



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Químicas
Doctorado en Ciencias con mención en Química

**NANOTUBOS DE TiO_2 REDUCIDO COMO POTENCIAL PLATAFORMA
PARA FOTOQUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER**

Por:

ESTEFANÍA VÉLEZ PEÑA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado académico de Doctora en Ciencias con
mención en Química

Profesor Guía: Dr. Cristian H. Campos Figueroa

Profesor Co- Guía: Dr. Joel B. Alderete Triviños

Junio 2024

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Dedicado a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que me acompañaron y contribuyeron durante este camino a mi crecimiento personal y académico, haciendo posible este logro.

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por la Beca Nacional de Doctorado 24210396 y los proyectos FONDECYT 1220674 y 1231352 que financiaron esta tesis doctoral. A la Universidad de Concepción y a sus profesores por proporcionarme herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

Agradezco especialmente a mis directores de tesis, el Dr. Cristian Campos y el Dr. Joel Alderete, por todas sus enseñanzas, su gran contribución a mi formación académica, paciencia y valiosa guía durante estos años. A la Dra. Cecilia Torres por todo su apoyo y gestión cada vez que fue requerido. A los integrantes de NanoBioCat por su acompañamiento y cariño, donde encontré amigos y colegas maravillosos.

A los miembros de la comisión evaluadora por sus aportes constructivos durante el desarrollo del proyecto de tesis. Agradezco con especial cariño a mi tutor de la pasantía doctoral, el Dr. Joaquín Manzo Merino por su disposición, tiempo y cariño, así como a los integrantes del Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos que me integraron de manera muy especial durante mis dos estancias.

Agradezco especialmente a la Dra. Verónica Jiménez por sus consejos en los momentos justos, su apoyo y valiosa contribución en una etapa determinante para llegar a la meta.

Fue crucial la constante motivación y cariño recibido por parte de los doctores Paula Osorio y Julián Rengifo, a quienes admiro y agradezco especialmente por su apoyo tanto académico como afectivo.

A mi familia en Colombia que siempre me brindaron regocijo. La distancia nunca disminuyó el cariño ni el respaldo que siempre me han brindado, especialmente mi mamá que ha sido una fuente de fortaleza. A mi amiga Juli por todo su soporte emocional. A Myle, Laurita y Yadi por su buena energía y cariño que hicieron que todo este proceso de finalizar esta etapa tan importante fuera más amena. A mis amigas y amigos que han hecho parte de este proceso y me han acompañado de alguna forma.

Por último, a mi gran amigo y amor Jaiver Osorio que me apoyó y entendió incondicionalmente. Tu comprensión, soporte y amor en los momentos difíciles fueron fundamentales.

Solo queda por decir, y con el corazón pletórico de emoción: muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
2.1. Hipótesis.....	18
2.2. Objetivo general	18
2.3. Objetivos específicos.....	18
3. METODOLOGÍA	20
3.1. Síntesis de los nanomateriales	20
3.1.1. Preparación de los NRTB y NRTN.....	20
3.1.2. Funcionalización superficial con Ce6.....	21
3.1.3. Funcionalización superficial con TBO.....	22
3.2. Caracterización de los nanomateriales.....	23
3.3. Producción de oxígeno singlete y radicales hidroxilo.	25
3.4. Ensayos de hemólisis	27
3.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga	28
3.6. Estudio de liberación de doxorrubicina <i>in vitro</i>.....	29
3.7. Experimentos de viabilidad celular	29
3.8. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Caracterización de los nanomateriales prístinos.....	33
4.2. Caracterización de los nanomateriales NRTB con Ce6 y TBO.....	41
4.3. Caracterización de los NRTN conjugado con Ce6	46
4.4. Generación de especies reactivas de oxígeno.....	49
4.5. Ensayos de actividad hemolítica	55

4.6. Experimentos de viabilidad celular	56
4.6.1. Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTB/Ce6	58
4.6.2. Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTB/TBO	64
4.6.3 Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTN/Ce6	67
4.7. Capacidad de encapsulación y liberación <i>in vitro</i> de DOX.	71
4.8. Experimentos de quimio-fototoxicidad	78
4.8.1. Experimentos de quimio-fototoxicidad con NRTB y NRTB/Ce6.....	78
4.8.2. Experimentos de quimio-fototoxicidad con NRTN y NRTN/Ce6.....	80
5. CONCLUSIONES	84
6. PRODUCTIVIDAD	87
6.1. Artículos	87
6.2. Participación en eventos	88
7. BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	95
Anexo 1: Imágenes TEM para los nanotubos calcinados a 400°C durante 4 h.....	95
Anexo 2: Isoterma de adsorción y desorción de N ₂ para los NRTB.....	95
Anexo 3: Distribución del tamaño de poro de (A) nanomateriales prístinos y (B) reducidos.	96
Anexo 4: Estimación de band-gap para los NRTB.	96
Anexo 5: Espectro XPS para NRTB y NRTN.	96
Anexo 6: Mediciones de control de experimentos de generación de radicales hidroxilo y oxígeno singlete con NRTB y NRTB/Ce6 bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²). Los experimentos se llevaron a cabo con suspensiones de 2 mg mL ⁻¹ utilizando las sondas fluorescentes HPF (10 μM) y SOSG (40 μM). La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.....	97
Anexo 7: Espectro de emisión de la lámpara de luz LED blanca.....	98
Anexo 8: Experimentos de control de inmunofluorescencia indirecta en oscuridad y luz. Fluorescencia intrínseca del buffer de dilución de anticuerpos en presencia y ausencia del mismo. Se utilizó la detección nuclear DAPI. Las imágenes se recopilaron con el objetivo de 40X.....	98
Anexo 9: Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN (100 μg mL ⁻¹) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) . Se utilizó la detección nuclear DAPI con un canal verde para daño de DNA/RNA y un	

canal rojo para daño de membrana. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X..... 100

Anexo 10: Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}) . Se utilizó la detección nuclear DAPI con un canal verde para HSP72/73 y un canal rojo para apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X..... 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Propiedades texturales de los sólidos prístinos. 35

Tabla 4.2. Encapsulación de DOX en los materiales preparados. 73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de un par electrón-hueco en un semiconductor con posibles trayectorias de desintegración. Adaptado de las referencias [14, 15].....	5
Figura 2. Fotografías y espectros de absorción de nanocristales de TiO ₂ blanco y negro. Tomado de la referencia [20]......	8
Figura 3. Diagrama de Jablonski modificado que muestra el principio de la PDT. Adaptado de la referencia [33]......	11
Figura 4. Estructuras del (A) Chlorin e6 y (B) Toluidine Blue O, fotosensibilizadores de segunda generación.	13
Figura 5. Procedimiento de preparación de nanorods de titanio conjugados con Ce6.	22
Figura 6. Procedimiento de preparación de nanorods de titanio conjugados con TBO.	23
Figura 7. (A) Patrones DRX e (B) imágenes TEM para los materiales prístinos.	34
Figura 8. Ruta de preparación de nanorods de TiO ₂ negro (NRTN).....	36
Figura 9. Difracción de rayos X para los NRTB y reducidos con NaBH ₄ : NRTN.	37
Figura 10. Espectros de reflectancia difusa UV-Vis para NRTB y NRTN.	38
Figura 11. (A) Espectro XPS zonas de alta resolución Ti 2p y (B) Espectro EPR a baja temperatura para para NRTB y NRTN.	39
Figura 12. Análisis FTIR para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.....	42
Figura 13. Análisis termogravimétrico para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.	44
Figura 14. Análisis de DRX para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.	45
Figura 15. Espectros de reflectancia difusa UV-Vis para los NRTB/Ce6 y NRTB/TBO.	46
Figura 16. Caracterización de los NRTN/Ce6 mediante (A) FTIR, (B) TGA y (C) DRS.	48
Figura 17. Detección de (A) ¹ O ₂ con sonda SOSG y (B) radicales HO• con sonda HPF.	50
Figura 18. Detección de ROS para los nanomateriales en base a NRTB bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 W m ⁻²). (A) Generación de ¹ O ₂ y (B) HO•. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando suspensiones de 2 mg mL ⁻¹ utilizando las sondas fluorescentes SOSG (40 μM) y HPF (10 μM), respectivamente. La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.....	52
Figura 19. Detección de ROS para los nanomateriales en base a NRTN bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 W m ⁻²). (A) Generación de ¹ O ₂ y (B) HO•. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando suspensiones de 2 mg mL ⁻¹ utilizando las sondas fluorescentes SOSG (40 μM) y HPF (10 μM), respectivamente. La	

fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.....	53
Figura 20. Experimentos de producción de HO• en suspensiones de NRTN evaluadas mediante spin-trapping utilizando DMPO (40 µM). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando suspensiones sólidas de 4 mg mL ⁻¹ . Datos representativos de n = 3 experimentos independientes.	55
Figura 21. Porcentajes de hemólisis inducidos por (A) NRTB, NRTB/Conjugados (B) NRTN y NRTN/Ce6.....	56
Figura 22. Diagrama esquemático de la biorreducción de MTS por células viables.....	58
Figura 23. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTB/Ce6 (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTB/Ce6 (100 µg mL ⁻¹) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²). Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) canal verde para daño de DNA/RNA y (C.III, CVII) canal rojo para daño de membrana. (C.X, C.XIII) canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.....	61
Figura 24. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTB/TBO (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTB/Ce6 (100 µg mL ⁻¹) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²). Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) canal verde para daño de DNA/RNA y (C.III, CVII) canal rojo para daño de membrana. (C.X, C.XIII) canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.....	66
Figura 25. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTN/Ce6 (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN/Ce6 (100 µg mL ⁻¹) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) . Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) con un canal verde para daño de DNA/RNA y un (C.III, CVII) canal rojo para daño de	

membrana. (C.X, C.XIII) con un canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.	69
Figura 26. Estructura química del clorhidrato de doxorubicina.	72
Figura 27. Perfil de liberación de DOX de los NRTB y NRTB/Ce6.	76
Figura 28. Perfil de liberación de DOX de los NRTN y NRTN/Ce6.	77
Figura 29. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con DOX:NRTB y DOX:Ce6-NRTB. (A) 12 h y (B) 24 h (quimiotoxicidad) (C) 12 h de oscuridad, irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) y oscuridad hasta 24 h (quimio-fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células no tratadas y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.	80
Figura 30. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con formulaciones de DOX:NRTN y DOX:Ce6-NRTN. (A) 12 h y (B) 24 h (oscuridad) (quimiotoxicidad) (C) 12 h de oscuridad, irradiación con luz LED (15 min, 150 W m ⁻²) y oscuridad hasta 24 h (quimio-fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células no tratadas y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

FS	Fotosensibilizador
Ce6	Chlorin e6
TBO	Toluidine blue O
ROS	Especies reactivas de oxígeno
BC	Banda de conducción
PDT	Terapia fotodinámica
PTT	Terapia fototérmica
NRTB	Nanorods de dióxido de titanio blanco
NRTN	Nanorods de dióxido de titanio negro
MSN	Nanopartículas de Sílice Mesoporosas
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
HO•	Radical hidroxilo
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
SOSG	Sensor de Oxígeno Singlete Verde
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
DOX	Doxorrubicina
APTMS	(3-aminopropil)-trimetoxisilano
IPTES	(3-isocianatopropil)-trietoxisilano
NHS	N-hidroxisuccinimida
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida

TEA	Trietilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
HRTEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
XPS	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X
FTIR	Espectroscopia infrarroja
TGA	Análisis termogravimétrico
DRS	Espectroscopia de reflectancia difusa
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
HSP	Proteínas de choque térmico
4-HNE	4-hidroxinonenal
PARP-1	Poli(ADP-Ribosa) polimerasa
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que ha causado una alta tasa de mortalidad alrededor del mundo, por lo que es de vital importancia el desarrollo de diversas estrategias de tratamiento debido al gran impacto que tiene sobre la sociedad. En ese sentido, el uso de nanomateriales ha surgido como un enfoque prometedor para el desarrollo de sistemas con la capacidad de propiciar modalidades de tratamiento combinadas para mejorar la eficacia y superar limitaciones relacionadas a los tratamientos convencionales. Por lo anterior, en la presente tesis doctoral se prepararon nanotransportadores basados en dióxido de titanio (TiO_2) sin reducir y reducido, funcionalizados superficialmente con los fotosensibilizadores Chlorin e6 (Ce6) y Toluidine Blue O (TBO), con capacidad de adsorber fármacos quimioterapéuticos con el propósito de combinar los efectos de la administración de fármacos, mediada por nanomateriales, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), esenciales para la terapia fotodinámica (PDT–*Photodynamic Therapy*), como estrategias para inducir muerte de células cancerosas. La caracterización realizada en las diferentes etapas de preparación de los nanomateriales confirman la obtención de nanorods de TiO_2 que tras ser sometidos al tratamiento térmico con NaBH_4 dan lugar a nanorods de TiO_2 negro (NRTN). Los sistemas que poseen fotosensibilizadores unidos covalentemente a su superficie evidenciaron la generación de ROS,

específicamente $^1\text{O}_2$ y $\text{HO}\cdot$, bajo irradiación con luz LED visible, las cuales fueron detectadas a través de un método fluorimétrico empleando hidroxifenilfloresceína (HPF) y Sensor de Oxígeno Singlete Verde (SOSG), como sensores de $\text{HO}\cdot$ y $^1\text{O}_2$, respectivamente.

Los experimentos de viabilidad celular *in vitro* con células HeLa mostraron que los nanomateriales preparados exhiben actividad fotodinámica cuando se irradian con luz LED visible (150 W m^{-2}), y no son citotóxicos en oscuridad bajo las condiciones evaluadas. Además, los experimentos de encapsulación de doxorubicina (DOX), como fármaco quimioterapéutico modelo, demostraron que las nanoestructuras encapsulan eficazmente DOX y las formulaciones de nanomateriales/DOX muestran efectos quimicitotóxicos en las células HeLa. Los experimentos combinados de quimio-fototoxicidad muestran efectos mejorados en cuanto a la reducción de la viabilidad de las células HeLa, indicando que los NRTN conjugados con fotosensibilizadores son plataformas prometedoras para su uso en terapia combinada inducida por irradiación de luz visible.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases with a high mortality rate worldwide, making the development of various treatment strategies vital due to its significant impact on society. In this sense, nanomaterials have emerged as a promising approach for developing systems that can promote combined treatment modalities to improve efficacy and overcome the limitations of conventional treatments.

In this work, nanocarriers based on unreduced and reduced titanium dioxide (TiO_2) were prepared and superficially functionalized with the photosensitizers Chlorin e6 (Ce6) and Toluidine Blue O (TBO). These nanocarriers can adsorb chemotherapeutic drugs, combining the effects of nanomaterial-mediated drug delivery with the production of reactive oxygen species (ROS), essential for photodynamic therapy (PDT) to induce cancer cell death. The characterization during the preparation stages confirmed the formation of TiO_2 nanorods; precursors used to produce black TiO_2 nanorods (NRTN) after thermal treatment with NaBH_4 . The systems covalently conjugated with photosensitizers generated $^1\text{O}_2$ and $\text{HO}\cdot$ under visible LED light irradiation. These species were detected using a fluorimetric method with Hydroxyphenyl fluorescein (HPF) and Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) as sensors for $\text{HO}\cdot$ and $^1\text{O}_2$, respectively.

In vitro cell viability experiments with HeLa cells showed that the prepared nanomaterials exhibited photodynamic activity when irradiated with visible LED light (150 W m^{-2}) and were non-cytotoxic in darkness under the tested conditions. Furthermore, encapsulation experiments with doxorubicin (DOX), a model chemotherapeutic drug, demonstrated that the nanostructures effectively encapsulated DOX. The nanomaterials/DOX formulations exhibited chemocytotoxic effects on HeLa cells. Combined chemo-phototoxicity experiments showed enhanced effects in reducing HeLa cell viability, indicating that NRTNs conjugated with photosensitizers are promising platforms for combined therapy induced by visible light irradiation.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer figura como una de las principales causas de muerte, con tendencia a un aumento continuo tanto en la incidencia como en la mortalidad. Según las estadísticas mundiales del cáncer en el año 2022 se presentaron 20.0 millones de casos nuevos en todo el mundo y 9.7 millones de muertes por cáncer en el mismo año, lo que representa un desafío crítico para la salud pública en todo el mundo [1]. En ese sentido, se han empleado diferentes enfoques de tratamiento, los más convencionales son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía, las cuales además se utilizan de manera combinada de acuerdo con el tipo de cáncer y su localización [2]. Entre los tratamientos convencionales, la quimioterapia es la más utilizada y consiste en la administración de medicamentos para inhibir la proliferación de células cancerosas. Si bien se han logrado resultados satisfactorios, siguen prevaleciendo problemas como las altas toxicidades que presentan para los tejidos normales, la resistencia hacia las drogas por parte del organismo y la necesidad de suministrar altas dosis para un tratamiento eficaz, debido a que diversos medicamentos no alcanzan los niveles requeridos, donde se necesitan, para ejercer su acción terapéutica pues poseen una rápida eliminación por parte del organismo [3, 4]. Por lo anterior, es crucial fomentar el desarrollo de estrategias alternativas con mejores respuestas terapéuticas contra las enfermedades oncológicas.

Actualmente se exploran estrategias de tratamiento combinadas para abordar los inconvenientes terapéuticos asociados a las terapias convencionales y de esta forma mejorar la eficacia del tratamiento al fomentar efectos aditivos o sinérgicos para obtener los resultados deseados [5]. Entre las estrategias combinadas, la quimio-fototerapia es una alternativa prometedora en el tratamiento del cáncer, ya que considera los efectos anti proliferativos de agentes quimioterapéuticos comunes y el empleo de la fototerapia que es una modalidad menos invasiva, con menos efectos secundarios, que podría tener selectividad hacia el sitio diana (por ejemplo, un tumor), ya que es posible irradiar con luz específicamente la zona deseada. Este tipo de terapia involucra el empleo de un agente fotoactivo con capacidad de inducir muerte de células cancerosas bajo irradiación sin causar daños considerables en la oscuridad. De manera general, la fototerapia incluye la terapia fotodinámica (PDT) que consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inhiben la proliferación de células cancerosas debido a la irradiación de una especie fotoactiva como un fotosensibilizador (FS) a una longitud de onda específica en presencia de oxígeno molecular [6] o la terapia fototérmica (PTT) que busca aumentar la temperatura irradiando un agente fotoabsorbente que provoca la ablación térmica de las células cancerosas y la posterior muerte celular [7].

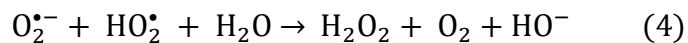
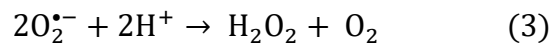
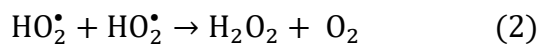
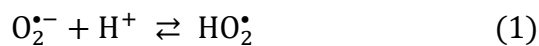
En ese sentido, los nanomateriales se han convertido en buenos candidatos como plataformas potenciales para tales propósitos. En particular, las nanoplataformas de dióxido de titanio (TiO_2) han atraído especial atención debido

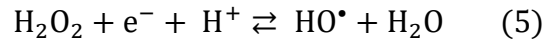
a su estabilidad química, biocompatibilidad, propiedades ópticas y versatilidad para la modificación superficial [8], estas características las postulan como una excelente opción para ser utilizadas como nanotransportadores con capacidad de encapsular o conjugar fármacos y agentes fotoactivos. Múltiples estudios han utilizado materiales basados en TiO_2 como nanotransportadores de fármacos [9-11]. Por ejemplo, trabajos previos han demostrado las propiedades prometedoras de los nanotubos de TiO_2 modificados con polímeros para aplicaciones de administración de fármacos utilizando curcumina (CUR), metotrexato (MTX) y silibinina (SIL) como compuestos terapéuticos modelos [12]. Además, el uso de nanovehículos podría promover la acumulación significativa del fármaco en el tejido tumoral a través del efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR effect) [13].

El TiO_2 es un semiconductor ampliamente utilizado en procesos fotocatalíticos, por cual sería posible propiciar su uso en tratamiento combinado del cáncer mediados por luz, a través de procesos fotodinámicos o fototérmicos. En la figura 1 se ilustra el mecanismo mediante el cual el TiO_2 puede actuar como agente fotodinámico por medio de la producción de ROS. Tras la absorción de un fotón (con energía igual o superior a la banda prohibida del TiO_2 de 3.0 – 3.2 eV) electrones de la banda de valencia son fotopromovidos a la banda de conducción (BC), dejando un hueco en la banda de valencia y formando los denominados pares electrón-hueco [14]. Una parte de estos portadores de carga se recombinan mediante un proceso no radiativo con la subsecuente liberación de

calor y dejando solo un 10% de ellos disponibles para ser atrapados en sitios específicos de la superficie del TiO₂, como pueden ser sitios pentacoordinados de Ti⁴⁺ para electrones generando sitios Ti³⁺ o grupos (Ti-OH) para huecos.

Una vez atrapados en la superficie, estos portadores de carga pueden participar en reacciones de transferencia de carga con aceptores o donores de electrones que pueden o no estar previamente adsorbidos en la superficie del óxido. Por ejemplo, los electrones en la BC, los cuales exhiben un potencial redox de -0.51 V (vs. ENH a pH 7.0), pueden termodinámicamente reducir el oxígeno molecular (-0.33 V vs. ENH) al radical superóxido O₂^{•-}. Esta especie puede protonarse para formar el radical perhidroxilo de acuerdo con el equilibrio ácido-base con pKa=4.8 (Reacción 1) y tiende a dismutarse hacia la generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como se observa en las reacciones (2-4) [15, 16]. Este a su vez, puede ser reducido a radical hidroxilo (HO•) (+0.39 V vs. ENH a pH 7.0) por los electrones fotogenerados en la superficie del TiO₂ como se observa en la figura 1 (Reacción 5).





Por otro lado, los huecos en la banda de valencia poseen el potencial redox suficiente (+2.70 V vs. ENH a pH 7.0) para oxidar moléculas de agua (+2.31 V vs. ENH a pH 7.0) generando HO^\bullet y la dimerización éstos radicales también pueden conducir a la generación de H_2O_2 . A su vez, el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ también puede participar en la oxidación favorecida por los huecos fotoinducidos para generar oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (+0.64 V) [17, 18].

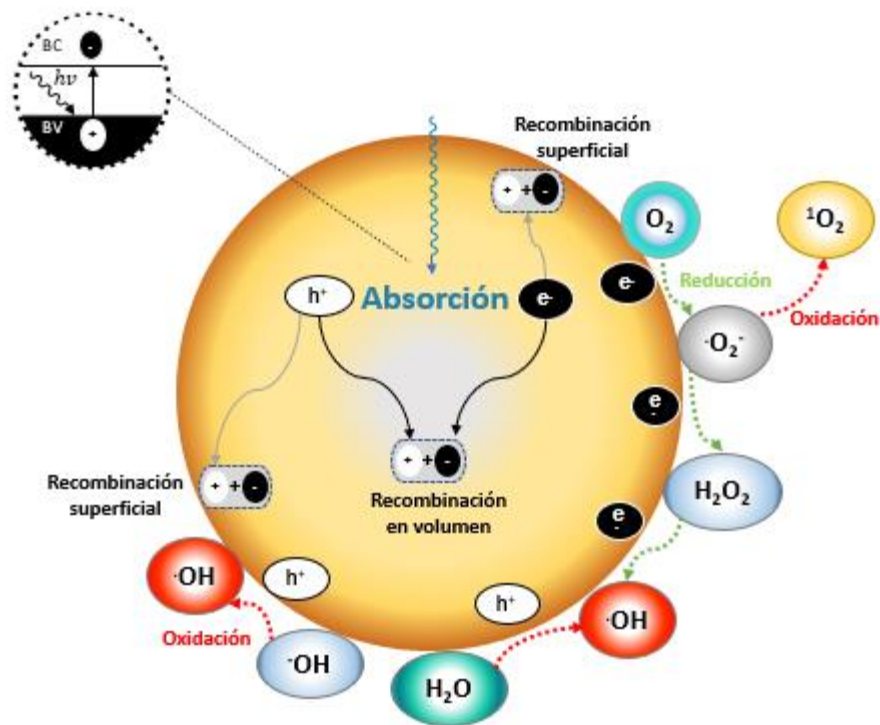
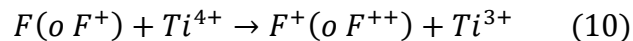
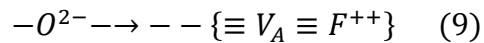
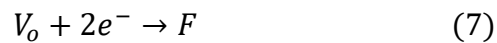
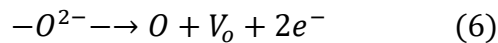


Figura 1. Formación de un par electrón-hueco en un semiconductor con posibles trayectorias de desintegración. Adaptado de las referencias [14, 15]

A pesar de estas características prometedoras, el TiO_2 presenta algunos inconvenientes para su aplicación en estrategias mediadas por luz para el tratamiento del cáncer. Debido a su elevada banda prohibida sólo permite la absorción de luz ultravioleta. Además la luz UV induce daño a los componentes biológicos de las células y posee una penetración limitada en los tejidos debido a la absorción significativa de luz por parte de los componentes tisulares en esa región del espectro [19]. Para superar estas desventajas, se han utilizado diferentes estrategias de modificación de los nanomateriales de TiO_2 para extender su absorción de luz desde la región ultravioleta del espectro hasta las regiones visible e infrarrojo. En ese sentido, ha sido de gran interés la preparación de TiO_2 negro que contiene una cantidad sustancial de defectos de superficie y tiene la capacidad para absorber luz visible. El primer reporte realizado sobre este material fue en 2011, Chen y colaboradores informaron sobre la síntesis y aplicaciones fotocatalíticas impulsadas por la luz solar de nanocristales negros de TiO_2 , que exhibieron absorción desde el ultravioleta al infrarrojo cercano (figura 2) debido a la introducción de desorden en las capas superficiales del nanomaterial a través de la hidrogenación (tratamientos de reducción) [20]. Desde entonces, se ha reportado en la literatura varios estudios relacionados a la síntesis de este tipo de nanomateriales, comúnmente denominados *black titania*, en diferentes condiciones, como flujos de H_2 (Ar o N_2) diluidos [21, 22]. Otras estrategias también evaluadas son (i) la descomposición térmica de

borohidruro de sodio (NaBH₄) para generar H₂ *in situ* y (ii) el tratamiento con gases nobles que actúan como reductores especiales [23, 24].

