



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Químicas

Doctorado en Ciencias con Mención en Química

VECTORIZACIÓN DE NANOCARRIERS FOTOSENSIBILIZADOS CON  
POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIA COMBINADA PARA EL  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER

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

Por:

ROSA IBIS MENEAU HERNÁNDEZ

Profesora Guía: Dra. Tatiana M. Bustamante Betancur

Profesor Co-Guía: Dr. Cristian H. Campos Figueroa

Concepción, 2026

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

## **AGRADECIMIENTOS**

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN .....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUCCIÓN .....	23
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo General .....	39
3.2. Objetivos específicos .....	39
4. METODOLOGÍA .....	40
4.1. Síntesis de los nanomateriales.....	40
4.1.1. Síntesis de HNT-Ce6.....	40
4.1.2. Síntesis de HNT-Ce6-PFOL.....	42
4.1.3. Síntesis de PAMAM-Ce6.....	43
4.1.4. Síntesis de PAMAM-Ce6-FOL.....	44
4.2. Caracterización de los nanotransportadores.....	46
4.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	49
4.4. Evaluación de la encapsulación y liberación de doxorubicina.....	50

4.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de doxorrubicina materiales en base a HNT .....	50
4.6. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de doxorrubicina materiales en base a PAMAM .....	51
4.6.1. Estudio de liberación de DOX.....	52
4.7. Ensayos de viabilidad celular.....	53
4.7.1. Ensayos de hemólisis .....	53
4.7.2. Experimentos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7.....	54
4.7.2.1. Ensayos in vitro de viabilidad celular para los nanomateriales y formulaciones en base a HNT y PAMAM en oscuridad (intrínseca y quimiotoxicidad) .....	56
4.7.2.2. Ensayos in vitro de viabilidad celular para las formulaciones en base a HNT y PAMAM bajo radiación lumínica (fototoxicidad y fotoquimiotoxicidad) .....	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
5.1. Nanomateriales en base a HNT .....	58
5.1.1. Preparación de los nanomateriales.....	58
5.1.2. Caracterización .....	59
5.1.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	60
5.1.2.2. Análisis termogravimétrico.....	63
5.1.2.3. Espectroscopía ultravioleta – visible de reflectancia difusa en estado sólido (DRS UV-vis).....	65
5.1.2.4. Movilidad electrocinética.....	69

5.1.3.	Producción de ROS.....	72
5.1.4.	Ensayos de Hemólisis.....	74
5.1.5.	Evaluación de la capacidad encapsulación y liberación de DOX .....	77
5.1.6.	Ensayos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7.....	85
5.1.6.1.	Viabilidad intrínseca (oscuridad) .....	85
5.1.6.2.	Viabilidad bajo irradiación de luz LED (fototoxicidad).....	86
5.1.6.3.	Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores (quimiotoxicidad).....	89
5.1.6.4.	Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores bajo irradiación de luz LED (fotoquimiotoxicidad).....	93
5.2.	Nanomateriales en base a PAMAM.....	98
5.2.1.	Preparación de los nanoconjugados.....	99
5.2.2.	Caracterización .....	99
5.2.2.1.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup> H) .....	99
5.2.2.2.	Espectroscopía de ultravioleta – visible (UV-vis) .....	103
5.2.2.3.	Espectroscopía de dispersión de luz dinámica (DLS) y medidas de potencial zeta .....	105
5.2.3.	Producción de ROS.....	107
5.2.4.	Ensayos de Hemólisis.....	109
5.2.5.	Evaluación de la capacidad encapsulación y liberación de DOX .....	111
5.2.6.	Ensayos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7.....	117
5.2.6.1.	Viabilidad intrínseca (oscuridad) .....	117

5.2.6.2.	Viabilidad bajo irradiación de luz LED (fototoxicidad).....	119
5.2.6.3.	Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores (quimiotoxicidad).....	123
5.2.6.4.	Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores bajo irradiación de luz LED (fotoquimiotoxicidad).....	127
6.	CONCLUSIONES.....	131
7.	PRODUCTIVIDAD.....	134
7.1.	Artículos científicos.....	134
7.2.	Participación en eventos.....	135
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	136
9.	ANEXOS.....	150

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1.</b> Diagrama de Jablonski modificado que ilustra el principio de la PDT. Adaptado de [7].....	26
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo de los nanotubos de HNT. Adaptado de [20]	29
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la estructura ramificada de los dendrímeros PAMAM. Extraído desde [39] .....	33
<b>Figura 4.</b> Procedimiento de preparación de nanomaterial HNT conjugado con Ce6. (a) APTMS en reflujo en tolueno seco y (b) activación de Ce6 en presencia de NHS/DCC y posterior contacto con una solución tampón a pH = 9.0 .....	41
<b>Figura 5.</b> (a) Preparación de IPTES-PEG-FOL y (b) IPTES-PEG-FOL en reflujo en tolueno seco sobre la superficie externa de HNT-Ce6.....	42
<b>Figura 6.</b> Esquema de conjugación de PAMAM con Ce6.....	44
<b>Figura 7.</b> Esquema de conjugación de PAMAM-Ce6 con NHS-PEG-FOL	45
<b>Figura 8.</b> Espectrogramas de FTIR para los nanomateriales en base a HNT	61
<b>Figura 9.</b> Curvas termogravimétricas para los materiales en base a HNT. Condiciones: atmósfera de N <sub>2</sub> a un flujo de 10 mL min <sup>-1</sup> a una rampa de calentamiento de 10 °C min <sup>-1</sup> desde temperatura ambiente hasta 700 °C	64
<b>Figura 10.</b> DRS UV-vis en estado sólido para los materiales en base a HNT	67
<b>Figura 11.</b> Movilidad electrocinética de nanomateriales basados en HNT	70
<b>Figura 12.</b> Detección de ROS para los nanomateriales en base a HNT bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 mW cm <sup>-2</sup> ). (a) Generación de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> y (B) ·OH.	

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, empleando suspensiones a 2 mg mL<sup>-1</sup> y las sondas fluorescentes SOSG (40 μM) y HPF (10 μM). La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 525 nm, respectivamente ..... 74

**Figura 13.** Experimentos de actividad hemolítica para nanomateriales basados en HNT ..... 75

**Figura 14.** Porcentajes de liberación cumulativa del fármaco a partir de nanotransportadores basados en HNT cargados con DOX a pH 7.4 y 5.0. (a) DOX@HNT, (b) DOX@HNT-Ce6 y (c) DOX@HNT-Ce6-PFOL ..... 80

**Figura 15.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar la citotoxicidad intrínseca. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ns no significativo; n = 3). ..... 86

**Figura 16.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar fototoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min, 150 mW cm<sup>-2</sup>) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante

un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y ns, no significativo; n = 3)..... 87

**Figura 17.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar la quimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ns no significativo; n = 3)..... 90

**Figura 18.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con las formulaciones basadas en HNT para evaluar la fotoquimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min, 150 mW cm<sup>-2</sup>) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y ns, no significativo; n = 3)... 94

**Figura 19.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de los nanoconjugados preparados a partir de PAMAM. (a) (a) PAMAM, PAMAM-Ce6, NHS-PFOL y PAMAM-Ce6-PFOL; y (b) espectros ampliados del nanoconjugado PAMAM-Ce6-PFOL..... 100

**Figura 20.** Espectro UV-vis de los nanoconjugados PAMAM-Ce6 y PAMAM-Ce6-FOL..... 104

<b>Figura 21.</b> Detección de ROS en nanoconjugados basados en PAMAM bajo irradiación con luz LED (60 min, 150 mW cm <sup>-2</sup> ). (a) Generación de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> y (b) HO·. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, empleando suspensiones a 2 mg mL <sup>-1</sup> y las sondas fluorescentes SOSG (40 μM) y HPF (10 μM). La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 525 nm, respectivamente.....	108
<b>Figura 22.</b> Experimentos de actividad hemolítica para nanomateriales basados en PAMAM.....	110
<b>Figura 23.</b> Porcentajes de liberación cumulativa del fármaco a partir de nanoconjugados basados en PAMAM cargados con DOX a pH 5.0 y 7.4. (a) DOX@PAMAM, (b) DOX@PAMAM-Ce6 y (c) DOX@PAMAM-Ce6-PFOL	114
<b>Figura 24.</b> Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar la citotoxicidad intrínseca. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ns no significativo; n = 3).....	118
<b>Figura 25.</b> Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar fototoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min, 150 mW cm <sup>-2</sup> ) y una segunda incubación	

hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y ns, no significativo; n = 3)..... 120

**Figura 26.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar la quimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ns no significativo; n = 3)..... 124

**Figura 27.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con las formulaciones basadas en PAMAM para evaluar la fotoquimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min, 150 mW cm<sup>-2</sup>) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y ns, no significativo; n = 3). 128

