



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON ISOFLAVONOIDES EXTRAÍDOS DE  
*EYSENHARDTIA POLYSTACHYA (ORTEGO) SARG (EP)* PARA ESTUDIAR SUS  
EFECTOS ANTITUMORALES

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
MARÍA GUADALUPE FERREIRA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. MIRIAM ROCÍO ESTEVEZ GONZÁLEZ  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ROGELIO RODRÌGUEZ TALAVERA  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
DRA. MARTHA ELENA CRUZ SOTO  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO-QUERÉTARO

JURIQUILLA, QUERÉTARO. MAYO 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Contenido

---

Índice de tablas .....	4
Índice de figuras.....	5
Resumen .....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Antecedentes.....	10
1.2 Objetivos.....	16
1.2.1 Objetivo general.....	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	16
2. Planteamiento del problema.....	17
2.1 Justificación.....	17
2.2 Hipótesis.....	18
3. Marco teórico.....	19
3.1 Cáncer de mama.....	19
3.1.1 Definición y estadísticas.....	19
3.1.2 Clasificación y tipos de cáncer de mama.....	22
3.1.2.1 Cáncer de mama hormonosensible.....	26
3.1.2.2 Tratamientos para cáncer de mama hormonosensible.....	29
3.2 Palo azul ( <i>Eysenhardtia polystachya</i> ).....	35
3.2.1 Compuestos presentes en el palo azul.....	37
3.3 Nanotecnología y nanomateriales.....	41
3.3.1 Materiales nanocerámicos. Método de Stöber.....	45
3.4 Técnicas de caracterización.....	48
3.4.1 Test o prueba de Shinoda.....	48
3.4.2 Espectroscopía UV-Vis.....	49
3.4.3 Espectroscopía FTIR.....	51
3.4.4 Cromatografía en capa fina y columna.....	52
3.4.5 Espectroscopía Raman.....	52
3.4.6 Dispersión de luz.....	53
3.4.7 Difracción de rayos X.....	53
3.4.8 Microscopía SEM.....	54

4	Descripción de la propuesta de trabajo.....	55
4.1	Identificación y caracterización de la muestra vegetal .....	55
4.2	Extracción de los compuestos de EP.....	55
4.3	Identificación de los compuestos de EP por ensayos de colorimetría .....	56
4.4	Caracterización por espectroscopia UV-Vis de los compuestos de EP .....	56
4.4.1	Determinación de compuestos metilados y grupos OH libres de los extractos de EP. 58	
4.5	Caracterización de los compuestos de EP por microscopia Raman.....	58
4.5.1	Modelado matemático de moléculas fluorescentes .....	58
4.6	Caracterización por FTIR de los compuestos de EP.....	59
4.7	Separación de los compuestos de EP por Cromatografía en columna y capa fina 59	
4.7.1	Caracterización por UV-Vis.....	60
4.7.2	Caracterización por FTIR y Raman.....	60
4.8	Síntesis de nanopartículas de sílice .....	60
4.9	Cuantificación del tamaño de las nanopartículas de sílice por dispersión de luz dinámica.....	60
4.10	Difracción de rayos X de las nanopartículas.....	61
4.11	Funcionalización de la superficie de las partículas de sílice .....	61
4.12	Ensamble de los compuestos de EP a las nanopartículas funcionalizadas de sílice. 61	
4.13	Caracterización de las nanopartículas de sílice con AMPS y compuestos de EP.. 62	
4.13.1	Análisis por FTIR.....	62
4.13.2	Análisis por microscopia Raman.....	62
4.13.3	Difracción de rayos X.....	62
4.13.4	Potencial zeta de las nanopartículas .....	62
4.14	Estudio de internalización del nanosistema a la línea celular MCF-7.....	62
5.	Análisis y discusión de los resultados .....	64
5.1	Identificación de la muestra vegetal.....	64
5.2	Extracción de los compuestos de EP.....	65
5.3	Caracterización por ensayos de colorimetría.....	68
5.4	Caracterización por espectroscopia UV-Vis de los compuestos de EP.....	69
5.5	Determinación de compuestos con grupos OH libres de los extractos de EP.....	75
5.6	Caracterización de los compuestos de EP por espectroscopía Raman. ....	77
5.6.1	Modelado matemático de moléculas fluorescentes .....	82

5.7	Análisis de los compuestos de EP por FTIR .....	85
5.8	Separación de los compuestos de EP por cromatografía en capa fina y en columna. 87	
5.8.1	Caracterización por UV-Vis de los grupos de las fracciones obtenidas.....	89
5.8.2	Caracterización por FTIR y espectroscopía Raman de los compuestos separados 90	
5.9	Síntesis de nanopartículas de sílice .....	92
5.9.1	Cuantificación del tamaño de las nanopartículas de sílice por dispersión de luz dinámica (DLS).....	94
5.10	Funcionalización de la superficie de las nanopartículas de sílice.....	95
5.11	Caracterización de las nanopartículas de sílice con APTES y compuestos de EP.97	
5.11.1	Análisis por FTIR.....	97
5.11.2	Análisis por espectroscopía Raman .....	98
5.11.3	Difracción de rayos X.....	99
5.11.4	Potencial zeta .....	100
5.12	Internalización de las nanopartículas a la línea celular MCF-7.....	101
	Conclusiones.....	103
	Bibliografía.....	104
	ANEXOS.....	113
	Anexo 1. Fotografías de algunas especies del género Eysenhardtia .....	113
	Anexo2. Espectros infrarrojo y Raman de las grupos de fracciones .....	116
	Anexo 3. Productos de la investigación.....	121

# Índice de tablas

---

Tabla 1. Clasificación de inhibidores de aromatasasa (Miller, 2005a) .....	33
Tabla 2. Compuestos encontrados en diferentes partes del árbol de EP .....	38
Tabla 3. Bandas características (longitudes de onda) de los diferentes compuestos extraídos de palo azul reportados por varios autores.....	38
Tabla 4. Valor de absorción para las Bandas I y Bandas II de los diferentes tipos de flavonoides (Sing de Ugaz, 1997). .....	50
Tabla 5. Características del espectrofotómetro VWR 1600.....	57
Tabla 6. Características espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin-Elmer) .....	57
Tabla 7. Compuestos extraídos del duramen del árbol de palo azul.....	66
Tabla 8. Comparativo de los tiempos y porcentaje de extracción de los compuestos de EP con diferentes técnicas de extracción.....	67
Tabla 9. Resultados de la prueba de Shinoda sobre los compuestos extraídos del árbol de palo azul.....	69
Tabla 10. Principales bandas encontradas en los compuestos extraídos del árbol de palo azul a diferentes pH y valor del coeficiente de extinción molar ( $\text{Log } \epsilon$ ).....	75
Tabla 11. Principales bandas obtenidas de los extractos antes y después de agregar acetato de sodio .....	76
Tabla 12. Ecuaciones características del extracto E con sus correspondientes parámetros y % de pérdida de fotoluminiscencia.....	81
Tabla 13. Compuestos individuales separados de EP mediante CCF y CCC.....	88

# Índice de figuras

---

Figura 1. a) Estructura química base de los flavonoides con su correspondiente numeración. b) Estructura química base de los isoflavonoides con su numeración parcial (Álvarez & Cambeiro, 2012). .....	11
Figura 2. a) Representación esquemática de la estructura química del coumestrol. b) Representación esquemática de la estructura química de diferentes flavonas, con su correspondiente numeración y las posiciones de los sustituyentes (C. Wang, Mäkelä, Hase, Adlercreutz, & Kurzer, 1994). .....	12
Figura 3. Estructura química de la Genisteína y Daidzeína. Genisteína: R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = H. Daidzeína: R <sub>1</sub> = OH; R <sub>2</sub> = H (Mahmoud, Yang, & Bosland, 2014).....	13
Figura 4. a) Estructura química del tetraetilortosilicato. b) Estructura química del 3-aminopropiltriethoxisilano (AMPS) (SIGMA-ALDRICH, 2017).....	14
Figura 5. Anatomía de la glándula mamaria. Se muestran las principales partes de una glándula mamaria, incluidos los lóbulos y los conductos o ductos lactíferos (Donegan & Spratt, 1982).....	23
Figura 6. Tipos de cáncer de mama dependiendo de su infiltración en otros tejidos (Sinn & Kreipe, 2013; Viale, 2012; Weigelt et al., 2010).....	24
Figura 7. Tipo de cáncer de mama dependiendo de su condición hormonal (Arce et al., 2011).....	25
Figura 8. Estructura tridimensional y acción de la aromatasasa sobre sus sustratos (Hong & Chen, 2006; Miller, 2005; Ponzzone, Mininanni, Cassina, Pastorino, & Sismondi, 2008; Sanderson et al., 2004). .....	28
Figura 9. Vista del tronco (a), hojas- flores (b) e infusión (c) de <i>Eysenhardtia polystachya</i> (De Safford, William Edwin - Safford, William Edwin 1916). "Lignum nephriticum". Annual report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution. Washington: Government Printing Office. p. 271–298., Dominio público, <a href="https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21467338">https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21467338</a> ; UNAM, 2017).....	35
Figura 10. Estructura química de la Coatlina B y el tetrahidrometanobenzofuro[2,3-d]oxacina o Matlalina (A. Ulises Acuña, Amat-Guerri, Morcillo, Liras, & Rodríguez, 2009). 40	
Figura 11. Estructura química 7-hidroxi, 2', 4', 5' trimetoxi isoflavonoide (Burns, Dalgarno, Gargan, & Grimshaw, 1984) .....	40
Figura 12. Prueba de Shinoda. Reacciones características y compuestos que presentan esta reacción (Brown, LeMay, Bursten, Murphy, & Woodward, 2009; Krishnaswamy, 2003)... 49	
Figura 13. Esqueleto de compuestos del tipo flavonoide, donde se indican los sistemas responsables de las bandas características mostradas en espectros de UV-Vis. ....	50
Figura 14. Diagrama donde se muestran las diferentes técnicas usadas para extraer los compuestos de palo azul, así como las claves y condiciones de extracción. ....	55
Figura 15. Cortes transversales del duramen de EP con un aumento de 2.5x. ....	65

Figura 16. Prueba de Shinoda para los compuestos extraídos con diferentes solventes. a) Colores antes de la reacción de Shinoda. b) Resultados obtenidos después de la reacción de Shinoda.....	68
Figura 17. Espectros UV-Visible de los extractos de EP. A) Compuestos extraídos con etanol (E). B) Compuestos extraídos con metanol (M). C) Compuestos extraídos con una mezcla etanol-metanol. D) Compuestos extraídos con una mezcla agua-metanol-etanol... 70	70
Figura 18. Espectros, con insertos de tablas, de los extractos obtenidos utilizando el método de Burns et al., (1984) (A), sonicado (B) y microondas (C). El espectro del panel A corresponde al extracto E. El espectro del panel B corresponde a la muestra S-066 y el espectro del panel C corresponde a la muestra MO-1200. En todos los casos, en el eje de las abscisas se encuentra graficada la longitud de onda en nanómetros (nm) y en el eje de las ordenadas se encuentra graficada la Absorbancia en unidades arbitrarias. Los insertos de tablas, resumen para cada caso las bandas características que se obtuvieron en cada tratamiento.....	72
Figura 19. Extracción secuenciada de compuestos de EP usando diferentes solventes. A) Extracción con hexano. B) Extracción con acetato de etilo. C) Extracción con metanol. D) Extracción con agua destilada. En cada espectro está graficado en el eje de las abscisas la longitud de onda en nanómetros y en el eje de las ordenadas la absorbancia en unidades arbitrarias.....	73
Figura 20. Espectros UV-Vis de los extractos de los compuestos de palo azul a diferentes pH. A) Compuestos extraídos con E; B) Compuestos extraídos con M; C) Compuestos extraídos con M-E; D) Compuestos extraídos con A-M-E. En todos los casos, la línea negra corresponde a un pH de 4, la línea roja a un pH de 7.4 y la línea verde a un pH de 8.....	74
Figura 21. Espectros de los extractos E, M, M-e y A-M-E en etanol (línea negra) y con acetato de sodio (línea roja). En el panel A) se encuentra el extracto obtenido con etanol, en el panel B) el extracto obtenido con metanol, en el panel C) el extracto obtenido con una mezcla metanol-etanol y en el panel D) el extracto obtenido con una mezcla agua-metanol-etanol. En el eje de las abscisas está graficada la longitud de onda en nanómetros y el eje de las ordenadas está graficada la absorbancia en unidades arbitrarias.....	76
Figura 22. Espectros Raman del extracto E a diferentes pH. En el panel A) se muestra el espectro del extracto a pH 4, en el panel B) se muestra el espectro del extracto a pH 7.4 y en el panel C) se muestra el espectro del extracto a pH 8. En el panel D) se muestra un espectro comparativo de las máximas intensidades del extracto a diferentes pH. En el eje de las abscisas se grafica la longitud de onda y en el eje de las ordenadas la intensidad de fotoluminiscencia en unidades arbitrarias.....	78
Figura 23. Desplazamiento de Stokes. Espectros de absorción y de emisión del extracto E a pH 4 (panel A)), pH 7.4 (panel B)) y pH 8 (panel C)).....	80
Figura 24. Espectro fotoluminiscente del extracto E a diferentes pH. En el espectro se puede apreciar la dependencia de la fotoluminiscencia con el pH y el decaimiento de fotoluminiscencia con el tiempo. En el eje de las abscisas se grafica el tiempo en segundos y en el eje de las ordenadas se grafica la intensidad de la fotoluminiscencia en unidades arbitrarias.....	81
Figura 25. Modelos de estructura para las moléculas de: a) aurona, b) flavona, c) isoflavona and d) matlalina.....	83



Figura 26. Diagrama de los niveles de energía HOMO-LUMO para las diferentes moléculas. ....	83
Figura 27. Potencial electrostático para las moléculas de: aurona, flavona, isoflavona y matlalina.....	84
Figura 28. Espectros FTIR de los extractos de: A) Etanol, B) Metanol, C) Metanol-Etanol y D) Metanol-Etanol-Agua. En el eje de las abscisas se encuentra graficada la longitud de onda en $\text{cm}^{-1}$ y en el eje de las ordenadas se encuentra graficada la Transmitancia en unidades arbitrarias. ....	86
Figura 29. A) Placas de CCF a 254 nm. Se logró separar los compuestos no polares y se muestran las bandas similares para las extracciones obtenidas. B) Placas de CCF a 365 nm. Separación de compuestos que presentan fluorescencia. C) Set de fracciones que presentaron las mismas bandas. D) Fluorescencia de algunas de las fracciones extraídas. En la imagen se aprecia de la fracción 19-23.....	88
Figura 30. Espectros de los compuestos separados del extracto E.....	89
Figura 31. Micrografías de electrones secundarios retrodispersados de las nanopartículas de sílice sintetizadas con el método propuesto, tomadas con un microscopio Hitachi SU8230. La muestra a) fue tomada a 3.0 kV, con una distancia de trabajo (WD) de 5 mm, una magnificación de 12k y con un detector en configuración elevada, mientras que la b) se tomó a 1.0 kV, WD= 3.1 mm, magnificación de 350k, con una combinación de detectores bajo y elevado. ....	93
Figura 32. Espectro IR de las nanopartículas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ).....	93
Figura 33. Distribución del tamaño de las nanopartículas.....	94
Figura 34. Modelo propuesto de la funcionalización de las nanopartículas con APTES.....	95
Figura 35. Figura 31. Micrografías de electrones secundarios retrodispersados de las nanopartículas con APTES, tomadas con un microscopio Hitachi SU8230. a) 3.0 kV, WD= 3.3 mm y 300k aumentos; b) 3.0 kV, WD= 3.2 mm y 500k aumentos; c) 3.0 kV, WD= 3.2 mm y 120k aumentos. Las tres imágenes se obtuvieron con una combinación de detectores bajo y elevado. ....	96
Figura 36. Espectro IR de las nanopartículas sin APTES y con APTES.....	96
Figura 37. Espectro IR de las nanopartículas acopladas a compuestos de EP. ....	98
Figura 38. Espectro Raman del nanosistema y la rodamina.....	99
Figura 39. Difractograma de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Stöber. N = Nanopartículas; NA = Nanopartículas con APTES; NS = Nanopartículas + APTES + extracto E.....	100
Figura 40. a) La fluorescencia del palo azul en células MCF-7, fue captada por microscopía confocal a 488 nm. b) La micrografía en campo claro fue adquirida por el mismo microscopio y con el mismo objetivo, pero sin el filtro de fluorescencia.....	102

# Resumen

---

En esta tesis se presenta la síntesis, funcionalización y caracterización de nanopartículas de sílice, de morfología esférica, con compuestos del tipo flavonoide extraídos de un arbusto que se puede encontrar en la región centro del país. Además, se describen metodologías originales para la síntesis de nanopartículas de sílice y la extracción de los compuestos de interés, siendo éstas más simples y rápidas que las reportadas actualmente. Algunos de los resultados obtenidos de la caracterización de los compuestos extraídos no solo no se encontraron reportados en la literatura, sino que tienen potencial para ser utilizados como estándares o referencias para futuros trabajos de investigación en esta área. Finalmente, el modelo del nanosistema usado en las pruebas *in vitro* se internalizó en células MCF-7 sin necesidad de efectuar algún procedimiento adicional o previo, lo cual es un aporte importante, ya que al comparar este resultado con la literatura se encontró que, en trabajos similares, se requería una preparación adicional para llevar a cabo estudios *in vitro*.

# 1. Introducción

---

En este trabajo se presenta la metodología para desarrollar un nanosistema formado por nanopartículas de morfología esférica, acopladas con compuestos naturales del tipo flavonoide, con potenciales usos como biomarcador y/o en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, siendo el enfoque de este trabajo sobre el cáncer de mama hormonosensible. Además, el nanosistema obtenido presentó características morfológicas y químicas óptimas y superiores a las presentadas por otros tipos de nanopartículas con aplicaciones similares. En esta tesis se incluye la síntesis de nanopartículas de sílice, usando el método de Stöber, la extracción de los compuestos naturales, la bio-funcionalización de las nanopartículas con los compuestos extraídos, la caracterización del material compuesto obtenido y un estudio *in vitro* de internalización de éste en células MCF-7.

El documento está organizado de la siguiente forma: en la primera sección se presentan los antecedentes relacionados con el tema; se comienza revisando lo asociado con los compuestos del tipo flavonoide y la utilización de éstos en ensayos biológicos. Más aún, se incluye el uso de nanopartículas acopladas a diferentes compuestos para detección y tratamiento de enfermedades, incluido el cáncer y se presentan los objetivos propuestos para este trabajo. Posteriormente, se muestra el planteamiento del problema, la justificación y la hipótesis en la que se basó la investigación. Se continúa con el marco teórico necesario para abordar este tema, definiendo lo que es el cáncer de mama hormonosensible, estadísticas y compuestos usados actualmente para su tratamiento. Esta sección también contiene una recopilación de los compuestos hasta ahora encontrados que pertenecen al material vegetal y se revisa lo relacionado con la síntesis de las nanopartículas. Asimismo, se incluye un apartado donde se describen los fundamentos de las técnicas de caracterización. En la siguiente sección se describe la propuesta de trabajo, incluyéndose las metodologías utilizadas, una de las contribuciones originales de este trabajo. Consecutivamente se presentan los resultados encontrados junto con la discusión de los mismos y finalmente, las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos.

## 1.1 Antecedentes

Al igual que los vertebrados, las plantas también producen compuestos con estructuras químicas muy parecidas a las de las hormonas. Estos compuestos poseen múltiples propiedades biológicas que han sido reportadas en numerosas investigaciones. Además, su abundancia en la dieta y su amplio uso en la medicina tradicional, los convierte en una pieza importante para explicar la relación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de adquirir ciertas enfermedades crónicas. En un futuro, estos compuestos pueden llegar a ser utilizados en la farmacoterapia en diferentes tratamientos contra enfermedades como el cáncer.

La principal clase de compuestos de este tipo, que ha sobresalido son los flavonoides. Estos compuestos fueron descubiertos por el científico húngaro Albert Szent-Györgyi (ganador del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937), quien les acuñó el nombre de “vitamina P”, cuyo nombre dejó de usarse desde 1950. A estos compuestos se les han adjudicado propiedades como antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras (Álvarez & Cambeiro, 2012; Cartaya & Reynaldo, 2001; Martínez Flores, J, Culebras, & Tuñón, 2002).

Flavonoides es el nombre con el que se conoce un gran número de compuestos polifenólicos, de bajo peso molecular, caracterizados por una estructura de fenil-benzo- $\gamma$ -pirona (o fenil- $\gamma$ -cromona). La estructura química básica consiste de un esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$ , donde los componentes  $C_6$  son anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono (**Figura 1**). En las plantas los flavonoides, que son metabolitos secundarios, se encuentran en estado libre o en forma de heterósidos, generalmente, solubles en agua, mientras que sus agliconas, son sólo ligeramente solubles en ésta. Las distintas clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C, mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de esos grupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B, como pueden ser grupos hidroxilo. A esta familia pertenecen las chalconas, flavanonas, flavonas, flavanoles, isoflavonoides, flavonones, antocianinas y taninos.

Existen muchos estudios de cómo compuestos derivados de plantas pueden ser utilizados en el tratamiento de cáncer (Alonso-Castro et al., 2011; Fotsis, Pepper, & Aktas, 1997a; Sanderson et al., 2004). Estos compuestos en su mayoría, tienen

actividad farmacológica como antimutagénicos y anticarcinogénicos (Alonso-Castro et al., 2011; Andrade et al., 2010; Birt, Hendrich, & Wang, 2001; Gullett et al., 2010; Isaac, Jiménez, Yane, Martínez, & Fonseca, 2009; Martínez Flores, J, Culebras, & Tuñón, 2002). Los principales compuestos reportados, con alto potencial para el tratamiento de cáncer de mama, es la familia de los flavonoides, los cuales se ha reportado que pueden actuar como agonistas de estrógenos, ya sea bloqueando alguna enzima importante o en moléculas como los receptores estrogénicos (Birt et al., 2001; Britain et al., 1990; Fotsis et al., 1997a; Grube et al., 2001; Isaac et al., 2009; Paul, 1993; Sanderson et al., 2004; Ta & Walle, 2007; Walle et al., 2007; C. Wang et al., 1994).



Figura 1. a) Estructura química base de los flavonoides con su correspondiente numeración. b) Estructura química base de los isoflavonoides con su numeración parcial (Álvarez & Cambeiro, 2012).

Wang et al. (1994) demostraron que el coumestrol, perteneciente a las isoflavonas, es un inhibidor de la aromatasa, la cual es una enzima ampliamente estudiada por su relación con el cáncer de mama. Estos investigadores reportaron que el coumestrol inhibe a esta enzima 2.6 veces más que la Aminoglutatimida<sup>1</sup> en preadipositos. También se ha encontrado que el coumestrol, actúa como receptor o como agonista del receptor de estrógenos, principalmente del beta y ejerce efectos estrogénicos lo que sugiere que los efectos estrogénicos de coumestrol pueden oponerse en algunos casos por su inhibición de la síntesis de estrógenos (Kuiper et al., 1998).

También se ha explorado si existe una correlación de los grupos hidroxilo pertenecientes a la estructura de los flavonoides y su habilidad para inhibir la actividad enzimática de la aromatasa (Britain et al., 1990; Fotsis, Pepper, & Aktas, 1997b; Hong & Chen, 2006b; Walle et al., 2007). Algunos grupos de investigación sugieren que la hidroxilación del C-7 es la responsable de la actividad inhibidora de la aromatasa (Britain et al., 1990). Otros investigadores sugieren que la inhibición es debida a la di-hidroxilación de los carbonos 5 y 7 de

<sup>1</sup> Inhibidor de aromatasa de primera generación.

la flavona (Ta y Walle 2007). Wang et al. (1994) sugieren que la di-hidroxilación del carbono 2 y 3 decrece la inhibición de la aromatasasa, pues quercetina y morin, que tienen una hidroxilación en la posición 3 y 2 respectivamente, no presentan inhibición de la aromatasasa, mientras sus análogos químicos kaempferol y luteolina, los cuales no presentan hidroxilación en los carbonos 2 y 3 resultaron ser buenos inhibidores de ésta (Figura 2). Fotsis, et al. (1997), sugieren que el anillo C de los flavonoides, no debe estar hidroxilado con un oxo en la posición 4 y una doble unión entre los carbonos 2 y 3 es requerido para que la inhibición de células con cáncer sea máxima.

Otra relación importante que tienen en su estructura los diferentes flavonoides son sus grupos metil, pues con base en ellos se puede determinar la efectividad antitumoral de los flavonoides. Walle et al. (2007) reportaron que 5,7-dimetoxiflavona y 5,7,4'-trimetoxiflavona tuvieron 10 veces más potencia de inhibición en la proliferación celular que sus correspondientes análogos sin metilar, crisina y apigenina (Figura 2). Lo anterior posiblemente se deba a la falta de propiedades antioxidantes, que se relaciona con los grupos libres hidroxilo (Walle et al., 2007).

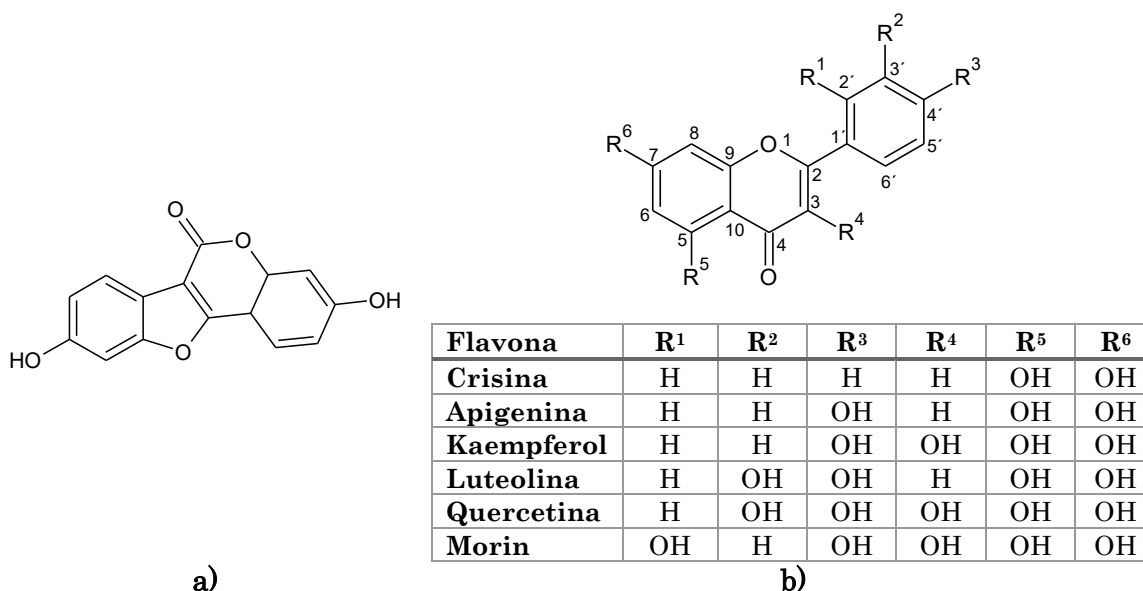


Figura 2. a) Representación esquemática de la estructura química del coumestrol. b) Representación esquemática de la estructura química de diferentes flavonas, con su correspondiente numeración y las posiciones de los sustituyentes (C. Wang, Mäkelä, Hase, Adlercreutz, & Kurzer, 1994).

Así pues, los compuestos derivados de los flavonoides que principalmente contienen grupos metil o hidroxilo en las posiciones 5 ó 7, tienen altas posibilidades de ser usados como inhibidores de la aromatasas, ya que al parecer la aromatasas posee afinidad por estos grupos. También en hongos se han encontrado compuestos que pueden inhibir la aromatasas (*Agaricus bisporus*), ya que de acuerdo a lo reportado por Grube et al. (2001), el perfil cinético de inhibición para la aromatasas es del tipo mixto, por lo que sugirieron la presencia de uno o más inhibidores en el extracto obtenido de estos hongos que forman parte de la dieta.

Los isoflavonoides que han tenido mayor atención por su futuro uso terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama, son los isoflavonoides de la soya, que han llegado a ser nombrados “fitoestrógenos”. Estos “fitoestrógenos” son la Genisteína y Daidzeína principalmente (**Figura 3**). Sin embargo, su actividad terapéutica no queda del todo clara. De acuerdo a varios reportes, la Genisteína tiene una estructura similar a la del estradiol y compite fuertemente con él para ocupar un receptor estrogénico (Borrás et al., 2006; Kuiper et al., 1998).

Actualmente se siguen estudiando otros compuestos derivados de plantas, que pudieran llegar a tener efectos antitumorales. Por ejemplo, los compuestos del palo azul, que se presentan en esta investigación.

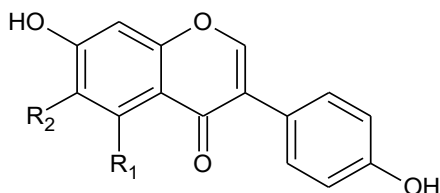


Figura 3. Estructura química de la Genisteína y Daidzeína. Genisteína:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$ . Daidzeína:  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$  (Mahmoud, Yang, & Bosland, 2014)

La eficiencia de un sistema o nanosistema terapéutico, como los usados para tratar cáncer, se mide por su capacidad para reducir y eliminar tumores sin dañar el tejido sano. Así pues, la capacidad para reconocer y marcar tumores es esencial para el éxito del sistema terapéutico. Un aumento en la especificidad de sitio y la internalización puede mejorar la eficacia del tratamiento y disminuir la posibilidad de los efectos secundarios graves que los pacientes de cáncer experimentan a menudo. El objetivo final de la terapéutica del cáncer es aumentar el tiempo de supervivencia y la calidad de vida del paciente. Desde que se comenzaron a utilizar las nanopartículas en investigaciones contra el cáncer, éstas han llevado a importantes mejoras en la terapéutica a través de ofrecer

especificidad a moléculas diana o sitios específicos, su capacidad para vencer la resistencia que ofrece la célula a múltiples fármacos y con ello la entrega eficiente de un agente farmacológico o con capacidad antitumoral. Además, esta nueva herramienta se está esparciendo rápidamente en investigaciones de todo el mundo.

Los materiales de óxido de silicio, que tienen como precursor el tetraetilortosilicato (TEOS, Figura 4a), poseen características físicas y químicas adecuadas para usarse en investigaciones relacionadas con la detección y el tratamiento de cáncer. Estas nanopartículas pueden sintetizarse fácilmente a un tamaño específico (Green et al., 2003; Ibrahim, Zikry, & Sharaf, 2010; Stober, 1968), tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y entrar al citoplasma (Xie et al., 2013) y una superficie que permite añadir químicamente compuestos con actividad biológica o foto luminiscente (Tan et al., 2004; L. Wang, 2008). Por ejemplo, Tran *et al.*, (2013) reportaron que a una nanopartícula de sílice de 90 nm es posible unir hasta 3940 moléculas fluorescentes. Dependiendo del tamaño es la cantidad de moléculas que se pueden unir químicamente a la superficie. Además, son ópticamente transparentes y están caracterizadas por su elevada superficie específica, su nula toxicidad (inertes) y son resistentes al bio-ambiente que se puede formar tanto en pruebas *in vivo* como *in vitro* (Abhilash, 2010; Tran et al., 2013).

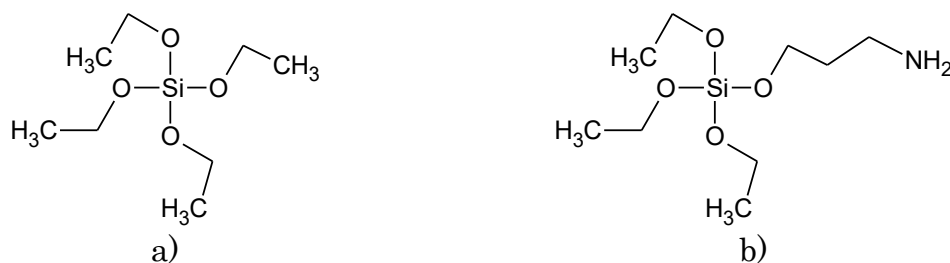


Figura 4. a) Estructura química del tetraetilortosilicato. b) Estructura química del 3-aminopropiltriétoxissilano (AMPS) (SIGMA-ALDRICH, 2017).

La estrategia “post-recubrimiento” de nanopartículas, que es la modificación química de la superficie de éstas con diferentes grupos funcionales, como los carboxilatos, polietilenglicol, octadecil y grupos amino, permite acoplar o unir diferentes compuestos o moléculas (Knopp, Tang, & Niessner, 2009). De acuerdo a lo reportado por varios investigadores, el uso de nanopartículas de sílice post-recubiertas en bioanálisis, mejora las propiedades ópticas que presentan ciertos fluoróforos, como la rodamina, cuando es usada para obtener bio-imágenes en tiempo real en sistemas *in vitro*. Además, ciertos anticuerpos cuando son unidos



a nanopartículas de sílice, son detectados con mucha más sensibilidad que aquellos que no están unidos. También, con el cambio en la superficie de las nanopartículas es posible unir covalentemente enzimas, anticuerpos, receptores, ácidos nucleicos, organelos y hasta células (Ambikapathi & Kempahanumakkagari, 2013; Bae, Tan, & Hong, 2012; Kumar et al., 2008; Tran et al., 2013; Zhao, Bagwe, & Tan, 2004).

Post-recubrir nanopartículas con moléculas que tienen grupos amino terminales ( $-NH_2$ ), como el 3amino-propil-trietoxisilano (AMPS, Figura 4b), ha resultado eficiente en la incorporación de compuestos orgánicos para cualquier tipo de nanopartícula (Ismail Ab Rahman & Padavettan, 2012; Veeranarayanan et al., 2012; Yan, Estévez, et al., 2007). En este caso la unión entre la nanopartícula y el compuesto orgánico no se realiza directamente, sino que la molécula que contiene este grupo amino cumple la función de “puente” o “conector” entre uno y otro. La unión se realiza justamente en el grupo amino por lo que es importante que éste quede “expuesto” en la superficie para que se realice la unión con él. Esta unión entre el grupo amino y el compuesto de interés se puede dar mediante un enlace del tipo covalente que se interpreta, en espectros infrarrojos, como una amina secundaria, o se puede dar mediante enlaces de hidrógeno si se cumplen las condiciones adecuadas (Ismail Ab Rahman & Padavettan, 2012).

El 3amino-propil-trietoxisilano puede usarse como precursor de nanopartículas de silicio, sin embargo, se compromete la forma esférica y la monodispersión de las nanopartículas resultantes. Además, pueden llegar a perderse los grupos amino, resultando en una menor cantidad de puentes o conectores para otras moléculas o compuestos (Branda, Silvestri, Luciani, & Costantini, 2007; Chen et al., 2008; I. A. Rahman, Jafarzadeh, & Sipaut, 2009; Suzuki et al., 2008). Por ello, se recomienda post-recubrir las nanopartículas con el APTES para mantener una considerable superficie de la nanopartícula activada con el grupo amino y con ello mantener la forma y la monodispersión de las nanopartículas.