Estos procesos conducen a la formación de defectos superficiales como vacancias de oxígeno (V₀) (también conocidos como centros de color). Al generar una V₀ en un óxido metálico, el par de electrones en la cavidad de V₀ originan un centro F, V₀ asociadas a un solo electron (F⁺) o (F⁺⁺) sin electrones como se observan en las reacciones 7-10 conocidos como centros de color. Por su parte, los electrones en la cavidad de V₀ pueden interactuar con iones Ti⁴⁺ adyacentes para dar sitios Ti³⁺ [25].



Estos defectos V₀ y especies de Ti³⁺ han sido asociados como responsables del desplazamiento de la absorción de luz a longitudes de onda mayores a 400 nm debido a que generan estados localizados cercanos a la BC y permiten el corrimiento en la absorción de estos materiales [26, 27] .

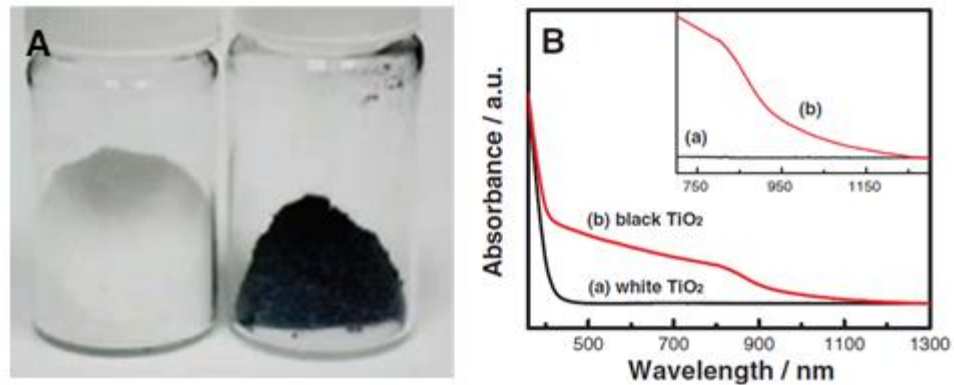


Figura 2. Fotografías y espectros de absorción de nanocrisales de TiO_2 blanco y negro. Tomado de la referencia [20].

Recientemente, algunos trabajos han explorado el uso de nanoestructuras basadas en titanio negro en aplicaciones de fototerapia. En ellos se ha evaluado el efecto fototóxico *in vitro* de nanopartículas negras de TiO_2 con absorción de luz visible e infrarroja cercana, mostrándose que el sistema es capaz de causar la muerte de células cancerosas de vejiga [28]. Liu y sus colaboradores reportaron una plataforma basada en nanopartículas negras de TiO_2 decoradas con aza-boro-dipirrometenos (aza-BODIPY) para mejorar la respuesta fotodinámica y fototérmica bajo irradiación láser NIR a 808 nm. Estos autores evaluaron los efectos fototerapéuticos *in vitro* e *in vivo*, obteniendo una eficiencia significativa en la disminución de la viabilidad celular y eliminación de tumores debido a los efectos sinérgicos de la PDT y la terapia fototérmica (PTT) [29]. Se han diseñado otras plataformas recubriendo nanopartículas negras de TiO_2 con polidopamina (PDA), para promover un mayor rendimiento fototérmico, y se han

acoplado a quelatos de chlorin-e6/ Mn^{2+} para evaluar su potencial utilización en PDT, probándose efectos duales fototérmicos (PTT)/fotodinámicos (PDT) bajo irradiación láser de 808 nm y 671 nm [29]. Otras aplicaciones exploradas con materiales basados en TiO_2 negro incluyen plataformas teranósticas en el tratamiento y detección del cáncer. Específicamente, Saeed *et al.* propusieron una estrategia versátil para mejorar la eficacia de la fototerapia con nanocompositos negros de $Fe_3O_4-TiO_2$ y para la fototerapia dual PDT/PTT guiada por imágenes [30]. Con base en los antecedentes presentados, fue de interés modificar los nanomateriales de TiO_2 blancos para extender su absorción de luz hacia la región visible del espectro, empleando un método de reducción en seco con $NaBH_4$ y calentamiento en atmósfera de Ar, que será descrito posteriormente con más detalle, para obtener nanomateriales de TiO_2 negro, siendo un método muy práctico, pues implica un tratamiento térmico en condiciones suaves ≤ 400 °C [31].

Entre otras estrategias que se han desarrollado para extender la absorción de luz del TiO_2 hacia la luz visible incluye la modificación de la superficie de nanopartículas de TiO_2 con un fotosensibilizador (FS), proceso conocido como *dye-sensitized*, el cual se puede llevar a cabo mediante acoplamiento covalente o no covalente de estos FS [32]. Además, la funcionalización de la superficie del nanomaterial de TiO_2 negro con FS podría potenciar la capacidad de producción de ROS de los sistemas, para su potencial uso en PDT empleando luz visible. La PDT es una modalidad de tratamiento que combina los procesos fotofísicos y

fotoquímicos que puede conducir un efecto biológico [33]. En la Figura 3 se ilustra su principio: al irradiar un FS en estado fundamental a una longitud de onda específica este absorbe energía y pasa de un estado singlete (S_0) a un estado singlete excitado, que presenta un tiempo de vida muy corto en el orden de nano a picosegundos, el cual puede desactivarse de manera radiativa en un proceso conocido como fluorescencia o no radiativa a través de conversión interna (CI). Alternativamente, desde el estado excitado (S_1) puede ocurrir un cruce entre sistemas a un estado triplete excitado de mayor tiempo de vida (orden de microsegundos) debido a que su proceso de desactivación al estado fundamental involucra una transición prohibida por espín. A partir del estado T_1 se puede liberar energía mediante el proceso radiativo fosforescencia o un decaimiento no radiativo (cruce entre sistemas, ISC), alternativamente el $^3FS^*$ puede reaccionar con sustratos celulares mediante transferencia de electrones permitiendo la formación de especies radicalarias (HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$), esta ruta se denomina reacción tipo I. Por otro lado, el $^3FS^*$ puede transferir energía al oxígeno molecular en estado triplete fundamental formando oxígeno singlete (1O_2), proceso conocido como reacción tipo II. Todas las especies reactivas formadas, ya sea por vía tipo I o II, pueden dar como resultado un incremento del estrés oxidativo en la célula desencadenando la muerte de las células cancerosas [33, 34].

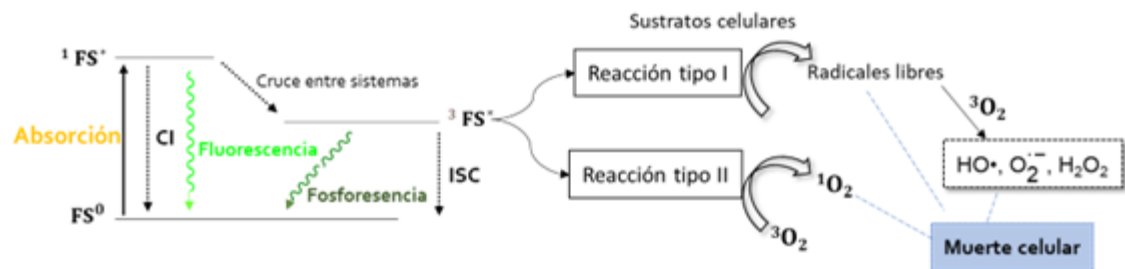


Figura 3. Diagrama de Jablonski modificado que muestra el principio de la PDT. Adaptado de la referencia [33].

Es importante considerar que el rol del TiO_2 tras ser modificado con un FS podría presentar modificaciones con respecto al mecanismo de formación de ROS bajo irradiación de luz. Diversos reportes realizados de sistemas basados en TiO_2/FS han propuesto que el TiO_2 participa en la producción de ROS mediante transferencia electrónica con el FS excitado [35, 36]. De manera general, tras la irradiación de los sistemas FS/TiO_2 con luz visible es posible promover al fotosensibilizador a un estado excitado singlete, como se había comentado previamente, a partir del cual se puede generar el proceso de inyección de electrones a la BC. Para que esta transferencia ocurra debe ser termodinámicamente favorable, es decir que el potencial de reducción de la BC debe ser más positivo. Como se había mencionado anteriormente, los electrones transferidos a la BC puede participar en reacciones de oxidación-reducción con moléculas de oxígeno adsorbidas para generar ROS. Por otra parte, no puede excluirse la posible contribución del FS para la formación del $^1\text{O}_2$ y otras ROS

mediante las reacciones fotoquímicas tipo I y II que en estos estudios se menciona de manera breve.

Hay características importantes que debe cumplir un FS para aplicaciones en PDT: se debe acumular en tejidos tumorales y eliminarse rápidamente de los tejidos normales, presentar en su estructura simultáneamente algún grado de carácter hidrofílico que facilite su distribución en los tejidos y carácter lipofílico que permita su unión a las células objetivo, no ser tóxico en oscuridad, poseer alto rendimiento cuántico en la formación del estado triplete, para hacer posible la producción de especies reactivas de oxígeno, y además ser activo en longitudes de onda que permitan la penetración profunda en los tejidos [37]. Para este fin, se han desarrollado gran variedad de fotosensibilizadores con el propósito de emplearlos para el tratamiento del cáncer, los cuales pueden ser clasificados en distintas generaciones. La primera generación incluye los fotosensibilizadores basados en porfirinas, derivados de hematoporfirina y porfímeros de sodio, uno de ellos llamado *Photofrin* fue el primer FS aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y ha sido ampliamente usado en diversos estudios clínicos. En uno de ellos se empleó para tratar pacientes con cáncer de esófago y se encontró que más del 80% lograron buenos resultados terapéuticos [38]. Sin embargo, los FS de esta generación presentan bajos coeficientes de extinción por lo que se requiere la administración de una cantidad grande del mismo para obtener una respuesta fototerapéutica deseada [37] y

tienden a acumularse en la piel, provocando fotosensibilización de la misma durante un tiempo prolongado [39].

La segunda generación son compuestos macrocíclicos derivados de sustituciones de porfirina, modificaciones en el cuerpo de la porfirina o incluso moléculas con diferente estructura de base [34], algunos ejemplos son: ftalocianina, chlorin, porficceno, hipericina, fenotiazina, entre otros. De manera general, presentan una absorción a longitudes de onda mayores a 630 nm, altos coeficientes de extinción, mayor formación de $^1\text{O}_2$ comparado con los FS de la primera generación lo que conlleva a una mayor eficiencia en el tratamiento del cáncer [37].

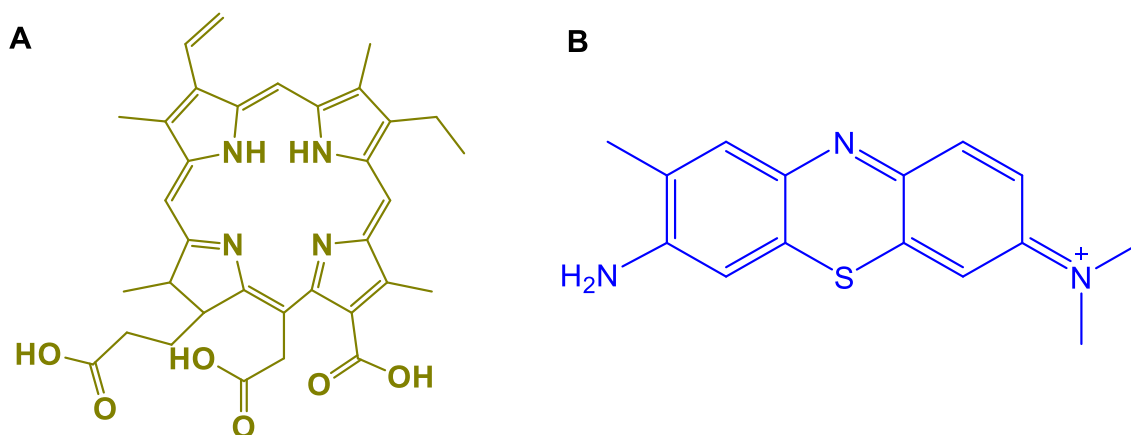


Figura 4. Estructuras del (A) Chlorin e6 y (B) Toluidine Blue O, fotosensibilizadores de segunda generación.

La selección del FS es un factor muy importante, en ese sentido hay diversos reportes sobre las propiedades fotoquímicas y los avances que han presentado,

algunos de ellos, con respecto a su uso con fines terapéuticos. Por ejemplo, Toluidine Blue O (TBO) es un FS de segunda generación, el cual es una fenotiazina catiónica de bajo costo que presenta una baja energía de excitación a una longitud de onda de 630 nm, coeficiente de extinción elevado, que según los reportes es $7.4 \times 10^4 \pm 0.9 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y rendimiento cuántico de oxígeno singlete en etanol de 0.44 ± 0.03 [40]. De manera interesante se ha encontrado que TBO tiene una alta afinidad por los ácidos nucleicos del DNA y reactividad con proteínas y lipoproteínas constituyentes de las membranas celulares [41, 42]. Estas características ha promovido la realización de diversos estudios que sobre el rol del TBO en la fotooxidación de membranas bacterianas, su capacidad de inactivación de microorganismos y su acumulación en células cancerosas *in vivo* [40, 41]. Por otra parte, *chlorin e6* (Ce6) es otro FS de segunda generación aprobado por la FDA el cual ha sido empleado en diversos estudios clínicos para múltiples tipos de cáncer mostrando propiedades terapéuticas prometedoras [43, 44], presenta un máximo de absorción a 650 nm y su estructura se puede observar en la figura 4. La solubilidad de este FS en condiciones fisiológicas es muy baja, debido a su anillo de porfirina que se encuentra unido a grupos alquilo en un extremo de la molécula confirmando naturaleza hidrófoba a la misma. En el otro extremo de la estructura se encuentran unidos tres ácidos carboxílicos, que pueden estar en diferentes formas iónicas de acuerdo con el pH de la disolución, por lo que podría, en principio, afectar las propiedades fotoquímicas para la producción de $^1\text{O}_2$. De hecho, en un estudio realizado los rendimientos cuánticos

para la formación de $^1\text{O}_2$ a pH 8.5, 7.4 y 6.3 fueron 0.67 ± 0.07 , 0.60 ± 0.06 , 0.50 ± 0.05 respectivamente, mostrándose que hay dependencia del rendimiento cuántico con el pH debido a la agregación de las moléculas del FS en rangos más ácidos según los resultados de dicho estudio [45]. Para poder dotarlo de mayor versatilidad en diversas aplicaciones biomédicas Ce6 ha sido encapsulado o inmovilizado en nanomateriales con el fin de que ejerza su acción fotodinámica en conjunto con los nanomateriales. Zhao y colaboradores desarrollaron micelas multifuncionales a base de quitosano con un núcleo hidrófobo en medios acuosos, que sirve para cargar Ce6 para PDT guiada por imágenes de resonancia magnética [46]. Los resultados indicaron una PDT eficaz guiada por resonancia magnética en células 4T1 y un modelo de tumor 4T1 *in situ*. Otros estudios han inmovilizado Ce6 en nanoplataformas basadas en TiO_2 para PDT. Por ejemplo, Youssef y colaboradores demostraron la eficacia de los sistemas Ce6 acoplados covalentemente a nanopartículas de TiO_2 en aplicaciones de PDT utilizando células de glioblastoma U87. La irradiación con un sistema de láser de diodo de 652 nm disminuyó la viabilidad celular en un 89% en las células contactadas con dispersiones de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los nanomateriales (equivalente a una concentración de Ce6 en el medio de $0.22 \mu\text{mol L}^{-1}$), mientras que Ce6 solo, para obtener una citotoxicidad similar, requiere una concentración de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ [47]. Jiao y colaboradores reportaron el uso de NP de TiO_{2-x} parcialmente reducidas y la posterior conjugación covalente de Ce6, que permiten, mediante radiación láser NIR, la terapia combinada PTT/PDT tanto a

nivel celular como en modelos animales [48]. Estos antecedentes demuestran el efecto beneficioso del uso de sistemas basados en TiO_2 fotosensibilizado con moléculas que poseen actividad PDT.

Con base en los antecedentes discutidos, en particular los resultados reportados por Jiao y colaboradores, se desarrolló la investigación, abordada en esta tesis doctoral, que se basó en la preparación de nanomateriales mesoporosos de TiO_2 a través síntesis hidrotérmica. Estos materiales se emplearon como precursores para la preparación de TiO_2 negro empleando la reducción térmica asistida por NaBH_4 bajo atmósfera de Ar. El nanomaterial TiO_2 pristino fue modificado superficialmente con Ce6 y también con TBO a través de agentes de acoplamiento tipo silano tales como (3-aminopropil)-trimetoxisilano y (3-isocianatopropil)-trietoxisilano que permitieron la formación de un enlace covalente entre la superficie del nanotransportador y el FS. Luego, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y su actividad fotodinámica con el fin de determinar cuál de los dos FS mostraba la mejor respuesta fotodinámica. Ce6 se eligió para ser inmovilizado en la superficie de TiO_2 negro y así evaluar la actividad quimio-fototerapéutica de los materiales basados en TiO_2 negro. Todos los sistemas preparados fueron caracterizados empleando diferentes técnicas fisicoquímicas. Como el objetivo central de esta propuesta se basó en obtener sistemas como potencial plataforma para foto-quimioterapia del cáncer se

empleó el fármaco doxorubicina (DOX), como droga modelo, para evaluar la capacidad de encapsulación/liberación por parte de los materiales sintetizados, y el potencial fototerapéutico se evaluó a través de la medición de ROS bajo irradiación con luz LED visible.

Los experimentos de viabilidad celular *in vitro* con células HeLa mostraron que los materiales preparados no son citotóxicos en oscuridad y los nanomateriales de TiO₂ negro, prístinos y conjugados con FS, exhibieron actividad fotodinámica cuando se irradian con luz LED visible. Los experimentos de carga de fármacos demostraron que las nanoestructuras encapsulan eficazmente DOX y las formulaciones obtenidas de nanomateriales/DOX evidenciaron efectos quimioterapéuticos en las células HeLa. Los experimentos combinados de quimio-fototoxicidad muestran efectos mejorados sobre la reducción en la viabilidad de las células HeLa, lo que indica que los sistemas conjugados son prometedores para su uso en terapia combinada inducida por irradiación de luz LED visible.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Materiales con base a nanotubos de TiO_2 reducido conjugados con fotosensibilizadores *toluidine blue O* (TBO) y *chlorine e6* (Ce6) serán activos en foto-quimioterapia para el tratamiento del cáncer empleando un fármaco encapsulado y luz LED como fuente lumínica. El nanotubo de TiO_2 reducido permitirá liberar de manera controlada al fármaco de uso típico en quimioterapia y la presencia de los sitios Ti^{3+} en conjunto con la inmovilización de los fotosensibilizadores actuarán de manera sinérgica en la acción fotodinámica como estrategia para inducir muerte de células cancerosas.

2.2. Objetivo general

Sintetizar nanotransportadores con base a nanotubos de TiO_2 reducidos funcionalizados con fotosensibilizadores tales como TBO y Ce6 para ser evaluados como agentes fotoquimioterapeúticos para el tratamiento del cáncer.

2.3. Objetivos específicos

- Preparar nanotubos de TiO_2 y someterlos a un tratamiento de reducción química.
- Funcionalizar la superficie de los nanotubos de TiO_2 reducidos con TBO y Ce6.

- Caracterizar fotoquímica y fisicoquímicamente los sistemas preparados durante cada etapa de síntesis.
- Evaluar la capacidad de los sistemas preparados para la encapsulación y liberación controlada de doxorubicina.
- Evaluar la viabilidad celular de los sistemas preparados en cultivos de células cancerosas del tipo HeLa.
- Establecer las condiciones óptimas de los ensayos *in vitro* de terapia fotodinámica, quimioterapia y combinada.

3. METODOLOGÍA

3.1. Síntesis de los nanomateriales

3.1.1. Preparación de los NRTB y NRTN

Para preparar la nanoestructura pristina se empleó un método hidrotermal reportado previamente por nuestro grupo de investigación [12] en el cual se dispersaron 2.5 g de nanopartículas de TiO₂-anatasa en 125 mL de una disolución 10 mol L⁻¹ de NaOH con calentamiento de la mezcla en un reactor a 110 °C durante 24 h con agitación constante. El sólido resultante se lavó con abundante agua destilada y se adicionó en una solución 0.1 mol L⁻¹ de HNO₃ la cual permaneció durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó nuevamente el sólido con agua destilada y los nanotubos obtenidos se secaron a temperatura ambiente durante la noche y seguidamente a 100 °C durante 12 h y finalmente fueron calcinados a 500 °C por un periodo de 2.5 h obteniendo nanorods de dióxido de titanio blanco (NRTB).

Seguidamente se realizó el tratamiento de reducción mezclando los NRTB con NaBH₄ (proporción 1:1) a temperatura ambiente y la mezcla homogénea obtenida se transfirió a un reactor de calcinación en atmósfera de argón el cual fue calentado a 10 °C/min hasta 400 °C durante 1 h. El sólido negro obtenido se lavó exhaustivamente con agua desionizada y etanol para eliminar el NaBH₄ sin reaccionar [31] obteniéndose los nanorods de dióxido de titanio negro (NRTN).

3.1.2. Funcionalización superficial con Ce6

La superficie de nanomateriales prístinos (NRTB y NRTN) se funcionalizó con Ce6 utilizando (3-aminopropil)-trimetoxisilano (APTMS). Para ello, se dispersaron 1.0 g de los nanorods (según el caso) en 50 mL de tolueno seco, luego se añadieron a la mezcla 3.7 mmol de APTMS y se calentó a reflujo durante 24 horas. Las nanoestructuras fueron centrifugadas y lavadas exhaustivamente con tolueno y acetona. Luego, se secaron en una estufa de vacío a 50 °C durante 24 horas para obtener NRTB y NRTN con grupos superficiales NH₂ (NRTB/APTMS y NRTN/APTMS) que se utilizaron para el acoplamiento de Ce6. Para la activación del fotosensibilizador, se mezclaron 0.05 mmol de Ce6 y 0.072 mmol de trietilamina (TEA) en 10 mL de dimetilsulfóxido seco (DMSO). La mezcla se agitó durante dos horas a 37 °C, después de lo cual se añadieron 0.10 mmol de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0.12 mmol de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). La solución se mantuvo a 37 °C en la oscuridad durante 12 h y se filtró a través de un diámetro de poro de 0.22 µm. Finalmente, se dispersaron 1.0 g de los nanorods con grupos NH₂ superficiales en 10 mL de tampón Na₂CO₃/NaHCO₃ (0.016 mol L⁻¹, pH 9.0). Luego, se añadió la solución con Ce6 obtenida en el proceso de activación y se agitó en oscuridad durante dos horas. Los productos finales se dializaron durante 48 h frente a agua destilada para eliminar el Ce6 que no había reaccionado. El material conjugado con Ce6 se centrifugó y se secó a 40 °C durante 72 h.

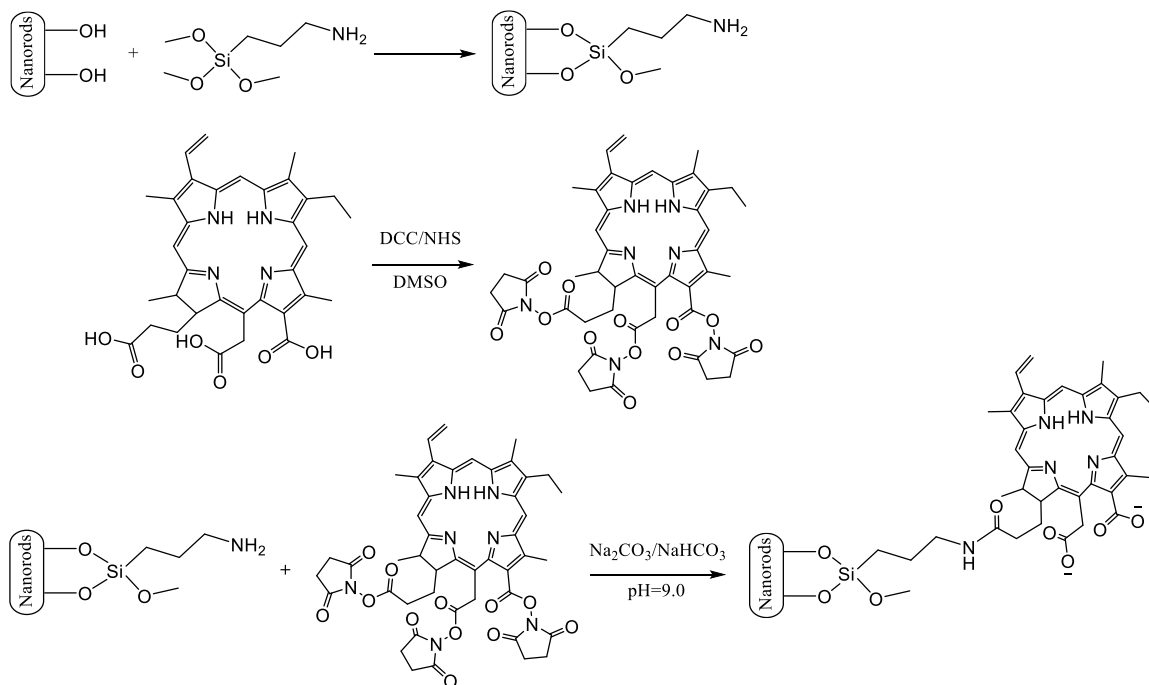


Figura 5. Procedimiento de preparación de nanorods de titanio conjugados con Ce6.

