células MCF-7 después de 24 horas empleando a los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP, SBA-15-nP-CdS y los Productos de Oxidación (PR) del AIA..... 87

Figura 56. Resultados de viabilidad de las células MCF-7 después de 48 horas empleando a los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP, SBA-15-nP-CdS y los Productos de Oxidación (PR) del AIA..... 87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.....	12
Tabla 2. Clasificación de peroxidasas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.	14
Tabla 3. Biotransformaciones con citocromo c (Vázquez-Duhalt, 1999).....	18
Tabla 4. Problemas que limitan la utilización de un fármaco que pueden resolverse con el diseño de profármacos.....	23
Tabla 5. Mezclas de los componentes empleados para las pruebas in vitro contra células MCF-7 de cáncer de mama.	55
Tabla 6. Parámetros cinéticos de reacción para obtenidos para sistemas H_2O_2 y nP-CdS en solución.	66
Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos para las 5 diferentes peroxidasas en la oxidación biocatalítica del ácido 3-indolacético.....	68
Tabla 8. Valores de eficiencia catalítica para MP-11, CYP c, SbP y CPO, y su comparación respecto del valor obtenido (0.083) para la HRP, empleando H_2O_2	68
Tabla 9. Parámetros cinéticos de reacción obtenidos para los sistemas nP-CdS en solución y SBA-15-nP-CdS.....	80
Tabla 10. Parámetros empleados para la detección de las fracciones obtenidas de la cromatografía líquida, para su detccción en el espectrómetro de masas.....	81
Tabla 11. Sustancias identificadas tras la oxidación del AIA empleando peroxidasas.....	82
Tabla 12. Posible masa de los espectros de ionización positiva ($[M+H]^+$) de las sustancias reportadas tras la oxidación del AIA empleando peroxidasas (véase tabla x).	83

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
HRP	Peroxidasa de rábano picante
QDs	Quantum Dots
AIA	Ácido 3-indolacético
nP-CdS	Nanopartículas de sulfuro de cadmio
MCF-7	Línea de celular de cáncer de mama
MP-11	Microperoxidasa 11
CdS	Sulfuro de cadmio
SBA-15	Santa Barba Amorphus
AOT	Diocil sulfosuccinato de sodio
CYP c	Citocromo c peroxidasa
CPO	Cloperoxidasa
APTES	3-aminopropil trietoxisilano
Cd(ClO₄)₂	Perclorato de cadmio
Na₂S	Sulfuro de sodio
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier
NH₂	Grupo amino
UV-Vis	Ultravioleta- visible
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de las Salud
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
SSA	Secretaria de Salud
NOM	Norma Oficial Mexicana
SPPS	Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
RHNM	Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas
IARC	International Agency for Research on Cancer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MMO	Materiales Mesoporosos Ordenados
MCM	Mobile Crystalline Material
CEA	antígeno carcinoembriónico
ADEPT	Antibody-directed enzyme prodrug therapy
PDEPT	polymer-directed enzyme prodrug therapy
GDEPT	Gene-directed enzyme prodrug therapy
NEA	Aminoacidos no esenciales
MEM	Modified Eagle's Medium
FBS	Suero Bovino Fetal
SbP	Peroxidasa de Soya
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
PR	Productos de reacción

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la obtención de un nanomaterial compuesto de peroxidasa de rábano blanco (HRP), ácido 3-indolacético (AIA) y nanopartículas de sulfuro de cadmio (nP-CdS) catalíticamente activas mediante luz, empleando al material mesoporoso SBA-15 como soporte de todos estos componentes, y evaluar al sistema completo *in vitro*, contra células MCF-7 de cáncer de mama, para tratar de proponer así una nueva variante de la terapia fotodinámica contra este tipo de células cancerosas. Se sintetizaron nanopartículas de sulfuro de cadmio por el método de micelas inversas, obteniendo nP-CdS de un tamaño de 5.36 nm, las cuales resultaron ser fotoactivas con luz ultravioleta (365 nm). Se determinaron parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , V_{max}/K_m) de la conversión del AIA empleando H_2O_2 y nP-CdS como fuentes donadoras de especies reactivas de oxígeno para la activación de la actividad catalítica de la HRP en dicha reacción, los resultados mostraron que la eficiencia catalítica del sistema empleando nP-CdS en solución ($0.074 \mu M^{-1} min^{-1}$) y la obtenida empleando H_2O_2 ($0.083 \mu M^{-1} min^{-1}$) resulta ser aproximadamente la misma. También se evaluaron los mismos parámetros cinéticos pero esta vez empleando en la reacción nP-CdS en solución y al sistema SBA-15-nP-CdS, mostrando que, empleando nP-CdS en solución la eficiencia catalítica del sistema ($0.074 [\mu M^{-1} min^{-1}]$) resulta ser 1.5 veces mejor que mediante el empleo del sistema SBA-15-nP-CdS ($0.048 [\mu M^{-1} min^{-1}]$). Se contó con la oportunidad de poder evaluar algunas otras peroxidases para la conversión del AIA, encontrando que la microperoxidasa-11 (MP-11) tiene una eficiencia catalítica 200 veces mayor ($16.94 [\mu M^{-1} min^{-1}]$) respecto al de la HRP empleando al H_2O_2 como agente oxidante, sin embargo, resultó que la MP-11 no puede catalizar la reacción de conversión del AIA empleando nP-CdS lo cual la descarta como una posible candidata a los fines particulares de este trabajo. En los resultados de las pruebas de viabilidad celular, se encontró que los componentes del sistema (HRP, AIA, nP-CdS, SBA-15) por si solos a diferentes concentraciones, no causan efecto citotóxico alguno contra las MCF-7, pero los experimentos en los que se realizaron las mezclas de los componentes del sistema catalítico a diversas concentraciones de AIA, HRP y nP-CdS se encontró que empleando una concentración de $100 \mu M$ de AIA, $0.7 \mu M$ de HRP y $7 \mu M$ de nP-CdS se produce un efecto citotóxico que se ve reflejado en la disminución de más del 90% de la viabilidad de las células sembradas tras 48 horas después de la terapia (con y sin

el uso del luz UV), también se encontró que mediante el empleo de la mezcla de los productos de reacción obtenidos por la conversión del AIA empleando nP-CdS la muerte de las células cancerosas fue de aproximadamente un 60% de ellas empleando una concentración de la mezcla señalada de 100 μ M. Con respecto al empleo de los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP y SBA-15-nP-CdS en la terapia, los cuales fueron pre-irradiados agregándoles una concentración 100 μ M de AIA, redujeron la actividad metabólica al 100 % de las células MCF-7 a las 24 horas de iniciado el tratamiento. Se logró la identificación de dos subproductos de reacción empleando nP-CdS mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas los cuales son: 3-indolaldehido y la 4-hidroxiquinolona, entre otros que aún no han podido ser identificados claramente.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es el área del conocimiento que trata acerca del saber y el control de la materia en dimensiones cercanas al intervalo de 1 a 100 nanómetros; además, es un área floreciente y vigorosa en varios campos de aplicación, como la medicina, la electrónica, y los materiales (Giljohannand *et al*, 2009). En esta escala la materia muestra características y aplicaciones nuevas a las ya tradicionales o conocidas. En la nanotecnología se comprende la representación gráfica, la medición, el modelado y la manipulación de la materia en una escala nanométrica; es decir, átomo por átomo. Una de sus metas es el desarrollo de componentes con funciones individuales que se integren en una arquitectura que cumpla funciones múltiples, máquinas biomoleculares revolucionarias que se puedan ensamblar para formar nanodispositivos con múltiples grados de libertad; que sean capaces de, por ejemplo, reconocer células cancerígenas, de diagnosticar las causas del cáncer, de suministrar fármacos a un órgano o tejido específico, de reportar la localización de un tumor y de reportar los resultados de una terapia (muerte de células cancerosas) (Folkes y Wardman, 2001; Folkes *et al*, 1999; Greco *et al*, 2001). Estos sistemas serían capaces de transferir información desde el nivel nano hacia el macromundo y serían también capaces de viajar en un nanoambiente. De estos sistemas se espera que sean muy eficientes, económicos en una producción masiva, que sean controlables y capaces de trabajar con poca supervisión (Alivisatos *et al*, 2005; Elizondo, 2005; Michalet *et al*, 2005).

En nanotecnología, los puntos cuánticos (QDs), son nanopartículas semiconductoras metaloide cristalinas de aproximadamente 2 - 100 nm, que contienen alrededor de 200-10.000 átomos (Juzenas *et al*, 2008; Smith *et al*, 2008). Debido a su pequeño tamaño, los puntos cuánticos tienen propiedades ópticas y electrónicas únicas, las cuales pueden modularse por medio del tamaño, que a su vez depende de las condiciones de síntesis (Chan *et al*, 2002). Debido a estas propiedades, los puntos cuánticos tienen el potencial de revolucionar imágenes biológicas a nivel celular, la detección y tratamiento del cáncer, radio y quimioterapia, agentes y administración dirigida de fármacos sensibilizantes (Alivisatos, 2004; Hardman, 2006).

El potencial de los puntos cuánticos para aplicaciones biomédicas se realizó recientemente, a pesar de su desarrollo en la electrónica y la óptica desde hace dos décadas. Sin embargo, su aplicación se ha ampliado notablemente en los últimos años como por ejemplo en sondas de alta resolución para producir imágenes moleculares de componentes celulares y para el seguimiento de las actividades y movimientos de una célula dentro del cuerpo (Alivisatos *et al*, 2005; Michalet *et al*, 2005) además las QDs pueden someterse a la fotoactivación y tienen potenciales aplicaciones en terapias fotodinámicas y como agentes radiosensibilizadores para tratamientos contra el cáncer (Anas *et al*, 2008).

Las nanopartículas de sulfuro de cadmio son una clase especial de materiales semiconductores, que han despertado gran interés en diversos campos de estudio; de acuerdo con los informes publicados, las nanopartículas de CdS generan especies reactivas de oxígeno que pueden ser potencialmente útiles para terapia fotodinámica (Cho *et al*, 2007; Green *et al*, 2005; Ipe *et al*, 2005; Michalet *et al*, 2005).

Un área particularmente interesante es la aplicación de las QDs como catalizadores en reacciones de interés médico o ambiental. Los catalizadores son sustancias que reducen la energía necesaria para llevar a cabo la transformación de los reactivos en productos, elevando la velocidad de la reacción química, al contrario de los catalizadores negativos (normalmente llamados "inhibidores") los cuales reducen la velocidad de la reacción química (Tinoco *et al*, 2007). A diferencia de la práctica común aplicada en catálisis, la nanocatálisis se distingue por sus propiedades únicas y no escalables que se originan por las dimensiones reducidas de los agregados catalíticamente activos. En consecuencia, el objetivo central de la nanocatálisis es la promoción, valoración, dirección y control de las reacciones químicas, cambiando el tamaño, la dimensión, composición química, morfología o bien, el estado de carga del catalizador.

El diseño de nanocatalizadores más eficientes, selectivos y específicos conllevaría un ahorro sustancial en los costos de producción para la industria, por lo que resulta muy importante comprender los principios que rigen el comportamiento de estas sustancias (Elizondo, 2005).

Dentro de los catalizadores, los de origen biológico, las enzimas, representan un área de gran potencial dada sus características de selectividad, especificidad y condiciones suaves de reacción. La unión entre enzimas y QDs ha resultado en catalizadores interesantes debido a la capacidad de catalizar reacciones activadas y moduladas por luz, por ejemplo, la peroxidasa de rábano blanco (horseradish peroxidase o HRP) (Gandubert *et al*, 2008, Greco *et al*, 2001; Xiaodan *et al*, 2014) . Las peroxidasas son enzimas con muchas aplicaciones en la medicina, industria ambiental, clínica, ambiental y de síntesis orgánica. La hibridación de la peroxidasa con las nanopartículas de CdS produce un nanobiocatalizador activado por luz.

Esta activación de la enzima por las nanopartículas de CdS se explica de la siguiente manera. La irradiación de las nanopartículas de CdS produce radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}); estas especies reactivas oxidan a la enzima HRP, llevándola a un estado de oxidación que tiene la capacidad de catalizar la oxidación selectiva de algunos sustratos aromáticos. Importantemente, la reacción puede ser regulada por el apagado y encendido de una fuente de irradiación de luz como es el caso de la luz UV, produciendo entonces un biocatalizador cuya actividad catalítica puede ser detenida o reactivada de acuerdo a necesidades específicas (Gandubert *et al*, 2008); esto es una ventaja ya que la enzima de manera natural utiliza peróxido de hidrógeno como agente oxidante, lo que limita su aplicación en el área médica dado la toxicidad del peróxido. La capacidad de activar y controlar con luz la cantidad de agentes oxidantes, y por ende, las reacciones catalizadas por la peroxidasa, sitúa a este nanobiocatalizador con potencial importante en el sector médico. Por ejemplo, en estudios aun en investigación, la aplicación de la prodroga compuesta de peroxidasa de rábano y el ácido indolacético puede ser aplicada para el tratamiento de células cancerígenas humanas, lográndose reducir en hasta en un 90% la viabilidad celular en estudios de laboratorio (Folkes y Wardman, 2001; Greco *et al*, 2001).

Sin embargo, al medir la estabilidad del sistema se encontró que la enzima es dañada por las exposiciones prolongadas a la luz, perdiendo el 50% de su actividad enzimática después de 30 minutos de exposición (Alivisatos *et al*, 2005). La irradiación continua de luz provoca también un incremento en la temperatura de medio de aproximadamente 6 °C, afectando con esto también el funcionamiento biocatalítico del sistema. En conjunto, la

exposición a la luz y la temperatura disminuyen importantemente la actividad catalítica del nanohíbrido, hasta un 60% después de una hora de operación. Esta es la mayor desventaja del nanofotobiocatalizador, la cual se ha logrado sortear mediante la inmovilización de las biomoléculas en un medio insoluble en el medio de reacción, generalmente una estructura sólida, como lo son los materiales mesoporosos del tipo SBA-15 en los cuales esta técnica ha brindado buen resultado.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Nanopartículas semiconductoras

Actualmente las nanopartículas semiconductoras ocupan el centro de interés científico y tecnológico debido a la naturaleza cuántica que gobierna y explica los fenómenos ópticos y de transporte en estos nanomateriales. Las nanopartículas semiconductoras, también llamados puntos cuánticos (QD's quantum dots, por sus siglas en inglés), o átomos artificiales son nanoestructuras con propiedades entre el régimen molecular y de estado sólido, sus propiedades son únicas y son controladas por su forma y tamaño (Rajendran *et al*, 2009; Gandubert *et al*, 2008).

Todas estas propiedades de las nanopartículas semiconductoras se han dirigido para la aplicación en diversos campos del área biológica, incluyendo marcadores celulares (Bailey *et al*, 2004), biosensores y también pueden ser usadas en investigación biomédica. Con el avance y desarrollo en nanotecnología puede ser posible la construcción de nuevos dispositivos basados en nanopartículas semiconductoras para el diagnóstico, la exploración y detección por ejemplo de alteraciones genéticas causadas por alguna enfermedad, nanopartículas sensoras capaces de penetrar en células cancerígenas y liberar enzimas que inicien su apoptosis o secuencia auto-destructiva.

La nanotecnología también ha proporcionado medios para diseñar sistemas de liberación de fármacos que puedan transportar drogas más efectivamente y mejorar la liberación del fármaco al objetivo elegido. Los sistemas de liberación desarrollados con esta nueva tecnología han utilizado nanoestructuras tales como nanopartículas semiconductoras. Las ventajas de estos nanosistemas son la disponibilidad de una gran área de superficie y la posibilidad de diseñar nanosistemas multifuncionales. Estos nanosistemas complejos en tamaño están formados por al menos dos componentes de los cuales uno es un principio activo, desarrollado para tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades (Deshpande, 1996; Folkes y Wardman, 2001; Folkes *et al*, 1999; Greco *et al*, 2001).

Los métodos para la síntesis de nanopartículas semiconductoras son muy diversos, existen actualmente más de 60 técnicas para su obtención, algunas de estas técnicas son muy

sofisticadas y requieren de condiciones de alto vacío además del uso de materiales de alta pureza. También se pueden sintetizar mediante dispersiones coloidales, donde los precursores del material se encuentran reaccionando en presencia de un agente estabilizador que restringe el crecimiento de la partícula, manteniéndola en un rango de tamaño donde los efectos cuánticos son predominantes, sin embargo la síntesis requiere de condiciones de alta temperatura y el manejo de materiales en ambientes inertes (Gandubert *et al*, 2008; Ipe *et al*, 2005).

Dentro de las muchas técnicas ya reportadas, se encuentra la técnica de microemulsiones inversas. Las microemulsiones agua en aceite (w/o) o inversas son dispersiones termodinámicamente estables y ópticamente isotrópicas de nanogotas de agua estabilizadas por uno o varios tensioactivos en una fase oleica externa (Qi *et al*, 1996). La caracterización de las microemulsiones es de suma importancia cuando éstas son utilizadas como medio de síntesis de nanopartículas, ya que en la mayoría de los casos, la forma y tamaño de las micelas determina las características de las nanopartículas sintetizadas dentro de ellas (Li *et al*, 2000; Pileni *et al*, 2001). Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos las formas de las micelas y las nanopartículas no son similares (Li *et al*, 2000). El factor más importante que genera esta diferencia es la solubilización de los reactantes dentro de las micelas (Pileni *et al*, 2001), y a que la adición de iones puede provocar un cambio drástico en la morfología de las micelas, por lo que la reacción química no se lleva a cabo en la forma deseada. Dos rutas se han establecido para superar estos inconvenientes, I) evitar que la reacción química dentro de las micelas sea completa y II) utilizar tensioactivos con grupos funcionales específicos. En este último punto han existido grandes avances en el mejoramiento del método de síntesis. Numerosos estudios se han realizado sobre la obtención de tensioactivos en cuya estructura se incorpora uno de los reactantes necesarios para la síntesis, y además estos han sido utilizados para estabilizar la formación de micelas inversas (Gandubert *et al*, 2008; Rajendran *et al*, 2009); un ejemplo importante es el tensioactivo aniónico bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), el cual es empleado en la síntesis de nP-CdS del presente trabajo el cual es empleado para la formación de las micelas inversas (figura 1).

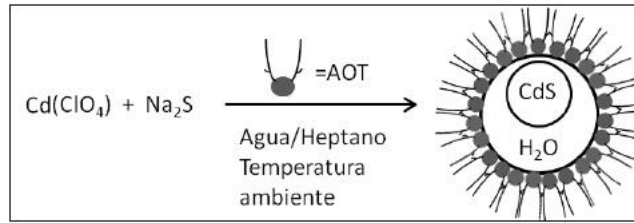


Figura 1. Crecimiento de nanopartículas de CdS por el método de micelas inversas.

2.2 Semiconductor de sulfuro de cadmio

En los últimos años se ha revelado un especial interés en semiconductores a escala nanométrica, en especial en los sulfuros de los metales de transición, semiconductores que adquieren aplicación como sensores, filtros ópticos, celdas solares, sistemas fotocatalíticos, entre otras (Ni *et al*, 2002; Vijay *et al*, 2002). Los nanocristales de los semiconductores están siendo estudiados extensivamente debido a sus propiedades ópticas, las cuales son altamente dependientes del tamaño y morfología del cristal, usando estos nuevos conocimientos, se pretende realizar la síntesis de nanopartículas semiconductoras de CdS y emplearlas como fuentes potenciales donadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS), para entender este mecanismo debemos tomar en cuenta lo siguiente, el material semiconductor CdS, puede presentar dos estructuras cristalinas, una de ellas es una estructura cúbica y la otra es una estructura cristalina hexagonal (figura 2).

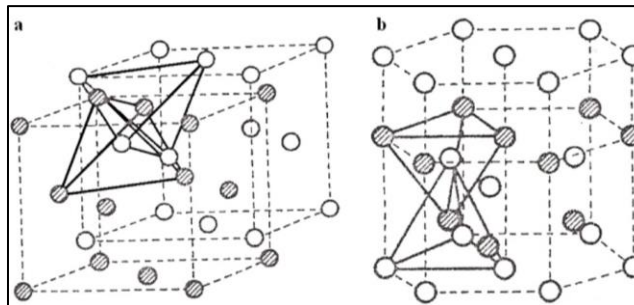


Figura 2. Estructuras del CdS: a. Fase cúbica. b. Fase hexagonal.

El material semiconductor de CdS se encuentra en el grupo II-VI de la tabla periódica y se forma mediante un enlace covalente por medio de la compartición de los electrones de valencia de cada átomo y posee una brecha de energía en condiciones estándar de 2.42 eV en la estructura cúbica (Cao *et al*, 2004). La energía de la brecha de energía en una nanopartícula semiconductor, la cual se define como la diferencia en energía entre el mínimo de la banda de conducción y el máximo de la banda de valencia E_g , es mayor que la

del semiconductor volumétrico E_g (bulk) (Rodríguez *et al*, 2008) (figura 3). Una vez entendido todo esto los pasos del mecanismo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Las nanopartículas son irradiadas con una fuente de luz, la cual proporciona la suficiente cantidad de energía que permita el paso del de un electrón a un nivel energético más alto que el de la brecha de conducción.
- El electrón excitado interviene en la reacción de fotoreducción del oxígeno presente en medios acuosos, lo cual lleva a la formación de radicales superóxido.

No obstante con lo señalado en la reacción de fotoreducción del oxígeno, también ocurre al mismo tiempo otra reacción, en la cual el agua presente en el medio sufre un proceso de fotooxidación, mediada por la energía liberada de la excitación de las nanopartículas, lo cual permite la obtención de radicales hidroxilo, este mecanismo fue estudiado por Stadtman (Stadtman, 1993) recolectando estudios sobre la oxidación de residuos de aminoácidos en péptidos y proteínas por radiólisis y las reacciones de radicales catalizadas por metales, el mecanismo completo puede ser explicado empleando una aproximación al mecanismo propuesto por Stadtman en 1993, el cual se muestra en la figura 3.

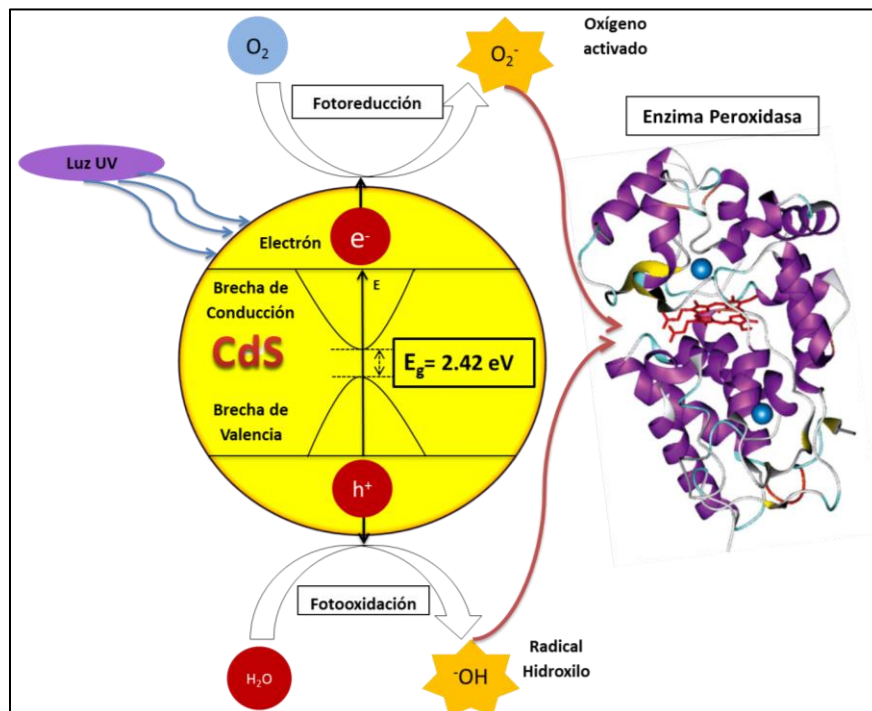


Figura 3. Mecanismo de la generación de especies reactivas de oxígeno mediante la irradiación con luz ultravioleta, empleando nanopartículas de sulfuro de cadmio.

Las nanopartículas de CdS tienen propiedades ópticas que no se observan normalmente en otra clase de materiales semiconductores. Dichas propiedades se modifican particularmente al disminuir el tamaño de partícula, además, éstas son diferenciadas cuando la estructura cristalina de la nanopartícula cambia (Lian, 2003; Vossmeier *et al*, 1994).

Los semiconductores representan una clase de bloques construidos a nanoescala y que han sido utilizados para construir estructuras electrónicas incluyendo los diodos emisores de luz, fotodetectores, láseres altamente eficientes y sistemas fotocatalíticos (Raimondi *et al*, 2005; Gratzel *et al*, 1983).

En la literatura, se pueden encontrar antecedentes de la conjugación de nanopartículas acopladas con enzimas para producir una nueva generación de materiales. En el año 2005 Ipe *et al*, presentó un innovador diseño de un fotocatalizador híbrido compuesto de nanopartículas de sulfuro de cadmio y enzima citocromo P450 capaz de catalizar reacciones regio selectivas mediante la fotoactivación de las QDs basado en el siguiente principio: la irradiación de nanocristales de CdS conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno en solución acuosa, a saber, radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxil ($\cdot OH$), estas especies activan a la enzima citocromo P450, la cual fue capaz de oxidar al ácido mirístico (figura 4).

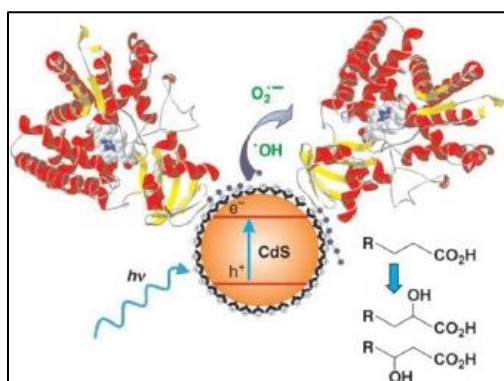


Figura 4. Monooxigenación del ácido mirístico ($R = (CH_2)_{10}(CH_3)$) usando C-P450/QDs

Tras la realización de este estudio se determinó la activación de la enzima citocromo P450 para llevar a cabo la reacción, sin embargo, no se realizaron ningún tipo de estudios de las propiedades cinéticas del fotobiocatalizador desarrollado, no obstante, el trabajo realizado

denota las ventajas sobre el control de las reacciones entre la fotoactivación de la enzima y la tradicional iniciación química con H_2O_2 , además de contar con la mejoría en la recuperación del catalizador en las reacciones de transformación involucradas. Dos años más tarde, Fruk y col. realizaron estudios sobre la activación inducida por luz de 3 diferentes peroxidases, a decir: el citocromo c peroxidasa, mioglobina y peroxidasa de rábano picante (HRP) (Fruk *et al*, 2007). El sustrato empleado en estas pruebas fue el Ampliflu™ Red, los resultados demostraron que las peroxidases mencionadas eran capaces de oxidar, en diferentes proporciones, al sustrato en presencia de nP-CdS y luz ultravioleta (365 nm). Y así se llegó a la conclusión de que la activación de la HRP con nP-CdS resultó ser 5% más eficiente que la reacción donde se empleaba H_2O_2 , y además, se demostró que la irradiación continua de la enzima HRP causaba su fotodegradación, lo que afectaba significativamente la actividad de la misma debido principalmente a la limitada fotoestabilidad que posee la HRP (Neves *et al*, 2007).

2.3 Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos de origen proteico (biocatalizadores) que presentan varias ventajas sobre sus parientes sintéticos: alta especificidad y selectividad y, en general, una mayor actividad en medios de reacción suaves.

Las propiedades de las enzimas se derivan de su estructura proteica, siendo la principal propiedad su capacidad catalítica. La capacidad catalítica de una enzima depende de su estructura nativa. Dicha configuración es el resultado de muchas fuerzas de interacción como puentes de hidrógeno, interacciones apolares y los enlaces iónicos. La clasificación de las enzimas se lleva a cabo teniendo en cuenta su acción catalítica específica. Se distinguen así 6 grandes grupos o clases (Doble *et al*, 2004) (Ver tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.

CLASE	TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLO
Ligasas	Síntesis	Ligasa X-Y
Isomerasas	Isomerización	Racemasas
Liasas	Reacciones de eliminación	Sustrato grupo liasa
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas
Transferasas	Transferencia de grupo	Transaldolasas
Óxido-reductasas	Oxidación/reducción	Peroxidasas

Además, la capacidad catalítica de las enzimas se debe en gran parte a la presencia de moléculas de naturaleza diferentes a los aminoácidos como metales, azúcares, grupos prostéticos, etc.

Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas como biocatalizadores es su alta especificidad por el sustrato. Existen tres tipos de especificidad (Bernhard S.A, 1968).

- a) **Especificidad absoluta:** Existen enzimas que sólo aceptan una molécula como sustrato, por ejemplo, la acetilcolinesterasa, que actúa sobre los ésteres de colina.
- b) **Especificidad de grupo:** Son enzimas que catalizan el mismo tipo de reacción con varios sustratos; pero que tienen en común un mismo grupo químico, el cuál es el directamente modificado en la reacción, por ejemplo, la esterasa, que actúa sobre los grupos éster.
- c) **Estereoespecificidad:** Está relacionada con el arreglo espacial de las moléculas de los sustratos (estereoisomería). Así, un gran número de enzimas son específicas para los isómeros ópticos L o D (especificidad óptica).

2.4 Peroxidasas

Las Peroxidasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos. Son las encargadas de catalizar la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (donadores de hidrógeno) empleando como uno de sus sustratos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este tipo de enzimas también participan en la biosíntesis de la pared celular por la polimerización del alcohol cinámico a lignina y el entrecruzamiento de proteínas estructurales.