Actualmente el uso de nanopartículas de sílice, se ha extendido a estudios para detección y tratamiento de diferentes tipos de enfermedades, como el cáncer de mama, usando moléculas con actividad biológica unidas a las nanopartículas, siendo estas moléculas anticuerpos, proteínas, rodamina, fármacos (como los inhibidores de la aromatasas), e incluso medicamentos usados en quimioterapia (Anajwala et al., 2010; Gary-Bobo et al., 2012; Kumar et al., 2008b; Prabhu, 2011; Santra et al., 2001).

Otro tipo de compuestos a base de silicio también se han usado en el área biomédica. Un ejemplo de ello es el silicio poroso embebido con platino como agente antitumoral. También se ha diseñado silicio poroso calcificado como un factor de crecimiento artificial y como acarreador de anticuerpos, antibióticos, enzimas y proteínas (Abhilash, 2010), por lo que el uso de nanopartículas de sílice en un futuro cercano, tal vez llegue a convertirse en uno de los primeros recursos para la detección y tratamiento de diferentes enfermedades.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y funcionalizar nanopartículas de sílice con isoflavonoides extraídos de *Eysenhardtia polystachya* (EP) para estudiar sus posibles efectos antitumorales.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Y Extraer, separar y caracterizar los extractos obtenidos de EP.
- Y Sintetizar nanopartículas de sílice (Np) mediante el método de Stöber.
- Y Funcionalizar las nanopartículas de sílice con el agente acoplante (NpA)
- Y Funcionalizar las nanopartículas NpA con los compuestos de EP (NpAE).
- Y Caracterizar los tres tipos de nanopartículas obtenidas (Np, NpA y NPAE)
- Y Determinar la internalización de las nanopartículas de sílice con EP en la línea celular MCF-7.

## 2. Planteamiento del problema

---

El cáncer de mama representa el 16% del total de los cánceres femeninos, y de acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en México y en el mundo el cáncer de mama es una de las primeras causas de muerte en mujeres de entre 20 y 65 años de edad. En México, se reportan 14,000 nuevos casos al año y el Consejo Nacional de Población (CONAPO), indicó que para el 2020, un tercio de la población mexicana, sin importar su estatus socioeconómico, padecerá este tipo de cáncer. Así mismo, se reportan 5,700 muertes al año por cáncer de mama en mujeres y se estima que el 43% de las mujeres con este padecimiento se encontraban en edad laboral productiva. La mayoría de las muertes se debe a diagnósticos tardíos o a que los tratamientos resultan agresivos y los efectos secundarios son, en ocasiones, peores que los problemas causados por el cáncer. A lo largo de los años, este tipo de cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en México y de la mayoría de los países en vías de desarrollo.

### 2.1 Justificación

Reducir la morbi-mortalidad del cáncer de mama es importante para países como México que no cuentan con un sistema de salud adecuado para atender los miles de casos que se presentan al día. Por ello, desarrollar mejores formas de detectar y tratar esta enfermedad es vital. La búsqueda de nuevos compuestos y materiales con capacidades adecuadas para detener el cáncer resulta atractiva, pues se exploran opciones que antes parecían imposibles. De acuerdo a lo revisado, los compuestos de palo azul y el uso de nanopartículas como vehículo para éstos, pueden ser idóneos para usarse en el tratamiento de este u otros tipos de cáncer, o como terapia coadyuvante. Además, como algo novedoso, y a diferencia de compuestos análogos como los de la soya, los compuestos descritos

en esta tesis presentan fluorescencia que podría aprovecharse en aplicaciones de bio-imágenes o bio-marcadores en estudios *in vitro* e *in vivo*.

## 2.2 Hipótesis

Las nanopartículas de sílice funcionalizadas con APTES, pueden llegar a formar enlaces de hidrógeno, a través del nitrógeno presente en el agente acoplante y los grupos OH y/o el grupo carbonilo de los isoflavonoides, permitiendo que este nanosistema tenga las características adecuadas para lograr internalizarse en la línea celular MCF-7.

## 3.Marco teórico

---

### 3.1 Cáncer de mama

#### 3.1.1 Definición y estadísticas

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el término «Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Al respecto, las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

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

En el marco internacional, una de cada ocho mujeres tiene o va a desarrollar cáncer de mama en el lapso de su vida, es decir, que el 12 % de la población femenina actual en el mundo, va a presentar esta enfermedad (OMS, 2013). Este tipo de cáncer es la segunda neoplasia más frecuente en la población, pero es la más frecuente entre la población femenina. Se estima que se diagnostican 1.67 millones de nuevos casos anualmente y esto representa el 25% de los cánceres en mujeres. La tendencia de la mortalidad es ascendente debido a una mayor incidencia de la enfermedad, el envejecimiento poblacional y la poca capacidad de respuesta de los sistemas de salud en países subdesarrollados (Secretaría de Salud, 2015).

En el 2012, en el continente americano, aproximadamente 408,000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer y 92,000 mujeres murieron por esta causa. En América Latina, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres, con 152,059 casos diagnosticados anualmente, lo que corresponde a una cuarta parte (24.9%) de los casos de cáncer en mujeres. Este tipo de cáncer, es también la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer latinoamericana,

con 43,208 defunciones y tasas de mortalidad de hasta 13%. (Secretaría de Salud, 2015) .

En México, la tasa de mortalidad de cáncer de mama en 1990 fue del 13.06% en mujeres de entre 35 a 54 años de edad. Sin embargo, la tasa de mortalidad aumentó al 14.9% para el año 2000, lo que demostró una tendencia ascendente a presentar cáncer de mama y morir por esta causa (Maza Fernández & Vecchi Martini, 2009; OMS, 2013). A partir del año 2006, en México, el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico-uterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres (Secretaría de Salud, 2015). Las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres de 20 y más años en 2011 fueron por cáncer de mama (13.8%) y cervicouterino (10.4%) (Maza Fernández & Vecchi Martini, 2009). En el año 2013, se registraron 5,405 defunciones en mujeres con una tasa de 16.3 defunciones por 100,000 mujeres. Para este mismo año, en Querétaro se registraron 90 defunciones en mujeres con una tasa de 16.8 por cada 100,000 mujeres (Secretaría de Salud, 2015).

De acuerdo con el Consejo Nacional de Población (CONAPO), se calcula que para el año 2020, el número de muertes debidas al cáncer de mama, en mujeres mayores de 25 años, alcanzará los 38.8 millones, lo cual representaría casi un tercio de la población mexicana (Maza Fernández & Vecchi Martini, 2009). También se estima que para el 2030, el número de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en el continente americano aumentará en un 46% (Secretaría de Salud, 2015).

Desafortunadamente en México se ha observado que, en la mayor parte de los casos, el diagnóstico se realiza en etapas muy avanzadas de la enfermedad (estadios III o IV<sup>2</sup>). Este diagnóstico tardío implica que el tratamiento de cáncer es más costoso, más doloroso y con menos posibilidades de mejoría y en otros casos un mal diagnóstico anula toda posibilidad de curación. Es por ello que, para reducir el impacto de esta enfermedad en la población, la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que la detección temprana es una estrategia fundamental para el diagnóstico y tratamiento oportuno. Atendiendo lo propuesto por la OMS, en México existe la Norma Oficial Mexicana NOM-041-

---

<sup>2</sup> El cáncer de mama se clasifica en 5 estadios (0 al IV). En el I el tumor está en la mama, mide menos de 2 cm y no se ha diseminado fuera de la misma. A partir del estadio II se ubica en los ganglios linfáticos axilares; estos ganglios son un factor de pronóstico relevante, ya que de las lesiones en ellos se determina la evolución y sobrevivencia del paciente.

SSA2-2011 la cual indica que la población de 20 años y más debe realizarse la autoexploración; a partir de los 25 años, una exploración clínica anual por un profesional de la salud; de los 40 a 69 años una mastografía cada dos años y para las de 70 años y más, mastografías de seguimiento en las mujeres con antecedentes de cáncer de mama o bien por indicación médica (Diario Oficial de la Federación, 2011).

En México, se realizan dos tipos de mastografías, la de tamizaje (que permite la detección temprana de cáncer de mama a mujeres aparentemente sanas) y de diagnóstico, que se realiza como parte de la evaluación del estado de salud de la mujer cuando se sospecha o tiene síntomas clínicos de patología de cáncer mamario (OMS, 2013). Sin embargo, la mastografía es menos eficaz en mujeres jóvenes (entre 20 y 25 años) debido a la densidad de las mamas, por ello el diagnóstico es más tardío e ineficiente, por lo que se necesitan nuevas herramientas que permitan detectar este padecimiento oportunamente. La autoexploración en México se realiza de forma frecuente en la población femenina, pero solo entre el 5 y 10% de los tumores son identificados en estadio I siguiendo esta técnica (Arce et al., 2011; INEGI, 2011).

Con respecto a los métodos de detección de cáncer de mama, el Instituto Nacional de Cáncer, en estudios realizados en Estados Unidos y Reino Unido, reportó que la adopción generalizada de pruebas para detectar el cáncer de mama, aumentan la incidencia de este tipo de cáncer para una población dada y cambia las características de los cánceres que se detectan. La incidencia se da principalmente en cáncer ductal *in situ*, lesiones premalignas y cánceres de riesgo bajos. Estas incidencias, también se atribuyen a factores de riesgo como la adopción de la hormonoterapia posmenopáusica, pero sobre todo al uso de la mastografía, como método de detección (NIH, 2016a).

Se considera que un factor de riesgo es todo aquello que aumentan las probabilidades de que una persona tenga o pueda padecer una enfermedad, como es el cáncer. Para el cáncer de mama, son muchos y variados los factores de riesgo asociados. A continuación, se enlistan los factores de riesgo (genéticos, biológicos, estilo de vida, ciertas condiciones en el seno) que se han relacionado con esta enfermedad (Lanfranchi, 2016; National Cancer Institute, 2016; NIH, 2016a; Sanfilippo B. & Moreno Hernández, 2008; SS, 2016).

1. Envejecimiento
2. Edad avanzada de la primera lactancia
3. Estilo de vida poco saludable
4. Alimentación rica en grasa y carbohidratos

5. Ingesta reducida de frutas y hortalizas
6. Inactividad física
7. Índice de masa corporal elevado (sobre peso)
8. Obesidad después de la posmenopausia
9. Consumo de tabaco
10. Consumo de alcohol
11. Cambios en los patrones reproductivos
12. Historia familiar
13. Temprana menarquia
14. Tardía menopausia
15. Nuliparidad
16. Prolongado uso de anticonceptivos orales
17. Haber llevado una terapia de remplazo hormonal
18. Previa radiación en la pared torácica
19. Ciertas condiciones en el seno (como son neoplasia lobular)
20. Identificación de sobreexpresión de los genes BRCA-1 y BRCA-2

### 3.1.2 Clasificación y tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama es considerado como una enfermedad muy heterogénea, ya que se conoce que esta neoplasia maligna exhibe variables histopatológicas y características biológicas diferentes, diferentes resultados clínicos y diferentes respuestas a intervenciones sistémicas (Eroles, Bosch, Pérez Fidalgo, & Lluch, 2012). Debido a este alto grado de heterogeneidad, el cáncer de mama no puede verse como una simple entidad clínico patológica, pero puede ser dividida en entidades homogéneas con características y patrones similares (de Snoo, Bender, Glas, & Rutgers, 2009; Schnitt, 2010). Al respecto se han propuesto diferentes categorías, con el fin de tener una clasificación adecuada basada en hechos científicos, con una utilidad clínica, fácil aplicación y altamente reproducible. Por ello, es que se han estado modificando y se han propuesto diferentes formas de clasificar el cáncer de mama.

Para entender mejor la clasificación del cáncer de mama, es importante conocer la anatomía de la mama. La anatomía normal de la mama, está compuesta de tres estructuras primordiales: los conductos o ductos, los lóbulos y el estroma. Cada mama tiene entre 15 y 20 secciones de lóbulos, los cuales a su vez se dividen en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lóbulos y lobulillos se conectan por los conductos que son como tubos delgados. El estroma, es el tejido



adiposo y el tejido conectivo que rodea a los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos (**Figura 5**) (Donegan & Spratt, 1982).

Cuando puede haber presencia de cáncer de seno, uno de los exámenes médicos que se realiza con más frecuencia es lo que se conoce como *biopsia*. Una biopsia, es un *procedimiento que consiste en extraer una muestra, total o parcial, de un tejido determinado, para posteriormente analizarla bajo un microscopio*. En la detección y tratamiento de cáncer de mama, una vez que se extrae el tejido mamario, se analiza en un laboratorio para determinar si es canceroso (maligno) o no canceroso (benigno). Si la muestra analizada es un tejido benigno, por lo regular no se requieren más estudios, ni tratamiento. Por el contrario, si el resultado es tejido maligno, la biopsia puede ayudar a que el médico diagnostique el tipo de cáncer de mama (Donegan & Spratt, 1982; Lanfranchi, 2016; SS, 2016).

El término *carcinoma* se usa para describir un cáncer que ha comenzado en la capa de revestimiento, como pueden ser células epiteliales, de órganos como el seno. Casi todos los cánceres de seno son carcinomas y por ello existen los términos carcinoma ductal y carcinoma lobulillar. Un *adenocarcinoma*, es un tipo de carcinoma que comienza en el tejido glandular (tejido que produce y segrega una sustancia). Los conductos y los lobulillos del seno son tejidos glandulares (pues producen y conducen la leche materna), por lo que a los cánceres que comienzan en estas áreas a menudo se les llama *adenocarcinomas* (Nacional de Cáncer, 2016).

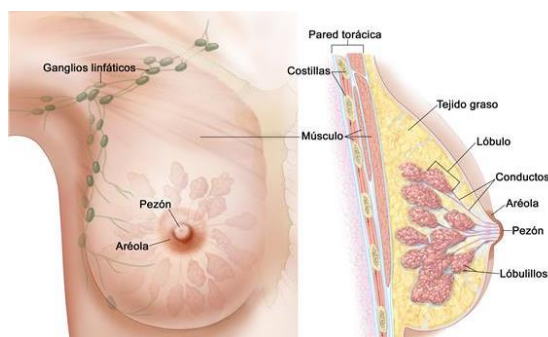


Figura 5. Anatomía de la glándula mamaria. Se muestran las principales partes de una glándula mamaria, incluidos los lóbulos y los conductos o ductos lactíferos (Donegan & Spratt, 1982).

El tamaño que tiene o que llega a tener el cáncer de mama, se mide de forma transversal en su punto más ancho. Por lo regular, el tamaño está dado en milímetros o centímetros. Aunque el tamaño es considerado para determinar el tipo de estadio que presenta un paciente con cáncer de mama, no lo dice todo, ya

que un carcinoma de tamaño pequeño, como 2 mm, puede significar un cáncer muy agresivo, mientras que uno de 1 cm puede ser que no sea agresivo o viceversa. Por ello todas las características del cáncer deben ser tomadas en cuenta (NIH, 2016a).

El tejido obtenido de una biopsia se analiza histopatológicamente para determinar el tipo de cáncer. Por ejemplo, el cáncer intraductal, que es el tipo de cáncer más común del seno, se encuentra en las células de los conductos y se diagnostica en el 70 y 80% de los casos. Por otro lado, el cáncer que se origina en los lóbulos o lobulillos se llama cáncer lobular. El cáncer lobular es el tipo de cáncer que con más frecuencia afecta a los dos senos (Nacional de Cáncer, 2016; Secretaría de Salud, 2015; SS, 2016).

El cáncer de mama, dependiendo de su infiltración en otros tejidos se clasifica en: invasivo y no invasivo o *in situ*. En el carcinoma invasivo, su crecimiento supera las paredes de la estructura en la que se encuentran y se expanden a tejidos circundantes. Este tipo de cáncer causa metástasis. Por otro lado, los carcinomas *in situ*, no superan las paredes donde se encuentran, aun teniendo un tamaño considerable (Sinn & Kreipe, 2013; Viale, 2012; Weigelt et al., 2010).

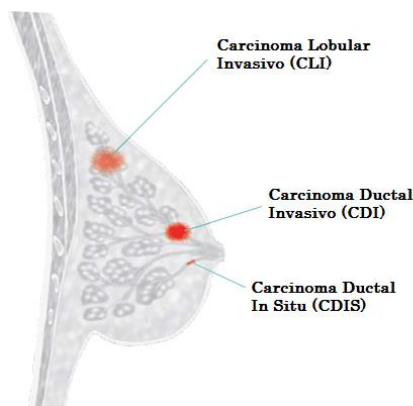


Figura 6. Tipos de cáncer de mama dependiendo de su infiltración en otros tejidos (Sinn & Kreipe, 2013; Viale, 2012; Weigelt et al., 2010).

El carcinoma de mama ductal invasivo (CDI) comienza en un canal o conducto lácteo del seno y penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo. 8 de cada 10 mujeres tienen CDI. El carcinoma lobulillar invasivo (CLI), lo presentan 1 de cada 10 mujeres. El CLI puede ser más difícil de detectar por mamografía que el CDI (**Figura 6**) (Donegan & Spratt, 1982; Nacional de Cáncer, 2016; Secretaría de Salud, 2015).

En la mayoría de los casos, el cáncer de mama se localiza en el cuadrante superior externo (por arriba y afuera del pezón) y a partir de ahí, al primer lugar donde migraran las células metastásicas es a los ganglios de la axila, ya que las vías linfáticas drenan primero en este sitio. Por eso es importante saber si estos ganglios están comprometidos o no, puesto que será un indicio muy importante sobre la diseminación de la enfermedad (Donegan & Spratt, 1982).

Junto con el estudio histopatológico, a la muestra obtenida mediante la biopsia se le realizan pruebas que se conocen como *condición del receptor hormonal*. Los receptores hormonales son proteínas que se encuentran en las células (sanas y cancerosas) y a éstos se les unen hormonas y/o proteínas. Cuando se unen, estimulan el crecimiento de las células sanas y de mayor manera estimulan el crecimiento de las células transformadas o dañadas (Angeles & Angeles, n.d.; Deroo & Korach, 2006; Engelsman, Korstan, Persijin, & Cleton, 1973; National Cancer Institute, 2016; Schneider et al., 2007; Schnitt, 2010).

El estrógeno y la progesterona son hormonas que se pueden unir a los receptores hormonales, que se encuentran en el núcleo. Si el tumor tiene estos receptores, se les conoce como *cáncer hormonosensible* o “*RE+/RP+*” y se le detecta al 70% de las pacientes (NIH, 2016b). Aproximadamente uno de cada cinco cánceres de seno tiene una cantidad muy elevada de una proteína llamada HER2/neu. A los tumores con niveles aumentados de ésta se les conoce como *cáncer HER2* (Viale, 2012). Finalmente, existe un tipo de cáncer menos común, que parece ser más frecuente en mujeres de raza negra, en mujeres latinoamericanas y mujeres premenopaúsicas jóvenes. Es conocido con el nombre técnico de “*triple negativo*” o “*basal*” (Figura 7). Su nombre se debe a que no presenta los receptores de estrógeno y progesterona, ni el HER2. Alrededor del 5 al 10% de las pacientes, se les detecta este tipo de cáncer (Arce et al., 2011).

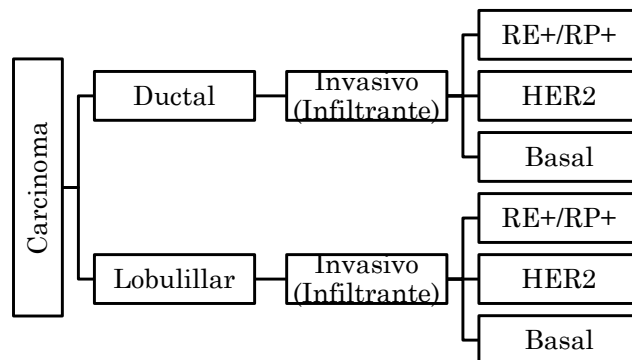


Figura 7. Tipo de cáncer de mama dependiendo de su condición hormonal (Arce et al., 2011).

El avance en la tecnología, respecto a la identificación de genes presentes en los distintos tipos de cáncer, ha tenido una importante contribución al incluir microarreglos de ADN complementario (cADN). Perou *et al.* (2000) y Soiler *et al.* (2001), fueron los primeros en utilizar los microarreglos de cADN, para identificar genes presentes e invariables en los diferentes tipos de cáncer de mama y con base en ello proponer una clasificación.

La clasificación propuesta consta de 4 grupos: luminal, basal, normal y HER2/ERBB2. El grupo luminal, a su vez se subdivide en 2 que son el luminal A y el luminal B (Sørli *et al.*, 2001). El subtipo Luminal A es el más frecuente, correspondiendo al 67% de los tumores. Éste posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. A la inversa el subtipo Luminal B presenta niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de genes de proliferación. El índice de proliferación se determina mediante la expresión de Ki-67<sup>3</sup> (Su *et al.*, 2010).

### 3.1.2.1 Cáncer de mama hormonosensible

El cáncer de mama con receptores de estrógeno y progesterona positivos, conocido como cáncer de mama hormonosensible, es el tipo de cáncer que se detecta en el 70% de las mujeres con cáncer de mama (NIH, 2016b; Secretaría de Salud, 2015). Los cánceres de seno con receptor hormonal positivo suelen crecer más lentamente y tienen muchas más probabilidades de responder al tratamiento hormonal que los cánceres de seno que no tienen estos receptores (ACS, 2014). En muchas de las investigaciones se ha reportado que el cáncer de mama hormonosensible se presentaba principalmente en mujeres postmenopáusicas (Adlercreutz & Vickery, 1993; Deroo & Korach, 2006; Grube, Eng, Kao, Kwon, & Chen, 2001; Leder, 2004; Mokbel, 2002; Simpson, 2003; C. Wang, Mäkelä, Hase, Adlercreutz, & Kurzer, 1994). Sin embargo, actualmente se ha reportado cáncer de mama hormonosensible incluso en mujeres de 20 años de edad (INEGI, 2011).

El desarrollo de cualquier tipo de cáncer a partir de células sanas es un proceso que involucra un daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Cada tipo de cáncer tiene diferentes mecanismos por los cuales se daña el ADN, teniendo distintos y variados factores internos y externos (Reis-Filho & Pusztai, 2011; Romero,

---

<sup>3</sup> Ki-67 corresponde a un antígeno nuclear presente en todas las células que se encuentran en la fase proliferativa del ciclo celular.

Bendahl, Fernö, Grabau, & Borgquist, 2014; Weigelt et al., 2010). Para comprender mejor como se desarrolla el cáncer de mama hormonodependiente, es necesario conocer los mecanismos propuestos hasta ahora, para entender las causas y con base en ello buscar estrategias para la detección y tratamiento, como la que se propone en este trabajo.

Como su nombre lo indica, este tipo de cáncer se desarrolla principalmente en presencia de hormonas. Las hormonas son moléculas que liberan las células que se encargan de controlar el sistema endócrino. Estas moléculas viajan hasta las células diana que normalmente se encuentran a cierta distancia. Al llegar a las células diana interaccionan con receptores específicos. Este proceso es conocido como transducción de señal. La interacción de una hormona con su receptor estimula o inhibe ciertos procesos dentro de la célula diana. Actualmente, se sabe que todas las hormonas investigadas hasta el momento actúan a través de la unión a receptores específicos, aunque esos receptores estén situados dentro de la célula diana o en la superficie (membrana plasmática) (Mathews, Van Holde, Appling, & Anthony-Cahill, 2013).

Las hormonas son segregadas por glándulas endócrinas y se transportan por el torrente sanguíneo, logrando que la respuesta a una señal hormonal se produzca de manera rápida y directa. Las hormonas son activas a concentraciones sumamente bajas (en el intervalo micromolar o picomolar). Desde el punto de vista químico, las hormonas de los vertebrados son de los siguientes tipos: péptidos o polipéptidos, esteroides y derivados de aminoácidos (Mathews et al., 2013).

La estrona y el estradiol son hormonas del tipo esteroideas y proceden del colesterol. Estas hormonas son mejor conocidas como estrógenos y se producen principalmente por acción de la enzima aromatasa, que se encuentra en el último paso de conversión de andrógenos a estrógenos (Figura 4) (Altundag & Ibrahim, 2006; Arriola, Hui, Dowsett, & Smith, 2007; Britain et al., 1990; Nobuhiro Harada et al., 1990). Los esteroides y las hormonas relacionadas actúan intracelularmente. En virtud de su naturaleza hidrofóbica, atraviesan la membrana plasmática y ejercen sus efectos dentro de la célula, en realidad dentro del núcleo, donde controlan la actividad de genes específicos (Mathews et al., 2013).

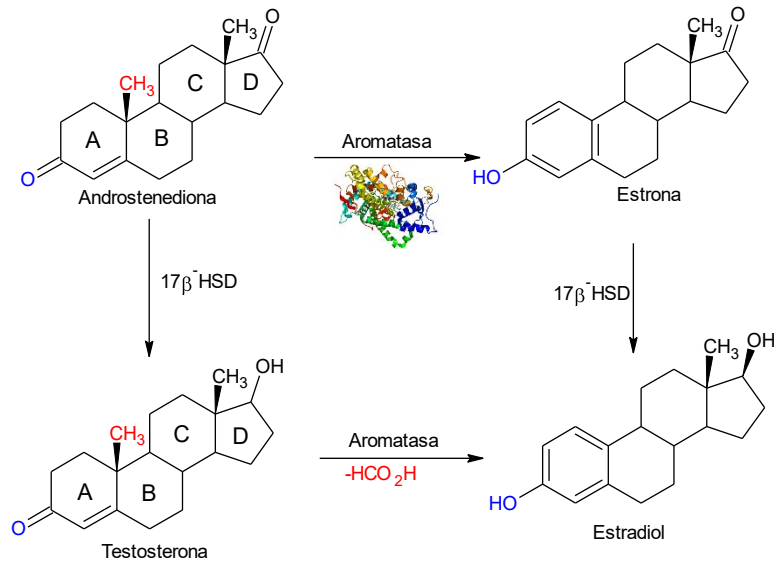


Figura 8. Estructura tridimensional y acción de la aromatasa sobre sus sustratos (Hong & Chen, 2006; Miller, 2005; Ponzzone, Mininanni, Cassina, Pastorino, & Sismondi, 2008; Sanderson et al., 2004).

La aromatasa es una enzima que se encuentra en el retículo endoplasmático liso de la célula y pertenece al complejo citocromo P<sub>450</sub> y su expresión está a cargo del gen CYP19. Su principal acción es transformar la androstenediona en estrona y la testosterona en estradiol (**Figura 8**). El mecanismo de acción de la aromatasa en el proceso de conversión de los andrógenos a estrógenos se basa en la eliminación de un grupo metilo entre el anillo A y el anillo B y la aromatización del anillo A, de ahí que se designe el nombre de aromatasa (Hong, Li, Yuan, & Chen, 2009; Miller, 2005a; Ponzzone, Mininanni, Cassina, Pastorino, & Sismondi, 2008; Sanderson et al., 2004).

La evidencia de numerosas investigaciones sostiene que elevadas cantidades de estrógenos promueven la proliferación de células tumorales en cáncer de mama y a su vez se presenta una sobreexpresión de los genes que codifican para la aromatasa. Por esta razón, varios de los tratamientos para este tipo de cáncer involucran compuestos para inhibir la aromatasa y se revisan más adelante en este trabajo (Altundag & Ibrahim, 2006; Ellem & Risbridger, 2010; Ghosh et al., 2012; Hong & Chen, 2006b; Lonning, 2004; Mokbel, 2002; Vo & Millis, 2012). Además, otros investigadores han reportado que la aromatasa está involucrada en la proliferación de cáncer de hígado (Weinberg et al., 2005), cáncer de pulmón (Castagnetta et al., 2003) y cáncer de colon (Fiorelli, Picariello, Martinetti, Tonelli, & Brandi, 2000).

Una vez que la aromatasa ha producido los estrógenos, estos últimos llegan a los receptores de estrógenos (RE). Los RE son proteínas de 65 kDa y pertenecen a una superfamilia de receptores hormonales nucleares de otras hormonas esteroideas, tiroideas, entre otras. Los RE se sabe que se expresa en un 75% de los tumores de mama, convirtiéndose en un buen predictor de respuesta al tratamiento hormonal (Deroo & Korach, 2006).

Existen dos tipos de RE: RE $\alpha$  y RE $\beta$ . El RE $\alpha$  fue el primero en describirse y se distribuye en útero, endometrio, ovario y mama, mientras que el RE $\beta$  se encuentra en el útero, mama, ovario, próstata, epidídimo, testículo, hipófisis, riñón, hueso y sistema nervioso central. Éste último receptor juega un papel importante en la hormono resistencia.

Cuando los estrógenos actúan en los RE, se activan dos funciones que conducen a la transcripción de genes con inducción de la proliferación tumoral. Otro receptor que se encuentra en la membrana nuclear es el receptor de progesterona (RP) y está en el citosol de ciertas células. Este receptor, parece tener una influencia positiva en la producción de RE. Los tumores RE $^{+}$  y RP $^{+}$  son los que mejor responden a la terapia hormonal, con tasas de respuesta de hasta el 40% en metástasis y además se alcanzan estabilizaciones prolongadas. Para los tumores del tipo RE $^{-}$  y RP $^{-}$  no se recomienda la terapia hormonal, pues tienden a sobre expresar factores como el HER2. Para ese tipo de carcinoma es recomendable usar otras alternativas (E.R Simpson, 2003).

En ausencia de estrógenos, los receptores se encuentran predominantemente en el citoplasma. El número de receptores es de unos 10,000 por célula, mostrando el 17 $\beta$ -estradiol una mayor afinidad por los receptores; en cambio, la estrona y el estriol presentan menor afinidad, lo que facilita su disociación del receptor y ello explica su menor actividad. En el receptor estrogénico se han identificado dos dominios de activación de la transcripción. El dominio AF-1 reside en la parte amino terminal de la molécula y no necesita fijar estrógeno para iniciar la transcripción génica. El dominio AF-2 reside en la porción carboxiterminal donde se fijan los estrógenos. El complejo receptor-estrógeno cambia las características del receptor y, una vez introducido en el núcleo, permite la unión de una larga serie de factores de transcripción intermedios (proteínas coactivadoras) que inician la transcripción génica (Amado & Flórez, 2014).

### 3.1.2.2 Tratamientos para cáncer de mama hormonosensible

Una vez diagnosticado el cáncer de mama, el tratamiento integral de este tipo de cáncer es multidisciplinario. Los principales tratamientos incluyen la cirugía



y radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa) y el tratamiento sistémico que incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares (Arce et al., 2011; Rodríguez Cuevas & García, 2006). La hormonoterapia o terapia endócrina, como tratamiento del cáncer de mama, se ha practicado desde hace poco más de un siglo, cuando el cirujano Sir George Beatson, obtuvo un resultado satisfactorio tras realizar una ooforectomía a una paciente con cáncer de mama avanzado (Beatson, 1896).

Son tres tipos de estrategias que se utilizan para el tratamiento hormonal. La primera es bloquear la función de los ovarios, la segunda es el bloqueo de la producción de estrógeno y la tercera es el bloqueo de los efectos de los estrógenos (OMS, 2013). El bloqueo de la función de los ovarios se conoce como ablación ovárica y puede hacerse quirúrgicamente con una operación para extirpar los ovarios llamada ooforectomía (Gibson, Lawrence, Dawson, & Bliss, 2009). Por otro lado, la función de los ovarios se puede suprimir con fármacos, los cuales son agonistas de la hormona liberadora gonadotropina. El mecanismo de acción de estos fármacos es que interfieren con las señales de la glándula pituitaria la cual estimula los ovarios para producir estrógeno (E.R Simpson, 2003).

En un inicio, el tratamiento hormonal se basaba en suprimir las fuentes de estrógenos mediante cirugías o radioterapias y era común realizar suprarrenalectomías e hipofisectomías, las cuales son técnicas obsoletas hoy en día (Gibson et al., 2009; Lonning, 2004). Actualmente, aún se siguen realizando ooforectomías y radioterapia ovárica pues son técnicas relativamente sencillas, pero irreversibles (INEGI, 2011). Actualmente, las nuevas alternativas que se han desarrollado con la hormonoterapia, se basan en la introducción de agentes farmacológicos que permiten obtener resultados semejantes a las prácticas convencionales, como las mencionadas anteriormente, pero de forma reversible (Miller & Larionov, 2012; Ponzzone et al., 2008; Purohit, 2001).

El tratamiento hormonal ha resultado ser muy versátil en cuanto a sus aplicaciones, pues se puede utilizar como tratamiento sistémico, en el cáncer de mama metastásico, se puede usar en pacientes ancianas y hasta en pacientes inoperables (Adlercreutz & Vickery, 1993; Cole & Robinson, 1990; Lonning, 2004; Evan R Simpson, 2002). Este tipo de tratamiento se ha destacado como tratamiento adyuvante en estadios avanzados, en la terapia neoadyuvante y como tratamiento preventivo (INEGI, 2011).

Una de las desventajas del tratamiento hormonal, es que su acción es más lenta que la de la quimioterapia, sin embargo, los efectos secundarios que produce son



mucho menores y una vez que se consigue una respuesta, ésta se mantiene por más tiempo y con beneficios en supervivencia (Doyle et al., 1999; Gibson et al., 2009; M. Singh, McGinley, & Thompson, 2000). Es común, que el tratamiento hormonal se asigne a pacientes con receptores de estrógenos positivo (RE+), mientras que la quimioterapia es más apropiada en situaciones donde la progresión del cáncer es rápida, existe hormono resistencia o por ausencia de receptores de estrógenos. En adyuvancia la hormonoterapia añade a la quimioterapia beneficios cuando se trata de tumores con RE+ (INEGI, 2011; OMS, 2013).

En la terapia hormonal es frecuente utilizar los términos agonistas y antagonistas hormonales. *Un agonista hormonal es un análogo que une de forma eficaz a un receptor, que puede ser una enzima, e imita la acción de la hormona endógena, es decir, que la respuesta metabólica es comparable a la de la hormona o sustrato. Por el contrario, un antagonista hormonal, se une a los receptores o enzimas, pero no provoca la respuesta biológica normal.*

Hoy en día, las terapias hormonales que se prefieren utilizar se basan en el uso de inhibidores de aromatasa o el uso de los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos, los cuales se describen en las siguientes secciones.

#### *3.1.2.2.1 Inhibidores de aromatasa*

Los inhibidores de aromatasa, como su nombre lo indica, inhiben la enzima aromatasa y lo pueden hacer de forma reversible o irreversible (Ellem & Risbridger, 2010; Ghosh et al., 2012; Lonning, 2004; Miller, 2005a). Los inhibidores se usan principalmente en pacientes postmenopáusicas, ya que las mujeres premenopáusicas producen demasiada aromatasa y los inhibidores no pueden bloquearla eficazmente (Gibson et al., 2009). La activación de la aromatasa tiene lugar, principalmente, en las células de la granulosa en los ovarios, siendo esta la principal fuente de estrógenos. Con la edad, decrece la actividad de estas células, y la actividad de la aromatasa se desempeña en otros tejidos como la grasa, el hígado, el músculo o el folículo piloso y el sistema nervioso central, donde se encuentra la principal fuente de estrógenos tras la menopausia (Altundag & Ibrahim, 2006; Ghosh et al., 2012; Gibson et al., 2009; Hong & Chen, 2006; Miller & Larionov, 2012; Sanderson et al., 2004).