3.1.3. Funcionalización superficial con TBO

La funcionalización de los NRTB se realizó como se describe de manera esquemática en la figura 6. Primero se dispersaron 1.0 g de los NRTB en 50 mL de tolueno seco; posteriormente, se añadieron 4.5 mmol de (3-isocianatopropil)-tri-etoxisilano (IPTES) como agente de acoplamiento y se sometió la mezcla a calentamiento en reflujo durante 24 h. Los nanotubos modificados se centrifugaron y lavaron exhaustivamente con tolueno y acetona para finalmente secarse en un horno de vacío a 50 °C durante 24 h.

El sólido modificado con el agente de acople se disolvió en acetona para formar una dispersión y posteriormente se adicionó TBO previamente disuelto en acetona y se mantuvo en agitación a oscuridad durante 2 h. Los productos finales resultantes se sometieron a diálisis durante 48 h frente a agua destilada para eliminar el TBO sin reaccionar de los materiales. El material conjugado con TBO se centrifugó y se secó a 40 °C durante 72 h.

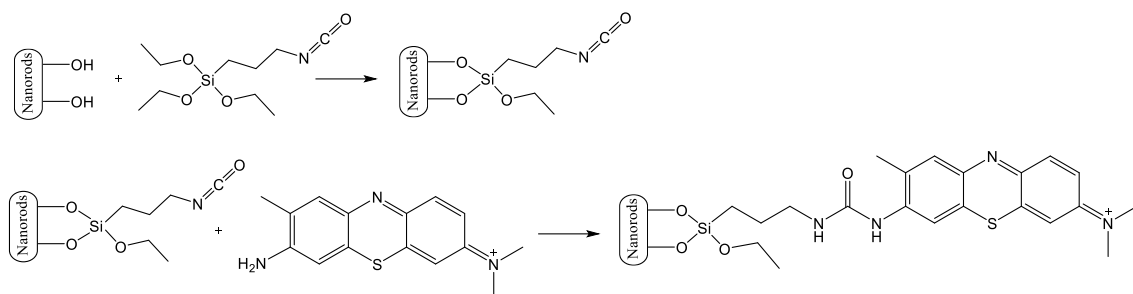


Figura 6. Procedimiento de preparación de nanorods de titanio conjugados con TBO.

3.2. Caracterización de los nanomateriales

Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ a 77 K se realizaron en un equipo Micromeritics TriStar II 3020. La superficie específica se determinó mediante la ecuación BET (Brunauer-Emmett-Teller), utilizando datos de adsorción en un rango de presión relativa entre 0.05 y 0.3, las distribuciones de tamaño de poro se estimaron utilizando el método BJH. Para tales estimaciones, las muestras se desgasificaron a 120 °C durante 3 h. La morfología y el tamaño de las nanoestructuras se examinaron mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando un modelo JEOL JEM-1200 EXII. Los patrones

de DRX se registraron en un difractor Rigaku D/max-2500 con radiación Cu K α a 40 kV y 100 mA. Se llevaron a cabo medidas de los espectros de reflectancia difusa, los cuales fueron registrados en un rango espectral de 200 a 900 nm para estimar la banda prohibida de los NRTB y la respuesta a luz visible de los materiales reducidos y conjugados con los fotosensibilizadores con muestras en polvo. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution 260 equipado con una lámpara de flash de xenón y una esfera integradora de 60 mm con recubrimiento Spectralon®. Las mediciones de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) se realizaron utilizando un espectrómetro electrónico VG Escalab 200R equipado con un analizador de electrones hemisférico y una fuente de rayos X de Mg K α (1253,6 eV). Se llevaron a cabo experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a baja temperatura con un espectrómetro (Bruker EMX que opera en la banda X (frecuencia ~9,5 GHz)) utilizando nitrógeno líquido (99,999%) para mantener la temperatura a 77 K. La unión de los fotosensibilizadores fue confirmada a través de mediciones de espectroscopía infrarroja (FTIR) que se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer 1760-X utilizando un rango de 4000–400 cm⁻¹ y gránulos de KBr. Por su parte, el grado de conjugación se estimó a partir de experimentos de análisis termogravimétrico (TGA) empleando un NETZSCH TG 209F3 con un flujo de O₂ de 25 mL min⁻¹ y una velocidad de calentamiento de 25 a 600 °C.

3.3. Producción de oxígeno singlete y radicales hidroxilo.

La generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) se detectó mediante sondas fluorescentes disponibles comercialmente, como el sensor de oxígeno singlete verde (SOSG) y la hidroxifenilfluoresceína (HPF), respectivamente [49]. En el primer caso, se agregaron 5 μL de una solución de SOSG en metanol de 2 mmol L^{-1} a 100 μL de las suspensiones de los sólidos a 2 mg mL^{-1} en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una placa de 96 pocillos. Se realizaron experimentos de control utilizando PBS a pH 7.4 en presencia de la solución metanólica SOSG para evaluar la capacidad intrínseca de estos sistemas para inducir la generación de $^1\text{O}_2$ en las mismas condiciones experimentales. Además, se utilizaron 100 μL de las dispersiones de nanomateriales sin agregar el reactivo SOSG para confirmar la ausencia de señales de emisión de fluorescencia de los sólidos. Los sistemas se irradiaron con una fuente de luz LED (150 W m^{-2}) en intervalos de 3 a 60 minutos, después de lo cual se leyó la intensidad de la fluorescencia utilizando filtros de excitación/emisión de 488 nm y 525 nm, respectivamente. Por otro lado, se utilizó un protocolo similar para detectar $\text{HO}\cdot$. Para ello, se agregaron 5 μL de una solución acuosa de HPF de 210 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 100 μL de las suspensiones de los sólidos a 2 mg mL^{-1} en PBS en una placa de 96 pocillos. Se llevaron a cabo experimentos de control utilizando PBS a pH 7.4 en presencia de la solución acuosa de HPF para evaluar la capacidad intrínseca de estos sistemas para inducir la generación de $\text{HO}\cdot$ en las mismas condiciones experimentales.

Además, se utilizaron dispersiones de nanomateriales de 100 μL sin agregar el reactivo HPF para confirmar la ausencia de señales de emisión de fluorescencia derivadas de los nanomateriales. Los sistemas se irradiaron con una fuente de luz LED (150 W m^{-2}) en intervalos de 3 a 60 minutos, después de lo cual se leyó la intensidad de la fluorescencia utilizando filtros de excitación/emisión de 488 nm y 525 nm, respectivamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando un lector de placas múltiples POLARstar Omega (BMG Labtech).

La producción de $\text{HO}\cdot$ en los sistemas estudiados en PBS a pH 7.4 fue corroborada usando EPR, empleando 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) como spin-trap. Los espectros EPR del aducto DMPO/HO fueron monitoreados en suspensiones de los NRTN en oscuridad y durante la irradiación por hasta 15 minutos, correspondientes al tiempo de irradiación de los experimentos de fototoxicidad con el modelo celular. Las concentraciones finales en los sistemas fueron $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para DMPO y 4 mg mL^{-1} para los NRTN. Las muestras iniciales fueron registradas en la oscuridad, y la reacción se inició irradiando las suspensiones sólidas. Posteriormente, se transfirieron alícuotas a capilares y se colocaron en la cavidad Bruker ER 4119HS del espectrómetro Bruker EMX para adquirir espectros lo más rápido posible. La potencia del microondas EPR fue de 20 mW, la frecuencia de modulación de 100 kHz y el campo central de 3515 G con un ancho de barrido de 80 G. La ganancia del receptor se ajustó a 30 dB con un tiempo de barrido de 20 segundos.

3.4. Ensayos de hemólisis

Para determinar el grado de actividad hemolítica, se procedió de la siguiente forma: se obtuvieron muestras de sangre humana de voluntarios del Departamento de Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción (Concepción, Chile) y se recolectaron en tubos heparinizados. Luego, se centrifugaron 4 mL de sangre anticoagulada recientemente extraída a 2500 rpm durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS (1X, pH 7.4). Posteriormente, se incubaron 140 µL de una suspensión base al 10% v/v de glóbulos rojos humanos en PBS en un agitador rotatorio durante 30 minutos a 37 °C, después de lo cual se añadieron las suspensiones sólidas (100, 300, 400 y 500 µg mL⁻¹). Se mezclaron PBS 1X y agua desionizada con la suspensión de células sanguíneas humanas y se usaron como control negativo y positivo con 100% de actividad, respectivamente. Las mezclas se incubaron en un agitador rotatorio durante 3 horas a 37 °C antes de centrifugarse y se midió la absorbancia de la hemoglobina libre producto de la lisis de los eritrocitos en los sobrenadantes mediante espectroscopía UV/VIS a 541 nm. Los porcentajes de hemólisis se calcularon de la siguiente manera como se indica en la ecuación (11)

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorción muestra} - \text{Absorción control } (-)}{\text{Absorción control } (+) - \text{Absorción control } (-)} * 100\% \quad (11)$$

3.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga

La adsorción del fármaco se llevó a cabo contactando 10 mg de los nanorods prístinos y conjugados con 2 mL de solución del fármaco (0.2 mg mL⁻¹ de solución etanólica de doxorubicina) en un vial de color ámbar que se colocó en un agitador giratorio tipo carrusel durante 24 horas a temperatura constante de 25 °C. Luego, las muestras se centrifugaron y la concentración restante del fármaco del líquido sobrenadante se midió a través de un lector multiplacas POLARstar Omega (BMG Labtech) utilizando datos previamente registrados de las curvas de calibración. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y la eficiencia de encapsulación del fármaco (EE) y la capacidad de carga de los sólidos (LC) se calcularon de acuerdo con las ecuaciones (12) y (13), respectivamente:

$$EE (\%) = 100 \times (C_0 - C)/C_0 \quad (12)$$

$$LC \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = (C_0 - C) \times 543.5 \times V \times 10^3 / M_e \quad (13)$$

donde: C₀ = cantidad inicial de DOX (M); C = cantidad de DOX en el sobrenadante después de la encapsulación (M); 543,5 = masa molar de DOX; V = volumen de solución DOX utilizada (mL); y M_e = cantidad de sólidos utilizados para la encapsulación (mg).

3.6. Estudio de liberación de doxorubicina *in vitro*.

La liberación de DOX de los nanomateriales se realizó utilizando un método de membrana de diálisis Spectra/Por®. Para ello, los NRTB, NRTN y conjugados cargados con DOX (~11 mg) se dispersaron en 22 mL de PBS (pH 7.4 y 5.0) y se agitaron a 37 °C en condiciones de oscuridad durante 24 h. A ciertos intervalos, se tomaron alícuotas del dializado para la detección de DOX y se reemplazaron con un volumen equivalente de medio PBS fresco. La concentración de DOX liberada se determinó mediante un lector de placas múltiples POLARstar Omega (BMG Labtech) para doxorubicina basado en las curvas de calibración correspondientes.

3.7. Experimentos de viabilidad celular

La evaluación *in vitro* del potencial de los nanomateriales preparados para la administración de fármacos y aplicaciones de fototerapia inducida por luz visible se realizó utilizando un modelo celular HeLa. Para ello se cultivaron 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% en una incubadora que contenía CO₂ al 5% a 37 °C durante 24 h. Para la evaluación de la fototoxicidad, se agregaron a las células 100 µL de suspensiones de los nanomateriales preparadas en medio DMEM en el rango de 20 a 300 µg mL⁻¹. Las suspensiones se irradiaron durante 15 minutos con una fuente de luz LED (150 W m⁻²) y luego se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante hasta 24 horas.

Para los experimentos de citotoxicidad, las células se pusieron en contacto con 100 μL de suspensiones preparadas en medio DMEM en los mismos rangos de concentración y se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 37 °C en 5% de CO_2 durante 24 h. Para los experimentos de quimicitotoxicidad, las células se pusieron en contacto con 100 μL de las suspensiones de los nanorods precargadas con DOX, las cuales se prepararon en un medio DMEM en un rango de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se incubaron a 37 °C en 5% CO_2 durante 12 y 24 horas. Para los experimentos de terapia combinada, las células se pusieron en contacto con 100 μL de suspensiones de los sólidos precargados con DOX, las cuales se prepararon en medio DMEM en el rango de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y luego se incubaron en la oscuridad a 37 °C para 5 % de CO_2 durante 12 h. Posteriormente se irradió durante 15 min con luz LED (150 W m^{-2}) y se volvió a incubar a 37 °C. En todos los casos, se realizaron experimentos de control sin las suspensiones, donde las células se pusieron en contacto con 100 μL de solución Triton al 0,1% como control C (+), mientras que el control negativo involucró el contacto de las células con 100 μL de medio de cultivo DMEM fresco C (-) (100% de viabilidad). Después de cada tratamiento, la viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos se normalizaron y graficaron con el software estadístico GraphPad Prism 5 expresando los valores como porcentajes referidos a las células sin tratamiento y se presentaron como media \pm SD, n=3 considerando las células sin tratamiento como control de

normalización. Para evaluar las diferencias significativas con el grupo control, se realizó una prueba de t-student considerando un valor $p < 0.050$ señalado con * como estadísticamente significativo.

3.8. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron 180.000 células HeLa en portaobjetos en una placa de 6 pocillos utilizando DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Luego, la placa se incubó en una atmósfera que contenía 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, las células se pusieron en contacto con 2 mL de suspensiones de los sólidos las cuales se prepararon en medio DMEM a una concentración de 100 µg mL⁻¹. También se incluyeron muestras de control en ausencia de los sólidos.

Se irradiaron las suspensiones durante 15 minutos con una fuente de luz LED (150 W m⁻²) y, en paralelo, se mantuvo un grupo de control en condiciones de oscuridad. A continuación, las células se incubaron durante 8 horas, se fijaron por contacto con una solución de paraformaldehído al 3,7% en DMEM durante 20 minutos y luego se realizó la permeabilización utilizando PBS 1X con Triton-X100 al 0,1%. Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión no específicos con una solución de BSA al 0,5% en PBS y se realizó una doble tinción por inmunofluorescencia. Para ello, las células se incubaron durante la noche a 4 °C

con los anticuerpos primarios tales como anti DNA-RNA damage (ab62623) y anti 4-hidroxyononal (ab46545), así como también se emplearon de manera paralela bajo el mismo diseño el anti heat hock protein 72/73 (HSP01) y anti cleaved PARP1 (9541S), en todos los casos diluidos 1:50. Las células se lavaron exhaustivamente con PBS y luego se incubaron con anticuerpos secundarios anti-Mouse Alexa Fluor® 488 y anti-Rabbit Alexa Fluor® 555 diluidos 1:700 durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez que se completó la incubación, los portaobjetos se volvieron a lavar con PBS y se montaron en portaobjetos usando VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium con DAPI. Finalmente, las células se observaron para su registro fotográfico con un microscopio de fluorescencia EVOS utilizando un objetivo de 40X para su análisis cualitativo posterior.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los nanomateriales prístinos

Para preparar la nanoestructura prístina de TiO_2 , se utilizó un método hidrotermal previamente reportado por nuestro grupo de investigación [12] en el cual se obtienen nanotubos de titanato de hidrógeno como materiales precursores que se calcinaron a diferentes temperaturas y tiempos con el objetivo de evaluar las condiciones necesarias para alcanzar durante el proceso de calcinación la fase cristalina anatasa, obtener una alta superficie específica y a su vez confirmar la morfología nano tubular. Estos materiales fueron caracterizados mediante DRX donde se demostró la formación gradual de la estructura cristalina anatasa cuando aumentó la temperatura de calcinación. La Figura 7A muestra los patrones de difracción obtenidos, los cuales revelan que los sólidos calcinados a $500\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2.5 h (150 min) exhiben varios picos de difracción a 25.28° (1 0 1), 37.80° (0 0 4), 48.00° (2 0 0), 53.85° (1 0 5), 55.08° (2 1 1), 62.70° (2 0 4) y 75.07° (2 1 5), que corresponden a la fase TiO_2 anatasa (JCPDS-ICDD: 21-1272) [50]. Estos picos son comparables a los observados en sólidos calcinados a la misma temperatura durante 4 h (240 min). Sin embargo, exhiben mayor cristalinidad que los calcinados a $400\text{ }^\circ\text{C}$, en los cuales se evidenciaron solo dos picos de baja intensidad a 25.28° y 48.32° , correspondientes a anatasa.

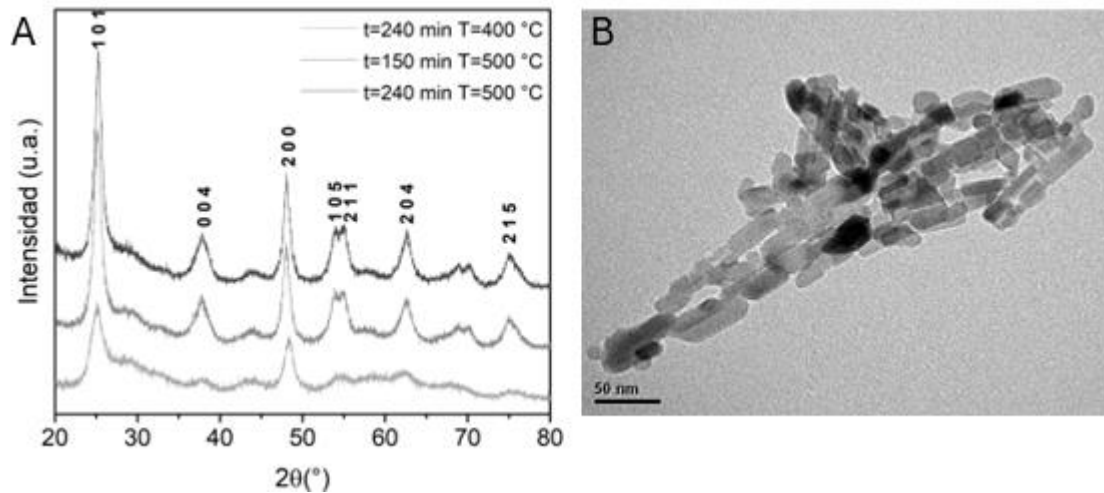


Figura 7. (A) Patrones DRX e (B) imágenes TEM para los materiales prístinos.

Por otra parte, los análisis de TEM confirmaron la formación de nanotubos después del tratamiento hidrotérmal los cuales mantuvieron su morfología incluso después del tratamiento térmico a 400 °C (Anexo 1), lo cual coincide con lo que se ha reportado anteriormente en la literatura [51]. Sin embargo, cuando la temperatura de calcinación se incrementó a 500 °C, se observó la formación de nanorods de TiO₂ debido al reordenamiento de la nanoestructura (Figura 7B), los cuales exhibieron una longitud y diámetro de 41.3 ± 11.0 y 12.9 ± 2.0 nm, respectivamente. Este hallazgo se respaldó con los resultados de las propiedades texturales obtenidas de las isothermas de adsorción y desorción de N₂ mostrados en la tabla 1, donde se obtuvo una disminución en el área superficial inducida por el tratamiento térmico, que fue más significativa a temperaturas de calcinación más altas. Por lo tanto, según los resultados obtenidos, se utilizaron como materiales prístinos los nanorods de TiO₂ obtenidos

a 500 °C durante 2.5 h denominados (NRTB) para su posterior modificación en condiciones reductoras debido a que, si bien los sólidos calcinados a 400 °C mantuvieron la morfología de interés durante la propuesta del presente proyecto, no se alcanzó durante el proceso de calcinación una cristalinidad significativa a diferencia de los nanorods obtenidos a 500 °C que evidencian una cristalinidad significativa mostrando intensos picos de difracción característicos de la estructura cristalina anatasa lo que va a incidir directamente en su actividad fotocatalítica, pues ésta se ve favorecida directamente a una mayor cristalinidad.

La isoterma de la nanoestructura (Anexo 2) revela un perfil de tipo IV característico de los sólidos mesoporosos con un ciclo de histéresis en $(p/p^{\circ}) = 0.6-1.0$. El análisis de área (Tabla 1) indicó un valor de superficie específica de $\sim 171 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, considerablemente menor que la reportada para los nanotubos empleados como material precursor.

Tabla 4.1. Propiedades texturales de los sólidos prístinos.

Muestra	$S_{\text{BET}}(\text{m}^2 \text{ g}^{-1})$	$d_{\text{poro}}(\text{nm})$
Nanotubos de titanato	273 ± 27	6.20 ± 0.6
T=400 °C, 240 min	266 ± 27	6.94 ± 0.7
T=500 °C, 150 min	171 ± 17	9.68 ± 1.0
T=500 °C, 240 min	163 ± 16	10.10 ± 1.0

Posteriormente, el tratamiento de reducción se llevó a cabo mezclando los NRTB con NaBH_4 en atmósfera de argón a $400\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora para obtener nanorods de TiO_2 negro (NRTN) (Figura 8). Este método ha demostrado ser práctico ya que implica un tratamiento térmico en condiciones suaves, normalmente a temperaturas $\leq 400\text{ }^\circ\text{C}$. El área de superficie específica de los sólidos negros no mostró cambios significativos en comparación con la nanoestructura prístina. Un ligero aumento podría atribuirse a los poros en un rango más pequeño, como se observa en la distribución del tamaño de los poros para los NRTN (Anexo 3).



Figura 8. Ruta de preparación de nanorods de TiO_2 negro (NRTN).

Por otro lado, los resultados de DRX (Figura 9) para los NRTN evidencian que el proceso de reducción condujo a una disminución significativa en la cristalinidad en comparación con el sólido prístino, el cual exhibe picos de difracción correspondientes a la anatasa. Otras investigaciones que involucran tratamientos de reducción de NaBH_4 han observado resultados similares en sus análisis de DRX. Esos estudios realizaron estudios de microscopía electrónica de

transmisión de alta resolución (HRTEM) y encontraron una abundante capa amorfa en una superficie de anatasa cristalizada, que señalan como la posible explicación de sus resultados en los patrones DRX [52].

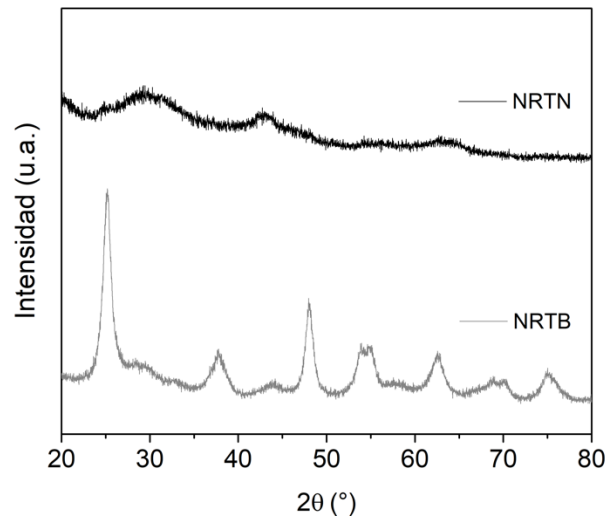


Figura 9. Difracción de rayos X para los NRTB y reducidos con NaBH₄: NRTN.

Se realizaron medidas adicionales como DRS UV-Vis para los NRTB, las cuales mostraron la absorción de luz típica de TiO₂ anatasa en longitudes de onda inferiores a 400 nm correspondientes a la región UV (Figura 10), que no es adecuada para aplicaciones de fototerapia contra el cáncer como se discutió previamente. Para determinar el valor de banda prohibida de los NRTB, se tomaron los datos de reflectancia en un rango de 200 a 900 nm y se calculó la función de Kubelka-Munk ($F(R)$) con la cual se construyó un gráfico de $(F(R) \times E)^{1/2}$ vs Energía (eV) como se observa en el anexo 4. El valor correspondiente a la banda prohibida se estimó según la intersección en el eje de las abscisas

mediante el trazado de rectas tangentes ajustadas al segmento lineal en dicho gráfico, se obtuvo un valor de 3.20 eV que corresponde al TiO₂ en su fase anatasa.

Por el contrario, se evidencia en la figura 10 que los NRTN efectivamente exhibieron una fuerte absorción de luz ultravioleta y amplia absorción de luz visible en la región que comprende 200 y 800 nm, cubriendo regiones de la primera ventana biológica óptica del infrarrojo cercano entre 600 y 900 nm, donde los componentes del tejido exhiben una menor absorción de luz [53].

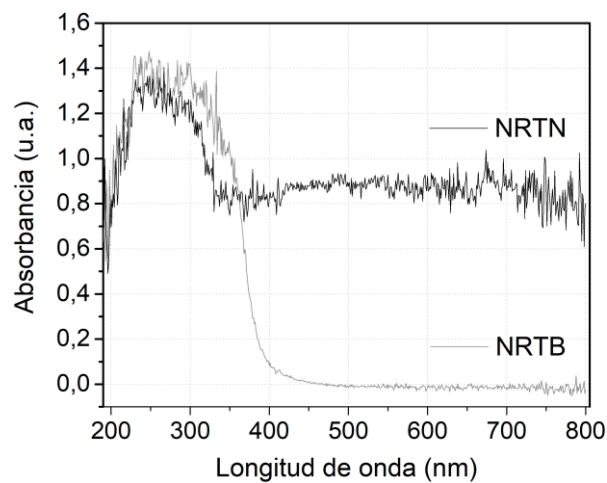


Figura 10. Espectros de reflectancia difusa UV-Vis para NRTB y NRTN.

Los cambios en los estados de oxidación del titanio, incluida la formación de sitios Ti³⁺ que han sido asociados con defectos superficiales y vacancias de oxígeno (V_o), se evaluaron mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). El espectro XPS y las zonas de alta resolución para Ti 2p se muestran en las Figuras

Anexo 5 y 11A, respectivamente. El espectro de Ti 2p para los NRTB muestra dos señales correspondientes a Ti 2p_{3/2} y Ti 2p_{1/2} con una diferencia en sus energías de ligadura de aproximadamente 5.7 eV, que puede atribuirse a los enlaces Ti⁴⁺-O típicos en TiO₂ [31]. Estas señales se observaron en 458.21 y 463.90 eV, asignadas a las contribuciones de Ti⁴⁺ 2p_{3/2} y Ti⁴⁺ 2p_{1/2}. En el caso de los NRTN, se observó un cambio en las señales asociadas al Ti hacia energías de ligadura menores, lo que podría indicar la presencia de especies de Ti³⁺ con señales a 457.76 y 463.17 eV, que concuerda con reportes previos para este tipo de materiales [54]. Además, la contribución de las especies de Ti⁴⁺ se encontró con las mismas energías de enlace que para los NRTN.