Estas enzimas de óxido-reducción se pueden encontrar bajo la misma clasificación E.C.1.11.1.x, oxidoreductasa donador: peróxido de hidrógeno. En el catalogado realizado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular se ha incorporado a las reacciones catalizadas por peroxidasas: de E.C. 1.11.1.1 a 1.11.1.16 (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de peroxidasa según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

Número EC	Nombre recomendado	Abreviación
EC 1.11.1.1	Peroxidasa NADH	NadPrx
EC 1.11.1.2	Peroxidasa NADPH	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.3	Peroxidasa de ácidos grasos	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.11 (antes EC 1.11.1.4)	Triptófano 2,3-dioxigenasa	Ya no se considera como una peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo-c Peroxidasa	CcP, DiHCcP
EC 1.11.1.6	Catalasa	CAT
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	Hemo peroxidasa
EC 1.11.1.8	Yodo peroxidasa	TPO
EC 1.11.1.9	Glutación peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.10	Cloro peroxidasa	HaIPrx, HaINPrx, HaIVPrx
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato peroxidasa	APx
EC 1.11.1.12	Glutación hidroperóxido fosfolipídico peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.13	Manganeso Peroxidasa	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxiredoxina	1CysPrx, 2CysPrx, PrxII/V/PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	VP

La mayoría de las peroxidasa son hemoproteínas, que contienen un grupo prostético hemo unido fuertemente a la cadena polipeptídica. El hemo en las peroxidasa es un complejo de protoporfirina IX e iones ferrosos (Fe^{3+}). Las peroxidasa reaccionan vía radical libre empleando H_2O_2 como agente oxidante, el mecanismo de reacción de peroxidasa se puede describir en términos generales (Ortiz, 2010) como se muestra en la figura 5. El grupo hemo de la enzima reacciona primero con una molécula de peróxido de hidrógeno para producir el compuesto I. Este compuesto es un oxo-ferril (IV) – radical porfirina o un oxo-ferril (IV)–radical proteína, que están dos equivalentes de oxidación por arriba del estado férrico. Durante este paso de reacción, el peróxido de hidrógeno se reduce a agua, mientras que la enzima se oxida. Luego el compuesto I oxida al sustrato reducido (AH_2) para dar un radical sustrato ($AH\bullet$), y la enzima se reduce al compuesto II, que contiene un centro oxiferril coordinado a la porfirina. Usualmente, ambos compuestos, I y II, reaccionan con el mismo AH_2 . Por lo tanto, una vez que inicia la reacción entre el compuesto I y AH_2 , se produce el compuesto II que reacciona simultáneamente con una segunda molécula de AH_2 .

Como resultado, el compuesto II se reduce nuevamente al estado férrico que corresponde a la forma nativa de la enzima, con la oxidación acoplada de una segunda molécula de sustrato y producción de agua.

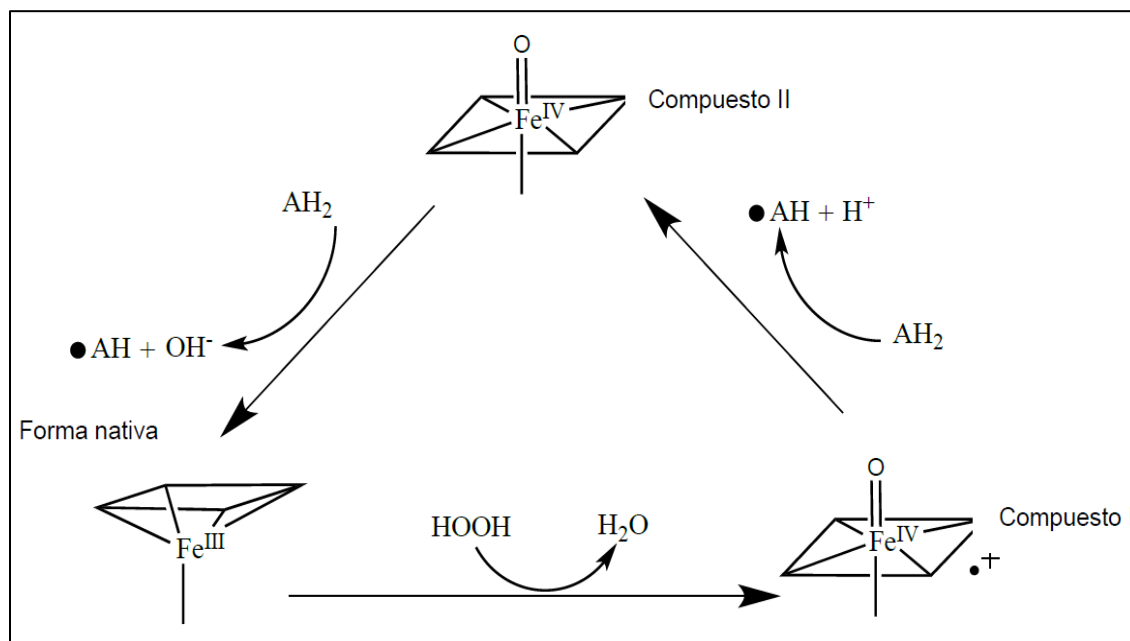
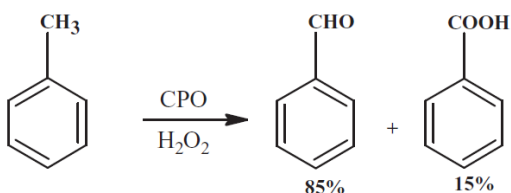


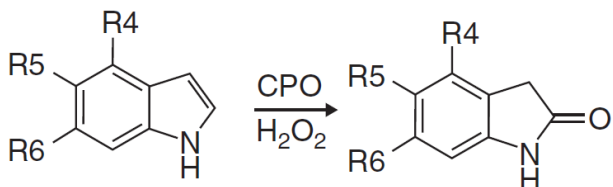
Figura 5. Ciclo catalítico de las peroxidasas.

A través de este mecanismo general, las peroxidasas catalizan varias reacciones de oxidación de interés (Casella *et al*, 2010) (ver figura 6). También catalizan las oxidaciones de contaminantes como el caso de los azo colorantes, plaguicidas, e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Husain *et al*, 2009; Torres *et al*, 2003). Además, las peroxidasas se han empleado con frecuencia en biosensores como un catalizador final para la oxidación de un sustrato colorimétrico y así, de una forma indirecta permiten cuantificar otro analito.

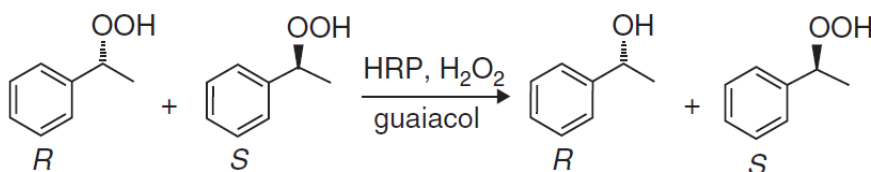
Oxidación de compuestos aromáticos.



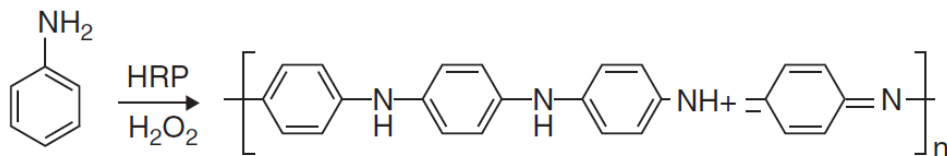
Oxidación de heteroátomos



Resolución cinética de hidroperóxidos de alquilo en mezclas racémicas.



Oxidación de aminas.



Oxidación de derivados naftil.

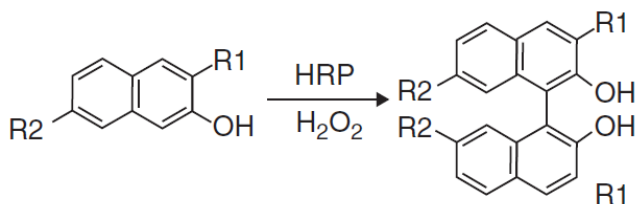


Figura 6. Algunas reacciones catalizadas por peroxidasas.

Aunque en el presente trabajo la peroxidasa de rábano picante es la enzima en la que se enfocó la investigación, se tuvo la oportunidad de poder trabajar con otras peroxidasas, las cuales se describen brevemente a continuación.

Citocromo c peroxidasa (CYP c). Es una proteína que se encuentra como un componente de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Su función biológica es la de transportar electrones entre los complejos membranales citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa. Sin embargo, esta proteína ha sido utilizada como catalizador biológico en diversas reacciones de oxidación de compuestos tóxicos. Su actividad catalítica es similar a la de las hemoperoxidasas, en tanto que requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno, contiene también un grupo hemo en su estructura como sitio catalítico, se inactiva por peróxido en ausencia de un sustrato reductor y, finalmente, su ciclo catalítico está basado en los estados de oxidación del átomo de Fe del grupo prostético hemo.

Los citocromos c son moléculas de proteínas muy pequeñas, constituidas por 103-112 aminoácidos, con pesos moleculares de alrededor de 12 000 Da y puntos isoeléctricos básicos ($P_i \approx 10$). Presentan una alta conservación en la secuencia de aminoácidos, así como de su estructura terciaria. Se ha determinado la conservación de 21 residuos en 91 secuencias de citocromos c de origen eucarionte. También se ha demostrado un contenido de α -hélices superior a 30% para el citocromo de levadura. Una característica importante es que en el citocromo c, el grupo hemo se encuentra unido covalentemente a la apoproteína por medio de dos enlaces tioéter (a diferencia de las peroxidasa como HRP en la que está unido no covalentemente a la proteína), y el átomo de Fe se encuentra coordinado axialmente por dos ligandos, la His18 y la Met80 (figura 7).

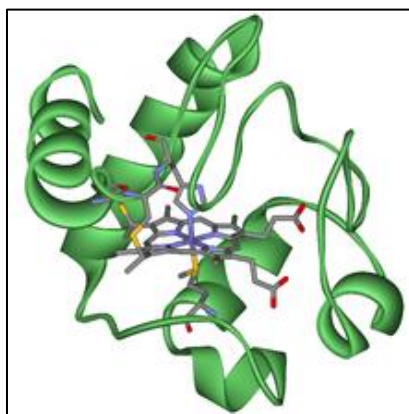


Figura 7. Estructura tridimensional del Citocromo C peroxidasa.

Algunos ejemplos de sustratos y productos generados por biotransformaciones mediadas por esta hemoproteína se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Biotransformaciones con citocromo c (Vázquez-Duhalt, 1999).

SUSTRATOS	PRODUCTOS
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	
Antraceno	9,10-Antraquinona
Benceno	Fenol
Benzo(a)pireno	1,6-Benzo(a)pirenodiona
Pireno	1,8-Pirenodiona
Compuestos organoazufrados y heterocíclicos	
Benzotiofeno	Sulfóxido de benzotiofeno
Carbazol	Desconocido
Dibenzotiofeno	Sulfóxido de dibenzotiofeno
Sulfuro de dibencilo	Sulfóxido de dibencilo
Sulfuro de difenilo	Sulfóxido de difenilo
N-metil carbazol	N-Hidroximetil carbazol
Tiantreno	Disulfóxido de tiantreno
Tioanisol	Metilfenil-sulfóxido
Otros sustratos	
ABTS	ABTS (radical catiónico)
Guayacol	Tetraguayacol
Ácido linoléxico	Peróxido de linoleato
Luminol	Quimioluminiscencia
Metionina	Etileno
Estilbeno	Epóxido de estilbeno

Es importante resaltar que el citocromo c es activo catalíticamente en mezclas de reacción que contienen solventes orgánicos en proporciones que van desde 10 hasta el 90%; además, presenta actividad en el rango de valores de pH de 2 a 11. Ambas propiedades en esta proteína son interesantes, ya que facilitan el uso del citocromo c en condiciones de reacción extremas. La posibilidad de utilizar solventes orgánicos como medios de reacción, permite disolver una mayor cantidad de sustrato. Frecuentemente se han utilizado mezclas de solventes miscibles en agua sin provocar un efecto de inactivación severo al citocromo c.

Microperoxidasa-11(MP-11). Es una de las especies modelo para las hemo peroxidasas que se obtiene a partir de la digestión enzimática de citocromo c, resultando en un grupo hemo covalentemente unido a 11 aminoácidos (Aron *et al*, 1986; Wang y Vanwart, 1989), (ver figura 8), (Munro y Marques, 1996). Aunque la actividad de la peroxidasa de este hemo péptido es menor que la de la peroxidasa intacta (Baldwin *et al.*, 1987; Gooding *et al.*, 2001), MP-11 es mucho más pequeña en tamaño. La MP-11 se presenta normalmente como una sal disódica, que se prepara a partir del citocromo c de corazón de caballo.

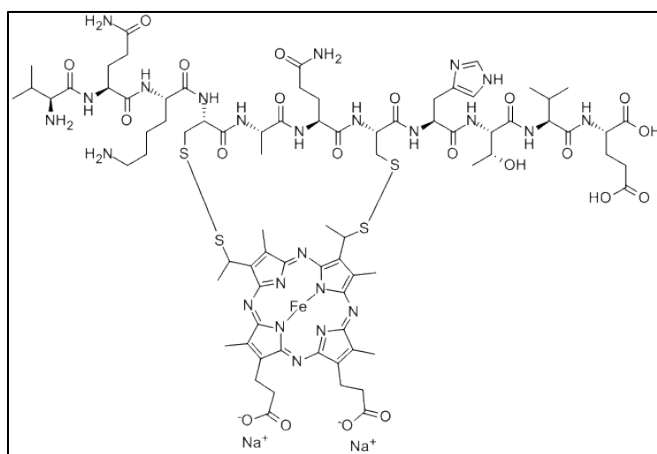


Figura 8. Estructura molecular de la microperoxidasa-11.

Cloroperoxidasa (CPO). Proviene del hongo *Caldariomyces fumago*, es una peroxidasa de origen marino muy funcional, ya que no sólo cataliza las reacciones “clásicas” de las peroxidasas, sino que también reacciones de transferencia de oxígeno y halogenaciones con una alta especificidad de sustrato, en la figura 9 se muestra la estructura tridimensional de la CPO. *In vivo*, esta enzima interviene en la síntesis del caldariomicina, un compuesto halogenado con propiedades antimicrobiales. *In vitro*, la enzima cataliza un número importante de reacciones químicas, tales como las reacciones enantioselectivas de transferencia de oxígeno y las halogenaciones oxidativas. Entre el grupo de las haloperoxidasas es la que presenta mayor actividad específica. Sin embargo, es altamente sensible a la temperatura y puede llegar a inhibirse por concentraciones altas del agente oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

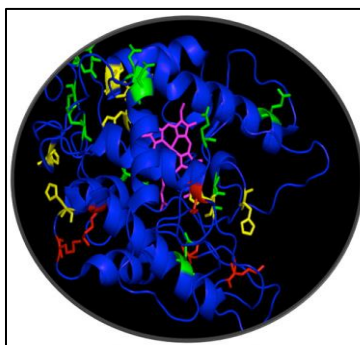


Figura 9. Estructura tridimensional de la enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo Caldariomyces fumago.

La peroxidasa de rábano picante (HRP: horseradish peroxidase) es, sin duda, la peroxidasa vegetal más importante y estudiada hasta el momento en cuanto a su potencialidad para su aplicación en diversos campos de investigación. Pertenece a la familia de la clase III de las peroxidases vegetales. Cataliza reacciones redox en las que el sustrato aceptor de electrones es el H_2O_2 , mientras que el sustrato donador de electrones es de naturaleza variable. Esta peroxidasa tiene 308 residuos aminoacídicos y un peso molecular comprendido entre 33.89 y 42.1 kD (figura 10). Mantiene su estabilidad entre pH 5.7 y 8.5. Su inactivación térmica se produce a partir de los 81.5 °C, aunque Schomburg y col. han encontrado que a 50 °C mantiene su actividad durante 30 minutos y que a 70 °C pierde el 10% de su actividad en 5 minutos. La incubación a temperaturas comprendidas entre 5 y 35 °C tampoco provoca una pérdida significativa de actividad enzimática.

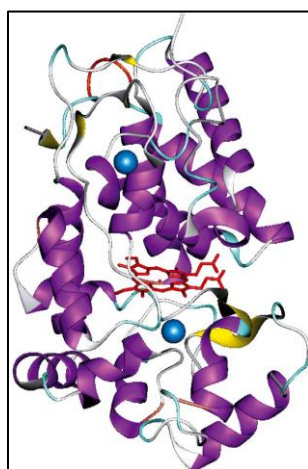


Figura 10. Representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos X de la peroxidasa de rábano picante. El grupo hemo (en color rojo) está situado entre los dominios distales y proximales, que contienen cada uno un átomo de calcio (mostrado como esferas azules).

Sus aplicaciones actuales son diversas, entre las que encontramos referencias a utilidades en análisis clínicos (Deshpande, 1996), biosensores de peróxido de hidrógeno, determinaciones de mercurio, síntesis de compuestos orgánicos, oxidación de compuestos con interés farmacológico (profármacos) para el combate contra diversas patologías (Delehanty *et al*, 2009; Giljohannand y Mirkin, 2009; Husain *et al*, 2009; Juzenas *et al*, 2008; Medintz *et al*, 2008; Michalet *et al*, 2005; Xiaodan *et al*, 2014;).

2.5 Activación Enzimática de profármacos

El término “Profármaco” (o proagente) fue introducido por primera vez en 1958 por Adrien Albert (Albert, 1958), para describir compuestos que necesitan una biotransformación (química o enzimática) para ejercer su efecto farmacológico.

Según esta definición y la aceptada por la IUPAC, los profármacos son agentes terapéuticos inactivos “*per se*” que son transformados *in vivo* en uno o más metabolitos activos (Cabrera y Díez-Torrubia, 2010) (figura 11). Desde un punto de vista no riguroso, los profármacos se pueden entender como compuestos que contienen grupos transitorios y no-tóxicos que modifican o eliminan propiedades no deseadas de la molécula patrón (fármaco).

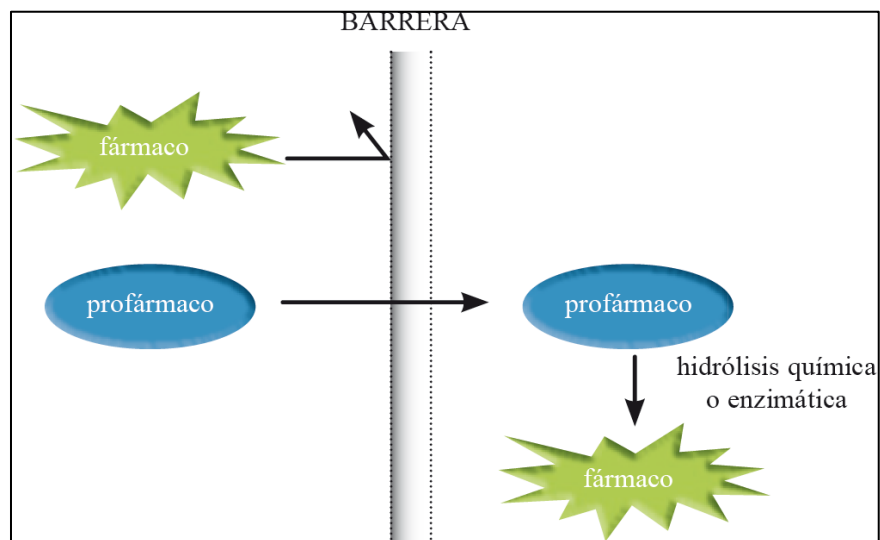


Figura 11. Concepto esquemático de un profármaco.

El interés creciente por los profármacos, tanto por parte de la industria farmacéutica como del ámbito académico, hace que sean hoy en día una parte integral del proceso de descubrimiento de fármacos en el caso en el que no sea posible la preparación de análogos. En la actualidad en el mercado comercial podemos encontrar algunos profármacos, entre los compuestos comercializados más vendidos, como por ejemplo el omeprazol (antiácido), el valaciclovir (antiviral) o el enalapril (antihipertensivo). Sin embargo, tan sólo se ha comenzado a explotar su gran potencial ya que el reciente descubrimiento y comprensión de diversos fenómenos biológicos permitirán el diseño de profármacos más sofisticados, más seguros y mejor dirigidos (Rautio *et al*, 2008).

Muchas de las fallas presentes en los fármacos, como puede observarse en la figura 12 son problemas que se presentan debido a las propiedades farmacocinéticas desfavorables, tales como una mala absorción, distribución, metabolismo o excreción (propiedades ADME) (Takahashi *et al*, 2001), lo cual resulta como una de las causas principales por las que un potencial fármaco no llega al mercado, en la tabla 4 se presentan algunos puntos principales de los problemas que limitan la utilización de un fármaco que pueden resolverse con el diseño de profármacos.

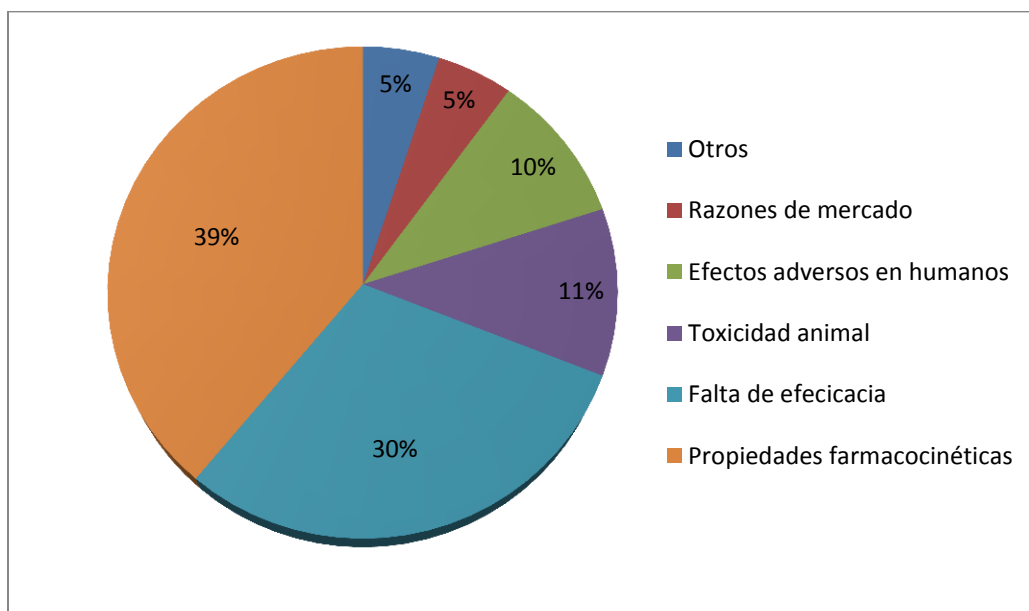


Figura 12. Razones del fracaso en el desarrollo de un fármaco.

Tabla 4. Problemas que limitan la utilización de un fármaco que pueden resolverse con el diseño de profármacos.

Problemas relacionados con la farmacocinética

- Baja solubilidad en lípidos resultando en una baja permeación de membranas para atravesar varias barreras biológicas incluidas el tracto gastrointestinal, la barrera hematoencefálica, la piel, etc.
- Absorción, distribución o eliminación a velocidad inadecuada.
- Alto metabolismo presistémico que puede llevar a la inactivación metabólica antes de alcanzar el sitio de acción.

Problemas de Formulación y Administración

- Pobre solubilidad acuosa causando problemas en la seguridad de la administración parenteral, principalmente intravenosa.
- Limitada proporción de disolución y de biodisponibilidad oral del fármaco.
- Inestabilidad *in vitro*.
- Incompatibilidades químicas o fisicoquímicas en la forma farmacéutica.
- Fármacos con corta vida media biológica, se sugieren formas de dosificación controladas.

Problemas de Toxicidad

- Toxicidad intrínseca.
- Carencia de especificidad de sitio, resultando en efectos indeseables.

Entre las diversas clasificaciones de profármacos que se encuentran en la bibliografía, se encuentra aquella que divide a los profármacos en dos tipos (Wermuth, 2003):

a) Profármacos unidos a un transportador

Resultan de la unión temporal de una molécula activa a un transportador (figura 13). En el diseño de este tipo de profármacos se deben cumplir los siguientes requisitos:

- La unión entre los fragmentos debe ser covalente.

- El profármaco debe ser inactivo o menos activo que el fármaco.
- El enlace debe romperse *in vivo*.
- El profármaco y el transportador no deben ser tóxicos.
- La bioactivación del fármaco debe ser rápida en el lugar de acción para evitar el metabolismo alternativo

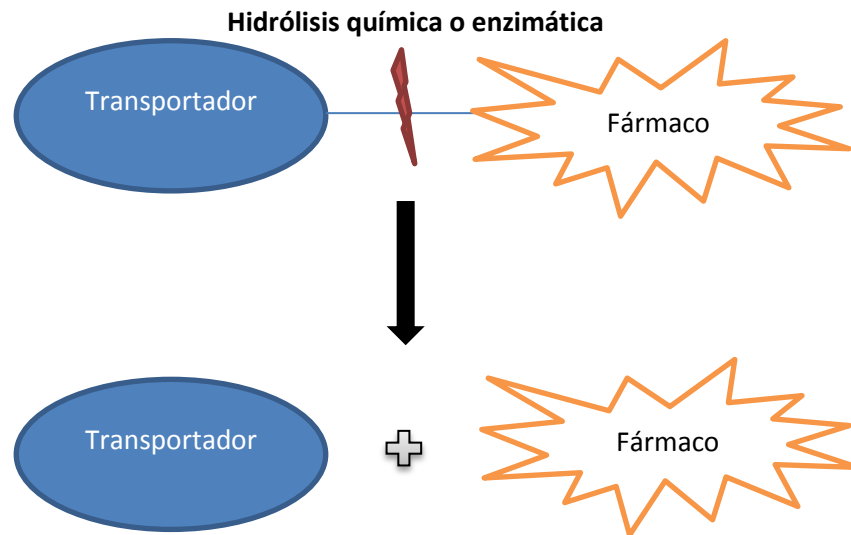


Figura 13. Concepto esquemático de un profármaco unido a un transportador.

b) Profármacos bioprecursores

Aquellos que resultan de la modificación de la estructura molecular del fármaco y necesitan una activación metabólica en el organismo (ej. oxidación, reducción) para regenerar el principio activo.

Un ejemplo de profármaco bioprecursor es el omeprazol, el cual es un potente inhibidor de la secreción de ácido del estómago (figura 14). Es un profármaco que debe activarse en la luz de los canalículos secretores de dichas células para ser activo. Se comporta como una base débil que tras su absorción, se distribuye por el organismo. Al llegar a las células parietales, en un medio extremadamente ácido, sufre una transposición molecular de Smiles, dando lugar a la forma activa, un derivado sulfonamida, totalmente hidrófilo, por lo que no puede acceder de nuevo al torrente sanguíneo y se acumula en estas células. La inhibición de la ATPasa se debe a la formación de puentes disulfuro con residuos de

cisteína de la cadena alfa luminal de la bomba de protones. Esta inhibición es prácticamente irreversible, no competitiva y dosis dependiente (Lindberg *et al*, 1986).

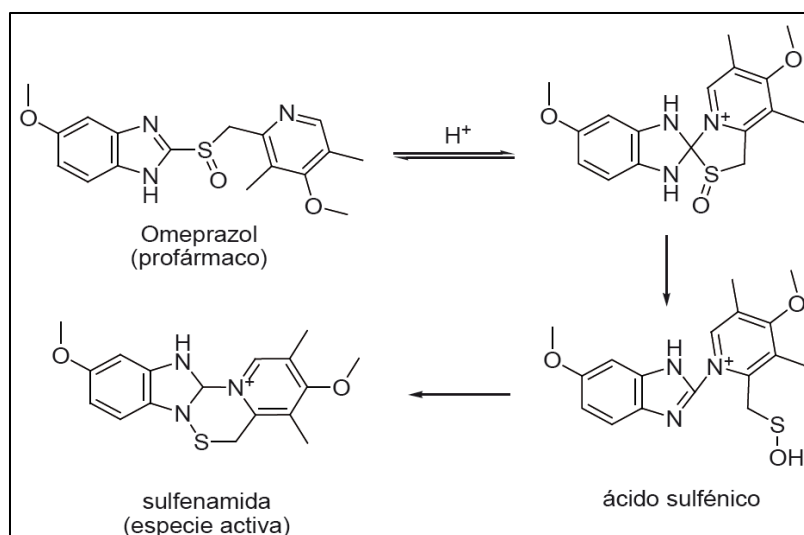


Figura 14. Activación de omeprazol en el medio ácido del estómago.

Otro de los criterios de clasificación de profármacos se basa en sus mecanismos de activación, entre los que cabría destacar los mecanismos enzimáticos frente a los no enzimáticos. Ambos poseen ventajas e inconvenientes (Ettmayer *et al*, 2004). La activación del profármaco por vía enzimática va a depender de la velocidad con que la enzima sea capaz de llevar a cabo la transformación del sustrato a su forma activa o de la cantidad de enzima presente en el tejido donde va a ser activado el profármaco, lo que nos podría permitir modular la cantidad de fármaco liberado en cada caso. Un inconveniente sería la variabilidad en el contenido enzimático que presentan las distintas especies animales, o que incluso se dan dentro de una misma especie (polimorfismo genético).

Por otro lado, si un profármaco es activado por mecanismos químicos (p. ej. liberación química espontánea a un determinado pH), los problemas derivados de variabilidad entre especies o polimorfismos genéticos pueden evitarse. Sin embargo, pueden aparecer problemas de estabilidad química (insuficiente vida media) y de falta de activación en un sitio definido. Es interesante destacar que existen muy pocos ejemplos en la bibliografía de profármacos diseñados para ser activados exclusivamente mediante mecanismos no enzimáticos, probablemente debido a lo difícil que resulta descartar una participación enzimática en la activación de los mismos.

Cabe destacar que la mayoría de los profármacos comercializados, o que se encuentran en fase de desarrollo clínico, han sido diseñados principalmente con dos objetivos: mejorar su biodisponibilidad (es decir, aumentar los niveles de fármaco en la sangre) y conseguir su acción en lugares específicos como órganos o tejidos (Hsieh *et al*, 2009).