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Eficiencia de encapsulación de DOX en nanotransportadores basados en HNT y ajuste del modelo cinético matemático de Korsmeyer-Peppas a los datos de liberación del fármaco a diferentes pH en formulaciones basadas en HNT cargadas con DOX.....	78
<b>Tabla 2.</b> Valores de IC <sub>50</sub> calculados a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED 150 mW cm <sup>-2</sup> de cada nanotransportador en líneas celulares HeLa y MCF-7 .....	88
<b>Tabla 3.</b> Valores IC <sub>50</sub> calculado a partir de los datos de citotoxicidad de las formulaciones de DOX encapsuladas en cada nanotransportador basado en HNT en las líneas celulares HeLa y MCF-7.....	91
<b>Tabla 4.</b> Valores IC <sub>50</sub> y CI calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED 150 mW cm <sup>-2</sup> de cada formulación de DOX encapsulada en los nanotransportadores en base a HNT en líneas celulares HeLa y MCF-7.....	96
<b>Tabla 5.</b> Parámetros obtenidos a partir de mediciones de DLS y potencial zeta para nanoconjugados en base a PAMAM en PBS a pH = 7.4. Los valores representan la media ± desviación estándar (SD) de tres réplicas independientes. ....	106
<b>Tabla 6.</b> Eficiencia y estequiometría de encapsulación de DOX para los nanoconjugados en base a PAMAM, y ajuste del modelo cinético matemático de	

Korsmeyer-Peppas de los datos de liberación del fármaco a diferentes pH para las formulaciones basadas en HNT cargadas con DOX.....	112
<b>Tabla 7.</b> Valores $IC_{50}$ calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED $150 \text{ mW cm}^{-2}$ de cada nanoconjugado en líneas celulares HeLa y MCF-7 .....	122
<b>Tabla 8.</b> Valores $IC_{50}$ calculado a partir de los datos de citotoxicidad de las formulaciones de DOX encapsulada en cada nanoconjugado basado en PAMAM en líneas celulares HeLa y MCF-7 .....	125
<b>Tabla 9.</b> Valores $IC_{50}$ y CI calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED $150 \text{ mW cm}^{-2}$ de cada formulación de DOX encapsulada en los nanoconjugados en base a PAMAM en líneas celulares HeLa y MCF-7.....	129

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APTMS</b>	(3-aminopropil)-trimetoxisilano
<b>CD44</b>	Receptor de superficie celular CD44 (receptor de ácido hialurónico)
<b>Ce6</b>	Chlorin e6
<b>CIELFQAR</b>	Péptido dirigido a la E-selectina (secuencia aminoacídica)
<b>CRGDKGPDC</b>	Secuencia peptídica del péptido penetrante iRGD
<b>CT</b>	Quimioterapia (Chemotherapy)
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>DCC</b>	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>DMEM-F12</b>	Mezcla de medios DMEM y F-12 para cultivo celular
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>EDC</b>	Hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<b>EE</b>	Eficiencia de encapsulación
<b>EpCAM</b>	Molécula de adhesión de células epiteliales (epithelial cell adhesion molecule)
<b>EPR</b>	Efecto de permeabilidad y retención aumentada (enhanced permeability and retention)
<b>FDA</b>	Administración de alimentos y medicamentos de USA (food and drug administration)

<b>FOL</b>	Ácido fólico
<b>FOLR</b>	Receptor de folato (folate receptor)
<b>FS</b>	Fotosensibilizador
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (fourier transform infrared spectroscopy)
<b>HeLa</b>	Línea celular de adenocarcinoma cervical humano
<b>HepG2</b>	Línea celular de hepatoblastoma humano
<b>HMVII</b>	Línea celular de melanoma maligno vaginal
<b>HNT</b>	Nanotubos de haloisita (Halloysite Nanotubes)
<b>HPF</b>	Hidroxifenilfluoresceína (sonda fluorescente para radical hidroxilo)
<b>CI</b>	Índice de combinación (Combination Index)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media máxima (half-maximal inhibitory concentration)
<b>IPTES</b>	3-(trietoxisilil)-propil isocianato
<b>iRGD</b>	Péptido penetrante tumoral iRGD (CRGDKGPDC)
<b>LC</b>	Capacidad de carga (Loading capacity)
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz (Light-Emitting Diode)
<b>MCF-7</b>	Línea celular de cáncer de mama humano ER/PR-positivo
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b>NIR</b>	Infrarrojo cercano (near-infrared)
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud

<b>PACT</b>	Quimioterapia fotoactivada (photoactivated chemotherapy)
<b>PAMAM</b>	Poli-[amidoamina] (polyamidoamine)
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)
<b>PCT</b>	Fotoquimioterapia (photochemotherapy)
<b>PDI</b>	Polidispersidad
<b>PDT</b>	Terapia fotodinámica (photodynamic therapy)
<b>PEG</b>	Poli-[etilenglicol] (polyethylene glycol)
<b>PFOL</b>	Poli-[etilenglicol]-ácido fólico (peg-folic acid)
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>pTAT</b>	Péptido penetrante celular derivado del virus del VIH-1
<b>PTT</b>	Terapia fototérmica (photothermal therapy)
<b>RBCs</b>	Eritrocitos (red blood cells)
<b>R<sub>H</sub></b>	Radio hidrodinámico
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance)
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear protónica (proton nuclear magnetic resonance)
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SOSG</b>	Singlet oxygen sensor green (sonda fluorescente para oxígeno singlete)
<b>T75</b>	Frasco de cultivo celular de 75 cm <sup>2</sup>

<b>T98G</b>	Línea celular de glioblastoma multiforme humano
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico (thermogravimetric analysis)
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visible (espectroscopía)
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	Oxígeno singlete
<b><math>\cdot\text{OH}</math></b>	Radical hidroxilo

## RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que ha causado una alta tasa de mortalidad a nivel mundial, por lo que resulta de vital importancia desarrollar diversas estrategias de tratamiento debido al gran impacto que tiene en la sociedad. En ese sentido, el uso de nanomateriales ha surgido como un enfoque prometedor para el desarrollo de sistemas capaces de propiciar tratamientos combinados que mejoren la eficacia y superen las limitaciones de los tratamientos convencionales. Por lo anterior, en la presente tesis doctoral se obtuvieron nanotransportadores basados en nanotubos de haloisita (HNT) y dendrímeros de poli-[amidoamina] (PAMAM) de cuarta generación modificados superficialmente con Chlorin e6 (Ce6) como agente fotodinámico y vectorizados con poli-[etilenglicol] funcionalizado con ácido fólico (PFOL) para generar sistemas que posean la capacidad de actuar como agentes nanotransportadores de fármacos (quimioterapia) y que posean la capacidad de inducir efecto fototóxico (terapia fotodinámica) mediante irradiación de luz LED en líneas celulares de cáncer que sobreexpresen el receptor de ácido fólico. La caracterización realizada en las distintas etapas de preparación de los nanomateriales confirma la obtención de HNT-Ce6-PFOL y de PAMAM-Ce6-PFOL. Los sistemas que poseen Ce6 inmovilizado covalentemente en su superficie evidenciaron la generación de ROS, específicamente  $^1\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$  bajo irradiación con luz LED visible a  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ . Los experimentos de encapsulación de doxorubicina (DOX), como fármaco quimioterapéutico modelo, demostraron que las nanoestructuras encapsulan

eficazmente el fármaco y que las formulaciones de DOX@HNT-Ce6-PFOL y DOX@PAMAM-Ce6-PFOL presentan una liberación dependiente del pH del medio simulado. Los perfiles de liberación se ajustaron a un modelo cinético de Korsmeyer-Peppas y se encontró que, en ambas formulaciones, la máxima liberación del fármaco ocurre a pH = 5.0.

Los experimentos de viabilidad celular *in vitro* con células HeLa y MCF-7 mostraron que los nanomateriales HNT-Ce6-PFOL y PAMAM-Ce6-PFOL no exhiben citotoxicidad intrínseca (oscuridad), mientras que bajo irradiación con luz LED visible ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) manifiestan fototoxicidad en ambas líneas celulares. De ellos, la actividad fotodinámica fue mayor en el sistema PAMAM-Ce6-PFOL, donde se observaron valores de concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) ~10 veces menores que en Ce6 libre. Para las formulaciones DOX@HNT-Ce6-PFOL y DOX@PAMAM-Ce6-PFOL se detectaron efectos quimiotóxicos en las células HeLa y MCF-7, con valores de IC<sub>50</sub> significativamente inferiores a los del DOX libre, excepto en el sistema DOX@HNT-Ce6-PFOL en la línea MCF-7, donde no se observó una disminución de la viabilidad inferior al 60% a las concentraciones evaluadas. Los experimentos combinados de fotoquimiotoxicidad demostraron efectos sinérgicos en la reducción de la viabilidad de las células estudiadas, lo que indica que los sistemas DOX@HNT-Ce6-PFOL y DOX@PAMAM-Ce6-PFOL con fotosensibilizadores son plataformas prometedoras para su uso en terapia combinada y dirigida inducida por la irradiación con luz LED visible.