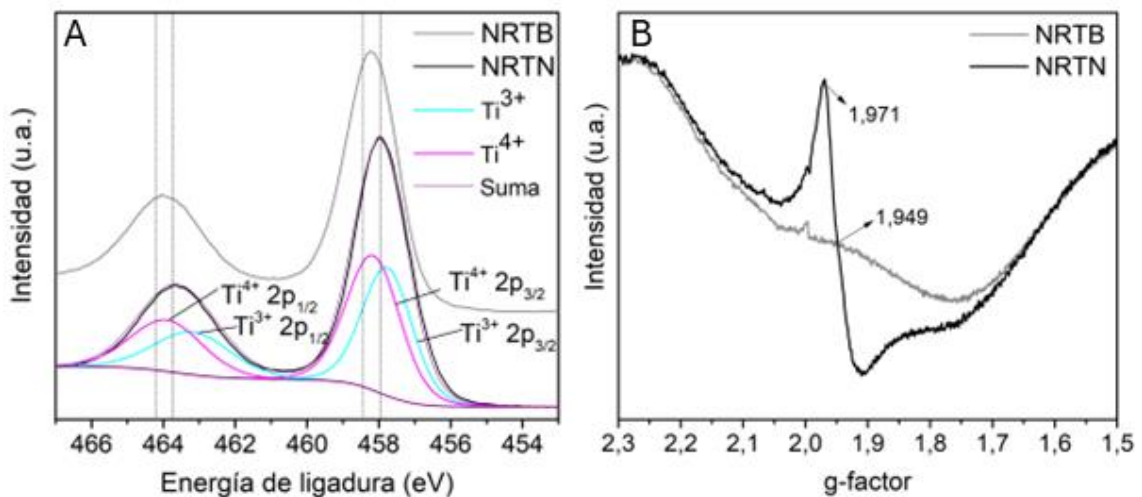


Figura 11. (A) Espectro XPS zonas de alta resolución Ti 2p y (B) Espectro EPR a baja temperatura para para NRTB y NRTN.

Entre los diferentes métodos descritos en la literatura para obtener materiales de TiO₂ negros, el uso de NaBH₄ tiene algunas particularidades ya que su descomposición térmica genera hidrógeno molecular, creando defectos como vacancias de oxígeno (V₀). Los electrones en la cavidad de V₀ pueden interactuar con iones Ti⁴⁺ adyacentes para dar sitios Ti³⁺ [24, 25], como se pudo inferir del espectro XPS en la Figura 11B. Estos defectos se han asociado con el cambio en la absorción hacia longitudes de onda de menor energía en el TiO₂ coloreado [26]. Por otro lado, los gases nobles pueden funcionar como reductores especiales porque pueden alterar el equilibrio termodinámico de $\text{TiO}_2 \rightleftharpoons \text{TiO}_{2-x} + x/2\text{O}_2$, formando defectos estructurales [23].

Se realizaron análisis de espectroscopia EPR para evaluar la presencia de la señal característica de Ti³⁺. Los espectros de EPR se registraron a baja temperatura (77 K) tanto para los NRTB como para NRTN. La Figura 11B muestra señales correspondientes a NRTN en campos magnéticos en el rango 3300-3600 G, ubicados en g=1.949 y g=1.971. Estos valores son consistentes con los reportados para centros Ti³⁺, confirmando la presencia de dichos defectos de acuerdo con las mediciones de XPS. Por su parte, sólo las vacancias de oxígeno con un solo electrón producen una señal EPR, a diferencia de las asociadas con un par de electrones o las vacancias sin electrones que no presentan. Además, los electrones asociados a las vacancias de oxígeno a menudo reducen los iones Ti⁴⁺ adyacentes a Ti³⁺, de modo que la presencia de sitios Ti³⁺ confirma indirectamente la existencia de vacancias de oxígeno [55]

4.2. Caracterización de los nanomateriales NRTB con Ce6 y TBO

Una vez obtenidos los NRTB prístinos mediante condiciones hidrotermales y su posterior calcinación a 500 °C, se realizó el proceso de funcionalización con los fotosensibilizadores Ce6 y TBO. Esto se llevó a cabo mediante agentes de acoplamiento tipo silano, como APTMS e IPTES, respectivamente, para obtener NRTB/Ce6 y NRTB/TBO. Los NRTB y modificados se caracterizaron mediante análisis FTIR, TGA, DRX y DRS. La unión covalente de Ce6 y TBO a la superficie de los NRTB se confirmó mediante análisis FTIR. En los espectros de la figura 12 A y B, los NRTB muestran bandas características en 3394 cm^{-1} relacionadas con vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de grupos hidroxilo superficiales (Ti-OH) y moléculas de agua adsorbidas, a 1634 cm^{-1} asociadas con vibraciones de flexión -OH y de 1000 a 400 cm^{-1} correspondientes a los modos de estiramiento Ti-O y puente Ti-O-Ti [56]. El espectro FTIR para los NRTB modificados con APTMS muestra una señal característica a 2925 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-H, alrededor de 1050 cm^{-1} los modos de estiramiento Si-O y finalmente, la señal atribuida a la flexión N-H del grupo terminal APTMS a 1560 cm^{-1} [57]. Con respecto a los NRTB conjugados con Ce6, se observa una nueva banda débil a 1523 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento C=N del pirrol, mientras que la banda C=O para Ce6 aparece a 1637 cm^{-1} . Esta banda se desplaza de la señal C=O del Ce6 libre (1686

cm^{-1}), lo que confirma el acoplamiento covalente a los NRTB [47]. Finalmente, la banda que indica la presencia del enlace C-N se detectó a 1384 cm^{-1} .

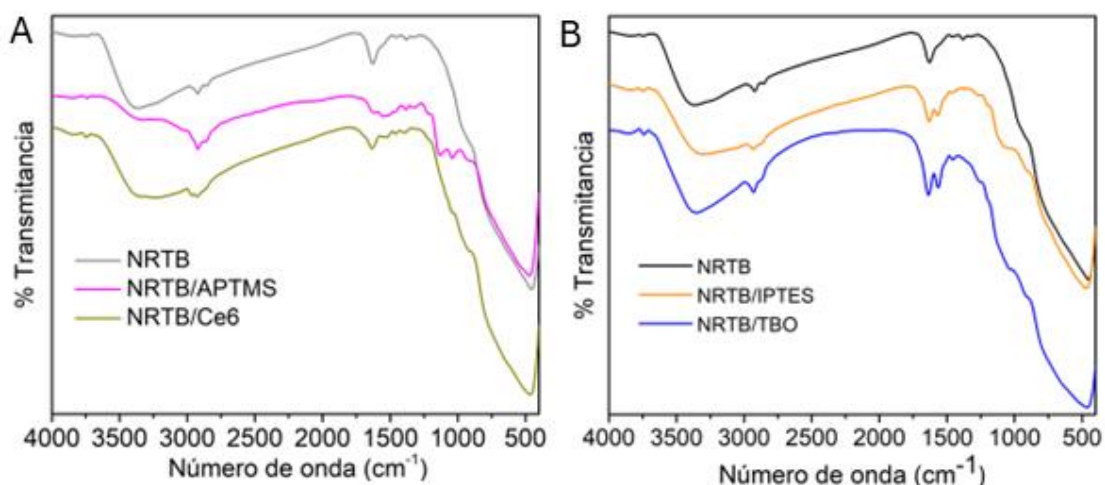


Figura 12. Análisis FTIR para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.

En los espectros de NRTB/IPTES se observan modos de estiramiento Si-O alrededor de los 1071 cm^{-1} y 905 cm^{-1} , correspondientes al agente de acoplamiento IPTES. Además, se identifican nuevas bandas a 1641 cm^{-1} y 1551 cm^{-1} , posiblemente atribuibles a la formación del enlace uretano. Es importante considerar las posibles interacciones covalentes entre los grupos hidroxilos superficiales (-OH) del nanorod y el grupo isocianato del agente de acoplamiento IPTES formando un éster de carbamato [58]. Además, estos grupos (-OH) podrían realizar un ataque nucleofílico al Si, como se muestra en la figura 6. En este último caso, debería observarse una señal correspondiente al grupo isocianato en los NRTB/IPTES, que no es percibida posiblemente debido a la superposición con la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo, una banda

intensa y amplia o probablemente relacionado con la baja cantidad de la TBO unido a la superficie.

Se estimó el grado de conjugación de los agentes de acoplamiento considerando la pérdida de masa en experimentos de TGA para los NRTB y conjugados. En la figura 13 A y B se muestran las curvas termogravimétricas del material pristino, modificado con el agente de acople y con fotosensibilizador, las cuales se normalizaron al paso correspondiente a la pérdida de agua a una temperatura de 120 °C, un valor promedio basados en la literatura. Esta normalización fue necesaria debido a que la humedad de las muestras puede variar según la preparación de la misma [59]. En el caso de la figura 13A para la conjugación con Ce6, la diferencia en la pérdida de masa entre los materiales pristinos y modificados dio como resultado grados de conjugación del 3.9 % para APTMS y del 3.6 % para Ce6. De la misma forma, fue posible establecer un porcentaje de inmovilización para el IPTES y TBO de 7.2 % y 1.7 % respectivamente, lo que permite concluir que la inmovilización del TBO fue menos efectiva. En este caso, en la evaluación de este material para las aplicaciones mencionadas se podrá concluir si la cantidad inmovilizada es efectiva para conducir los efectos deseados.

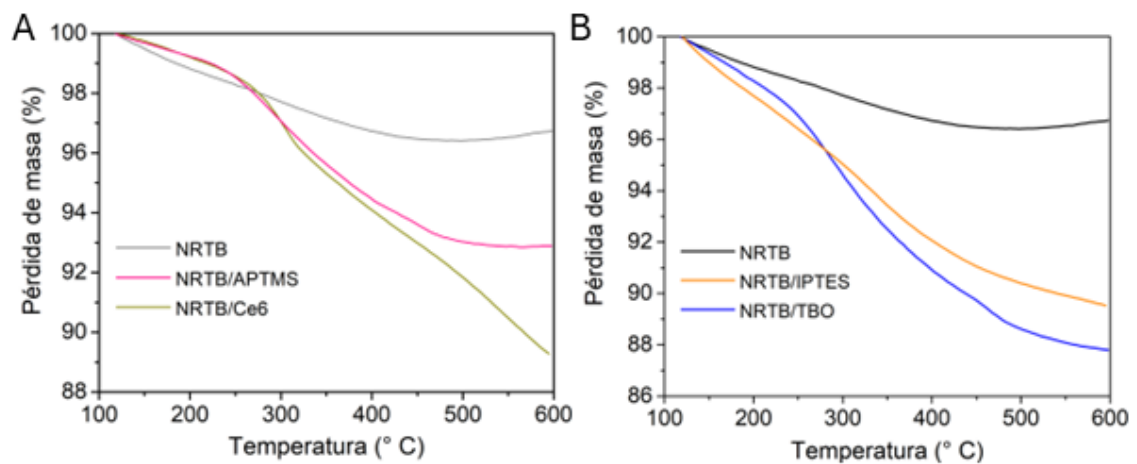


Figura 13. Análisis termogravimétrico para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.

Además de lo anterior, también se hicieron medidas de DRX después de la silanización superficial del nanoportador de TiO_2 y el posterior acoplamiento a Ce6 y TBO. En la figura 14A y B se muestran los patrones de DRX del material prístino, modificado con el agente de acople y con fotosensibilizador los cuales fueron similares entre los materiales de TiO_2 prístinos y modificados. Los picos de difracción obtenidos se presentaron en 25.28° (1 0 1), 37.80° (0 0 4), 48.00° (2 0 0), 53.85° (1 0 5), 55.08° (2 1 1), 62.70° (2 0 4) y 75.07° (2 1 5), correspondientes a la fase anatasa del TiO_2 .

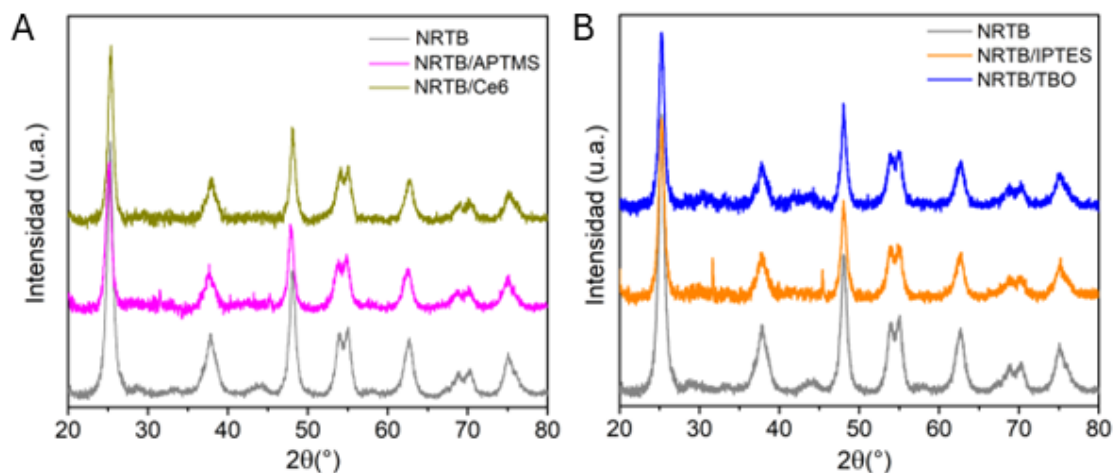


Figura 14. Análisis de DRX para los NRTB y conjugados (A) con Ce6 y (B) TBO.

Finalmente, se realizaron mediciones de los espectros de reflectancia difusa UV-Vis tras la modificación con fotosensibilizadores para compararlos con los NRTB previamente discutidos. Estos últimos exhibían la banda de absorción característica de anatasa TiO_2 en longitudes de onda <400 nm, como se ilustra en la Figura 15. Sin embargo, al ser modificados con los fotosensibilizadores se observan nuevas bandas de absorción en la región del visible donde dichas moléculas presentan absorción. El espectro de absorbancia UV-Vis de una solución etanólica de Ce6 se caracteriza por una fuerte banda de absorción en el ultravioleta (alrededor de 400 nm) y otra a 670 nm [60]. Por su parte, la TBO presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 627 nm [40]. Estos resultados respaldan la unión de los fotosensibilizadores y demuestran un cambio en la fotorepuesta hacia el espectro de luz visible en los materiales conjugados con Ce6 y TBO.

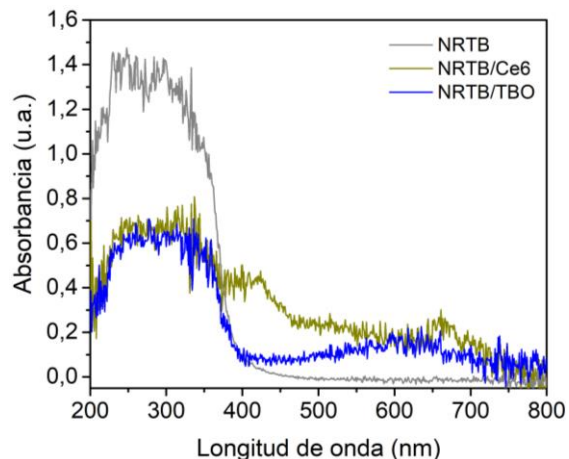


Figura 15. Espectros de reflectancia difusa UV-Vis para los NRTB/Ce6 y NRTB/TBO.

4.3. Caracterización de los NRTN conjugado con Ce6

De acuerdo con los análisis que se realizaron preliminares de actividad fototóxica se determinó que la conjugación con TBO no produjo efectos significativos para promover la PDT (sección 4.6.2). Por esta razón, se descartó inmovilizarlo en NRTN y solo se empleo Ce6 para ese nanomaterial. El proceso de funcionalización con Ce6 en NRTN se realizó empleando el agente de acople APTMS siguiendo el mismo procedimiento descrito para los NRTB. Los NRTN/Ce6 obtenidos se caracterizaron mediante análisis FTIR, TGA y DRS (Figura 16). De manera similar, la unión covalente de Ce6 a la superficie de los NRTN se confirmó mediante análisis FTIR. En los espectros de la figura 16A se puede observar la comparación entre los sólidos sin modificar y aquellos funcionalizados. Para los primeros se observa una similitud con los NRTB ya que presentan una banda a 3428 cm^{-1} la cual puede atribuirse a vibraciones de

estiramiento tanto simétricas como asimétricas de grupos hidroxilos superficiales (Ti-OH) y moléculas de agua adsorbidas, así como la banda alrededor de los 1642 cm^{-1} asociada a vibraciones de flexión de los mismos grupos y finalmente en la región de 1000 a 400 cm^{-1} se correlaciona a los modos de estiramiento de Ti-O y puente de Ti-O-Ti. Para los NRTN/APTMS, la señal característica a 2921 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento C-H, se presentan los modos de estiramiento Si-O correspondientes al agente de acople APTMS en torno a 1000 cm^{-1} y 900 cm^{-1} . Para los NRTN/Ce6 se observa una nueva banda débil a 1517 cm^{-1} que coincide con la vibración de estiramiento C=N del pirrol, por otra parte, según lo reportado por Youssef y colaboradores, la banda C=O para el Ce6 sin acoplar se presenta en 1686 cm^{-1} , sin embargo cuando fue acoplado a NP TiO_2 la banda cambia a un número de onda menor a 1637 cm^{-1} [47] que en nuestro caso coincide con lo expuesto por los autores y finalmente la banda que indica la presencia del enlace C-N se detectó a 1392 cm^{-1} . Para determinar el grado de conjugación de los NRTN, se realizaron análisis comparativos de pérdida de masa mediante experimentos de TGA entre los NRTN, NRTN/APTMS y NRTN/Ce6. Según los resultados presentados en la figura 16B, se encontró un grado de conjugación del 8.5 % para APTMS y del 1.7 % para Ce6.

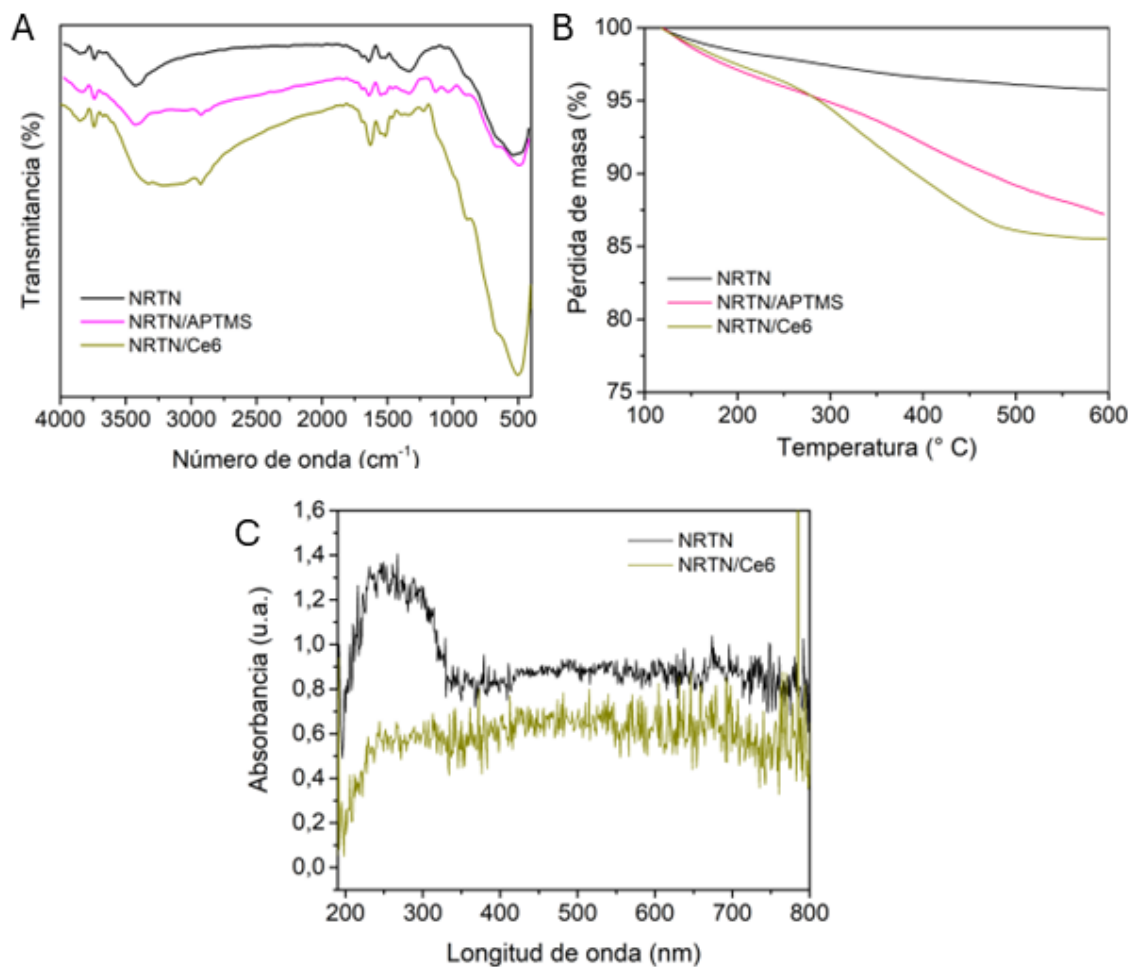


Figura 16. Caracterización de los NRTN/Ce6 mediante (A) FTIR, (B) TGA y (C) DRS.

Finalmente, se registraron los espectros de absorción de los NRTN modificados con Ce6 como se puede observar en la figura 16C. En la sección anterior se había observado que los espectros de reflectancia difusa UV-Vis de los NRTB modificados con los fotosensibilizadores presentaban nuevas bandas de absorción en la región del visible donde dichas moléculas presentan absorción. Cuando se evaluaron los sistemas reducidos fue posible distinguir un aumento

significativo de la absorbancia en la región visible del espectro (400 – 800 nm), debido a la conjugación del Ce6 a la superficie del NRTN, siendo comparable a la absorbancia de la región UV del espectro.

4.4. Generación de especies reactivas de oxígeno

El potencial de los sólidos preparados para aplicaciones de terapia fotodinámica mediada por luz visible se evaluó midiendo la generación de oxígeno singlete y radical hidroxilo a través de las sondas fluorescentes SOSG y HPF disponibles comercialmente para la detección de $^1\text{O}_2$ y $\text{HO}\cdot$, respectivamente [61]. En el caso de SOSG reacciona con $^1\text{O}_2$ para producir un endoperóxido fluorescente con una longitud de onda de excitación de 488 nm y emisión a 528 nm [15]. Por su parte, HPF reacciona selectivamente con radicales $\text{HO}\cdot$ para formar la molécula fluoresceína la cual se excita a 490 nm y emite a 515 nm [62] como se muestra en la figura 17.

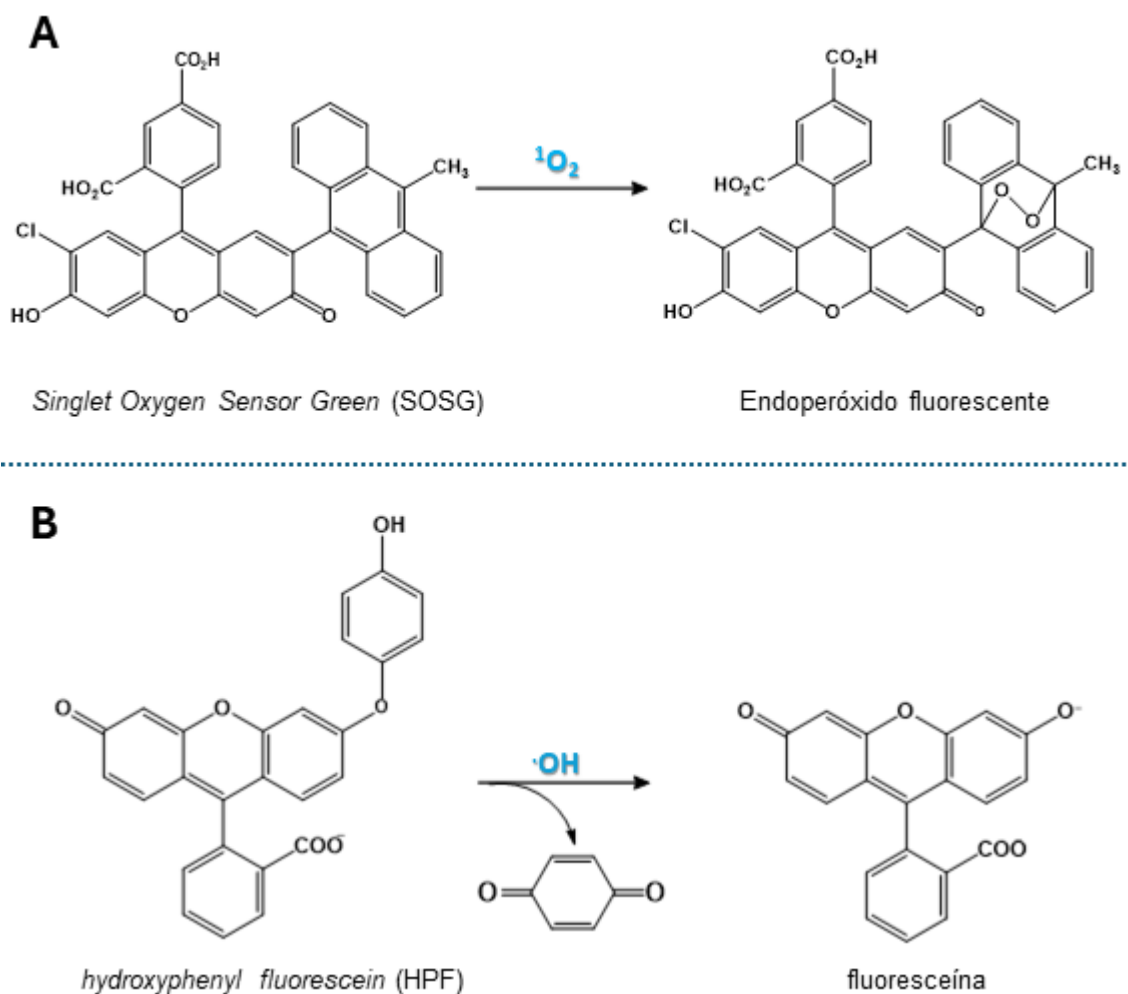


Figura 17. Detección de (A) $^1\text{O}_2$ con sonda SOSG y (B) radicales $\text{HO}\cdot$ con sonda HPF.