El transporte selectivo de un fármaco a sus células o tejidos diana fue definido por Paul Ehrlich con la metáfora de la “bala mágica” a principios del siglo XX (Ehrlich, 1910). Ehrlich se refería a compuestos que actuaran específicamente sobre la causa de la enfermedad sin dañar al resto del organismo; lo que constituye el objetivo ideal en el desarrollo de un fármaco, ya que permite obtener un beneficio terapéutico óptimo minimizando efectos secundarios no deseados. El diseño racional de profármacos dirigidos a lugares específicos es, probablemente, el desafío más apasionante de una estrategia profármaco, y cobra especial interés en el caso de fármacos muy tóxicos, tales como los agentes antitumorales (Prodrugs: Challenges and Rewards (Eds.: V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley), Springer, New York, 2007).

El transporte selectivo puede abordarse mediante cuatro vías diferentes:

- Enriquecimiento del fármaco en el tejido diana de forma pasiva
- Transporte mediado por transportadores específicos (localizados en las células o tejidos diana).
- Transporte mediado por enzimas específicas de células o tejidos
- Transporte dirigido a antígenos de la superficie celular (Ettmayer *et al*, 2004).

Las dianas más comunes a las que van dirigidos este tipo de profármacos son el sistema nervioso central, los tumores y el hígado (Prodrugs: Challenges and Rewards (Eds.: V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley), Springer, New York, 2007).

En la actualidad, el principal reto en la quimioterapia del cáncer es el transporte selectivo de fármacos a las células tumorales sin afectar a las células sanas. Las células tumorales presentan ciertas diferencias respecto a las células sanas, ya que su proliferación alta y su actividad biorreductora hacen que ciertas enzimas estén sobreexpresadas y puedan ser empleadas para la activación selectiva de profármacos en dichas células tumorales

(Sinhababu y Thakker, 1996). Un buen ejemplo de profármaco activado por enzimas específicas de tumores es la capecitabina, comercializado bajo el nombre de Xeloda® y que se administra por vía oral a pacientes con cáncer de mama y colorrectal metastásico (figura 15). La capecitabina es un profármaco del 5-fluorouracilo (5-FU) que tras su absorción oral experimenta tres pasos de activación, dando lugar a altas concentraciones de 5-fluorouracilo en el tumor. Las tres etapas de activación son: (a) hidrólisis en el hígado por acción de carboxilesterasas, (b) desaminación en el hígado y en células tumorales mediada por la citidina desaminasa y (c) liberación específica de 5-fluorouracilo en las células tumorales por acción de la enzima timidina fosforilasa (sobreexpresada en dichas células) (Marshall *et al*, 2002).

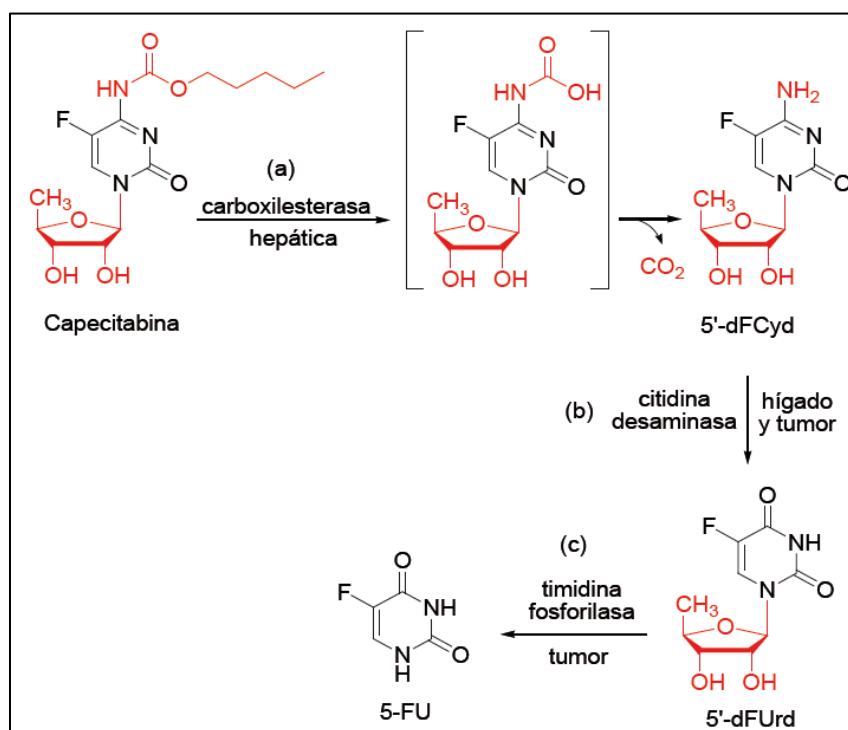


Figura 15. Bioconversión de capecitabina a 5-FU.

Así como el medicamento Xeloda® dirigido para combatir lo que hoy en día en el mundo se considera un problema de salud a nivel mundial como lo es el cáncer, diversos equipos de investigación en todo el mundo se están dando a la tarea para llevar a cabo diversas acciones para el combate de este mal que aqueja a la humanidad. A nivel mundial, este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas,

aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones (OMS, 2013). En la región de las Américas fallecieron 1.2 millones de personas en 2008 por cáncer; afectando a los hombres principalmente en la próstata, pulmón, colonorrectal y estómago; y las mujeres en la mama, pulmón, colonorrectal y cervicouterino (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2013).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS], 2013).

La entidad nacional: Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) señala que entre 1922 y 2001 la proporción de muertes por cáncer en México pasó de 0.6 a 13.1% de las defunciones totales ocurridas por todas las causas y en toda la población. Así mismo, el cáncer en México ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país y desde 1980, se ha identificado al cáncer de cuello de útero (24.4%), piel (13.6%), mama (11%), próstata (6%) y estómago (3%) como los principales causantes de las defunciones.

Para las mujeres, el cáncer de mama es la primera causa de morbilidad hospitalaria, 58 de cada 100 casos se ubican en las mujeres de 40 a 59 años; situación similar se observa para el cáncer en órganos genitales, 47.4 % ocurren en las de 40 a 59 años; respecto al cáncer en órganos digestivos, son las mujeres de 50 a 59 años y de 65 a 74 años quienes lo presentan con mayor frecuencia (22.9 y 20.0 %, respectivamente).

El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se transformó en los últimos 50 años y el cáncer mamario ha pasado a ser un problema de salud pública. Sus principales factores de riesgo conocidos están asociados a la exposición prolongada a estrógenos, son indicadores de estilos de vida y patrones reproductivos, y por esto resultan difíciles de modificar. Reducir la mortalidad requiere, entonces, mejorar la detección temprana y las estrategias de tratamiento (Cancer Mundial, International Agency for Research on Cancer, IARC; Peto *et al*, 2000).

La evidencia reciente demuestra que el cáncer de mama es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo (Mathers *et al*, 2006).

En México, con una población un poco mayor de 100 millones de habitantes, el cáncer de mama es hoy día uno de los desafíos más importantes para la salud de la mujer adulta. Esta situación es aún un hecho poco conocido, ya que además abundan las interpretaciones erróneas sobre la enfermedad. El cáncer cérvicouterino se considera todavía una amenaza mucho mayor para la salud y las vidas de las mujeres pobres y se ha difundido la creencia de que el cáncer de mama se concentra de manera notoria en los grupos de nivel socioeconómico elevado. En realidad, las mujeres de bajos recursos enfrentan hoy día una doble carga a partir de las elevadas tasas de cáncer de mama y cérvicouterino. El cáncer de mama es ahora causante, en general, de un mayor número de muertes en México, comparado con el cáncer cérvicouterino, y afecta a mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso. Actualmente, es la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad (Lozano *et al*, 2008).

Con respecto a las políticas, la Secretaría de Salud amplió y aumentó la normatividad y legislación relativa al control del cáncer de mama a través de las directrices técnicas de la Norma Oficial Mexicana (Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2.2002. Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.). Se establecieron criterios más rigurosos para vigilar los servicios de salud públicos y privados en la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia de la enfermedad. Para promover la detección temprana, las directrices hacen énfasis en la autoexploración, el examen clínico y la mamografía. Se establece un examen clínico anual realizado por personal capacitado para todas las mujeres de 26 y más años que visitan un centro de salud. Se recomienda una mamografía anual o bianual para mujeres de 40 a 49 años con factores de riesgo específicos y una vez al año para todas las mujeres de 50 años y mayores.

Entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de dos a cuatro muertes por 100000 mujeres. Luego se elevó de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por 100000 para la mitad de la década de 1990 y se ha mantenido más o menos estable desde entonces.

El cáncer de mama representa una pesada carga de muertes prematuras, ya que 60% de las mujeres que muere tiene entre 30 y 59 años de edad. También existe cierta evidencia de que

la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en los países en desarrollo que en los más desarrollados (Rodríguez-Cuevas *et al*, 2000 y 2006).

Para el año 2006, el cáncer de mama se había convertido en la segunda causa de muerte más común en México entre las mujeres de 30 a 54 años y la tercera más frecuente entre el grupo de 30 a 59 años (después de la diabetes y las cardiopatías).

Es evidente que impera la necesidad de integrar nuevas formas de combatir esta enfermedad. La incorporación de nuevas medidas terapéuticas al tratamiento de esta afección son el producto de desarrollo e implementación de estricta investigación científica la cual comienza desde el descubrimiento de los elementos básicos pasando por la aplicación funcional y preclínica finalizando en la aplicación clínica. Este es un proceso bien complejo el cual requiere de una voluntad política, económica y social en la valoración y soporte de las ideas y de la acción concertada de entes públicos y privados.

De ahí la necesidad de crear nuevas tecnologías que coadyuven en el tratamiento del cáncer, y que a su vez sean accesibles a las diferentes instituciones educativas o de salud. Los sistemas compuestos por enzimas u otras biomoléculas tienen la propiedad de ser muy específicos, además de ser de fácil manejo.

El nanohíbrido de peroxidasas y nanopartículas de CdS presenta la característica de ser activado por luz, no requerir cofactores costosos y de mantener las propiedades de selectividad y sensibilidad de las enzimas. Sin embargo, su mayor limitante es la inestabilidad ya que las exposiciones prolongadas de luz ultravioleta, así como la poca estabilidad de las nanopartículas al medio lo hacen particularmente sensible a las condiciones de trabajo. La solución a esta problemática ha demostrado ser la inmovilización en materiales mesoporosos del tipo SBA-15 (López, 2011), los cuales han demostrado ser excelentes medios para estabilizar proteínas, DNA, drogas, nanopartículas, etc., debido a que los materiales son confinados en espacios que proveen de un microambiente aislado.

2.6 El ácido 3-Indolacético

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que controlan diversos procesos del metabolismo vegetal. Las auxinas son un grupo de reguladores del crecimiento de las plantas, que se caracterizan por inducir alargamiento celular, división celular e iniciación de la raíz (Engvild, 1989), siendo el ácido indolacético (AIA) sin dudas el miembro más conocido de este grupo.

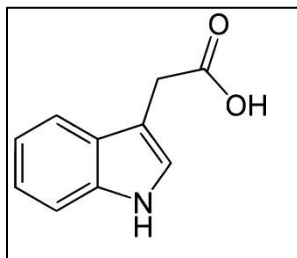


Figura 16. Estructura del ácido 3-Indolacético.

Ácido Indol-3-acético, es un catabólito del triptófano (ver figura 16) y una hormona de crecimiento de la planta, es relativamente no tóxico para las células de mamíferos. Una de las características más sobresalientes de esta fitohormona es su potencial como pro fármaco que se presenta cuando mediante la acción catalítica de la peroxidasa de rábano picante (HRP), esta oxida en presencia de una pequeña cantidad de materia orgánica peróxido (una impureza común en los medios biológicos) el cual es requerido para iniciar la reacción (Krylov y Dunford, 1996), por medio de esta reacción catalizada por esta enzima se producen radicales citotóxicos que podrían ser utilizados como la base para una nueva terapia contra el cáncer (Folkes y Wardman, 2001; Folkes *et al*, 1999).

2.7 Materiales mesoporosos y la inmovilización de enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos de origen proteico (biocatalizadores) que presentan varias ventajas sobre sus parientes sintéticos: altas especificidad y selectividad y, en general, una mayor actividad en medios de reacción suaves. Sin embargo su uso en aplicaciones industriales no siempre resulta sencillo de implementar: a menudo se desnaturalizan total o parcialmente (con la consiguiente pérdida de actividad) en presencia de disolventes orgánicos, de uso muy común en las que serían sus potenciales aplicaciones, o al someterse a temperaturas elevadas o medios agresivos (por ejemplo con pHs lejanos a la neutralidad). Además, por ser las proteínas solubles en medio acuoso, su separación del

medio de reacción (imprescindible para que un catalizador sea comercialmente viable) es cara y complicada. La forma más aceptada de sortear estos obstáculos es la inmovilización de las biomoléculas en un medio insoluble en el medio de reacción, generalmente una estructura sólida.

Los beneficios potenciales de esta técnica son muchos:

- La simplificación del proceso de reciclado del catalizador (enzima), que puede separarse del mismo por un simple proceso de filtrado o centrifugado.
- En algunos casos la inmovilización permite aumentar la estabilidad de la enzima. Esto puede ocurrir cuando la estructura terciaria de la proteína adquiere rigidez, bien por unión covalente mediante varios enlaces con el soporte, bien mediante confinamiento en espacios reducidos. Esta mayor estabilidad puede llegar a permitir el empleo de la enzima en medios más severos, lo que dispararía el campo de posibles aplicaciones y facilitaría enormemente los procesos.

Un aspecto negativo de la inmovilización de enzimas es que no hay estrategias generalizables, pues las técnicas o los materiales de inmovilización que funcionan en un caso pueden conducir al fracaso en otro. Con todo, analizando la amplia bibliografía disponible se suelen distinguir tres métodos distintos para la inmovilización:

a) Anclaje a un soporte: la enzima se enlaza a un soporte preexistente mediante fuerzas de tipo diverso.

b) Encapsulación: la enzima queda atrapada en el interior de un material en formación, sin que sea necesaria unión física ni química a la pared del soporte.

c) Cross linking o entrecruzamiento: las enzimas se unen unas a otras formando su propio soporte, de modo que no es necesario ningún material externo. En realidad esta técnica puede ser considerada como de insolubilización, y no de inmovilización propiamente dicha.

En la actualidad, numerosos campos de la química requieren para su avance el empleo de materiales que aporten, además de otras características, una estructura porosa controlada que permita ejercer una selectividad por tamaños sobre las especies implicadas. Son los llamados tamices moleculares, de creciente importancia en aplicaciones en las que se

precisa selectividad por tamaños en el rango de amstrongs (Å) o nanómetros (nm). Ejemplos de aplicaciones susceptibles de demandar materiales de este tipo son los procesos de separación (adsorción), la catálisis, los sensores químicos o la liberación controlada de fármacos.

Para resultar eficientes, los tamices moleculares deben cumplir sobre todo dos requisitos:

- a) Distribución de tamaños de poro estrecha.
- b) Posibilidad de controlar de forma precisa el diámetro de los poros dentro de un rango lo más amplio posible

Estas características determinan sus aplicaciones como adsorbentes, catalizadores o soportes de especies activas. Por ejemplo, si la distribución de tamaños de un determinado material es muy ancha no resultará eficiente como adsorbente, pues la selectividad por tamaños será reducida. Por otro lado, es evidente que distintas aplicaciones requieren distintos tamaños de poro en función de las especies implicadas, que pueden ir desde moléculas formadas por unos pocos átomos a macromoléculas biológicas de varios nanómetros de diámetro. Es por ello que uno de los factores más importantes es el rango de tamaños de poro alcanzables. Basándose en este factor, la IUPAC establece una clasificación que divide los materiales porosos en tres tipos:

- a) Microporosos: poros inferiores a 2 nm.
- b) Mesoporosos: poros entre 2 y 50 nm.
- c) Macroporosos: poros superiores a 50 nm de diámetro.

El empleo de sílices mesoporosas ordenadas como soportes de peroxidasas ya ha sido descrito anteriormente en la bibliografía. De hecho, ya en el informe original de Díaz y Balkus, que constituye el primer intento de inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos ordenados (MMO), los autores intentaron inmovilizar HRP en MCM-41 (Díaz y Balkus *et al*, 1996), debido a que el tamaño de la enzima era mayor al diámetro de los poros la inmovilización fue un fracaso, mientras que otras enzimas de menor tamaño como el citocromo c sí que pudieron ser introducidas con éxito en la red porosa.

El grupo de Inagaki también ha tratado de inmovilizar HRP en MCM-41 y FSM-16, postulando que, a consecuencia del confinamiento en espacios reducidos, su estabilidad una vez alojada en los MMO es óptima cuando el tamaño es lo más cercano posible al del poro en el que está alojada (Takahashi *et al*, 2001). Los resultados muestran una mayor actividad de la enzima inmovilizada con respecto a su forma nativa cuando actúa en disolventes orgánicos (Takahashi *et al*, 2000).

Dentro de los materiales mesoporosos se encuentran los denominados SBA (siglas derivadas de la universidad de procedencia, Santa Barbara University), el caso más representativo es el SBA-15 (figura 17), análogo del MCM-41 (Zhao *et al*, 1998). Se trata de materiales con paredes de óxido de silicio de hasta 60 Å, lo que les confiere mayor estabilidad hidrotérmica, también presentan tamaños de poro de 2 a 50 nm de diámetro, los cuales permiten el acceso a su interior de proteínas y otras biomoléculas, para ser inmovilizadas ; además, el área superficial es de alrededor de 1000 m²/gr de material, lo que permite adsorber, en principio, grandes cantidades de biomaterial. Los materiales mesoporosos han sido utilizados para adsorber metales, vitaminas, biomoléculas, drogas, nanopartículas, etc., por lo que su aplicación como soportes (bio) catalíticos, adsorbentes, y acarreadores de medicamentos se vislumbra como exitosa en el corto y mediano plazo.

Los beneficios potenciales de la inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos son muchos. El más evidente es la simplificación del proceso de reciclado del catalizador, que puede separarse del mismo por un simple proceso de filtrado o centrifugado. Además, en algunos casos la inmovilización permite aumentar la estabilidad de la enzima. Esto puede ocurrir cuando la estructura terciaria de la proteína adquiere rigidez, bien por unión covalente mediante varios enlaces con el soporte (Blanco *et al*, 1989), bien mediante confinamiento en espacios reducidos (Kato *et al*, 2003). Esta mayor estabilidad puede llegar a permitir el empleo de la enzima en medios más severos, lo que dispararía el campo de posibles aplicaciones y facilitaría enormemente los procesos, con la consiguiente reducción de costos. El esquema ideal que podría presentar estas características tan atractivas sería en el cual la enzima se encuentre unida al material mediante un enlace covalente o de otra índole el cual le permitiera mantenerse anclada al soporte pero que a su vez no provoque la modificación de su estructura, lo cual traería como consecuencia la

perdida total o parcial de la actividad. Otro aspecto a tomar en cuenta, sería la posibilidad de poder inmovilizar otro tipo de compuestos de interés, como por ejemplo nanopartículas semiconductoras fotoactivas que pudieran contribuir de alguna forma en la catálisis llevada a cabo por la enzima dando origen a un nanofotobiocatalizador (figura 18).

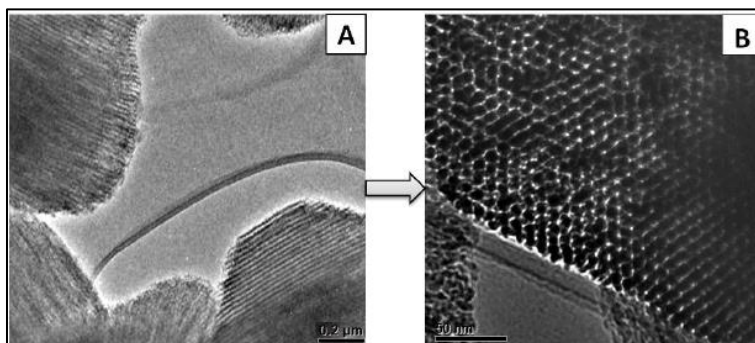


Figura 17. Imágenes (A y B) de microscopía de transmisión electrónica del material SBA-15.

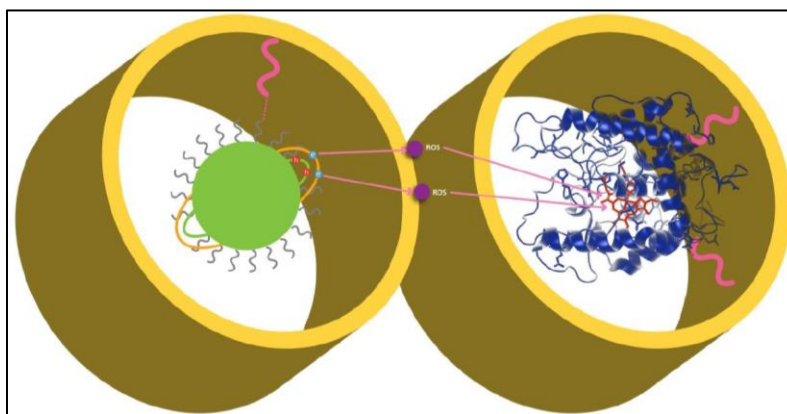


Figura 18. Idealización del funcionamiento del sistema del nanofotobiocatalizador inmovilizado en un material mesoporoso, a la izquierda se encuentra inmovilizada una nanopartícula semiconductor que provee de especies reactivas de oxígeno (ROS) a una enzima tipo peroxidasa que se encuentra inmovilizada al material para activar su acción catalítica.

2.8 El potencial del Ácido 3-indolacético en su empleo como profármaco.

Las investigaciones recientes por parte de diversos grupos de investigación han sugerido que el potencial del AIA tras su oxidación con la HRP produce especies tóxicas que podrían ser utilizadas como la base de una nueva terapia novedosa contra el combate del cáncer (Folkes *et al*, 1999). Se tienen indicios de que el AIA es bien tolerado en los seres humanos (Mirsky y Diengott, 1956) y además este resulta no ser fácilmente susceptible a sufrir oxidación por peroxidasas de mamíferos, es por ello que se ha planteado que una de las posibles orientaciones para poder llevar a cabo la oxidación del AIA es la de administrar a

la HRP conjuntamente, dirigiendo estos componentes a tumores ya localizados lo cual permitiría la producción de especies citotóxicas dentro de ellos, lo que evitaría a su vez daños a células sanas del tejido afectado. Para llevar a cabo esto se ha realizado ya investigaciones en las que se han empleado anticuerpos o polímeros que permitan la focalización de la HRP en el tumor. El mecanismo de la oxidación del AIA empleando a la HRP basado en radicales libres (figura 19) fue propuesto en una hipótesis por el grupo de Candeias, Folkes y Wardman (Candeias *et al*, 1995) en la cual se estudiaban los posibles niveles elevados de peroxidasa en tumores humanos (Brightwell y Tseng, 1982) los cuales metabolizaban al AIA para su uso como un agente quioterapéutico.

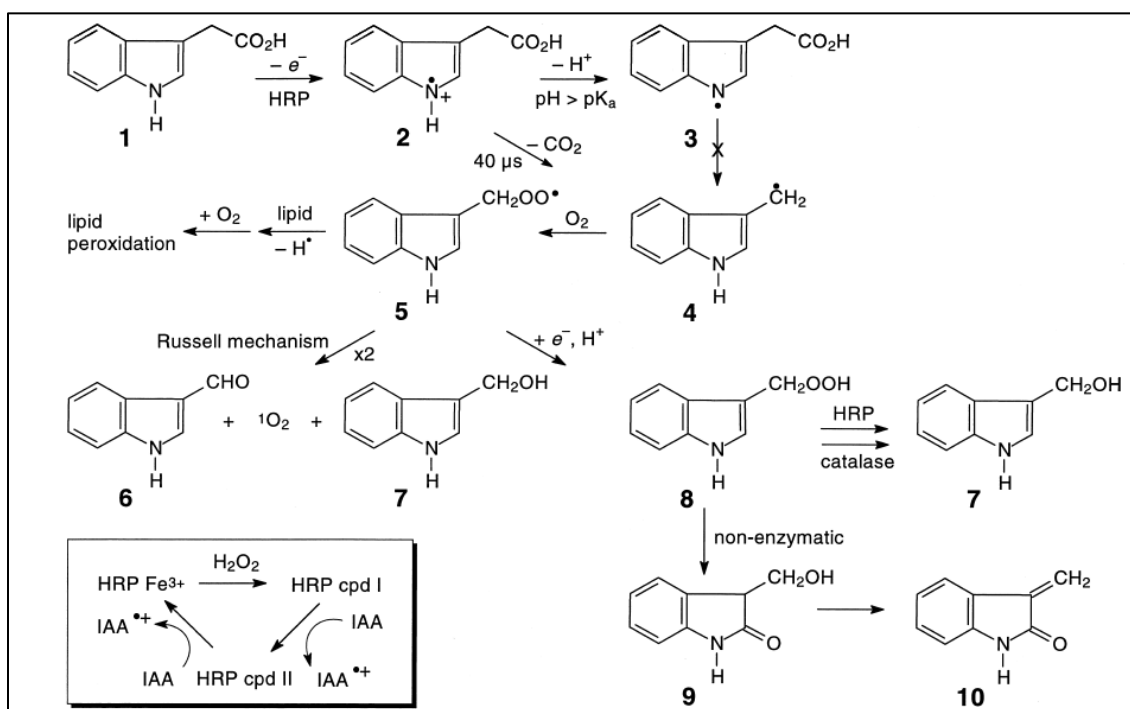


Figura 19. Principales vías implicadas en la reacción de activación oxidativa de AIA (IAA por sus siglas en inglés) a diversas especies tóxicas empleando a la HRP (Folkes y Wardman, 2001).

La reacción entre el AIA y HRP presenta un mecanismo extremadamente complejo que aún no está completamente claro, una característica clave en la reacción entre estos dos compuestos es que no se requiere H_2O_2 para la oxidación de la enzima en su forma nativa para convertirse en el llamado compuesto I, a diferencia de reacciones con muchos otros sustratos para esta enzima (por ejemplo, fenoles) (Folkes y Wardman, 2001). El compuesto I y II de la HRP son los encargados de la oxidación del AIA (figura 19, 1) a un pH neutro a un radical catiónico indolilo (figura 19, 2) este catión se disocia para formar un radical

indolilo (figura 19, 3) a un pKa de 5.1 para la disociación del grupo amino del radical indol. El radical catiónico (figura 19, 2), pero este radical no se disocia (figura 19, 3) se descarboxila en aproximadamente 40 microsegundos para formar un radical escatol (figura 19, 4) (Candeias *et al*, 1994), este radical es muy reactivo frente al oxígeno y rápidamente forma un radical peroxilo (figura 19, 5). El radical peroxilo puede descomponerse en dos maneras. Reducción y protonación forman un escatol hidroperóxido (figura 19, 8), que puede reaccionar adicionalmente con el compuesto I de la HRP para formar el indol-3-carbinol (figura 19, 7) (Gazarian *et al*, 1998). El hidroperóxido también puede descomponerse por una vía no enzimática a oxindol-3-carbinol (figura 19, 9) y el 3-Metileno-2-oxindol (MOI) (figura 19, 10), además la condensación y eliminación por el mecanismo de Russell, en la que dos radicales peroxilo se combinan, forman al indol-3-aldehído (figura 19, 6), indol-3-carbinol (figura 19, 7), y el oxígeno singlete (Kanofsky, 1988), aunque esto no puede ocurrir a pH fisiológico (Escobar *et al*, 1992).

La HRP es capaz de oxidar al AIA con solo una traza de peróxido orgánico, con la producción de hidroperóxido durante toda la reacción permitiendo su reciclamiento por la enzima (Krylov y Dunford, 1996). Se ha encontrado que en células V79 de hámster con fibroblastos, empleando al compuesto 1-metil-AIA (0.1 mM) y HRP (1.2 mg/mL) para su tratamiento durante un periodo de dos horas en ausencia de peróxido, se ha notado que solo una pequeña fracción de las células sembradas sobrevive al tratamiento (figura 20) (Folkes *et al*, 1999) y empleando otros compuestos derivados del AIA se encontró que la citotoxicidad producida por cada uno de ellos era variable hasta en cuatro órdenes de magnitud (Folkes *et al*, 1999) (figura 21).

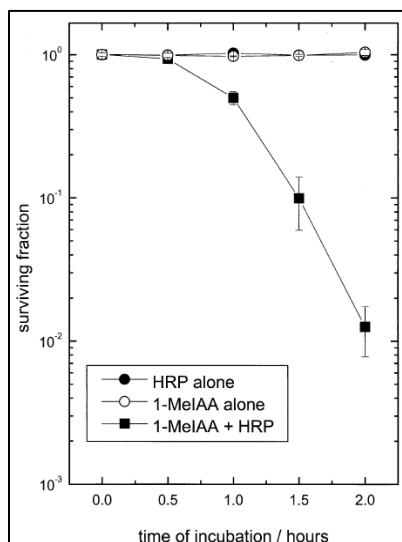


Figura 20. Fracción superviviente de células V79 tratadas con 0.1 mM 1-metil-IAA y 1.2 mg/ml de HRP en solución salina equilibrada de Hanks libre rojo de fenol. Los valores son medias \pm 6 SEM de 3 experimentos (Folkes *et al*, 1999).

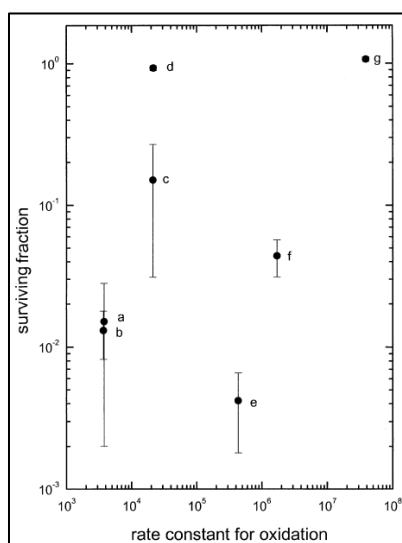


Figura 21. Fracciones sobrevivientes de células V79, incubaciones 2-hr con derivados de indol 100 mM y 1.2 mg / mL de HRP en salina equilibrada de Hanks solución, en comparación con las constantes de velocidad para la reacción con 0.5 mM HRP compuesto I a pH 7. (a) IAA, (b) 1 metil-IAA, (c) 5-benciloxi-IAA, (d) 5-metoxi-IAA, (e) 2-metil-IAA, (f) 2-metil-5-metoxi-IAA, y (g) 2 metil-5,6-dimetoxi-IAA. Los valores son medias \pm 6 SEM de 3 experimentos (Folkes *et al*, 1999).