## ABSTRACT

Cancer is a group of diseases that has caused a high mortality rate worldwide, making it vitally important to develop diverse treatment strategies due to its significant impact on society. In this regard, the use of nanomaterials has emerged as a promising approach to developing systems that enable combination therapies to improve efficacy and overcome the limitations of conventional treatments. Therefore, in this doctoral thesis, nanocarriers based on halloysite nanotubes (HNTs) and fourth-generation poly-[amidoamine] (PAMAM) dendrimers were obtained, surface-modified with Chlorin e6 (Ce6) as a photodynamic agent and vectorized with folic acid-functionalized poly-[ethylene glycol] (PFOL). These systems were designed to act as drug nanocarriers (chemotherapy) and to induce a phototoxic effect (photodynamic therapy) through LED light irradiation in cancer cell lines that overexpress the folic acid receptor. The characterization performed at the different stages of nanomaterial preparation confirms the production of HNT–Ce6–PFOL and PAMAM–Ce6–PFOL. Systems with Ce6 covalently attached to their surface produced ROS, specifically  $^1\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$  under visible LED light at  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ . Experiments with doxorubicin (DOX) encapsulation, using it as a model chemotherapeutic, showed that the nanostructures effectively loaded the drug. Additionally, the DOX@HNT–Ce6–PFOL and DOX@PAMAM–Ce6–PFOL formulations display pH-dependent release in the simulated medium. The release

profiles were fitted to a Korsmeyer-Peppas kinetic model, and it was found that, in both formulations, maximum drug release occurs at pH = 5.0.

In vitro cell viability experiments with HeLa and MCF-7 cells showed that the HNT-Ce6-PFOL and PAMAM-Ce6-PFOL nanomaterials do not exhibit intrinsic cytotoxicity (darkness), while under irradiation with visible LED light (150 mW cm<sup>-2</sup>) they exhibit phototoxicity in both cell lines. Among these, the PAMAM-Ce6-PFOL system exhibited greater photodynamic activity, with maximum mean IC<sub>50</sub> values approximately ten times lower than those of free Ce6. Chemotoxic effects were detected in HeLa and MCF-7 cells for the DOX@HNT-Ce6-PFOL and DOX@PAMAM-Ce6-PFOL formulations, with IC<sub>50</sub> values significantly lower than those of free DOX, except in the DOX@HNT-Ce6-PFOL system in the MCF-7 cell line, where no viability reduction of less than 60% was observed at the evaluated concentrations. Combined photochemotoxicity experiments demonstrated synergistic effects in reducing the viability of the studied cells, indicating that the DOX@HNT-Ce6-PFOL and DOX@PAMAM-Ce6-PFOL systems with photosensitizers are promising platforms for use in combination and targeted therapy induced by visible LED irradiation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte y un obstáculo importante para aumentar la esperanza de vida a nivel mundial. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) este se sitúa entre la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países y ocupa el tercer o cuarto lugar en los otros 23. El término cáncer, engloba un conjunto heterogéneo de trastornos multifactoriales. Biológicamente, este emerge a partir de alteraciones genéticas y moleculares que confieren a las células tumorales una serie de capacidades adquiridas: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis, reprogramación del metabolismo y escape del control inmunitario [1]. Estas características se sustentan en procesos subyacentes, como la inestabilidad genómica y la inflamación crónica, factores que favorecen la progresión y la heterogeneidad tumoral [2].

En la práctica clínica, las terapias convencionales contra el cáncer incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (CT) [3]. La cirugía resulta efectiva durante etapas de detección temprana, mientras que la radioterapia se emplea como tratamiento complementario con fines curativos o paliativos. No obstante, la CT continúa siendo un pilar en el manejo de neoplasias avanzadas y metastásicas en las que los fármacos empleados actúan interfiriendo con el ciclo

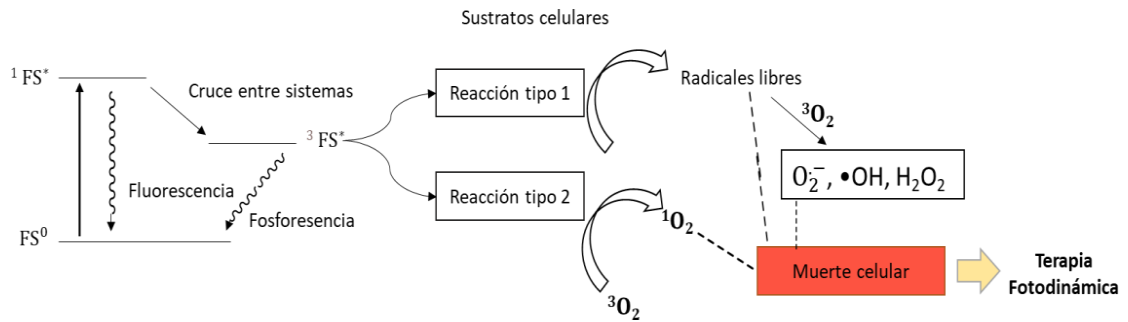
celular por diversos mecanismos: daño directo al ADN (cisplatino), inhibición de enzimas clave en la síntesis de nucleótidos (5-fluorouracilo, metotrexato), intercalación en el ADN con generación de radicales libres (doxorrubicina) o bloqueo de la polimerización de microtúbulos (taxanos y alcaloides de la vinca) [4], entre otros. No obstante, la quimioterapia tiene desventajas como la resistencia inmunitaria que el cuerpo desarrolla frente a los fármacos [6], su elevada toxicidad para las células sanas y la necesidad de dosis altas para que sea efectiva, debido a su rápida eliminación por el organismo [5]. En este sentido, la posibilidad de aplicar una terapia selectiva en la que los efectos citotóxicos se manifiesten únicamente en el tejido afectado supondría un enorme avance respecto de la quimioterapia tradicional, superando sus desventajas.

En paralelo a estas estrategias, la fototerapia ha surgido como una alternativa terapéutica prometedora por su capacidad de inducir daño localizado con menor toxicidad sistémica [5, 6]. Este enfoque se basa en el uso de fotosensibilizadores (FS), moléculas fotoactivas capaces de absorber luz en longitudes de onda específicas y, tras su activación, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables del efecto citotóxico. A diferencia de otras terapias convencionales, la acción del fotosensibilizador depende de la luz empleada, lo que permite activar el tratamiento únicamente en la zona de interés y en el momento deseado.

De este modo, la generación de ROS se limita al área irradiada, lo que reduce el daño en tejidos sanos y mejora el perfil de seguridad del tratamiento.

De acuerdo con su mecanismo de acción, la fototerapia se clasifica en terapia fotodinámica (PDT), terapia fototérmica (PTT) y quimioterapia fotoactivada (PACT). Entre ellas, la PDT ha sido ampliamente estudiada por su carácter mínimamente invasivo y su potencial de integración con otras modalidades terapéuticas, lo cual resulta especialmente relevante ante la complejidad del microambiente tumoral. No obstante, su eficacia puede verse limitada por factores como la baja penetración de la luz en tejidos profundos, la dependencia del oxígeno y la distribución subóptima de los fotosensibilizadores [6].

En cuanto a su mecanismo de acción, la PDT se basa en la activación de un fotosensibilizador mediante irradiación lumínica, lo que induce su transición a un estado excitado capaz de generar especies reactivas a través de dos rutas principales [7], como se muestra en la Figura 1. En el mecanismo tipo I, el fotosensibilizador participa en procesos de transferencia electrónica que conducen a la formación de radicales libres y otras ROS con efecto citotóxico; mientras que en el mecanismo tipo II transfiere energía al oxígeno molecular en estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ), produciendo oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), altamente citotóxico.



**Figura 1.** Diagrama de Jablonski modificado que ilustra el principio de la PDT. Adaptado de [7].

Estas especies reactivas provocan daño oxidativo en biomoléculas clave, como lípidos, proteínas y ADN, además de afectar la vasculatura tumoral y modular el microambiente tumoral, lo que contribuye a la muerte celular por apoptosis, necrosis o autofagia [8]. El proceso terapéutico de la PDT comprende dos etapas principales: la administración del fotosensibilizador, idealmente con acumulación selectiva en el tejido tumoral, seguida de la irradiación localizada con luz de longitud de onda adecuada sobre la zona afectada [9]. Los fotosensibilizadores empleados en PDT han evolucionado desde los de primera generación, como el Photofrin, con limitaciones de absorción y acumulación cutánea prolongada, hacia moléculas de segunda generación con mejores propiedades fotofísicas y farmacocinéticas [10].

Entre estos, el chlorin e6 (Ce6) destaca como un fotosensibilizador registrado por la FDA (FDA UNII: 5S2CCF3T1Z), con alta eficiencia en la generación de ROS y buena biocompatibilidad. No obstante, su uso se ve restringido debido a su

carácter hidrofóbico, a su tendencia a agregarse en medios fisiológicos y a su biodistribución ineficiente, lo que disminuye su acumulación en tumores y su eficacia terapéutica. Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de estrategias avanzadas que permitan optimizar su desempeño terapéutico, particularmente mediante sistemas de liberación más eficientes y selectivos.