Los inhibidores que actualmente se utilizan son en su mayoría tóxicos y existen características de riesgo en cada paciente. El mayor efecto secundario de algunos inhibidores es que provocan osteoporosis, por lo que su uso debe ser por un período no mayor a 5 años y es importante vigilar la densidad ósea de los pacientes que optan por este tratamiento (Arce et al., 2011; Maza Fernández & Vecchi Martini, 2009; Rodríguez Cuevas & García, 2006).

Para verificar la acción de la aromatasa, es frecuente el uso de líneas celulares especializadas como la línea celular MCF-7 (por sus siglas en inglés Michigan Cancer Foundation). Éstas se consideran como RE+/aromatasa positiva ya muestra un incremento en la proliferación celular en presencia de hormonas del tipo estrogénicas. Por ello esta línea celular se utiliza frecuentemente para evaluar inhibidores de aromatasa o de receptores estrogénicos (Brooks, Locke, & Soule, 1973; E. Leung, Kannan, Krissansen, Findlay, & Baguley, 2010; Levenson & Jordan, 1997; Salehi et al., 2013; Zhou et al., 2012).

Los principales inhibidores de aromatasa se clasifican en tres grupos, denominados de Primera, Segunda y Tercera Generación. A su vez éstos se subdividen en Tipo I y Tipo II (**Tabla 1**) (Altundag & Ibrahim, 2006; Gibson et al., 2009; Hong & Chen, 2006a; Lombardi, 2002; Ponzzone et al., 2008). La principal diferencia entre los de Tipo I y Tipo II, es su estructura, ya que los de Tipo I tienen una estructura similar a la de los esteroides o sustrato de la aromatasa, mientras que los del Tipo II no tienen esta estructura (Arriola et al., 2007; N Harada, Honda, & Hatano, 1999; Hong & Chen, 2006a).

Por el tipo de estructura, los de Tipo I, inhiben a la aromatasa de forma irreversible, pues se unen covalentemente a su sitio activo, por lo que frecuentemente se les denomina “inhibidores suicidas” o inactivadores de enzima. Además, su inhibición sigue aún después de discontinuar su uso. Por otro lado, los de Tipo II, se unen reversiblemente a la aromatasa, resultando solo en una inhibición competitiva y es necesario tomarlos por largos periodos de tiempo (Altundag & Ibrahim, 2006; Arriola et al., 2007).

En los tratamientos que utilizan inhibidores de aromatasa, se ha reportado que algunos pacientes presentan problemas cerebro-vasculares, cardio-vasculares, trombosis, hipercolesterolemia y osteoporosis (Altundag & Ibrahim, 2006; Hong & Chen, 2006b; Mokbel, 2002). Por ejemplo, la Aminoglutatimida (AG), es un inhibidor menos específico y puede inhibir a otras enzimas del complejo CYP450 involucradas en la biosíntesis del cortisol y aldosterona, lo que puede provocar náuseas, vómito e hipoglucemia, por lo que resulta en un inhibidor tóxico. Así, su uso debe ser controlado y debe utilizarse tratamientos alternativos que

minimicen sus efectos secundarios (Altundag & Ibrahim, 2006; Hong et al., 2009; Lombardi, 2002).

<b>Generación</b>	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>
<b>Primera Generación</b>	Ninguno	Aminoglutatimida
<b>Segunda Generación</b>	Formestano (Lentaron ®)	Fradozol (Afema ®)
<b>Tercera Generación</b>	Exemestano (Aromasin®)	Anastrozol (Arimidex ®) Letrozol (Femara ®) Vorozol (Rivizor ®)

Los nombres en paréntesis son los nombres comerciales con lo que están patentados.

El exemestano, comercializado con el nombre de Aromasin®, es un inhibidor de aromatasa del Tipo I de tercera generación. Este inhibidor fue aprobado por la FDA en 2005 (National Cancer Institute, 2015) y se receta en pacientes posmenopáusicas. Se ha encontrado que el exemestano inhibe la aromatasa placentaria con una eficiencia similar a la del Formestano, pues tienen IC<sub>50</sub> de 42 y 44 nM respectivamente (Lombardi, 2002; Lonning, 2004; Miller, 2005a). Una de las ventajas de utilizar este inhibidor es que sus dosis son menores que las de otros inhibidores y se está considerando como primera línea terapéutica contra cáncer de mama. Uno de los inconvenientes de utilizar este inhibidor es que como existirá una menor concentración de estrógenos en el cuerpo, las células óseas reciben menos estrógenos, lo que puede causar debilitamiento de los huesos y un riesgo superior de sufrir fracturas (Ghosh et al., 2012; Ponzzone et al., 2008; Evan R Simpson, 2002).

#### *3.1.2.2.2 Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs)*

Para el tratamiento de cáncer de mama hormonosensible, con receptores de hormonas positivos (RE+/RP+), se ha utilizado lo que se conoce como moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs, por sus siglas en inglés), los cuales se describieron con mucha exactitud, en tumores de mama por Engelsman et al. en 1973 (Engelsman et al., 1973).

Los SERMs y los inhibidores de la aromatasa, a menudo son considerados como equivalentes, pero no lo son, ya que sus diferencias en el mecanismo de acción,

pueden llevar a diferentes variaciones biológicas y clínicas. Los SERMs a diferencia de los inhibidores no inhiben la síntesis endógena de estrógenos, como lo hacen los inhibidores, por lo que cantidades remanentes de éstos no se ven afectadas, pero en los casos de mujeres pre-menopáusicas los niveles de estrógeno pueden incrementar. Estas diferencias son importantes, porque metabolitos de los estrógenos pueden verse comprometidos independientemente del RE (Miller, 2005b).

Los inhibidores de aromatasa reducen las cantidades de estrógenos endógenos, no ocurriendo esto con los estrógenos exógenos. En contraste, los SERMs, pueden interactuar de forma antagónica con el RE, independientemente del ligando (Miller, 2005b).

El principal SERM utilizado en la terapia endocrina es el Tamoxifeno, el cual se ha venido utilizando desde 1971 y es considerado como tratamiento estándar, siendo recomendado como primera línea de tratamiento de cáncer de mama avanzado, después de la intervención quirúrgica, la quimioterapia e incluso en cáncer de mama metastásico en hombres y mujeres (Mathews et al., 2013). El Tamoxifeno funciona como un antagonista competitivo en los RE, sin embargo, los tumores RE+ y RP- son menos sensibles a los SERM (Espinós et al., 2008; Hong et al., 2009; Katzenellenbogen, Norman, Eckert, Peltz, & Mangel, 1984; Mokbel, 2002). El principal efecto tóxico que tiene el Tamoxifeno se localiza en el útero. Existen reportes de que grupos de mujeres tratadas con éste, presentan engrosamiento endometrial, estimulación del revestimiento mucoso y glandular del útero, que si no es revisando continuamente puede llegar a ser canceroso. Por ello es que a las pacientes que optan por esta opción, se les realiza constantemente exploraciones con ultrasonido y biopsia endometrial (Link, 2016; Mathews et al., 2013). También se ha reportado que de los 12-18 meses después de iniciado el tratamiento se observa resistencia al Tamoxifeno y en algunos casos puede estimular el crecimiento celular del cáncer de mama, cáncer endometrial y enfermedad tromboembólica, así como descalcificación de huesos (Altundag & Ibrahim, 2006; Arce et al., 2011; Arriola et al., 2007). Por ello, el estudiar otras opciones que puedan ser menos tóxicas y/o que ayuden a disminuir el uso de quimioterápicos es de suma importancia.

### 3.2 Palo azul (*Eysenhardtia polystachya*)

*Eysenhardtia* es un género de plantas con flores, perteneciente a la familia *Fabaceae* (alt. *Leguminosae*), subfamilia *Faboideae* y a la tribu *Amorpheae*. El género fue descrito por Wight & Arn. y publicado en 1823 en *Nova Genera et Species Plantarum* (quarto ed.) 6: 489–491. Comprende 19 especies descritas y de éstas, solo 13 fueron aceptadas hasta el 2012<sup>4</sup>, de las cuales *Eysenhardtia polystachya* fue la especie de interés para este trabajo (Anexo 1).

La primera publicación registrada que se tiene de *Eysenhardtia polystachya* (EP), se encuentra en “The Silva of North America” No. 3: 29, en el año 1892. En el documento se reporta que EP es una especie proveniente de México, en ambas vertientes y la parte central del país (Col., Chis., Chih., Coah., Cd. MX., Dgo., Gto., Gro., Hgo., Jal., Mex., Mich., Mor., Oax., Pue., Qro., S.L.P., Tamps., Tlax., Ver., Zac.). Actualmente, su estatus de protección ante el CITES es “no protegido” (Figura 9).

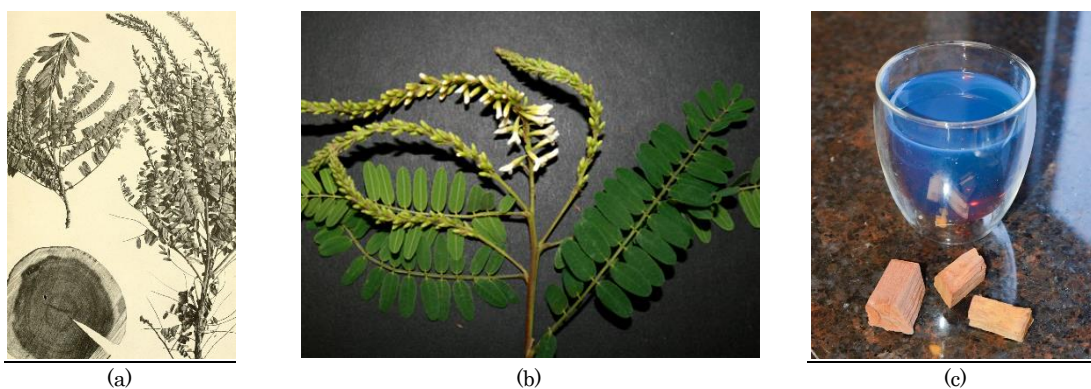


Figura 9. Vista del tronco (a), hojas- flores (b) e infusión (c) de *Eysenhardtia polystachya* (De Safford, William Edwin - Safford, William Edwin 1916). "Lignum nephriticum". Annual report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution. Washington: Government Printing Office. p. 271–298., Dominio público, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21467338>; UNAM, 2017)

EP se conoce comúnmente como “Palo azul” (por el color de la infusión que se extrae de él), “Palo Dulce” (Sin., Mex., Hgo., Pue., Mich.), “Tlapalezpatli” (en lenguaje Náhuatl), “Coatli” (I. Náhuatl), “Urza” y “Tlapahuaxpatli” (en lenguaje Otomí), “Chontalpa”, “Coatillo” (Pue.), “Cuate” (Jal.), “Lanaé” (I. Chontalpa,

<sup>4</sup> Para cada una se indica el nombre binomial seguido del autor, abreviado según las convenciones y usos. *Eysenhardtia adenostylis* Baill.; *Eysenhardtia drummondii* Torr. & A.Gray; *Eysenhardtia officinalis* R. Cruz D. & M. Sousa; *Eysenhardtia orthocarpa* (A.Gray) S.Watson; *Eysenhardtia parvifolia* Brandege; *Eysenhardtia peninsularis* Brandege; *Eysenhardtia platycarpa* Pennell & Saff.; *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.; *Eysenhardtia punctata* Pennell; *Eysenhardtia schizocalyx* Pennell; *Eysenhardtia spinosa* A.Gray; *Eysenhardtia subcoriacea* Pennell; *Eysenhardtia texana* Scheele.

Oax.), “Cohuatli” y “Cuatle” (Oax.), “Palo cuate” y “Rosilla (Sin.), “Taray” (N. L. y Hgo.), “Vara Dulce” y “Varaduz” (Dgo.), “Kidneywood” (E. U. A.). Hay diversas especies llamadas popularmente “Palo azul” como *Cyclolepis genistoides*, que es un arbusto oriundo de Argentina que también se utiliza ampliamente como diurético y puede prestarse a fácil confusión, por lo que se debe tener cuidado con su identificación.

Los individuos del palo azul suelen ser árboles o arbustos caducifolios de 3 a 9 m de altura con diámetros de 15 a 35 cm, folíolos de 10 a 15 pares por hoja, elípticos, de 7 a 13 mm de largo por 3 a 5 mm de ancho, con glándulas resinosas aromáticas. Presentan tallos ramificados color café oscuro y duramen de color café anaranjado pálido, oscureciéndose considerablemente bajo exposición prolongada; con transición abrupta a la albura de color crema amarillenta. Se observan límites de anillos de crecimiento apenas visibles, marcados con fajas oscuras (madera tardía). Tiene un veteado suave, textura media a fina, hilo entrecruzado y su madera seca no tiene un olor característico. La corteza externa amarilla de textura ligeramente rugosa, escamosa, cuando se seca es desprendible en placas irregulares de color oscuro de 1 mm de grosor y corteza interna pardo-rojiza. Presenta inflorescencias dispuestas en racimos espigados terminales o sub-terminales, 5 a 7 cm de largo; cáliz campanulado, 2.5 a 3 mm de largo, 5-lobulados; corola blanca, formada por 5 pétalos libres, de 5 mm de largo por 1.3 a 2 mm de ancho, oblongos. Su fruto es una vaina ligeramente curvada, atenuada en el ápice, pubescente o subglabra, de 7 a 9.5 mm de largo, con el estilo persistente, frágil e indehisciente, provista con glándulas; cada vaina contiene una semilla. La testa de la semilla es delgada y permeable al agua. No tiene raíz dispone y es hermafrodita.

Su madera es muy dura y es difícil de trabajar con herramientas de mano y maquinaria, por lo que requiere el uso de herramientas provistas de carburo de tungsteno o estelita. Es de buen cepillado y permite un buen acabado. De excelente comportamiento al escopleado y moldurado, bueno para el barrenado, probablemente algo difícil de encolar. Para clavar y atornillar es imprescindible perforarla previamente.

En cuanto al secado de la madera, es de esperarse que, por su elevada densidad y el bloqueo de los vasos como conductos principales del movimiento de agua y vapor, sus tiempos de secado al aire libre sean lentos. Para el secado técnico convencional se recomienda un programa suave, tendiente a los utilizados por la madera de encinos mexicanos. Debido a su buena estabilidad dimensional no se espera graves defectos de secado.



Palo azul tiene un duramen altamente resistente a los hongos de pudrición (clase 1 según ASTM D 2017-5; clase I según EN 350-2); y tiene reputación de ser altamente resistente a los insectos (termitas y barrenadores).

El palo azul ha sido ampliamente usado desde el tiempo de los aztecas y civilizaciones contemporáneas. Durante los años 60's y 70's, la madera de esta planta fue exportada de México a Europa, donde es conocida como *Lignum nephriticum* (Alvarez et al., 1998; Muyskens, 2006).

La especie es muy apreciada por sus múltiples beneficios y virtudes medicinales que se le atribuyen popularmente, ya que su uso se refiere a propiedades diuréticas, antidiabéticas y antimicrobianas. Por ejemplo, con la madera se prepara una infusión a la que se le atribuyen propiedades contra las enfermedades renales y de la vesícula, también se utiliza como anticonceptivo. Las hojas y tallos, se emplean para aliviar las molestias debidas a los cálculos renales y contra el aborto y la flor se usa para la diarrea en niños. En el siglo XX, se refiere su uso como planta antiespasmódica, antipirética, cicatricial regenerativa y para las enfermedades de los ojos, entre otras.

Cabe destacar que las únicas actividades terapéuticas que han sido evaluadas científicamente son la antiinflamatoria inducida por el uso de los extractos acuosos (infusión y decocción a la dosis de 200 mg/kg de p.c.) y etanólico (50 y 100 mg/kg de p.c.) de la corteza, tronco y hojas de palo dulce. En este mismo estudio se observó que el uso de estos extractos para disminuir el proceso inflamatorio, no provoca alteraciones gastroduodenales en contraste con la indometacina; la diurética y contra la urolitiasis, demostrando que las isoflavonas aisladas de la corteza actúan como inhibidores en la formación y crecimiento de los cristales de oxalato y fosfato de calcio, reduciendo el grado de agregación y el tamaño de la partícula precipitada. También se han identificado isoflavanos de la corteza de palo dulce que en experimentos demostraron tener actividad citotóxica y antimicrobiana.

Debido a su alto contenido de extractos de la madera y corteza, aún hoy en día son motivo de investigaciones científicas con el objetivo de conocer su actividad biológica y principios activos.

### 3.2.1 Compuestos presentes en el palo azul

Desde hace tiempo, varios investigadores han extraído diversos compuestos de diferentes partes del árbol con varios tipos de solventes y se han encontrado picos característicos de éstos, lo cual se resumen en la **Tabla 2** y **Tabla 3**.

Tabla 2. Compuestos encontrados en diferentes partes del árbol de EP		
Autor	Parte del árbol de EP	Compuestos
Beltrami et al. (1982)	Madera	C-glucosil- $\alpha$ -hidroxidihidrochalcona, así como de los flavonoides coatlina A y B
Burns et al. (1984)	Duramen (madera del tronco y ramas de un árbol)	7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona
	Corteza	9-metoxi-2,3-metilenedioxycoumestan; 3,4-dimetoxi-8,9-(metilenedioxi)pterocarpan y dehidrorotenona, 9-metoxi-2,3-metilenedioxycoumestan
Alvarez et al., 1998	Corteza y tronco	(3 <i>S</i> )-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavan y (3 <i>S</i> )-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavan (que son tóxicos), estigmasterol, isoduartin, cuneatin
Narváez et al. (2006)	Ramas y hojas	5,7 dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona, 5,7-dihidroxi-8-metil-6-prenilflavanona, 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona, 5,7-dihidroxi-8-prenilflavanona, 4- <i>O</i> -metil-8-prenilnaringeninán, 5-hidroxi-7-metoxi-8-prenilflavanona
Acuña et al. (2009)	Madera	Tetrahidrometanobenzofuro[2,3-d]oxacina

En la época de la colonia, personajes como Nicolás B. Monardes y Fr. Bernardino de Sahagún se interesaron en la peculiar infusión que se obtenía de EP al punto de registrar sus características y usos. En los reportes de Nicolás B. Monardes y Fr. Bernardino de Sahagún se resaltó, por encima de las propiedades medicinales del palo azul, la propiedad luminiscente de su infusión.

Esta propiedad, que hoy se conoce como fluorescencia, ha interesado a personajes de la talla de Boyle, Newton, Priestley y muchos otros naturalistas y filósofos. Hoy día sigue siendo un tema que llama la atención por lo que grupos de investigación de corte internacional siguen investigando acerca de la fluorescencia de los compuestos de EP.

Tabla 3. Bandas características (longitudes de onda) de los diferentes compuestos extraídos de palo azul reportados por varios autores.

Autor	Compuesto	Solvente	Picos característicos
-------	-----------	----------	-----------------------



<b>Beltrami, et al., 1982</b>	Coatlina A	Metanol (MeOH)	284 nm y 323 nm
		MeOH+ AlCl <sub>3</sub>	314 nm
		MeOH+	310 nm
		AlCl <sub>3</sub> +HCl→A	341 nm
		A+NaOMe→B	341 nm
		B+NaOAc→C	
	Coatlina B	Metanol (MeOH)	285 nm y 328 nm
		MeOH + AlCl <sub>3</sub>	312 nm
		MeOH+ AlCl <sub>3</sub> +HCl	309 nm
<b>Burns, et al., 1984</b>	7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisiflavona	MeOH	244nm y 295nm
	9-metoxi-2,3-metilendioxicoumestan	MeOH	244 nm, 309nm y 347 nm
<b>Álvarez, et al., 1999</b>	( $\alpha$ -R)- $\alpha$ ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona	MeOH	321nm, 284 nm, 213 nm
	( $\alpha$ -R)-3'-O- $\beta$ -D-xilipiranosil- $\alpha$ ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona	MeOH	322.5 nm, 309 nm, 284.5 nm, 253 nm, 218.5 nm, 213 nm, 203.5 nm
	( $\alpha$ -R)-3'-C- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona	MeOH	321.5 nm, 309 nm, 284.5 nm, 253.5 nm, 218 nm, 213.5 nm, 204 nm
<b>Acuña, et al., 2008</b>	Coatlina B	Solución pH 4-7	282 nm y 325 nm
		Solución pH 10	338 nm
	Matlalina (tetrahydromethanobenzofuro[2,3-d]oxacine)	Solución pH 4-5.5	307 nm y 382 nm
		Solución pH 9	283 nm y 429.5 nm

En el 2009 Ulises Acuña y colaboradores reportaron que la fluorescencia azul intenso de la infusión de EP, observada por primera vez en el siglo XVI, se debe a que en presencia de oxígeno la Coatlina B, que es un compuesto del tipo chalcona, por oxidación causada por el medio ambiente, presenta una serie de reacciones dando lugar a la Matlalina (**Figura 10**) que es el compuesto final que no está presente en el arbusto de forma natural presenta la fluorescencia en condiciones de pH neutro a básico, ya que se ioniza.

En cambio, Burns, *et al.* (1984) atribuyeron la fluorescencia de la infusión a compuestos del tipo isoflavonoide como el mostrado en la **Figura 11**. En este trabajo fue importante encontrar qué compuesto o compuestos son los responsables del fenómeno de fluorescencia, ya que podría llegar a presentarse la situación donde los mismos compuestos que pueden presentar actividad biológica son a su vez los que presentan la fluorescencia.

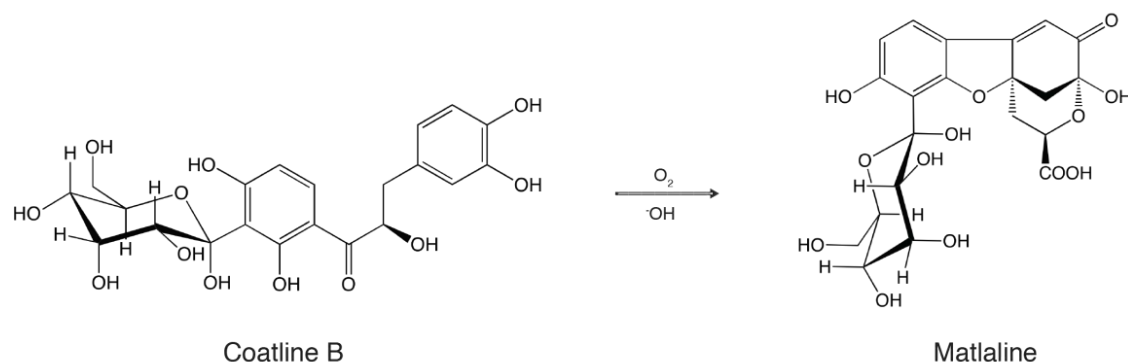


Figura 10. Estructura química de la Coatlina B y el tetrahidrometanobenzofuro[2,3-d] oxacina o Matlalina (A. Ulises Acuña, Amat-Guerri, Morcillo, Liras, & Rodríguez, 2009)

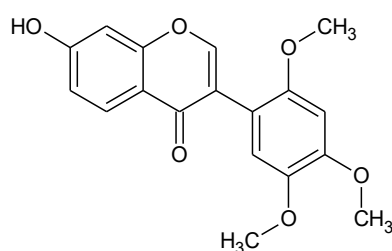


Figura 11. Estructura química 7-hidroxi, 2', 4', 5'-trimetoxi isoflavonoide (Burns, Dalgarno, Gargan, & Grimshaw, 1984)

Pese al gran interés por las propiedades fluorescentes o coloridas de los extractos de EP, pocos investigadores se han enfocado en alguna otra utilidad. La mayoría de las propuestas de uso para la mezcla química presente en el EP giran en torno a sus propiedades antisépticas. Burns *et al.* (1984), propusieron el uso de los flavonoides del EP como indicadores de basicidad por cambio en la fluorescencia de la infusión obtenida, pero fuera de lo mencionado anteriormente no existen estudios o propuestas del uso de los componentes químicos presentes en el EP en el campo de la biología o medicina. Al respecto, la mezcla de compuestos de EP, presenta un amplio grupo de flavonoides e isoflavonoides con diferentes posiciones de hidroxilación y metilación, como se muestra en la tabla 2, que pueden ser idóneos para tener efectos antitumorales.

Dentro de las aplicaciones importantes que han tenido los compuestos fluorescentes en la ciencia, se encuentran la proteína verde fluorescente, que es una herramienta bioquímica de investigación que involucra la expresión de genes; auto marcación de secuencias de ADN; inmunoensayos como del tipo *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), entre otros (Muyskens, 2006). Por ello, los compuestos de EP son una propuesta interesante para detectar moléculas o dar seguimiento a algún material que entre a la célula o para la obtención de bio-imágenes.

### 3.3 Nanotecnología y nanomateriales

Richard Feynman, premio nobel de Física en 1965, fue el primero en concebir la idea de que era posible manipular la materia a nivel atómico. Esta idea fue presentada en un discurso, que dio en el Instituto Tecnológico de California (**CalTech**) en 1959, titulado “There’s Plenty of Room at the Bottom” (Feynman, 1992). En él, se sentaron los pilares de lo que posteriormente se conocería como nanotecnología, pues planteaba la idea de manipular, controlar y fabricar objetos de pequeñas dimensiones. Así mismo, puso de manifiesto que las propiedades de estos sistemas nanométricos serían distintas a las presentadas en la macroescala, pues a esta escala rigen las leyes cuánticas.

En un principio la idea parecía ciencia-ficción, pero sus ideas estaban sustentadas por el hecho de que, según Feynman, esta manipulación de los átomos no contradecía ninguna ley física y, por tanto, no había ningún motivo para que no pudiese llevarse a cabo. A pesar de lo obvio que le resultaba a Feynman que la dirección a seguir fuese la planteada en su discurso, pasaron al menos 30 años para que sus ideas empezasen a concretarse pues el principal obstáculo al que éstas se enfrentaban fue la falta de herramientas adecuadas que permitiesen la manipulación de átomos y moléculas. Sin embargo, en 1981 en los laboratorios de IBM Zürich, G. Binnig y H. Rohrer, inventaron el microscopio de efecto túnel, lo que les dio el Premio Nobel en 1986, abriendo un mundo nuevo: la posibilidad de ver y manipular átomos y moléculas, permitiendo que muchas de las ideas de Feynman pudiesen ponerse en práctica.

En 1981 el ingeniero estadounidense Eric Drexler, inspirado en el discurso de Feynman, publicó en la revista “Proceedings of the National Academy of Sciences”, el artículo “Molecular engineering: An approach to the development of

general capabilities for molecular manipulation” donde describió con más detalle las ideas de Feynman. El término “Nanotecnología” fue aplicado por primera vez por Drexler en el año 1986, en su libro *“Motores de la creación: la próxima era de la Nanotecnología”*. En este libro explica como una máquina nanotecnológica tiene la capacidad de auto replicarse y propuso el término “plaga gris” para referirse a lo que sucedería si un “nanobot autoreplicante” fuera liberado al ambiente. Además de Drexler, el científico japonés Norio Taniguchi, utilizó por primera vez el término nanotecnología en el año 1974, en la que define a la nanotecnología como el procesamiento, separación y manipulación de materiales átomo por átomo, sin embargo, este dato es aún incierto.

Esta nueva área ahora desarrolla la nanociencia (ciencia básica) y la nanotecnología (ciencia aplicada), y tienen su fundamento en el estudio de fenómenos ocurridos a nivel nanométrico, surgiendo los nanomateriales, permitiendo el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras, lográndose así un mejor entendimiento de la relación fundamental entre estructura-propiedades-fabricación (Gutiérrez, 2005).

El concepto de nanotecnología se ha creado poco a poco. Cada descubrimiento aporta algo a esta ciencia, por lo que el concepto no es fijo ni cerrado. Jain (2005) definió a la nanotecnología como la *síntesis y utilización de materiales y sistemas a través del control de materia a escala nanométrica*. Buzea, et al. (2007) define a la nanotecnología como *el diseño, síntesis y aplicación de materiales, donde su forma y tamaño han sido creados a una nanoescala, explotándose con esto únicas propiedades químicas, físicas, eléctricas y mecánicas que emergen cuando la materia está estructurada a nanoescala*. El **National Nanotechnology Initiative**, define la nanotecnología como *la comprensión y el control de la materia a un tamaño comprendido entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros, donde los fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones*. Otra definición la ofrece el **Center for Responsible Nanotechnology** que define a la nanotecnología como *la ingeniería de sistemas funcionales a escala molecular, refiriéndose a la capacidad proyectada para construir elementos de abajo hacia arriba, utilizando técnicas y herramientas que se están desarrollando hoy para hacer productos completos y de alto rendimiento*.

La nanotecnología tiene el potencial para revolucionar una serie de herramientas médicas y biotecnológicas, así como procedimientos que pueden llegar a ser portables, baratos, seguros y hasta de fácil administración. El campo de la farmacéutica se enfrenta a retos interesantes y tareas difíciles de realizar como es la entrega de moléculas con cierta actividad a tejidos tumorales. Esto

resulta ser una tarea complicada, debido al entorno crítico y específico que existe en el tumor. Sin embargo, poco a poco se han superado estos retos y ha sido gracias, en parte, a los nuevos instrumentos y métodos basados en la nanotecnología (Anajwala, Jani, & Swamy, 2010; Liu, 2006; N. C. Tansil & Gao, 2006). El uso de nanopartículas muestra resultados prometedores cuando se usan modelos *in vivo*, posiblemente por la manera selectiva en la que entran a las células, debido a su tamaño y modificabilidad química (N. Tansil & Gao, 2006; Yan, Smith, et al., 2007).

Diversos grupos de investigadores de todo el mundo, diariamente prueban diferentes tipos de nanopartículas desarrollándose así una nueva generación de terapias efectivas contra distintas enfermedades, entre ellas cáncer, lo que ha permitido vencer muchas barreras biológicas, biofísicas y biomédicas que el cuerpo presenta (Gary-Bobo et al., 2012; Tan et al., 2004; L. Wang, 2008). Una de las características atractivas que tiene el uso de esta tecnología es la entrega de moléculas con actividad biológica, específicamente al estudio en cultivos celulares (Bastiat et al., 2013; Jain, 2005), micro-arreglos (Zhou & Zhou, 2004) o los tejidos con tumores en modelos *in vivo* (Xie et al., 2013), con lo que se ha permitido tener nuevas herramientas y otras opciones para detección y tratamiento de enfermedades y cáncer.

Diversas investigaciones dónde utilizan compuestos de la herbolaria con el objetivo de incluirlos en la farmacoterapia contra distintas enfermedades, entre ellas el cáncer habían avanzado de forma lenta, además de que los resultados no eran precisos, y en algunos casos no eran reproducibles (Alonso-Castro et al., 2011). Una de las principales desventajas que tienen ciertos compuestos o moléculas provenientes de la herbolaria frente a los fármacos es su baja biodisponibilidad (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010; Hollman, 2004; Hu, 2007; Thilakarathna & Vasantha Rupasinghe, 2013). Esta desventaja se da porque la mayoría de estos compuestos al ser ingeridos son fácilmente degradados en el intestino delgado (Crozier et al., 2010; Hollman, 2004). El problema del transporte hasta el sitio de interés o diana molecular se ha superado gracias a que, en teoría, en una nanopartícula pueden incluirse más de una molécula con actividad biológica que puede dirigirse y conservar su actividad biológica.

El futuro de la nanotecnología en el área biomédica cada día es más claro, pues los avances han optimizando el diagnóstico clínico, por ejemplo, con el uso de biochips (Jain, 2005), el tratamiento, la informática y la imagenología (Quelhas, Marcuzzo, Maria, Oliveira, & Campilho, 2009; Tothill, 2009).

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de estos), en los que por lo menos una de sus dimensiones se encuentra entre 1 y 100 nm. Esto representa una transición entre las moléculas y átomos, y un material con dimensiones de sólido volumétrico como son los bulk (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007; Gutiérrez, 2005; Hasan, 2015).

Los nanomateriales pueden clasificarse de acuerdo a su dimensión, morfología, composición y uniformidad/aglomeración (Buzea et al., 2007; Gutiérrez, 2005). Dependiendo del número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, existen 4 tipos de nanomateriales. *Materiales de dimensión cero*: Las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico y a éste corresponden las nanopartículas que a su vez se subdividen por su tipo de estructura cristalina en amorfas o cristalinas. A su vez, dependiendo de su diámetro, las nanopartículas se pueden clasificar como sigue: *Partículas finas* con diámetros de 100 a 2500 nm y *partículas ultrafinas* que tienen diámetros de 1 a 100 nm (Abhilash, 2010). *De una dimensión*: Teniendo una dimensión variable, pero conservando una sola dimensión en el régimen de nanómetros, como es el caso de nanoalambres y nanotubos. *De dos dimensiones*: Con áreas de tamaño definido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como en el caso de películas delgadas. *De tres dimensiones*: En que los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas (Gutiérrez, 2005).

Con base en su composición, los nanomateriales se clasifican como materiales de una sola composición o materiales de varias composiciones. Dependiendo de su morfología se clasifican de acuerdo a su relación de área, por ejemplo, una relación alta la tiene materiales como los nanotubos y los nano-cables que tienen formas de hélice o zigzag y una relación baja la tienen materiales con forma esférica, ovalada, cúbica, prisma, pilares, entre otros. Finalmente, la relación uniformidad/aglomeración indican si las nanopartículas son dispersas, en aerosol (suspensiones/coloides) y en estado aglomerado y puede ser isométricas o no isométricas (Buzea et al., 2007).

Podría decirse que las nanopartículas metálicas fueron las primeras nanopartículas usadas por la humanidad, pues se sabe que los egipcios utilizaban nanopartículas metálicas como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener buena salud. Por otro lado, la civilización china, además de utilizarlos con fines curativos, también los empleaba como colorantes inorgánicos en porcelanas. La cultura romana llegó a utilizar nanopartículas y de esta civilización ha causado gran interés la copa de Lycurgus, creada en el

siglo IV DC. Esta copa quizá por accidente contenía nanopartículas metálicas y aún se exhibe en el Museo Británico. El interés y atractivo que tiene esta copa es que fue fabricada con un vidrio dicróico, que presenta diferentes colores dependiendo de si la luz pasa o no a través del mismo. El vidrio toma un tono rubí cuando la copa es iluminada desde atrás y verde cuando se ilumina frontalmente. Análisis de este vaso muestran que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas metálicas (de ~70 nm) de oro y plata en una relación molar aproximada de 14:1, y estas son las responsables de este fenómeno óptico (Gutiérrez, 2005).

Actualmente, se han usado ampliamente nanopartículas de todo tipo para diferentes aplicaciones, como en el descubrimiento de nuevos fármacos, administración de fármacos, diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de enfermedades, incluido el cáncer. Esta nueva tecnología, contribuye a mejorar e inventar nuevos materiales, ya que son fuertes, ligeros, limpios, pueden formar sistemas y tienen superficies “inteligentes”.

Otros atractivos que tienen las nanopartículas son sus características únicas, su relación de superficie que supera con mucho a otras partículas y materiales, sus reacciones de promoción catalítica, su habilidad para adsorber y llevar otros compuestos como son fármacos, pruebas y proteínas, la reactividad de su superficie, que depende fuertemente de las condiciones de síntesis y de los compuestos que se desean incorporar y que su superficie puede ser más reactiva comparada con su análogo macro (Abhilash, 2010).