La toxicidad para algunos de los análogos fue observada, con dosis equivalentes en dos líneas celulares humanas, MCF-7 de cáncer de mama, células de carcinoma de colon y células HT29 de carcinoma (Folkes *et al*, 1999).

Otros resultados que evidencian el efecto citotóxico de la combinación AIA/HRP en células de carcinoma de vejiga urinaria humana (TCCSUP), demostraron que después de 24 horas de tratamiento (AIA/HRP) estas morían, esto fue evidenciado con fotografías tomadas bajo microscopio con fase de contraste (figura 22), en donde se observó el desprendimiento de las células de la placa de cultivo lo cual indica su muerte (Jeong *et al*, 2010).

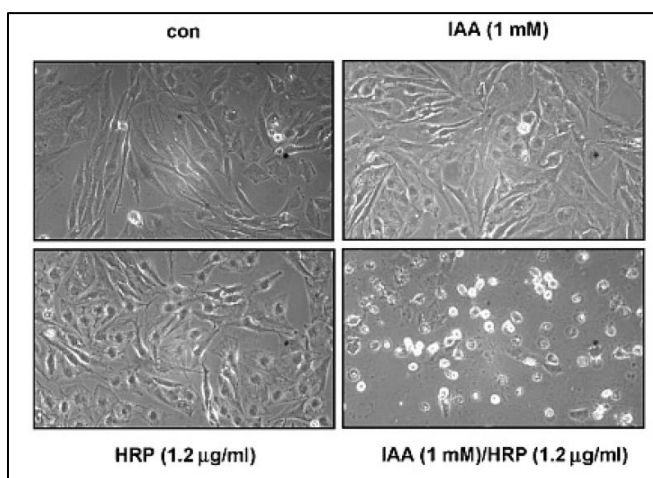


Figura 22. Citotoxicidad del AIA / HRP en células de carcinoma de vejiga urinaria humanos TCCSUP, después de la privación de suero, células TCCSUP fueron tratados con 1 mM de IAA en el ausencia y en presencia de HRP (1,2 µg / ml). Microfotografías de contraste de fase se tomaron a utilizando una cámara de video digital (Jeong *et al*, 2010).

La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de cristal violeta 24 horas después del tratamiento AIA/HRP. De acuerdo con la observación morfológica, el tratamiento AIA/HRP causó la muerte celular de una manera dependiente de la concentración, mientras que el AIA solo no fue citotóxico en concentraciones ensayadas hasta 1 mM de 24 horas (figura 23). Seguidamente, las células fueron tratadas con dosis crecientes de HRP con o sin AIA (1 mM) de tratamiento, y encontrado que AIA / HRP conduce a la muerte celular en dosis dependientes de la concentración de la enzima HRP (figura 24). Además, la viabilidad de las células tratadas con AIA / HRP disminuyó de una manera dependiente del tiempo. A partir de 6 horas después del tratamiento AIA (1 mM) / HRP (1,2 µg / mL), las células mostraron reducción significativa de la viabilidad, mientras que AIA o HRP por sí solo no mostraron efectos citotóxicos (figura 25).

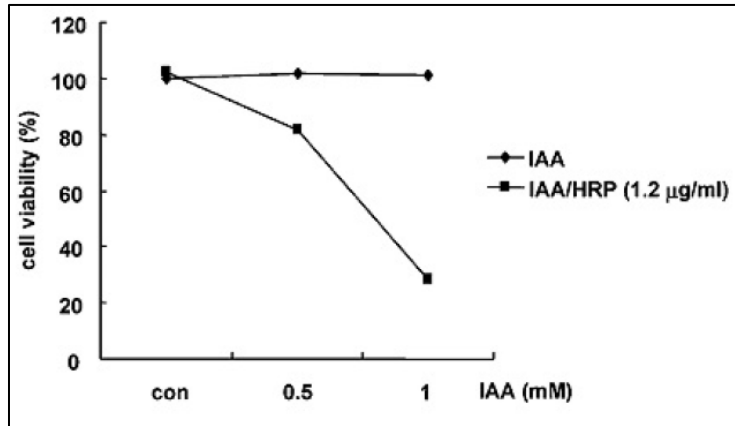


Figura 23. Las células fueron tratadas con 0.5 o 1 mM de AIA en la ausencia o presencia de HRP (1.2 µg / ml). Después de 24 horas, se realizó un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).

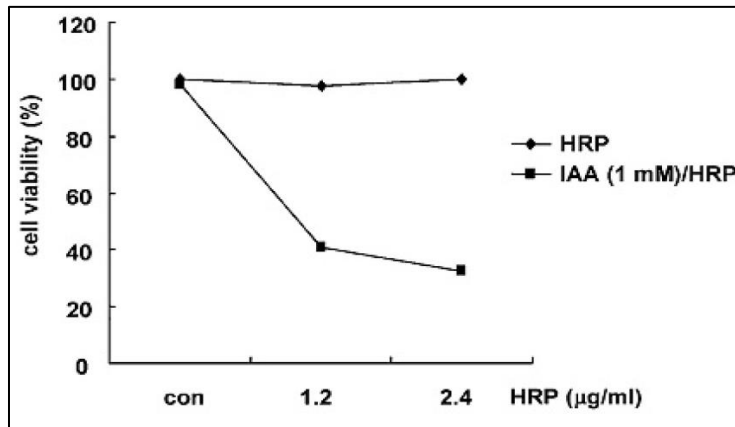


Figura 24. Las células fueron tratadas con 1 mM de AIA en la ausencia o presencia de HRP (1,2 µg / mL o 2,4 µg / mL). Después de 24 horas, se realizó un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).

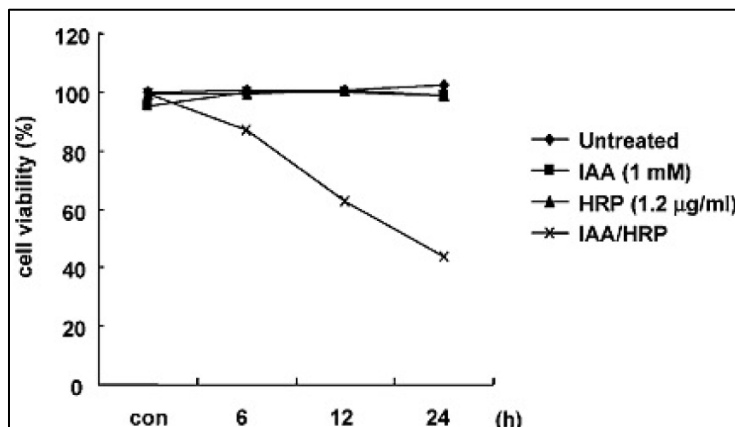


Figura 25. Las células fueron tratadas con AIA (1 mM) y HRP (1,2 µg / mL). A la hora indicada en los puntos después del tratamiento, la viabilidad celular se midió mediante un ensayo de cristal violeta (Jeong et al, 2010).

Se ha propuesto que para que la terapia AIA/HRP pueda provocar un efecto antitumoral específico, ya sea la enzima o el profármaco tienen que ser dirigidos específicamente a los tumores. Para ello una opción es dirigir específicamente a la HRP al tejido afectado, y así el AIA sería puesto en circulación en el organismo y ya que en esta forma los resultados encontrados han mostrado que no existe el riesgo de intoxicación, el AIA mostraría su forma activa solo en los tumores donde se encuentre presente la HRP a espera de poder oxidarlo, evitando así el daño celular en los tejidos sanos.

Aunque se ha encontrado que la oxidación del AIA por la HRP es más eficiente a pH más bajo que el fisiológico, la reacción sigue siendo eficiente. El pH extracelular de los tumores ha sido medido y se informa que es inferior al del tejido sano (Griffiths, 1991) lo que indicaría que la HRP puede tener una mayor actividad en los tumores. La HRP puede oxidar a una amplia serie de compuestos, incluyendo a compuestos fisiológicos como la tirosina, sin embargo, para que la enzima pueda llevar a cabo esta tarea sería necesario contar con una fuente constante de H_2O_2 , a diferencia de los índoles. Además se ha encontrado que el AIA es un mal sustrato para las peroxidasas presentes en mamíferos en ausencia de H_2O_2 (Kanofsky, 1988; Kobayashi *et al*, 1980); la oxidación del AIA por la HRP también puede ocurrir a concentraciones bajas de oxígeno (Greco *et al*, 1999) lo que permitiría su orientación a las regiones hipóxicas del tumor. Estos factores se prestan para apoyar a la posibilidad de emplear a la terapia dirigida empleando AIA/HRP.

Los grupos de Folkes y Wardman, se han enfocado a la exploración de tres conceptos que podrían formar parte para la orientación de la HRP a tumores (Folkes y Wardman, 2001), dichos conceptos se describen a continuación:

Terapia enzima/profármaco dirigida por anticuerpos (Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)). Se encuentra actualmente en fase II de ensayos clínicos (Bagshawe *et al*, 1994; Melton y Sherwood, 1996). La propuesta de esta terapia se basa en la conjugación de una enzima a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para reconocer a un antígeno tumoral extracelular (por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA)) el cual se une fuertemente a muchos tipos de carcinoma epiteliales incluyendo tumores de colon) esto permitiría dirigir selectivamente a la enzima después de su administración intravenosa hacia los tumores existentes. Cuando el profármaco es

administrado después de un tiempo suficiente para el despacho del anticuerpo al sitio de unión con su antígeno específico, la activación a la droga se produce preferentemente en el tumor dado que la conjugación de la enzima-anticuerpo-antígeno es capaz de activar a muchas moléculas de profármaco. El concepto también se basa en la absorción adecuada que se presenta en el tumor, de la enzima y el profármaco, un detalle a tomar en cuenta es que una vez que la enzima comience a llevar a cabo su actividad la respuesta citotóxica inducida también afectará a las células vecinas lo que las conducirá a morir. Idealmente debe existir una diferencia elevada entre la citotoxicidad que presentan el profármaco y sus metabolitos activos. El antígeno tiene que ser de una alta especificidad, ya que se está tiene que expresarse mucho más en células enfermas en comparación con el tejido normal; antígenos presentes en la circulación también competirán por los sitios de unión del anticuerpo expresado en la superficie del tumor. La lisis de las células tumorales inducirá la liberación del antígeno en la circulación, esto se toma en cuenta para dejar un lapso de tiempo para volver a administrar al profármaco. Esta terapia puede causar reacciones inmunogénicas debido a los problemas que trae consigo la administración de proteínas extrañas al organismo, aunque estas respuestas pueden reducirse mediante la administración de inmunosupresores durante el tratamiento.

La conjugación del anticuerpo a un polímero como el PEG (polietilenglicol) también puede reducir las respuestas inmunogénicas, así como el aumento en el tiempo de circulación de la enzima y por lo tanto aumentar el potencial para alcanzar el tumor (Pedley *et al*, 1994). La HRP ha sido conjugada con éxito con el anticuerpo anti-CEA (Pedley RB, Royal Free Hospital, London, resultados aún no publicados) resultando en la unión de un 50% de la enzima. La representación de esta terapia tomando en cuenta los aspectos ya señalados, se muestra en la figura 26, en la cual se emplea la terapia AIA/HRP.

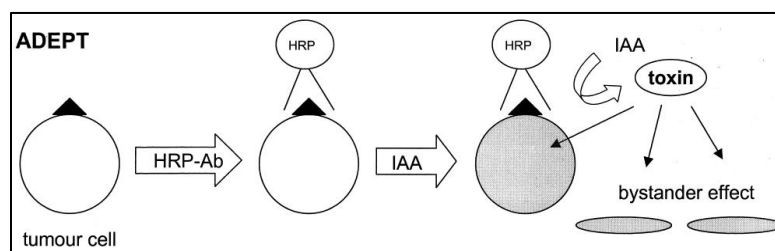


Figura 26. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por anticuerpos (ADEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).

Terapia enzima/profármaco dirigida por polímero (polymer-directed enzyme prodrug therapy (PDEPT)). Es una variación de ADEPT (Duncan *et al*, 1996). Esta terapia ya se ha utilizado para administrar fármacos citotóxicos (por ejemplo, doxorubicina) a tumores, mediante su unión a un polímero (Connors *et al*, 1995) y ha completado la fase I de ensayos clínicos (Vasey *et al*, 1999). La conjugación de fármacos o proteínas a polímeros puede aumentar su tiempo de circulación y reducir su respuesta inmunogénica en el organismo. El polímero empleado debe ser soluble en agua, biocompatible, no inmunogénico y no debe reducir la actividad biológica (en caso de las proteínas). En general, cuanto mayor sea el polímero (0.40 kDa), el tiempo de circulación será más largo hasta llegar al tejido diana; sin embargo, los tiempos de exposición pueden producir efectos adversos. El concepto de esta terapia se basa en la irrigación sanguínea que existe en los tumores ya que esta tiende a ser fugas, por lo que grandes moléculas de polímeros ligadas pueden entrar en los espacios extracelulares de los tumores, pero no muy fácilmente en los tejidos normales. Esta captación requiere que la presión intersticial del tumor se ha baja para permitir la filtración neta de la sangre en el tejido, lo cual puede ser un problema potencial. La eliminación del polímero en el tumor es muy lenta debido a la falta de drenaje linfático. Una vez en el espacio extracelular, el polímero entra a las células por endocitosis, la liberación de la toxina se da por la acción proteolítica en los lisosomas, de modo que esto causa la muerte celular. El enlace entre el polímero y profármaco también puede ser eliminado por la acción de una enzima unida a un polímero diferente o al mismo, de modo que el fármaco citotóxico sea liberado. Enzimas fisiológicas, como por ejemplo, las esterasas, también pueden ser utilizadas para escindir el enlace entre el fármaco y el polímero. Folkes y Wardman han sugerido que dado que la HRP ha sido vinculada con éxito con diversos polímeros (Fortier y Laliberte, 1993), podría ser esta una oportunidad para vincular a la HRP con un polímero biológicamente compatible, el cual también pueda acumularse en un tumor. Tras administración sistémica del AIA, la activación de este se daría preferentemente en el tumor, previniendo nuevamente el daño a tejido sano. La activación podría ocurrir en el espacio extracelular de un tumor o, alternativamente, después de un tiempo mayor antes de la administración del profármaco, en los lisosomas. En los lisosomas el pH se encuentra alrededor de 5.5, cerca al pH óptimo en el que trabaja

la HRP. Se espera que los efectos inmunogénicos de esta terapia sean menores en comparación con ADEPT debido al enmascaramiento de la proteína extraña por el polímero. La representación de esta terapia tomando en cuenta los aspectos ya señalados, se muestra en la figura 27, en la cual se emplea a la terapia AIA/HRP.

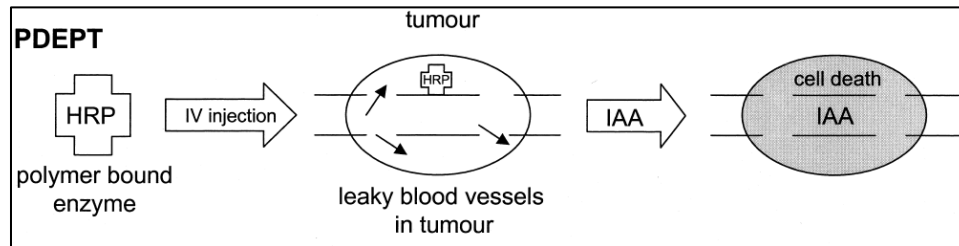


Figura 27. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por polímero (PDEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).

Terapia enzimática profármaco dirigida por genes (Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)). (Connors, 1995). Se encuentra en ensayos clínicos; esta terapia se basa en la adición de un gen que codifique una enzima en una célula, seguida de la administración de un profármaco. El gen codificador puede ser entregado a la célula diana por vía viral o no viral. La expresión del gen en el objetivo permitiría la producción de una enzima que sea capaz de activar un profármaco con potencial citotóxico. Por otra parte, un efecto espectador puede tener lugar, ya que no solo las células que sintetizan la enzima son muertas sino también las células vecinas. Este enfoque de terapia genética permite que la enzima sea expresada durante tiempos más largos en comparación con ADEPT y se encuentre en contacto más estrecho en el espacio intracelular, lo que permitiría un metabolismo mayor de un profármaco en la mayoría de los casos. Una desventaja con el enfoque GDEPT AIA/HRP es que la enzima es poco probable para ser trasladada a través de la membrana celular, a secuencias menores de ADN que se han añadido para la focalización celular específica; por lo tanto, la oxidación del profármaco sólo va a ocurrir intracelularmente. Esto es diferente en ADEPT en el que la HRP se encuentra libre, y la activación del profármaco se lleva a cabo extracelularmente. Pero hay que tener en cuenta que si el daño al ADN es la razón de la toxicidad, se podría asumir que intracelularmente la activación aumentaría la posibilidad de que el fármaco activo llegue al núcleo. Sin embargo, si la clave es la membrana extracelular, la activación intracelular reduciría la toxicidad del fármaco. Aunque la HRP puede ser producida por periodos más largos

siguiendo la estrategia GDEPT, en comparación con ADEPT y PDEPT, en los que los niveles de la enzima pueden ser demasiado bajos para producir suficiente fármaco activo para causar toxicidad. Esta orientación del gen a una célula tumoral mediante la entrega selectiva de genes y expresión, eliminaría la posibilidad del daño tisular causado por la sobreexpresión de la HRP. La secuencia del gen de HRP ya ha sido elucidada y expresada en células bacterianas (Smith *et al*, 1990) y células de mamíferos (Connolly *et al*, 1994; Greco *et al*, 1999). La representación de esta terapia tomando en cuenta los aspectos ya señalados, se muestra en la figura 28, en la cual se emplea la terapia AIA/HRP.

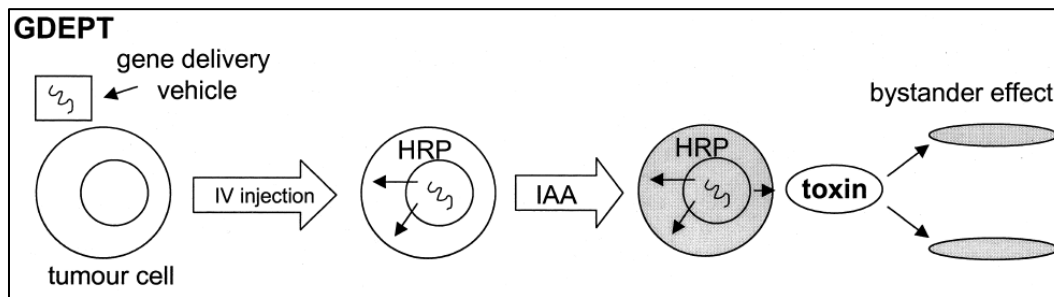


Figura 28. Representación de la terapia enzima/profármaco dirigida por genes (GDEPT), empleando a la HRP y al AIA (Folkes y Wardman, 2001).

El AIA ha demostrado ser un profármaco con un potencial interesante, ya que su toxicidad es baja, y solo se presenta cuando es activado por la HRP a diversas citotoxinas, las peroxidasa endógenas de los mamíferos resultan ser ineficientes comparada con la acción catalítica de la enzima HRP; la naturaleza robusta de la reacción catalizada por la HRP y la baja toxicidad que presenta el profármaco forman en conjunto una atractiva base para en combinación presentar una propuesta con fines de éxito empleada en terapia tumoral dirigida.

HIPÓTESIS

Con la obtención de un nanomaterial tipo SBA-15 fotoactivo, compuesto de nanopartículas de sulfuro de cadmio (nP-CdS) y peroxidasa de rábano picante (HRP), el sistema obtenido será capaz de catalizar la reacción de oxidación del ácido 3-Indolacético, para que este pueda ser usado en terapia fotodinámica *in situ* contra células cancerosas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener un nanomaterial compuesto de peroxidasa de rábano blanco (HRP), ácido 3-indolacético (AIA) y nanopartículas de sulfuro de cadmio (nP-CdS) catalíticamente activas mediante luz, empleando al material mesoporoso SBA-15 como soporte de todos estos componentes.

Objetivos Particulares

- Sintetizar nanopartículas semiconductoras (nP-CdS) en solución mediante el método de microemulsiones invertidas.
- Caracterizar a las nanopartículas obtenidas por métodos espectroscópicos.
- Inmovilizar las nanopartículas en materiales mesoporosos SBA 15 por adsorción física
- Inmovilizar en un mismo soporte a la enzima HRP covalentemente en el material mesoporoso.
- Evaluar la capacidad de las NP's libres e inmovilizadas para activar a la enzima peroxidasa en la oxidación del ácido indolacético.
- Caracterización cinética del nanomaterial.
- Evaluar *in vitro* la respuesta del empleo de nanopartículas sulfuro de cadmio fotoactivas (nP-CdS), peroxidasa de rábano picante (HRP) y el ácido 3-indolacético (AIA), en terapia fotodinámica contra células de cáncer mamario de la línea celular MCF-7.
- Determinar el potencial de diversas enzimas peroxidases, con capacidad de oxidar al ácido 3-Indolacético, de ser activadas mediante el empleo de nP-CdS activadas por luz ultravioleta.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Reactivos

Reactivo	Peso Molecular y Pureza	Proveedor
Peroxidasa de rábano blanco picante (HRP)	250-330 u/mg**	SIGMA-ALDRICH®
Microperoxidasa (MP-11)	1.861 kDa	SIGMA-ALDRICH®
Citocromo c peroxidasa (CYP c)	12.384 kDa	SIGMA-ALDRICH®
Peroxidasa de soya (SbP)	40.662 kDa	SIGMA-ALDRICH®
Cloroperoxidasa (CPO)	42 kDa	
Ácido 3-Indolacético (AIA)	175.18, 98%	SIGMA-ALDRICH®
Ampliflu™ Red *	257.24, 98%	SIGMA-ALDRICH®
Perclorato de cadmio hidratado	311.31, 99.9%	SIGMA-ALDRICH®
Sulfuro de sodio nonahidratado	240.18, 99.9%	SIGMA-ALDRICH®
Diocil sulfosuccinato de sodio (AOT)	444.55, 99.9%	SIGMA-ALDRICH®
Ácido mercaptoacético	92.12, 98%	SIGMA-ALDRICH®
3-aminopropiltrióxido de silano (APTES)	221.37, 98%	SIGMA-ALDRICH®
Fosfato de sodio dihidrogenado dihidratado	268.07, 98%	MERCK
Fosfato de sodio monohidrogenado	137.99, 99%	VWR
Piridina	79.10, 99%	BAKER
Heptano	100.20, 99.8%	ACROSS
Butanol	74.12, 99.5%	ACROSS
2-propanol	60.1, 99%	FLUKA
Metanol	32.04, 99.8%	FLUKA
Acetato de etilo	88.11, 98%	FLUKA
Ninhidrina	178.14, 99%	BAKER

* Ampliflu™ Red es el nombre comercial para el compuesto 10-Acetil-3,7-dihidroxifenoxazina asignado por la compañía Sigma Aldrich. ** Siendo una unidad la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μ mol de Pyrogallol (bencen-1,2,3-triol) por minuto.

3.2 Metodología Experimental

3.2.1 Síntesis de nP-CdS

Para este punto se siguió la metodología reportada usando el método de micelas inversas (Gandubert *et al*, 2008). Como se describe a continuación:

1. La microemulsión se prepara disolviendo 2.8 g de AOT (Docusate sodium salt), en 40 mL de heptano y agregando también 0.8 mL (800 μ L) de agua destilada. A esta mezcla le denominaremos “Solución A”.

2 La “Solución A” se divide en dos viales, de la siguiente manera:

a) 24.4 mL de “Solución A”, y agregar 96 μ L de perclorato de cadmio ($\text{Cd}(\text{Cl})_4$)₂ 1M.

b) 16.4 mL de “Solución A”, y agregar 64 μ L de sulfuro de sodio (Na_2S) 1 M.

3. Se procede agitar ambas soluciones, durante 30 minutos.

4. Se detiene la agitación y se mezclan ambas soluciones; una vez hecha la mezcla, esta se mantiene en agitación durante 60 minutos, pero empleando un baño de hielo y bajo una atmósfera de nitrógeno. A esta mezcla le denominaremos “Solución B”.

5. Después se agregan 64 μ L de ácido mercaptoacético a la “Solución B” y se deja agitando durante 8 horas en baño de hielo bajo atmósfera de nitrógeno.

6. Inmediatamente después se añaden lentamente 10 mL de piridina, sin dejar de agitar, hasta que precipiten todas las nanopartículas.

7. La mezcla se transfiere a un embudo de separación, para lograr la correcta separación de las fases que se forman y solo resta esperar a que se separen las fases.

8. La fase importante es la que se sitúa en la parte de abajo, en ella se aprecian a simple vista las nP-CdS, así que con ayuda de un embudo con filtro y membrana, se procede a filtrar solamente a la fase en la que se encuentran las nanopartículas.

9. Se lavan consecutivamente empleando 14 mL de heptano, butanol, isopropanol y metanol.

10. Se dejan secar y se disuelven después en 10 mL de Buffer de Fosfatos 60 mM + 50mM NaCl, pH 7.

11. Para quitar trazas y pelusas, se centrifuga a 2000 rpm por un lapso de 2 minutos.

12. La solución se guarda en un vial protegido de la incidencia de luz a 4°C.

3.2.2 Caracterización de las nanopartículas

Espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia.

Una alícuota de 0.10 ml (100 µL) de nanopartículas en solución se coloca en la celda de cuarzo, y se diluye con solución amortiguadora de fosfatos 60 mM + 50mM NaCl, pH 7 hasta 3 ml. La dilución se realiza para evitar absorbividades mayores a 1. Posteriormente se traza el espectro de UV-Vis en un rango de 200 a 800 nm y de fluorescencia en el rango de 350 a 750 nm. En la espectroscopia de fluorescencia, la muestra fue tratada a una longitud de onda de excitación de 383 nm y la emisión fue leída desde 400 a 800 nm.

3.2.3 Actividad de las nP-CdS en solución

La actividad enzimática del sistema empleando nP-CdS en solución, se encuentra basado en la reacción de conversión del Ampliflu™ Red. La actividad de la peroxidasa de rábano activada por nanopartículas se realizó como a continuación se describe: en una celda de cuarzo de 3 mL, se colocan los componentes de la reacción en el siguiente orden: 2.926 µL de solución amortiguadora de fosfatos 60 mM pH 6, 15 µL de enzima HRP [stock 79.12 µM], 44 µL de nP-CdS [stock 270 µM] en solución (se calculó la relación en concentración enzima-nP-CdS 1:10) y por último se adicionan 5 µL de sustrato Ampliflu™ Red [stock 2mM]. La celda se coloca rápidamente dentro del espectrómetro de fluorescencia el cual monitorea la formación de producto por su longitud de onda de emisión a 585 nm, excitando a 450 nm con un slit de emisión y excitación de 5. La reacción se inicia irradiando con luz UV a una longitud de onda a 365 nm. Los experimentos se realizan en dos modalidades diferentes:

a) La reacción se monitorea con el equipo de fluorescencia mientras la lámpara UV se mantiene encendida hasta la conversión total del sustrato.

b) Reacción se modula con intervalos de encendido (5 min) y apagado (5 min) de la lámpara.

3.2.4 Actividad de la HRP en solución contra AIA

Para llevar a cabo la caracterización de la oxidación catalítica del AIA se emplearon dos variantes de experimentación:

1) **Empleando peróxido de hidrógeno como fuente de especies reactivas de oxígeno.** La reacción consiste en colocar los componentes de la reacción en una celda de cuarzo de 3 mL, los cuales son: solución amortiguadora de pH 6.5, enzima HRP (stock 79.12 μM), peróxido de hidrógeno (stock 200 mM), 10% de isopropanol y por último se adiciona el sustrato (AIA), empleando diferentes concentraciones de este último. La celda se coloca dentro del fluorímetro el cual monitorea la desaparición de la señal del sustrato por su longitud de onda de emisión a 365 nm, excitando a 280 nm.

2) **Empleando nanopartículas de sulfuro de cadmio.** La reacción se lleva a cabo como de igual manera en que se describió mediante el uso de peróxido de hidrógeno, exceptuando el uso del mismo, ya que, ahora las nanopartículas serán las encargadas de suministrar a la reacción especies reactivas de oxígeno. Para estas pruebas en particular siempre se mantuvo una relación HRP:nP-CdS de 1:10. Para ello se pusieron en la celda de reacción 15 μL de HRP [stock 79.12 μM], y también se colocaron 44 μL de nP-CdS [stock 270 μM] en solución, para obtener una concentración final de HRP y nP-CdS de 0.396 y 3.96 μM respectivamente.

3.2.5 Modificación del material SBA-15

Se colocan 100 mg de material SBA-15 en un vial de 40 mL. Para silanizarlo, se adicionan 2 mL de amino-propil-trietoxisilano y 8 mL de metanol, se deja en reacción en agitación continua por 24 horas para después separar el SBA del medio de reacción por centrifugación a 10,000 rpm durante 3 minutos, el centrifugado se lava con metanol, repitiendo el procedimiento 10 veces con la finalidad de retirar el reactivo que no reaccionó. Al final el mesoporoso fue secado empleando nitrógeno. Con este sencillo procedimiento el mesoporoso se funcionalizó con un grupo amino reactivo en la superficie, el cual se comprobará por FT-IR.

3.2.6 Inmovilización de la enzima HRP en el material SBA-15 modificado

Con el propósito de inmovilizar a la enzima en el material mesoporoso se procedió a la incubación de 30 mg del material funcionalizado, agregándole a este 0.300 mL de la HRP [stock 79.12 μM] y 0.700 mL de solución amortiguadora de fosfatos 60 mM pH 6.5; se sometió a incubación por un periodo de 4 horas en agitación continua, a 4 °C con la finalidad de evitar la desnaturalización de la enzima.