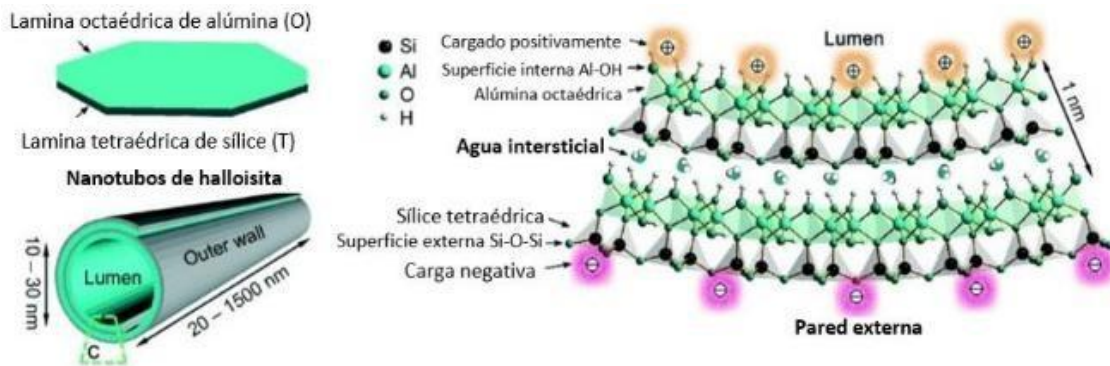
En este contexto, la nanotecnología ha revolucionado el campo de los tratamientos oncológicos al abordar las limitaciones inherentes de las terapias convencionales, como la CT y la PDT [11, 12]. El diseño racional de nanomateriales ha permitido mejorar significativamente la preparación de sistemas capaces de ejercer efectos terapéuticos combinados, destacándose la fotoquimioterapia (PCT) para el tratamiento del cáncer [13]. Para la PCT, las plataformas nanométricas ofrecen soluciones ingeniosas al permitir integrar múltiples funciones terapéuticas en un único sistema. Por un lado, facilitan la administración dirigida de agentes quimioterapéuticos (CT), favoreciendo su acumulación en el tejido tumoral y reduciendo los efectos adversos sistémicos, mientras que la incorporación de un componente fotodinámico en el nanomaterial permite la generación localizada de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la irradiación, induciendo efectos fototóxicos selectivos en el sitio diana. Esta combinación potencia la eficacia terapéutica global y posiciona a la PCT como una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer.

Actualmente se han reportado diferentes nanomateriales para aplicaciones en PCT destacándose aquellos de naturaleza polimérica [14], carbonosa [15],

metálica [16], en base a óxidos (metálicos, semimetálico o no metálico) [17] o estructuras biológicas de barrera lipídica como liposomas y micelas [18]. De ellas, en esta investigación llamaron la atención los nanotubos de haloisita (HNT) y los dendrímeros de poli-[amidoamina] (PAMAM) pues son nanomateriales ampliamente estudiados en el campo de la biomedicina, donde se destacan sus propiedades de biocompatibilidad, capacidad de transporte de fármacos y versatilidad para formar nanomateriales con diferentes propiedades mediante modificaciones químicas en su superficie [19].

Los HNT son aluminosilicatos arcillosos de origen natural que poseen fórmula química general  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , cuya morfología nanotubular única es el resultado del enrollamiento espontáneo de láminas de sílice y alúmina durante su formación geológica [20]. A diferencia de muchos nanomateriales sintetizados mediante procesos complejos y costosos, la haloisita se extrae directamente de depósitos naturales, lo que la convierte en un material de bajo costo, abundante y fácilmente escalable [21]. Su estructura es variable con un diámetro externo de 50-70 nm, un diámetro interno lumen de 10-15 nm y una longitud que varía de 500 a 1500 nm como se muestra en la Figura 2 [22, 23]. Esta arquitectura confiere al material una gran capacidad de carga, permitiendo el transporte y protección de una amplia gama de agentes quimioterapéuticos [24]. Una de sus características más destacadas es su biocompatibilidad inherente. Estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que HNT, en su forma nativa,

presentan una citotoxicidad significativamente menor que la de otros nanomateriales inorgánicos, como las nanoarcillas catiónicas o ciertas nanopartículas metálicas [25].



**Figura 2.** Esquema ilustrativo de los nanotubos de HNT. Adaptado de [20]

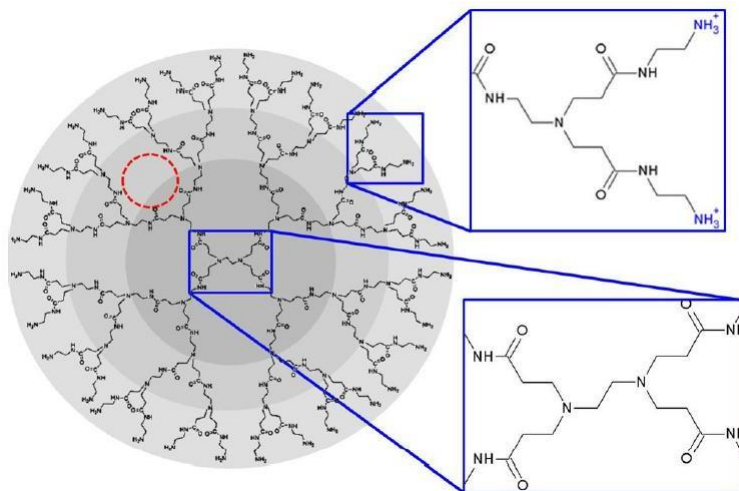
No obstante, su verdadero potencial terapéutico se manifiesta tras una funcionalización superficial. La química de superficie de la halloisita es singular: la superficie externa está compuesta principalmente por sílice ( $\text{SiO}_2$ ), que presenta grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) que pueden ser funcionalizados con silanos para anclar de forma covalente o electrostática una amplia gama de sustancias, como polímeros sintéticos [26], carbohidratos [27], y péptidos [28], entre otros. Por el contrario, la superficie interna del lumen está compuesta por alúmina ( $\text{Al-OH}$ ), que confiere una carga positiva en condiciones fisiológicas, lo cual facilita la adsorción de moléculas aniónicas [29].

En este sentido, se han reportado algunos estudios sobre el uso de HNT modificado en el PCT del cáncer. Nyankson y col. [30] han estudiado el uso de HNT modificada con Ag-TiO<sub>2</sub> como agente fotodinámico y su capacidad de transportar y liberar curcumina como fármaco modelo en células HeLa (adenocarcinoma cervical) demostrando un efecto sinérgico en PCT, el cual fue atribuido a la producción de ROS generadas por el Ag-TiO<sub>2</sub> y al efecto anticancerígeno – fotosensibilizante de la curcumina liberada por los HNTs en las células estudiadas. Recientemente, Adams y col. [31] han empleado un sistema basado en nanotubos de haloisita funcionalizados con nanopartículas de CuO y cargados con curcumina (CUR–CuO–HNT), orientado a potenciar estrategias de fotoquimioterapia. Este nanocompuesto no solo actúa como reservorio del fármaco, sino que también integra múltiples mecanismos terapéuticos, combinando las propiedades citotóxicas intrínsecas del CuO con la actividad biológica de la curcumina y su potencial fotodinámico. Los autores evaluaron su eficacia en líneas celulares HepG2 (hepatoblastoma), MCF-7 (ER/PR-positivo de mama humana) y HMVII (melanoma maligno vaginal), observando una mejora significativa en la actividad antitumoral del sistema en comparación con la curcumina libre. En particular, los resultados evidenciaron una disminución de los valores de concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>) en las formulaciones nanoestructuradas, especialmente bajo irradiación UV, lo que sugiere un efecto sinérgico asociado a la generación de ROS y a la liberación controlada del fármaco.

En conjunto, estos resultados destacan la relevancia de los sistemas basados en HNT como plataformas versátiles para terapias combinadas, capaces de mejorar la eficacia global mediante efectos sinérgicos entre quimioterapia y fototerapia. Si bien los sistemas basados en HNT han demostrado ser plataformas versátiles para la integración de agentes fotoactivos y quimioterapéuticos, la mayoría de las estrategias reportadas se han centrado en el uso de compuestos con actividad fotodinámica intrínseca, como la curcumina, o en la incorporación de nanopartículas inorgánicas con efectos citotóxicos complementarios. En contraste, el acoplamiento racional de fotosensibilizadores moleculares bien definidos a la superficie de HNT ha sido explorado predominantemente en el contexto de la PDT [32-34], sin abordar sistemáticamente su potencial en esquemas de PCT. Esta restricción indica que aspectos importantes, como la optimización de la producción de ROS, la regulación de la liberación de fármacos y la posible sinergia terapéutica bajo irradiación, aún están insuficientemente caracterizados en estos sistemas híbridos. En este contexto, el presente estudio plantea el desarrollo de nanotransportadores de HNT funcionalizados con Ce6, con el objetivo de evaluar su desempeño como plataforma terapéutica dual que integra de manera controlada la quimioterapia y la activación fotodinámica en el tratamiento del cáncer.