Para este propósito, se irradiaron suspensiones de los NRTB, NRTB/TBO, NRTB/Ce6, NRTN y NRTN/Ce6 en presencia de las sondas fluorescentes SOSG y HPF, tal como se muestra en las Figuras 18 y 19. Paralelamente, se realizaron experimentos de control utilizando PBS/SOSG y PBS/HPF en las mismas condiciones experimentales. Además, se han incluido experimentos con

suspensiones de sólidos en ausencia de sondas para verificar la existencia de señales detectables derivadas de la emisión de fluorescencia intrínseca de los nanomateriales.

Para la detección de $^1\text{O}_2$ (figura 18A) los sólidos conjugados con los FS presentaron la producción más alta de dicha especie, comparado con los prístinos, y más significativa con respecto a los controles incluidos de PBS_SOSG. En la figura se evidencia que PBS_SOSG presenta un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia en relación con el aumento en el tiempo de irradiación, incluso sin generación externa de $^1\text{O}_2$, lo cual es consistente con observaciones previas sobre la emisión inicial de SOSG y la generación de $^1\text{O}_2$ por sí misma mediante la irradiación de luz visible [63]. En cuanto a la detección de $\text{HO}\cdot$ los resultados también muestran un aumento en la intensidad de la fluorescencia notorio tras la irradiación para los NRTB conjugados en presencia de reactivo HPF en comparación con los experimentos de control (Figura 18B), lo que sugiere la generación de $\text{HO}\cdot$ a partir de los NRTB/Ce6 y NRTB/TBO inducidos por luz visible en contraste con los materiales prístinos, que no presentan un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia a 525 nm a medida que transcurre el tiempo de irradiación. Los experimentos de control revelaron que la señal inicial de PBS/HPF en oscuridad permaneció constante durante la irradiación y las respuestas de las suspensiones sólidas irradiadas en ausencia de HPF fueron similares a la respuesta de PBS no fluorescente (Anexo 6).

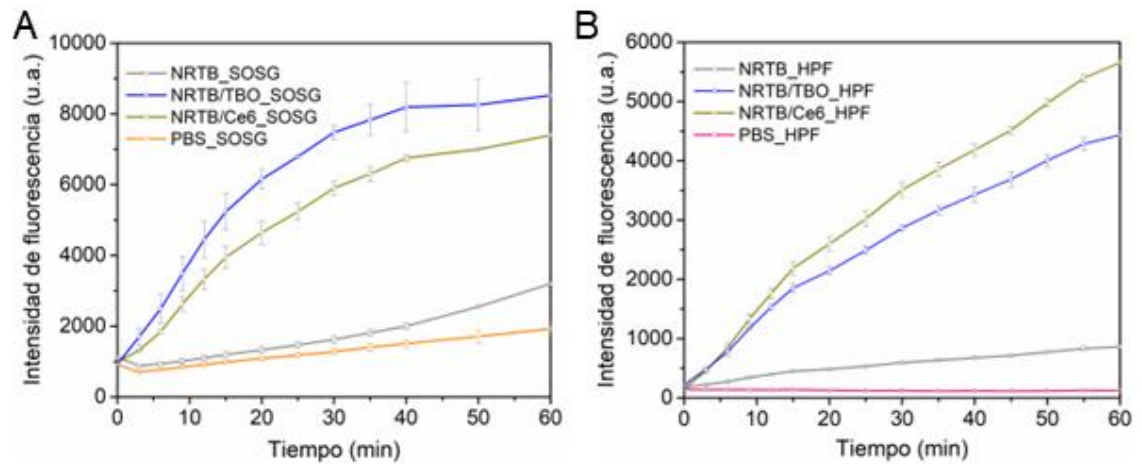


Figura 18. Detección de ROS para los nanomateriales en base a NRTB bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 W m^{-2}). (A) Generación de 1O_2 y (B) $HO\bullet$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando suspensiones de 2 mg mL^{-1} utilizando las sondas fluorescentes SOSG ($40 \mu\text{M}$) y HPF ($10 \mu\text{M}$), respectivamente. La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.

En la Figura 19 se muestran los experimentos de producción de ROS para los nanomateriales en base a NRTN bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 W m^{-2}). De manera similar, los resultados indican que los NRTN/Ce6 presentan una mayor capacidad para producir $HO\bullet$ y 1O_2 que los NRTN y los experimentos de control incluidos bajo irradiación de luz visible, indicando las mejores capacidades fotodinámicas del sistema conjugado (Figura 19 A y B).

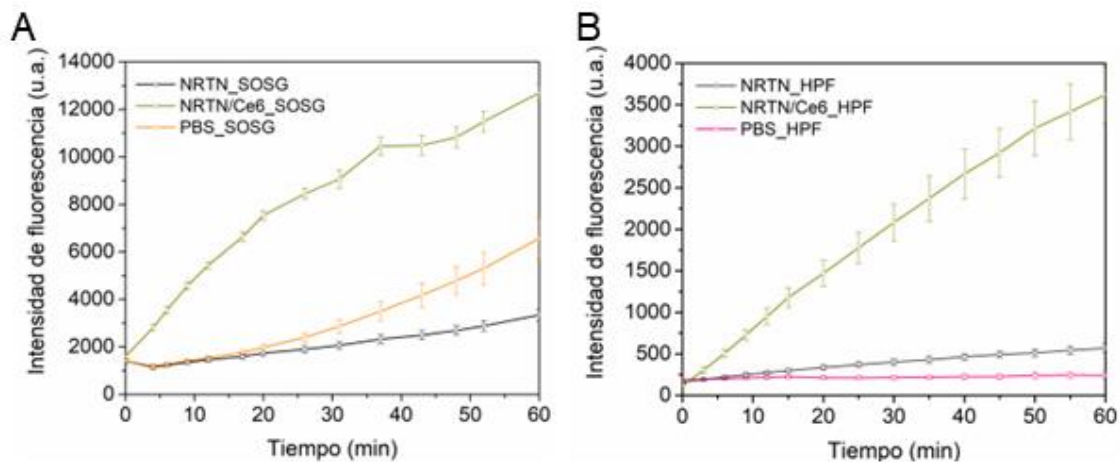


Figura 19. Detección de ROS para los nanomateriales en base a NRTN bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 W m^{-2}). (A) Generación de 1O_2 y (B) $HO\bullet$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando suspensiones de 2 mg mL^{-1} utilizando las sondas fluorescentes SOSG ($40 \mu\text{M}$) y HPF ($10 \mu\text{M}$), respectivamente. La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.

Además, la generación de especies como $HO\bullet$ y 1O_2 exhibidas por los sistemas conjugados, podría indicar la presencia de reacciones fotoquímicas de tipo I y II [64]. Estos resultados son muy auspiciosos ya que confirman la actividad fotodinámica de los materiales propuestos y su potencial aplicación en PDT. Es importante resaltar que para los NRTN sólo se observó un ligero incremento en cuanto a la producción de $HO\bullet$ con respecto al control PBS_HPF, a pesar de la capacidad de absorción que presenta este material a lo largo de todo el espectro de emisión de la lámpara empleada (Anexo 7) comparado con la absorción de los NRTB, se podría esperar una mayor generación de $HO\bullet$ lo cual no se distinguió significativamente.

Si bien la sonda HPF ha sido ampliamente utilizada para la detección de HO• y ha demostrado poseer mayor especificidad para esta especie en comparación con otras especies reactivas de oxígeno (intensidades de fluorescencia seis veces mayores que para la reacción con el radical ONOO⁻) [65], fue relevante en este caso contrastar la generación de HO• para los sistemas reducidos NRTN mediante spin-trapping con EPR.

La Figura 20 muestra los resultados obtenidos para la caracterización del sistema empleando la técnica de EPR, los cuales fueron adquiridos después de la irradiación continua con luz LED visible, para asegurar la formación de HO•, de suspensiones de NRTN en presencia de DMPO. Los espectros muestran señales típicas para el cuarteto característico 1:2:2:1 de la formación del aducto aducto DMPO/OH, las cuales muestran constantes de acoplamiento $\alpha_N = \alpha_{\beta-H} = 14.9$ G [52, 66]. Por otro lado, la presencia de señales adicionales es consistente con un triplete de baja intensidad, que se vuelve más notorio a los 15 minutos de irradiación que podría estar relacionado con productos derivados del aducto DMPO-OH [67]. Estos resultados respaldan las mediciones obtenidas utilizando la sonda HPF indicando que los NRTN pueden generar efectivamente especies HO•, lo cual es relevante para ensayos de fototoxicidad que fueron realizados con este material utilizando una fuente de radiación de luz LED.

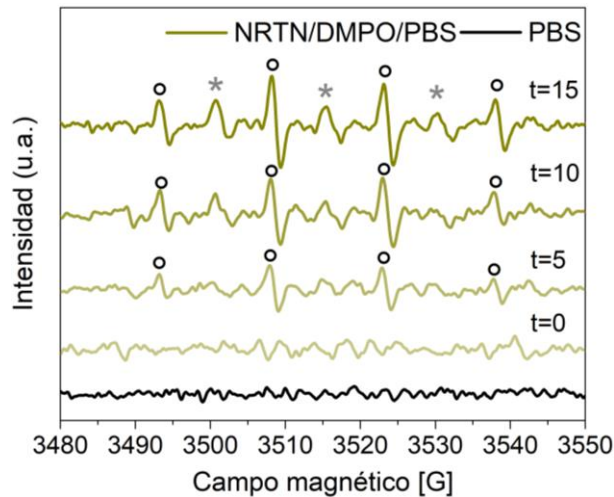


Figura 20. Experimentos de producción de HO• en suspensiones de NRTN evaluadas mediante spin-trapping utilizando DMPO (40 μM). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando suspensiones sólidas de 4 mg mL^{-1} . Datos representativos de $n = 3$ experimentos independientes.

4.5. Ensayos de actividad hemolítica

La hemotoxicidad de los materiales prístinos NRTB, NRTN y sus conjugados con FS se evaluó a partir de experimentos de actividad hemolítica poniendo en contacto suspensiones de los nanomateriales sólidos con glóbulos rojos (RBC). El experimento está basado en la medición de la hemoglobina libre como consecuencia de la lisis de eritrocitos después del contacto con los nanomateriales en las concentraciones utilizadas en experimentos de viabilidad celular posteriores. El control negativo (C-) corresponde al contacto celular con PBS 1X, mientras que el control positivo (C+) (100% de actividad hemolítica) se

evaluó utilizando agua desionizada. Todos los sólidos evaluados mostraron un porcentaje de hemólisis inferior al 5% en todo el rango de concentraciones ensayadas, lo que indica la ausencia de actividad hemolítica nociva (Figura 21). Estos hallazgos se encuentran dentro de los rangos establecidos por la norma ISO 10993-4, que especifica que cualquier sistema con un porcentaje de hemólisis superior al 5% no es apto como material en contacto con la sangre. Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad de los nanomateriales en células HeLa (línea celular de cáncer de cuello uterino humano) para establecer las posibles aplicaciones biomédicas de estos materiales.

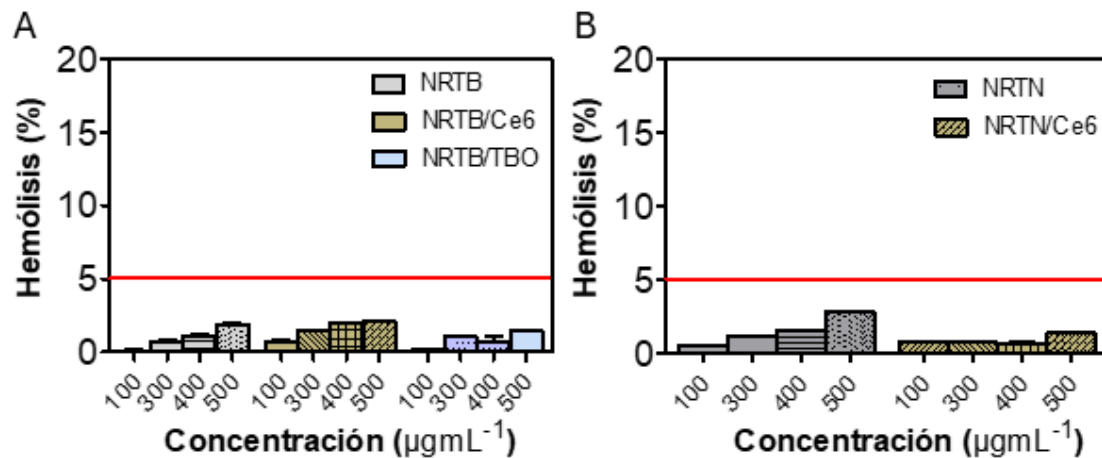


Figura 21. Porcentajes de hemólisis inducidos por (A) NRTB, NRTB/Conjugados (B) NRTN y NRTN/Ce6.

4.6. Experimentos de viabilidad celular

La evaluación de la citotoxicidad de los nanomateriales sintetizados es un paso clave para determinar el potencial de estos sistemas para su uso en terapia combinada del cáncer.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron tanto en la oscuridad como en presencia de irradiación con luz LED visible, durante 15 min. Se inició con la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad empleando como modelo la línea celular HeLa, determinándose la viabilidad celular a través de un método colorimétrico. Para ello, se empleó el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) el cual es utilizado para determinar viabilidad celular en ensayos de proliferación celular o citotoxicidad dado que contiene una sal de tetrazolio (MTS: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)), la cual es bio-reducida en presencia de un agente de acoplamiento de electrones (fenazina metosulfato) como consecuencia de la actividad metabólica de las células viables produciendo formazán que corresponde a un compuesto coloreado y soluble en el medio de cultivo que puede detectarse a una longitud de onda de 490 nm y de esta manera relacionar la cantidad de células viables con la señal detectada correspondiente al formazán. En la Figura 22 se puede observar el mecanismo que han propuesto, en el cual la reducción ocurre mayoritariamente en el entorno extracelular a pesar de que el carácter lipofílico del MTS podría favorecer el ingreso a la célula, tiene una capacidad limitada para cruzar la membrana plasmática debido a su naturaleza química en la cual la carga positiva en el anillo tetrazol es compensada con la carga negativa del grupo

sulfonato. Sin embargo, la presencia del grupo carboximetoxi débilmente ácido unido a un segundo anillo fenilo no favorece el ingreso a la célula a través del potencial de membrana [68].

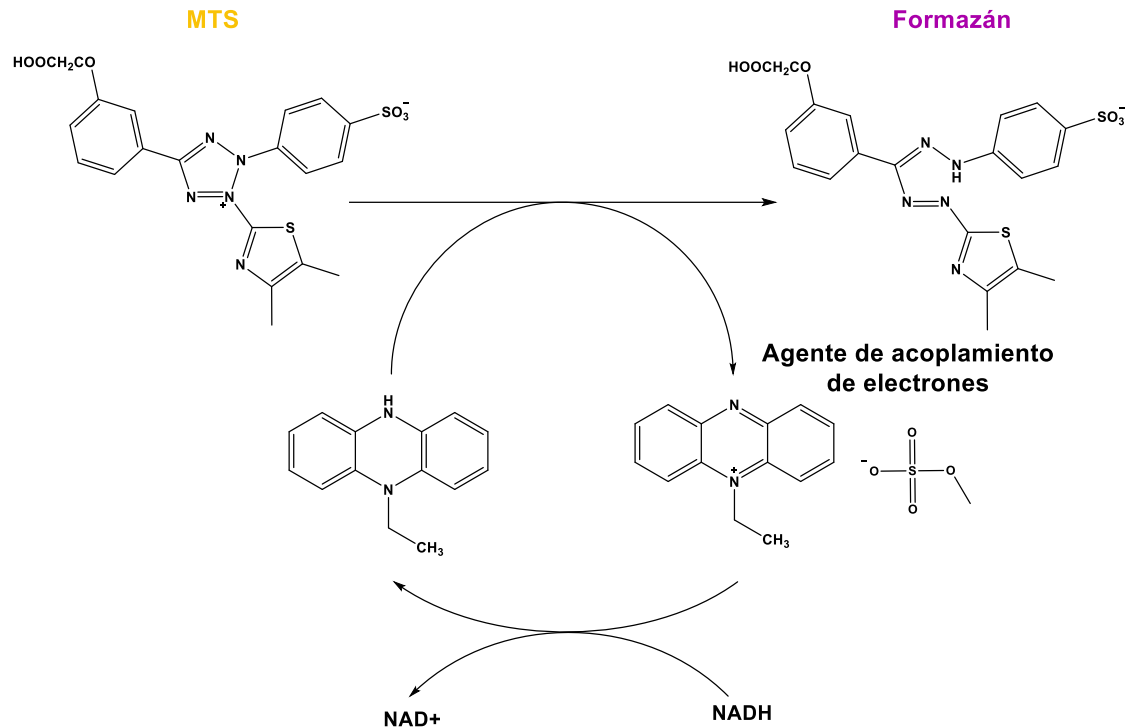


Figura 22. Diagrama esquemático de la biorreducción de MTS por células viables.

4.6.1. Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTB/Ce6

La citotoxicidad de los NRTB y NRTB/Ce6 se evaluó incubando en oscuridad suspensiones de concentraciones crecientes de estos materiales con células HeLa, cuya viabilidad celular se midió utilizando el ensayo de actividad metabólica MTS (Figura 23 A y B).

La Figura 23A muestra los resultados de la evaluación de la viabilidad de las células HeLa, en oscuridad, después de 24 h de incubación, los cuales indican que tanto los materiales prístinos NRTB como los conjugados NRTB/Ce6 no presentaron efectos significativos sobre la viabilidad celular, después de dicho tiempo de incubación, en todo el rango de concentraciones evaluadas. Este resultado es clave para futuras aplicaciones de estos sistemas en PDT. Por otra parte, se evaluó la fototoxicidad de NRTB y NRTB/Ce6 incubando células HeLa con suspensiones de concentración creciente de estos nanomateriales e irradiando las muestras con luz LED visible (15 minutos, 150 W m^{-2}). La viabilidad celular se midió después de 24 h de incubación, una vez finalizada la irradiación con luz LED visible, y los resultados se muestran en la Figura 23B. Los sistemas irradiados que contenían NRTB no mostraron cambios significativos en la viabilidad celular en comparación con el control positivo, lo que concuerda con la incapacidad de este sistema para producir $^1\text{O}_2$ y $\text{HO}\cdot$ cuando es irradiado con luz visible (Figura 18), ya que el TiO_2 blanco sólo presenta actividad fotodinámica en el rango del ultravioleta [19]. Por otro lado, los sistemas conjugados NRTB/Ce6 al ser irradiados con luz LED mostraron una disminución importante en la viabilidad celular en todo el rango de concentraciones ensayadas. El máximo efecto se obtuvo con suspensiones de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, con una viabilidad celular del 35%. Según la norma ISO10993-5 que establece como no tóxica para una viabilidad celular superior al 80%, toxicidad débil entre el 80% y el 60%, toxicidad moderada entre el 60% y el 40% y citotoxicidad fuerte por debajo del 40% [69].

los resultados indican que los NRTB/Ce6 son compuestos fototóxicos fuertes (<40% de viabilidad) a disepersiones superiores a los 20 mg L⁻¹ [69], lo cual confirma que la modificación superficial del NRTB con Ce6 es una estrategia adecuada para inducir la actividad fotodinámica en estos sistemas cuando son irradiados con luz LED visible.

Por otro lado, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para evaluar los efectos de la producción de ROS mediada por luz visible en células HeLa incubadas con suspensiones de NRTB/Ce6 a una concentración de 100 µg mL⁻¹ con la que se asegura un efecto citotóxico fuerte tal como se muestra en la Figura 23C. Para ello, se empleó el anticuerpo anti DNA-RNA damage que reconoce biomarcadores de daño oxidativo como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), producto formado por la interacción entre especies como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete con la guanina [70]. Por otra parte, para evaluar el efecto de las ROS en las membranas celulares, debido a la irradiación de los sistemas, se empleó un anticuerpo primario que reconoce el 4-hidroxinonenal (4-HNE), uno de los principales productos secundarios generados en la peroxidación lipídica, considerado un marcador e inductor del daño oxidativo, pues al ser un aldehído α, β insaturado puede reaccionar con componentes celulares como ácidos nucleicos y proteínas [71, 72].

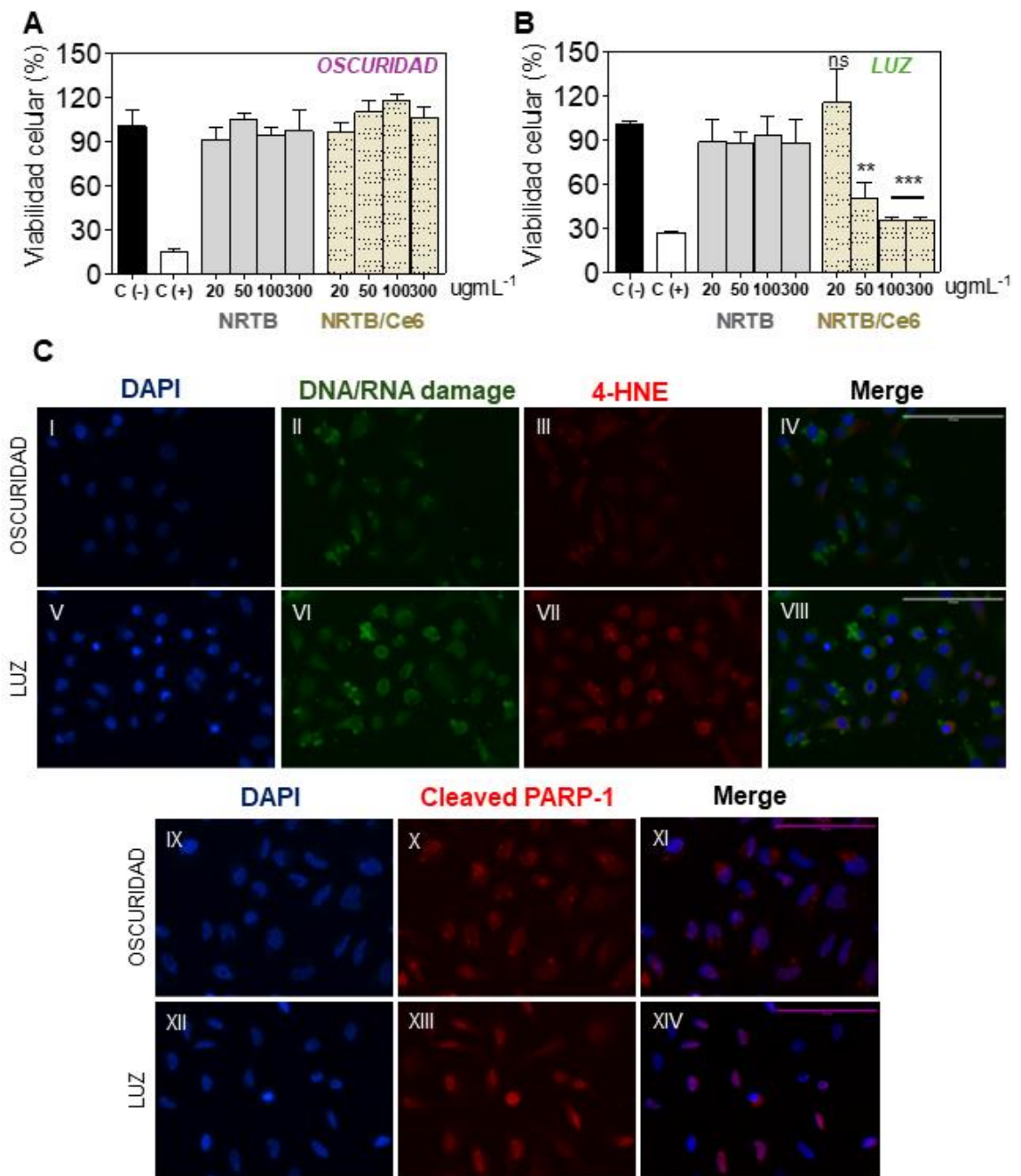


Figura 23. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTB/Ce6 (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente

significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a $p < 0.050$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTB/Ce6 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) canal verde para daño de DNA/RNA y (C.III, CVII) canal rojo para daño de membrana. (C.X, C.XIII) canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.

Finalmente, se evaluó la inducción de un mecanismo de muerte celular como la apoptosis, para el cual se utilizó el anticuerpo Cleaved PARP-1 como anticuerpo primario. La Poli(ADP-Ribosa) polimerasa (PARP-1) es una proteína de unión al DNA asociada a procesos de reparación detectando roturas en el mismo. Cuando el daño generado en el DNA es intenso y no reparable posterior a la activación de dicha proteína se promueve su fragmentación por medio de caspasas para su inactivación e inducción de muerte por apoptosis [73]. Por lo anterior, al usar el anticuerpo mencionado se puede detectar niveles de PARP-1 fragmentado y evaluar la inducción de dicho mecanismo de muerte posterior a los tratamientos realizados. Durante el desarrollo de los ensayos, se incluyeron experimentos de control con las células sin las suspensiones de NRTB/Ce6 para evaluar la respuesta basal de los anticuerpos en condiciones de oscuridad y de irradiación. También se realizaron medidas adicionales sin sólidos ni anticuerpos primarios y secundarios para evaluar la respuesta inicial correspondiente al buffer de dilución de anticuerpos (Resultados consignados en anexo 8 del presente documento).