Pasado el tiempo de reacción, se centrifuga a 9500 rpm durante 3 min y se lava con 1 mL de solución amortiguadora pH 6.5 por diez veces y se le retira el sobrenadante, para retirar a la enzima que no fue adsorbida. La cantidad de enzima adsorbida en el sistema se cuantifica por diferencia determinando por espectroscopia UV-Vis la enzima no adsorbida.

3.2.7 Inmovilización de las nanopartículas de sulfuro de cadmio en el sistema SBA-15-HRP.

El total del volumen (30 mg/ 1mL) del sistema del mesoporoso-HRP originado por la inmovilización de la HRP se colocó en un vial, y se agregaron 70 μL de la solución stock de nP-CdS [270 μM] y se sometió a incubación por un periodo de 4 horas en agitación continua, a 4 °C, con la finalidad de evitar la desnaturalización de la enzima. Después se realizaron lavados por centrifugación a 6000 rpm durante 3 minutos con solución amortiguadora de fosfatos 60 mM pH 7 la cual también contenía una concentración 50 mM de NaCl. Se tomó un espectro de UV-Vis en cada lavado para cuantificar el total de nanopartículas adsorbidas.

Además se llevó a cabo la inmovilización de nanopartículas en SBA-15 funcionalizado pero sin que este hubiese tenido contacto con la HRP, es decir, obtener así un sistema SBA-15 conformado únicamente por nP-CdS adsorbidas dentro de sus poros. Para llevar a cabo lo antes mencionado se realizaron dos incubaciones consecutivas empleando 1 mL de solución stock de nanopartículas [stock 285 μM] en cada incubación, y después realizar en cada una de ellas el mismo procedimiento descrito anteriormente para realizar los lavados por centrifugación, y así nuevamente poder cuantificar el total de nanopartículas inmovilizadas. Todo ello con el fin de que ahora este sistema SBA-15-nP-CdS estuviera saturado con nanopartículas fotoactivas.

3.2.8 Actividad del sistema híbrido de SBA-15-nP-CdS-HRP

La actividad catalítica del sistema se evaluó empleando dos sustratos diferentes, el Ampliflu™ Red y al ácido 3-Indolacético. Para las pruebas empleando al Ampliflu™ Red, en una celda de cuarzo de 3 mL, se colocan los componentes de la reacción en el siguiente orden: 2.98 mL de solución amortiguadora de fosfatos 60 mM pH 6.5, 15 µL del sistema híbrido SBA-15-nP-CdS-HRP (las concentraciones de enzima y nanopartículas en el material fueron de 4.32×10^{-5} mmoles/mg y 3.6×10^{-4} mmoles/mg respectivamente), (poner concentración) y por último se adicionan 5 µL de sustrato Ampliflu™ Red [stock 2mM]. La celda se coloca rápidamente dentro del espectrómetro de fluorescencia el cual monitorea la formación de producto por su longitud de onda de emisión a 585 nm, excitando a 450 nm. La reacción se modula con intervalos de encendido (5 min) y apagado (5 min) de la lámpara UV.

3.2.9 Actividad del sistema SBA-15- nP-CdS

Para medir la actividad enzimática de este sistema saturado de nP-CdS, se colocan en la celda de cuarzo: un volumen de 14.74 µL de la suspensión del material SBA-15-nP-CdS [stock 280.5 µM en nanopartículas] y 2.668 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, la boca de la celda se cubre con parafilm para evitar escurrimientos, se procede a colocarla en un sistema de agitación, siendo irradiada por 5 minutos con luz ultravioleta a una distancia de la lámpara de aproximadamente 25 cm, después de la irradiación se toma todo el volumen y se traspasa a un tubo tipo eppendorf y se centrifuga por 5 minutos a 9500 rpm, el sobrenadante fue tomado solamente y puesto en una celda de cuarzo nueva y limpia, a la cual se agregaba la concentración del indolacético deseada y al final 16.62 µL de enzima HRP [stock 74.7 µM], esta operación se repite para los triplicados de cada una de las concentraciones que se emplearon del AIA.

3.2.10 Pruebas de viabilidad celular

3.2.10.1 Cultivo celular

Para la realización del presente trabajo se utilizaron células MCF-7 (Nº-ATCC: HTB-22). Las MCF-7 son células tumorales de mama que se convirtieron a una línea celular estable, obtenidas de efusión pleural de una mujer caucásica que tenía 69-años con carcinoma mamario metastásico después de radio- y hormonoterapia. Las células de esta línea celular adherida de cáncer de mama son tipo epiteliales, las cuales crecen en monocapas. Se

duplican durante aproximadamente 50 horas (rango de 30-70 horas) dependiendo de la manera de cultivarlas y la composición del medio cultivo. Para las pruebas con las MCF-7, estas fueron sembradas el primer día de cada experimento con una densidad de $4.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$, para así poder obtener una buena cantidad de células viables para llevar a cabo una serie de experimentos previamente planeados.

Como medio de cultivo para el crecimiento de las células cancerosas se empleó medio de cultivo “Modified Eagle’s Medium (MEM)”, suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal, inactivado por calor), 1% penicilina/estreptomicina (P/S) de una solución que contiene 10000 U/mL penicilina, 10000 mg/mL estreptomicina (=100x), 1 mM piruvato de sodio (P) y opcional 0.1 mM aminoácidos no esenciales (NEA). El MEM contiene las sales de Earle (Earle’s salt), que incluyen 292 g/L L-Glutamina, 1 g/L Glucosa, 2.2 g/L NaHCO_3 .

Para preparar medio de cultivo completo hay que mezclar:

- 500 mL MEM (11095-072 Life Technology)
- 50 mL FBS (16000044 Life Technology)
- 5 mL P/S (1670249 MP Biomedicals)
- 5 mL Piruvato de sodio 1 mM (100 mM 58636 Sigma Aldrich)
- 5 mL NEA (aminoácidos no esenciales) 0.1 mM (100x, TMS-001-C-Millipore)

Para obtener el número de células necesarias para llevar a cabo las experiencias, para llevar a cabo su crecimiento estas se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C , manteniendo una atmosfera con 5% de CO_2 por casi 4 días en los cuales se había determinado (conteo celular) que la densidad de la población celular era la óptima.

3.2.10.2 Estudio de viabilidad /proliferación celular con el reactivo WST-1

Para evaluar *in vitro* la respuesta del empleo del nanomaterial en terapia fotodinámica contra células de cáncer mamario de la línea celular MCF-7, mediante el efecto citotóxico de la oxidación del ácido 3-indolacético, este fue valorado empleando el método WST-1 de Roche, el cual consiste en una determinación colorimétrica de la actividad metabólica y de la proliferación celular, en cual la sal soluble de tetrazolio (WST-1) se convierte a

formazán, mediante la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células viables (el mecanismo general se ilustra en la figura 29, produciéndose un cambio de color. A mayor proliferación, mayor actividad mitocondrial, que se traduce en una mayor hidrólisis del reactivo WST-1, dando una coloración que se detecta a 450 nm.

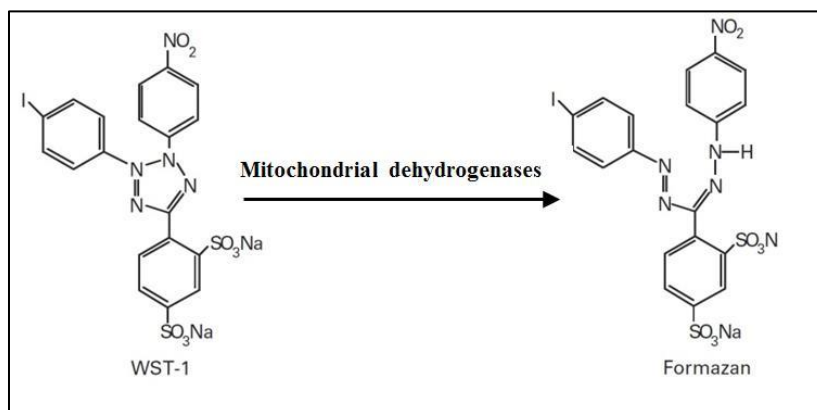


Figura 29. Mecanismo general de la reacción para identificar células viables empleando el ensayo WST-1.

Para llevar a cabo la experiencia, las células se incubaron en una placa de 96 pocillos 1.28 x 10⁴ células/pocillo; las células, fueron tratadas con diferentes concentraciones del AIA (10 μM, 100 μM y 1000 μM), empleando los sistemas: SBA-15-nP-CdS-HRP, SBA-15-nP-CdS y al material SBA-15NH₂. Para estos sistemas la metodología empleada fue la siguiente:

- Sistema **SBA-15-nP-CdS-HRP**. En un tubo tipo falcon, se agregan en condiciones estériles 3 mL de MEM, 30 mg del material híbrido SBA-15-nP-CdS-HRP, 1000 μM de AIA, 0.3 mL de 2-propanol; todo el sistema obtenido se somete a irradiación con luz UV a una longitud de onda de 365 nm, a una distancia de ~25 cm durante 3 minutos 24 segundos (inciso b de la figura 30). Posterior a su irradiación se centrifuga durante 5 minutos a 1200 rpm, para depositar en 3 pocillos 100 μL del sobrenadante en cada uno de ellos.
- Sistema **SBA-15-nP-CdS**. En un tubo tipo falcon, se agregan en condiciones estériles 3 mL de MEM, 30 mg del material híbrido SBA-15-nP-CdS (material saturado de nP-CdS), 1000 μM de AIA, 0.3 mL de 2-propanol y finalmente 22.5 μM de HRP; todo el sistema obtenido fue sometido a irradiación bajo las mismas condiciones que el anterior (inciso a de la figura 30). Al finalizar se centrifuga

durante 5 minutos a 1200 rpm, para depositar en 3 pocillos 100 μ L del sobrenadante en cada uno de ellos.

- Material **SBA-15NH₂**. En un tubo tipo falcon, se agregaron en condiciones estériles 3 mL de MEM, 30 mg del material SBA-15-NH₂, 1000 μ M de AIA, 0.3 mL de 2-propanol; el sistema fue irradiado con luz UV (inciso c de la figura 30). Al finalizar se centrifuga durante 5 minutos a 1200 rpm, para depositar en 3 pocillos 100 μ L del sobrenadante en cada uno de ellos.

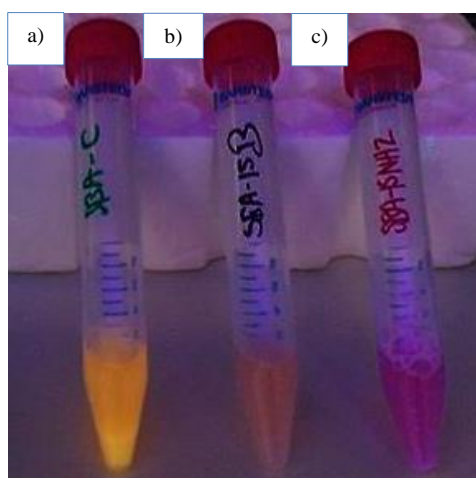


Figura 30. Sistemas: a) SBA-15-nP-CdS, b) SBA-15-nP-CdS-HRP y c) SBA-15NH₂, bajo irradiación con luz ultravioleta (365 nm).

Con respecto a las mezclas de los componentes principales (nP-CdS, HRP y AIA) sin ser inmovilizados en el SBA-15, las concentraciones empleadas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Mezclas de los componentes empleados para las pruebas in vitro contra células MCF-7 de cáncer de mama.

MEZCLA	HRP [μ M]	nP-CdS [μ M]	RELACIÓN nP-CdS:HRP 1:	AIA [μ M]
I	0.14	1.4	10	100
II	0.7	7	10	100
III	0.7	7	10	10

Otro tratamiento más se llevó a cabo agregando 100 μ M de una solución que contenía los productos de la reacción de oxidación del AIA (véase sección 3.2.11) empleando nP-CdS y a la HRP, los cuales fueron disueltos en 1 mL de 2-propanol.

Los efectos del tratamiento a la viabilidad fueron determinados a 24 y 48 horas después del tratamiento. Tras estos periodos de tiempo se añaden 7 μL /pocillo del reactivo WST-1 (Roche) y se mantienen durante 2 horas a 37 °C. Las lecturas de la absorbancia a 450 nm se llevaron a cabo empleando al equipo Multiskan FC, colocando las placas de 24 y 48 horas para su lectura (ver figura 31). Los resultados se expresan como actividad metabólica relativa (actividad de la deshidrogenasa mitocondrial).



Figura 31. A la Izquierda se muestra el equipo Thermo Scientific Multiskan FC: fotómetro de microplacas, a la derecha soporte para colocar las placas de 96 pocillos para las lecturas en el equipo.

3.2.11 Obtención e identificación de los productos de la oxidación del AIA

Para la obtención de los productos de la reacción de oxidación del AIA empleando nP-CdS, en un matraz se colocaron 0.25 mL de sustrato AIA [2 mM], 0.5 mL de isopropanol, 2.051 mL de nP-CdS [270 μM], 0.7 mL de HRP [79.12 μM] y 1.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 para completar un volumen de reacción de 5 mL, cabe señalar que la relación HRP:nP-CdS fue 1:10. La reacción se llevó a cabo a 25 ° C y en agitación constante, y se rastreó la señal del AIA por medio de espectroscopia de fluorescencia tomando una pequeña muestra del volumen reaccionante hasta que la señal del sustrato desapareciera completamente, haciendo constar que la conversión del mismo fuese del 100%. Para extraer el o los productos de la reacción, se utilizó acetato de etilo seco y desgasificado, realizando varias extracciones con este para poder obtener la máxima concentración de productos, posteriormente la fase acuosa se desechó y el acetato de etilo fue llevado al rotavapor empleando una temperatura de 77 ° C (punto de ebullición del acetato de etilo) y realizando vacío, para evaporar la mayoría del solvente, el crudo de reacción se fue concentrando cada vez más lo que se hizo notar con un cambio de

coloración en la solución obtenida; cuando el volumen restante en el que se encontraban concentrados el o los productos de reacción fue de 1 mL se retiró del equipo de destilación y el resto del acetato de etilo fue evaporado con nitrógeno gaseoso, la muestra obtenida fue resguardada en un desecador y evitando siempre su contacto con luz natural o artificial. La muestra fue enviada al laboratorio de adsorción y cromatografía del centro de química del ICUAP para su análisis con la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) para identificar los posibles productos obtenidos bajo estas condiciones y empleando a la enzima HRP.

La misma metodología fue empleada para obtener la conversión del 100% AIA pero empleando H₂O₂, tomando en cuenta el hecho de que se necesitaron 500µL de una solución [200 mM] de H₂O₂.

3.3 Instrumentación analítica

Las diferentes caracterizaciones así como los experimentos fueron realizados en:

- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian modelo Cary Eclipse. Software: Cary Eclipse, 2000. El equipo de fluorescencia cuenta con una lámpara de xenón de alto poder la cual refleja en los resultados una excelente sensibilidad y bajo ruido en las mediciones.
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Varian, modelo Cary-50 Conc. Software: Win UV, 2000. Cuenta con una lámpara de xenón, con un rango máximo de escaneo de 24,000 nm por minuto, brinda una alta sensibilidad.
- Espectrofotómetro FT- IR marca Digilab modelo Scimitar Series. Software: Digilab Merlin 3.3
- Lámpara de mano marca Spectroline, modelo XX-15NF, con longitudes de onda de 365 nm y 325 nm.
- Fotómetro de microplacas marca Thermo Scientific Multiskan FC, con un rango de longitud de onda de 340 a 850 nm, filtros estándar de 405, 450 y 620 nm preinstalados y soporte de placas adaptado a sistemas robotizados para placas de 96 y de 384 pocillos.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Síntesis de nP-CdS

La técnica de microemulsiones inversas es un método el cual mostró ser eficaz al obtener tras llevar a cabo la metodología ya establecida por Rajendran y col. un precipitado amarillo (inciso “a” de la figura 32) que al disolver en solución amortiguadora produjo una solución de color amarillo, la presunta disolución que contiene a las nP-CdS se muestra en el inciso “b” de la figura 32.

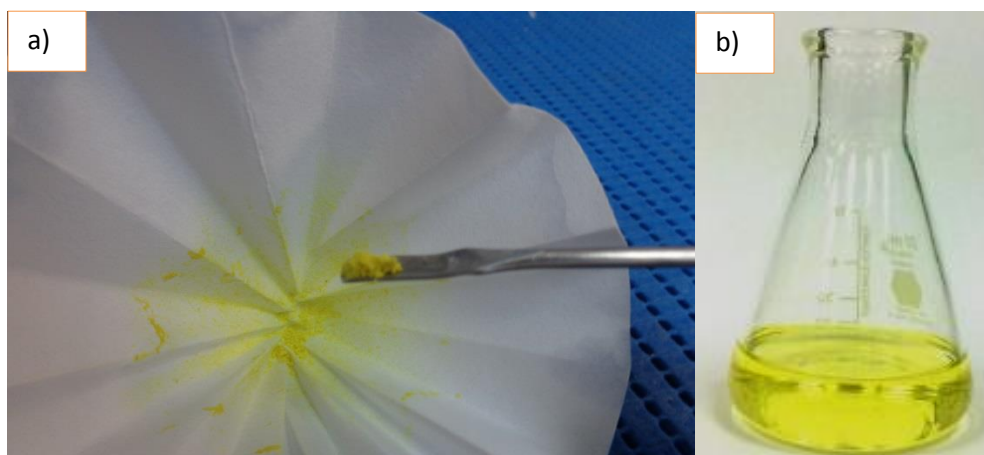


Figura 32. a) Precitado obtenido al final de la síntesis de nP-CdS por el método de microemulsiones inversas y b) Solución de nanopartículas de sulfuro de cadmio obtenida a partir de la solvatación con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.60 mM.

A continuación se procederá a verificar si la solución obtenida concuerda con las características ya reportadas, a partir de la comparación de los espectros electrónicos de fluorescencia y absorción UV-vis con los ya reportados (Ipe y Niemeyer, 2005; Rajendran *et al*, 2009).

4.2 Caracterización de las nanopartículas

4.2.1 Espectroscopía UV-Vis

En la figura 33 se ilustra el espectro electrónico de absorción obtenido. Este espectro obtenido coincide con el reportado para nanopartículas de sulfuro de cadmio producidas empleando la metodología de microemulsiones inversas (Ipe y Niemeyer, 2005). A partir de los datos de absorbancia es posible determinar el tamaño de la nanopartícula usando el

modelo de masa efectiva, que relaciona el cambio en la brecha de energía respecto del radio de la partícula (Brus, 1986).

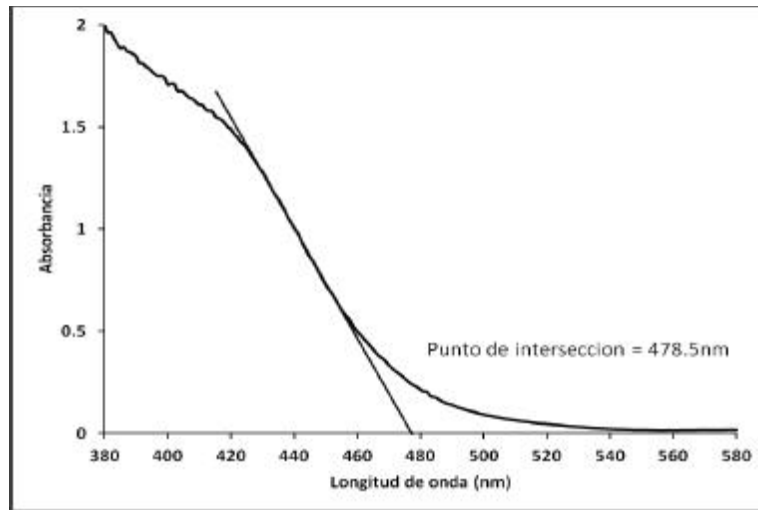


Figura 33. Espectro UV-Vis de las nP-CdS.

El modelo se describe con la ecuación 1.

$$E = E_g + \frac{h^2}{8m_e R^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1,8e^2}{4\pi\epsilon_\infty\epsilon_0 R} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde:

E Es la brecha de energía de Joules de la nanopartícula determinada experimentalmente a partir del espectro UV-vis obtenido.

E_g es la brecha de energía de las nP-CdS a temperatura ambiente igual a 3.8768×10^{-19} J

h es la constante de Planck: 6.63×10^{-34} Js

r es el radio de la partícula en metros

m_e es la masa efectiva del electrón en la banda de conducción en el material semiconductor de CdS: 1.73×10^{-31} kg

m_h es la masa efectiva del hueco en la banda de valencia del CdS: 7.29×10^{-31} kg

e es la carga del electrón: 1.6×10^{-19} C

ϵ_{∞} Es la permitividad relativa o constante dieléctrica de CdS: 5.7

ϵ_0 Es la permitividad determinada al vacío: $8.85 \times 10^{-12} \text{ C}^2/(\text{N}\cdot\text{m}^2)$

La diferencia de energía entre el estado basal de un electrón (banda de valencia) y el estado de excitación (banda de conducción) llamada brecha de energía, varía en función del tamaño de nanopartícula. A partir del espectro electrónico de ultravioleta, es posible determinar esta brecha (E).

Basándonos en el método de masa efectiva (Brus, 1986), se aplicó el método de regresión lineal para calcular la ecuación de la recta mostrada en la figura 4.2.1 y con ello también calcular, el punto de intersección con el eje de las abscisas: 478.5 nm. Dividiendo este valor (por su equivalente en metros) por la constante de la velocidad de la luz (c) y la constante de Planck (h) obtuvimos el valor de la brecha de energía $E = 4.151 \times 10^{-19} \text{ J}$.

El punto de intersección obtenido a partir del espectro de UV-vis se correlaciona directamente al tamaño de nanopartícula obtenida en la síntesis antes descrita, estas relaciones donde se determina la relación inversamente proporcional entre la brecha de energía (E) y el tamaño de partícula a través de un estudio de caracterización de nanopartículas de CdS a diferentes tamaños son ampliamente descritas por especialistas en el tema (Vossmeier *et al*, 1994).

Reacomodando la ecuación 1 para determinar el radio de partícula en función del valor experimental de E se obtuvo un valor de **5.36 nm** para el tamaño de la nanopartícula. Este valor no concuerda con lo reportado con el mismo método de síntesis realizado por Gandubert y colaboradores en 2008 (Gandubert *et al*, 2008), así como Rajendran y colaboradores en 2009 (Rajendran *et al*, 2009 y 2010), quienes encontraron un tamaño de 3.4 nm de diámetro. Esto puede deberse a que estas nanopartículas pudieron haberse aglomerado.

4.2.2 Espectroscopia de fluorescencia

Posteriormente se midió su espectro de emisión de fluorescencia. En la figura 34 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de CdS con una longitud de absorción máxima en 614 nm.

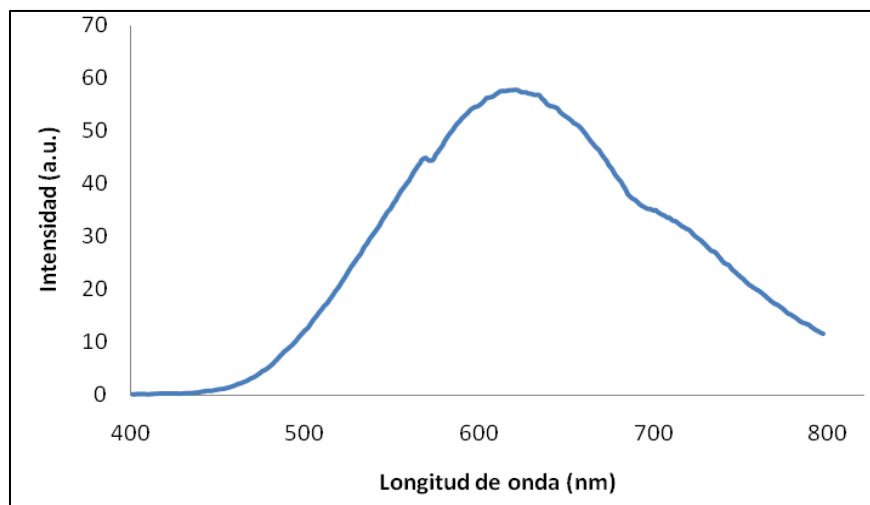


Figura 34. Espectro de emisión de las nanopartículas de CdS

Aunque este resultado es diferente al reportado por Rajendran y colaboradores (Rajendran *et al*, 2009) para nanopartículas de CdS con recubrimiento de ácido mercaptoacético, de nuevo, esto es muy probablemente debido a la diferencia en tamaño reportada anteriormente o a que se esté realizando una medición con agregados de nanopartículas. Sin embargo, como se mostrará en las secciones en las que se evaluó la actividad de las nanopartículas obtenidas los resultados avalan que estas sí presentan actividad.

4.3 Actividad de las nP-CdS en solución

Como ya se había hecho mención las nP-CdS tienen la característica de que bajo irradiación con luz UV es posible originar especies reactivas de oxígeno; estas especies formadas son consumidas por enzimas como las peroxidasas (Fruk *et al*, 2007), y estas a su vez son capaces de catalizar la oxidación de diversos tipos de sustratos.

Para determinar si las nanopartículas sintetizadas eran capaces de ser activadas por luz UV y estas generasen radicales libres que pudieran servir de “combustible” para que la peroxidasa de rábano pudiera llevar a cabo su acción catalítica, la actividad enzimática se determinó siguiendo la cinética de la oxidación de Ampliflu™ Red (N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) por medio de espectroscopia de fluorescencia, este sustrato se utilizó debido a que en presencia de peroxidasas reacciona 1:1 con el H₂O₂, obteniendo como producto de la reacción a la resorufina, la reacción se ilustra en la figura 35, en la cual la HRP usa a este sustrato como un donador de electrones durante la reducción del peróxido de hidrógeno, el cual se convierte en agua (BioTek Instruments, 2006). Este ensayo es

ampliamente utilizado para detectar actividad de peroxidasas con alta sensibilidad (Zhou *et al.*, 1997).

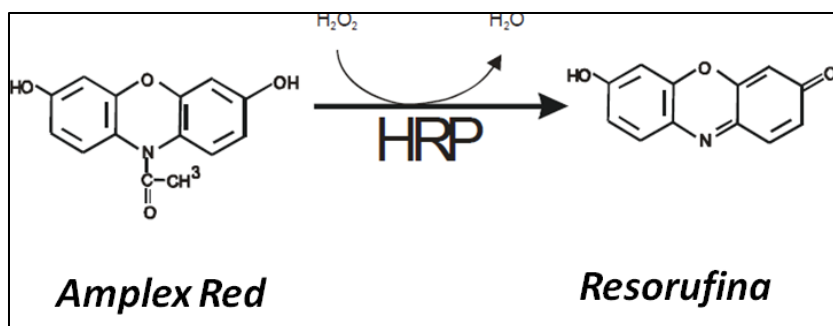


Figura 35. Conversión de Ampliflu™ Red en resorufina por la HRP.

En la figura 36 se muestra el resultado de la cinética de oxidación del Ampliflu™ Red medida en el equipo de fluorescencia, donde los parámetros para rastrear la formación de resofurina fueron a una longitud de onda de emisión de 587 nm, excitando a 450 nm. La conversión total del sustrato se logró aproximadamente a los 35 minutos de haber comenzado la reacción.

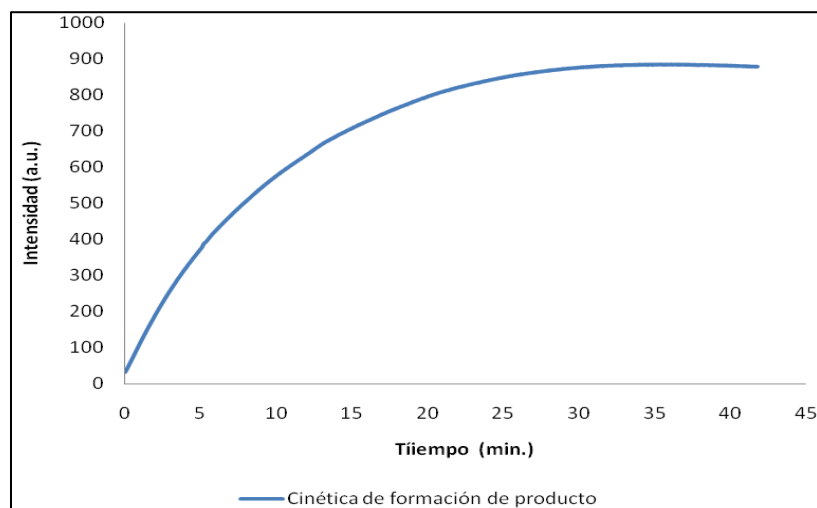


Figura 36. Actividad catalítica del sistema nP-CdS-Enzima-Sustrato

Para asegurarnos que la reacción es activada por la luz se encendió y apagó la lámpara durante varios intervalos, como se muestra en la figura 37.

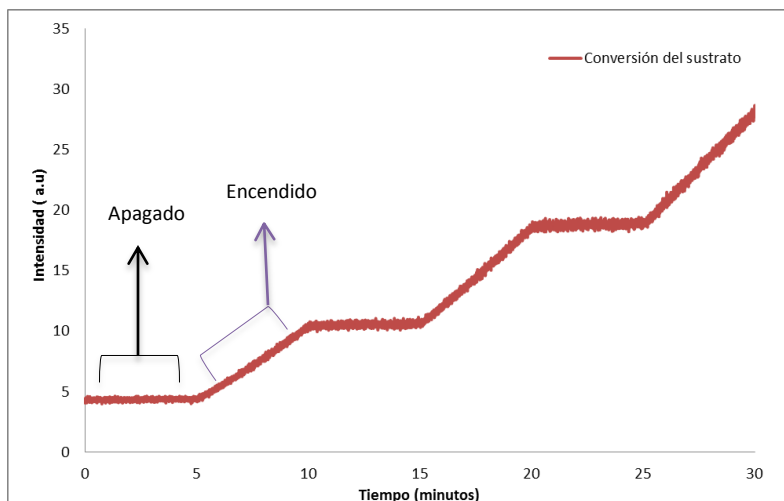


Figura 37. Cinética por intervalos de conversión del sustrato (*Ampliflu™ Red*) con nP-CdS en solución.