Por otra parte, los dendrímeros PAMAM representan una clase distintiva de nanotransportadores poliméricos sintéticos cuya estructura altamente ramificada y simétrica les confiere propiedades excepcionales para aplicaciones biomédicas

[35, 36]. Desarrollados inicialmente en la década de 1980, estos nanomateriales se construyen mediante una síntesis iterativa controlada a partir de un núcleo central de etilendiamina, al que se añaden sucesivas capas de ramificaciones de amida y amina, generando estructuras concéntricas denominadas "generaciones" (G0, G1.0, G2.0, etc.) [37]. Esta arquitectura molecular resulta en nanopartículas monodispersas, con un tamaño y forma uniformes, una ventaja crucial sobre otros sistemas poliméricos que suelen presentar alta heterogeneidad tal como se muestra en la Figura 3 [38]. Su tamaño nanométrico controlable (entre 2-15 nm dependiendo de la generación) y su superficie, que se torna catiónica en condiciones fisiológicas para la mayoría de las generaciones, generan sistemas que favorecen la internalización celular; predominantemente mediante endocitosis, mejorando significativamente la biodistribución y la captación intracelular de los agentes terapéuticos transportados [39]. La característica más destacable de los PAMAM es su elevada densidad de grupos funcionales terminales (aminas primarias en la superficie), que aumenta exponencialmente con cada generación [40]. Esta propiedad los convierte en plataformas ideales para la ingeniería de nanotransportadores multifuncionales para PCT, permitiendo la conjugación simultánea y controlada de múltiples sustancias, como agentes FS, y la encapsulación de fármacos quimioterapéuticos en una sola entidad nanométrica.



**Figura 3.** Representación esquemática de la estructura ramificada de los dendrímeros PAMAM. Extraído desde [39]

Derivado de ello, la gran mayoría de los trabajos reportados sobre dendrímeros PAMAM se ha centrado en su uso como agentes de transporte dual de fármacos y fotosensibilizadores, que suelen encapsularse en los bolsillos internos del polímero. Estas “cavidades” o “bolsillos” corresponden a espacios tridimensionales definidos por la arquitectura altamente ramificada del dendrímero, que permiten alojar moléculas mediante interacciones no covalentes, como fuerzas electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno.[41-43] Alternativamente, otros estudios han abordado la inmovilización covalente de estos compuestos en la superficie del dendrímero para su empleo en PDT [44-47]. Con este último enfoque, se ha demostrado que la eficacia fotodinámica del FS no solo se mantiene, sino que puede verse favorecida por las propiedades fisicoquímicas del dendrímero, tales como su alta

solubilidad, multivalencia y capacidad de interacción con sistemas biológicos. También es relevante señalar que estos sistemas conservan su capacidad de transportar fármacos, lo que sugiere la posibilidad de integrar funciones terapéuticas complementarias en una única plataforma nanométrica. Este marco conceptual constituye el punto de partida del enfoque desarrollado en la presente tesis doctoral, orientado al diseño de sistemas híbridos con potencial aplicación en terapia combinada.

A pesar de estos avances tecnológicos, persiste un obstáculo fundamental: la distribución heterogénea e inespecífica de los agentes terapéuticos. La dependencia del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) pasivo resulta insuficiente para garantizar una acumulación tumoral robusta y uniforme, lo que conduce a una baja concentración intratumoral y a una captación significativa en órganos sanos, comprometiendo tanto la eficacia como la seguridad del tratamiento. Para superar esta limitación, la vectorización activa se ha erigido en una estrategia indispensable [48]. Este concepto se basa en la funcionalización superficial de los nanotransportadores con ligandos biológicos específicos, como anticuerpos, péptidos o aptámeros, que reconocen selectivamente receptores sobreexpresados en la superficie de las células tumorales [6]. La vectorización activa mejora la acumulación tumoral y promueve la internalización celular del agente terapéutico, lo que aumenta su eficacia citotóxica y avanza hacia tratamientos más selectivos. [49].

En la búsqueda de plataformas versátiles para terapias combinadas, los nanotransportadores han sido modificados con diversas sustancias, lo que se traduce en una mejora considerable de su actividad terapéutica. En el caso de materiales basados en HNT, se ha reportado la funcionalización de los nanotransportadores con ácido hialurónico como agente vectorizador para la focalización eficiente mediada por el receptor CD44, el cual se sobreexpresa en una amplia línea de células de cáncer (gliomas, mamas, pulmón, colon y ovarios), lo que demuestra una importante mejora en su acción como agente CT en comparación con células que son negativas al receptor CD44 [50]. Tan y col. han vectorizado HNT con el anticuerpo anti-EpCAM para direccionar de forma eficiente formulaciones que incluyen HNT@indocyanine green para su acción contra el cáncer de mama, empleando MCF-7 como línea celular, y han observado una elevada actividad fotodinámica en comparación con los sistemas no vectorizados [51]. En el caso de PAMAM, Tang y col. han reportado sistemas PAMAM G5.0 como agentes nanotransportadores del fármaco temozolomida y del FS indocyanine green, vectorizando la superficie con ácido hialurónico para usarlos como agentes terapéuticos en células que sobreexpresen el receptor CD44 demostrando – con ensayos in vitro e in vivo – el efecto sinérgico que confiere el empleo de la terapia combinada y dirigida [41]. Ge y col. [52] han estudiado el uso de nanoplataformas híbridas que combinan PAMAM G5.0 conjugado con un péptido penetrante iRGD (CRGDKGPDC) modificado con cypate como FS. Estas plataformas fueron diseñadas para encapsular docetaxel

para su uso en PCT dirigido a células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Los estudios terapéuticos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostraron que la exposición local a la luz puede mejorar significativamente la eficacia antitumoral y reducir el riesgo de recurrencia tumoral. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado el empleo de dendrímeros PAMAM G4.0 doblemente modificados con un péptido penetrante celular (pTAT) y un péptido dirigido a la E-selectina (CIELFQAR) el cual se empleó como nanotransportador de DOX y fue internalizado de forma exitosa en células tumorales T98G mostrando capacidad CT mejorada en comparación con el fármaco libre y la formulación PAMAM@DOX monovectorizada [53].

Una alternativa prometedora ha sido la vectorización de nanotransportadores empleando ácido fólico (FOL) como ligando biológico [54]. El FOL es una vitamina económica e hidrosoluble que se une específicamente al receptor de folato (FOLR) con elevada afinidad ( $K_d \sim 10^{-10}$  M) lo que le brinda una alta permeabilidad para su transporte en el citosol [55, 56]. Gracias a estas características, se le considera el ligando más versátil en su función como vectorizador de nanotransportadores de fármacos quimioterapéuticos. A modo de ejemplo, varios autores han reportado el uso de FOL como agente vectorizador acoplado a poli-[etilenglicol] (PFOL) en HNT, con el fin de generar sistemas con elevada biocompatibilidad y afinidad por células que sobreexpresan FOLR, empleando longitudes de cadena entre 1000 y 5000 Da para asegurar una buena afinidad

nanotransportador-sitio diana [26, 57, 58]. En todos los casos, se ha observado una elevada actividad terapéutica al emplear estos sistemas como nanotransportadores dirigidos de fármacos. Este efecto se asocia principalmente a la bioacumulación y posterior internalización de los nanotransportadores en las líneas celulares estudiadas, lo que favorece un aumento de la eficacia del tratamiento. Diversos estudios reportan alta afinidad por tejido tumoral y resultados prometedores en modelos in vivo. En PAMAM, se han usado metodologías similares a las de HNT, explorando terapias combinadas con PFOL como direccionador [59].

El uso de sistemas basados en PCT que integren un nanomaterial capaz de actuar como transportador de fármacos y que, simultáneamente, incorpore una doble funcionalización mediante conjugación química (que le confiera propiedades fotodinámicas a través de un fotosensibilizador FS y una capacidad de direccionamiento hacia el receptor de folato FOLR) ha sido el foco de investigación en el desarrollo de esta tesis doctoral. En este contexto, el objetivo de esta tesis doctoral fue desarrollar y caracterizar nanotransportadores basados en nanotubos de haloisita y dendrímeros PAMAM G4.0 funcionalizados con Ce6 como fotosensibilizador y con PFOL como agente vectorizador, con el fin de evaluar su desempeño como sistemas de liberación dirigida de doxorubicina (DOX) para aplicaciones potenciales en terapia quimio-fotodinámica en modelos celulares de cáncer.

## **2. HIPÓTESIS**

La modificación superficial de nanomateriales del tipo HNT y PAMAM-G4.0, con ácido fólico pegilado como direccionador y Ce6 como fotosensibilizador, generará nanotransportadores multifuncionales con una elevada afinidad por células tumorales que sobreexpresen el receptor de ácido fólico, para la entrega de DOX como fármaco quimioterapéutico, y con actividad fotodinámica cuando se irradian con luz LED como fuente lumínica. De esta manera, los sistemas propuestos serán capaces de ejercer una acción dual que generará una mayor tasa de inactivación o de muerte de células cancerígenas en comparación con su efecto en quimioterapia o en fototerapia dinámica por separado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Obtener nanotransportadores en base a HNT y PAMAM-G4 modificados superficialmente con PFOL y Ce6, evaluando su acción fotoquimioterapéutica *in vitro* en líneas celulares del tipo HeLa y MCF-7.