### 3.3.1 Materiales nanocerámicos. Método de Stöber

De acuerdo a la definición dada anteriormente, los materiales cerámicos de dimensiones cero se conocen como nanocerámicos. Éstos, a diferencia de los compuestos cerámicos de tamaño macro, son resistentes al calor y pueden tener varias aplicaciones como dieléctricos, superconductores, piezoeléctricos, entre otras (Zanella, 2012). El método de síntesis más conocido y estudiado que se usa para obtener este tipo de materiales, es un método desarrollado en los años 60's por Stöber, Fink y Bohn (1968). Sin embargo, el sinterizado y el uso de microondas son técnicas que están siendo usadas con más frecuencia para la síntesis de éstos.



El método desarrollado por Stöber, Fink y Bohn (1968), también es conocido como método sol-gel o simplemente método de Stöber y permite obtener nanopartículas, con tamaños menores a 100 nm, monodispersas. La metodología se basó en una población de Kolbe (1956), en la cual se describió la formación de partículas de sílica al hacer reaccionar tetraetil silicato en soluciones alcohólicas con agua, en presencia de ciertas bases (Stöber, Fink, & Bohn, 1968).

El método de Stöber es llevado a cabo gracias a que es posible combinar y controlar la hidrólisis seguida de una policondensación de ciertos ésteres, como los tetraésteres de ácido silícico. La solución química de la que se parte para llevar a cabo la hidrólisis es un “sol” que actúa como precursor de una red integrada, ya sea de partículas discretas o una red de polímeros que forman un “gel”, de ahí el nombre de método sol-gel. Este método es el preferido para fabricar nanomateriales de óxidos metálicos, por ejemplo, el óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) o *sílice*, óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de zinc ( $\text{ZnO}_2$ ), óxido de aluminio ( $\text{AlO}_2$ ) y el óxido de zirconio ( $\text{ZrO}_2$ ).

Stöber, Fink y Bohn (1968) utilizaron silicatos de alquilo y cloruros de algunos metales para llevar a cabo las dos reacciones y finalmente formar una dispersión coloidal, que luego favorece una polimerización lenta para formar un gel. Los silicatos de alquilo se usan, preferentemente sobre los cloruros, ya que éstos son muy sensibles a la humedad favoreciéndose una hidrólisis completa y para llevar a cabo dicha reacción es común el uso de alcoholes que son un disolvente común para los diferentes líquidos inmiscibles que se forman como subproductos de las reacciones, como es el ácido silícico, el cual cuando su concentración está por encima de su solubilidad en el alcohol, éste se comienza a nuclear homogéneamente y comienza a formarse la partícula de tamaño nanométrico (Beganskien, Sirutkaitis, Kurtinaitien, Remigijus Jušk, & Kareiva, 2004; Green et al., 2003; Ibrahim et al., 2010; Mestanza et al., 1968; Stober, 1968).

Además, los mismos autores, determinaron que dependiendo del tipo de silicato de alquilo que se utilice, se obtienen diferentes tamaños de las partículas, por ejemplo, con tetraetil éster, derivado del ácido silícico, las partículas obtenidas son de menor tamaño ( $0.2 \mu$ ) comparadas con las de tetrapentil éster, derivado del mismo ácido, bajo las mismas condiciones ( $1.38 \mu$ ). De igual manera, el tamaño de la cadena del alcohol que se utilice influye en el tamaño y la rapidez con que se formen las nanopartículas. Así, si la reacción se lleva a cabo en metanol, ésta será más rápida que si lleva en n-butanol y las nanopartículas sintetizadas con metanol, serán de menor tamaño que las sintetizadas en n-butanol. El contenido de agua, influye en la formación del gel, por lo que la



relación molar debe ser óptima para formar las nanopartículas. El catalizador que aparentemente influye en la obtención de una forma esférica de las partículas es el amoniaco o el hidróxido de amonio, ya que si éste no es agregado se forman flóculos de forma irregular que no pueden ser observados bajo un microscopio (Lee, Sathyagal, & McCormick, 1998; Limpo, Rubio, & Oteo, 1993; Rao, El-Hami, Kodaki, Matsushige, & Makino, 2005; Rojas, Juan, Km, Carretera, & Sta, 2009; Stöber et al., 1968).

Tomando como base el trabajo anterior, se han derivado muchas investigaciones, que tienen como fin sintetizar nanopartículas de sílice para diferentes aplicaciones. El precursor más usado para la síntesis de las nanopartículas de sílice es el tetraetilortosilicato (TEOS) (Figura 7). El TEOS tiene una fórmula química  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , es un líquido incoloro y es el éter etílico de ácido ortosilícico,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , además este compuesto es fácil de hidrolizar. De acuerdo con Bogush, *et al.*, (1988), para obtener una mol de  $\text{SiO}_2$ , es necesario una mol de TEOS y dos moles de agua que, a su vez producen cuatro moles de etanol y la cantidad suficiente de hidróxido de amonio para obtener la forma esférica.

El interés por conocer y controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas por el método de Stöber, generó muchas investigaciones que tuvieron como fin explicar el mecanismo de formación de este tipo de nanopartículas, y se llegaron a varias hipótesis al respecto. Una de ellas es que el crecimiento de las nanopartículas ocurre principalmente a través de un mecanismo de agregación que se pueden predecir por la teoría DLVO (Deryaguin-Landau-Verwey-Oberbeek) de estabilidad coloidal. De acuerdo con esta teoría, las partículas coloidales están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión, y existe un balance entre dichas fuerzas. El movimiento Browniano produce colisión entre las partículas y si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecen separadas después de la colisión. Las fuerzas de atracción son las de Van der Waals, en tanto que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas (Bogush, Tracy, & Zukoski IV, 1988; Van Helden, Jansen, & Vrij, 1981).

El método sol-gel ha sido usado en los últimos años para preparar una amplia variedad de materiales nanoestructurados. El método ofrece varias ventajas, por ejemplo, el proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas, las nanopartículas obtenidas tienen una alta pureza y homogeneidad. Una de las desventajas que tiene este método es que, si las energías de activación no son lo suficientemente



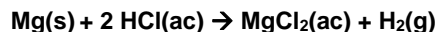


Figura 12. Prueba de Shinoda. Reacciones características y compuestos que presentan esta reacción (Brown, LeMay, Bursten, Murphy, & Woodward, 2009; Krishnaswamy, 2003).

En cuanto al mecanismo exacto, no se conoce del todo, pero el flavonoide se reduce, siendo el metal magnesio el agente reductor (Brown et al., 2009). Lo anterior podría deberse a una transferencia de electrones única con intermedios radicales o aniónicos, también podría explicarse por estados de transición cíclico e intermediarios del tipo carbanioide en coordinación con el magnesio. En cualquier caso, el propósito del ácido probablemente es activar el carbonilo del flavonoide a la reducción por protonación, y así proporcionar una fuente de iones  $\text{H}^+$  para la posterior formación de agua (Brown et al., 2009; Krishnaswamy, 2003). Pero el mecanismo aún debe estudiarse para explicar satisfactoriamente los cambios que presentan los compuestos en la reacción.

La prueba Shinoda es similar a la reducción de Clemmensen, que consiste en que un grupo carbonilo se reduce usando amalgama de zinc-mercurio. La prueba Shinoda es una prueba para la presencia de flavonas. Si están presentes en la muestra de ensayo, se reducen a antocianidinas bajo las condiciones de reacción Shinoda como se muestra en la figura 13. La conjugación en los compuestos del tipo flavonoide produce un color amarillo, mientras que la conjugación extendida en la antocianidina resultante cambia el color más lejos a la región roja del espectro visible. El cambio en el color hace de esta una prueba visual simple para detectar la presencia de flavonas u otros compuestos del tipo flavonoide (Brown et al., 2009; Krishnaswamy, 2003; Sing de Ugaz, 1997).

#### 3.4.2 Espectroscopía UV-Vis

Una técnica importante de caracterización es la espectroscopia UV-Visible, ya que es rápida, tiene alta reproducibilidad y es relativamente sencillo llevar a cabo el análisis. Con esta técnica es posible identificar compuestos e incluso conocer ciertas estructuras específicas. Al realizar la espectroscopia UV-Visible, es importante seleccionar el tipo de solvente a utilizar, ya que éste puede causar un efecto no deseado. Para realizar este análisis es común el uso de etanol como solvente, porque absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda (Horowitz & Jurd, 1960; Owen, 2002). También es importante mencionar que antes de comenzar con el análisis de los compuestos de interés, se debe realizar

un barrido con el solvente sin muestra para obtener una línea base. Esto permite minimizar el ruido y descartar bandas que pueden pertenecer al solvente.

La espectroscopia UV-Visible, se fundamenta en que los compuestos del tipo flavonoide poseen dos bandas características (Banda I y Banda II), debida a los anillos o sistemas que forman la molécula (Figura 13). La Banda II se puede considerar originada a partir del anillo A o sistema benzoilo y la Banda I, se asocia al anillo B o sistema cinamoilo. Además, el anillo B puede ser originado por los otros tipos de compuestos del tipo flavonoide, como son flavonas, antocianidinas, entre otros (Tabla 4) (Horowitz & Jurd, 1960; Sing de Ugaz, 1997).

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH sustituido)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330h	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330h	Isoflavonas, dihidroflavonoides
230-270 (baja intensidad)	340-390	Chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas y antocianinas

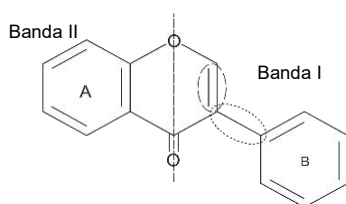


Figura 13. Esqueleto de compuestos del tipo flavonoide, donde se indican los sistemas responsables de las bandas características mostradas en espectros de UV-Vis.

#### 3.4.3.1 Determinación de compuestos metilados y no metilados utilizando espectroscopia UV-Vis

Un grupo hidroxilo libre en la posición 7- de un isoflavonoide es lo suficientemente ácido para ser ionizado por el acetato de sodio. Esta ionización

del grupo 7-hidroxil resulta en un cambio batocrómico de la principal banda de absorción de unos 10 nanómetros para isoflavonoides y entre 35-60 nanómetros para las flavanonas. Sin embargo, no hay cambios significativos cuando se observan los espectros UV-Vis de compuestos que tienen ocupada la posición 7 (Horowitz & Jurd, 1960).

La adición de hidróxido de sodio, generalmente da un espectro similar al obtenido con acetato de sodio excepto en el caso de 4'-hidroxi-7-alcoxi o 4'-hidroxi-7-glucosidoxiflavanones. Cuando estas características estructurales son presentadas, los compuestos son rápidamente convertidos a chalconas, en forma ionizada, y el resultado es un espectro UV-Vis con una banda máxima en la región de 400-450 nanómetros, que es característica de esos compuestos. Todos los flavanones forman chalconas, eventualmente, en concentraciones alcalinas, pero parece que solo 4'-hidroxi-7-alcoxi o 4'-hidroxi-7-glucosidoxiflavanones forman chalconas rápidamente (5-10 min) en un medio muy alcalino. Esta susceptibilidad a la formación de chalconas en estos compuestos puede ser visualizada como el resultado de incrementar la acidez del hidrógeno del átomo alfa del grupo carbonil acoplado con la ionización del grupo 4'-hidroxi (Horowitz & Jurd, 1960).

### 3.4.3 Espectroscopía FTIR

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo de especies moleculares se pueden explicar si se supone que todos son resultado de distintos cambios energéticos producidos por las transiciones de las moléculas de unos estados energéticos vibracionales y rotacionales en otros. La frecuencia de la radiación absorbida coincide a su vez con la frecuencia de la vibración molecular que, en realidad es la causa del proceso de absorción. La radiación IR no tiene la suficiente energía para producir la clase de transiciones electrónicas que se encuentran en las radiaciones ultravioleta y visible; por esta razón, la absorción de radiación IR se limita en gran parte a especies moleculares para las cuales existen pequeñas diferencias de energías entre los distintos estados vibracionales y rotacionales (Domínguez, 1973; Skoog, James Holler, & Crouch, 2008).

En el caso de una molécula sencilla diatómica o triatómica, es fácil definir el número y la naturaleza de dichas vibraciones, y relacionarlas con las energías de absorción. En el caso de las moléculas poliatómicas, es difícil, hacer un

análisis de esta clase. No sólo a causa del gran número de centros de vibración que presentan las moléculas grandes, sino también por las interacciones entre varios de estos centros, lo cual se debe tener en cuenta si se desea un análisis completo (Domínguez, 1973; Skoog et al., 2008).

#### 3.4.4 Cromatografía en capa fina y columna

La cromatografía es un método físico que tiene como fundamento la separación de los componentes de una mezcla, por migración diferencial de soluto transportados por una fase móvil, que son retenidos selectivamente por una fase estacionaria (inmóvil), donde la fase estacionaria puede ser sólida o líquida (Domínguez S., 1975).

#### 3.4.5 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico, permitiendo así su identificación. El análisis se basa en examinar la luz que es dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia de la luz incidente, esto lo registra un detector y se obtiene así el espectro de emisión de la muestra. Esta técnica tiene la ventaja de que el análisis se realiza directamente sobre la muestra sin necesitar algún tipo de preparación especial y no conlleva a alguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, por lo que la técnica es no destructiva.

Uno de los problemas inherentes cuando se adquiere cualquier señal es el “ruido” presente en la medida. En el caso de la obtención de los espectros Raman, uno de los “ruidos” habituales es el generado por la muestra. Este “ruido” incluye emisiones ópticas como la fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno de emisión de luz que pertenece al fenómeno de luminiscencia y se clasifica como un fenómeno fotoluminiscente. La fluorescencia es un fenómeno que se produce si, al incidir un fotón sobre una molécula éste es absorbido y la molécula pasa a un estado electrónico excitado donde permanece unas decenas de nanosegundos, para saltar a otro estado excitado, pero de menor energía, librando un fotón de frecuencia más baja que el incidente emitiendo radiación en el espectro visible o cercano a éste. Es común que este fenómeno lo

presenten sustancias que absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta, como la radiación ultravioleta, y la emitan en una longitud de onda más larga, por ejemplo, dentro del espectro visible (Lakowicz, 2006; Sauer, Hofkens, & Enderlein, 2011; Shinde, Dhoble, Swart, & Park, 2012). La fluorescencia más intensa y la más útil es la de los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baja energía. Los compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas y alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también presentan fluorescencia, pero la cantidad de estos compuestos es pequeña comparada con el número de sistemas aromáticos (Skoog et al., 2008)

Con base en lo descrito anteriormente, se propuso determinar la fluorescencia de los compuestos usando esta técnica que es sencilla, rápida, se utiliza un mínimo de muestra, no es destructiva y los valores obtenidos pueden ser comparados con otros compuestos. Además, es posible obtener el desplazamiento de Stokes, que proporciona la diferencia de energía que existe entre las absorciones y emisiones entre dos niveles de la misma energía (Alford et al., 2009), ya que es un parámetro reportado para caracterizar compuestos con capacidad de convertir lo invisible, como es la radiación ultravioleta, en radiaciones de mayor longitud de onda, que pueden ser visibles.

#### 3.4.6 Dispersión de luz

La dispersión de luz dinámica (DLS), es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y la distribución de tamaño de moléculas y partículas típicamente en la región sub-micrométrica, y con la última tecnología, inferiores a 1 nanómetro. Sus principales aplicaciones son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido. El fundamento de esta técnica es que a través del movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto del tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein.

#### 3.4.7 Difracción de rayos X

La difracción es un fenómeno característico de las ondas, que consiste en la dispersión de las ondas cuando se interaccionan con una estructura ordenada. Ocurre en todo tipo de ondas, desde las sonoras, hasta las ondas electromagnéticas como la luz, y también los rayos X. La difracción de rayos X es el único método que permite, tras un procedimiento generalmente largo y complicado, determinar de modo exacto la estructura molecular de cualquier producto, ya sea un fármaco, un compuesto inorgánico, un mineral, una proteína o incluso un virus.

### 3.4.8 Microscopía SEM

Las imágenes de microscopía de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) proporcionan una imagen tridimensional de la superficie de la muestra con un nivel de detalle y profundidad de campo muy superiores a la microscopía óptica convencional. El haz de electrones, al recorrer la muestra, arranca electrones secundarios de la misma que son captados y convertidos en tonos más claros o más oscuros en función de su intensidad. Dicha intensidad está relacionada directamente con la orientación de las distintas superficies hacia el captador, por lo que girando e inclinando la muestra podemos adaptar a nuestro gusto la dirección de las luces y sombras de forma que destaquen los detalles más significativos de la muestra.



## 4 Descripción de la propuesta de trabajo

### 4.1 Identificación y caracterización de la muestra vegetal

La muestra vegetal obtenida, la cual se nombró EP, de Uruapán Michoacán, se analizó en la Xiloteca del Jardín Botánico, del Instituto de Biología de la UNAM. La muestra la identificó y caracterizó la maestra Josefina Barajas del Instituto de Biología.

### 4.2 Extracción de los compuestos de EP

Se molieron trozos de duramen de madera (10 gramos) y se extrajeron sus compuestos en un equipo Soxhlet usando metanol (M), etanol (E), mezcla metanol-etanol (ME) y una mezcla de metanol-etanol-agua destilada (EMA), cada uno por 96 horas en 150 ml. Luego el extractante se disolvió en éter etílico y se le adicionó una solución 5 M de hidróxido de sodio. Posteriormente se precipitaron los compuestos con ácido clorhídrico. En la figura 14 se muestra esta metodología de manera simplificada como Burns *et al.* 1984 (Burns, Dalgarno, Gargan, & Grimshaw, 1984).

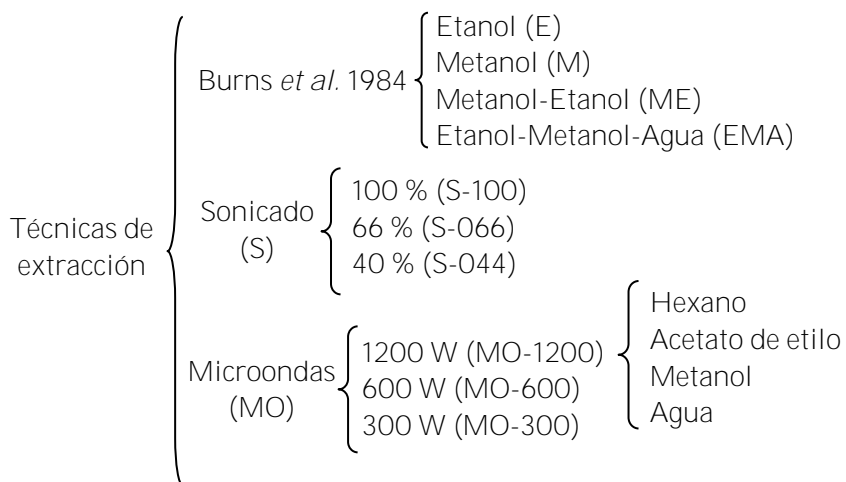


Figura 14. Diagrama donde se muestran las diferentes técnicas usadas para extraer los compuestos de palo azul, así como las claves y condiciones de extracción.

Adicionalmente, se probaron dos técnicas de extracción, una usando un Sistema de Reacción Acelerada de Microondas de CEM. Para futuras referencias los compuestos extraídos con esta técnica se referirán con las siglas, MO. El modelo del microondas es un MARS Xpress, con potencia regulable entre 0 y 1600 vatios

a una frecuencia de 2455 MHz y el software que se utilizó fue el “Synergy Prep” para control y monitorización de las operaciones. La otra opción de extracción fue usando un sonicador, las muestras extraídas se representan con una “S”, el cual trabajó a 53 KHz y fue posible cambiar la potencia de un máximo de 100% a un mínimo de 44%.

Las condiciones en las que se trabajó con el MO fueron las siguientes: Un gramo de muestra se colocó en un tubo de teflón con 15 ml de solvente, etanol. El tiempo de extracción fue de 5 min a 50°C a 300 W, 600 W y 1200 W con una potencia del 100% y rampa de 5 min.

Las condiciones usando el sonicador fueron las siguientes: Un gramo de muestra se colocó con 15 ml de solvente, etanol, y se dejó sonicando por 20 min, sin modificar la temperatura, a 3 diferentes potencias que fueron 100%, 66% y 40%.

Además, usando MO bajo las mismas condiciones a 1200 W, se realizó una extracción secuenciada usando diferentes solventes, con el fin de encontrar que componentes se extraían usando solventes con diferentes polaridades (Figura 14).

#### 4.3 Identificación de los compuestos de EP por ensayos de colorimetría

Para identificar los compuestos usando la técnica de Burns *et al.*, se utilizaron pruebas colorimétricas (Domínguez, 1979). Adicionalmente, se realizó una prueba, donde se colocaron los compuestos extraídos de EP a diferentes pH, pasando por el ácido (pH 4), el fisiológico (pH 7.4) y uno básico (pH 8) y haciendo incidir luz ultravioleta a dos longitudes de onda diferentes (254 nm y 365 nm).

#### 4.4 Caracterización por espectroscopia UV-Vis de los compuestos de EP

Para esta parte del experimento los solventes que se utilizaron fueron etanol y metanol, hexano, acetato de etilo y agua. Los diferentes polvos obtenidos de las diferentes técnicas de extracción, se diluyeron en los diferentes solventes por separado y se midieron en un equipo de UV-Vis. Además, se obtuvieron los espectros UV-Vis de los compuestos diluidos en los buffers con diferentes pH (4, 7.4 y 8). Los resultados obtenidos se compararon con la literatura para encontrar las bandas características de compuestos del tipo isoflavonoides o flavonoides. También, se realizó el cálculo del coeficiente de extinción molar ( $\text{Log } \epsilon$ ) usando una curva de calibración, diluyendo 10 mg, aproximadamente, del extracto seleccionado en el buffer 7.4 y respetando la Ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción se obtuvo a una  $\lambda = 345$  nm para el extracto E y M-E y  $\lambda = 339$  para

el extracto M y A-M-E. Para asegurar un buen ajuste lineal se realizaron 10 diluciones y la pendiente de ese ajuste fue tomado como el valor de  $\epsilon$ .

Todo lo anterior se realizó usando dos espectrofotómetros, un espectrofotómetro VWR 1600 PC spectrophotometer (NASDAQ: VWR, Randor, Pennsylvania, USA) y el espectrofotómetro de banco *Lambda 25* (Perkin-Elmer). Las características principales del espectro VWR 1600PC se enlistan en la **Tabla 5**, mientras que las del espectrofotómetro de banco *Lambda 25* se enlistan en la **Tabla 6** (Perkin Elmer, 2004; VWR, 2017).

Tabla 5. Características del espectrofotómetro VWR 1600	
	Características
<b>Longitud de onda</b>	Fijado entre 200 – 900 nm
<b>Ancho de banda</b>	4 nm
<b>Celda</b>	Celdas de cuarzo y de plástico de 10 mm
<b>Fuente de luz</b>	Doble haz de luz de lámparas pre-alineadas de deuterio y halógenas de tungsteno con encendido automático
<b>Tamaño</b>	490 × 360 × 240
<b>Peso</b>	14 kg
<b>Velocidad de scan</b>	220 nm/min
<b>Software</b>	M.Wave Professional en modo barrido

Fuente: Información de VWR International (2017)

Tabla 6. Características espectrofotómetro <i>Lambda 25</i> (Perkin-Elmer)	
	Características
<b>Longitud de onda</b>	Fijado entre 200 – 800 nm
<b>Ancho de banda</b>	Fijado a 1 nm
<b>Celda</b>	2 celdas de cuarzo de 10 mm
<b>Fuente de luz</b>	Doble haz de luz de lámparas pre-alineadas de deuterio y halógenas de tungsteno con encendido automático
<b>Tamaño</b>	650 mm x 560 mm x 23 mm
<b>Peso</b>	26 kg
<b>Velocidad de scan</b>	240 nm/min
<b>Software</b>	UV Winlab

Fuente: Información de Perkin-Elmer (2004).

#### 4.4.1 Determinación de compuestos metilados y grupos OH libres de los extractos de EP.

Con la finalidad de conocer si algunos de los compuestos extraídos tienen grupos metil o se encuentran grupos OH libres, se procedió a tratar los compuestos con acetato de sodio en medio etanólico y con NaOH al 1% (Beltrami et al., 1982; Horowitz & Jurd, 1960). Los compuestos se diluyeron en etanol y se midieron en el equipo de UV, posteriormente se les agregaron 3 gotas de acetato de sodio y a otro grupo de muestras se les agrego NaOH al 1%. Todas las muestras se midieron y se obtuvieron sus correspondientes espectros. El equipo usado fue un espectrofotómetro VWR 1600 PC spectrophotometer (NASDAQ: VWR, Randor, Pennsylvania, USA) **Tabla 5**.

#### 4.5 Caracterización de los compuestos de EP por microscopia Raman

Los compuestos E, M, ME, EMA y rodamina B, se analizaron por espectroscopia Raman. Los datos de fotoluminiscencia se obtuvieron por excitación a 480 nm con un láser de argón (30mW). Para calibrar el equipo se usó silicio como estándar. El estudio se llevó a cabo en una configuración de 90° con la señal del láser para evitar efectos de re-absorción. El estudio comprendió el tiempo de decaimiento de los compuestos de EP y la rodamina 6G, donde se hicieron mediciones a un tiempo inicial o tiempo cero y a partir de ese tiempo se midieron cada 40 segundos 10 veces, cumplido el número de mediciones, se midieron 2 veces más en un lapso de 5 minutos. Los compuestos de EP se diluyeron por separado a 3 diferentes pH (4, 7.4 y 8) usando buffers de fosfato para llegar a los pH seleccionados y se colocaron en una cubeta de cuarzo de 2 mililitros para su medición. Para este experimento, se usó un micro-espectrómetro Raman con líneas de excitación de 632.8, 514.5 y 488 nm, marca Dilor, modelo Labram II. El intervalo de número de onda alcanzable es de 100 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . La resolución espacial está definida por el diámetro mínimo del spot del láser alcanzable con el microscopio que es de 1 micra. La temperatura de trabajo fue de 20 °C. El software que se utilizó para el análisis de los datos fue Origin 8 de acceso libre.

##### 4.5.1 Modelado matemático de moléculas fluorescentes

La geometría molecular de las moléculas de aurona, flavona, isoflavona y matlalina fueron modeladas sin restricción de simetría usando una función híbrida de correlación e intercambio Becke-Lee-Yang-Parr (BLYP) y el DNP (función de bases numérica); el conjunto de la base de datos fue implementada en el programa DMol3. La base DNP se considera que proporciona una exactitud del 99.99% teniendo también en cuenta el cálculo de la unión de hidrógeno.

#### 4.6 Caracterización por FTIR de los compuestos de EP

Las muestras de EP en polvo se prepararon por dispersión y presión en KBr para formar pastillas y se analizaron en un equipo de Infrarrojo marca Bruker, Vector 33, Biospin Corporation, USA y las muestras se midieron en un intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.7 Separación de los compuestos de EP por Cromatografía en columna y capa fina

El extracto que se obtuvo usando MO-1200, se analizó en placas de cromatografía marca Sigma Aldrich. Las placas que se usaron para analizar el extracto se cortaron de 4 cm de largo por 2 cm de ancho. En una cámara de cromatografía se colocó la placa con el extracto y se usaron diferentes solventes con diferentes polaridades para conocer la polaridad de la molécula. Se comenzó a eluir con hexano hasta llegar a metanol. De esta prueba previa se concluyó que en la columna se debía comenzar con una fase móvil de Hexano:Acetato (1:1 (V/V)).

1 gramo de extracto seco, se mezcló con 4 veces su peso de sílica gel (Silical gel, 200-400 mesh, 60 Å, marca Sigma Aldrich) a la mezcla se le agregaron 2 ml de etanol (Polvo A). Para empacar la columna se colocó primero algodón y 3.5 veces en peso de sílica limpia con respecto al polvo A. Después se coloca el Polvo A y de nuevo se colocó un algodón.

Una vez empacada la columna se eluye con Hexano: Acetato (1:1 (V/V)), seguido de Hexano: Acetato (50:50 (V/V)), Acetato (100%), Acetato: Metanol (50:50 (V/V)), Acetato: Metanol (25:75 (V/V)) y se finalizó con metanol (100%).

Se obtuvieron fracciones de 40 ml, a las que inmediatamente se les removía la máxima cantidad de solvente usando un rotavapor marca BUCHI, modelo R-210 con las siguientes condiciones: Presión 70 mmHg y temperatura del baño de 25 °C.

De la separación en columna se obtuvieron 80 fracciones, las cuales se agruparon dependiendo del corrimiento de las bandas.

#### 4.7.1 Caracterización por UV-Vis

Para la caracterización por UV, primero fue necesario obtener la línea base o blanco que correspondió al espectro UV del solvente puro. Para esta parte del experimento los solventes que se utilizaron fueron etanol y metanol que fueron usados como blancos. De las diferentes fracciones obtenidas con la técnica de cromatografía en columna, se obtuvieron sus espectros UV en un equipo de UV-Vis. Los espectros se analizaron y se obtuvieron sus bandas características. Todo lo anterior se realizó en un espectrofotómetro VWR 1600 PC spectrophotometer (NASDAQ: VWR, Randor, Pennsylvania, USA) ver **Tabla 5**.

#### 4.7.2 Caracterización por FTIR y Raman

Las fracciones obtenidas de la columna en polvo, se prepararon y se analizaron en un equipo de Infrarrojo marca Bruker, Vector 33, Biospin Corporation, USA en modo ATR. Las muestras se midieron en un rango de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . De igual forma se obtuvieron los espectros Raman de los compuestos para comparar el análisis.

### 4.8 Síntesis de nanopartículas de sílice

La síntesis de las nanopartículas se realizó utilizando etanol como medio para el crecimiento de las nanopartículas, tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor, agua destilada e hidróxido de amonio como agente para controlar el tamaño de las nanopartículas (Beganskien et al., 2004). En un matraz Erlenmeyer, se adicionó etanol/agua en una relación molar de 3:2 y se dejó sonicar por 20 minutos. Después, se añadió 0.006M de TEOS y se dejó sonicar por 10 min más. Posteriormente, agregaron 50 ml de hidróxido de amonio y se dejó sonicar por 10 min más. Al terminar, se dejaron secar las nanopartículas.

#### 4.9 Cuantificación del tamaño de las nanopartículas de sílice por dispersión de luz dinámica

En un vial con agua destilada, se colocó la cantidad de nanopartículas secas correspondientes a 0.001 gramo. El vial con la muestra se agitó magnéticamente

durante 5 minutos, posteriormente se filtró la muestra usando membranas de 420 nm y posteriormente se colocó el vial en un sonicador por 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se midieron en un equipo de dispersión de luz Brookhaven Instrument BI-220SM Research Goniometer System, equipado con un corredor digital de alta velocidad PCI-BI9000AT con un detector de fotones de estado sólido y un láser de He-Ne de 35 mW (633 nm) Melles Griot 9167EB-1 como fuente de luz. La prueba se realizó a un ángulo de 90° durante 10 segundos a 25 ° C. Todas las muestras se hicieron por triplicado.

#### 4.10 Difracción de rayos X de las nanopartículas

Las nanopartículas sintetizadas por el método de Stöber, se caracterizaron por difracción de rayos X, usándose porta muestras “zero background”. El equipo que se utilizó fue un Difractómetro de rayos X marca Rigaku, modelo Ultima IV y las condiciones de operación fueron las siguientes: Detector de alta velocidad D/teX-ULTRA, con un intervalo de medición (2theta) de 5 a 80°, velocidad = 5 grados por minuto, muestreo = 0.02 segundos, incertidumbre de medición: ±0.017 grados y longitud de onda de la radiación utilizada, 1.54 Å.

#### 4.11 Funcionalización de la superficie de las partículas de sílice

Para liberar nanopartículas sintetizadas de agua adsorbida en la superficie y evitar que interfirieran en la funcionalización, las nanopartículas se sometieron a un proceso de calentamiento a 120°C 48 horas. 1.0 g de sílica se sometió a reflujo en tolueno a 150 °C por 24 horas en presencia de 1.0 ml de 3-aminopropiltriétoxosilano (AMPS) y al finalizar el tiempo de reacción se separaron por centrifugación y se lavaron con tolueno, etanol y agua consecutivamente con el mismo procedimiento de separación para eliminar solvente y agente acoplante remanentes (Echeverrie, Giraldo, & López, 2007).

#### 4.12 Ensamble de los compuestos de EP a las nanopartículas funcionalizadas de sílice.

Para ensamblar las nanopartículas de sílice con AMPS con los compuestos de EP, se tomaron 0.5 gramos de nanopartículas con AMPS y se dispersaron en dimetilsulfóxido a 35 °C, una vez disueltas se agregaron los compuestos de EP y

se dejaron en agitación por 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se secaron a temperatura ambiente.

#### 4.13 Caracterización de las nanopartículas de sílice con AMPS y compuestos de EP

##### 4.13.1 Análisis por FTIR

Para corroborar que se activó la superficie de las nanopartículas de sílice con el AMPS y los compuestos de EP, se realizó un infrarrojo, usando la metodología antes descrita, para encontrar bandas características que indiquen grupos funcionales representativos.

##### 4.13.2 Análisis por microscopia Raman

El estudio se realizó bajo las mismas condiciones que sin las nanopartículas, usando los compuestos de EP y la rodamina B unidos químicamente a las nanopartículas de sílice.

##### 4.13.3 Difracción de rayos X

A las nanopartículas sintetizadas por el método de Stöber, funcionalizadas con el agente acoplante y los compuestos de palo azul, se le sometió a difracción de rayos X en las mismas condiciones reportadas en el punto 2.10.

##### 4.13.4 Potencial zeta de las nanopartículas

El potencial zeta de las nanopartículas (N), nanopartículas con APTES (NA) y nanopartículas con compuestos de EP (NS) fue medido en una electroforesis de partículas ACOUSTOSIZER IIS™. Las muestras fueron analizadas a un pH de 7.4 y en una concentración de 0.5% (p/v) y fueron colocadas en el recipiente para su análisis.

#### 4.14 Estudio de internalización del nanosistema a la línea celular MCF-7

La línea celular utilizada en este trabajo fue la MCF-7. Las células se mantuvieron en condiciones óptimas de cultivo con medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DEMEM), 10% de antibiótico/antimicótico marca BIFCO, 10%



de aminoácidos no esenciales, 0.01mg/ml de insulina bovina y 10 % de suero bovino fetal.

Una vez que las células mostraron una confluencia del 60%, se trataron con el extracto del EP en concentraciones de 1 a 200  $\mu$ M por 48 horas, de acuerdo con Choi y cols. 2009. La captación del extracto del EP se analizó bajo el microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta, Munich, Germany). A su vez, las células se observaron bajo el microscopio confocal a las 2, 4, 6, 8, 18, 24 y 36 horas del tratamiento con el EP para monitorear la duración y el tiempo de decaimiento de la fluorescencia.

## 5. Análisis y discusión de los resultados

---

### 5.1 Identificación de la muestra vegetal

La muestra vegetal con la que se contó para este trabajo fue analizada por la Maestra Josefina Barajas, quien es responsable de la Xiloteca del Instituto de Biología en la UNAM. De acuerdo al análisis realizado la muestra vegetal, correspondió a *Eysenhardtia polystachya* (Ortego) Sarg. y, se le asignó un nombre y un número de identificación que correspondió al MEXU1850 (**Figura 15**). El material MEXU1850 mostró las siguientes características:

**Características generales de la madera:** Albura de color amarillo claro o ligeramente verdoso, duramen de color café homogéneo o ligeramente vetado, sabor amargo, lustre mediano, textura mediana y grano entrecruzado a ondulado. Su madera es dura y pesada con 0.80 de gravedad específica.