Los resultados obtenidos tras la irradiación del sistema nos muestran que cuando la lámpara de luz ultravioleta se mantiene encendida, inmediatamente comienza un incremento en la intensidad de fluorescencia, lo cual es el resultado de la formación de la resofurina. Por el contrario, cuando la lámpara se apaga, la producción de especies reactivas se detiene y esto trae como consecuencia que la actividad catalítica de la HRP se detenga casi inmediatamente trayendo como consecuencia la completa detención de la reacción de conversión del sustrato.

Las reacciones típicas, en las que la HRP es utilizada conllevan a la conversión completa del sustrato en un cierto tiempo determinado y bajo condiciones específicas, la activación de esta enzima inducida por luz permite la modulación en la conversión del sustrato mediante la irradiación del sistema de reacción.

4.3.1 Determinación de las constantes cinéticas del sistema empleando HRP en solución y otras peroxidasas contra AIA

En la catálisis enzimática se utilizan diversos métodos para estudiar el mecanismo y la caracterización de las enzimas, no obstante, el método principal para estudiar los principales parámetros de una reacción catalizada enzimáticamente consiste en la determinación de la velocidad de reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales.

Medir el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de una enzima no es sencillo, si pensamos que lógicamente la concentración del sustrato disminuye según avanza la reacción. Una simplificación en los experimentos cinéticos consiste en medir la velocidad inicial (V_o), la curva que representa la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad inicial (V_o) tiene la misma forma genérica para la mayoría de las enzimas, este comportamiento es de tipo hiperbólico y se describe con la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2). Donde, V_{max} es la velocidad máxima de conversión de sustrato que puede alcanzar la enzima, K_m es la constante de Michaelis, y se define como la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la V_{max} , $[S]$ es la concentración de sustrato y V_o es la velocidad de reacción a determinada concentración de sustrato.

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 2.

La velocidad inicial (V_o) se debe medir al principio de la reacción, cuando $[S]$ es mucho mayor que la concentración de la enzima ($[E]$) a menudo 60 segundos o menos (Lehninger *et al*, 2005).

En muchos casos es de vital importancia conocer estos parámetros cinéticos. En principio, podrían obtenerse de forma poco rigurosa a partir de la curva de Michaelis-Menten, para lo cual sería preciso primero obtener el valor de la V_{max} y después, teniendo en cuenta que la K_m es la concentración a la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima, podríamos obtener su valor. Pero existen métodos gráficos más fiables que facilitan el cálculo preciso de la K_m y la V_{max} .

Los cálculos se hacen en base a transformaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis; una de las expresiones más utilizadas es la representación de Lineweaver-Burk. En esta forma de cálculo se representa $1/V$ frente a $1/S$, esto es la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración (de ahí que también la representación sea conocida como de dobles inversos), así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es $-1/K_m$ y con el eje Y es $1/V_{max}$, siendo la pendiente K_m/V_{max} .

Por estas razones, para determinar los parámetros cinéticos de los dos sistemas, el primero empleando peróxido de hidrógeno y el sistema híbrido compuesto por nanopartículas como donadoras de ROS al medio de reacción, se determinaron únicamente las velocidades iniciales para cada experimento, variando solamente la concentración total de sustrato presente en reacción y realizando cada punto experimental por triplicado. Utilizando el promedio aritmético de cada medición, es posible graficar los datos (figura 38) para después realizar un ajuste tipo Lineweaver-Burk derivado de la ecuación de Michaelis-Menten con el fin de obtener los valores de V_{\max} y K_m .

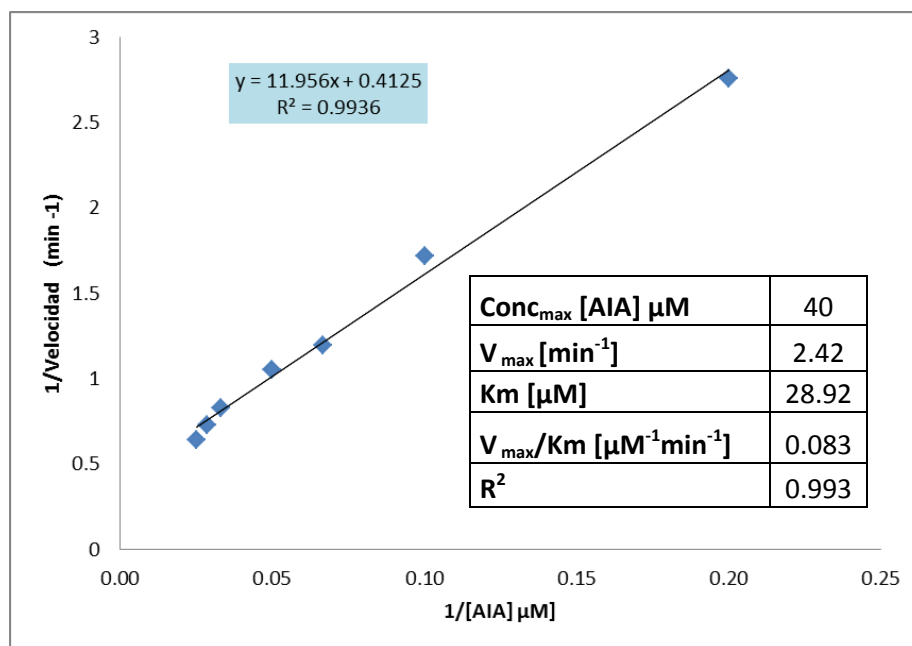


Figura 38. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato para el sistema, empleando H_2O_2 .

El resultado de las mediciones de las velocidades iniciales empleando nP-CdS se muestran en la figura 39.

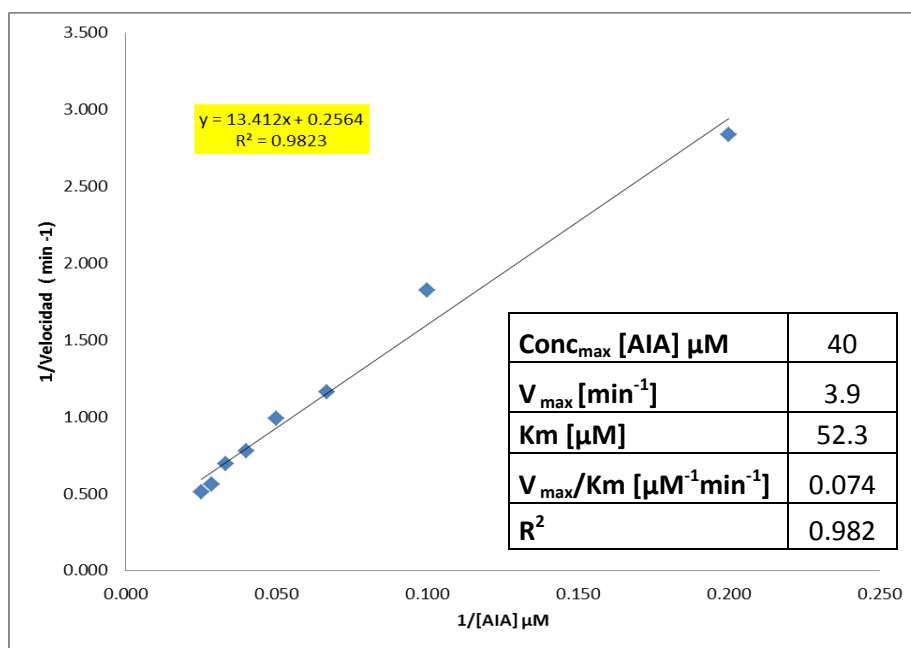


Figura 39. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato para el sistema, empleando nP-CdS.

Para comparar la eficiencia entre los sistemas analizaremos los resultados en los cálculos de cada parámetro cinético. En la tabla 6 observamos que el valor de K_m es considerablemente mayor para el sistema de nP-CdS-HRP-AIA que para el sistema en el que se empleó H_2O_2 . Por otro lado, el valor de la V_{max} es menor para el sistema de H_2O_2 en que para el sistema empleando nanopartículas.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de reacción para obtenidos para sistemas H_2O_2 y nP-CdS en solución.

Parámetro cinético	Sistemas de reacción	
	nP-CdS en solución	Peróxido de hidrógeno
K_m [μM]	52.3	28.92
V_{max} [min⁻¹]	3.9	2.42
V_{max}/K_m [μM⁻¹min⁻¹]	0.074	0.083

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} son generalmente útiles para el estudio y comparación entre sistemas de reacción distintos, el valor de K_m puede variar considerablemente cuando se trabaja con diferentes enzimas e incluso para diferentes sustratos tratándose de la

misma enzima, lo mismo suele pasar con el valor de V_{max} . A veces el término se utiliza como un indicativo de la afinidad de una enzima por el sustrato, sin embargo, el valor real de K_m depende de aspectos específicos del mecanismo de reacción tales como el número y las velocidades relativas de cada paso intermediario en la reacción.

Si bien podemos observar a primera vista que los valores de K_m y V_{max} son casi similares para ambos sistemas, no es posible llegar a una conclusión definitiva con sólo evaluar los valores de K_m y V_{max} individualmente es por ello que es de amplia utilidad el uso de una constante de velocidad más general: la k_{cat} . En la ecuación de Michaelis-Menten la k_{cat} se define como aparece en la ecuación 3.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Ecuación 3.

En este caso en particular, la concentración de enzima fue la misma para todos los experimentos, por lo tanto, se establece la igualdad entre la k_{cat} y V_{max} .

Los parámetros cinéticos la k_{cat} y K_m son generalmente útiles para el estudio y comparación de enzimas. Estos datos reflejan como es el ambiente celular, la concentración de sustrato encontrada por la enzima y la química de la reacción catalizada, también es posible evaluar a partir de estos datos la eficiencia cinética de las enzimas. Sin embargo para tal fin, no es suficiente evaluar sólo uno de los parámetros individualmente. La mejor manera de comparar las eficiencias catalíticas es comparando la relación k_{cat}/K_m para las dos reacciones. Este parámetro es conocido como eficiencia catalítica, en este caso como ya se había especificado a través del uso de la ecuación 1 ($V_{max} = k_{cat}$) se representa dicha eficiencia por la relación: V_{max}/K_m .

De la tabla anterior es posible comprobar, con dicha constante, que el sistema de nP-CdS en solución posee un valor de $0.074 \mu M^{-1} min^{-1}$ mientras que para el sistema de H_2O_2 , tiene un valor de $0.083 \mu M^{-1} min^{-1}$ es posible entonces, deducir que el sistema en el que se emplea como agente oxidante al peróxido de hidrógeno es 0.12 veces más eficiente que el sistema en el que se emplean nanopartículas de CdS, lo que conlleva a que prácticamente se tenga la misma eficiencia catalítica de la reacción para ambos sistemas sea la misma.

Además de obtener y evaluar los parámetros de la cinética enzimática para la HRP que es la enzima en la que se centró la investigación, se contó con la oportunidad de poder evaluar los mismos parámetros cinéticos empleando 4 peroxidasa más, las cuales fueron: Citocromo c, Microperoxidasa-11, Peroxidasa de Soya y Cloroperoxidasa. Los parámetros cinéticos que se obtuvieron de la oxidación catalítica de AIA se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos para las 5 diferentes peroxidasa en la oxidación biocatalítica del ácido 3-indolacético.

ENZIMA	HRP		MP-11		CYP c		CPO		SbP	
SISTEMA	nP-CdS	H ₂ O ₂	nP-CdS	H ₂ O ₂	nP-CdS	H ₂ O ₂	nP-CdS	H ₂ O ₂	nP-CdS	H ₂ O ₂
K _m [μM]	52.30	28.92	SR	8.84	SR	2.93	SR	SR	SR	19.45
V _{max} [min ⁻¹]	3.90	2.42	SR	149.82	SR	4.33	SR	3372.33	SR	2.94
V _{max} /K _m [μM ⁻¹ min ⁻¹]	0.074	0.083	SR	16.94	SR	1.47	SR	SR	SR	0.15

SR: Sin Resultado

El parámetro del que nuevamente se utilizó para evaluar el sistema fueron los valores obtenidos para la relación de V_{max}/K_m (eficiencia catalítica) la cual se empleó en el análisis de los resultados cinéticos para la HRP. Para mejor facilidad en el manejo de la interpretación los datos se dividieron en dos grupos, el primero que corresponde a los experimentos empleando peróxido de hidrógeno y el segundo en el que se emplearon nP-CdS. Para poder comparar fácilmente los valores de eficiencia catalítica obtenidos para las 4 peroxidasa, se tomó como valor de referencia el resultado de V_{max}/K_m para la HRP, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de eficiencia catalítica para MP-11, CYP c, SbP y CPO, y su comparación respecto del valor obtenido (0.083) para la HRP, empleando H₂O₂.

Enzima	Eficiencia catalítica	Eficiencia catalítica respecto del valor para HRP
MP-11	16.94	204
CYP c	1.47	17
SbP	0.15	1.8
CPO	SR	SR

SR: Sin Resultado

El análisis de los resultados de la tabla 8, arroja que la eficiencia catalítica de la reacción catalizada por la HRP es mucho menor respecto de todas las peroxidasa empleadas,

incluyendo a la CPO, ya que, aunque no fue posible obtener el valor de V_{\max}/K_m debido a que la reacción catalizada era bastante rápida y eficiente, aun empleando concentraciones de sustrato (1 μM a 5 μM) y enzima (0.23 μM), lo cual a su vez imposibilitó técnicamente el análisis de la detección de la desaparición del AIA por espectroscopia de fluorescencia, ya que aunque esta técnica analítica es altamente sensible a la detección del sustrato se ve limitada para el manejo de concentraciones tan pequeñas, en las que además los errores analíticos se ven incrementados.

Por ello se tomó en consideración que uno de los datos más interesantes, además de inesperado resultó el valor de la eficiencia catalítica de la reacción de oxidación del AIA empleando a la Microperoxidasa-11 (16.94 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) el cual indica que:

- El ácido 3-Indolacético es un buen sustrato para la MP-11.
- La eficiencia catalítica de la MP-11 a concentraciones del AIA por debajo de los niveles de saturación son buenos.
- Representa que el paso de unión de la MP-11 y AIA se ve favorecido.

Comparando este resultado con el obtenido para la HRP (0.083 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$), es posible entonces, deducir que el sistema en el que se emplea a la MP-11 es un poco más de 200 veces más eficiente, catalizando la reacción de oxidación del AIA empleando peróxido de hidrógeno.

En los experimentos en los cuales se emplearon nP-CdS, no se encontró resultado alguno, para ninguna de las peroxidases que se trabajaron, como se muestra en el concentrado de resultados de la tabla 8, exceptuando a la peroxidasa de rábano la cual si mostró resultados favorables, lo cual la hace una candidata adecuada para llevar a cabo la activación de su potencial como biocatalizador empleando nanopartículas de CdS activadas por luz UV.

Existen diversas condiciones que alteran la actividad biocatalítica del sistema que se ha empleado, por ejemplo:

- Exposiciones prolongadas a luz UV.
- Incremento en la temperatura de medio (aproximadamente 6 °C).

En conjunto, la exposición a la luz y la temperatura disminuyen importantemente la actividad catalítica del nanohíbrido, hasta un 60% después de una hora de operación. Esta es la mayor desventaja del nanofotobiocatalizador, la cual se ha logrado sortear mediante la inmovilización de las biomoléculas en un medio insoluble en el medio de reacción, generalmente una estructura sólida, como lo son los materiales mesoporosos del tipo SBA-15 en los cuales esta técnica ha brindado buen resultado.

Los materiales mesoporosos han sido ya identificados como soportes de enzimas, ya que, tras la utilización de estos para llevar a cabo la inmovilización de diversas enzimas, se han logrado sortear muchos inconvenientes que se presentan tras el empleo de enzimas en reacciones que requieren por ejemplo temperaturas altas, condiciones en las que se requiera el uso de solventes orgánicos y cambios de pH (Longoria, Tinoco y Torres, 2010).

Con el propósito de mejorar la funcionalidad catalítica del sistema se procedió a la inmovilización en el material mesoporoso SBA-15.

4.4 Modificación del material mesoporoso SBA-15

Para proveer de sitios de interacción con los cuales puedan interactuar o reaccionar las nanopartículas y la enzima, se procedió a derivatizar al SBA-15. Para ello se empleó al APTES, reactivo el cual permite dotar al mesoporoso de grupos aminos libres en la superficie de este (ver figura 40). Para la determinación de los cambios en los grupos funcionales del material, primero, se obtuvo el espectro FT-IR (figura 41) del material mesoporoso SBA-15 sin modificar, para tomarlo como referencia de control.

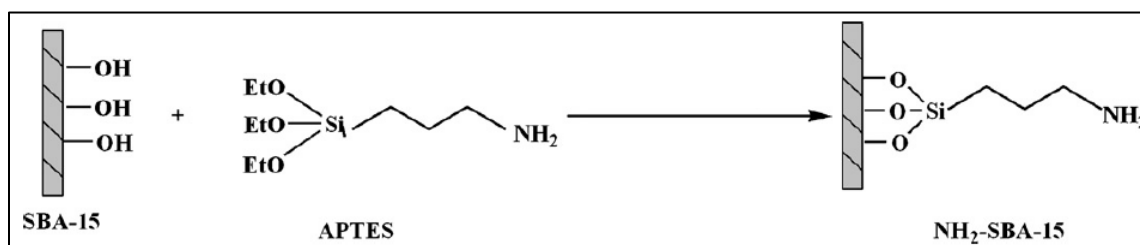


Figura 40. Ilustración esquemática de la funcionalización del SBA-15 (Z. Wang et al 2012.).

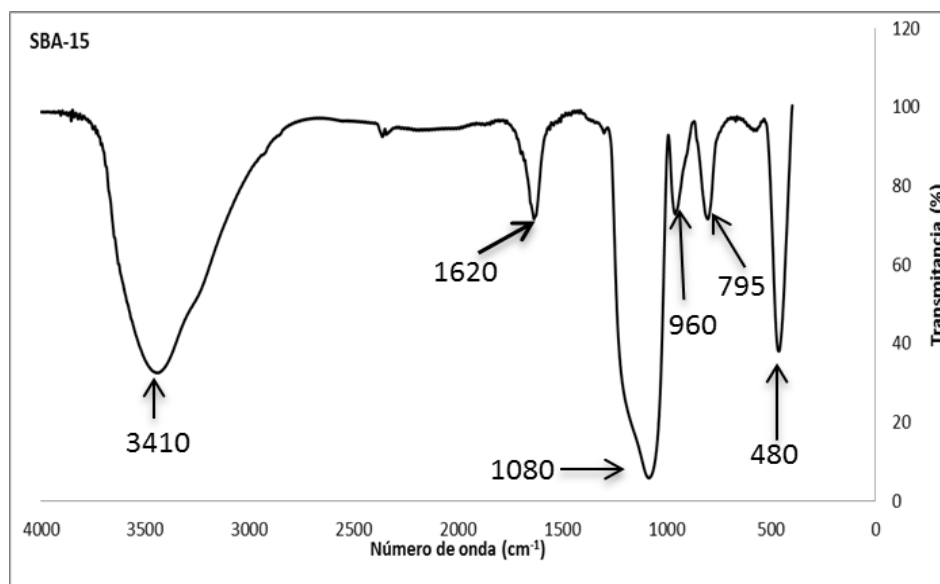


Figura 41. Espectro FT-IR del material mesoporoso SBA-15

La amplia banda de absorción alrededor de 3410 cm^{-1} corresponde a los enlaces moleculares de hidrogeno en las moléculas de agua unidas entre sí y con los grupos Si-OH que se pueden asignar a las vibraciones de los O-H y Si-OH. Las bandas alrededor de 1620 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de flexión de los enlaces O-H de los grupos OH, estas se superponen también con las vibraciones de estiramiento c-o-c, la banda vibracional alrededor de 1080 cm^{-1} se debe al estiramiento antisimétrico de las vibraciones entre Si-O-Si, solapándose con las vibraciones en los enlaces Si-O-C, C-O-C y Si-C. La banda en 960 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos silanol libres (Si-OH) en la estructura del solido amorfo y las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O que se pueden apreciar en este rango. Las vibraciones de estiramiento simétrico de los enlaces Si-O-Si pertenecientes a estructuras de anillo se observan alrededor de $795\text{ a }790\text{ cm}^{-1}$, las bandas entre $480\text{ a }460\text{ cm}^{-1}$ son atribuidas a las vibraciones asociadas a la flexión de los enlaces Si-O-Si. Obtenido este control de referencia se procedió a llevar a cabo la funcionalización de la superficie del mesoporoso, para posteriormente realizar las inmovilizaciones correspondientes.

En la figura 42 se muestra el espectro del mesoporoso, tras la reacción de silanización con APTES.

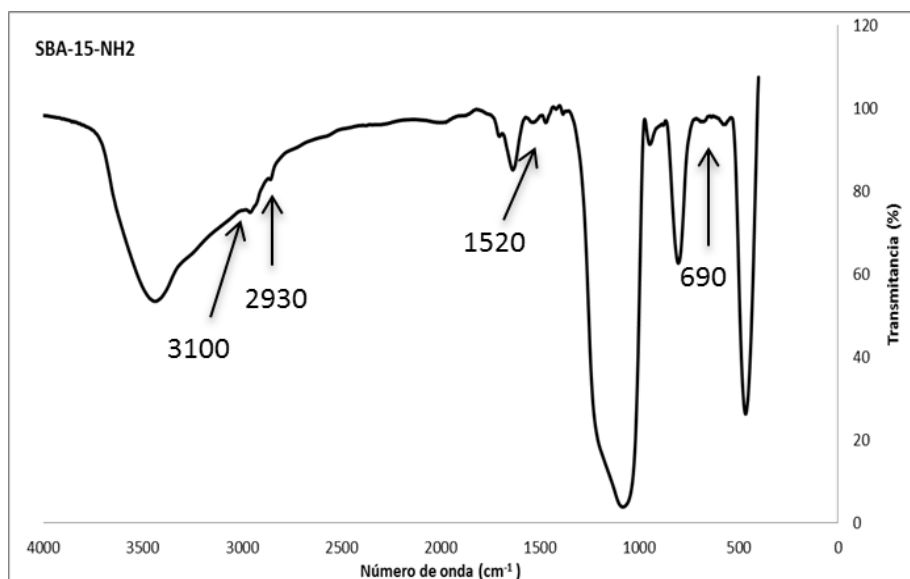


Figura 42. Espectro FT-IR del material mesoporoso SBA-15 silanizado con APTES.

Después de la modificación realizada con APTES se puede observar que, la banda correspondiente al grupo O-H ubicada en 3400 cm^{-1} presenta una menor intensidad relativa respecto a la banda de mayor porcentaje de transmitancia, característica que no se observa con la muestra del material SBA-15 sin modificar (figura 41), indicando ajustes en el contenido de grupos O-H. Aparece una señal con un ligero ensanchamiento a 3100 cm^{-1} debido al estiramiento del grupo N-H mientras que a 1520 cm^{-1} los movimientos vibracionales del grupo N-H se manifiestan con una señal de intensidad baja, y por último se corrobora la presencia de este grupo con una banda de intensidad débil a 690 cm^{-1} debido a la flexión del grupo N-H. Por otro lado, a 2930 cm^{-1} se observa una banda que indica el estiramiento del grupo C-H debido a la cadena hidrocarbonada del APTES.

La evidencia mostrada a partir del espectro de FT-IR confirma que los grupos silanol del material mesoporoso reaccionaron efectivamente con el APTES (Chong y Zhao, 2003).

Tras la confirmación por FT-IR lo cual nos confirmó la presencia de grupos amino primarios (-NH₂) se procedió a llevar a cabo una prueba de identificación colorimétrica empleando ninhidrina la cual es una prueba aún más sencilla que a pesar de resultar en extremo sencilla podría brindarnos una confirmación más del resultado obtenido y descartar también algunas otras hipótesis que se tenían acerca de esta reacción. La ninhidrina es un poderoso agente reactivo, el cual es empleado en bioquímica para llevar a cabo

identificación de aminas primarias y secundarias, comúnmente empleada para identificar aminoácidos.

El resultado obtenido para esta prueba se presenta en la figura 43.

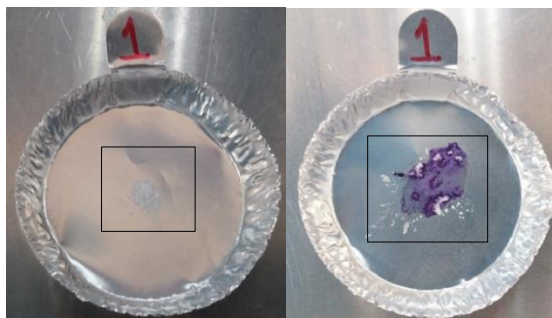


Figura 43. A la derecha se muestra al SBA-15-NH₂ en coloración morada indicio de la confirmación de la presencia de grupos -NH₂. A la izquierda se muestra al SBA-15N sin presencia de coloración antes de agregar la ninhidrina.

Se presentó un resultado positivo para la detección del grupo amino del SBA-15-NH₂ el cual se evidencia con el cambio en la coloración del material (de blanco a morado), para verificar ahora este nuevo resultado se realizaron una serie de diferentes experimentos en los que se incluye como control al material SBA-15 pero sin funcionalizar, el resultado de esos experimentos se muestra en las imágenes la figura 44.

Con los resultados observados en la figura 44 es posible evidenciar que las condiciones en la que se encuentra almacenado el material funcionalizado no afectan a la funcionalización del material (no se pierden los grupos -NH₂) lo resultados visibles en las pruebas 1, 2, 3; también es posible verificar que las condiciones y tiempo de reacción son importantes para que se lleve a cabo la correcta funcionalización del material ya que los resultados de las pruebas 4 y 5 lo evidencian, ya que al mantener la reacción durante una hora el material muestra una clara evidencia de que había sido funcionalizado en su superficie, mientras que en el caso extremo de solo agregar una porción del APTES al SBA-15 y luego dejar secar no conlleva a que se favorezca la reacción de funcionalización en la superficie del mesoporoso.

También resultó favorable lo observado en el control de SBA-15 sin funcionalizar el cual se mostró negativo para la identificación de grupos amino en su superficie, y por último el empleo de la identificación de los grupos amino en el APTES mostró un resultado positivo

pero este no fue del todo claro ya que la coloración no se mantuvo y se fue perdiendo con el tiempo, además que la tonalidad morada que se mostró en los experimentos que dieron positivo fue mucho menor.

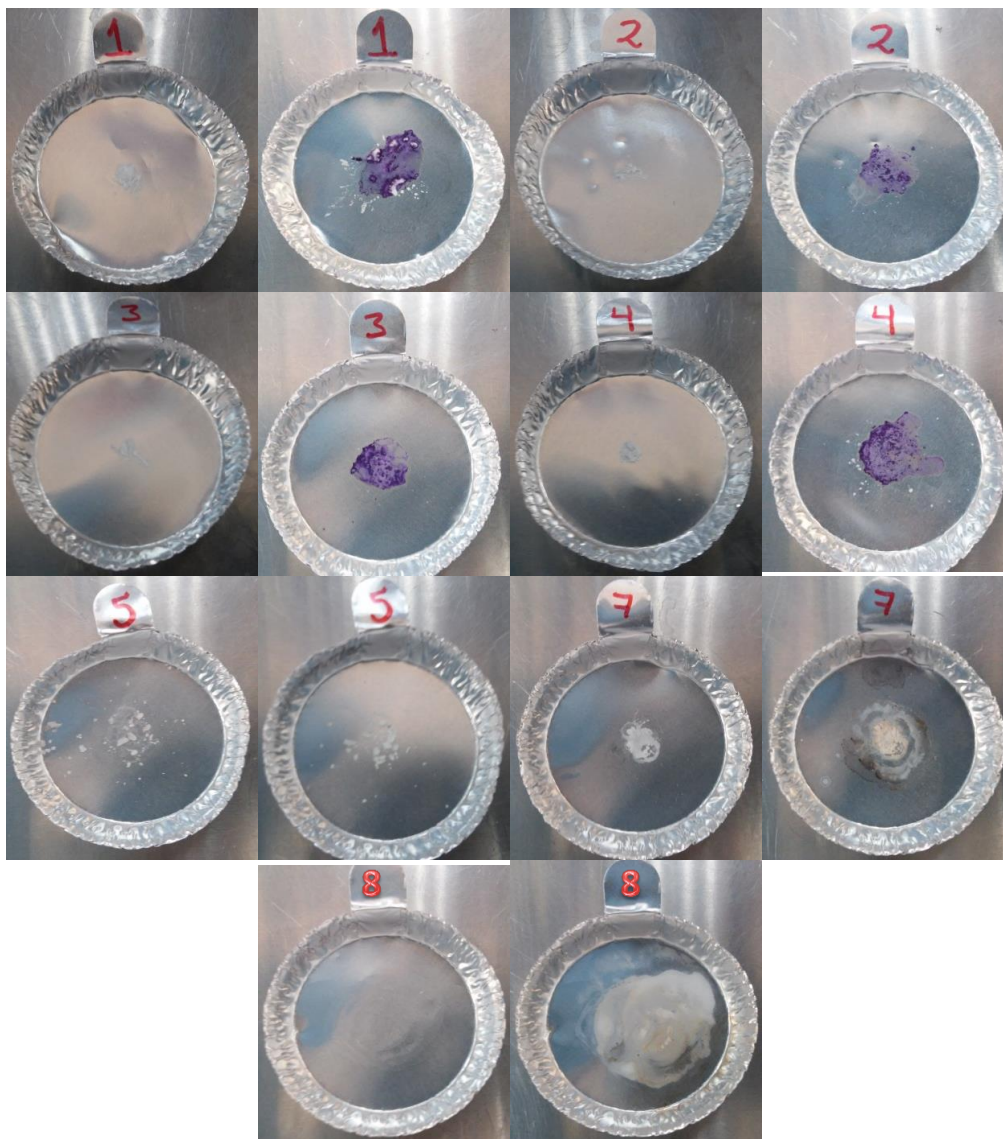


Figura 44. Antes y después, de la reacción con ninhidrina, 1) SBA-15-NH₂, 2) SBA-15-NH₂ secado bajo atmosfera de nitrógeno, 3) SBA-15-NH₂ secado a 100° C, 4) SBA-15-NH₂ después de una hora de reacción, 5) SBA-15 sin condiciones de reacción, 7) SBA-15 control sin funcionalizar, 8) APTES.