#### **3.2. Objetivos específicos**

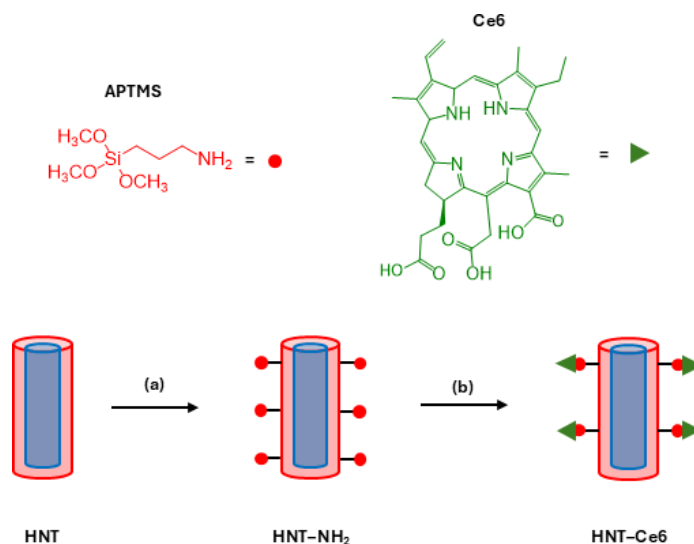
1. Obtener los nanotransportadores HNT y PAMAM-G4.0 modificados con Ce6 y PEG-FOL.
2. Caracterizar fotoquímica y fisicoquímicamente los sistemas preparados durante cada etapa de síntesis.
3. Evaluar la capacidad de los sistemas preparados para la encapsulación y la liberación controlada de DOX.
4. Evaluar las condiciones óptimas de los ensayos *in vitro* de terapia fotodinámica, quimioterapia y terapia combinada en las líneas celulares HeLa y MCF-7 como modelos de cáncer.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Síntesis de los nanomateriales**

#### **4.1.1. Síntesis de HNT-Ce6**

La obtención de los nanotransportadores tipo haloisita funcionalizados con el agente fotosensibilizador Ce6 se realizó en una serie de etapas, como se resume en la Figura 4. En la primera etapa, se silanizó la superficie de HNT mediante reacción con el agente de acople (3-amino-propil)-trimetoxisilano (APTMS, Sigma-Aldrich®, 97%) empleando protocolos reportados previamente por Campos y col. [60]. Para ello se dispersó 3.0 g del material HNT (Sigma-Aldrich®) en 50 mL de tolueno seco (Merck Millipore®, 98%), luego se añadió al balón de reacción 0.5 mmol de APTMS. La mezcla se colocó a reflujo a 120 °C durante 24 h. El sólido resultante se obtuvo mediante centrifugación y se lavó con tolueno y acetona (x3) empleando 50 mL de solvente en cada lavado. Finalmente, el material se secó al vacío a 50 °C durante 24 h para obtener HNT con grupos amino superficiales (HNT-NH<sub>2</sub>). La conjugación del fotosensibilizador Ce6 (Cayman Chemicals®, ≥90%) se llevó a cabo considerando un contenido nominal del 1% en masa de FS. Para ello, previamente se activaron los grupos carboxilo del Ce6 mediante la mezcla de 0.04 mmol de Ce6 y 0.13 mmol de trietilamina (TEA, Sigma-Aldrich®, 98%) en 10 mL de dimetilsulfóxido seco.



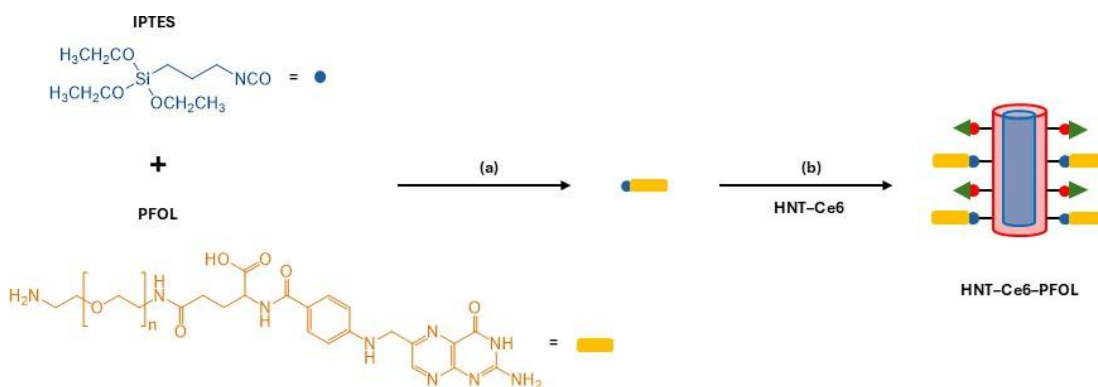
**Figura 4.** Procedimiento de preparación de nanomaterial HNT conjugado con Ce6. (a) APTMS en reflujo en tolueno seco y (b) activación de Ce6 en presencia de NHS/DCC y posterior contacto con una solución tampón a pH = 9.0.

La mezcla se agitó durante 2 h a 37 °C, tras lo cual se añadieron 0.08 mmol de N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich®, 98%) y 0.08 mmol de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, Sigma-Aldrich®). La solución se agitó a 37 °C en la oscuridad durante 12 h. La suspensión obtenida se filtró a través de un filtro de poros de 0.22  $\mu\text{m}$  para separar los subproductos no deseados [61]. Finalmente, se tomaron 2.0 g de HNT-NH<sub>2</sub> en 20 mL de tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (0.016 mol L<sup>-1</sup>, pH 9.0). Luego, se añadió la solución de Ce6 obtenida durante el proceso de activación y se agitó en la oscuridad durante 2 h. El sólido resultante se recuperó por centrifugación y se dializó, depositando el sólido en una membrana de diálisis

Spectra/Por® 3500 Da en disolución de PBS a pH 7.4. La absorbancia del dializado se monitoreó mediante espectroscopía UV-Vis a 404 nm, renovando el líquido de diálisis hasta que no se detectó una señal de absorción atribuible a Ce6.

#### 4.1.2. Síntesis de HNT-Ce6-PFOL

En una primera etapa, se modificó el polímero poli-[etilenglicol] bifuncional con grupo amino y ácido fólico (NH<sub>2</sub>-PEG-FOL, Biopharma PEG®, 97%) de 1.0 kDa. En un balón se depositaron 10 mL de tolueno seco y se añadieron 100 mg de NH<sub>2</sub>-PEG-FOL y 0.10 mmol de 3-(trietoxisilil)propil isocianato (IPTES, Sigma-Aldrich®, 95%), dejándolos bajo agitación constante a temperatura ambiente y en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 4 días, tal como se muestra en la Figura 5a.

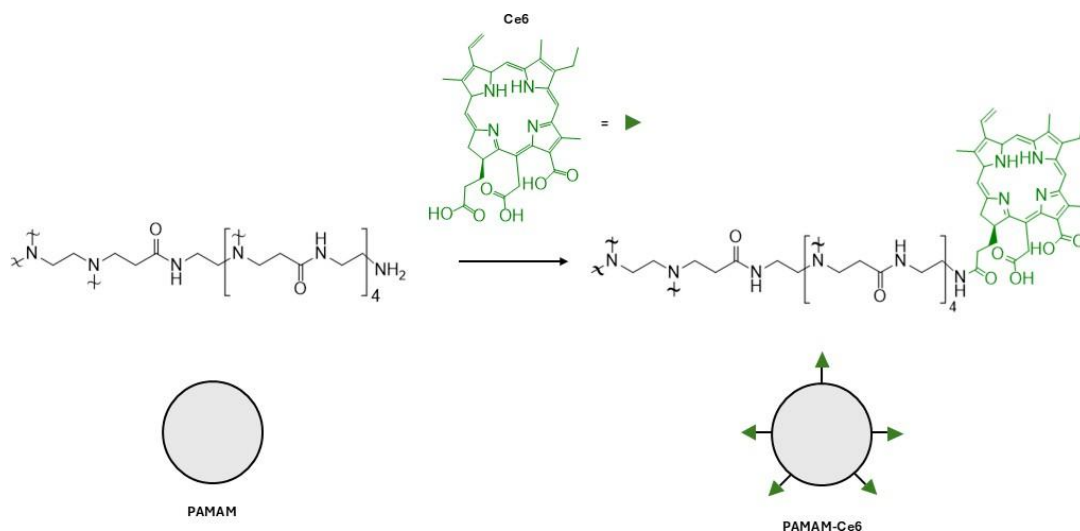


**Figura 5.** (a) Preparación de IPTES-PEG-FOL y (b) IPTES-PEG-FOL en reflujo en tolueno seco sobre la superficie externa de HNT-Ce6.