**Características microscópicas:** Madera con anillos de crecimiento conspicuos delimitados por la porosidad anular y por parénquima marginal. Poros de contorno ovalado a circular, en grupos de 2 a 5 en cadenas radiales o en racimos abundantes 34/mm, de diámetro mediano con  $107 \pm 8 \mu\text{m}$ , elementos de vaso muy cortos,  $239 \pm 202\text{-}327\mu\text{m}$  de longitud, con platinas de perforación simples y punteaduras intervasculares alternas, areoladas y ornamentadas de  $6 \mu\text{m}$  de diámetro, frecuentemente coalescentes. Presenta gomorresinas abundantes (**Figura 15**).

**Parénquima axial:** Paratraqueal escaso, confluyente, marginal, en algunas áreas con tendencia a la estratificación, con series de dos células y células fusiformes y con cristales prismáticos presentes.

**Parénquima radial:** Radios numerosos 9/mm, heterogéneos, principalmente bi y triseriados, con el cuerpo del radio formado por células procumbentes y una hilera de células erectas en uno o ambos márgenes; extremadamente bajos de  $366 \pm 38 \mu\text{m}$  de altura, con inclusiones de cadenas de cristales prismáticos grandes.

**Fibras:** Libriformes de longitud mediana con promedio de  $1109 \pm 116 \mu\text{m}$

**Otras características:** Anillos de crecimiento conspicuos delimitados por la porosidad anular y parénquima marginal.

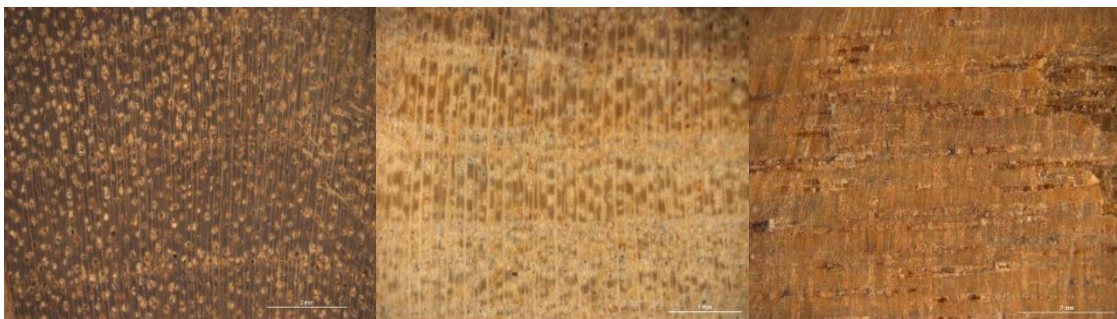


Figura 15. Cortes transversales del duramen de EP con un aumento de 2.5x.

## 5.2 Extracción de los compuestos de EP





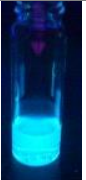






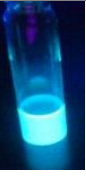

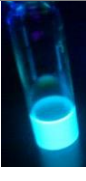














De la extracción realizada al duramen del árbol de palo azul con los diferentes solventes y siguiendo la metodología descrita por Burns, *et al.*, (1984), se obtuvieron los compuestos en forma de polvos que se muestran en la tabla 3 en la tercera columna.

Como se mencionó en la sección de metodología, se corroboró si los compuestos presentaban el fenómeno de fluorescencia al cambiar el pH del medio en el que se encontraban y así confirmar lo observado por Boyle cuando él usaba infusiones del árbol como un indicador ácido-base. Cabe mencionar que, antes de excitarlos se apreció un menisco azul en la parte superior del líquido, que es característico de las infusiones de palo azul, a pH 7.4 y 8 pero no es igual de distinguible a pH 4. Para observar lo descrito por Boyle, se optó por excitar esos compuestos con dos longitudes de onda pertenecientes a la radiación ultravioleta, de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm), y así verificar el fenómeno de fluorescencia. El resultado fue que se apreció éste fenómeno, pero solo bajo ciertas condiciones (Tabla 7).

En este experimento, se pudo apreciar que usando una longitud de onda corta de 265 nm, el fenómeno de fluorescencia no es apreciable en ninguno de los 3 pH propuestos, para ningún extracto diluido. Lo anterior podría deberse a que, de acuerdo a la ecuación que relaciona la energía de un fotón con la longitud de onda, se puede predecir que a menor longitud de onda, mayor frecuencia y por lo tanto mayor energía llevan los fotones, por lo que al usar una longitud de onda de 254 nm, posiblemente, lo que sucede con estos compuestos, es que se esté emitiendo en una longitud de onda no visible, como puede ser en el infrarrojo. Por lo tanto, con esta longitud de onda no es posible apreciar el fenómeno, a pesar

de observarse a simple vista el menisco azul para algunos casos (Shinde et al., 2012).

Tabla 7. Compuestos extraídos del duramen del árbol de palo azul.

Solvente	Clave	Fotografía del polvo	Compuestos a pH 4		Compuestos a pH 7.4		Compuestos a pH 8	
			Longitud de onda		Longitud de onda		Longitud de onda	
			254 nm	365 nm	254 nm	365 nm	254 nm	365 nm
<b>Metanol</b>	M							
<b>Etanol</b>	E							
<b>Metanol-Etanol (50%-50%) (v/v)</b>	M-E							
<b>Metanol- Etanol-Agua (33%-33%- 33%) (v/v)</b>	E-M-A							

Nota: El agua que se utilizó en todos los casos, fue agua destilada.

Cabe aclarar que esta prueba, al ser meramente cualitativa, solo dio información de qué extractos y bajo qué condiciones podían presentar la fluorescencia. Además, la radiación de 254 nm es absorbida por el ADN y produce daño directo, que consiste en atacar el material genético al formar unas estructuras que evitan la síntesis normal del ADN y este proceso conduce a la muerte de la célula, mutaciones y fragmentan el material genético (Mathews et al., 2013), por lo que en los otros ensayos y las pruebas biológicas no se usó esta longitud de onda.

Cuando se excitaron los compuestos con una longitud de onda larga, 365 nm, el resultado fue el esperado, ya que se apreció el efecto de fluorescencia. De acuerdo a lo reportado por Acuña, *et al.*, 2008, en condiciones básicas y con procesos de oxidación, se favorece un tipo de estructura fluorescente, que al parecer se obtuvo de los compuestos extraídos con los diferentes solventes. A pH ácido, no se

observó este fenómeno y posiblemente sea a que las moléculas se encontraban “protonadas” a causa del pH, lo que puede ser que no favoreció estructuras que permitan ese fenómeno (A. U. Acuña & Amat-Guerri, 2008; A. Ulises Acuña et al., 2009).

Particularmente, en este trabajo se puso especial atención a pH 7.4, ya que es el pH fisiológico o pH normal que tienen las células *in vivo* o *in vitro*. El efecto de fluorescencia fue observado, como se puede apreciar en la tabla 3 en la columna a pH 7.4, y es un resultado importante que alienta a usar este tipo de compuestos como biomarcadores, pues posiblemente ese mismo fenómeno se observe dentro de las células, específicamente en la línea celular MCF-7.

La fluorescencia se presentó a una longitud de onda larga y en pH 7.4 y 8 y se observó principalmente en los extractos que se obtuvieron usando M, E y una mezcla entre ellos, M-E; sin embargo, se observó que en la mezcla, A-M-E, no se aprecia la fluorescencia. Esto pudiera ser debido a que sus compuestos se encuentran enmascarados o, por efecto del agua utilizada otros compuestos se obtuvieron en mayor proporción y estos no presentan la fluorescencia. Sin embargo, no puede descartarse este extracto para usarse en el modelo celular, ya que tal vez estos compuestos bien no presentan fluorescencia, puede ser que presenten un efecto antitumoral.

Considerando que la muestra vegetal debía ser aprovechada al máximo, se optó por buscar otras técnicas de extracción de compuestos de EP y por ello se experimentó usando un microondas y un sonicador, que fueron descritos en la sección 4.2. No fue necesario repetir con estas técnicas las extracciones con todos los solventes, pues la extracción que se realizó con etanol (E), fue la que presentó los compuestos de mayor interés, por lo que la extracción con MO y S, solo se realizó usando etanol como solvente.

	Muestra	Miligramos de extracto obtenidos	Rendimiento (% extracción)	Tiempo de extracción
Burns <i>et al.</i> 1984	E	1,630.5	16.3	72 horas
Sonicado	100	70.3	7.03	20 min
	66	49.6	4.96	
	40	45.6	4.56	
Microondas	1200 W	77.3	7.73	15 min
	600 W	94.5	9.45	
	300 W	50	5	

La extracción usando el microondas fue la más rápida de las tres técnicas, pues en 15 min se obtuvo el extracto y con un mejor rendimiento que el obtenido siguiendo la metodología descrita por Burn *et al.*, 1984 (**Tabla 8**). Por lo que el uso de microondas para extraer los compuestos de interés resultó ser una técnica rápida y eficiente ya que se usó diez veces menos muestra y se obtuvieron los mismos compuestos, además es una técnica novedosa pues no está reportada en la literatura para este tipo de compuestos. Aunque parecerá que el sonicado es una técnica a considerar, no resultó eficaz pues los % de extracción fueron los más bajos de las tres técnicas y los compuestos obtenidos en algunos casos no coincidían con los obtenidos previamente.

### 5.3 Caracterización por ensayos de colorimetría

Los resultados de la prueba o test de Shinoda se muestran en la **Figura 16** y **Tabla 9**.



Figura 16. Prueba de Shinoda para los compuestos extraídos con diferentes solventes. a) Colores antes de la reacción de Shinoda. b) Resultados obtenidos después de la reacción de Shinoda.

De los resultados obtenidos, se observa que los extractos tienen compuestos del tipo flavonas, flavonoles, isoflavonas, isoflavononas, chalconas y auronas (Domínguez, 1973; Sing de Ugaz, 1997) que justamente corresponde a lo reportado por otros autores que han logrado identificar compuestos de este tipo en el árbol de palo azul usando técnicas cromatográficas y de espectrografía (A. Ulises Acuña *et al.*, 2009; Alvarez & Delgado, 1999; Beltrami *et al.*, 1982; Burns *et al.*, 1984; Narvaez-Mastache, Garduño-Ramírez, Alvarez, & Delgado, 2006).

Tabla 9. Resultados de la prueba de Shinoda sobre los compuestos extraídos del árbol de palo azul.			
Solventes	Apariencia antes de la reacción	Apariencia después de la reacción	Posible compuesto químico presente
<b>Etanol</b>	Ligeramente amarillo	Amarillo	Flavonas y flavonoles o isoflavonas
<b>Metanol</b>	Sin color	Sin color	Isoflavononas, chalconas y auronas
<b>Metanol/Etanol (50%-50% (v/v))</b>	Sin color	Sin color	Isoflavononas, chalconas y auronas
<b>E-M-A (33%-33%-33% (v/v))</b>	Sin color	Sin color	Isoflavononas, chalconas y auronas

En los extractos, se observa que cuando se usó etanol como solvente, al inicio de la reacción se tiene una coloración verde-amarilla, lo cual podría indicar la presencia de compuestos del tipo flavonoides o flavonas, lo cual se confirma después de realizar la prueba de Shinoda. Por otro lado, los compuestos que se extrajeron con M, M-E y M-E-A, no presentan una coloración, ni antes, ni después de la reacción de Shinoda, lo cual podría indicar que se trata de compuestos del tipo flavonoide, pero de otro tipo como son isoflavonas, chalconas o auronas. El que no presenten una coloración, podría deberse a que estos compuestos no tienen un análogo antocianídico que tiene una coloración visible (**Figura 12**).

#### 5.4 Caracterización por espectroscopia UV-Vis de los compuestos de EP.

Los espectros UV-Visible de los polvos extraídos con diferentes solventes se muestran en la **Figura 17**.

De acuerdo a los valores de la **Tabla 4**, se puede apreciar que aparecen bandas características para compuestos del tipo isoflavonas, principalmente, lo cual es un resultado esperado, pues con la prueba de Shinoda ya se habían obtenido resultados preliminares de los tipos de compuestos presentes en los extractos obtenidos del duramen de palo azul.

El espectro UV-Vis del extracto obtenido usando E (panel A) y una mezcla A-M-E (panel D), presentan bandas en longitudes de onda muy similares, las cuales parecen corresponder con compuestos del tipo isoflavonoides. Sin embargo, en el



espectro UV-Vis del extracto A-M-E aparecen otras bandas que parecen indicar que se extrajeron compuestos del tipo chalconas. Los espectros UV-Vis de los compuestos extraídos con metanol (panel B) y con una mezcla metanol-etanol (panel C) no presentan las bandas I y II características de flavonoides de acuerdo con la **Tabla 4**, pero, varias bandas coinciden con las longitudes de onda de otros compuestos reportados, por ejemplo, por Álvarez, *et al.*, (1999), quienes reportaron compuestos del tipo chalconas con bandas muy similares a los obtenidos en el panel B y C.

Con la información anterior, no es posible elucidar si verdaderamente son los compuestos reportados los que se están obteniendo, ya que la extracción no es del todo “selectiva” y muy posiblemente se extrajeron otros compuestos, por lo que es importante separar y analizar los compuestos que componen a los extractos.

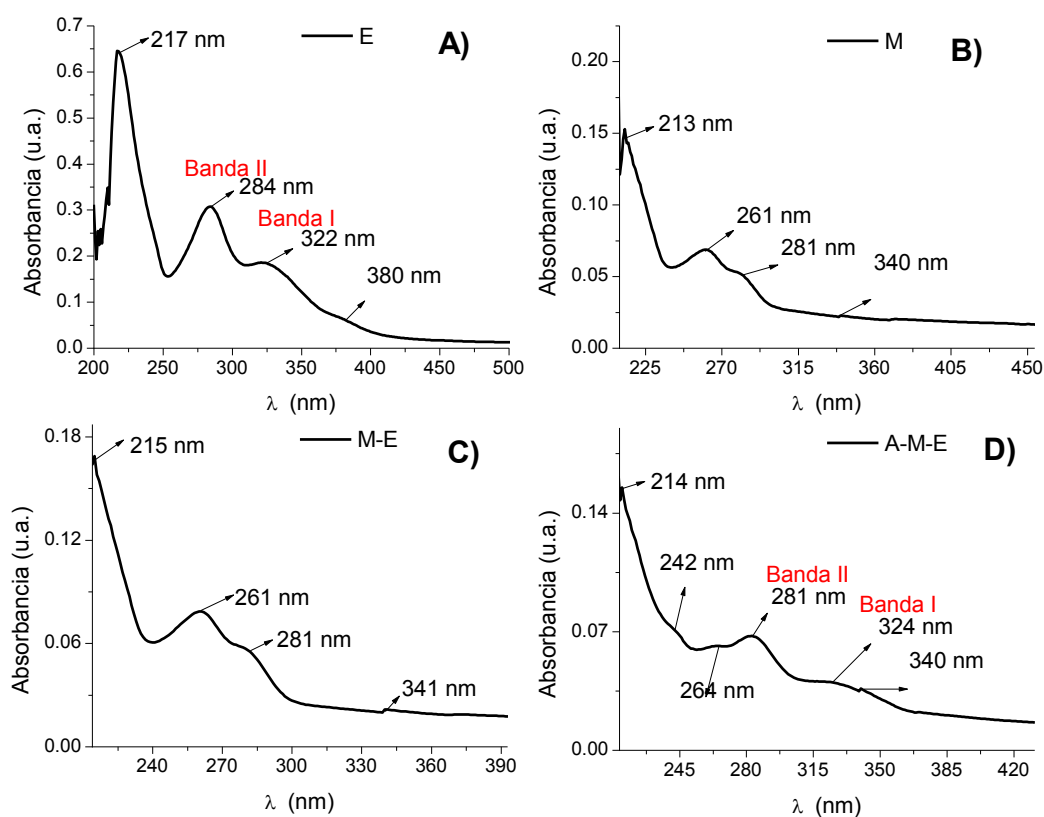


Figura 17. Espectros UV-Visible de los extractos de EP. A) Compuestos extraídos con etanol (E). B) Compuestos extraídos con metanol (M). C) Compuestos extraídos con una mezcla etanol-metanol. D) Compuestos extraídos con una mezcla agua-metanol-etanol.



Usando un microondas y un sonicador como métodos alternativos de extracción, se obtuvieron los metabolitos secundarios del duramen los cuales se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis marca PerkinElmer Lambda 25. Los espectros correspondientes a esas extracciones se observan en la **Figura 18**, y automáticamente se obtuvieron los valores en nanómetros de las posiciones de las bandas de las muestras analizadas con el equipo *Lambda 25*. Al comparar los espectros UV-Vis con la muestra E, que fue la muestra que presentó los compuestos de interés, se encontró que usando el equipo de microondas a 1200 W (MO1200) se obtuvo un espectro muy parecido al obtenido con la extracción reportada por Burns *et al.*, (1984), pues sus bandas se encuentran en posiciones casi idénticas a las de dicha muestra. Las diferencias que se aprecian entre el espectro de la Figura 17 y la Figura 18 de la muestra E, puede deberse posiblemente al equipo, pues la misma muestra se analizó en equipos diferentes, pero usando el mismo solvente.

El análisis de los espectros UV-Vis corroboró que con el uso del microondas se obtuvo una extracción más eficiente, pues en 15 minutos se lograron extraer los compuestos de interés.

Ahora bien, considerando que de acuerdo a la polaridad que pueden presentar diferentes moléculas o compuestos presentes en las plantas, es posible extraerlos utilizando solventes con una polaridad semejante a la que presentan. De acuerdo a los resultados obtenidos usando un microondas como medio para extraer, fue importante aprovechar esta técnica y se optó por extraer compuestos del duramen usando diferentes solventes, como se explicó en la sección 4.1, para obtener sus espectros UV-Vis y así identificar bandas características que nos permitan tener un tipo de “huella” de los compuestos presentes en EP basado en su polaridad.

En la **Figura 19**, en el primer panel (A), se obtuvo el espectro UV-Vis de los compuestos extraídos con hexano. Las principales bandas que se encontraron fueron a 220, 272, 283 y 379 nm y este espectro podría servir como referencia para identificar compuestos del tipo no polar presentes en el árbol de EP. Estos compuestos no polares pueden ser del tipo graso o incluso agliconas de flavonoides altamente metoxiladas (Cartaya & Reynaldo, 2001; Gracia Nava, 2006).

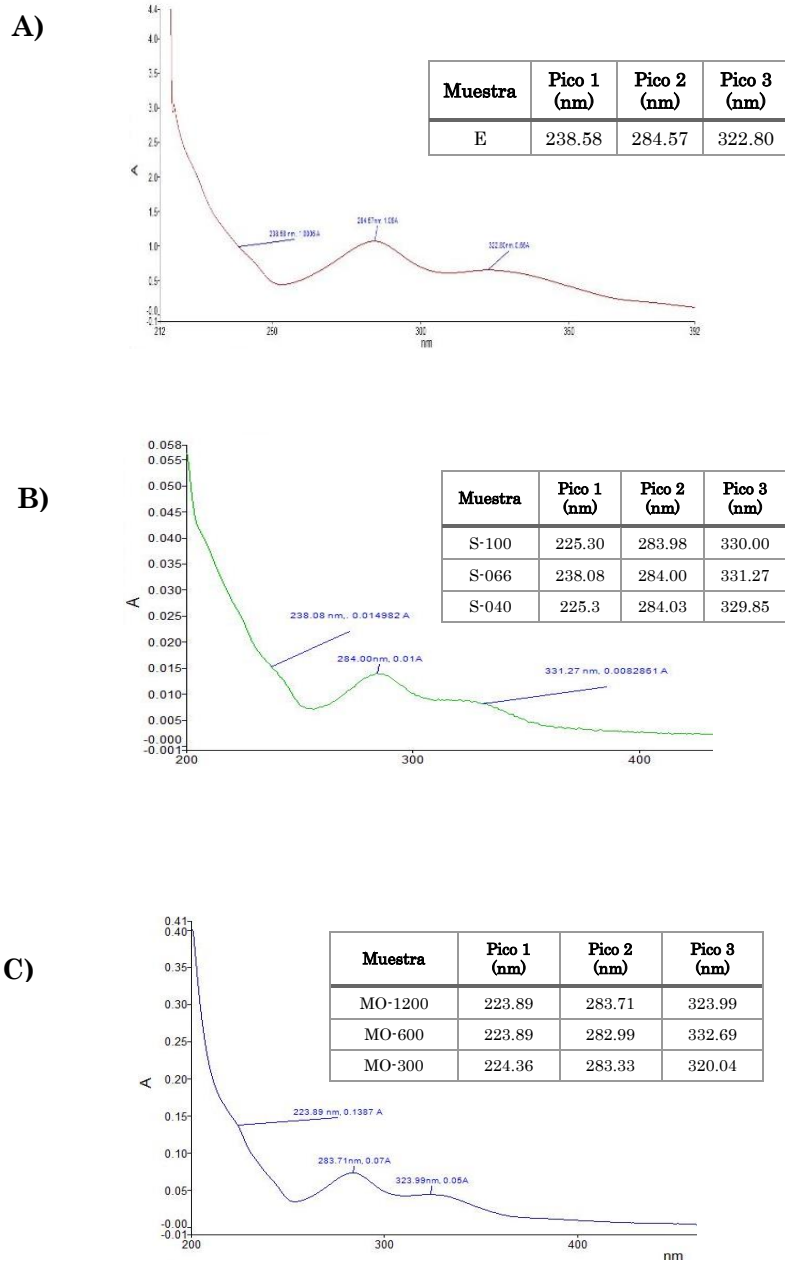


Figura 18. Espectros, con insertos de tablas, de los extractos obtenidos utilizando el método de Burns *et al.*, (1984) (A), sonicado (B) y microondas (C). El espectro del panel A corresponde al extracto E. El espectro del panel B corresponde a la muestra S-066 y el espectro del panel C corresponde a la muestra MO-1200. En todos los casos, en el eje de las abscisas se encuentra graficada la longitud de onda en nanómetros (nm) y en el eje de las ordenadas se encuentra graficada la Absorbancia en unidades arbitrarias. Los insertos de tablas, resumen para cada caso las bandas características que se obtuvieron en cada tratamiento.

En el segundo panel, (B), se muestra un espectro UV-Vis con bandas en 281, 319 y 358 nm, el solvente utilizado fue acetato de etilo y este es un disolvente polar

aprótico, el cual no puede formar enlaces de hidrógeno con el soluto. Las bandas que muestra este espectro, pueden corresponder, de acuerdo con la tabla 3 y 4, a compuestos del tipo isoflavonas y dihidroflavonoides.

En el panel C, se muestra el espectro Uv-Vis obtenido usando metanol como solvente, el cual es un solvente prótico, presenta bandas a 202, 222, 283, 320 y 386 nm. Nuevamente, y tomando como referencia la tabla 8 y 10, se podría asociar esas bandas a compuestos del tipo isoflavonoides y chalconas. En este espectro es importante notar que tiene un valor de absorbancia considerable (1.1 unidades arbitrarias, ua) bajo las mismas condiciones que los espectros obtenidos con los otros solventes, esto podría indicar que estos compuestos son los que están presentes, en mayor proporción en la madera. El último espectro UV-Vis, ubicado en el panel C, fue obtenido usando agua como disolvente y de acuerdo con la Tabla 4 estas bandas corresponden a compuestos del tipo isoflavonoides.

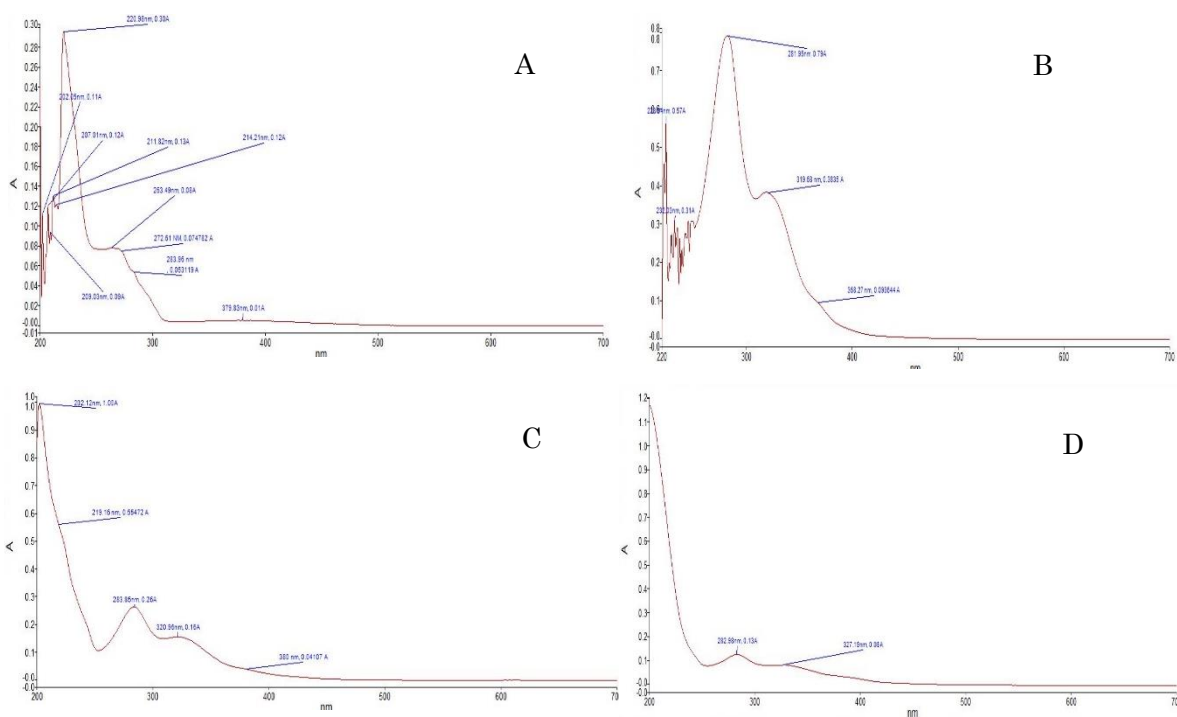


Figura 19. Extracción secuenciada de compuestos de EP usando diferentes solventes. A) Extracción con hexano. B) Extracción con acetato de etilo. C) Extracción con metanol. D) Extracción con agua destilada. En cada espectro está graficado en el eje de las abscisas la longitud de onda en nanómetros y en el eje de las ordenadas la absorbancia en unidades arbitrarias.

Por lo tanto, los espectros obtenidos en la **Figura 19**, pueden servir como una referencia futura para identificar compuestos extraídos con solventes de diferente polaridad resultando en una extracción más específica de compuestos naturales de interés del duramen de EP bajo condiciones controladas y usando un microondas.

Los espectros UV-Vis de los extractos E, M, E-M y A-M-E en diferentes condiciones de pH se muestran en la **Figura 20**.

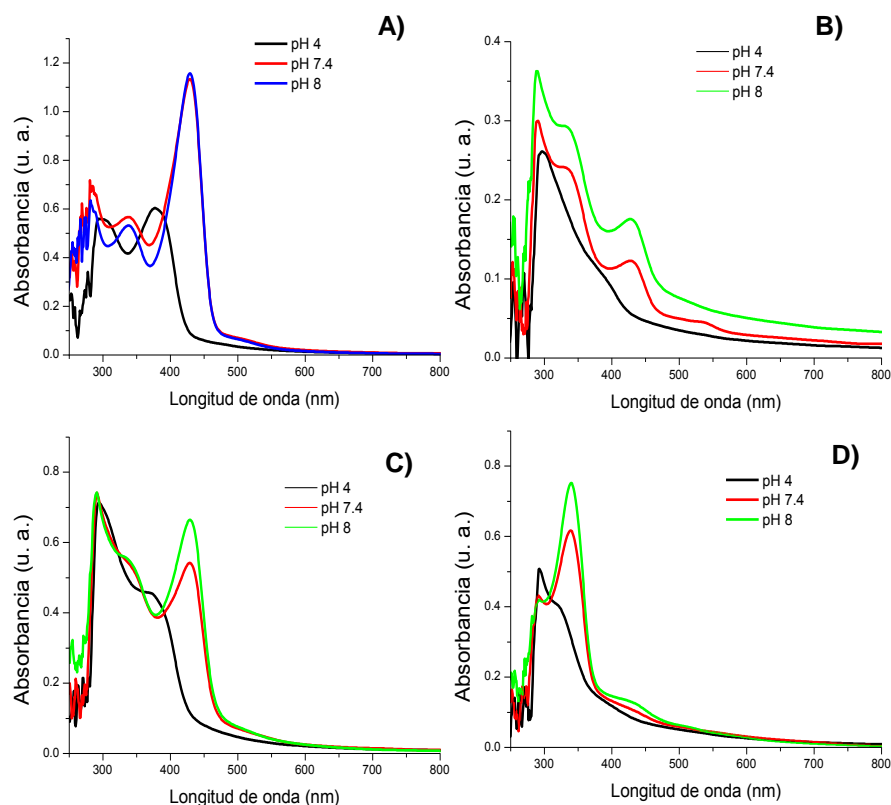


Figura 20. Espectros UV-Vis de los extractos de los compuestos de palo azul a diferentes pH. A) Compuestos extraídos con E; B) Compuestos extraídos con M; C) Compuestos extraídos con M-E; D) Compuestos extraídos con A-M-E. En todos los casos, la línea negra corresponde a un pH de 4, la línea roja a un pH de 7.4 y la línea verde a un pH de 8.

El espectro del extracto usando etanol como solvente y en condiciones de pH igual a 7.4 (Figura 20, panel A), muestra dos picos, uno a 280 nm y otro a 429 nm, que, de acuerdo a la literatura, corresponden a la Matlalina, el cual se reporta como uno de los compuestos responsables del fenómeno de fluorescencia, por lo que

puede decirse que en ese extracto está presente ese compuesto. El pico adicional que se está obteniendo, puede deberse a que estos compuestos no están “separados”, pues es posible que se estén extrayendo otros compuestos diferentes a los de interés.

Tabla 10. Principales bandas encontradas en los compuestos extraídos del árbol de palo azul a diferentes pH y valor del coeficiente de extinción molar (Log $\epsilon$ ).										
Muestra	pH 4			pH 7.4			pH 8			Coeficiente de extinción molar a pH 7.4
	Bandas (nm)			Bandas (nm)			Bandas (nm)			
<b>E</b>	290	377	---- -	<b>280</b>	338	<b>429</b>	<b>280</b>	338	<b>430</b>	$3.24 \pm 0.002$
<b>M</b>	297	393	---- -	290	330	429	289	330	428	$2.8 \pm 0.004$
<b>M-E</b>	295	371	---- -	291	345	429	291	335	429	$2.84 \pm 0.002$
<b>E-M-A</b>	293	322	---- -	291	330	-----	292	330	-----	$2.88 \pm 0.003$

En la Tabla 10, se muestran un resumen de las bandas con sus respectivas longitudes de onda, de los diferentes extractos a diferentes pH. Así mismo, se muestran los valores que se obtuvieron del coeficiente de extinción molar para cada uno, el cual definen cuan fuertemente una sustancia absorbe la luz a una dada longitud de onda.

Con base en la información obtenida del experimento, se llegó a la conclusión de que era necesario separar los compuestos provenientes del extracto E pues presentó compuestos de interés y el resto del trabajo se enfocó en separar y caracterizar sus compuestos usando cromatografía en placa y cromatografía en columna.

## 5.5 Determinación de compuestos con grupos OH libres de los extractos de EP

En la Figura 21, se muestran los espectros Uv-Vis de los diferentes extractos, obtenidos con diferentes solventes, después de agregar acetato de sodio.

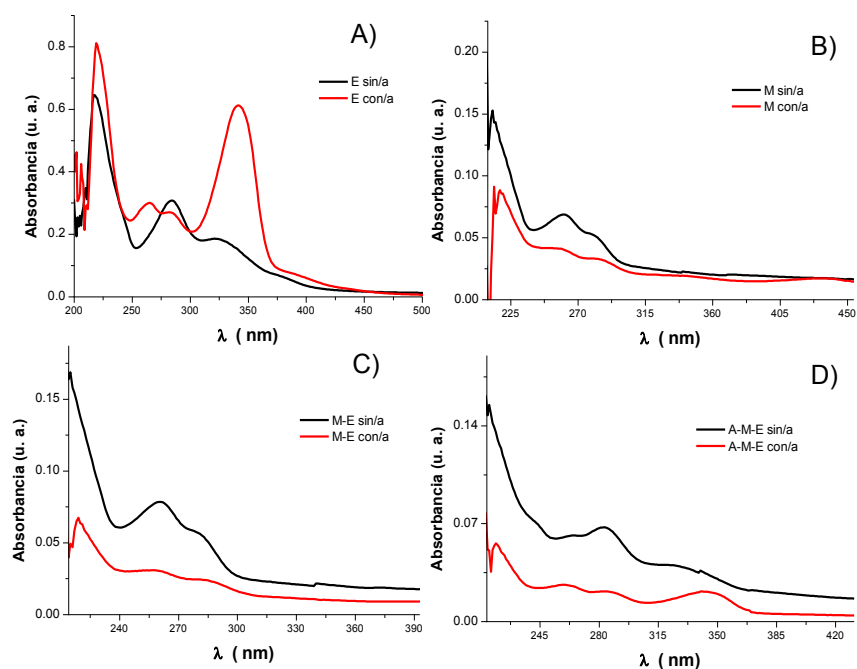


Figura 21. Espectros de los extractos E, M, M-e y A-M-E en etanol (línea negra) y con acetato de sodio (línea roja). En el panel A) se encuentra el extracto obtenido con etanol, en el panel B) el extracto obtenido con metanol, en el panel C) el extracto obtenido con una mezcla metanol-etanol y en el panel D) el extracto obtenido con una mezcla agua-metanol-etanol. En el eje de las abscisas está graficada la longitud de onda en nanómetros y el eje de las ordenadas está graficada la absorbancia en unidades arbitrarias.

Muestra	Sin acetato				Con acetato			
	Bandas (nm)				Bandas (nm)			
<b>E</b>	217	284	322		220	264	284	343
<b>M</b>	213	261	281	340	218	256	284	339
<b>M-E</b>	215	261	281	341	218	259	286	
<b>E-M-A</b>	214	264	281	340	219	259	287	346

En análisis de los espectros Uv-Vis de los extractos M, ME y A-M-E dio como resultado que no hay cambios apreciables en los espectros al agregar el acetato de sodio, sin embargo, en los espectros de la muestra E, se aprecian algunos cambios en las longitudes de onda de los principales picos. De acuerdo a la

literatura consultada, parece que estos cambios en las longitudes de onda de los principales picos, corresponden a compuestos con grupos OH libres de isoflavonoides, ya que los corrimientos fueron hacia longitudes de onda mayores. Esto parece coincidir con los resultados preliminares, ya que el etanol es un disolvente polar y hubo un corrimiento batocrómico. Por lo tanto, al parecer, los compuestos del extracto E son del tipo polar y aparentemente tienen grupos OH libres, o por lo menos en la posición 7- del isoflavonoide. En este experimento, no se obtuvo un espectro diferente al obtenido en la **Figura 21**, después de agregar el hidróxido de sodio ni se observó una banda entre 400 y 450 nm.