4.5 Inmovilización de la enzima HRP en el material SBA-15NH₂

Posterior a la modificación del material mesoporoso SBA-15 con el APTES, se procedió a realizar la inmovilización de la HRP. La funcionalización del material con un grupo amino

terminal (-NH₂) ha resultado ser bastante útil para el acoplamiento covalente de diversas proteínas sobre la superficie de materiales de sílice (Chong *et.al*, 2003).

Se realizó la inmovilización de la enzima resultando en la adsorción de 4.32×10^{-5} mmoles de HRP/mg de material, fijándose un promedio de 7.3% del total de enzima adicionada.

4.6 Inmovilización de las nanopartículas en el material mesoporoso (sistema SBA-15-HRP)

En la inmovilización de las nP-CdS, la adsorción es favorecida por la atracción de cargas positivas del grupo amino del material, con las cargas negativas de los grupos carboxilos de las nanopartículas. Al término del proceso, se obtuvo un cambio en el color del material mesoporoso (figura 45), presuntamente por la adsorción de las nP-CdS.



Figura 45. A la derecha se muestra el material modificado con APTES. A la izquierda, se muestra el material después del proceso de inmovilización de nP-CdS.

El espectro de FT-IR del SBA-15 conteniendo las nP-CdS se muestra en la figura 46.

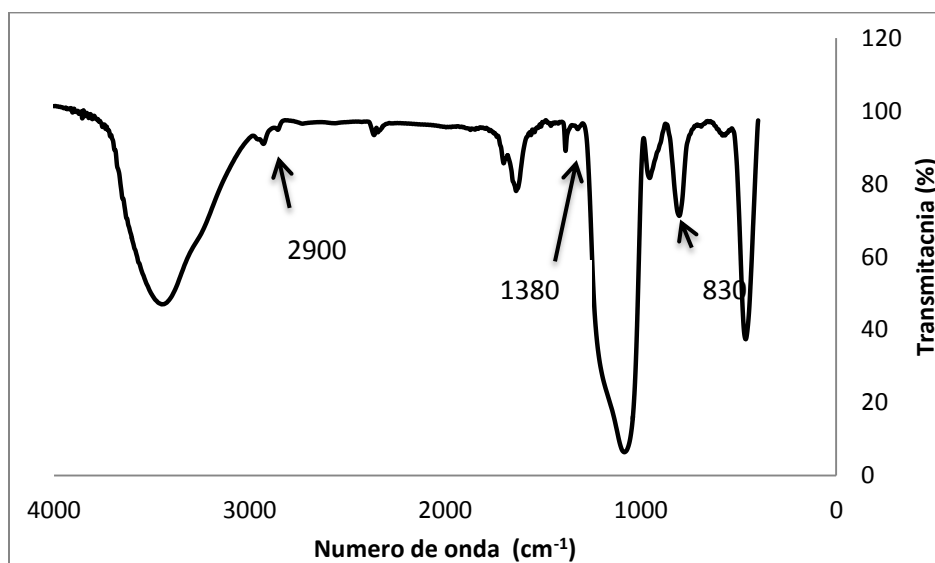


Figura 46. Espectro de FT-IR del material mesoporoso con nP-CdS inmovilizadas.

Se puede observar una banda correspondiente enlace C-H presente alrededor de 2900 cm^{-1} (Zhang *et al* ,2001). La banda que aparece a los 830 cm^{-1} corresponde al enlace Si-C (Diree *et al*, 2001). En el espectro, tampoco se observa la banda que corresponde al estiramiento del grupo Si-OH, esto es señal de que el APTES reaccionó favorablemente con el material mesoporoso. Otra banda adicional, aparece en 1380 cm^{-1} que corresponden al movimiento vibracional del grupo COO (Ke *et al*, 1998).

Se determinó entonces la cantidad de nanopartículas inmovilizadas por medio de la medición de la absorbancia del sobrenadante, utilizando el coeficiente de extinción de las nanopartículas a 323 nm que es de $2 \times 10^4\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Gandubert *et al*, 2008). Restando la cantidad de nP-CdS del sobrenadante, resultado de los lavados con solución amortiguadora, a la cantidad de nP-CdS agregadas al principio del experimento, se obtuvo como resultado, $14.5\text{ }\mu\text{M}$ de nP-CdS adsorbidas, que representa, en promedio, un 74.3% de adsorción, valor que nos indica que existe una afinidad favorable de las nanopartículas con el material mesoporoso modificado. De esta manera, se obtuvo un SBA-15 con 3.6×10^{-4} mmoles de nP-CdS/mg de material y de esta manera se obtuvo al final el sistema híbrido SBA-15-nP-CdS-HRP.

Para el caso en el que se buscó la obtención de un material en el cual solamente las nanopartículas fotoactivas estuviesen inmovilizadas dentro de sus poros se determinó que la absorción de estas fue de $516\text{ }\mu\text{M}$ inmovilizados, que representan un poco más del 90% de adsorción, contemplando las dos incubaciones a las que se sometió. De esta manera se obtuvo el material SBA-15-nP-CdS, en el cual las nanopartículas se encuentran saturando al material en una concentración de 0.0129 mmoles de nP-CdS/mg de material.

4.7 Actividad del sistema híbrido de SBA-15-nP-CdS-HRP

Referente a la metodología experimental, para evaluar la actividad del sistema, se empleó nuevamente como sustrato al Ampliflu™ Red, la reacción se realizó mediante intervalos de irradiación con luz UV.

El resultado se ilustra en la figura 47.

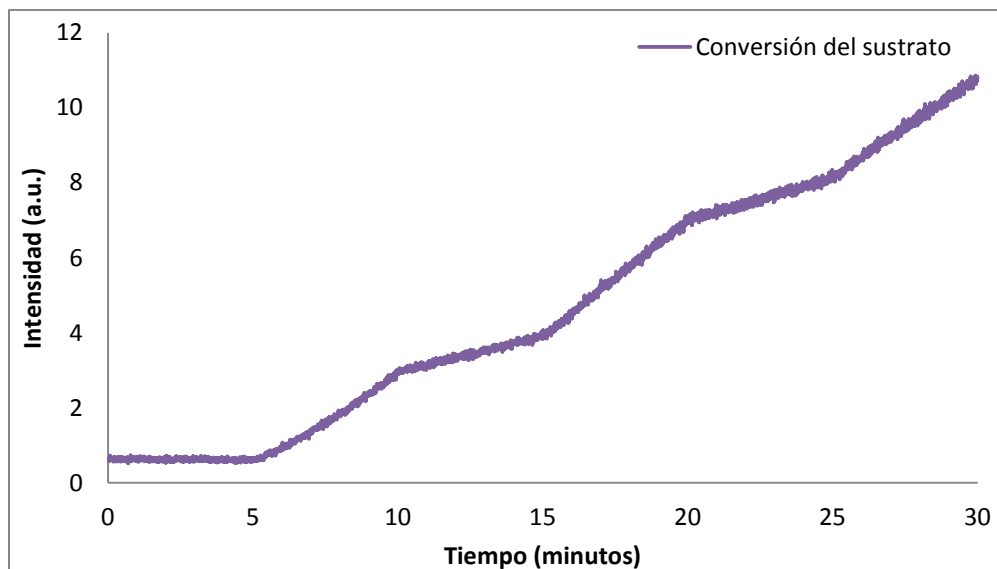


Figura 47. Cinética de conversión del sustrato (Ampliflu™ Red) con el sistema híbrido SBA-15-nP-CdS-HRP de manera discontinua.

Con la determinación de la conversión del Ampliflu™ Red podemos concluir que el sistema conformado (SBA-15-nP-CdS-HRP) es capaz de proporcionar un sistema fotocatalítico activo el cual puede ser controlado por el encendido y apagado de la fuente de irradiación, activando satisfactoriamente a la peroxidasa de rábano mediante la inducción de luz UV al sistema. El Ampliflu™ Red es ya conocido como un sustrato por el cual la HRP tiene una alta afinidad, siendo su límite de detección, por ejemplo, para el método de detección específica de anticuerpos marcados con HRP, de aproximadamente 1 ng / banda.

La actividad del sistema también fue puesta a prueba contra el AIA y los resultados obtenidos se muestran y describen a continuación.

En el protocolo para llevar a cabo los experimentos, se determinó que el sistema híbrido debía encontrarse suspendido en el medio de reacción para proveer los componentes necesarios para la oxidación del AIA. Cabe mencionar que al realizar esto se encontraron varias dificultades.

La primera de ellas fue, que al ser insoluble en medios acuosos, el sistema creado con el SBA-15 presento características indeseables de una suspensión (el material no se suspendía por lo que se asentaba en el fondo de la celda, el medio de reacción se volvió turbio, etc.) lo

que trajo como consecuencia que el medio en el cual la reacción se llevaba a cabo no permitiera la incidencia y el paso adecuado de la fuente de luz del espectrofluorímetro, ya que se tornaba opaco, lo que conllevó a tener errores en las lecturas de la señal del sustrato.

El segundo inconveniente que se detectó a lo largo de las pruebas que se llevaron a cabo fue que, al rastrear la señal de conversión del AIA en el espectrofluorímetro, esta mostraba una alta actividad de conversión del sustrato (ver figura 48), esto parecía un punto apremiante ya que tras la experiencia con el sistema en solución (sin SBA-15) se notó que el ácido 3-Indolacético es un sustrato no muy fácil de oxidar para la HRP, pero tras diversas pruebas se logró observar que la inclusión del sistema SBA-15-nP-CdS-HRP, al medio en el cual se realizaba la reacción (10 % isopropanol + solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, 60 mM), servía como un agente adsorbente del sustrato, ya que aun sin irradiar con luz UV para comenzar la reacción la disminución de señal del sustrato se veía disminuida bruscamente

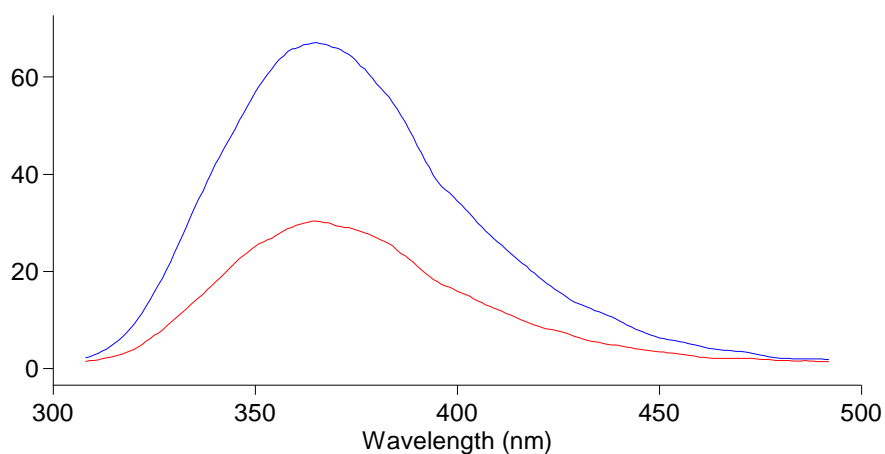


Figura 48. Espectro de emisión del sustrato antes de agregar el sistema SBA-15-nP-CdS-HRP (línea azul) y disminución de la señal de intensidad después de agregar el sistema híbrido (línea roja).

Este resultado prácticamente imposibilitó el empleo del sistema SBA-15-nP-CdS-HRP, para sortear este obstáculo en la investigación la propuesta que se llevó a cabo fue la de obtener un sistema en el cual el SBA-15NH₂ fuese saturado solo con nP-CdS y obtener el denominado sistema SBA-15-nP-CdS; la finalidad de obtener un sistema saturado con nP-CdS fue simplemente para que del sistema obtenido el volumen empleado en cada

experimento fuese menor y así tratar de remediar el problema de tener un medio en que la lectura del mismo se complicara por las adsorciones en el material.

4.8 Actividad del sistema SBA-15-nP-CdS

Para comprobar que la enzima oxida al AIA en el sistema activado por luz se procedió a medir la actividad de este sistema y a la vez tratar de sortear otros de los problemas detectados se tomaron a consideración los siguientes aspectos:

- **Irradiar por separado al sistema SBA-15-nP-CdS con luz UV**, durante 5 minutos, para así generar las especies reactivas de oxígeno necesarias para llevar a cabo la reacción.
- **Centrifugar al sistema SBA-15-nP-CdS irradiado del medio de reacción**, para que simplemente se tomara el sobrenadante (medio de reacción) que contenía las ROS, y tener un medio listo para agregar al AIA y a la HRP; además terminar con el problema de las lecturas erróneas por el efecto que causaba tener al material en suspensión en la celda de lectura.
- **No inmovilizar a la HRP en el sistema SBA-15-nP-CdS**, ya que, al irradiar por separado el sistema SBA-15-nP-CdS, no habría necesidad de que la enzima estuviera presente para realizar la acción sobre el AIA el cual tampoco se encontraba en la irradiación.

Tomando en cuenta los puntos anteriores, se determinaron los parámetros cinéticos del sistema, obteniendo nuevamente las velocidades iniciales para cada experimento, y variando solamente la concentración del AIA presente en reacción y realizando cada punto experimental por triplicado. Empleando el promedio aritmético de cada medición, se graficaron los datos (figura 49), para después realizar un ajuste de tipo Lineweaver-Burk derivado de la ecuación de Michaelis-Menten con el fin de obtener los valores de V_{max} y K_m .

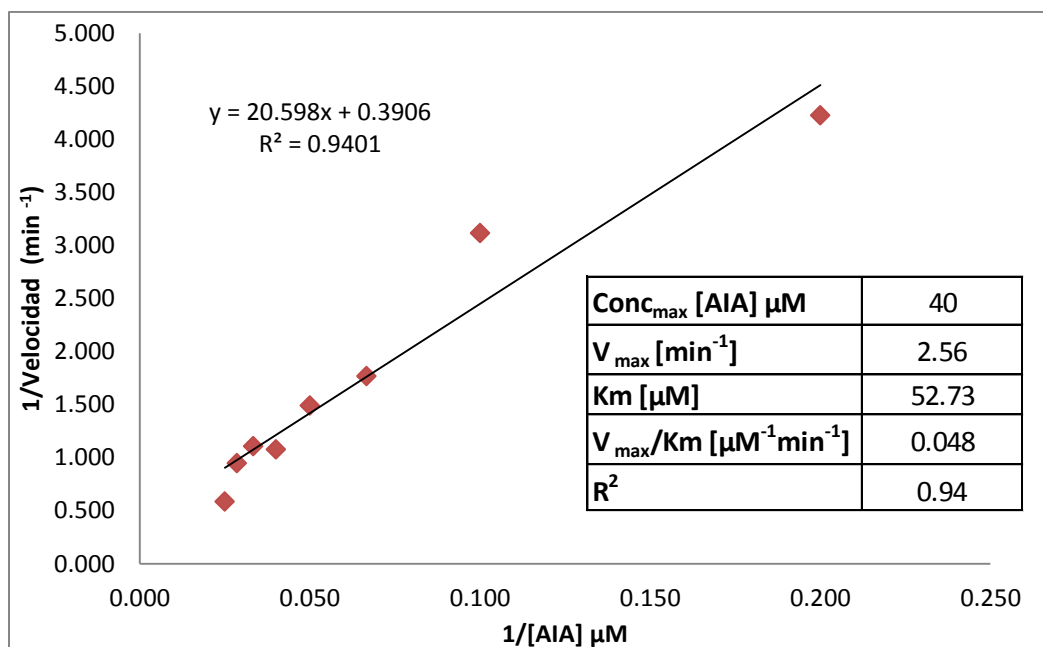


Figura 49. Dependencia de la velocidad inicial con respecto a la concentración del sustrato (AIA) para el sistema pre irradiado SBA-15-nP-CdS.

Con los resultados obtenidos analizaremos los resultados de cada parámetro cinético, comparando el sistema pre irradiado SBA-15-nP-CdS y el sistema con nP-CdS en solución. En la tabla 9 observamos que el valor de K_m es casi completamente igual en ambos sistemas. Por otro lado, el valor de la V_{max} es menor para el sistema SBA-15-nP-CdS que para el sistema con nP-CdS en solución.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de reacción obtenidos para los sistemas nP-CdS en solución y SBA-15-nP-CdS.

Parámetro cinético	Sistemas de reacción	
	nP-CdS en solución	SBA-15-nP-CdS
K_m [μM]	52.3	52.7
V_{max} [min⁻¹]	3.9	2.56
V_{max}/K_m [μM⁻¹min⁻¹]	0.074	0.048

Observando los valores obtenidos podemos evaluar nuevamente la eficiencia de ambos sistemas, y podemos concluir que el sistema empleando nP-CdS en solución que posee un valor de V_{max}/K_m igual a $0.074 \text{ [}\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}\text{]}$ resulta ser 1.5 veces más eficiente que el

sistema SBA-15-nP-CdS, lo cual en términos estrictos dictamina que ambos sistemas son muy similares, respecto a su eficiencia para catalizar la reacción de oxidación del AIA.

4.9 Productos de la oxidación del AIA empleando H₂O₂ nP-CdS, identificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Se analizaron 2 muestras (M1 y M2), la muestra M1 correspondía a los productos de reacción de la oxidación del AIA empleando H₂O₂ y la muestra M2 era la que contenía los productos de reacción obtenidos empleando nP-CdS. En M1 la mezcla de los productos de reacción fueron separados, por medio del empleo de la técnica de cromatografía líquida en la cual se empleó una columna Prevail C18 5µm, y como fase móvil o solución de resuspensión se utilizó ácido fórmico 0.1% (solución A) y metanol (solución B), ya que con esta fase móvil se conseguía una buena separación cromatográfica y una óptima ionización, el flujo empleado fue de 1 mL/min, todo ello siguiendo el método de gradiente (0-15 minutos, 10-70% B). Los parámetros adoptados para la detección de cada una de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía líquida para ser sujetas al análisis del espectrómetro de masas, se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros empleados para la detección de las fracciones obtenidas de la cromatografía líquida, para su detección en el espectrómetro de masas.

Parámetros de detección	
Voltaje del capilar	3500 V
Voltaje del fragmentador	175 V
Voltaje de Skimer	65 V
Temperatura del gas de secado	350 ° C
Flujo del gas de secado	11 L/min
Presión del nebulizador	60 psi

La identificación de los productos mediante la técnica de LC-MS muestra en un barrido completo (figura 50) la separación cromatográfica de los posibles diferentes productos de la oxidación del AIA, siendo posible la observación de 5 picos a diferentes tiempos de elución. Algunos de los productos de oxidación del AIA mostraron ser más polares que su precursor, y, por tanto, eluyen a tiempos más cortos.

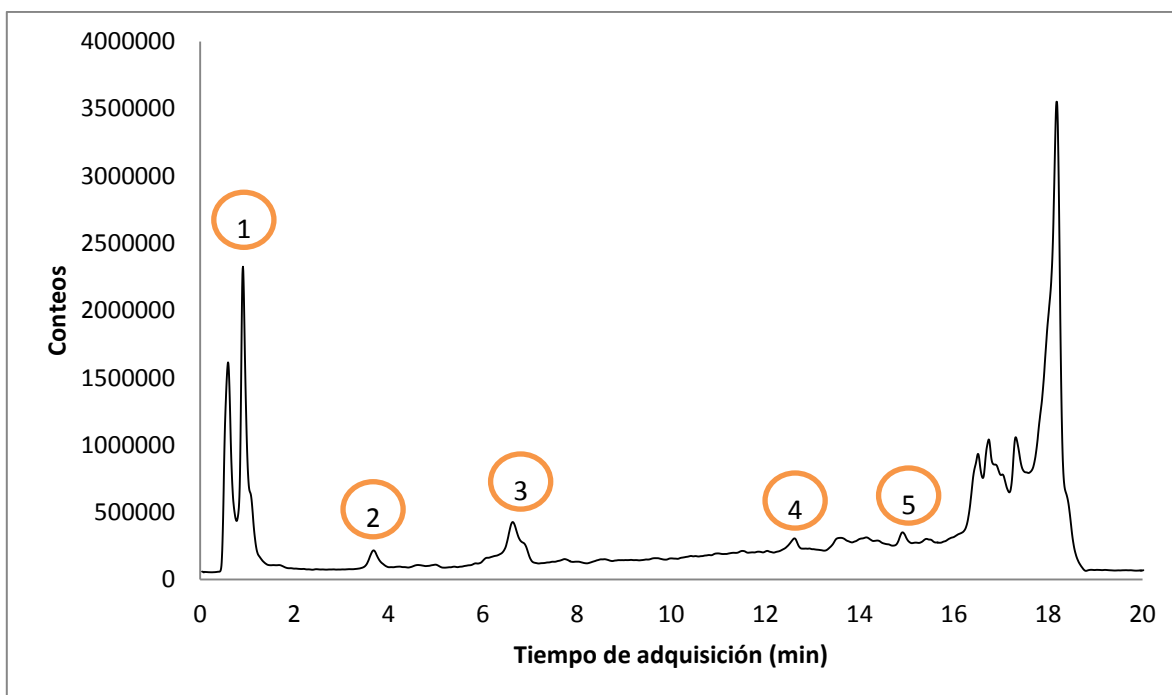


Figura 50. Cromatograma obtenido tras la inyección de la mezcla de los productos de reacción del AIA, empleando a la HRP y H_2O_2 , en el cual se localizan cinco picos de posibles productos de reacción.

Debido a que ya se tienen reportados algunos productos identificados tras la oxidación del AIA empleando diversas peroxidasas (tabla 11) (entre ellas la HRP) (Folkes y Wardman, 2001), se tomaron como referencia para que por medio del cálculo teórico de la posible masa de los espectros de ionización positiva ($[M+H]^+$) de las sustancias reportadas (tabla 12), sirvieran para evaluar si alguna de ellas se encontraba presente en las muestras obtenidas (M1 y M2), por medio de la comparación de los espectros de masas de cada una de las fracciones obtenidas por LC.

Tabla 11. Sustancias identificadas tras la oxidación del AIA empleando peroxidasas.

	Sustancia	Sinónimos	P.M.	Formula	CAS	Abreviación
1	ácido 3-indolacético	ácido indol-3-acético	175.19	C ₁₀ H ₉ NO ₂	87-51-4	AIA o IAA
2	3-indolaldehído	indol-3-carboxialdehído	145.16	C ₉ H ₇ NO	487-89-8	IAI
3	o-farmamidaacetofenona	Formamida, N-(2-acetilfenil)	163.17	C ₉ H ₉ NO ₂	52 57 06 7	OFA
4	o-aminoacetofenona	2-aminoacetofenona	135.16	C ₈ H ₉ NO	551-93-9	OAA
5	4-hidroxiquinolina	4-hidroxiquinolina, 4-quinolinol	145.16	C ₉ H ₇ NO	611-36-9	HQ

Tabla 12. Posible masa de los espectros de ionización positiva ($[M+H]^+$) de las sustancias reportadas tras la oxidación del AIA empleando peroxidasas (véase tabla x).

	Sustancia	$[M+H]^+$
1	ácido 3-indolacético	176.0706
2	3-indolaldehído	146.0600
3	o-farmamidaacetofenona	164.0706
4	o-aminoacetofenona	136.0757
5	4-hidroxiquinolona	146.0600

Tras el análisis individual de cada uno de los espectros de masas obtenidos para las fracciones de la muestra M1, se determinó que solo dos productos de la tabla 12 fueron identificados como presentes en la mezcla, los cuales fueron: el 3-indolaldehído y la 4-hidroxiquinolona, correspondientes a las fracciones 2 y 3 de la LC llevada a cabo, los espectros de masas y estructuras moleculares de ambas sustancias se observan en la figura 51.

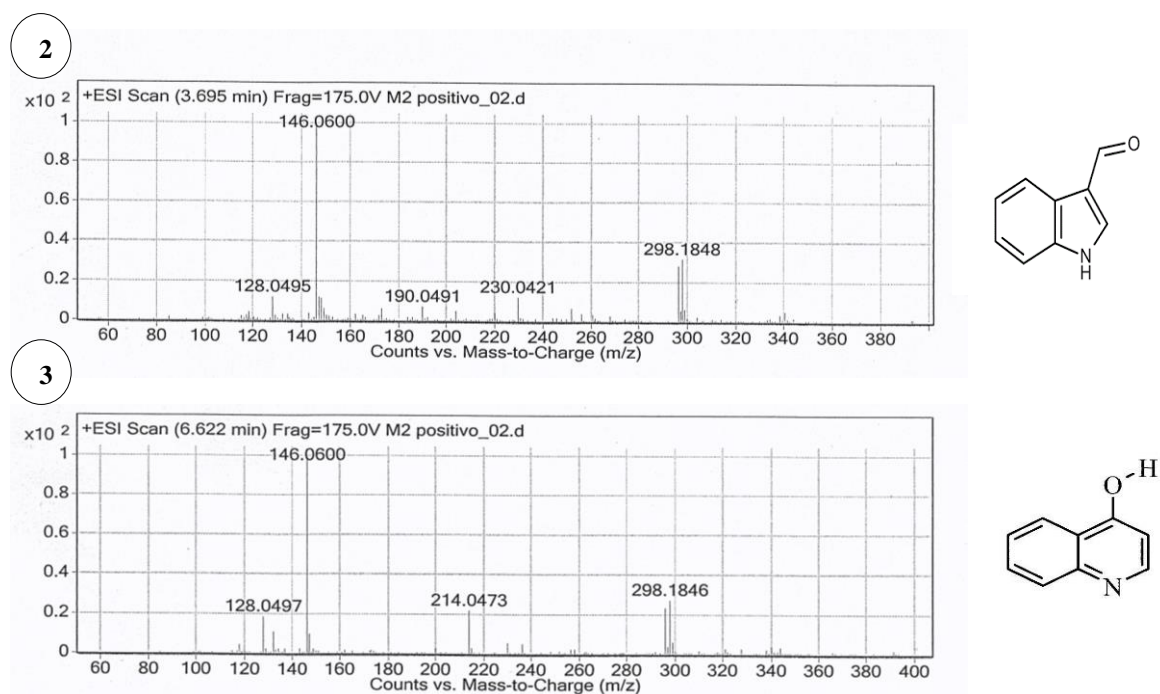


Figura 51. Espectros de masas obtenidos tras el análisis de las fracciones 2 y 3 de la LC, de la muestra M1. Para la fracción 2 se determinó que la sustancia obtenida es el 3-indolaldehído y para el caso de la fracción 3 se determinó que la sustancia obtenida es la 4-hidroxiquinolona.

Respecto a la muestra M2 no se logró identificar en ella ninguno de los compuestos ya reportados, sin embargo, en un vistazo a los espectros de masas obtenidos a partir de M2 se puede apreciar la presencia de numerosos compuestos, los cuales tienen un alto peso molecular lo que podría indicar la formación de dímeros o polímeros de algunos de los productos reportados.

4.10 Pruebas de viabilidad celular

Los resultados, en los que se emplearon a los diversos componentes del sistema fotobiocatalizador en solución (figura 52) mostraron no se presentaba un efecto toxico para las células tratadas con concentraciones de 10, 100 y 1000 μM de IAA por sí solo, lo que concuerda con los resultados por el equipo Folkes y Wardman en el 2001 y también los resultados de Jeong y col. en 2010, a pesar de que en el presente trabajo con una línea celular diferente (MCF-7), manteniéndose los valores de actividad metabólica relativa muy similares a los de la actividad presentada por la prueba control siendo estos resultados consistentes hasta las 48 horas posteriores al tratamiento.

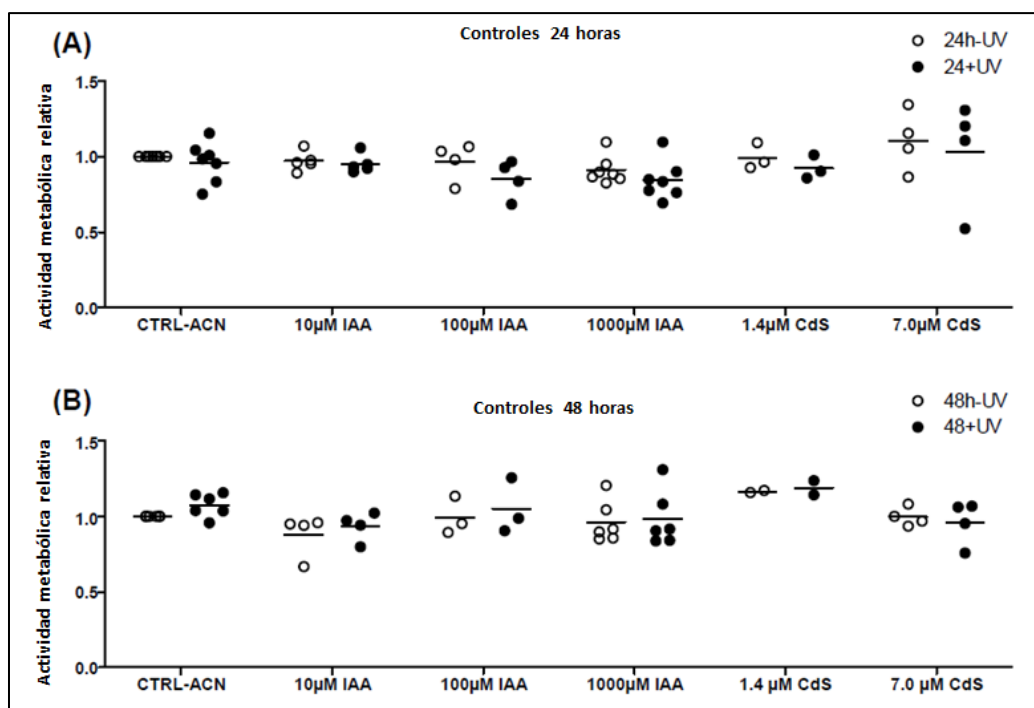


Figura 52. Controles de cada uno de los componentes de los diferentes sistemas, a diferentes concentraciones empleadas durante las pruebas a 24 horas (A) y 48 horas (B) después a su exposición a estos.