En la figura 23C se pueden observar los resultados para las suspensiones de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NRTB/Ce6 los cuales demuestran intensidades de fluorescencia más

altas en los canales verde para 8-OHdG y rojo para 4-HNE después de la fotoactivación. Esto sugiere que los sistemas expuestos a luz LED (Figuras 23C.VI y 23C.VII) aumentan los niveles de los marcadores evaluados en comparación con la respuesta en oscuridad (Figuras 23C.II y 23C.III) y los experimentos de control, que dan cuenta del daño celular inducido por ROS después de la irradiación con luz LED visible, afectando los ácidos nucleicos y las membranas celulares según los resultados del canal verde y rojo respectivamente.

Además, la Figura 23C.XIII revela un aumento en la intensidad de la fluorescencia dentro de la región nuclear en comparación con los controles en oscuridad (Figura 23C.X), lo que implica la existencia de esta vía de muerte celular. Estos resultados concuerdan con la disminución de la viabilidad celular evidenciada en los resultados de fototoxicidad (Figura 23B) y demuestran el potencial de NRTB/Ce6 para PDT bajo irradiación de luz visible. No obstante, este sistema podría beneficiarse de la combinación con otra estrategia como la quimioterapia [74] que corresponde a uno de los objetivos relevantes de este proyecto, la obtención de un sistema de acción combinada por lo que en la se presentará la evaluación de NRTB/Ce6 como nanoplataformas para aplicaciones combinadas de quimio-fototerapia (Sección 4.8) considerando que estos resultados fueron auspiciosos para tal propósito.

4.6.2. Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTB/TBO

Los NRTB también fueron funcionalizados con TBO como se describió previamente y se realizó la evaluación de la citotoxicidad siguiendo un protocolo similar, se incubaron las suspensiones de los NRTB/TBO en concentraciones crecientes con células HeLa bajo oscuridad y luego se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo MTS (Figura 24A y B). Los resultados indican que para los NRTB/TBO no se presenta disminución en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones evaluadas con respecto al control negativo de muerte después de 24 horas de incubación. Así mismo, los experimentos de fototoxicidad indican que no se presentan diferencias en la viabilidad celular obtenida entre los sistemas prístinos y funcionalizados con TBO (Figura 24B), es decir que la fotosensibilización de los materiales prístinos en este caso no permitió promover un efecto fototóxico significativo como lo observado en el caso de los NRTB/Ce6. Estos hallazgos también se reflejaron en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los cuales la diferencia en la intensidad de fluorescencia para los sistemas irradiados (Figuras 24C.VI y 24C.VII) no aumentaron de manera muy notable los niveles de los marcadores evaluados en comparación con la respuesta en oscuridad (Figuras 24C.II y 24C.III) y los experimentos de control como se manifestó para los NRTB/Ce6.

En principio, se había observado una producción significativa de $^1\text{O}_2$ y $\text{HO}\cdot$ por parte de los NRTB/TBO evidenciando el potencial de los mismos para estas

aplicaciones. Sin embargo, para obtener una respuesta analítica confiable por medidas de fluorescencia de las sondas SOSG y HPF se debió emplear concentraciones significativamente superiores a las evaluadas en los ensayos de fototoxicidad. Las dispersiones empleadas de NRTB/TBO 20 – 300 mg L⁻¹ de los materiales no son las suficientes para ejercer los efectos fototóxicos observados en los ensayos de producción de ROS. Este resultado permitió descartar el empleo de TBO como FS en la modificación de los sistemas NRTN.

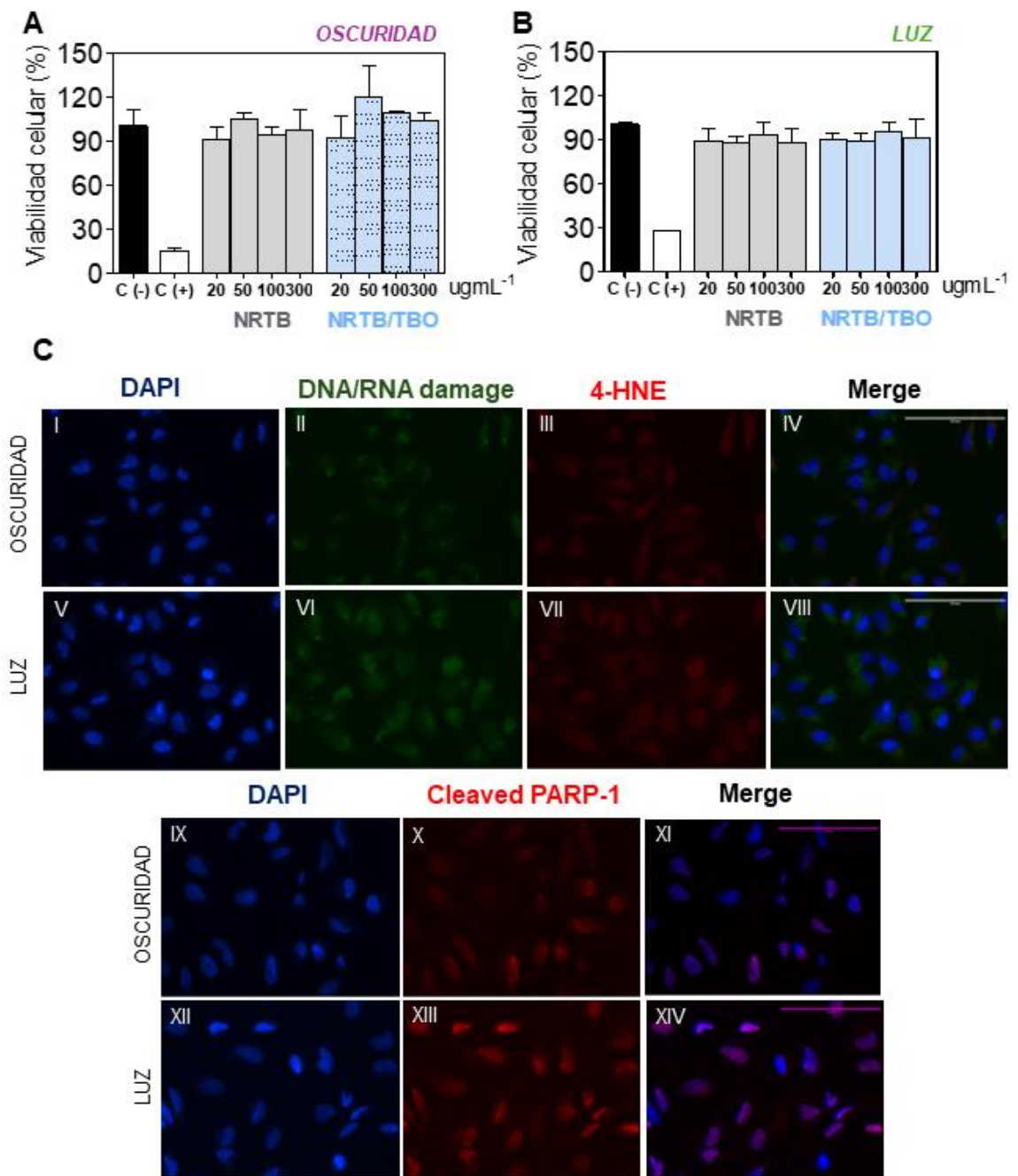


Figura 24. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTB/TBO (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media \pm SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a $p < 0.050$, ** $p <$

0.01 y *** $p < 0.001$. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTB/Ce6 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) canal verde para daño de DNA/RNA y (C.III, CVII) canal rojo para daño de membrana. (C.X, C.XIII) canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.

4.6.3 Evaluación de citotoxicidad y fototoxicidad con los NRTN/Ce6

La evaluación de la citotoxicidad y fototoxicidad inducida por las dispersiones de los NRTN y NRTN/Ce6 se llevó a cabo en el mismo rango de concentración, de 20 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, empleada para los sistemas prístinos. Se siguió un protocolo similar al anterior para las medidas de citotoxicidad en las que se incubaron las dispersiones con las células HeLa en oscuridad y en el caso de los experimentos de fototoxicidad se irradiaron con luz LED visible durante 15 minutos (150 W m^{-2}). La Figura 25 A muestra los resultados de la evaluación de la actividad metabólica (ensayos MTS) en condiciones de oscuridad para los sistemas NRTN y NRTN/Ce6 después de 24 h de incubación. Estos revelan porcentajes de viabilidad celular comparables al control negativo (C-, 100% de viabilidad) en las concentraciones evaluadas. Este hallazgo indica que la modificación de los NRTB en condiciones reductoras no generó que los sistemas NRTN exhiban efectos citotóxicos y tampoco la posterior funcionalización con Ce6, en la oscuridad. Por otra parte, cuando se irradiaron las dispersiones bajo las condiciones mencionadas hubo una disminución en los porcentajes de viabilidad

celular al aumentar las concentraciones de los nanomateriales (Figura 25B). En concreto, para los NRTN existen diferencias significativas respecto al control negativo a partir de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se obtuvo una viabilidad celular del 73% al aumentar la dispersión de los nanomateriales a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicando que los sistemas son débilmente fototóxicos según la clasificación de la norma ISO10993-5 mencionada previamente. Esto muestra que la estrategia de reducción de los NRTB para obtener los NRTN, además de extender la absorción de luz de estos últimos, desde la región UV a la región visible e infrarroja del espectro, y promover la formación de radical hidroxilo (Figura 18B), promueve un efecto fototóxico moderado que no se había observado con los sistemas de partida NRTB. Por otra parte, el efecto fototóxico de los NRTN efectivamente se potenció al unirle superficialmente el Ce6 debido a que presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo desde la concentración de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un porcentaje de viabilidad celular de 67 %, y al aumentar la concentración de las suspensiones a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se obtuvieron porcentajes inferiores al 40% en la viabilidad celular (Figura 25 B). Al comparar estos resultados con los obtenidos para NRTB/Ce6, principalmente se presentaron diferencias notables solo a bajas concentraciones ($20\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A estas concentraciones el NRTB/Ce6 tiene un fototoxicidad leve en cambio NRTN/Ce6 presenta una fototoxicidad moderada.

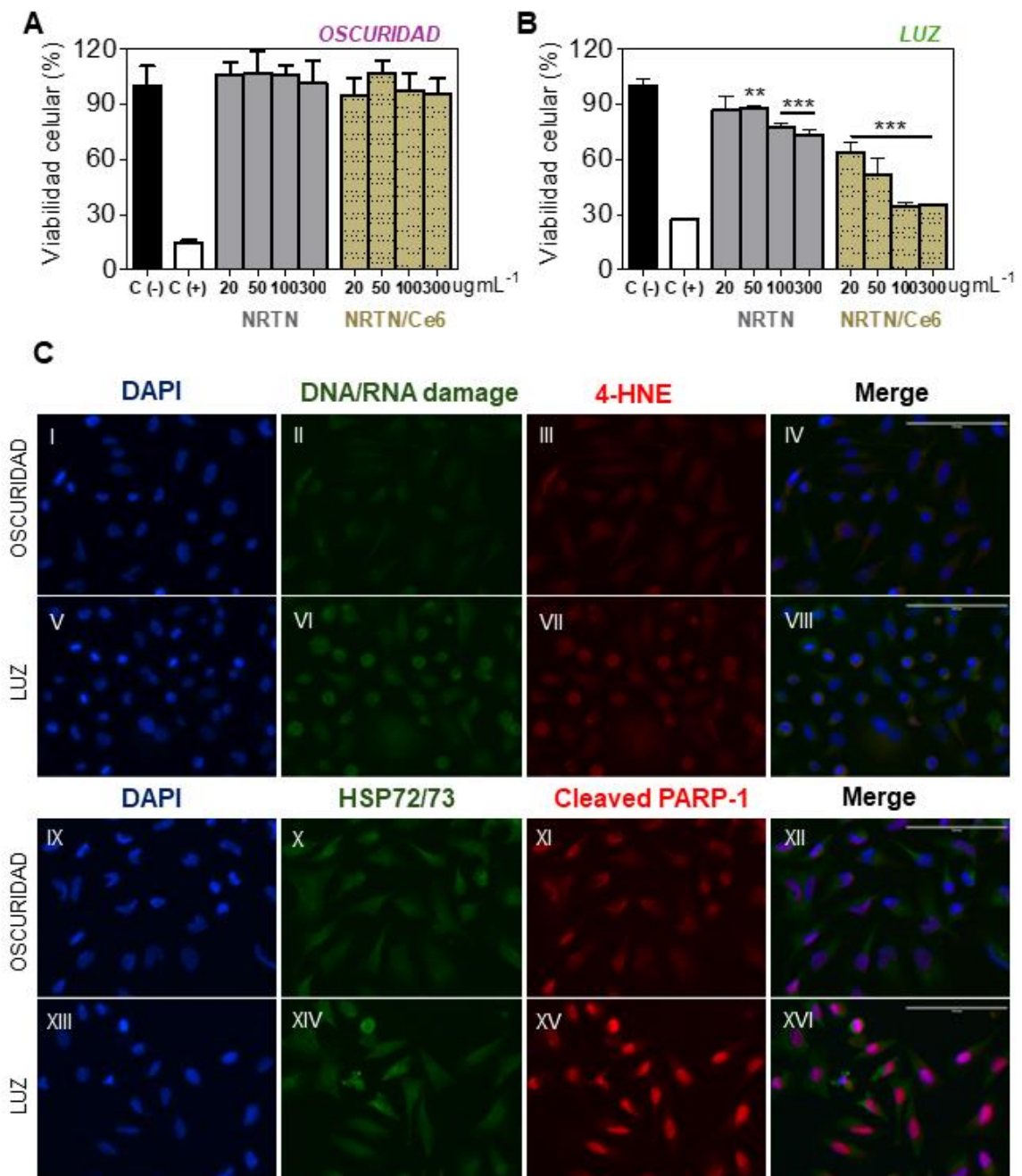


Figura 25. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con NRTN/Ce6 (A) Citotoxicidad (oscuridad) (B) irradiación con luz LED (15 min, 150 W m⁻²) (fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células sin tratamiento y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p <

0.01 y *** $p < 0.001$. (C) Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN/Ce6 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Se utilizó la detección nuclear DAPI, (C.II, CVI) con un canal verde para daño de DNA/RNA y un (C.III, CVII) canal rojo para daño de membrana. (C.X, C.XIII) con un canal rojo para la apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.

En este caso también se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia con tres de los mismos anticuerpos empleados para los análisis anteriores. Los resultados para suspensiones de NRTN/Ce6 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se pueden observar en la figura 25C, los cuales también reflejaron intensidades de fluorescencia más altas en los canales verde para 8-OHdG y rojo para 4-HNE indicando que los sistemas expuestos a luz LED aumentaron los niveles de los marcadores evaluados en comparación con la respuesta de los experimentos en oscuridad (II y III) que, a su vez, fue comparable con los experimentos de control (Incluido en anexos). Por su parte, el efecto observado para el canal de apoptosis fue mucho más notorio con respecto a los NRTB/Ce6, en la Figura 25C.XV muestra el aumento en la intensidad de la fluorescencia en la región nuclear con respecto a los controles oscuros (Figura 25C XI) indicando la presencia de esta vía de muerte celular y de la misma forma respalda la disminución de la viabilidad celular en la fototoxicidad discutida anteriormente

Por otro lado, la proteína de choque térmico HSP70 es reconocida como un indicador biológico sensible del estrés térmico, lo que convierte su monitoreo en un método para verificar la presencia de efectos fototérmicos en sistemas

específicos [75]. En consecuencia, se evaluó la inducción de HSP 72/73 en presencia de los sistemas basados en NRTN irradiados en comparación con los mismos en oscuridad. Este interés surgió de reportes previos que destacan el efecto fototérmico, como por ejemplo nanopartículas basadas en TiO₂ negro hidrogenado cuando se exponen a irradiación láser a 808 nm con una intensidad de 2 W cm⁻² [76]. A pesar de que las condiciones experimentales evaluadas implicaron el uso de luz LED visible (15 minutos de exposición a 150 W m⁻²), que favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno como se demostró previamente, no se puede descartar por completo el efecto fototérmico ya que la lámpara empleada posee una emisión residual en la región infrarroja (700-750 nm, ver espectro en Anexo 7). Los resultados indican que el nivel de estas proteínas después de la irradiación en las condiciones mencionadas anteriormente es mayor que en la oscuridad (Figura 25.CX), lo que podría sugerir un efecto térmico. Sin embargo, es necesario explorarlo más específicamente para este tipo de luz utilizada si se quiere favorecer este efecto lo cual no fue abordado en el presente trabajo.

4.7. Capacidad de encapsulación y liberación *in vitro* de DOX.

La posible utilización de los nanomateriales estudiados en esta tesis para terapia combinada del cáncer, particularmente quimio-fototerapia, requiere que estos sistemas posean capacidad para cargar drogas quimioterapéuticas, y la posterior liberación de éstas en el medio biológico.

La capacidad de encapsulación de fármacos por parte de los nanomateriales preparados se evaluó utilizando DOX como modelo de fármaco quimioterapéutico. DOX es una antraciclina con diversas funcionalidades químicas que pueden interactuar con los grupos atómicos de materiales porosos basados en TiO_2 . Esta molécula presenta dos unidades típicas, uno de ellas formado por un anillo tetracíclico con un residuo de antraquinona y una daunosamina unida por un enlace glucosídico a uno de los anillos tetracíclicos. DOX ha sido utilizado para tratar diversos tipos de cáncer, numerosos estudios han demostrado su eficacia en la exploración de enfoques de terapia combinada contra el cáncer [77, 78]. Dada su naturaleza hidrófoba se ha formulado como clorhidrato de doxorubicina para obtener mayor solubilidad en agua (Figura 26) [79].

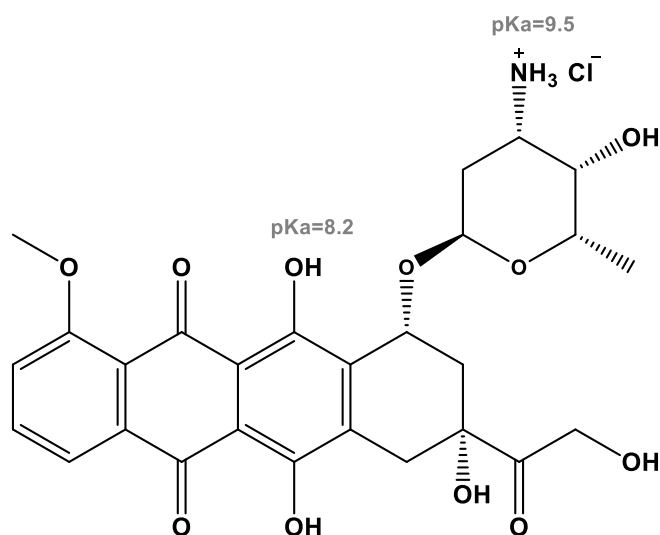


Figura 26. Estructura química del clorhidrato de doxorubicina.

Para llevar a cabo los experimentos de encapsulación, se puso en contacto una solución etanólica de DOX:HCl con los sólidos NRTB/Ce6 y NRTN/Ce6 bajo agitación constante en oscuridad durante 24 h. Estos sistemas se evaluarán en la sección siguiente en experimentos de foto-quimiotoxicidad. También se llevaron a cabo experimentos de encapsulación paralelos con los materiales prístinos en cada caso (NRTB y NRTN) con fines comparativos. La capacidad de carga de los sólidos se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones inicial y final de DOX en la solución después del tiempo de contacto, dando como resultado los valores consignados en la tabla 2. En la Tabla 2 se puede apreciar una disminución en la capacidad de carga de los nanomateriales al ser funcionalizados con Ce6, obteniendo valores de 16 µg/mg y 10 µg/mg , para NRTB/Ce6 y NRTN/Ce6 respectivamente. Por su parte, no se presentaron diferencias entre ambos materiales prístinos; 31 µg/mg y 30 µg/mg para NRTB y NRTN, respectivamente.

Tabla 4.2. Encapsulación de DOX en los materiales preparados.

Muestra	EE (%)	LC (µg/mg)
NRTB	95	31
NRTB/Ce6	47	16
NRTN	92	30
NRTN/Ce6	28	10

Una vez conocida la capacidad de encapsulación de los sólidos, se procedió a evaluar los perfiles de liberación de DOX a partir de experimentos de diálisis a pH 7.4 y 5.0, lo cual representa el entorno fisiológico y la acidez del microambiente tumoral, respectivamente. En la figura 27 se muestran los resultados de los experimentos de liberación de DOX a partir de los NRTB y NRTB/Ce6, en las cuales se reporta la cantidad liberada normalizada a la cantidad encapsulada para cada nanomaterial. En todos los casos se presenta una liberación rápida dentro de las primeras seis horas, seguida de una liberación constante durante las siguientes 18 horas, así como se observa un ligero incremento en la liberación del fármaco al disminuir el pH. Para ello es importante considerar que los grupos superficiales del nanomaterial pueden protonarse o desprotonarse según el valor del pH. Basados en reportes previos, el punto isoeléctrico del TiO₂ anatasa corresponde a un valor de pH=5.8 [80], por lo que por debajo de este pH los grupos titanol Ti-OH se protonarán cargando positivamente la superficie ($\equiv\text{Ti-OH}_2^+$) favoreciendo la interacción de moléculas cargadas negativamente. A valores mayores de pH los grupos titanoles se desprotonarán ($\equiv\text{Ti-O}^-$) cargando negativamente la superficie y permitiendo la adsorción de moléculas cargadas positivamente. Al realizar las liberaciones a pH 7.4 se esperaría entonces una carga negativa superficial fortaleciendo así las interacciones electrostáticas entre el grupo amonio de DOX y la superficie del nanomaterial, mientras que a pH 5.0 podría favorecerse la repulsión electrostática entre la DOX cargada positivamente (figura 26 con sus valores de pKa) y los

grupos superficiales catiónicos ($\equiv\text{Ti-OH}_2^+$) promoviendo una mayor liberación del fármaco adsorbido en el nanotransportador.

En el caso del sistema NRTB/Ce6 se obtiene como resultado porcentajes de liberación acumulados mayores, correspondientes a 23 % y 30 % a pH 7.4 y 5.0 respectivamente. Este es un resultado relevante pues confirma que la superficie del material fue modificada químicamente con APTMS y Ce6 disminuyendo los grupos Ti-OH tal como se verificó mediante la caracterización por TGA. La especiación del FS a los pH evaluados indica que se encuentra en su forma neutra tal como ha sido reportado en la literatura [81]. Es por lo anterior que se sugiere que la adsorción de DOX:HCl se favorece por la interacción con el FS inmovilizado para el sistema NRTB/Ce6. Luego, cuando se contacta la formulación con PBS a diferentes pH, predomina la solubilidad de DOX en agua frente a la interacción por adsorción superficial con NRTB/Ce6.

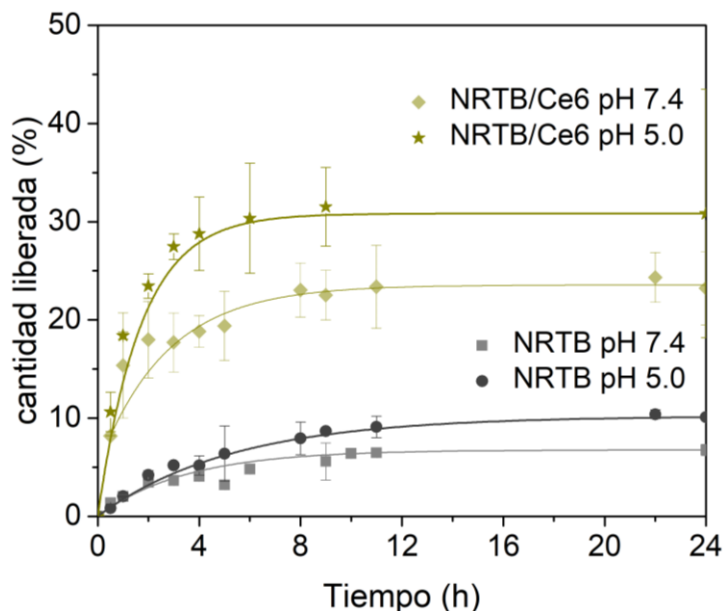


Figura 27. Perfil de liberación de DOX de los NRTB y NRTB/Ce6.

Es importante resaltar que a partir de los perfiles de liberación es posible estimar las cantidades liberadas de DOX desde los nanomateriales, en el rango de concentración de las suspensiones probadas en los experimentos de quimicitotoxicidad (sección 4.8.1 a continuación), las cuales son equivalentes con las dispersiones estudiadas en los ensayos de fototoxicidad (sección 4.6.1 y 4.6.3) para los materiales en base a NRTB.

Por su parte, también se realizaron los análisis con los NRTN y NRTN/Ce6 obteniendo los perfiles de liberación mostrados en la figura 28 para ambos pH evaluados. De manera similar, a lo determinado en los NRTB, se observó que la cantidad liberada a pH 5.0 es ligeramente mayor en el caso de los NRTN en los cuales se presentó un porcentaje de aproximadamente 11% y 15 % para pH 7.4 y

5.0 respectivamente. Un efecto más notorio fue observado para los NRTN/Ce6, resultando en cantidades liberadas de 22% y 40% a pH 7.4 y 5.0, respectivamente.