## 5.6 Caracterización de los compuestos de EP por espectroscopía Raman.

Como se mencionó en la metodología, de los 4 extractos se obtuvo un espectro de fotoluminiscencia usando espectroscopia Raman, siendo el extracto E el extracto que presentó mayores cuentas de fluorescencia y con respecto a los otros extractos fue el que se analizó a detalle, con la intención de cuantificar el decaimiento de la fotoluminiscencia y para obtener otros parámetros importantes como es el desplazamiento de Stokes.

La prueba se realizó disolviendo los diferentes compuestos extraídos a pH 4 (ácido), pH 7.4 (fisiológico) y pH 8 (básico) con el fin de identificar longitudes de onda donde se emite con mayor intensidad (picos característicos), la máxima intensidad de los compuestos en cada pH, cuantificar la pérdida de fotoluminiscencia y el desplazamiento de Stokes. El mayor interés se presentó a pH 7.4 (fisiológico), ya que como este es el pH al que normalmente se encuentra las células, fue importante cuantificar cual podría ser el comportamiento de estos compuestos dentro de un “ambiente” normal para una célula. El tiempo total del experimento para cada extracto a diferente pH fue de 1000 segundos (17 min aproximadamente).

Los espectros de fotoluminiscencia a diferentes pH del extracto E se muestran en la **Figura 22**. Los espectros muestran una banda bien definida a 563 nm con una intensidad máxima de 12 000 unidades arbitrarias a pH de 4, 542 nm con una intensidad máxima de 40 000 unidades arbitrarias a pH 7.4 y 545 nm con una intensidad máxima de 60 000 unidades arbitrarias a pH 8. Tomando como referencia las 60 000 unidades arbitrarias que se tuvieron a pH 8 como el máximo, se puede decir que las 40 000 unidades arbitrarias a pH 7.4 representan el 67 % del valor máximo y que las 12 000 cuentas registradas a pH 4 son el 20

% de las cuentas registradas a pH 8. De igual manera se observó que a pH 7.4 decayeron las cuentas un 33%, mientras que a pH 4 decayeron un 80 % con respecto a pH 8. Esto resultó congruente con lo revisado anteriormente en la literatura y el experimento previo que se realizó (tabla 5), y se puede concluir que la intensidad de la fluorescencia depende fuertemente del pH.

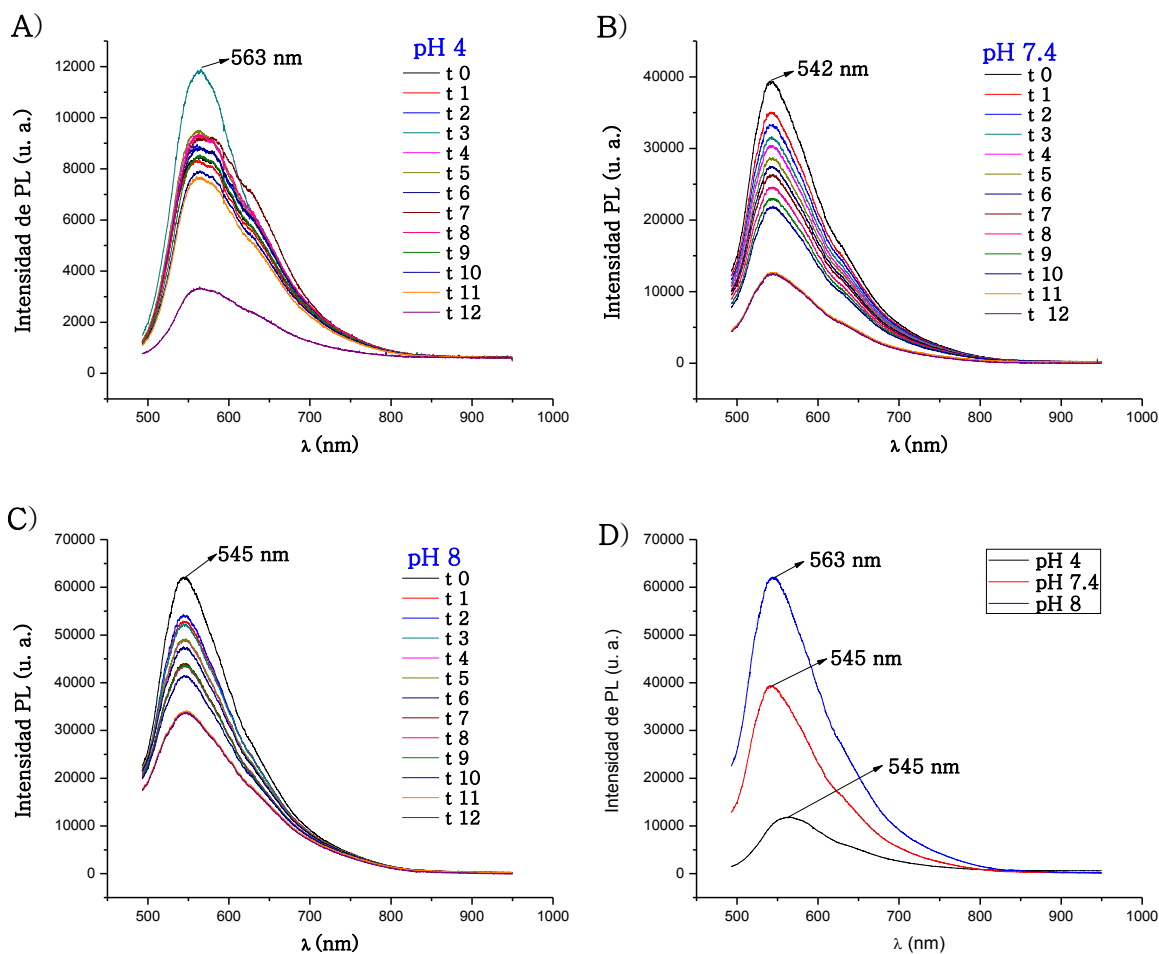


Figura 22. Espectros Raman del extracto E a diferentes pH. En el panel A) se muestra el espectro del extracto a pH 4, en el panel B) se muestra el espectro del extracto a pH 7.4 y en el panel C) se muestra el espectro del extracto a pH 8. En el panel D) se muestra un espectro comparativo de las máximas intensidades del extracto a diferentes pH. En el eje de las abscisas se grafica la longitud de onda y en el eje de las ordenadas la intensidad de fotoluminiscencia en unidades arbitrarias.



La dependencia de la fluorescencia con el pH, puede deberse al equilibrio proteolítico que existe en la Matlalina, que puede ser la especie dominante en el extracto, donde el di-anión formado por los grupos OH y el CO<sub>2</sub>H se encuentran ionizados (A. Ulises Acuña et al., 2009).

Teniendo los espectros de emisión (Figura 22) y los espectros de absorción (Figura 20) es posible determinar un parámetro que puede llegar a dar información con respecto a cambios de energía que pueden existir entre dos mismos niveles de energía.

En la Figura 23, se muestran los espectros de emisión y absorción del extracto E a diferentes pH y se muestra el desplazamiento de Stokes que es la diferencia de longitudes de onda de los picos máximos. El máximo desplazamiento de Stokes lo tiene el extracto a pH 4 (con 185 nm), mientras que a pH de 7.4 y 8 se mantiene el mismo desplazamiento y esto concuerda con lo reportado por Han y Burgess (2010) al analizar compuestos fluorescentes a diferentes pH.

El corrimiento de los espectros de emisión, con respecto a los de absorción, a energías menores (mayor longitud de onda), es debido a que los electrones que están en un estado excitado pasan a un estado menos excitado sin regresar toda la energía que absorbieron, por lo que no toda la energía es emitida, dando lugar a procesos de transiciones electrónica y no transiciones entre estados vibracionales o rotacionales de la molécula (Uoyama, Goushi, Shizu, Nomura, & Adachi, 2012). Cuando el desplazamiento de Stokes es pequeño, se producen las absorciones y emisiones a energías muy parecidas, mientras que en el caso de interacciones fuertes el desplazamiento de Stokes puede ser muy grande (ejemplo: con absorciones en el visible y emisiones en el infrarrojo) (L. Wang, Zhao, & Tan, 2008).

El desplazamiento de Stokes ha servido como un parámetro para determinar si alguno cromóforos tienen potencial para su uso en bioimágenes y es ampliamente reportado para diferentes compuestos, como las auronas (Shanker, Dilek, Mukherjee, McGee, & Bane, 2011), o la rodamina, que es uno de los cromóforos más usados (Anedda, Carbonaro, Clemente, & Corpino, 2005).

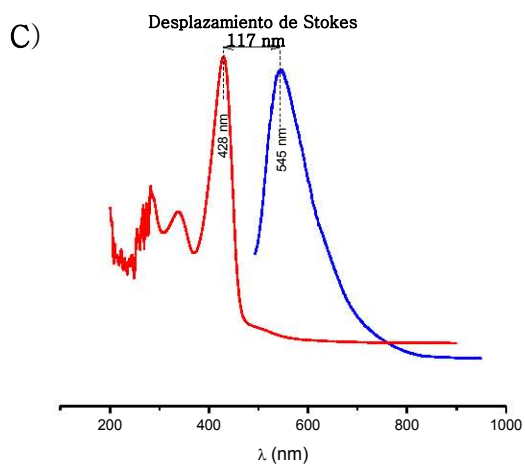
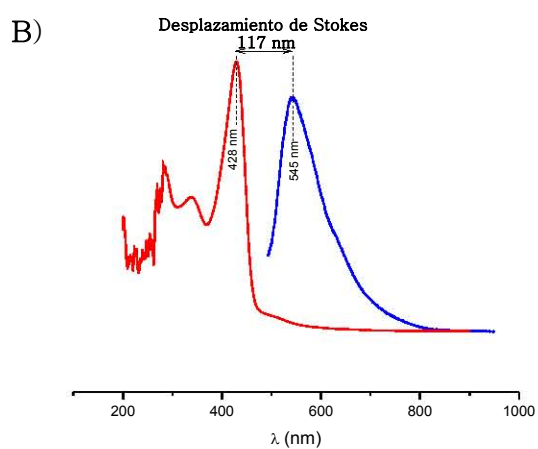
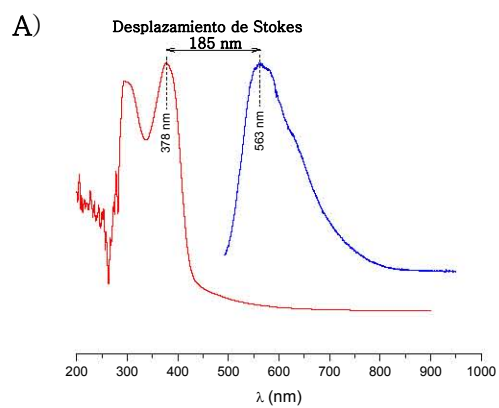


Figura 23. Desplazamiento de Stokes. Espectros de absorción y de emisión del extracto E a pH 4 (panel A)), pH 7.4 (panel B)) y pH 8 (panel C)).

En la **Figura 24**, se muestra el espectro donde se puede apreciar cómo decae la fotoluminiscencia con el tiempo y como depende este fenómeno del pH. Además, se muestran con líneas sólidas los mejores ajustes para modelar los puntos obtenidos de los espectros de la **Figura 25**.

De estos ajustes se obtuvieron ecuaciones particulares para cada extracto en cada uno de los pH, estas ecuaciones junto con sus parámetros se encuentran resumidos en la **Tabla 12**. El modelo de ecuación que mejor se ajustó a los datos a un pH de 4 fue un ajuste lineal, mientras que a un pH de 7.4 y 8 el mejor ajuste se obtuvo con una ecuación exponencial.

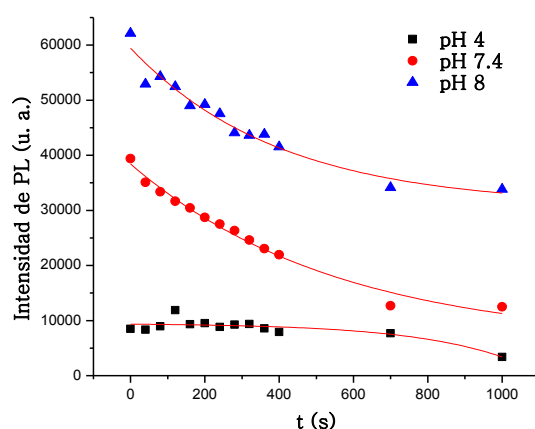


Figura 24. Espectro fotoluminiscente del extracto E a diferentes pH. En el espectro se puede apreciar la dependencia de la fotoluminiscencia con el pH y el decaimiento de fotoluminiscencia con el tiempo. En el eje de las abscisas se grafica el tiempo en segundos y en el eje de las ordenadas se grafica la intensidad de la fotoluminiscencia en unidades arbitrarias.

Tabla 12. Ecuaciones características del extracto E con sus correspondientes parámetros y % de pérdida de fotoluminiscencia.				
Muestra	Ecuación	Parámetros	$R^2$	Pérdida de fotoluminiscencia
E-pH 4	$PL_i = mt + (PL)_0$	$m(s^{-1}) = -2.223$ $(PL)_0$ es el valor para $t = 0$	0.90	60%
E-pH 7.4	$PL_i = (PL)_0 e^{(-kt)}$	$k(s^{-1}) = 0.001641$ $(PL)_0$ es el valor para $t = 0$	0.98	69%
E-pH 8	$PL_i = (PL)_0 e^{(-kt)}$	$k(s^{-1}) = 0.002572$ $(PL)_0$ es el valor para $t = 0$	0.95	46%

Utilizando los valores de máximo y mínimo fue posible calcular la pérdida de fotoluminiscencia del extracto, encontrándose que en el mismo tiempo a un pH de 8 se pierde, aproximadamente, la mitad de las cuentas de fotoluminiscencia,

por lo que se deduce que en un pH básico los compuestos del extracto E son estables. A pH 7.4 los compuestos presentan una pérdida significativa, ya que más de la mitad de las cuentas se pierde, pero considerando el tiempo de exposición y la energía con la que son excitados estos compuestos, nos da pauta para suponer que en un ambiente menos agresivo, como el ambiente de la célula estos compuestos pueden dar la respuesta que se espera.

### 5.6.1 Modelado matemático de moléculas fluorescentes

La teoría del funcional de densidad (DFT) es una de las mejores teorías para explicar la estabilidad química y la reactividad de las moléculas.

En primer lugar, se obtuvieron las estructuras geométricas optimizadas de las moléculas de aurona, flavona, isoflavona y matlalina (**Figura 25**). Después de eso, se obtuvo la energía de unión, el orbital molecular más alto ocupado (HOMO) y el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO). La brecha HOMO-LUMO es un índice importante para la reactividad química de las moléculas. La energía de unión de las moléculas se correlaciona con la energía de la brecha HOMO-LUMO. La isoflavona es la molécula con la brecha HOMO-LUMO más alta y la auronas la molécula más estable, debido a que la energía de unión es menor que las otras moléculas. Sin embargo, otras moléculas pueden estar presentes, por ejemplo, la matlalina que su energía de unión y HOMO-LUMO gap son casi similares a la molécula aurona.

La energía de la brecha HOMO-LUMO podría indicar las longitudes de onda que el compuesto puede absorber y estos valores calculados de gap HOMO-LUMO indicaron que las emisiones fluorescentes están en el azul y el verde visible. Los huecos HOMO-LUMO calculados están muy próximos a los observados experimentalmente en las **Figuras 18 y 21**. La **Figura 26**, muestra las distribuciones de orbitales moleculares HOMO y LUMO para las moléculas aurona, flavona, isoflavona y matlalina.

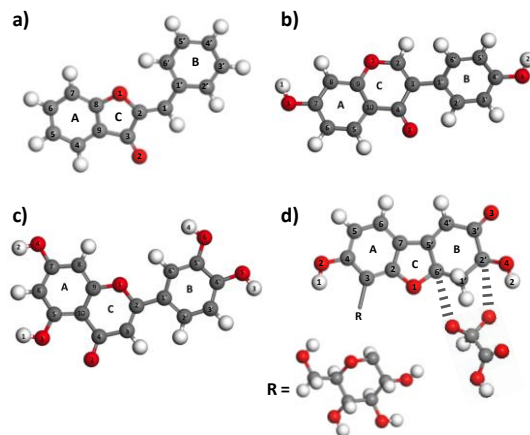


Figura 25. Modelos de estructura para las moléculas de: a) aurona, b) flavona, c) isoflavona and d) matlalina.

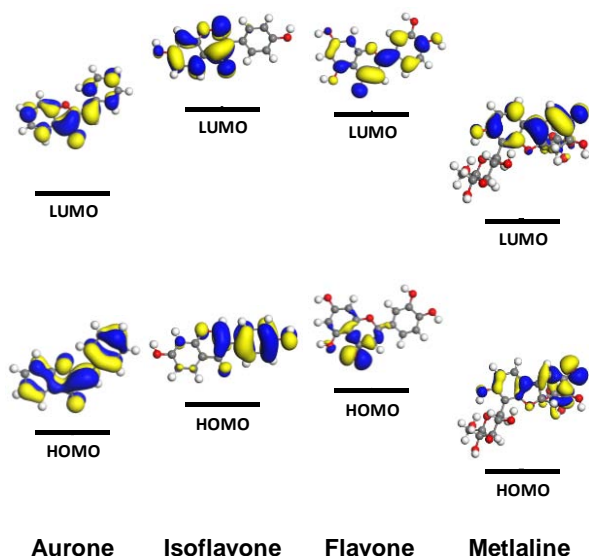


Figura 26. Diagrama de los niveles de energía HOMO-LUMO para las diferentes moléculas.

El HOMO de la isoflavona se localiza principalmente sobre el anillo B, mientras que el LUMO se localiza sobre los anillos A y C. La transición HOMO-LUMO se localiza sobre el grupo C = O. La distribución electrónica de carga de las posiciones HOMO, C (3) C (2) y C (5 ' ) C (4') tiene carácter de unión, mientras que C (2 ' ) C (1'), O (4) y O (1) tienen carácter anti-unión. Con respecto a la distribución electrónica de la carga de LUMO, las posiciones C (8) C (9), O (2) y C (2) tienen carácter de enlace, mientras que C (6) C (7), O (1) y C (10) C (4) tienen carácter anti-unión. En el caso de la flavona, el HOMO se localiza sobre

el anillo C principalmente sobre el grupo C = O. El grupo carbonilo tiene un carácter de unión con una densidad de electrones mayor.

Un punto interesante es que el LUMO se localiza casi uniforme sobre la molécula, la distribución electrónica de carga de LUMO se encuentra en C (5) C (10), O (2) y C (2) C (1 ') de las posiciones de unión, mientras que C (4) C (3), O (1) y C (6) C (7) tienen carácter anti-unión. Es interesante observar que LUMO de ambas moléculas, isoflavona y flavona, muestra mayor densidad de electrones en O (2), que favorecen la transferencia de electrones en el estado excitado. Para la molécula aurona, el HOMO y el LUMO se localizan homogéneos. Finalmente, en la molécula de matlalina, el HOMO y el LUMO se localizan sobre el anillo B, principalmente sobre el grupo C = O.

Los niveles de HOMO y LUMO de la molécula matlalina son reducidos en comparación con las otras moléculas, y también, la brecha HOMO-LUMO es ligeramente menor, consistente con la tendencia observada en las propiedades de fluorescencia. Por lo tanto, la fluorescencia de la molécula matlalina debe originarse con una pequeña excitación o perturbación, con lo que se podría justificar que existe un desplazamiento de Stokes, relativamente pequeño (< 150 nm).

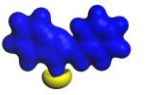
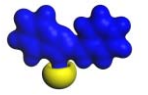
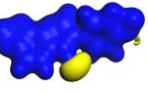
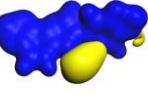
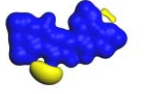
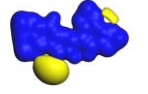
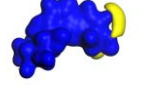
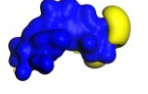
Molecule	Electrostatic Potential	
	<i>Vacuum</i>	<i>Methanol</i>
Aurone		
Isoflavone		
Flavone		
Matlaline		

Figura 27. Potencial electrostático para las moléculas de: aurona, flavona, isoflavona y matlalina.

Se realizaron simulaciones de las moléculas con diferentes disolventes como metanol, etanol y mezcla de metanol / etanol utilizando el programa COSMO

(COnductor-like Screening MOdel) implementado en DMol3. En todas las moléculas, la presencia del disolvente no afectó su geometría; Sin embargo, se observaron ligeros cambios en el HOMO, LUMO y propiedades electrostáticas. En el caso de las moléculas de isoflavona y flavona, se invirtieron los mapas electrónicos del HOMO y del LUMO, es decir, los mapas de electrones positivos en vacío ahora son mapas de electrones negativos. Por lo tanto, esto no causó un cambio en la brecha HOMO-LUMO y por lo tanto la energía de emisión fue casi similar. Así mismo, con respecto al potencial electrostático, las simulaciones de las moléculas con los diferentes disolventes mostraron un aumento con respecto a los valores negativos comparados con las moléculas en vacío.

La Figura 27, sólo muestra el potencial electrostático calculado en vacío y metanol como disolvente de las diferentes moléculas. De la figura, el color azul indica valores positivos y el color amarillo indica valores negativos. El potencial electrostático negativo se localiza principalmente sobre el grupo C = O en todas las moléculas. Por lo tanto, el uso de estos disolventes en las soluciones puede mejorar la estabilidad y la emisión de las moléculas.

Los resultados mostrados en esta sección, son de gran relevancia, ya que no se encuentra nada reportado en la literatura con respecto a estudios o análisis de este tipo en compuestos naturales y esto alienta a que lo que se obtuvo puede ser utilizado como estándar o como referencia de los compuestos presentes en EP, así como un aporte de datos característicos de los compuestos presentes en el arbusto. Además, para futuros trabajos donde se centre el interés en obtener parámetros característicos de compuestos fluorescentes provenientes de plantas u otra fuente, este trabajo puede considerarse como un ejemplo de cómo obtener ciertos datos relevantes o característicos de algún compuesto particular o de interés.

## 5.7 Análisis de los compuestos de EP por FTIR

Para este trabajo, los espectros obtenidos de los extractos, como se mencionó anteriormente, no son “puros” y de ahí que el análisis a los espectros fue más elaborado, sin embargo, se lograron identificar posiciones características de frecuencias pertenecientes a compuestos del tipo flavonoide.

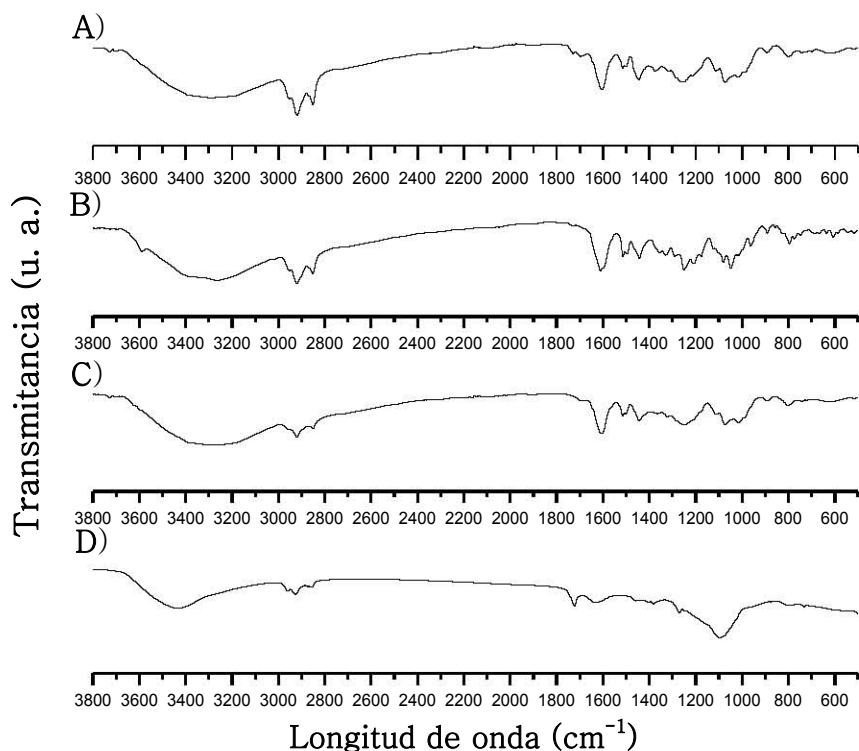


Figura 28. Espectros FTIR de los extractos de: A) Etanol, B) Metanol, C) Metanol-Etanol y D) Metanol-Etanol-Agua. En el eje de las abscisas se encuentra graficada la longitud de onda en  $\text{cm}^{-1}$  y en el eje de las ordenadas se encuentra graficada la Transmitancia en unidades arbitrarias.

En la **Figura 28**, se muestran los 4 espectros de los 4 extractos. Para realizar este análisis se partió del supuesto de que los compuestos presentes en los extractos son como las moléculas de las figuras **10**, **11** y **25** (C y D), por lo que se buscaron bandas representativas de enlaces del tipo OH, C=O y anillos aromáticos principalmente.

Las vibraciones del grupo hidroxilo son probablemente las más sensibles, por lo que las especies ligadas a hidrógeno muestran una pronunciada variación en la longitud de onda de una banda espectral, como la intensidad y forma de la banda y la posición de la frecuencia de los máximos de la banda. En la región de  $3600$  a  $3100 \text{ cm}^{-1}$ , se ubican los grupos OH provenientes de alcoholes y ácidos carboxílicos, así como aminas y alquinos terminales. Las bandas producidas por ácidos carboxílicos también son amplias, pero se desplazan hacia los  $3000 \text{ cm}^{-1}$  (Domínguez, 1973; Skoog et al., 2008). Las bandas producidas por los alcoholes son anchas y redondas, como los mostrados en la figura 26 y se ubican alrededor



de los  $3300\text{ cm}^{-1}$ . El grupo OH libre se absorbe fuertemente en la región  $3600\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la existencia de enlace de hidrógeno puede reducir el número de onda de estiramiento de O-H a la región de  $3550\text{ - }3200\text{ cm}^{-1}$  con un aumento en la intensidad y amplitud (H. Singh et al., 2014). Las bandas obtenidas entre  $3400\text{ a }1900$  se asignan a la vibración de estiramiento del grupo OH. Este tipo de banda lo exhiben compuestos con la estructura característica de ABC de complejos fuertes unidos por hidrógeno como la 2', 6'-dimetoxiflavona (Oyvind & Markhama, 2006). De acuerdo con la sección 3.4.1, mediante UV-Vis, se había concluido que los extractos estaban en su mayoría con grupos OH libre y con estos espectros parece confirmarse lo encontrado anteriormente.

Los espectros A), B) y C) de la figura 26, tienen una banda definida a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , que de acuerdo a la literatura podría corresponder con un modo vibracional del C=O (Domínguez, 1973; Oyvind & Markhama, 2006; Skoog et al., 2008), que se encuentra presente en la estructura de un flavonoide o incluso con el grupo carboxilo de la matlalina. Posiblemente, en el espectro A) de la figura 26 no se aprecia un pico más agudo que es característico de los ácidos carboxílicos y esto es debido posiblemente a que el extracto es una mezcla.

En las regiones de  $3100\text{ a }2800\text{ cm}^{-1}$  y entre  $1600\text{ y }1800\text{ cm}^{-1}$ , se ubican bandas o picos que son característicos de los grupos aromáticos (Domínguez, 1973; Skoog et al., 2008). Éstos son en su mayoría picos cortos, definidos y estrechos y de acuerdo con la figura 26, se pueden apreciar estos picos, en las regiones mencionadas. Por lo que se puede concluir que los compuestos analizados, posiblemente tengan grupos aromáticos sustituidos, con lo que podría decirse que estos espectros corresponden a compuestos del tipo isoflavonoides como se había propuesto.

## 5.8 Separación de los compuestos de EP por cromatografía en capa fina y en columna.

Las placas de cromatografía, así como algunas de las fracciones obtenidas se muestran en la **Figura 29**.

Utilizando la cromatografía en capa fina (CCF), se fue determinando que solvente debía usarse para eluir los compuestos hasta una retención de 0.5. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta, se lograron visualizar los compuestos que presentan fluorescencia.

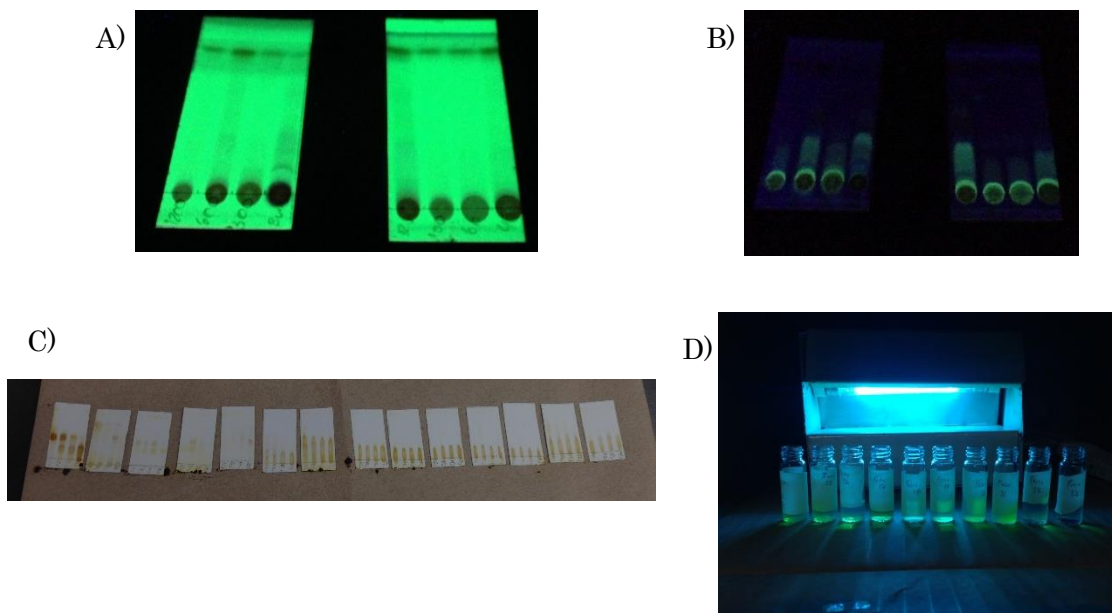


Figura 29. A) Placas de CCF a 254 nm. Se logró separar los compuestos no polares y se muestran las bandas similares para las extracciones obtenidas. B) Placas de CCF a 365 nm. Separación de compuestos que presentan fluorescencia. C) Set de fracciones que presentaron las mismas bandas. D) Fluorescencia de algunas de las fracciones extraídas. En la imagen se aprecia de la fracción 19-23.

Usando CCF y CCC se lograron separar 70 fracciones, de las cuales algunas presentaron los mismos corrimientos en CCF y ese conjunto de fracciones formaron un set o grupo de fracciones (**Figura 29, C**). Cada set de fracciones, correspondió a un compuesto individual, de los cuales se obtuvieron 9 compuestos individuales y solo algunos presentaron fluorescencia. Estos datos se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Compuestos individuales separados de EP mediante CCF y CCC		
Grupo	Set de Fracciones	Fluorescencia
G1	F1-F8	NO
G2	F9-F16	SÍ
G3	F17-F20	SÍ
G4	F21-F24	SÍ
G5	F25-F35	SÍ
G6	F36-F48	SÍ
G7	F49-F53	NO
G8	F54-F60	NO
G9	F61-F70	NO

De los 9 grupos de fracciones, el grupo G5, compuesto de 10 de las 70 fracciones obtenidas, tuvo espectros Uv-Vis muy interesantes y se sugirió se analizará por medio de resonancia magnética nuclear.

### 5.8.1 Caracterización por UV-Vis de los grupos de las fracciones obtenidas

La Figura 30, muestra los espectros de los 9 grupos asociados con las fracciones separadas del extracto E.

La mayoría de los compuestos encontrados en el extracto E, son del tipo isoflavonoides y chalconas, de acuerdo a lo reportado en la literatura. Además, los espectros mostrados solo muestran las bandas características de los compuestos, sin presentarse otra banda o pico adicional que pudiera estar presente. Esto ayudó a identificar los compuestos presentes de manera rápida y sin ambigüedades, pues solo se muestran las bandas pertenecientes a estos compuestos.

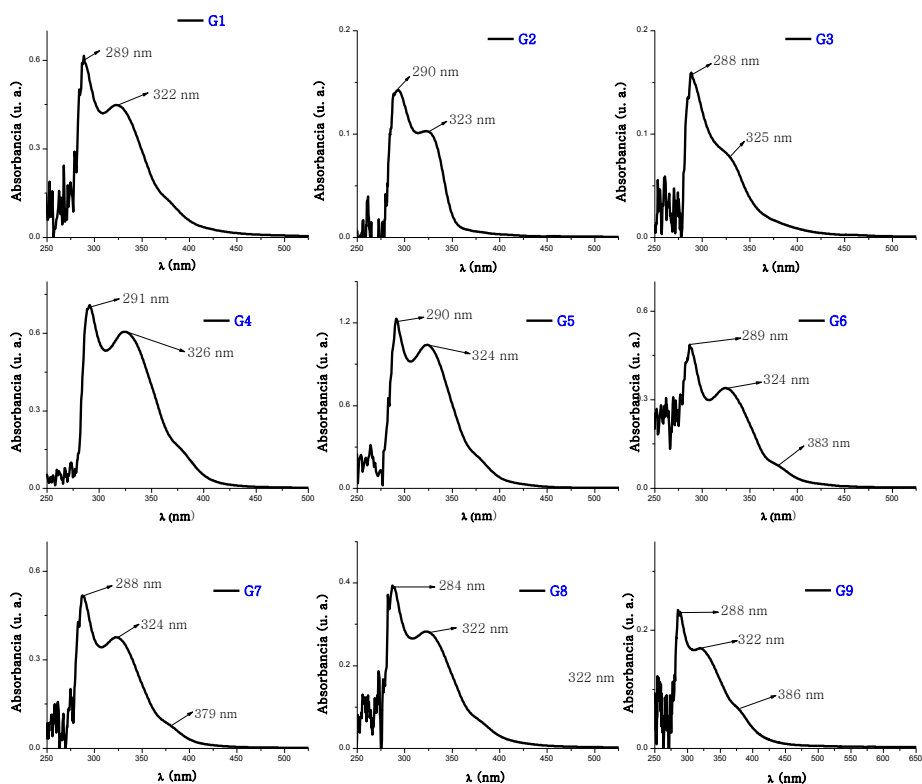


Figura 30. Espectros de los compuestos separados del extracto E.

A pesar de que la mayoría de los compuestos son del tipo de los isoflavonoides, se observó que no todos presentaban el fenómeno de fluorescencia, siendo el grupo G5 el que generó más interés, pues a una longitud de onda de 365 nm se

presentaba la fluorescencia. Además, para mejorar la separación, es recomendable volver a separar en CCF y CCC, para encontrar moléculas más específicas.