Otro dato importante a resaltar es el hecho de que empleando nP-CdS, las células no presentaron disminución en su actividad metabólica relativa, lo que resulta alentador ya que si las nP-CdS resultaran ser afectadas por fenómenos que causaran inestabilidad en su estructura, estas comenzarían a liberar iones de Cd^{2+} (Tsay y Michalet, 2005) lo cual provocaría el mal funcionamiento de distintos organelos celulares (Lovric et al, 2005) lo que conduciría a la muerte de las MCF-7.

Para los experimentos empleando las diferentes mezclas de los componentes de la reacción en solución (componentes no inmovilizados en SBA-15) para llevar a cabo la terapia fotodinámica *in situ* (figura 53), muestran que en el bloque II de experimentos, en los cuales la concentración de AIA fue de $100\mu\text{M}$, y las concentraciones de la enzima y de nanopartículas que fueron de $0.7\mu\text{M}$ y $7\mu\text{M}$ respectivamente, causaron la disminución en la actividad metabólica en más de un 60%, presentándose esto a las 24 horas posteriores de la administración del tratamiento. En los resultados a las 48 horas (figura 54) también se logra apreciar una disminución aún más drástica en la disminución de la actividad metabólica, llegando a ser de más de un 90%; sin embargo, en el mismo sistema que no fue irradiado con luz UV, los resultados mostraron aproximadamente el mismo porcentaje en la disminución de la actividad metabólica. Estos resultados concuerdan nuevamente con los expuestos por Folkes y Wardman en 2001 y Jeong y col. en 2010, en los que ambos grupos reportaron que la terapia empleando AIA/HRP en conjunto y a diversas concentraciones de AIA y HRP traía como consecuencia la disminución en el porcentaje de viabilidad celular (véase figura 20 y 25 de la sección 2.9), la propuesta para explicar este fenómeno era que, la reacción no requería ninguna cantidad del H_2O_2 para poder ser iniciada (Folkes y Wardman, 2001), lo cual da validez a los resultados expuestos en este trabajo.

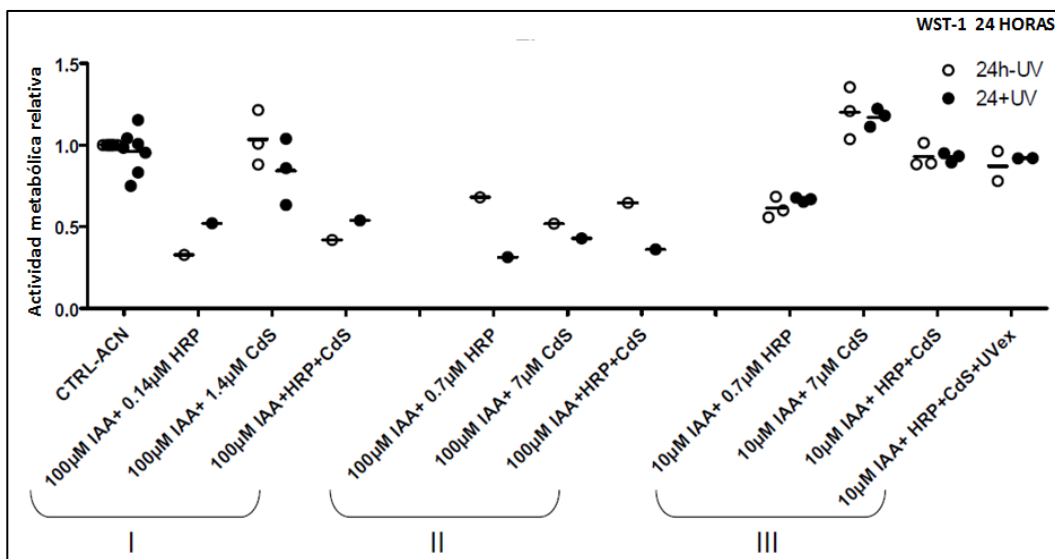


Figura 53. Actividad metabólica relativa de la línea celular MCF-7, 24 horas después del tratamiento nP-CdS activadas por luz UV.

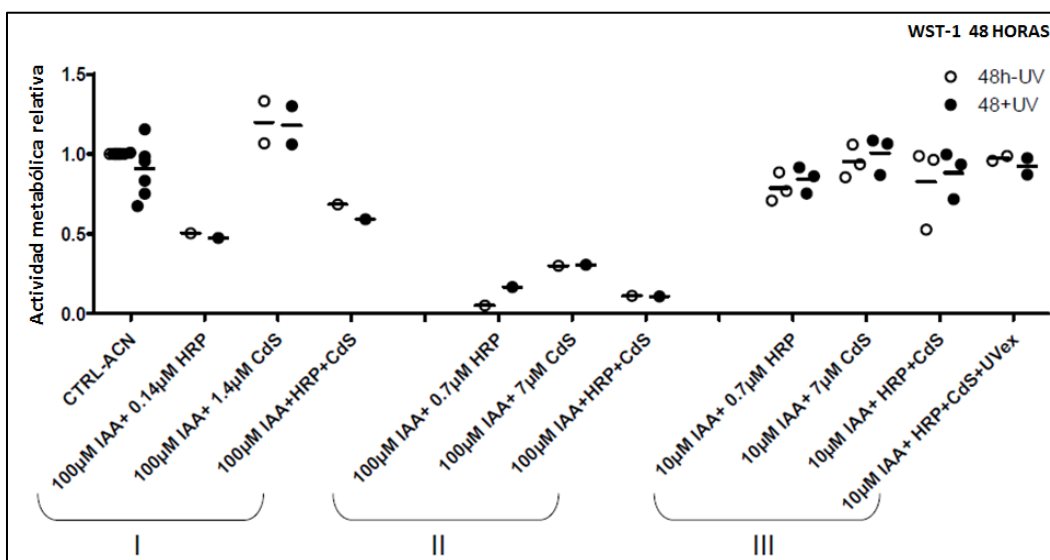


Figura 54. Actividad metabólica relativa de la línea celular MCF-7, 48 horas después del tratamiento con nP-CdS activadas por luz UV.

En las pruebas realizadas empleando a los sistemas fotobiocatalizadores SBA-15-nP-CdS-HRP y SBA-15-nP-CdS, los resultados obtenidos mediante el empleo de ambos sistemas en terapia fotodinámica con el AIA, mostraron la reducción del 100% de la actividad metabólica relativa a las 24 horas después del tratamiento, para ambos sistemas (figura 55). Con resultados consistentes hasta las 48 horas después del tratamiento (figura 56) para estos sistemas, podríamos afirmar que: la terapia fotodinámica en la que se emplean ya sea el sistema SBA-15-nP-CdS-HRP o SBA-15-nP-CdS para la oxidación del profármaco AIA,

resultan ser muy efectivos para el tratamiento en contra células de cáncer mamario tipo MCF-7, ya que al comparar estos resultados contra los valores obtenidos en los experimentos empleando a los componentes del sistema en solución (no adsorbidos en SBA-15) en los que el mejor resultado obtenido fue cuando se emplearon concentraciones de AIA 100 μM , nP-CdS 7 μM y 0.7 μM de HRP (bloque II de experimentos de la figura 54) mostrándose una reducción de más del 90% en la actividad metabólica relativa, se demuestra que los sistemas en los que se inmovilizaron los componentes del sistema en el material mesoporoso SBA-15, resultan una opción prometedora.

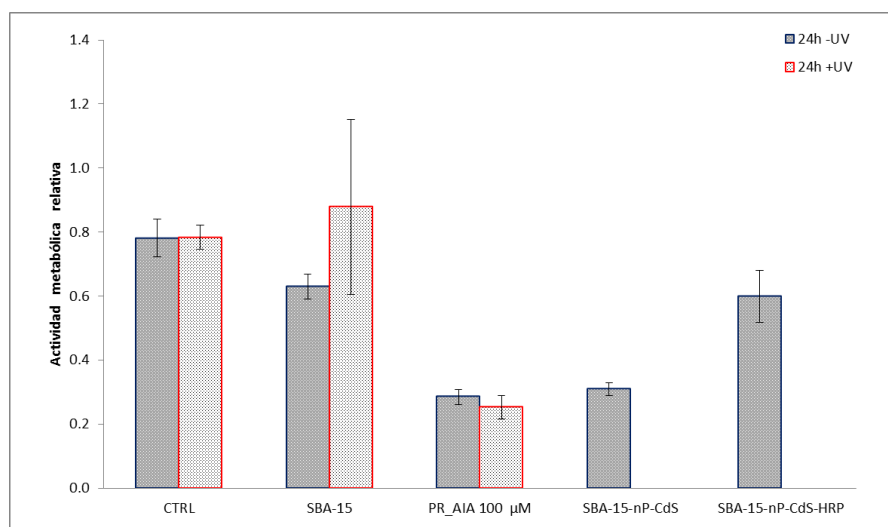


Figura 55. Resultados de viabilidad de las células MCF-7 después de 24 horas empleando a los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP, SBA-15-nP-CdS y los Productos de Oxidación (PR) del AIA.

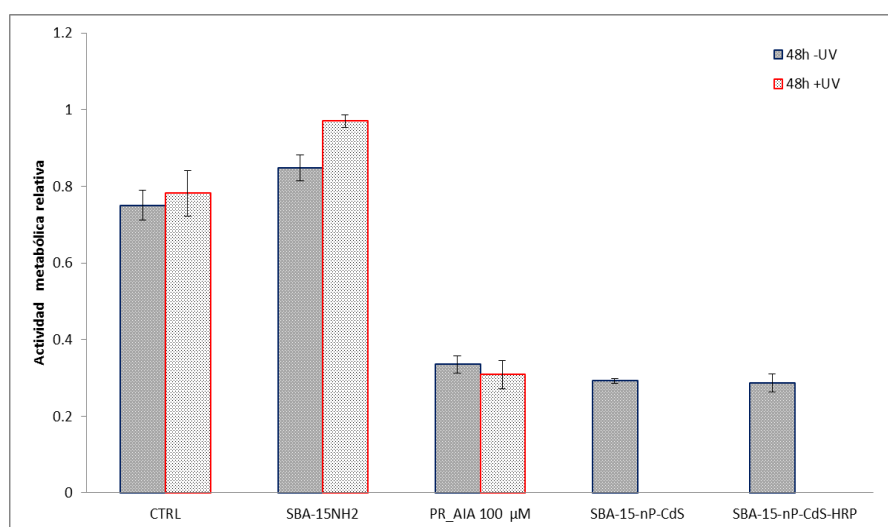


Figura 56. Resultados de viabilidad de las células MCF-7 después de 48 horas empleando a los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP, SBA-15-nP-CdS y los Productos de Oxidación (PR) del AIA.

Es de resaltar el hecho de que en los experimentos en que los sistemas no fueron irradiados con luz ultravioleta, es decir, no hubo activación del sistema fotocatalizador para comenzar la reacción, se observó que los valores en la actividad metabólica también se vieron afectados a las 24 y 48 horas después del tratamiento de las MCF-7 (figura 55 y 56); lo cual en el caso particular empleando al sistema SBA-15-nP-CdS, puede ser explicado nuevamente por la propuesta de Folkes y Wardman, la cual implica la no activación de la reacción en ausencia de H_2O_2 , para los sistemas en que la HRP y el AIA no se encuentran inmovilizados en algún soporte y pueden entrar dentro del interior de las células y provocar la citotoxicidad, por la activación de la reacción dentro de ellas. En el caso del sistema SBA-15-nP-CdS-HRP, la reducción en la actividad metabólica a las 24 y 48 horas sin haber sido irradiado con luz ultravioleta (figura 55 y 56), nos muestra un resultado contradictorio ya que se esperaba que al estar los componentes del sistema inmovilizados la propuesta de Folkes y Wardman tendría que ser reafirmada ya que, la enzima no tendría la capacidad de encontrarse con el sustrato para poder activarlo y mostrar así su efecto citotóxico. Dicho fenómeno debe estudiado aún más para ser explicado, aunque una probable explicación es que la HRP se esté desorbiendo del sistema, y entonces participe de la activación del AIA a la hora de aplicarla en las células. Esto debe ser estudiado posteriormente para tener una explicación certera de lo observado.

Empleando a los productos de reacción aislados de la oxidación del AIA catalizada por la HRP y nP-CdS en solución, se encontró que estos causaban una disminución en la actividad metabólica, de aproximadamente el 60% de la viabilidad de las MCF-7 desde las primeras 24 horas de tratamiento (figura 55), siendo esto logrado mediante el empleo de 100 μ M de la mezcla de los productos de reacción y manteniéndose constantes estos resultados hasta las 48 horas después (figura 56). Este resultado es importante ya que no se ha reportado la actividad citotóxica de los productos, sino más bien de los intermediarios de la reacción, que son radicales de poca duración. Más estudios deben hacerse para comprobar y optimizar en su caso el tratamiento con los productos finales de la reacción. Esto abre una ventana importante de posibilidades ya que los productos pueden ser sintetizados en un reactor enzimático *ex situ*, y solo aplicarlos a la célula. Claro que también deben considerarse los efectos farmacocinéticos, y de toxicidad dentro de los estudios posteriores.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del presente trabajo, se pueden enlistar las siguientes conclusiones:

- Se lograron sintetizar nanopartículas semiconductoras de sulfuro de cadmio mediante el método de micelas inversas, el cual resulta ser uno de los más sencillos y versátiles, sin embargo, las características reportadas para este tipo de nanopartículas empleando el método ya mencionado (espectros de fluorescencia y UV-Vis, tamaño de partícula), no fueron las mismas, lo cual podría ser explicado debido a la falta de estabilidad de las nanopartículas sintetizadas, ya que fenómenos como la aglomeración de estas podrían ser las causantes de estas inconsistencias.
- El sistema conformado por SBA-15-nP-CdS-HRP es capaz de propiciar un sistema fotocatalítico activo el cual puede ser controlado fácilmente por el encendido y apagado de la fuente de luz ultravioleta, sin embargo esta capacidad del sistema solo resultó eficiente empleando como sustrato al Ampliflu™ Red.
- En los sistemas de reacción en que los componentes del mismo se encontraban en solución, los resultados demuestran que mediante el empleo de nP-CdS y H₂O₂, la eficiencia catalítica de la HRP en la reacción de oxidación del AIA es la misma.
- La eficiencia catalítica de las peroxidasas MP-11, CYP C, SbP y CPO es mayor en comparación con el valor obtenido para la HRP, empleando H₂O₂ como agente oxidante, sin embargo, con el empleo de nP-CdS todas estas enzimas no muestran respuesta alguna bajo las condiciones de trabajo empleadas, exceptuando a la HRP.
- El sistema SBA-15-nP-CdS mostró una eficiencia catalítica igual al sistema empleando nP-CdS en solución.
- En la terapia fotodinámica en la que se emplearon a la HRP (0.7 μM), nP-CdS (7 μM) y al AIA en concentración 100 μM en solución, mostraron una disminución de más de un 90% después de 48 horas de tratamiento en la actividad metabólica en las pruebas *in vitro* con células de cáncer de mama MCF-7.
- Los productos de la oxidación catalítica del AIA empleando a la HRP y nP-CdS demostraron tener actividad citotóxica en el empleo contra células MCF-7, viéndose reflejado este resultado con la disminución de aproximadamente el 60% de la actividad metabólica relativa.

- Se logró la identificación de dos subproductos de reacción mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas los cuales son: 3-indolaldehído y la 4-hidroxiquinolona, entre otros que aún no han sido identificados.
- La terapia en la que emplearon los sistemas SBA-15-nP-CdS-HRP y SBA-15-nP-CdS los cuales fueron pre-irradiados agregándoles una concentración 100 μM de AIA, redujeron la actividad metabólica al 100 % de las células MCF-7 a las 24 horas de iniciado el tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert A. Nature, 1958, 182, 421-422.

Alivisatos AP, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes. Annu Rev Biomed Eng. 2005; 7:55–76. [PubMed: 16004566]

Alivisatos P, The use of nanocrystals in biological detection. Nat Biotechnol 2004;22:47–52. [PubMed:14704706]

Anas A; Akita H, Harashima H, Itoh T, Ishikawa M, Biju V. Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe/ZnS quantum dots. J Phys Chem B 2008;112:10005–10011. [PubMed: 18582008]

Aron J, Baldwin DA, Marques HM, Pratt JM, Adams PA, 1986. Hemes and hemoproteins. 1: Preparation and analysis of the heme-containing octapeptide (microperoxidase-8) and identification of the monomeric form in aqueous solution. J. Inorg. Biochem. 27, 227/243.

Avendaño C, Menéndez JC, en Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier, Amsterdam, 2008

Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Rogers GT, Antibody directed enzyme prodrug therapy. Ann Oncol 1994; 5:879 –91.

Bailey RE, Smith AM and Nie S, (2004), Physica E., 25,1

Baldwin DA, Marques HM, Pratt JM, 1987. Hemes and hemoproteins. 5: Kinetics of the peroxidatic activity of microperoxidase- 8: model for the peroxidase enzymes. J. Inorg. Biochem. 30, 203/217.

BERNHARD, S.A. The structure and function of enzymes. New York: 1968. W. A. Benjamín, Inc., p. 13.

BioTek Instruments, (2006) Determination of Horseradish Peroxidase (HRP) Using Amplex Red and the Synergy™MHT Microplate Reader, application note.

Blanco RM, Calvete JJ, Guisán JM, Enzyme Microbial Technology 11 (1989) 353.

Brightwell J, Tseng MT, Peroxidase content in cell subpopulations of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. Cancer Res 1982;42:4562– 6.

Brus L, (1986) Journal of Physical Chemistry, 90, 2555–2560

Wermuth CG, en The Practice of Medicinal Chemistry (Ed.: C. G. Wermuth), 2ª Ed, Academic Press, 2003, pp. 561–585.

Cabrera Silvia, Díez-Torrubia Alberto, Profármacos: pasado, presente y futuro An. Quím. 2010, 106(3), 207–214

Cancer Mundial, International Agency for Research on Cancer, IARC, <http://www.dep.iarc.fr>

Candeias LP, Folkes LK, Dennis MF, Patel KB, Everett SA, Stratford MRL, Wardman P, Free-radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. *J Phys Chem* 1994;98:10131–7.

Candeias LP, Folkes LK, Wardman P, Amplification of oxidative stress by decarboxylation: a new strategy in anti-tumour drug synthesis. *Biochem Soc Trans* 1995;23:262S

Cao X, Chen C, Yu H, Wang P. (2014) Horseradish peroxidase-encapsulated chitosan nanoparticles for enzyme-prodrug cancer therapy. *Biotechnology Letters*

Casella L, Monzani E, Nicolis S. Potential applications of peroxidases in the fine chemical industries. In: Torres E, Ayala M, editors. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010..

Chan WC, Maxwell DJ, Gao X, Bailey RE, Han M, Nie S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13(1):40–46. [PubMed: 11849956].

Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Rder B, Hackbarth S, Winnik FM. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir* 2007;23:1974–1980. [PubMed: 17279683]

Chong M. and Zhao X.S. (2003), *Journal of Physical Chemistry*, 107, 12650-12657

Connolly CN, Futter CE, Gibson A, Hopkins CR, Cutler DF, Transport into and out of the Golgi complex studied by transfected cells with cDNAs encoding horseradish peroxidase. *J Cell Biol* 1994;127:641–52.

Connors TA, Duncan R, Knox RJ, The chemotherapy of colon cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1373–8.

Connors TA, The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy. *Gene Ther* 1995;2:702–9.

Zhao DY, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD, *Science* 279 (1998) 548

Delehanty JB, Mattoussi H, Medintz IL, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 1091- 1105 .

Deshpande SS, Enzyme Immunoassays, From Concept to Product Development, Chapman and Hall, 169-171 (1996).

Díaz JF, Balkus KJ Jr., Catal J. Mol., B: Enzimatic 2 (1996) 115.

Diree S, Ceccato R, Facchin G, and Carturan G, (2001) Journal of Materials Chemistry, 11, 678.

Doble M, kruthiventi AK y Gaikar VG, Biotransformations and Bioprocesses. New York: Ed. Marcel Dekker Inc. 2004.

Duncan R, Dimitrijevic S, Evagorou EG, The role of polymer conjugates in the diagnosis and treatment of cancer. STP Pharma Sci 1996;6:237– 63.

Ehrlich P, Angew. Chem. 1910, 23, 2–8

Elizondo N, ciencia UANL, 2005, V3, Num. 2, 165-167.

Engvild KC, The death hormone hypothesis. Plant Physiol 1989;77:282–5.

Escobar JA, Va´squez-Vivar J, Cilento G, Free radicals and excited species in the metabolism of indole-3-acetic acid and its ethyl ester by horseradish peroxidase and by neutrophils. Photochem Photobiol 1992;55:895–902.

Ettmayer P, Amidon GL, Clement B, Testa BJ, Med. Chem. 2004, 47, 2393–2404.

Folkes LK, Dennis MF, Stratford MRL, Candeias LP, Wardman P, Peroxidase-catalysed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA and mammalian cells in vitro. Biochem Pharmacol 1999;57:375–82.

Folkes LK, Wardman P. Oxidative activation of indole-3-acetic acid to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. Biochem Pharmacol 2001;61:129-36.

Fortier G, Laliberte M, Surface modification of horseradish peroxidase with poly(ethylene glycol)s of various molecular masses. Biotechnol Appl Biochem 1993;17:115–30.

Fruk L., Rajendran V., Spengler M., and Niemeyer C.M. (2007) ChemBiochem, 8,2195-2198.

Gandubert VJ, Torres E, Niemeyer CM. Investigation of cytochrome P450- modified cadmium sulfide quantum dots as photocatalysts Journal of Materials Chemistry 2008; 18, 3824-3830.

Gazarian IG, Lagrimini M, Mellon FA, Naldrett MJ, Ashby GA, Thorneley RNF, Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. *Biochem J* 1998;333:223–32.

Giljohannand DA, Mirkin CA. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*. 2009; 462:461–464. [PubMed: 19940916]

Gratzel M, (1983) *Energy Resources through Photochemistry and Catalysis*, Academic Press, New York.

Greco O, Dachs GU, Wardman P, Folkes LK, Chaplin DJ, Development of an enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:478.

Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2001;1:151-160.

Green M, Howman E. Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. *Chem Commun* 2005;7:121–123.

Griffiths JR, Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* 1991;64:425–7.

Hardman RA, toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect* 2006;114:165–172. [PubMed: 16451849].

Hsieh PW, Hung CF, Fang JY, *Curr. Pharm. Des.* 2009, 15, 2236–2250.

Husain Q, Husain M, Kulshrestha Y, Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 2009;29(2):94–119.

Ipe BI, Lehnig M, Niemeyer CM. On the generation of free radical species from quantum dots. *Small* 2005;1:706–709. [PubMed: 17193510]

Jeong YM, Oh MH, Kim SY, Li H, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, Kim WY, Kim DS. Indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase induces apoptosis in TCCSUP human urinary bladder carcinoma cells. *Pharmazie*. 2010 Feb;65(2):122-6.

Juzenas P, Chen W, Sun YP, Coelho MAN, Genralov R, Genralova N, Christensen IL. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Delivery Revs* 2008;60:1600–1614.

Kanofsky JR, Singlet oxygen production from the peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* 1988;263:14171–5.

Kato K, Irimescu R, Saito T, Yokogawa Y, Takahashi H, Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (2003) 203.

Kobayashi S, Sugioka K, Nakano M, Takyu C, Yamagishi A, Inaba H, Excitation of indole acetate in myeloperoxidase-H₂O₂ system: possible formation of indole acetate cation radical. Biochem Biophys Res Commun 1980;93:967–73.

Krylov SN, Dunford HB, Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. In: Obinger C, Burner U, Erberman R, Penel C, Greppin H, editors. Plant peroxidases: biochemistry and physiology. Geneva: University of Geneva, 1996. p. 59–69.,

Kubinyi H, Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2, 665–668; b) S. Ekins, Y. Nikolsky, T. Nikolskaya, Trends Pharmacol. Sci. 2005, 26, 202–209.

Lehninger AL, Nelson DL, and Cox MM, (2005) Principles of Biochemistry, Ed, W. H. Freeman 4th edition, V1, p. 206.

Li M, Mann S, Langmuir, 16, 7088, (2000)

Lian Gao. “Synthesis and Characterization of CdS Nanorods via Hydrothermal Microemulsion”. Langmuir. 2003, 19, 208-210.

Lindberg P, Nordberg P, Alminger T, Braendstroem A, Wallmark B, J. Med. Chem. 1986, 29, 1327–1329.

Longoria A, Tinoco R, and Torres E, Enzyme technology of peroxidases: immobilization, chemical and genetic modification. In: E. Torres, & M. Ayala, Biocatalysis based on heme peroxidases, Germany: Springer (2010) p. 325.

Lopez RA, (2011) Tesis de licenciatura: Fotonanobiocatalizador compuesto de nanopartículas de CdS, peroxidasa de rábano y material mesoporoso sba-15, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, pue.

Lovric J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger D. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. J Mol Med 2005;83:377– 385. [PubMed: 15688234]

Lovric J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. Chem Biol 2005;12:1227–1234. [PubMed: 16298302]

Lozano R, Knaul FM, Gómez-Dantés H, Arreola-Ornelas H, Méndez O. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.

- Marshall JL**, Hwang JJ, Expert Opin. Pharmacother. 2002, 3, 733–743.
- Mathers CD**, Lopez AD, Murray CJL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. New York: Oxford University Press, 2006:45-93.
- Medintz IL**, Mattoussi H, Clapp AR, Int. J. Nanomed. 2008 , 3 ,151 – 167 .
- Melton RG**, Sherwood RF, Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. J Natl Cancer Inst 1996;88:153– 65.
- Michalet X**, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. Science. 2005; 307(5709):538–544. [PubMed: 15681376]
- Mirsky A**, Diengott D, Hypoglycemic action of indole-3-acetic acid by mouth in patients with diabetes mellitus. Proc Soc Exp Biol Med 1956;93:109 –10.
- Munro OQ**, Marques HM, 1996. Heme-peptide models for hemoproteins 1. Solution chemistry of N-acetyl-microperoxidase- 8. Inorg. Chem. 35, 3752/3767.
- Ni T**, Kotov NA, “CdS Nanoparticles Modified to Chalcogen Sites: New Supramolecular Complexes, Butterfly Bridging, and Related Optical Effects”. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 3980-3992
- Ortiz de Montellano PR**. Catalytic mechanisms of heme peroxidases. In: Torres E, Ayala M, editors. Biocatalysis Based, on Heme Peroxidases. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010.
- Pedley RB**, Boden JA, Begent RHJ, Turner A, Haines AMR, King DJ, The potential for enhanced tumour localisation by poly(ethyleneglycol) modification of anti-CEA antibody. Br J Cancer 1994;70: 1126–30.
- Peto R**, Boreham J, Clarke M, Davies C, and Beral V, UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. Lancet 2000, 355: 1822
- Pileni MP**,Langmuir,17,7476 (2001).
- Prodrugs: Challenges and Rewards** (Eds.: V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley), Springer, New York, 2007.
- Qi L**, Ma J, Cheng H, Zhao Z, Colloids surfaces A.,108, 117 (1996).
- Raimondi F**, Scherer GG, Kotz R, and Wokaun A, (2005) Angewandte Chemie International, 44, 2190.

- Rajendran V**, Lehnig M, Niemeyer CM. Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands. *Journal of Materials Chemistry* 2009;19:6348–6353. y 2010
- Rautio J**, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, Savolainen J, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 255–270.
- Rodríguez FP**, (2008) Tesis doctoral: Síntesis de nanopartículas semiconductoras recubiertas con almidón, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.
- Rodríguez-Cuevas S**, Capurso-García M. Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obst Méx* 2006;74:585-93.
- Rodríguez-Cuevas S**, Macías C, Labastida S. Cáncer de mama en México: ¿enfermedad de mujeres jóvenes? *Ginecol Obst Méx* 2000;68(5):185-190.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2.2002.** Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.
- Sinhababu AK**, Thakker DR, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 241–273.
- Smith AM**, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Delivery Revs* 2008;60:1226–1240
- Smith AT**, Santama N, Dacey S, Edwards M, Bray RC, Thorneley RNF, Burke JF, Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme. *J Biol Chem* 1990;265:13335–43.
- Stadtman ER**, *Annu. Rev. Biochem.* 1993 , 62 , 797 – 821 .
- Takahashi H**, Li B, Sasaki T, Miyazaki C, Kajino T, Inagaki S, *Microporous Mesoporous Mater.* 44-45 (2001), 755.
- Tinoco R**, Vázquez-Duhalt R, *Ciencia de la Biotecnología*, 2007, V14, CS3, 349
- Torres E**, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal B* 2003;46:1–15.
- Tsay JM**, Michalet X. New light on quantum dot cytotoxicity. *Chem Biol* 2005;12:1159–1161. [PubMed: 16298294]

Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditch TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E, Cassidy J on behalf of the Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]:first member of a new class of chemotherapeutic agents—drugpolymer conjugates. *Clin Cancer Res* 1999;5:83–94.

Vaucher S, Fielden J, Li M, Dujardin E, Mann S, *Nano Lett.*,2, 225 (2002)

Vijay TJ, McPherson GL. “Morphology of CdS Nanocrystals Synthesized in a Mixed Surfactant System”. *Nano Lett.* 2002, Vol. 2, No. 4, 263-268.

Vossmeier T, Katsikas L, Giersig M, Weller H, “CdS Nanoclusters: Synthesis, Characterization, Size Dependent Oscillator Strength, Temperature Shift of the Excitonic Transition Energy, and Reversible Absorbance Shift”. *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 7665-7673.

Wang Z. *Analytica Chimica Acta* 725 (2012) 81– 86

Zhang Z, Dai S, Hunt RD, Wei Y, and Qiu S, (2001) *Advanced Materials*, 13, 493.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry* 1997; 253:162.