Posteriormente, se agregaron 1.0 g de HNT-Ce6 a 50 mL de tolueno seco y se colocó a reflujo a 120 °C por 24 h en oscuridad (Figura 5b). El sólido resultante se recuperó por centrifugación y se dializó depositando el sólido en una membrana de diálisis Spectra/Por® 3.5 kDa en disolución de PBS a pH 7.4. Se siguió la absorbancia del dializado mediante espectroscopía UV/VIS a 276 nm cambiando el líquido de diálisis hasta que no se detectó absorción por parte de IPTES-PEG-FOL.

#### **4.1.3. Síntesis de PAMAM-Ce6**

Para la obtención del nanotransportador polímero poli-[amidoamina] de cuarta generación (PAMAM, Sigma-Aldrich®, 10% m/m en metanol) funcionalizado con Ce6 se empleó el protocolo reportado por Díaz y col. [46]. Para ello, se preparó el éster de Ce6 disolviendo 0.15 mmol de Ce6 en 20 mL de solución tampón DMSO/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1:1). A continuación, se añadieron 0.30 mmol de NHS y 0.30 mmol de hidrocóloro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich®), y 0.60 mmol de TEA a un matraz, y se agitó durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente y en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se disolvieron 25 µmol de PAMAM en 5 mL de DMSO y se añadieron al matraz. La mezcla se agitó durante 24 h y el producto de reacción se purificó empleando diálisis Spectra/Por® 3.5 kDa en disolución de PBS a pH 7.4.



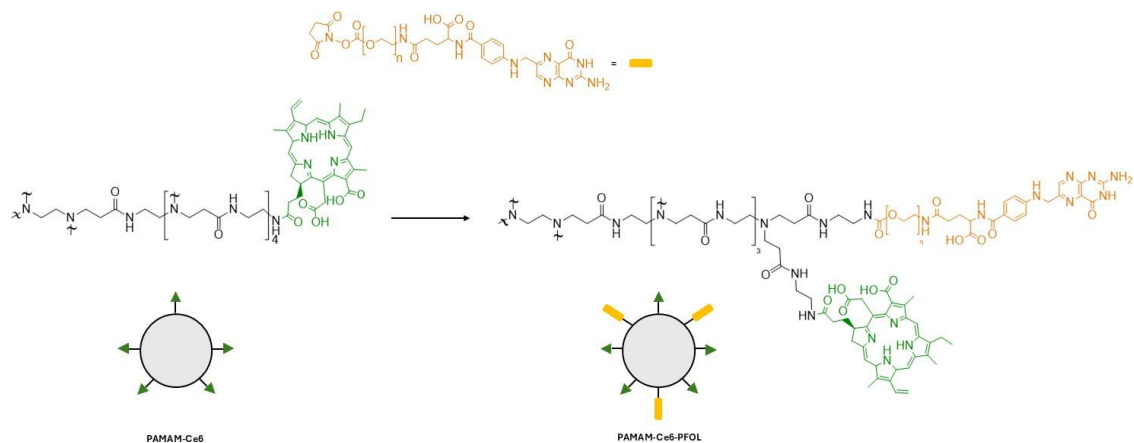
**Figura 6.** Esquema de conjugación de PAMAM con Ce6.

Se siguió la absorbancia del dializado mediante espectroscopía UV/VIS a 404 nm cambiando el líquido de diálisis hasta que no se detectó absorción por parte de Ce6. El material purificado se ultracentrifugó en tubos de ultracentrífuga con un límite de corte de 3.5 kDa y, finalmente, se liofilizó.

#### 4.1.4. Síntesis de PAMAM-Ce6-FOL

La funcionalización del nanomaterial PAMAM-Ce6 con el agente director se realizó empleando poli-[etilenglicol] bifuncional (NHS-PEG-FOL) con peso molecular de 1.0 kDa (Biopharma PEG®) tal como se muestra en la Figura 7. En un balón de reacción con 20 ml de DMSO seco se añadieron PAMAM-Ce6 (10  $\mu$ mol, 167 mg), TEA seca (0.40 mmol, 55  $\mu$ L) y NHS-PEG-FOL (0.40 mmol, 400 mg) para conseguir una modificación nominal de 32 grupos -NH<sub>2</sub> de PAMAM. Los

materiales se dejaron bajo agitación constante a temperatura ambiente y en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 4 días en oscuridad. Posteriormente, el material se dializó con PBS a pH 7.4 y con H<sub>2</sub>O bidestilada durante 2 días, utilizando bolsas de diálisis de 6.0 – 8.0 kDa. El sobrenadante se analizó por espectroscopía UV-Vis hasta que no se detectó FOL siguiendo la banda de absorción a 276 nm. Posteriormente, se lavó con PBS a pH 7.4 hasta que no se detectó FOL en el sobrenadante, utilizando tubos de ultracentrifugación con un corte de 30 kDa. El material obtenido se liofilizó y guardó en oscuridad a 4 °C.



**Figura 7.** Esquema de conjugación de PAMAM-Ce6 con NHS-PEG-FOL.

## **4.2. Caracterización de los nanotransportadores**

Los materiales basados en nanotubos de haloisita (HNT) fueron caracterizados mediante técnicas que permitieron evaluar su composición química, grado de funcionalización, propiedades ópticas y comportamiento superficial.

La identificación de grupos funcionales y la confirmación de la modificación química de la familia HNT se llevaron a cabo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Perkin Elmer 1760-X, utilizando un rango de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  y gránulos de KBr.

Se estimó el grado de conjugación del material con el fotosensibilizador y el agente director sobre los materiales HNT por análisis termogravimétrico (TGA) empleando un equipo NETZSCH TG 209F3 con un flujo de N<sub>2</sub> de 25 mL/min y una velocidad de calentamiento de  $5 \text{ °C min}^{-1}$  desde 25 hasta 600 °C.

Las propiedades ópticas y la respuesta a la radiación en el rango UV-visible, asociadas a la incorporación del fotosensibilizador, en este nanotransportador sólido, se evaluaron mediante espectroscopía de reflectancia difusa UV-Vis. Los espectros fueron registrados en el rango de 200 a 900 nm en 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®.

El comportamiento de la carga superficial del material y sus versiones modificadas fue determinado mediante mediciones de potencial Zeta por potencial de flujo, empleando un sistema SurPASS 3 de Anton Paar® con celda de separación ajustable. El potencial zeta se calculó según un método previamente reportado [62]. Como electrolito, se utilizó una disolución acuosa de KCl  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ajustando el pH mediante la adición de HCl  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  o de KOH  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante bombas de jeringa. Cada punto experimental corresponde al promedio de tres mediciones, analizando al menos dos muestras independientes por material.

Los sistemas dendriméricos fueron caracterizados con el objetivo de confirmar la conjugación química, evaluar sus propiedades ópticas y determinar su comportamiento superficial en solución.

La confirmación estructural y la evidencia de conjugación covalente entre el dendrímero y los componentes Ce6 y PFOL se realizó mediante resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), utilizando un espectrómetro *Bruker Avance III 500 MHz*. Las muestras se disolvieron en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se analizaron en tubos estándar de 5 mm. Se aplicó supresión de la señal residual del solvente durante la adquisición. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Los espectros se adquirieron con 512 escaneos, un tiempo de relajación de 2.0 s y un ancho de pulso de 22.35  $\mu\text{s}$ . Los desplazamientos

químicos ( $\delta$ ) se expresaron en ppm y los datos fueron procesados con el software Bruker TopSpin.

La confirmación complementaria de la conjugación tanto del fotosensibilizador como del agente director al nanotransportador se realizó mediante espectroscopía de absorción UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis SP 8001. Las mediciones se realizaron en DMSO, en un rango espectral de 190 a 800 nm, a una concentración final de  $5.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , empleando cubetas de cuarzo con una longitud de trayectoria óptica de 1 cm.

Para evaluar el comportamiento de los sistemas basados en PAMAM, se realizaron mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) con un instrumento Zetasizer Advance Lab de Malvern Panalytical en PBS, utilizando una cubeta de poliestireno con una longitud de trayectoria de 1 mm, durante más de 60 ciclos. Las muestras de PAMAM se prepararon a  $0.14 \mu\text{mol L}^{-1}$  en PBS 7.4 y se filtraron a través de un filtro de  $0.02 \mu\text{m}$ . El potencial zeta se midió con el mismo instrumento que en el análisis DLS a  $25^\circ\text{C}$ . Las muestras de dendrímero PAMAM se prepararon a una concentración de  $0.14 \mu\text{mol L}^{-1}$  en PBS a pH 7.4 y se cargaron en celdas capilares plegadas y previamente enjuagadas, y se midieron por triplicado aplicando un voltaje de 100 V.