Beltrami *et al.* (1982) y Acuña *et al.* (2008), reportan bandas a 285-292 nm y 324-329 nm para la coatlina B que es el precursor de la Matlalina. En el grupo 5 y 6 que fueron los grupos que presentaron fluorescencia, sus bandas coinciden con los reportado por ambos grupos de investigación, por lo que no se descarta que en estos grupos podría estar presente la coatlina B.

### 5.8.2 Caracterización por FTIR y espectroscopía Raman de los compuestos separados

En el anexo 2, se muestran los espectros FTIR y los espectros Raman de las fracciones analizadas. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y comparando con la literatura, se espera que los espectros, tengan bandas de grupos OH, C=O, aromáticos entre otras vibraciones características de enlaces C-H y C-C. Los espectros obtenidos, son un complemento ya que algunas vibraciones no se observan en el espectro IR, pero aparecen algunos picos interesantes en el espectro Raman.

Reportes, donde se incluyen espectros IR de compuestos del tipo flavonoides, coinciden que bandas características de compuestos fenólicos, aparecen entre  $900-1680\text{ cm}^{-1}$  (H. Singh et al., 2014; C. C. Wang, Prasain, & Barnes, 2002) y esas bandas o picos se pueden apreciar en los espectros presentados el anexo 1. Así mismo en la región de 3100-2800 se presenta bandas cortas y definidas que también son características de compuestos fenólicos y que se pueden apreciar en los espectros aquí presentados (H. Singh et al., 2014; Skoog et al., 2008). La única muestra que presenta un espectro IR complicado fue la muestra G2, debido a que fue una de las primeras muestras en salir de la columna y no está del todo purificada. La muestra G5 no pudo analizarse con espectroscopía Raman ya que presentó fluorescencia por lo que solo se analizó su espectro IR.

La daidzeina es un compuesto del tipo isoflavonoide y se obtiene de la soya, además es posiblemente uno de los compuestos más estudiados. Shing, *et al.* (2014), reportaron espectros IR y Raman de este isoflavonoide, por lo que se tomó como referencia para un análisis más detallado de los espectros obtenidos EP. Las vibraciones del grupo hidroxilo, como se mencionó anteriormente, son probablemente la más sensibles. Los espectros IR correspondientes a las

muestras G1, G3, G4, G5, G8 y G9, presentan una banda ancha y bien definida entre 3100 y 3550  $\text{cm}^{-1}$ , perteneciente al modo de estiramiento del OH. Este modo se encuentra entre 3500 y 3600  $\text{cm}^{-1}$ , en compuestos con OH libres, por lo que se puede suponer que los grupos OH se encuentran formando algún tipo de enlace con moléculas vecinas, pues la muestra se analizó en polvo. Además, esta consideración solo se aplica para los anillos A y B presentados en la figura 14. El que las muestras G2, G6 y G7 no presenten esta banda, puede ser debido a que estas ocupadas las posiciones del OH o es necesario purificar más las muestras como se sugirió con G2. El espectro Raman de las muestras puede confirmar algunas de los modos vibracionales, por ejemplo, la deformación del grupo hidroxilo de ambos anillos (A y B) corresponde a las bandas de 1188  $\text{cm}^{-1}$  para IR y 1183  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro Raman. Además, el modo mixto de doblado OH, del anillo A se asigna a la banda Raman observada a 1220  $\text{cm}^{-1}$ .

La confirmación de compuestos fenólicos, se presenta en la banda de 1227 y 1096  $\text{cm}^{-1}$ , para el espectro IR; en el espectro Raman esto se observa a 1221 y 1096  $\text{cm}^{-1}$ . Para el anillo A, además, se registraron cinco vibraciones de estiramiento CC totales del anillo. En el espectro IR se observan a 1634, 1462 y 1389  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que en el espectro Raman se observan a 1638, 1453 y 1387  $\text{cm}^{-1}$ . En este trabajo, las muestras G1, G3, G4, G5 y G8 presentan estos valores en sus espectros.

Para el anillo C, ubicado entre el A y B de la figura 14, se reportan vibraciones de estiramiento correspondientes con el modo vibracional de estiramiento de CH y se observan a 3078  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro IR y 3081  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro Raman. El modo de estiramiento C=O del anillo se asigna a una banda de Raman débil, ubicada a 1686  $\text{cm}^{-1}$ . Ahora, la vibración de estiramiento del anillo C-O-C corresponde con los picos a 609  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro IR y 610  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro Raman.

Las vibraciones correspondientes al anillo B, que es un benceno pueden interpretarse de manera más sencilla si se separa en dos partes; los modos que son predominantemente vibraciones de estiramiento C-H y los modos que implican vibraciones C-C. En el espectro IR, en la región de 2900 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  se pueden apreciar estas bandas que se interpretan para este modo y picos entre 3000 y 3100  $\text{cm}^{-1}$  para el espectro Raman deben observarse, como es el caso de las muestras G1, G4, G5, G8 y G9.

Existen varios modos de estiramiento correspondientes a C-C, y aunque algunos no son apreciables en el espectro IR, se pueden observar en el espectro Raman. A 1353  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda que corresponde con este modo en el espectro

Raman. Las flexiones en el plano correspondientes con las vibraciones C-H se aprecian en la región de 1000-1300  $\text{cm}^{-1}$  y las que aparecen fuera del plano se encuentran en la región de 700-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Para el caso de los anillos de benceno sustituidos, las flexiones se localizan en la región de 1500 - 1100  $\text{cm}^{-1}$ . En ocasiones estas vibraciones de flexión en el plano interactúan con las vibraciones de flexión y se produce otra contribución de estiramiento y estos modos de estiramiento pueden causar una deformación. En las muestras, esta contribución no se aprecia, por lo que las bandas correspondientes al anillo aromático se localizaron sin problema.

El desarrollo de nuevas técnicas de caracterización o el emplear técnicas que solo eran exclusivas para algunos tipos de compuestos, ha permitido que se generen nuevos conocimientos con respecto a la identificación de muestras. Los espectros IR y Raman presentados en este trabajo son una muestra de ello, ya que no se encontraron reportes con esta información y además es material original, ya que estas técnicas se han estado incluyendo para el análisis y detección de compuestos orgánicos.

## 5.9 Síntesis de nanopartículas de sílice

Las nanopartículas obtenidas con el método propuesto, se pueden apreciar en las micrografías de la Figura 31. Las micrografías de las nanopartículas fueron tomadas a bajos voltajes (3.0 kV y 1.0 kV).

Como se observa en la **Figura 31**, las nanopartículas tienen morfología esférica. Los tiempos reportados para la síntesis de este tipo de nanopartículas, son en promedio de una hora y treinta minutos, mientras que con la metodología propuesta se pueden sintetizar en 40 min aproximadamente.

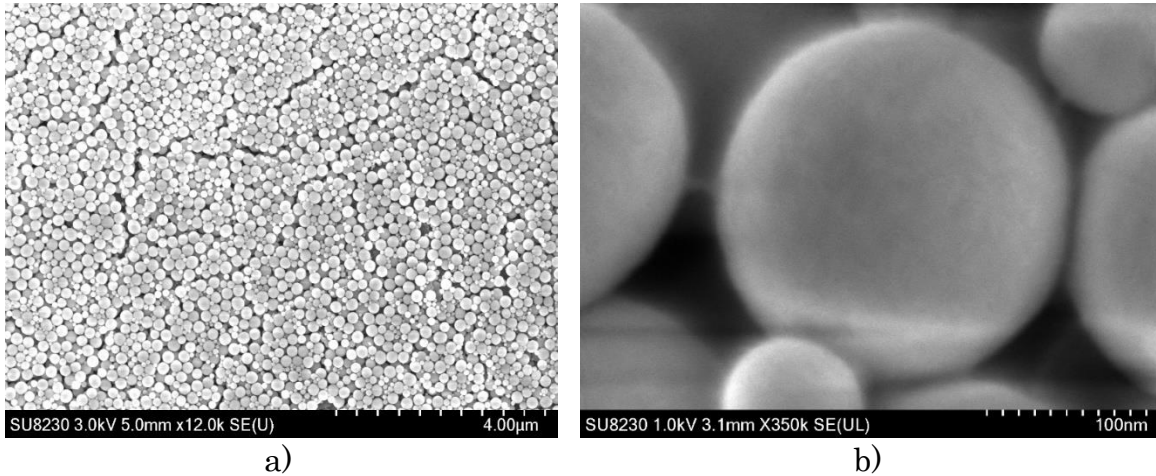


Figura 31. Micrografías de electrones secundarios retrodispersados de las nanopartículas de sílice sintetizadas con el método propuesto, tomadas con un microscopio Hitachi SU8230. La muestra a) fue tomada a 3.0 kV, con una distancia de trabajo (WD) de 5 mm, una magnificación de 12k y con un detector en configuración elevada, mientras que la b) se tomó a 1.0 kV, WD= 3.1 mm, magnificación de 350k, con una combinación de detectores bajo y elevado.

Para corroborar que se estaban obteniendo nanopartículas de óxido de silicio, en la Figura 32 se presenta el espectro IR de estas nanopartículas.

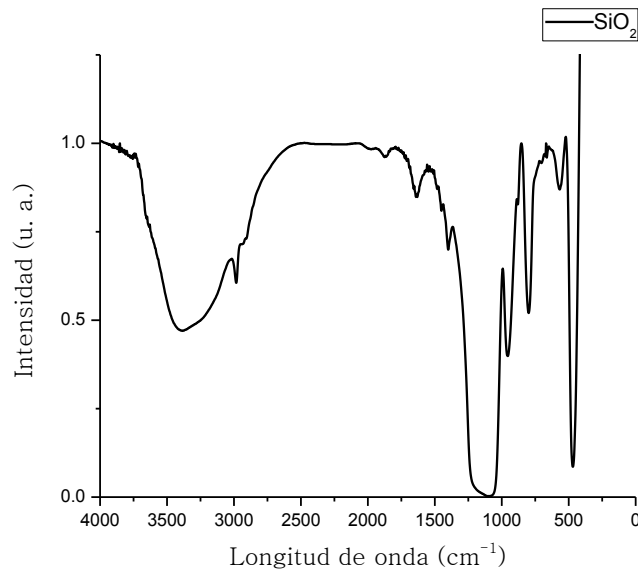


Figura 32. Espectro IR de las nanopartículas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ )



En el espectro se aprecian una serie de bandas características de absorción correspondiente al óxido de silicio: se observa un estiramiento debido al O-H a  $3462\text{ cm}^{-1}$ , lo que indica que es un grupo OH libre. Una banda debido a la vibración de flexión de tijera se aprecia a  $1635\text{ cm}^{-1}$  y es proveniente del agua molecular proveniente de la reacción. También se aprecian vibraciones asimétricas provenientes de la unión Si-O a  $1100\text{ cm}^{-1}$ , y se confirma a  $960\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro también se aprecia una banda a  $795\text{ cm}^{-1}$  provenientes de vibraciones simétricas entre el Si-OH. Previos reportes, han descrito las bandas de absorción entre  $800$  y  $1260\text{ cm}^{-1}$  como una superposición de varios picos de  $\text{SiO}_2$  y uniones de Si - OH y picos debidos a grupos orgánicos residuales (Beganskienė, Sirutkaitis, Kurtinaitien, Remigijus Jušk, & Kareiva, 2004; Echeverrie et al., 2007; Goharshadi, 2013; Ibrahim, Zikry, & Sharaf, 2010).

### 5.9.1 Cuantificación del tamaño de las nanopartículas de sílice por dispersión de luz dinámica (DLS).

El resultado obtenido con DLS fue que las nanopartículas tienen un tamaño promedio de  $150\text{ nm}$  y se muestra en la Figura 33. De acuerdo a varios reportes, los sistemas de nanopartículas que se han utilizado, con diferentes objetivos, tienen tamaños de  $50$  hasta  $500\text{ nm}$  (Jiang, Gnanasammandhan, & Zhang, 2010) y el tamaño de las nanopartículas que han entrado a la célula está entre  $90 - 170\text{ nm}$  (Cirstoiu-Hapca, Bossy-Nobs, Buchegger, Gurny, & Delie, 2007).

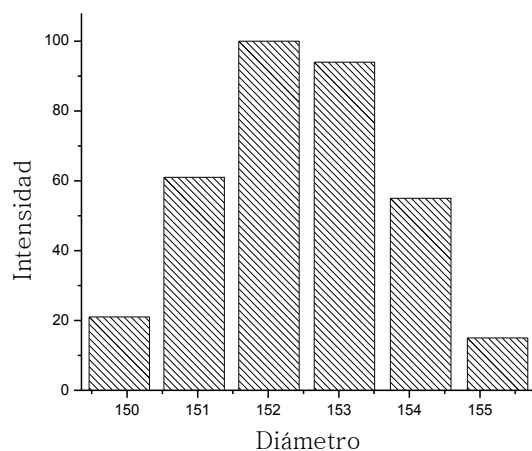


Figura 33. Distribución del tamaño de las nanopartículas.



El tamaño de las nanopartículas es determinante para obtener los resultados deseados, ya que, si las nanopartículas son del orden de 1 a 10 nm, se corre el riesgo de no poder acoplar la suficiente cantidad de compuestos con interés biológico y por lo tanto no podría funcionar como vehículo para éstos. Si el tamaño de las nanopartículas es mayor a 170 nm, la entrada a la célula se complica y por el tamaño es posible que se dañe la membrana celular (Abhilash, 2010; N. C. Tansil & Gao, 2006).

De la síntesis propuesta se obtuvieron nanopartículas con el tamaño dentro de un rango aceptable para usarse como vehículo de transporte de compuestos de interés, como son los compuestos de EP.

### 5.10 Funcionalización de la superficie de las nanopartículas de sílice.

La **Figura 34**, muestra la propuesta de reacción de las nanopartículas con el 3 aminopropiltriethoxisilano (APTES).

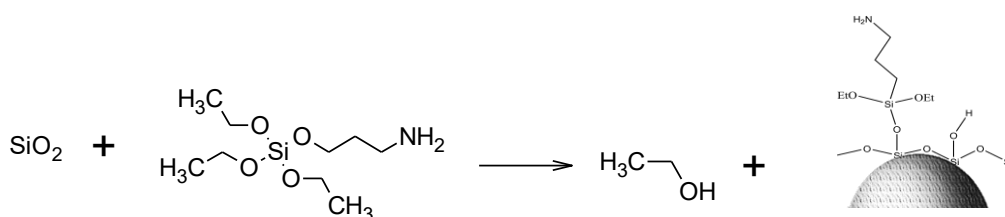


Figura 34. Modelo propuesto de la funcionalización de las nanopartículas con APTES.

La reactividad de los grupos OH, que se encuentran en la superficie de las nanopartículas, en condiciones adecuadas puede llegar a reaccionar de manera preferente con el enlace Si-O presente en el APTES, permitiendo que se lleve a cabo una reacción de doble sustitución o intercambio, dando como productos etanol y las nanopartículas funcionalizadas con el APTES.

Una vez que se obtuvieron las nanopartículas del tamaño y la forma deseada, se procedió a modificar la superficie de éstas, con el fin de poder acoplar o funcionalizar los compuestos de EP en el grupo amino del APTES.

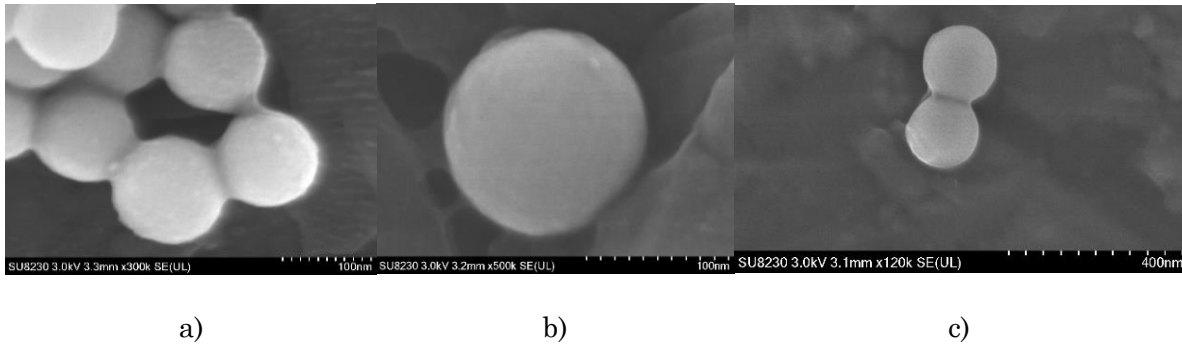


Figura 35. Figura 36. Micrografías de electrones secundarios retrodispersados de las nanopartículas con APTES, tomadas con un microscopio Hitachi SU8230. a) 3.0 kV, WD= 3.3 mm y 300k aumentos; b) 3.0 kV, WD= 3.2 mm y 500k aumentos; c) 3.0 kV, WD= 3.2 mm y 120k aumentos. Las tres imágenes se obtuvieron con una combinación de detectores bajo y elevado.

Como se puede apreciar en la micrografía de la Figura 35, al parecer se formó una capa que podría ser del APTES. Esta capa se observa que cubre a las nanopartículas casi en su totalidad, pero se pierde la monodispersidad, por lo que se podría utilizar alguna otra técnica para separar a las nanopartículas funcionalizadas.

Para corroborar que la reacción propuesta se cumplió, se obtuvo un espectro IR de las nanopartículas con APTES, el cual se muestra en la **Figura 37**.

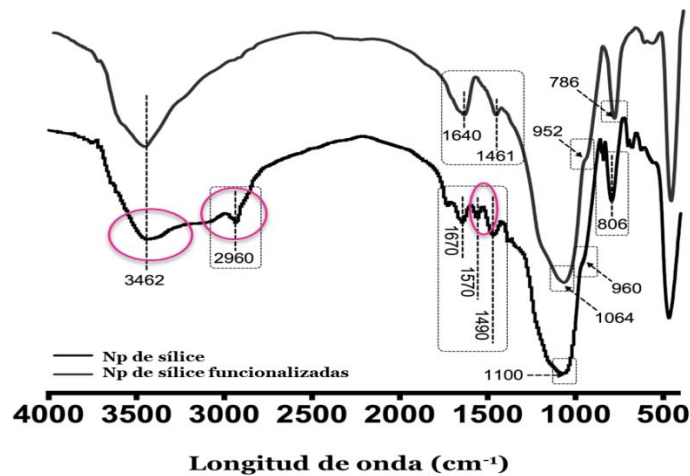


Figura 37. Espectro IR de las nanopartículas sin APTES y con APTES

Las nanopartículas con APTES tienen bandas en el intervalo de 3700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  y son debido a la frecuencia vibratoria de estiramiento de los grupos silanol. Sin embargo, durante la funcionalización superficial, los grupos hidroxilo

superficiales reaccionan con los APTES para formar enlaces Si-O-Si. Esta reducción en los grupos hidroxilo sugiere un mecanismo de anclaje que implica una reacción entre los grupos silanol y el APTES, por lo que se observa una disminución en la banda de  $941\text{ cm}^{-1}$ , que es característica de los grupos silanol. Esto puede ser debido a que se favoreció la conjugación de nanopartículas de sílice con APTES. Posiblemente por esta razón, una nueva banda asignada a  $\text{NH}_2$  se observa, la cual corresponde a una flexión asimétrica y se registra entre  $1590\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ . La banda que caracteriza a la unión C-H (a  $2930\text{ cm}^{-1}$ ) casi desapareció, lo que sugiere que había un posible grado de desacetilación de enlaces C-H. Con este resultado, se puede decir que se confirma la funcionalización de las NPs de sílice de acuerdo a la reacción propuesta, y también este resultados es congruente con los resultados previamente reportados por otros autores (Durdureanu-Angheluta et al., 2012; Echeverrie et al., 2007).

Lo anterior nos permitió determinar bandas que diera indicio de una amina primaria, ya que, de acuerdo con el modelo propuesto de la nanopartícula con AMPS, en ese sitio se realizaría la unión de los compuestos.

## 5.11 Caracterización de las nanopartículas de sílice con APTES y compuestos de EP.

### 5.11.1 Análisis por FTIR

En la **Figura 38** se muestra el espectro IR de las nanopartículas con el extracto E.

En la región donde anteriormente se mostraban los grupos OH que se encuentra entre los  $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ , se aprecia una banda ancha y menos definida que la observada en la figura 30 y 34. Esto, como se mencionó anteriormente, puede deberse al acoplamiento de APTES y ahora de las nanopartículas. También, como se reporta en la literatura, el desplazamiento a la región de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , indica que los grupos OH que presentaron las nanopartículas son posiciones ocupadas. De acuerdo a la figura 33, se espera que los compuestos se unan en el grupo amino que está libre y se forme posiblemente una unión débil, como es un enlace de hidrógeno, entre el grupo amino y los compuestos de EP. En un espectro infrarrojo se puede ubicar ciertas bandas entre  $3500\text{ y }3100\text{ cm}^{-1}$  que se interpretan como modos de tensión entre el N e H. Otra banda entre  $1350\text{ y }1000\text{ cm}^{-1}$  que se interpretan como modos de tensión entre el C y el N y finalmente una

banda entre 800 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a uniones N-H (Domínguez, 1973; Skoog et al., 2008).

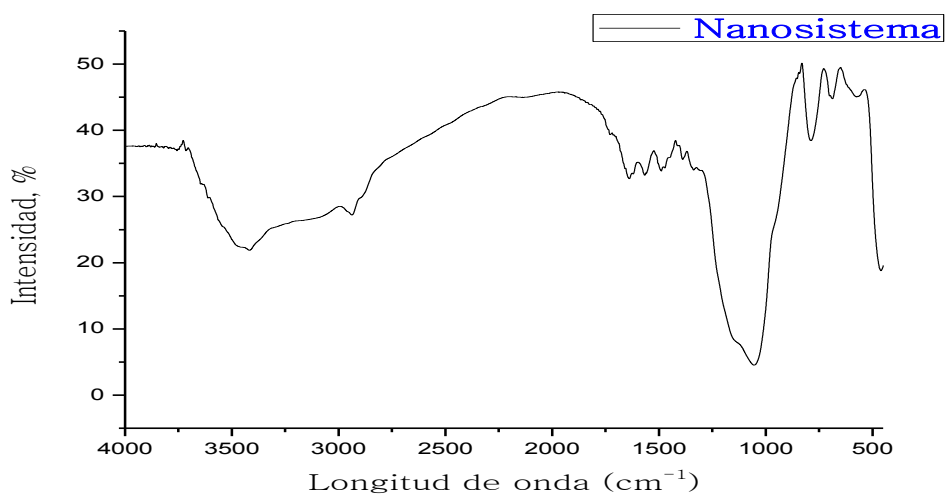


Figura 38. Espectro IR de las nanopartículas acopladas a compuestos de EP.

En el espectro de la Figura 38, se pueden apreciar algunas bandas y picos que corresponden a una amina secundaria o a que uno de los hidrógenos de la amina primaria este interactuando de alguna forma con los compuestos del extracto E, que como se explicó en la sección 3.9 era en la amina primaria obtenida donde se realizaría la unión de los compuestos de EP, por lo que, la propuesta que se presentó en este trabajo fue adecuada.

### 5.11.2 Análisis por espectroscopía Raman

Así como se midió la intensidad de fotoluminiscencia en los compuestos de forma individual, fue importante determinar la fotoluminiscencia de las nanopartículas con los compuestos de EP.

En la **Figura 39**, se aprecian los espectros del nanosistema y de la rodamina. Se realizó esta comparación para determinar si los compuestos de EP tenían propiedades similares a las de uno de los cromóforos más utilizados en el área médica y óptica. Como se puede apreciar, el nanosistema, parece ser más estable y mantiene por más tiempo la fluorescencia, incluso que la rodamina en el mismo tiempo. Con respecto a los compuestos analizados anteriormente, posiblemente, se está logrando incorporar más de un solo compuesto a las nanopartículas,

además de cierta forma la incorporación de los compuestos a las nanopartículas parece que estabiliza a éstos y por ello mantienen por más tiempo la fluorescencia.

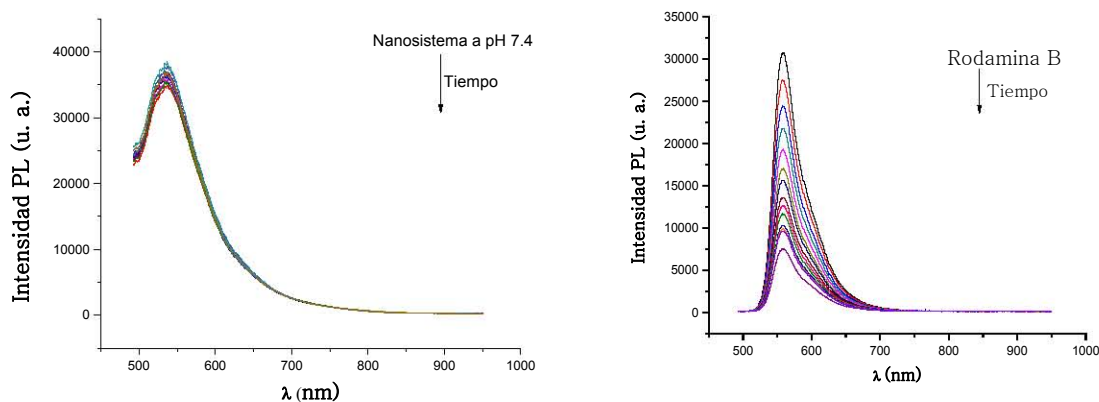


Figura 39. Espectro Raman del nanosistema y la rodamina.

Al respecto, estos resultados son de gran relevancia ya que son novedosos y para usos futuros pueden ser de gran utilidad, si se quieren modificar compuestos y estabilizarlos de una manera rápida y sencilla. Además, el encontrar compuestos de origen natural que pueden llegar a ser utilizados de manera separada o en conjunto con moléculas como la rodamina, pueden llegar a convertirse en herramientas poderosas y causar mínimos efectos secundarios en la salud de las personas.

### 5.11.3 Difracción de rayos X

De acuerdo con la literatura, las nanopartículas sintetizadas por el método de Stöber no presentan patrones de difracción del Si cristalino, pues no se realizó un tratamiento térmico capaz de cambiar el acomodo de los átomos y así obtener un material cristalino, pero para confirmar que las nanopartículas sintetizadas por el método de Stöber tuvieran una estructura amorfas, las nanopartículas (N), las nanopartículas con APTES (NA) y el prototipo del nanosistema (NS) se sometieron a difracción de rayos X y se obtuvo el difractograma que se aparece en la Figura 40. Además, se usaron nanopartículas comerciales de óxido de sílice, conocidas como Aerosil® de la marca Evonik Industries (ASi) para compararlas con las sintetizadas.

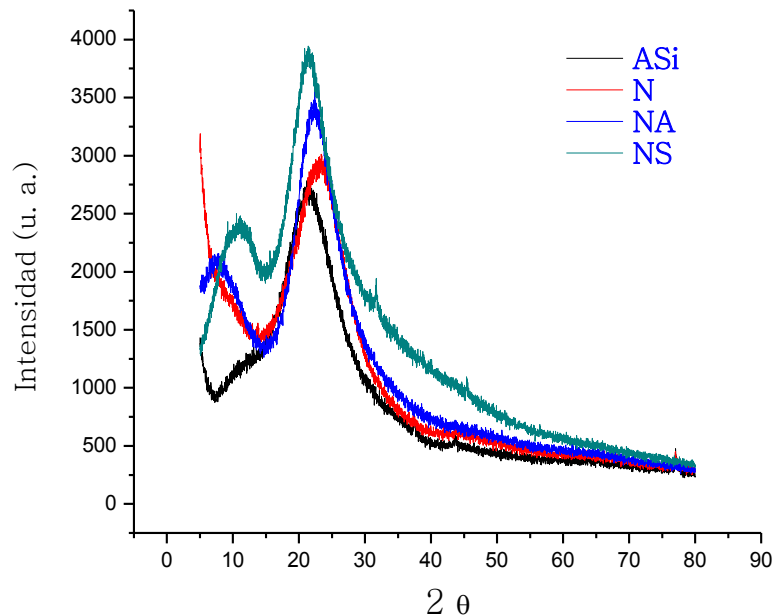


Figura 40. Diffractograma de nanopartículas de sílice sintetizadas por el método de Stöber. N = Nanopartículas; NA = Nanopartículas con APTES; NS = Nanopartículas + APTES + extracto E.

En el diffractograma, se observa que tanto las nanopartículas sintetizadas, como las nanopartículas con agente acoplante tienen una estructura amorfa, pues no se encontraron picos característicos de materiales cristalinos, como son picos delgados y bien definidos. Por otro lado, el diffractograma del nanosistema presentó un par de picos a  $31^\circ$  y  $45^\circ$ , pero no se encontraron reportes donde se asignen esos picos a una estructura cristalina para el silicio. Acuña, *et al.* (2008) reportaron que la matlalina, responsable de la fluorescencia, tiene una estructura cristalina, correspondiente con una estructura del tipo monoclinica. Por lo tanto, los picos que aparecieron, posiblemente, correspondan a la estructura que se propone por estos autores.

#### 5.11.4 Potencial zeta

Los resultados obtenidos, mostraron que las nanopartículas de sílice, N, tenían una carga eléctrica de  $-20,1$  mV, lo que podría atribuirse a la electronegatividad de los grupos silanol (Si - OH) en la superficie de las nanopartículas. Después, las nanopartículas con APTES, NA, mostraron un potencial zeta con cambio,  $+12,9$  mV y  $+8,5$  mV, lo que indica que, posiblemente, los grupos  $NH_2$  + se

localizaban sobre la superficie de las nanopartículas. Posteriormente, el potencial zeta del nanosistema se redujo, en comparación con el de NA, a un potencial  $\zeta$ , de +12,9 mV a +8,5 mV, lo que se relacionó con la presencia de compuestos acoplados al APTES en la superficie de las nanopartículas. Estos resultados, alientan a suponer que la modificación de la superficie de las nanopartículas de sílice se logró de una manera muy sencilla. Sin embargo, estos valores, se encontró que estaban cerca del punto isoeléctrico, lo que podría conducir a la agregación de éstas.

Zhang, *et al.*, (2008) encontraron que el potencial zeta de células normales y de cáncer tenían valores negativos (entre -20 y -30 mV), por lo que un valor positivo en esta prueba para el nanosistema alienta a suponer que esta diferencia de cargas, posiblemente permita que exista una interacción electrostática que dé como resultado la internalización del nanosistema a la célula (Zhang *et al.*, 2008).

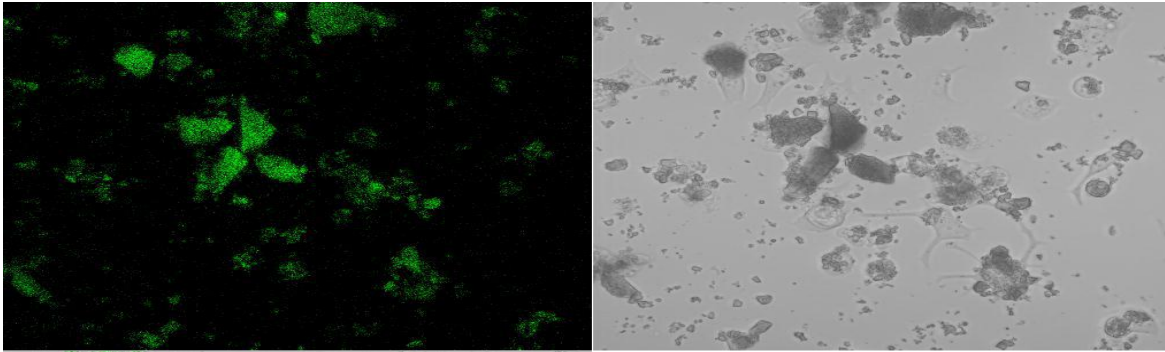
## 5.12 Internalización de las nanopartículas a la línea celular MCF-7

En la **Figura 41**, se muestran las micrografías adquiridas con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, Munich, Germany, con el objetivo EC Plan-Neofluar 20X/0.50 M27. Esto se puede interpretar como el resultado de la internalización del nanosistema a la línea celular MCF-7.

La internalización de las nanopartículas a la célula, se puede apreciar en la figura 38A, ya que, al usar el campo fluorescente, se observa una coloración verde en las estructuras con la forma y los límites de cada célula encontrada en la micrografía de campo brillante y que son características de esta línea celular.

Previo a esto, se habían tratado las células solo con los compuestos de EP, sin embargo, al usar el campo fluorescente no se observaron estructuras correspondientes a la línea celular. Por lo tanto, las células MFC-7 tratadas con el prototipo del nanosistema, mostraron internalización por las células tumorales, lo que indica que este primer prototipo fue adecuado para entrar en la célula sin ningún otro medio de permeabilización de la membrana celular.

Este fue un hallazgo interesante para la investigación biomédica, pues se presenta un nanosistema innovador que podría usarse en el área de bioimágenes, como biomarcador y queda por investigarse su posible acción terapéutica en líneas celulares de cáncer.



a)

b)

Figura 41. a) La fluorescencia del palo azul en células MCF-7, fue captada por microscopía confocal a 488 nm. b) La micrografía en campo claro fue adquirida por el mismo microscopio y con el mismo objetivo, pero sin el filtro de fluorescencia.



# Conclusiones

---

En esta tesis se presentó un nanosistema novedoso formado por nanopartículas de sílice de morfología esférica y compuestos extraídos con etanol. Tanto la síntesis, como la extracción resultaron ser técnicas novedosas. En éstas resaltan varios puntos: En la síntesis se lograron obtener nanopartículas de sílice con morfología esférica y con una superficie que puede ser modificada de manera sencilla. Además, el tiempo de síntesis y el consumo de reactivos fue menor que los reportados hasta ahora. Por otro lado, la extracción de los compuestos de palo azul, utilizando microondas, resultó favorable, pues con un gramo de madera del duramen y en tan solo 20 minutos se lograron extraer los compuestos de interés.

El estudio de fluorescencia usando espectroscopía Raman, reveló resultados no reportados hasta ahora, encontrándose que estos compuestos pueden llegar a competir con sustancias comerciales y tóxicos como la rodamina.

Finalmente, la internalización del prototipo del nanosistema a células cancerígenas MCF-7, motiva evaluar su potencial como marcador y, en futuro, como agente con actividad biológica.