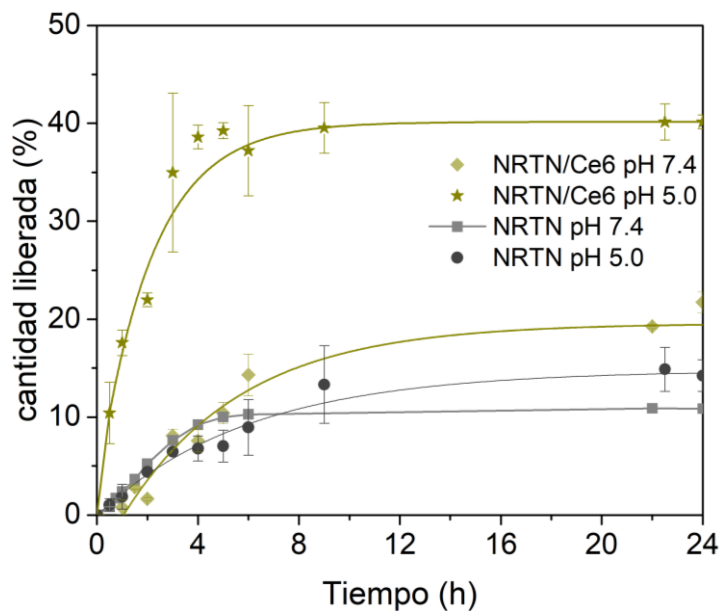


Figura 28. Perfil de liberación de DOX de los NRTN y NRTN/Ce6.

La superficie del sistema NRTN debería presentar propiedades similares a la del sistema NRTB, por lo que los fenómenos de interacciones electrostáticas deberían manifestarse de manera análoga en estos sistemas. Se espera que la modificación superficial con Ce6 modifique la capacidad de adsorción permitiendo que se libere mayor cantidad de DOX:HCl en comparación con el sistema NRTN.

4.8. Experimentos de quimio-fototoxicidad

4.8.1. Experimentos de quimio-fototoxicidad con NRTB y NRTB/Ce6

Se llevaron a cabo estudios de quimiotoxicidad y quimio-fototoxicidad *in vitro* con células HeLa para evaluar la capacidad del material conjugado NRTB/Ce6 como potencial plataforma dual en aplicaciones de quimio-fototerapia. Para ello, se incubaron células HeLa con suspensiones de DOX:NRTB/Ce6 a 100 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ correspondientes a concentraciones nominales de DOX de 1.60 a 4.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se llevaron a cabo experimentos paralelos con la formulación DOX:NRTB a las mismas concentraciones y sus contenidos de DOX corresponden a 3.10 y 9.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La Figura 29A muestra los resultados viabilidad celular, después de 12 h de contacto con las suspensiones en oscuridad, en los cuales se evidenciaron disminuciones moderadas en la viabilidad celular para ambas concentraciones evaluadas. Se puede presumir que estos resultados se deben a los efectos citotóxicos esperados de la liberación de DOX por parte de los nanomateriales. Después de 24 horas de incubación, los sistemas tratados con la formulación DOX:NRTBs mostraron cambios mínimos en la viabilidad celular, mientras que la formulación DOX:NRTB/Ce6 ejerció una disminución progresiva en la viabilidad celular después de 24 h de incubación más notorio en la mayor concentración empleada (Figura 29B). Estos hallazgos respaldan la mayor liberación de DOX observada en el sistema NRTB/Ce6 en comparación con los

NRTB prístinos. Para los experimentos combinados de quimio-fototoxicidad se incubaron las células HeLa con dispersiones de DOX:NRTB/Ce6 durante 12 horas, seguido de irradiación con luz LED visible (15 minutos, 150 W m^{-2}) y 12 h más de incubación (24 h en total) (Figura 29C). Las células tratadas con NRTB/Ce6 cargado con DOX mostraron una reducción significativa en la viabilidad celular en comparación con los resultados obtenidos en experimentos de quimiotoxicidad a las 24 h de incubación, lo que respalda la potenciación de los efectos quimiofototóxicos dado que se observaron diferencias significativas entre las dispersiones de NRTB/Ce6 a 100 y $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, alcanzando en ambos sistemas viabilidades cercanas al 26%. Estos hallazgos son consistentes con estudios anteriores que informan sobre el desarrollo de un nanotransportador multimodal basado en nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN) para la administración conjunta del fotosensibilizador Ce6 y DOX como agente quimioterapéutico para la terapia combinada contra el cáncer [82]. Además, nuestros resultados evidencian que la conjugación covalente del Ce6 a los nanorods mesoporosos NRTB confieren propiedades fotodinámicas a los materiales prístinos, bajo irradiación con luz LED visible, manteniendo al mismo tiempo la capacidad adecuada para la carga y liberación de DOX, que permitieron observar efectos mejorados contra la viabilidad del modelo celular empleado.

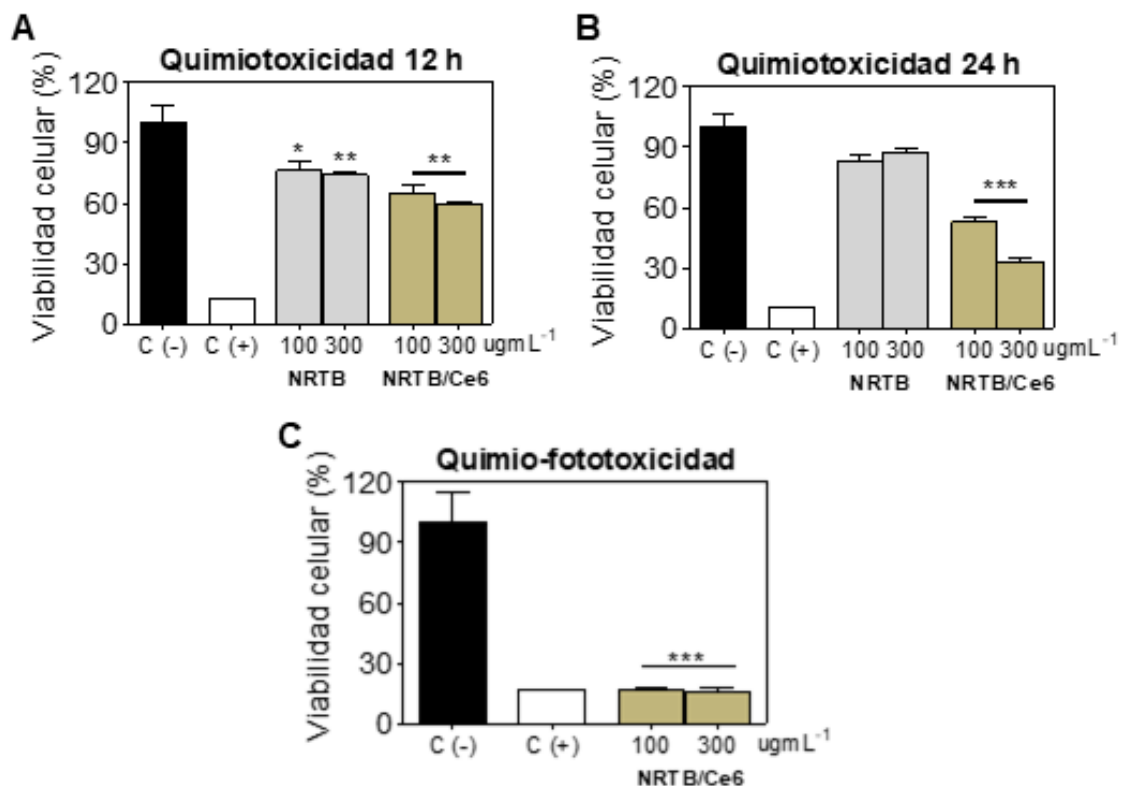


Figura 29. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con DOX:NRTB y DOX:Ce6-NRTB. (A) 12 h y (B) 24 h (quimiotoxicidad) (C) 12 h de oscuridad, irradiación con luz LED (15 min, 150 W m⁻²) y oscuridad hasta 24 h (quimio-fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células no tratadas y se presentaron como media ± SD, n=3. Las diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a p < 0.050, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

4.8.2. Experimentos de quimio-fototoxicidad con NRTN y NRTN/Ce6

De acuerdo con el potencial de los NRTN y NRTN/Ce6 en fototerapia y los resultados de las propiedades de encapsulación/liberación de DOX, también se llevaron a cabo los estudios de quimicitotoxicidad *in vitro* en la oscuridad con células HeLa utilizando suspensiones, precargadas con DOX, a concentraciones de 100 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que para los NRTN corresponden a concentraciones nominales de DOX en un rango de 3 – 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y para NRTN/Ce6 en un rango de concentraciones nominales de DOX de 1 – 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La Figura 30A muestra los resultados de los ensayos MTS después de 12 horas de contacto evidenciando una disminución en el porcentaje de viabilidad celular al aumentar las concentraciones de DOX:NRTNs. Se presentaron diferencias significativas solo en la concentración de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con un porcentaje de viabilidad celular cercano al 80%. Estos hallazgos fueron similares a los obtenidos con los experimentos de quimiotoxicidad en oscuridad a las 24 h (Figura 30 B), en los que se presentaron porcentajes comparables de viabilidad celular en ambas concentraciones evaluadas. En el experimento combinado con irradiación de luz LED (quimio-fototoxicidad (Figura 30 C)) después de 12 h de contacto de la formulación DOX:NRTN y posterior irradiación durante 15 min con luz LED, se observó que la disminución de la viabilidad celular es significativamente mayor en comparación al efecto fototóxico evaluado previamente (Figura 25B) y a los resultados de quimicitotoxicidad 24 h (Figura 30B). De manera puntual, para la concentración de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se alcanzó un porcentaje de viabilidad celular del 59% utilizando ambas estrategias en conjunto. Por su parte, el efecto combinado

se potenció significativamente tras la unión con Ce6, en la figura 30C se puede observar que los porcentajes de viabilidad celular obtenidos (~12 %) fueron comparables al control positivo, mientras que en los experimentos de quimiototoxicidad 24 h para los NRTN/Ce6 se disminuyó a un porcentaje de viabilidad celular alrededor de 40 % para 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

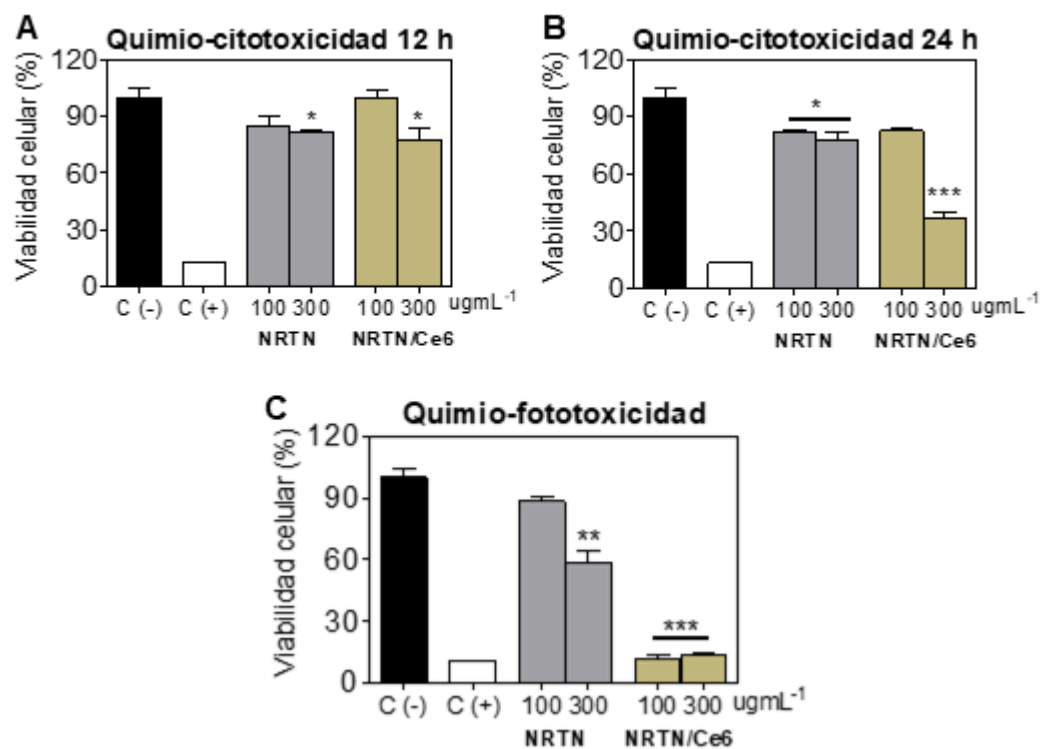


Figura 30. Experimentos de viabilidad celular con células HeLa en contacto con formulaciones de DOX:NRTN y DOX:Ce6-NRTN. (A) 12 h y (B) 24 h (oscuridad) (quimiototoxicidad) (C) 12 h de oscuridad, irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}) y oscuridad hasta 24 h (quimio-fototoxicidad). Los resultados se expresaron como porcentajes referidos a células no tratadas y se presentaron como media \pm SD, $n=3$. Las

diferencias estadísticamente significativas con el control (-) están marcadas con * y corresponden a $p < 0.050$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los hallazgos encontrados indican el potencial de una estrategia combinada mediada por luz, y fue posible establecer que se puede obtener un sistema de acción dual que actúa más eficiente que cada efecto evaluado individualmente, confirmando el potencial de los nanotransportadores basados en nanorods de TiO_2 en estrategias de quimio-fototerapia, y señala posibles alternativas para superar las limitaciones asociadas con la monoterapia.

5. CONCLUSIONES

Se prepararon, caracterizaron y evaluaron nanotransportadores empleando como precursores nanotubos de titanato de hidrógeno para obtener nanorods de TiO_2 . Estos nanomateriales fueron conjugados con los fotosensibilizadores Ce6 y TBO para ser empleados como materiales activos en quimiofototerapia mediada por luz LED visible. Todos los materiales mostraron nula actividad hemolítica y capacidad de actuar como nanotransportadores de doxorubicina como fármaco quimioterapéutico. No se detectó disminución de la viabilidad celular cuando los materiales se evaluaron en cultivos celulares del tipo HeLa. Sin embargo, mostraron quimiotoxicidad cuando se evaluó la formulación con doxorubicina en la línea celular de estudio. Además, la actividad fotodinámica, en el rango de luz visible, mostró un efecto fototóxico en los sistemas conjugados con Ce6 mientras que el nanorod prístino y el sistema conjugado con TBO no mostraron actividad fotodinámica cuando se irradiaron con luz LED visible. En los experimentos de actividad quimiofototerapéutica, se logró demostrar que el sistema conjugado con Ce6 mostró un efecto combinado cuando se evaluó su acción dual en la línea celular HeLa.

El sistema de nanorods de TiO_2 se modificó químicamente, tratándolo térmicamente con NaBH_4 , con el fin de generar nanorods de TiO_2 negro con capacidad fotodinámica bajo irradiación de luz visible. Con el fin de incrementar la absorción de luz en el rango espectral deseado, este nanomaterial se conjugó

con Ce6 donde se verificó, mediante las caracterizaciones fisicoquímica y fotoquímicas, que ambos materiales poseen actividad fotodinámica. Estos materiales mostraron ser hemocompatibles y poseen capacidad de encapsulación-liberación de doxorubicina. Los sistemas no mostraron ser citotóxicos cuando se evaluó su viabilidad celular en oscuridad, mientras que bajo irradiación de luz LED visible mostraron fototoxicidad en la línea celular HeLa. Finalmente, la actividad quimiofototerapéutica mostró un efecto importante en la disminución de la viabilidad celular de las líneas de cáncer empleadas lo que permite confirmar que el material en base a nanorods de TiO_2 conjugados con Ce6 son una nanoplataforma que posee un elevado potencial para ser empleado como un nanovehículo para el transporte de fármacos quimioterapéuticos además de ejercer acción fotodinámica cuando se irradia con luz LED visible.

Sería de gran interés explorar los sistemas basados en TiO_2 negro con otro tipo de radiación como infrarrojo cercano que han sido empleadas para promover el efecto fototérmico reportado para este tipo de nanomateriales y de esta manera poder potencializar en mayor medida los sistemas NRTN/Ce6 con respecto a los NRTB/Ce6. Esto podría beneficiar también las formulaciones NRTN:DOX sin modificaciones con FS, las cuales presentaron resultados también relevantes como plataformas potenciales para aplicaciones de quimio-fototerapia inducida por luz LED visible en presencia de células HeLa como consecuencia de un efecto potencialmente mejorado frente al efecto quimiotóxico y fototóxico evaluado individualmente pero requiriendo concentraciones mucho mayores. Por

otro lado, sería interesante evaluar estos sistemas con otro tipo de quimioterapéuticos modelos en orden de expandir estas plataformas a otro tipo modelos celulares.

6. PRODUCTIVIDAD

6.1. Artículos

1. Chlorin e6-Conjugated Mesoporous Titania Nanorods as Potential Nanoplatform for Photo-Chemotherapy. (Estado: Publicado 25/05/2024). Nanomaterials.

Estefanía Vélez-Peña, Verónica A. Jiménez, Joaquín Manzo-Merino, Joel B. Alderete* y Cristian H. Campos*

2. Black TiO₂ Nanorods as Dual Drug Delivery and Visible LED Light-sensitive carriers for Enhancement in Cancer Chemophotherapy. (Estado: Enviado 25/03/2024). Journal of Drug Delivery Science and Technology.

Estefanía Vélez-Peña, Verónica A. Jiménez, Joaquín Manzo-Merino, Victoria Melin, David Contreras, Joel B. Alderete*, Cristian H. Campos*

3. Mesoporous mixed oxides prepared by hard template methodology as novel drug delivery. Publicado. Journal of Drug Delivery Science and Technology

Estefanía Vélez-Peña, Ruddy Morales, Carlos Reyes-Escobar, Cecilia C. Torres, Marcia Avello, Kelly P. Marrugo, Joaquín Manzo-Merino, Joel B. Alderete, Cristian H. Campos.

6.2. Participación en eventos

Nanorods de dióxido de titanio reducido como potencial plataforma para terapia combinada contra el cáncer.

Estefanía Vélez-Peña, Cecilia C. Torres, Verónica A. Jiménez, Joaquín Manzo-Merino, Joel B. Alderete, Cristian H. Campos.

XII Jornadas Chilenas de Catálisis y Adsorción.

Termas de Quinamávida, Linares, Chile.

15 al 17 de noviembre de 2023
Modalidad oral

Nanotransportadores de dióxido de titanio conjugados con fotosensibilizadores como potencial plataforma para fotoquimioterapia.

Estefanía Vélez-Peña, Joel B. Alderete, Cristian H. Campos.

Segundo Seminario de Investigación en Química Industrial (SIQUIN).
Perspectivas de Investigación en la Región

11 al 12 de septiembre de 2023
Modalidad oral

Chlorine e6 and Toluidine blue O conjugated titania nanotubes for photodynamic therapy applications.

Estefanía Velez-Peña, Carola F. Diaz, Cecilia C. Torres, Verónica A. Jiménez, Joel B. Alderete, Cristian H. Campos.

5th International Conference on MATERIALS SCIENCE & NANOTECHNOLOGY.

London, United Kingdom
06 y 07 de octubre 2022
Modalidad oral (Evento híbrido)

Photosensitized Halloysite nanotubes as potential nanoplatforms for photochemotherapeutic treatment of cancer.

Keila Barrera, **Estefanía Vélez-Peña**, Jaiver Osorio-Grisales, Carlos Reyes-Escobar, Cecilia C. Torres, Joel B.

19th International Conference on Advanced Nanomaterials (ANM2022)

Universidad de Aveiro, Aveiro-Portugal

27 al 29 de Julio de 2022
Modalidad oral (evento híbrido)

Alderete, Joaquín Manzo-Merino, and Cristian H. Campos.

Inmovilización de Azul de Toluidina en nanoplateformas de Al_2O_3 y su aplicación en fototerapia dinámica.

Nicolás Moreno, **Estefanía Velez-Peña**, Cecilia C. Torres, Verónica A. Jiménez, Joaquin Manzo-Merino, Cristian H. Campos y Joel Alderete.

VI CONGRESO NACIONAL DE
NANOTECNOLOGÍA

Puerto Varas, Chile.

23 al 26 de noviembre de 2021

(Modalidad oral (evento online))

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2024.
2. Price, P. and K. Sikora, *Treatment of cancer*. 2020: CRC Press.
3. Debela, D.T., et al., *New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives*. SAGE Open Med, 2021. **9**: p. 20503121211034366.
4. Senapati, S., et al., *Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance*. Signal Transduct Target Ther, 2018. **3**: p. 7.
5. Qin, S.Y., et al., *Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy*. Biomaterials, 2018. **171**: p. 178-197.
6. Li, W.P., et al., *Recent Advances in Photodynamic Therapy for Deep-Seated Tumors with the Aid of Nanomedicine*. Biomedicines, 2021. **9**(1).
7. Cheng, L., et al., *Functional nanomaterials for phototherapies of cancer*. Chem Rev, 2014. **114**(21): p. 10869-939.
8. Pourmadadi, M., et al., *TiO₂-based nanocomposites for cancer diagnosis and therapy: A comprehensive review*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023. **82**.
9. Nešić, M., et al., *Light controlled metallo-drug delivery system based on the TiO₂-nanoparticles and Ru-complex*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2017. **347**: p. 55-66.
10. Salahuddin, N., et al., *Synthesis and Design of Norfloxacin drug delivery system based on PLA/TiO₂ nanocomposites: Antibacterial and antitumor activities*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020. **108**: p. 110337.
11. Kafshgari, M.H., et al., *Intracellular Drug Delivery with Anodic Titanium Dioxide Nanotubes and Nanocylinders*. ACS Appl Mater Interfaces, 2019. **11**(16): p. 14980-14985.
12. Torres, C.C., et al., *PAMAM-grafted TiO₂ nanotubes as novel versatile materials for drug delivery applications*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **65**: p. 164-71.
13. Khafaji, M., et al., *Inorganic nanomaterials for chemo/photothermal therapy: a promising horizon on effective cancer treatment*. Biophys Rev, 2019. **11**(3): p. 335-352.
14. Habisreutinger, S.N., L. Schmidt-Mende, and J.K. Stolarczyk, *Photocatalytic reduction of CO₂ on TiO₂ and other semiconductors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(29): p. 7372-408.
15. Nosaka, Y. and A.Y. Nosaka, *Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis*. Chem Rev, 2017. **117**(17): p. 11302-11336.
16. Sawyer, D.T. and J.S. Valentine, *How super is superoxide?* Accounts of Chemical Research, 1981. **14**(12): p. 393-400.
17. Armstrong, D.A., et al., *Standard electrode potentials involving radicals in aqueous solution: inorganic radicals*. BioInorganic Reaction Mechanisms, 2013. **9**(1-4).
18. Rengifo-Herrera, J.A., P. Osorio-Vargas, and C. Pulgarin, *A critical review on N-modified TiO₂ limits to treat chemical and biological contaminants in water. Evidence that enhanced visible light absorption does not lead to higher degradation rates under whole solar light*. J Hazard Mater, 2022. **425**: p. 127979.

19. Jukapli, N.M. and S. Bagheri, *Recent developments on titania nanoparticle as photocatalytic cancer cells treatment*. J Photochem Photobiol B, 2016. **163**: p. 421-30.
20. Xiaobo Chen, L.L., Peter Y. Yu, and Samuel S. Mao *Increasing Solar Absorption for Photocatalysis with Black Hydrogenated Titanium Dioxide Nanocrystals*. Science, 2011. **331**: p. 746-750.
21. Wu, M.-C., et al., *Highly visible-light absorbing black TiO₂ nanocrystals synthesized by sol-gel method and subsequent heat treatment in low partial pressure H₂*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. **63**: p. 430-435.
22. Leshuk, T., S. Linley, and F. Gu, *Hydrogenation processing of TiO₂ nanoparticles*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2013. **91**(5): p. 799-807.
23. Liu, X., et al., *Progress in Black Titania: A New Material for Advanced Photocatalysis*. Advanced Energy Materials, 2016. **6**(17).
24. Ariyanti, D., et al., *NaBH₄ modified TiO₂: Defect site enhancement related to its photocatalytic activity*. Materials Chemistry and Physics, 2017. **199**: p. 571-576.
25. Serpone, N., *Is the Band Gap of Pristine TiO₂ Narrowed by Anion- and Cation-Doping of Titanium Dioxide in Second-Generation Photocatalysts?* The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(48): p. 24287-24293.
26. Andronic, L. and A. Enesca, *Black TiO(2) Synthesis by Chemical Reduction Methods for Photocatalysis Applications*. Front Chem, 2020. **8**: p. 565489.
27. Naldoni, A., et al., *Photocatalysis with Reduced TiO(2): From Black TiO(2) to Cocatalyst-Free Hydrogen Production*. ACS Catal, 2019. **9**(1): p. 345-364.
28. Ni, W., et al., *808nm light triggered black TiO(2) nanoparticles for killing of bladder cancer cells*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **81**: p. 252-260.
29. Liu, N., et al., *Aza-BODIPY Probe-Decorated Mesoporous Black TiO(2) Nanoplatform for the Highly Efficient Synergistic Phototherapy*. ACS Appl Mater Interfaces, 2020. **12**(37): p. 41071-41078.
30. Saeed, M., et al., *Tunable fabrication of new theranostic Fe(3)O(4)-black TiO(2) nanocomposites: dual wavelength stimulated synergistic imaging-guided phototherapy in cancer*. J Mater Chem B, 2019. **7**(2): p. 210-223.
31. Vadakkekara, R. and S.R. Jadkar, *3D Urchin-like Hierarchical Black TiO₂ Hollow Nanospheres: A Highly Active and Stable Electrocatalyst for Water Oxidation in Alkaline and Neutral Media*. ACS Applied Energy Materials, 2021. **5**(1): p. 674-684.
32. Ziental, D., et al., *Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine*. Nanomaterials (Basel), 2020. **10**(2).
33. Chilakamarthi, U. and L. Giribabu, *Photodynamic Therapy: Past, Present and Future*. Chem Rec, 2017. **17**(8): p. 775-802.
34. Chen, J., et al., *Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges*. Biomaterials, 2020. **237**: p. 119827.
35. Lei, W., et al., *Photodynamic Activity of Ascorbic Acid-modified TiO₂ Nanoparticles upon Visible Illumination (>550 nm)*. Chemistry Letters, 2009. **38**(12): p. 1138-1139.
36. Xu, S., et al., *Active oxygen species (1O₂, O₂⁻) generation in the system of TiO₂ colloid sensitized by hypocrellin B*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2002. **67**(1): p. 64-70.
37. Lucky, S.S., K.C. Soo, and Y. Zhang, *Nanoparticles in photodynamic therapy*. Chem Rev, 2015. **115**(4): p. 1990-2042.