# Bibliografía

---

- Abhilash, M. (2010). Potential applications of nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(1), 1–12.
- ACS, A. C. S. (2014). Resumen sobre el cáncer de seno (mama). *American Cancer Society*, 42. Retrieved from <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003038-pdf.pdf%5Cnwww.cancer.org>
- Acuña, A. U., & Amat-Guerri, F. (2008). Early History of Solution Fluorescence : The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes. *Springer Series on Fluorescence*, 4, 3–20. <http://doi.org/10.1007/4243>
- Acuña, A. U., Amat-Guerri, F., Morcillo, P., Liras, M., & Rodríguez, B. (2009). Structure and formation of the fluorescent compound of Lignum nephriticum. *Organic Letters*, 11(14), 3020–3. <http://doi.org/10.1021/ol901022g>
- Adlercreutz, H., & Vickery, L. E. (1993). INHIBITION OF H U M A N AROMATASE BY MAMMALIAN, 44(2), 147–153.
- Alford, R., Simpson, H. M., Duberman, J., Hill, G. C., Ogawa, M., Regino, C., ... Choyke, P. L. (2009). Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging : Literature Review, 8(6), 341–354. <http://doi.org/10.2310/7290.2009.00031>
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. a, Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945–72. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- Altundag, K., & Ibrahim, N. K. (2006). Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview. *The Oncologist*, 11(6), 553–62. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.11-6-553>
- Álvarez, E., & Cambeiro, O. (2012). Actividad biológica de los flavonoides ( I ). Acción frente al cáncer, 22(I).
- Alvarez, L., & Delgado, G. (1999). C - and O -Glycosyl- a -hydroxydihydrochalcones from Eysenhardtia polystachya. *Phytochemistry*, 50, 681–687.
- Amado, J. A., & Flórez, J. (2014). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología Humana*, 867–890.
- Ambikapathi, G., & Kempahanumakkagari, S. K. (2013). Bioimaging of Peroxynitrite in MCF-7 Cells by a New Fluorescent Probe Rhodamine B Phenyl Hydrazide. *Journal of Fluorescence*, 23, 705–712. <http://doi.org/10.1007/s10895-013-1205-y>
- Anajwala, C. C., Jani, G. K., & Swamy, S. M. V. (2010). Current Trends of Nanotechnology for Cancer Therapy. *International Journal of Pharmaceutics Sciences and Nanotechnology*, 3(3), 1043–1056.
- Anedda, A., Carbonaro, C. M., Clemente, F., & Corpino, R. (2005). Rhodamine 6G – SiO 2 hybrids : A photoluminescence study. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 351, 1850–1854. <http://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2005.04.027>
- Angeles, L., & Angeles, L. (n.d.). Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina, (6).
- Bae, S. W., Tan, W., & Hong, J.-I. (2012). Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications. *Chemical Communications*, 48(17), 2270. <http://doi.org/10.1039/c2cc16306c>
- Beatson, G. T. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with ullustrative cases. *Lancet*, 2, 104–107.
- Beganskienė, A., Sirutkaitis, V., Kurtinaitien, M., Remigijus Jušk, N., & Kareiva, A. (2004). FTIR , TEM and NMR

- Investigations of Stöber Silica Nanoparticles. *Material Science*, 10(4), 287–290.
- Beltrami, E., Bernardi, D. E., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., & Vita-finzi, P. (1982). Coatline A and B, two C-glucosyl-alpha-hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry*, 21(12), 2931–2933.
- Bogush, G. H., Tracy, M. A., & Zukoski IV, C. F. (1988). PREPARATION OF MONODISPERSE SILICA PARTICLES: CONTROL OF SIZE AND MASS FRACTION. *Journal of Non*, 104, 95–106.
- Borrás, C., Gambini, J., Gómez-Cabrera, M. C., Sastre, J., Pallardó, F. V., Mann, G. E., & Viña, J. (2006). Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(12), 2136–8. <http://doi.org/10.1096/fj.05-5522fje>
- Branda, F., Silvestri, B., Luciani, G., & Costantini, A. (2007). The effect of mixing alkoxides on the Stöber particles size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299(1–3), 252–255. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.11.048>
- Brooks, S. C., Locke, E. R., & Soule, H. D. (1973). COMMUNICATIONS : Estrogen Receptor in a Human Cell Line ( MCF-7 ) from Breast Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 248(10), 6251–6253.
- Brown, T. L., LeMay, H. E. J., Bursten, B. E., Murphy, C. J., & Woodward, P. (2009). *Química. La ciencia central*. (Decimoprim). México, D. F.
- Burns, D. T., Dalgarno, B. G., Gargan, P. E., & Grimshaw, J. (1984). An Isoflavone and a Coumestan from *Eysenhardtia polystachya*-Robert Boyle's fluorescent acid-base indicator. *Phytochemistry*, 23(1), 167–169.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-R71. <http://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). FLAVONOIDES : CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Chen, S., Osaka, A., Hayakawa, S., Tsuru, K., Fujii, E., & Kawabata, K. (2008). Novel One-pot Sol–Gel Preparation of Amino-functionalized Silica Nanoparticles. *Chemistry Letters*, 37(11), 1170–1171. <http://doi.org/10.1246/cl.2008.1170>
- Cirstoiu-Hapca, a, Bossy-Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R., & Delie, F. (2007). Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin) and anti-CD20 (Mabthera) coupled nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(2), 190–6. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.002>
- Cole, P. A., & Robinson, C. H. (1990). Mechanism and Inhibition of Cytochrome P-450 Aromatase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(5), 2934–2942.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- de Snoo, F., Bender, R., Glas, A., & Rutgers, E. (2009). Gene expression profiling: Decoding breast cancer. *Surgical Oncology*, 18(4), 366–378. <http://doi.org/10.1016/j.suronc.2009.07.005>
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Review series Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 561–570. <http://doi.org/10.1172/JCI27987>. Selective
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica* (Primera). México: LIMUSA, S. A.
- Domínguez S., X. A. (1975). *CROMATOGRAFÍA EN PAPEL Y EN CAPA DELGADA*.

- Donegan, W. L., & Spratt, J. S. (1982). *Cáncer de mam* (Segunda Ed). Argetina: Editorial Médica Panamericana.
- Doyle, A., Yang, W., Abruzzo, L. V, Gao, Y., Rishi, A. K., & Douglas, D. (1999). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(lane 2), 15665–15670.
- Durdureanu-Angheluta, a., Dascalu, a., Fifere, a., Coroaba, a., Pricop, L., Chiriac, H., ... Simionescu, B. C. (2012). Progress in the synthesis and characterization of magnetite nanoparticles with amino groups on the surface. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(9), 1679–1689. <http://doi.org/10.1016/j.jmmm.2011.11.062>
- Echeverrie, M., Giraldo, L. F., & López, B. L. (2007). Síntesis y funcionalización de nanopartículas de sílica con morfología esférica. *Scientia et Technica*, (36), 169–173.
- Ellem, S. J., & Risbridger, G. P. (2010). Aromatase and regulating the estrogen : androgen ratio in the prostate gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(4–5), 246–251. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.10.015>
- Engelsman, E., Korstan, C. B., Persijin, J. P., & Cleton, F. J. (1973). Human breast cancer and estrogen receptor. *Archivum Chirurgicum Neerlandicum*, 25(4), 393–397.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698–707. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Espinós, J., Reyna, C., S, D. C., Olier, C., Hernández, A., & O, F. H. (2008). Tratamiento hormonal del cáncer de mama. *Revista Médica Universidad Navarra*, 52, 40–48.
- Feynman, R. P. (1992). There are Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1(1), 60–66. <http://doi.org/10.1109/84.128057>
- Ghosh, D., Lo, J., Morton, D., Valette, D., Xi, J., Griswold, J., ... Davies, H. M. L. (2012). Novel Aromatase Inhibitors by Structure-Guided Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 8464–8476.
- Gibson, L., Lawrence, D., Dawson, C., & Bliss, J. (2009). Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women ( Review ), (4).
- Goharshadi, H. R. N. and N. S. and M. R. R.-A. and M. M. B. M. and E. K. (2013). Gradual growth of gold nanoseeds on silica for SiO<sub>2</sub>@gold homogeneous nano core/shell applications by the chemical reduction method. *Physica Scripta*, 87(2), 25802. <http://doi.org/10.1088/0031-8949/87/02/025802>
- Gracia Nava, M. A. (2006). Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. *Universidad Autonoma de Querétaro*, 1–4. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200015>
- Gutiérrez, C. E. W. (2005). Las NANOPARTÍCULAS : pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? *Contacto Nuclear*, 24–29. Retrieved from [http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39\\_NANOPARTICULAS.pdf](http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39_NANOPARTICULAS.pdf)
- Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, 4(February 2015), 1–4.
- Hollman, P. C. H. (2004). Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42(s1), 74–83. <http://doi.org/10.3109/13880200490893492>
- Hong, Y., & Chen, S. (2006). Aromatase Inhibitors. Structural Features and Biochemical Characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 251, 237–251. <http://doi.org/10.1196/annals.1386.022>
- Hong, Y., Li, H., Yuan, Y., & Chen, S. (2009). Molecular Characterization of Aromatase. *Steroid Enzymes and*

- Cancer*, 120, 112–120. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03703.x>
- Horowitz, R. M., & Jurd, L. (1960). Spectral Studies on Flavonoid Compounds. II. Isoflavones and Flavanones. *Spectral Studies on Flavonoid*, 26, 2446–2449.
- Hu, M. (2007). Commentary: Bioavailability of flavonoids and polyphenols: Call to arms. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 803–806. <http://doi.org/10.1021/mp7001363>
- Ibrahim, I. A. M., Zikry, A. A. F., & Sharaf, M. A. (2010). Preparation of spherical silica nanoparticles : Stober silica. *Journal of American Science*, 6(11), 985–989.
- INEGI. (2011). Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte ☐. *Instituto Nacional de Estadística Y Geografía*, 276(11), 1–8.
- Jain, K. K. (2005). Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 358(1–2), 37–54. <http://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.03.014>
- Jiang, S., Gnanasammandhan, M. K., & Zhang, Y. (2010). Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7(42), 3–18. <http://doi.org/10.1098/rsif.2009.0243>
- Katzenellenbogen, B. S., Norman, M. J., Eckert, R. L., Peltz, S. W., & Mangel, W. F. (1984). Bioactivities , Estrogen Receptor Interactions , and Plasminogen Activator-inducing Activities of Tamoxifen and Hydroxytamoxifen Isomers in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Bioactivities , Estrogen Receptor Interactions , and Plasminogen tamoxifen Isomers. *Cancer Research*, 44, 112–119.
- Knopp, D., Tang, D., & Niessner, R. (2009). Review: bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta*, 647(1), 14–30. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.037>
- Krishnaswamy, N. R. (2003). Characterization of naturally occurring compounds. Preliminary studies-color reactions. In *Chemistry of Natural Products A Laboratory Handbook* (pp. 26–34).
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., ... Gustafsson, J. a. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263. <http://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>
- Kumar, R., Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Goswami, L. N., Bonoiu, A. C., Bergey, E. J., ... Prasad, P. N. (2008). Covalently Dye-Linked, Surface- Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging. *Acs Nano*, 2(3), 449–456.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lanfranchi, A. (2016). *Cáncer de mama : Riesgos y Prevención Cuarta edición*.
- Lee, K., Sathyagal, A. N., & McCormick, A. V. (1998). A closer look at an aggregation model of the Stöber process. *Colloids and Surfaces A*, 144, 115–125.
- Leung, C. C., Yu, I. T. S., & Chen, W. (2012). Silicosis. *Lancet*, 379(9830), 2008–2018. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60235-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60235-9)
- Leung, E., Kannan, N., Krissansen, G. W., Findlay, M. P., & Baguley, B. C. (2010). MCF-7 breast cancer cells selected for tamoxifen resistance acquire new phenotypes differing in DNA content, phospho-HER2 and PAX2 expression, and rapamycin sensitivity. *Cancer Biology and Therapy*, 9(9), 717–724. <http://doi.org/10.4161/cbt.9.9.11432>
- Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line '. *Cancer Research*, 58, 3071–3078.

- Limpo, J., Rubio, J., & Oteo, J. L. (1993). Estudio por FT-IR de la hidrólisis del tetraetilortosilicato, *32*, 31–35.
- Link, J. (2016). *Cáncer de mama y calidad de vida* (1ra ed.). Roobin Book.
- Liu, W.-T. (2006). Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *102*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1263/jbb.102.1>
- Lombardi, P. (2002). Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1587*(2–3), 326–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084475>
- Lonning, P. (2004). Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, *11*(2), 179–189. <http://doi.org/10.1677/erc.0.0110179>
- Mahmoud, A. M., Yang, W., & Bosland, M. C. (2014). Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *140*, 116–32. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.010>
- Martínez Flores, S., J. G. G., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, *XVII*(6), 271–278.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Bioquímica* (4a ed.). Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid.
- Maza Fernández, M. E., & Vecchi Martini, E. (2009). El cáncer de mama en México : evolución , panorama actual y retos de la sociedad civil. *Salud Pública de México*, *51*(1), 329–334.
- Miller, W. R. (2005a). Aromatase Inhibition and Breast Cancer. *Hormonal Carcinogenesis IVmo*, *4*(4), 166–180.
- Miller, W. R. (2005b). Aromatase Inhibition and Breast Cancer. *Hormonal Carcinogenesis IV*, *4*(4), 166–180.
- Miller, W. R., & Larionov, A. a. (2012). Understanding the mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Research : BCR*, *14*(1), 201. <http://doi.org/10.1186/bcr2931>
- Mokbel, K. (2002). The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, *7*(5), 279–83. <http://doi.org/10.1007/s101470200040>
- Nacional de Cáncer, I. (2016). Cáncer de seno ( mama ): Tratamiento ( PDQ ® )– Versión para profesionales de salud Información general sobre el cáncer de mama, 1–9.
- Narvaez-Mastache, J. M., Garduño-Ramírez, M. L., Alvarez, L., & Delgado, G. (2006). Antihyperglycemic activity and chemical constituents of *Eysenhardtia platycarpa*. *Journal of Natural Products*, *69*(12), 1687–91. <http://doi.org/10.1021/np060166z>
- National Cancer Institute. (2015). FDA Approval for Exemestane. Retrieved from <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-exemestane>
- National Cancer Institute. (2016). Cáncer de seno ¿ Qué es el cáncer ?
- NIH, I. N. del C. (2016a). *Cáncer de seno ( mama ): Tratamiento ( PDQ ® )– Versión para profesionales de salud Información general sobre el cáncer de mama*.
- NIH, I. N. del C. (2016b). Terapia Hormonal para el cáncer de mama. Retrieved from <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/hoja-informativa-terapia-hormonal-seno>
- OMS. (2013). “ ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL CONTRA EL CÁNCER DE MAMA .” *INEGI*, *24*, 1–17.
- Owen, T. (2002). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy. Microwaves*. <http://doi.org/10.1002/0471733555.ch1>

- Oyvind, A. M., & Markhama, K. R. (2006). *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press.
- Pascual, S., Urrutia, I., Ballaz, A., Arrizubieta, I., Altube, L., & Salinas, C. (2011). Prevalence of Silicosis in a Marble Factory after Exposure to Quartz Conglomerates. *Archivos de Bronconeumología ((English Edition))*, 47(1), 50–51. [http://doi.org/10.1016/S1579-2129\(11\)70008-8](http://doi.org/10.1016/S1579-2129(11)70008-8)
- Perkin Elmer, I. Technical specifications for the Lambda 25/35/45 UV/Vis spectrophotometers, PerkinElmer Inc (2004).
- Ponzone, R., Mininanni, P., Cassina, E., Pastorino, F., & Sismondi, P. (2008). Aromatase inhibitors for breast cancer: different structures, same effects? *Endocrine-Related Cancer*, 15(1), 27–36. <http://doi.org/10.1677/ERC-07-0249>
- Purohit, V. (2001). Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens ? A review. *Alcohol*, 22(2000), 123–127.
- Quelhas, P., Marcuzzo, M., Maria, M. A., Oliveira, M. J., & Campilho, A. (2009). Cancer cell detection and invasion depth estimation in brightfield images. *Cancer Cell*, 1–10.
- Rahman, I. A., Jafarzadeh, M., & Sipaut, C. S. (2009). Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using gamma-aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*, 35(5), 1883–1888. <http://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.10.028>
- Rahman, I. A., & Padavettan, V. (2012). Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel : Size-Dependent Properties , Surface Modification , and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites — A Review. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/132424>
- Rao, K. S., El-Hami, K., Kodaki, T., Matsushige, K., & Makino, K. (2005). A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 289(1), 125–131. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.02.019>
- Reis-Filho, J. S., & Pusztai, L. (2011). Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *The Lancet*, 378(9805), 1812–1823. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61539-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61539-0)
- Rojas, J. A. P., Juan, S., Km, M., Carretera, D., & Sta, E. (2009). Nanoesferas monodispersas de SiO<sub>2</sub> : síntesis controlada y caracterización, 22(3), 44–48.
- Romero, Q., Bendahl, P.-O., Fernö, M., Grabau, D., & Borgquist, S. (2014). A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagnostic Pathology*, 9, 118. <http://doi.org/10.1186/1746-1596-9-118>
- Salehi, H., Middendorp, E., Panayotov, I., Dutilleul, P.-Y. C., Vegh, A.-G., Ramakrishnan, S., ... Cuisinier, F. (2013). Confocal Raman data analysis enables identifying apoptosis of MCF-7 cells caused by anticancer drug paclitaxel. *Journal of Biomedical Optics*, 18(5), 56010. <http://doi.org/10.1117/1.jbo.18.5.056010>
- Sanderson, J. T., Hordijk, J., Denison, M. S., Springsteel, M. F., Nantz, M. H., & van den Berg, M. (2004). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 82(1), 70–9. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfh257>
- Sanfilippo B., J., & Moreno Hernández, M. I. (2008). *Cáncer de mama. El Ejercicio Actual de la Medicina*. Retrieved from [http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2002/ponencia\\_jul\\_2k2.html](http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2002/ponencia_jul_2k2.html)
- Santos, C., Norte, A., Fradinho, F., Catarino, A., Jorge Ferreira, A., Loureiro, M., & Fontes Baganha, M. (2010). Silicosis – brief review and experience of a pulmonology ward. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 16(1), 99–115. [http://doi.org/10.1016/S2173-5115\(10\)70021-X](http://doi.org/10.1016/S2173-5115(10)70021-X)



- Sauer, M., Hofkens, J., & Enderlein, J. (2011). Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*, 1–30. <http://doi.org/10.1002/9783527633500.ch1>
- Schneider, J., Tejerina, A., Perea, C., Tejerina, A., Lucas, R., & Sánchez, J. (2007). El fenotipo tumoral “basal like” (c-erb-B2 -, RE - y RP - negativo) define un subgrupo biológicamente muy agresivo de cáncer de mama en estadio postquirúrgico pT1. *Gaceta Médica de Bilbao*, *104*(4), 131–134. [http://doi.org/10.1016/S0304-4858\(07\)74591-2](http://doi.org/10.1016/S0304-4858(07)74591-2)
- Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *23 Suppl 2*(S2), S60–S64. <http://doi.org/10.1038/modpathol.2010.33>
- Secretaría de Salud, M. (2015). Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. Retrieved from <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- Shanker, N., Dilek, O., Mukherjee, K., McGee, D. W., & Bane, S. L. (2011). Aurones: Small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules. *Journal of Fluorescence*, *21*(6), 2173–2184. <http://doi.org/10.1007/s10895-011-0919-y>
- Shinde, K. N., Dhoble, S. J., Swart, H. C., & Park, K. (2012). Phosphate Phosphors for Solid-State Lighting Chapter2. Basic Mechanisms of Photoluminescence. In *Springer Series on Fluorescence* (Vol. 174, pp. 41–60). <http://doi.org/10.1007/978-3-642-34312-4>
- SIGMA-ALDRICH. (2017). (3-Aminopropyl)triethoxysilane.
- Simpson, E. . (2003). Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *86*(3–5), 225–230. [http://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00360-1](http://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1)
- Simpson, E. R. (2002). Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertility and Sterility*, *77 Suppl 4*(4), S6-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007896>
- Sing de Ugaz, O. L. (1997). *Colorantes Naturales* (Primer Edi). Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial 1997.
- Singh, H., Singh, S., Srivastava, A., Tandon, P., Bharti, P., Kumar, S., & Maurya, R. (2014). Conformational analysis and vibrational study of daidzein by using FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *120*, 405–15. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.045>
- Singh, M., McGinley, J. N., & Thompson, H. J. (2000). A comparison of the histopathology of premalignant and malignant mammary gland lesions induced in sexually immature rats with those occurring in the human. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *80*(2), 221–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701691>
- Sinn, H. P., & Kreipe, H. (2013). A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care*, *8*(2), 149–154. <http://doi.org/10.1159/000350774>
- Skoog, D. A., James Holler, F., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ... Børresen-dale, A. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(19), 10869–10874.
- SS, S. de S. (2016). *Autoexploración para combatir el cáncer de mama Este tipo de cáncer es la primera causa de muerte en mujeres en edad reproductiva* .



- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. *Journal of Colloid and Interface Science*, 69, 62–69.
- Su, Y., Clínica, C., Uribe, J. R., Hernández, C. a, Menolascino, F., Rodríguez, J. E., ... Uribe, J. L. (2010). CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA Artículo de revisión. *Rev Venez Oncol*, 22(2), 109–116.
- Suzuki, T. M., Nakamura, T., Fukumoto, K., Yamamoto, M., Akimoto, Y., & Yano, K. (2008). Direct synthesis of amino-functionalized monodispersed mesoporous silica spheres and their catalytic activity for nitroaldol condensation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 280(1–2), 224–232. <http://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.11.012>
- Tansil, N. C., & Gao, Z. (2006). Nanoparticles in biomolecular detection. *Nano Today*, 1(1), 28–37.
- Tansil, N., & Gao, Z. (2006). Nanoparticles in biomolecular detection. *Nano Today*.
- Thilakarathna, S. H., & Vasantha Rupasinghe, H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367–3387. <http://doi.org/10.3390/nu5093367>
- Tohill, I. E. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(1), 55–62. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.015>
- Tran, H. N., Lien Nghiem, T. H., Duong Vu, T. T., Pham, M. T., Nguyen, T. Van, Tran, T. T., ... Nguyen, P. H. (2013). Dye-doped silica-based nanoparticles for bioapplications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(4), 1–13. <http://doi.org/10.1088/2043-6262/4/4/043001>
- Uoyama, H., Goushi, K., Shizu, K., Nomura, H., & Adachi, C. (2012). Highly efficient organic light-emitting diodes from delayed fluorescence. *Nature*, 492(7428), 234–8. <http://doi.org/10.1038/nature11687>
- Van Helden, a. K., Jansen, J. W., & Vrij, a. (1981). Preparation and characterization of spherical monodisperse silica dispersions in nonaqueous solvents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 81(2), 354–368. [http://doi.org/10.1016/0021-9797\(81\)90417-3](http://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90417-3)
- Veeranarayanan, S., Poulouse, A. C., Sheikh Mohamed, M., Nagaoka, Y., Iwai, S., Nakagame, Y., ... Sakthi Kumar, D. (2012). Synthesis and application of luminescent single CdS quantum dot encapsulated silica nanoparticles directed for precision optical bioimaging. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3769–3786. <http://doi.org/10.2147/IJN.S31310>
- Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, 23(SUPPL. 10). <http://doi.org/10.1093/annonc/mds326>
- VWR, S. ®. Basic Vis or UV-VIS , V-1200 , UV-1600PC (2017).
- Wang, C. C., Prasain, J. K., & Barnes, S. (2002). Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777(1–2), 3–28. [http://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00341-0](http://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00341-0)
- Wang, C., Mäkelä, T., Hase, T., Adlercreutz, H., & Kurzer, M. S. (1994). Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 50(3–4), 205–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049151>
- Wang, L., Zhao, W., & Tan, W. (2008). Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Research*, 1(2), 99–115. <http://doi.org/10.1007/s12274-008-8018-3>
- Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F. A., ... Peterse, J. L. (2010). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *The Journal of Pathology*, 220(September), 114–125. <http://doi.org/10.1002/path>
- Yan, J., Estévez, M. C., Smith, J. E., Wang, K., He, X., Wang, L., & Tan, W. (2007). Dye-doped nanoparticles for

bioanalysis. *Nano Today*, 2(3), 44–50.

Yan, J., Smith, J. E., Wang, K., He, X., Wang, L., & Tan, W. (2007). Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nano Today*, 2(3), 44–50.

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas : controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 69–81.

Zhang, Y., Yang, M., Portney, N. G., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., ... Ozkan, C. S. (2008). Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices*, 10(2), 321–8. <http://doi.org/10.1007/s10544-007-9139-2>

Zhao, X., Bagwe, R. P., & Tan, W. (2004). Development of Organic-Dye-Doped Silica Nanoparticles in a Reverse Microemulsion. *Advanced Materials*, 16(2), 173–176. <http://doi.org/10.1002/adma.200305622>

Zhou, C., Zhong, Q., Rhodes, L. V, Townley, I., Bratton, M. R., Zhang, Q., ... Wang, G. (2012). Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration. *Breast Cancer Research*, 14(2), R45. <http://doi.org/10.1186/bcr3144>

# ANEXOS

## Anexo 1. Fotografías de algunas especies del género *Eysenhardtia*

**# catálogo:** DES00077442

**ID de guía (GUID):** bea7865b-c625-4ae0-8f0a-7b4db005ebd4

**Taxonomía:** *Eysenhardtia adenostylis* Baill.

**Familia:** *Fabaceae*

**Recolector:** R. F. Thorne 46279

**Día:** 09 Octubre 1971

**Recolectores adicionales:** E.W. Lathrop, M.Z. Thorne

**Localidad:** México, Chiapas, Pueblo Nuevo Solistahuacán, Jitotol, Jitotol. Altiplano septentrional: 6 millas al norte de Jitotol. 17.154482 -92.861108 +10121m. WGS84

**Registro:** bea7865b-c625-4ae0-8f0a-7b4db005ebd4

### Descripción

**Coordenadas Verbatim:** 17° 07' N 92° 53' W

**Elevación:** 1555 metros

**Elevación Verbatim:** 5100 pies

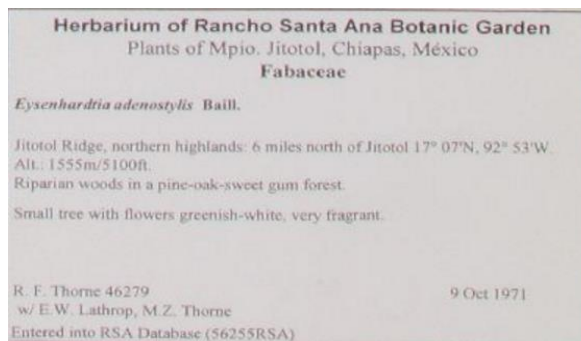
**Hábitat:** Arbustos ribereños en pino-roble-bosque de chicle dulce.

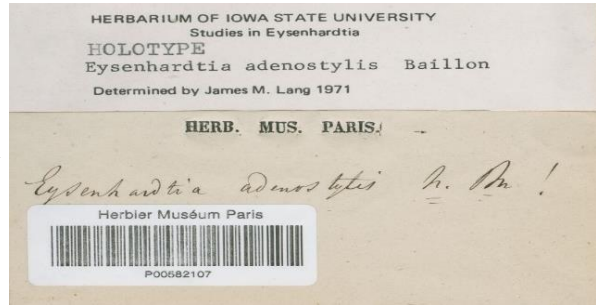
**Descripción:** Árbol pequeño con flores blanco verdoso, muy fragante.

**Fenología:** Flores.

**Notas:** Jardín Botánico Ex. Rancho Santa Ana.

**Derechos de uso:** [CC BY-NC \(Attribution-Non-Commercial\)](#)

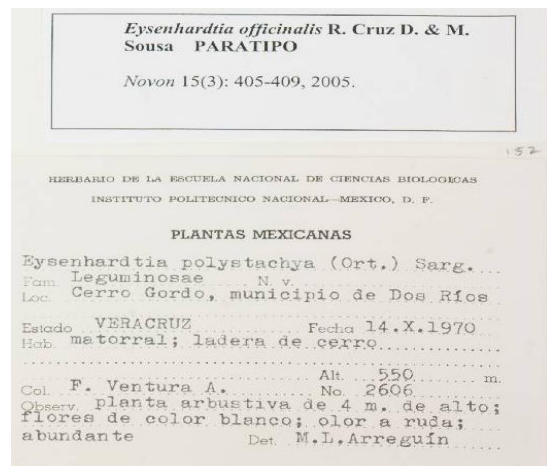
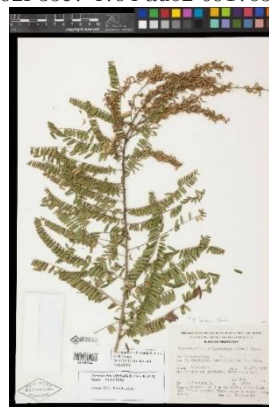




**Descripción**

# Catálogo: 1239744  
 ID de guía (GUID): URN:catalog:NY:Herbarium:1239744  
 Taxonomía: *Eysenhardtia officinalis* M. Sousa  
 Familia: *Fabaceae*  
 Tipo de estatus: paratype  
 Colector: F. Ventura A. 2823

Día: 11 November 1970  
 Localidad: Mexico, Veracruz, Dos Ríos, El Carrizal  
 Elevación: 400 metros (1312ft)  
 Fuente: [NY #1239744](#)  
 Derechos de uso: [CC BY-NC \(Attribution-Non-Commercial\)](#)  
 Registro: 5a64192f-35e7-4794-ad02-0917634630a3





Descripción

# catálogo: UWFP009326

Occurrence ID (GUID): 3d1da749-23f0-469a-90ed-31601b670221

Taxón: *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.

Family: Fabaceae

Usage Rights: [CC0 1.0 \(Public-domain\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Record Id: 3d1da749-23f0-469a-90ed-31601b670221



HERBARIUM OF THE UNIVERSITY OF WEST FLORIDA  
Plants of TEXAS  
*Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg.  
Crockett Co. About 20 mi W of Sheffield at rest stop along Interstate 10 (US 290). Mountainous area. Soil hard, compacted, rocky, with sand. Gnarled shrub 3 ft tall. Fls white. With *Mentzelia oligosperma*.  
*Opuntia leptocaulis*.  
Date Jun 22, 1979 No. 6513  
Coll. James R. Burkhalter

**G1. FTIR**

1500 1000 500

**G1. Raman**

1500 1000 500

**G2. FTIR**

1500 1000 500

**G2. Raman**

1500 1000 500

G3. FTIR

100 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>

G3. Raman

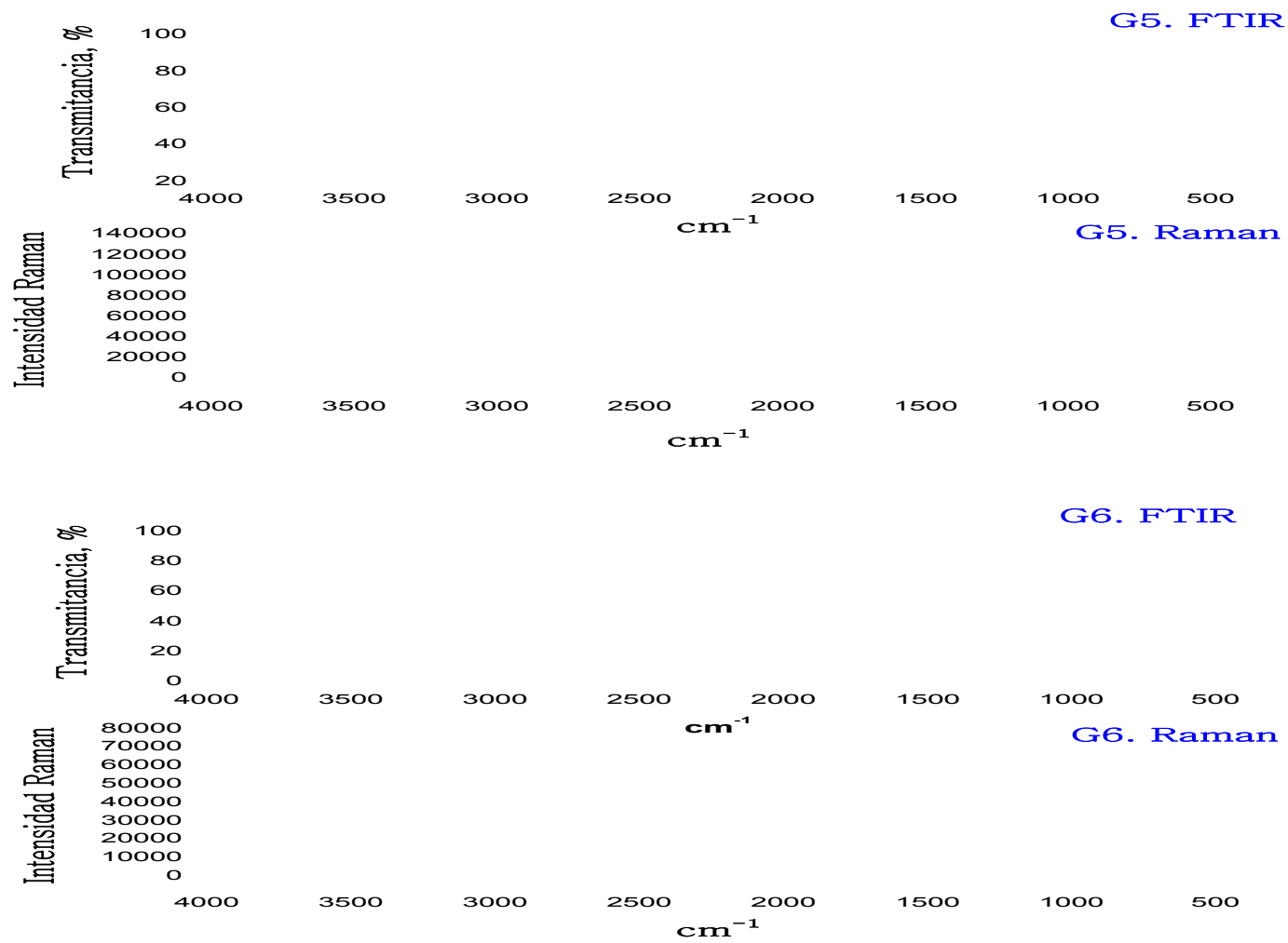
100 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>

G4. FTIR

100 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>

G4. Raman

100 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>





G7. FTIR

3000 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>  
G7. Raman

3000 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>

G8. FTIR

3000 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>  
G8. Raman

3000 2500 2000 1500 1000 500  
cm<sup>-1</sup>

## G9. FTIR

% 100

## Anexo 3. Productos de la investigación

### *Artículos*

Guadalupe Ferreira, Angel R. Hernandez-Martinez, Hector Pool, Gustavo Molina, Martha Cruz-Soto, Gabriel Luna-Barcenas, Miriam Estevez. (2015). Synthesis and functionalization of silica-based nanoparticles with fluorescent biocompounds extracted from *Eysenhardtia polystachya* for biological applications. *Materials Science and Engineering C*. 57 (2015) 49 –57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.012>

M. G. Ferreira-García, A. R. Hernandez-Martinez, R. Esparza, G. A. Molina, F. Rodriguez-Melgarejo, S. Jiménez, M. Estevez. Effects of extraction solvents on Photoluminescent properties of *Eysenhardtia Polystachia* and their potential usage as biomarker. *Materials Science & Engineering C*. (16)32185-3. DOI: [10.1016/j.msec.2016.11.047](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.047)

### *Congresos*

María Guadalupe Ferreira García, Martha Elena Cruz Soto, Ángel Ramón Hernández Martínez, Ángel Luis Rodríguez Morales, Francisco Josué López Martínez, Roberto Augusto Ferriz Martínez, Margarita Teresa de Jesús García Gasca, Miriam Rocío Estévez González. SILICA NANOPARTICLES DOPED WITH ISOFLAVONES FROM EYSENHARDTIA POLYSTACHYA TO STUDY THEIR ANTIPROLIFERATIVE EFFECT AND BIOMARKER PROPERTIES IN MCF-7 CELLS. XXIV International Materials Research Congress. 2015.