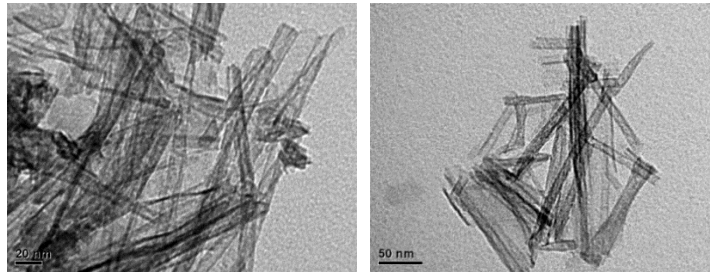
38. Bergein F. Overholt, M.P., John M. Haydek, *Photodynamic therapy for Barrett's esophagus: follow-up in 100 patients*. 1999.
39. Zhang, J., et al., *An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy*. *Acta Pharm Sin B*, 2018. **8**(2): p. 137-146.
40. Bacellar, I.O., et al., *Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers*. *Photochem Photobiol*, 2014. **90**(4): p. 801-13.
41. Almeida, A.M., Jr., O.N. Oliveira, Jr., and P.H.B. Aoki, *Role of Toluidine Blue-O Binding Mechanism for Photooxidation in Bioinspired Bacterial Membranes*. *Langmuir*, 2019. **35**(51): p. 16745-16751.
42. M, L., et al., *Phenothiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms*, in *Advanced Aspects of Spectroscopy*. 2012.
43. Adimoolam, M.G., et al., *Chlorin e6 loaded lactoferrin nanoparticles for enhanced photodynamic therapy*. *J Mater Chem B*, 2017. **5**(46): p. 9189-9196.
44. Nasr, S., et al., *A Naturally Derived Carrier for Photodynamic Treatment of Squamous Cell Carcinoma: In Vitro and In Vivo Models*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(6).
45. Parkhats, M.V., et al., *Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e 6: The effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone*. *Optics and Spectroscopy*, 2009. **107**(6): p. 974-980.
46. Zhao, X., et al., *Chitosan derived glycolipid nanoparticles for magnetic resonance imaging guided photodynamic therapy of cancer*. *Carbohydr Polym*, 2020. **245**: p. 116509.
47. Youssef, Z., et al., *Titania and silica nanoparticles coupled to Chlorin e6 for anti-cancer photodynamic therapy*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018. **22**: p. 115-126.
48. Jiao, X., et al., *Rational design of oxygen deficient TiO(2-x) nanoparticles conjugated with chlorin e6 (Ce6) for photoacoustic imaging-guided photothermal/photodynamic dual therapy of cancer*. *Nanoscale*, 2020. **12**(3): p. 1707-1718.
49. Jiménez, V.A., et al., *Visible-light-responsive folate-conjugated titania and alumina nanotubes for photodynamic therapy applications*. *Journal of Materials Science*, 2020. **55**(16): p. 6976-6991.
50. Qaid, S.M.H., et al., *Successful Growth of TiO(2) Nanocrystals with 001 Facets for Solar Cells*. *Nanomaterials (Basel)*, 2023. **13**(5).
51. Lopez Zavala, M.A., S.A. Lozano Morales, and M. Avila-Santos, *Synthesis of stable TiO(2) nanotubes: effect of hydrothermal treatment, acid washing and annealing temperature*. *Heliyon*, 2017. **3**(11): p. e00456.
52. Wang, M., et al., *Azo Initiator Loaded Black Mesoporous Titania with Multiple Optical Energy Conversion for Synergetic Photo-Thermal-Dynamic Therapy*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019. **11**(51): p. 47730-47738.
53. Algorri, J.F., et al., *Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(14).
54. Zada, I., et al., *Superior photothermal black TiO2 with random size distribution as flexible film for efficient solar steam generation*. *Applied Materials Today*, 2020. **20**.
55. Li, J., et al., *Synergistic effect of surface and bulk single-electron-trapped oxygen vacancy of TiO2 in the photocatalytic reduction of CO2*. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017. **206**: p. 300-307.

56. Praveen, P., et al., *Structural, optical and morphological analyses of pristine titanium dioxide nanoparticles--synthesized via sol-gel route*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014. **117**: p. 622-9.
57. Suddai, A., et al., *Feasibility of hard acid–base affinity for the pronounced adsorption capacity of manganese(ii) using amino-functionalized graphene oxide*. RSC Advances, 2018. **8**(8): p. 4162-4171.
58. Parhizkar, N., T. Shahrabi, and B. Ramezanzadeh, *Synthesis and characterization of a unique isocyanate silane reduced graphene oxide nanosheets; Screening the role of multifunctional nanosheets on the adhesion and corrosion protection performance of an amido-amine cured epoxy composite*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2018. **82**: p. 281-299.
59. Mueller, R., et al., *OH Surface Density of SiO₂ and TiO₂ by Thermogravimetric Analysis*. Langmuir, 2003. **19**(1): p. 160-165.
60. Bharathiraja, S., et al., *Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **19**: p. 212-220.
61. Thermofisher, *CHAPTER 18 Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide, in Molecular Probes™ Handbook* 2010.
62. <naito-et-al-2008-real-time-single-molecule-imaging-of-the-spatial-and-temporal-distribution-of-reactive-oxygen-species.pdf>.
63. Kim, S., M. Fujitsuka, and T. Majima, *Photochemistry of singlet oxygen sensor green*. J Phys Chem B, 2013. **117**(45): p. 13985-92.
64. Baptista, M.S., et al., *Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways*. Photochem Photobiol, 2017. **93**(4): p. 912-919.
65. Bai, X., et al., *HKOH-1: A Highly Sensitive and Selective Fluorescent Probe for Detecting Endogenous Hydroxyl Radicals in Living Cells*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(42): p. 12873-12877.
66. Buettner, G.R., *Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts** Free Radical Biology and Medicine, 1987. **3**(4): p. 259 - 303.
67. Fontmorin, J.M., et al., *Stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide as a spin-trap for quantification of hydroxyl radicals in processes based on Fenton reaction*. Water Res, 2016. **99**: p. 24-32.
68. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 127-52.
69. 10993-5, I., *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, in ISO standard. 2009: Geneva, Switzerland.
70. Urbaniak, S.K., et al., *8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development*. Molecules, 2020. **25**(1).
71. Chen, Z.H. and E. Niki, *4-hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects?* IUBMB Life, 2006. **58**(5-6): p. 372-3.
72. Gueraud, F., et al., *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products*. Free Radic Res, 2010. **44**(10): p. 1098-124.

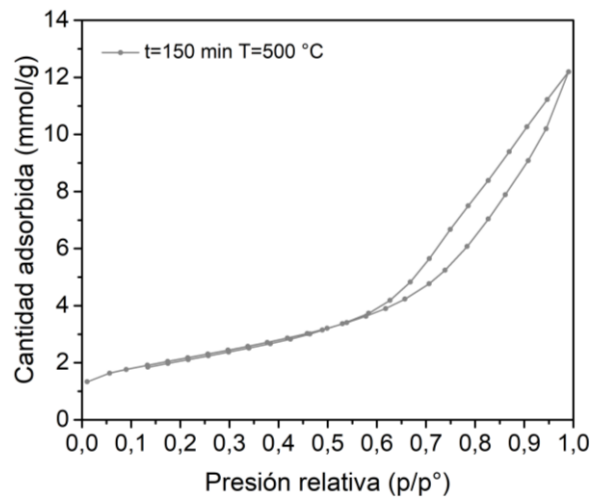
73. T. Martínez, D.B., T. Zafra, F. Pastor, *Método isotópico para determinación de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1) en muestras biológicas*. 2005, *Química Clínica* 2005; 24 (6) 464-467: Unidad de Radiofármacos. Hospital Virgen de la Arrixaca.
74. Denkova, A.G., R.M. de Kruijff, and P. Serra-Crespo, *Nanocarrier-Mediated Photochemotherapy and Photoradiotherapy*. *Adv Healthc Mater*, 2018. **7**(8): p. e1701211.
75. Vankayala, R., et al., *First demonstration of gold nanorods-mediated photodynamic therapeutic destruction of tumors via near infra-red light activation*. *Small*, 2014. **10**(8): p. 1612-22.
76. Ren, W., et al., *A Near Infrared Light Triggered Hydrogenated Black TiO₂ for Cancer Photothermal Therapy*. *Adv Healthc Mater*, 2015. **4**(10): p. 1526-36.
77. Cacaccio, J.C., et al., *Photodynamic Therapy in Combination with Doxorubicin Is Superior to Monotherapy for the Treatment of Lung Cancer*. *Biomedicines*, 2022. **10**(4).
78. Yousefi Sadeghloo, A., K. Khorsandi, and Z. Kianmehr, *Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells*. *Photochem Photobiol Sci*, 2020. **19**(11): p. 1580-1589.
79. Neacșu, A., *Physicochemical investigation of the complexation between γ -cyclodextrin and doxorubicin in solution and in solid state*. *Thermochimica Acta*, 2018. **661**: p. 51-58.
80. McNamee, C.E., Y. Tsujii, and M. Matsumoto, *Physicochemical Characterization of an Anatase TiO₂ Surface and the Adsorption of a Nonionic Surfactant: An Atomic Force Microscopy Study*. *Langmuir*, 2005. **21**(24): p. 11283-11288.
81. Vermathen, M., et al., *pH-dependent distribution of chlorin e6 derivatives across phospholipid bilayers probed by NMR spectroscopy*. *Langmuir*, 2010. **26**(13): p. 11085-94.
82. Sun, J.H., et al., *Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as efficient transporters of doxorubicin and chlorin e6 for chemo-photodynamic combinatorial cancer therapy*. *J Biomater Appl*, 2018. **32**(9): p. 1253-1264.

ANEXOS

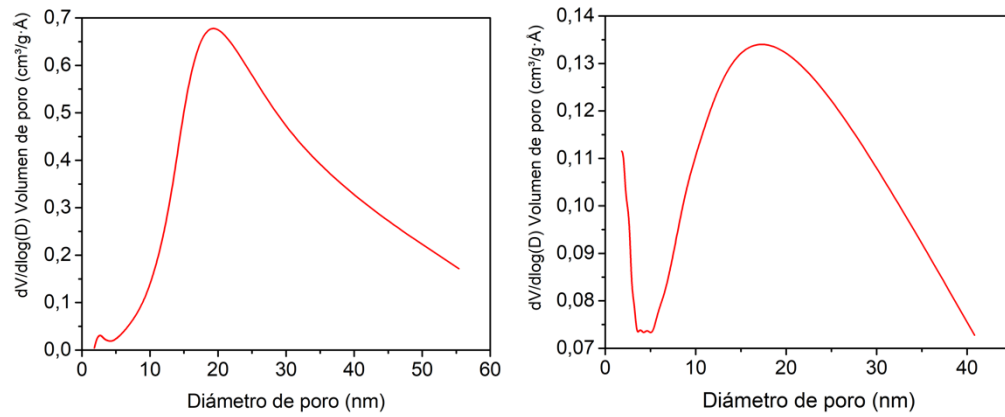
Anexo 1: Imágenes TEM para los nanotubos calcinados a 400°C durante 4 h.



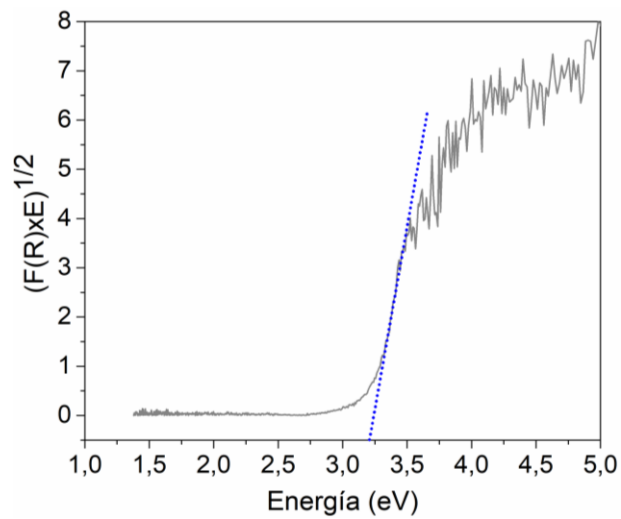
Anexo 2: Isotherma de adsorción y desorción de N₂ para los NRTB.



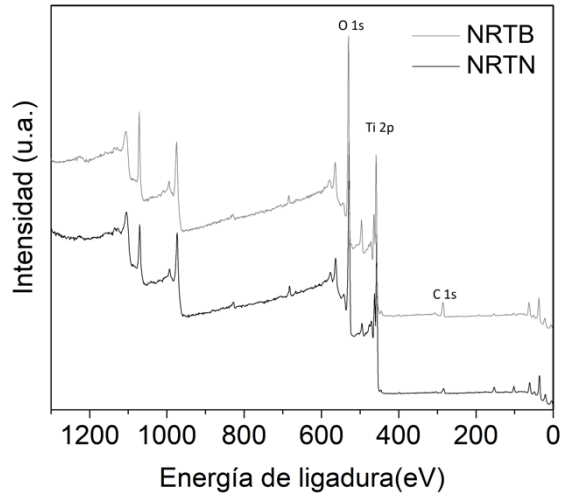
Anexo 3: Distribución del tamaño de poro de (A) nanomateriales prístinos y (B) reducidos.



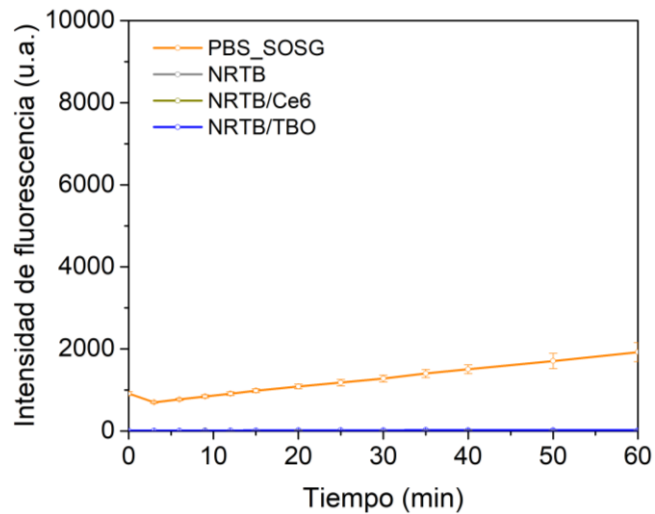
Anexo 4: Estimación de band-gap para los NRTB.

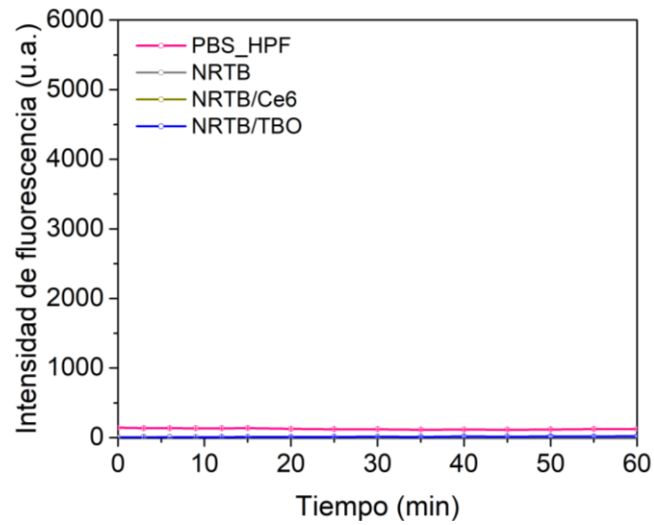


Anexo 5: Espectro XPS para NRTB y NRTN.

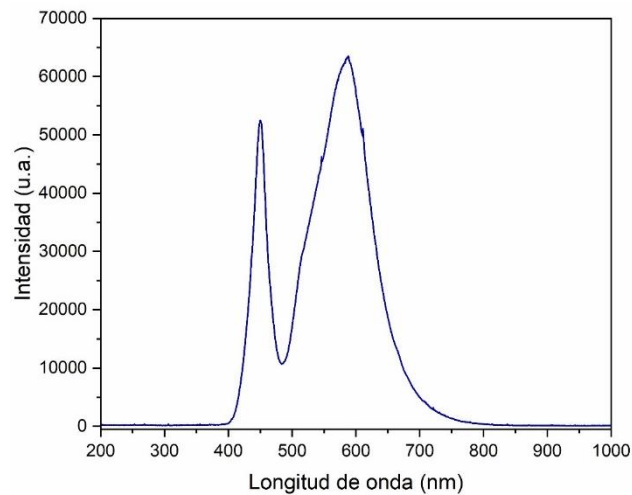


Anexo 6: Mediciones de control de experimentos de generación de radicales hidroxilo y oxígeno singlete con NRTB y NRTB/Ce6 bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Los experimentos se llevaron a cabo con suspensiones de 2 mg mL^{-1} utilizando las sondas fluorescentes HPF ($10 \mu\text{M}$) y SOSG ($40 \mu\text{M}$). La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 488/525 nm.

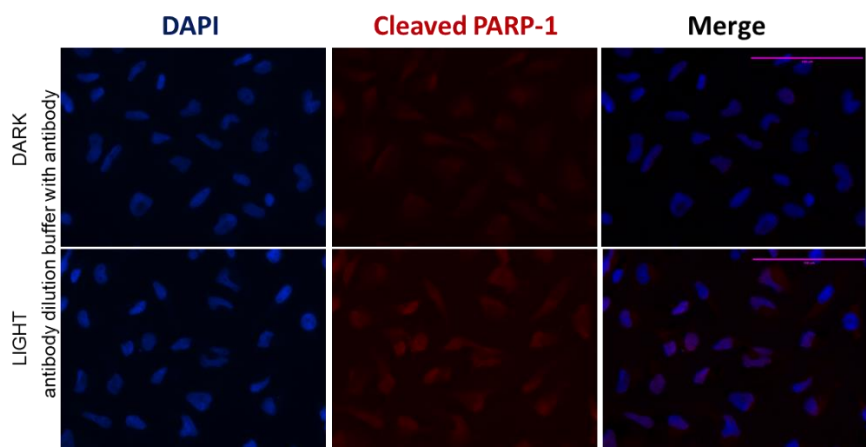
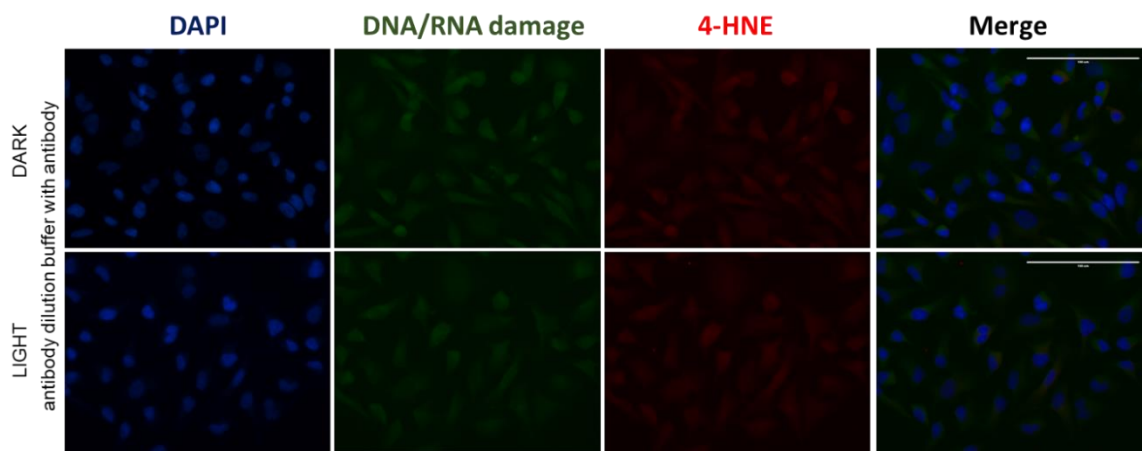
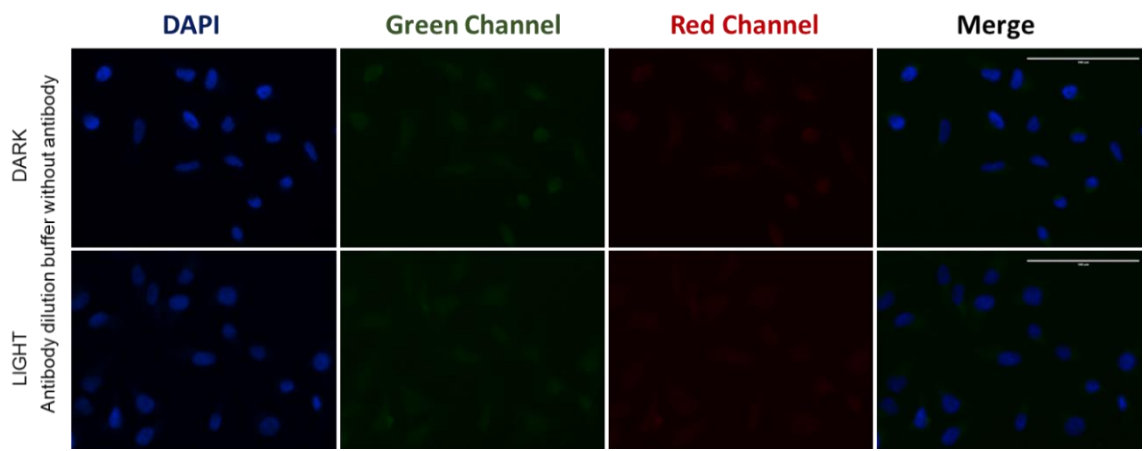


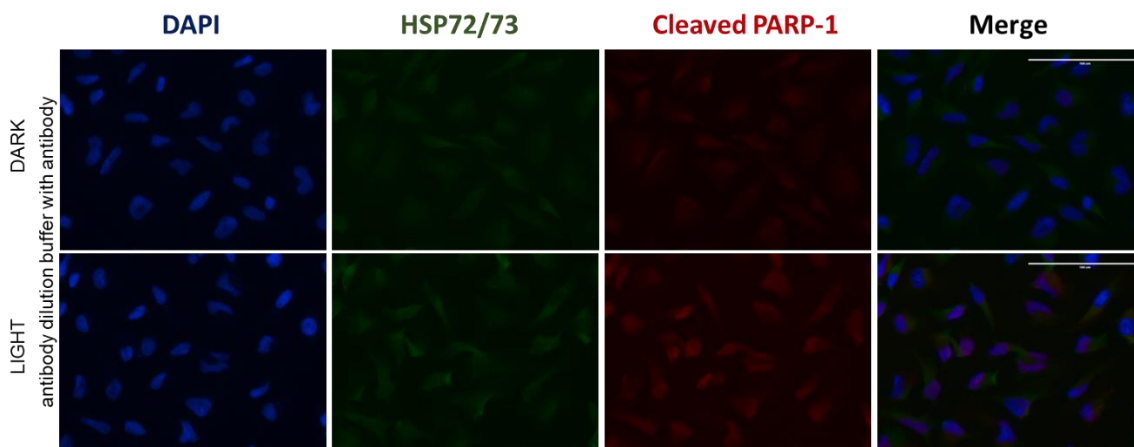


Anexo 7: Espectro de emisión de la lámpara de luz LED blanca.

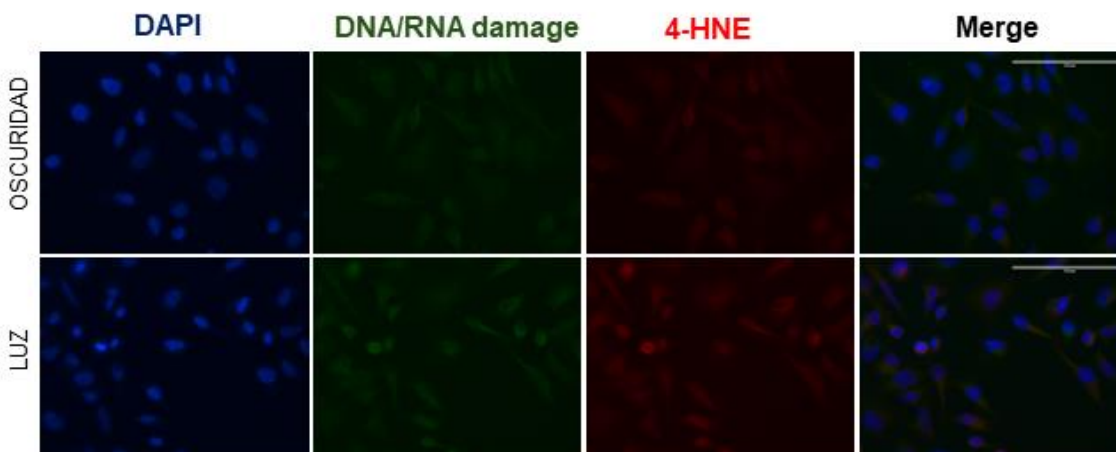


Anexo 8: Experimentos de control de inmunofluorescencia indirecta en oscuridad y luz. Fluorescencia intrínseca del buffer de dilución de anticuerpos en presencia y ausencia del mismo. Se utilizó la detección nuclear DAPI. Las imágenes se recopilaron con el objetivo de 40X.





Anexo 9: Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Se utilizó la detección nuclear DAPI con un canal verde para daño de DNA/RNA y un canal rojo para daño de membrana. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.



Anexo 10: Ensayos de inmunofluorescencia con células HeLa en presencia de NRTN ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en oscuridad y bajo irradiación con luz LED (15 min, 150 W m^{-2}). Se utilizó la detección nuclear DAPI con un canal verde para HSP72/73 y un canal rojo para apoptosis. Las imágenes fueron recolectadas con el objetivo de 40 X.