### 4.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se estudió, para ambas familias de nanotransportadores, la cinética de generación y cuantificación de especies ROS, como  $^1\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$ , mediante el empleo de sondas fluorescentes comerciales. Para  $^1\text{O}_2$  se empleó Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, 95%, Thermofisher) y para  $\cdot\text{OH}$  la hidroxifenilfluoresceína (HPF, 98%, Thermofisher), respectivamente [63]. En el primer caso, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de SOSG en metanol de 2  $\text{mmol L}^{-1}$  a 100  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de los materiales en base a HNT y PAMAM de 2.0  $\text{mg mL}^{-1}$  en solución de PBS a  $\text{pH} = 7.4$  en una placa de 96 pocillos. Se utilizó como control PBS  $\text{pH} 7.4$  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  $\mu\text{L}$  de las dispersiones de nanomateriales, sin agregar el reactivo SOSG, para confirmar la ausencia de señales de fluorescencia. Los sistemas se irradiaron con una fuente de luz LED ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) durante 3 a 60 minutos, después de lo cual se midió la intensidad de la fluorescencia utilizando filtros de excitación/emisión de 488/525 nm, respectivamente. Por otro lado, se utilizó un protocolo similar para detectar  $\cdot\text{OH}$ . Para ello, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de HPF a 210  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{L}$  de las suspensiones de los materiales a 2  $\text{mg mL}^{-1}$  en PBS en una placa de 96 pocillos. Se llevaron a cabo experimentos de control con PBS a  $\text{pH} 7.4$  en presencia de la solución acuosa de HPF para evaluar la capacidad intrínseca de estos sistemas para inducir la generación de  $\cdot\text{OH}$  en las mismas

condiciones experimentales. Además, se utilizaron dispersiones de nanomateriales de 100  $\mu\text{L}$ , sin agregar el reactivo HPF, para confirmar la ausencia de señales de fluorescencia procedentes de los nanomateriales. Los sistemas derivados de HNT y PAMAM fueron irradiados con una fuente de luz LED ( $150 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) durante intervalos de 3 a 60 minutos, tras lo cual se registró la intensidad de fluorescencia mediante filtros de excitación y emisión a 488/525 nm, respectivamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado utilizando un lector de placas múltiples POLARstar Omega BMG Labtech®.

#### **4.4. Evaluación de la encapsulación y liberación de doxorubicina**

#### **4.5. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de doxorubicina materiales en base a HNT**

Los ensayos de encapsulación de doxorubicina (DOX, Sigma-Aldrich®, >98%) se realizaron contactando 250 mg de los nanomateriales (HNT, HNT-Ce6 y HNT-Ce6-PFOL) con 10 mL de una solución etanólica a  $355 \text{ mg L}^{-1}$  del fármaco. Para ello, se utilizaron viales de vidrio ámbar para evitar la fotodegradación del fármaco o el *autobleaching* del material. Las mezclas se mantuvieron en agitación continua en un sistema rotatorio tipo carrusel durante 24 h a una temperatura controlada de 25 °C. Transcurrido este período, las suspensiones se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó su concentración a partir de la ecuación de la recta construida con diluciones seriadas del fármaco, cuya absorbancia se registró con un lector multicanal POLARstar Omega BMG

Labtech®. La cantidad de fármaco adsorbido en los nanomateriales se calculó como la diferencia entre la concentración inicial determinada de DOX y la concentración determinada en el sobrenadante. 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 (1) y (2), respectivamente:

$$EE(\%) = 100 \times (C_0 - C) / C_0 \quad (1)$$

$$LC \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) = (C_0 - C) \times 543.5 \times V \times 10^3 / M_e \quad (2)$$

donde:

$C_0$  = cantidad inicial de la ecuación;  $C$  = cantidad de DOX en el sobrenadante después de la encapsulación ( $M$ ); 543.5 corresponde a la masa molar de DOX;  $V$  = volumen de solución de DOX utilizada (mL); y  $M_e$  = cantidad de sólidos utilizados para la encapsulación (mg).

#### **4.6. Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de doxorrubicina en materiales en base a PAMAM**

La encapsulación de DOX en los sistemas basado en PAMAM se realizó siguiendo la metodología reportada por Liao y col. [64]. Se disolvieron 10 mg de nanomateriales en 3 mL de agua. En paralelo, 4.5 mg de DOX se disolvieron en 300  $\mu\text{L}$  de metanol, añadiendo 5  $\mu\text{L}$  de trietilamina (TEA). Las soluciones de DOX se añadieron a las concentraciones acuosas de los nanomateriales y se

mantuvieron en agitación durante 24 h a 25 °C en oscuridad. Luego, los viales se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min. Inmediatamente, se recuperó y liofilizó el sobrenadante. La eficiencia de encapsulación del fármaco (EE) se determinó re-suspendiendo la DOX no adsorbida (precipitada) en metanol, la cual se cuantificó cuya absorbancia fue registrada empleando un lector multiplacas POLARstar Omega (BMG Labtech), utilizando una curva de calibración. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y EE y LC se calcularon de acuerdo con las ecuaciones (2) y (3), presentadas en el apartado anterior.

#### **4.6.1. Estudio de liberación de DOX**

Se evaluaron los perfiles de liberación de DOX mediante experimentos de diálisis a pH 7.4 y 5.0. Para ello se utilizaron membranas de diálisis Spectra/Por® de 3.5 kDa en las que se colocaron, para el caso de los materiales a base de HNT, 25 mg de los nanomateriales cargados con DOX en el tampón PBS a pH 7.4 o pH 5.0. El volumen final del ensayo fue de 50 mL. Para los materiales en base a PAMAM se colocaron 2 mg de los nanomateriales cargados en 1 mL PBS al pH correspondiente (7.4 o 5.0) y el volumen total fue 9.0 mL. Para todos los ensayos, los sistemas de liberación se agitaron a 37 °C en oscuridad durante 48 h. Se tomaron alícuotas de 150 µL en intervalos de 15 min durante la primera hora, luego cada 1 h hasta completar las 6 h y por último a las 24 y 48h para la detección de DOX a tiempo infinito. Las alícuotas fueron reemplazadas por 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. Todos los experimentos de liberación se realizaron por triplicado. Los perfiles de liberación se normalizaron con respecto a la cantidad total de DOX encapsulado y se ajustaron al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3)$$

donde  $M_t$  es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo  $t$ ,  $M_\infty$  es la cantidad de DOX en equilibrio,  $k$  es la constante de velocidad de liberación ( $\text{min}^{-n}$ ) y  $n$  es el exponente de liberación (relacionado con el mecanismo de liberación del fármaco) en función del tiempo  $t$  (min). El exponente  $n$  se determinó a partir de la parte de la curva de liberación en la que  $M_t/M_\infty < 0,60$ .

#### **4.7. Ensayos de viabilidad celular.**

##### **4.7.1. Ensayos de hemólisis**

Para determinar el grado de actividad hemolítica, se obtuvieron muestras de sangre humana de voluntarios sanos, provistas por el Departamento de Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción (Concepción, Chile), y se recolectaron en tubos heparinizados. Las muestras (4 mL de sangre anticoagulada) se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS (1X, pH 7.4). Posteriormente, se incubaron 140  $\mu\text{L}$  de una

suspensión base al 10% v/v de glóbulos rojos humanos en PBS en un agitador rotatorio durante 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se añadieron las suspensiones de nanomateriales basadas en HNT (10, 50, 100 y 250 µg mL<sup>-1</sup>) o en PAMAM (20, 40, 80 y 160 µg mL<sup>-1</sup>). Se mezclaron PBS 1X y agua desionizada con la suspensión de células sanguíneas humanas y se usaron como controles negativo y positivo con 100% de actividad, respectivamente. Las mezclas se incubaron en un agitador rotatorio durante 2 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 como se indica en la ecuación (4):

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{\text{Abs of muestra} - \text{Abs of control negativo}}{\text{Abs of control positivo} - \text{Abs of control negativo}} \cdot 100 \quad (4)$$

#### **4.7.2. Experimentos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7**

La biocompatibilidad y el efecto terapéutico de los nanomateriales se evaluaron mediante ensayos de viabilidad celular en las líneas celulares HeLa y MCF-7. Para ello, ambas líneas se cultivaron en frascos T75 utilizando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, para la línea celular HeLa y DMEM-F12 para MCF-7. En una incubadora con atmósfera controlada (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Una vez alcanzada una confluencia del 80%, las células se separaron mediante tripsinización, se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad aproximada de 5,000 células

por pocillo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 24 h para permitir la adhesión celular antes de iniciar los tratamientos. Los ensayos se realizaron empleando concentraciones de nanomateriales y las formulaciones en los medios respectivos para cada línea celular, y se llevaron a cabo tanto en oscuridad como bajo irradiación lumínica. En todos los casos, se incluyeron controles: un control positivo (C<sup>+</sup>), consistente en el tratamiento con 100 µL de Triton X-100 al 0,1%, y un control negativo (C<sup>-</sup>), en el que se adicionaron 100 µL de medio DMEM fresco (considerado como 100% de viabilidad). Tras cada tratamiento, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se normalizaron respecto al control negativo y se expresaron como porcentaje de viabilidad (media ± SD, n = 3). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5, empleando el análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, ns, no significativo).

#### **4.7.2.1. Ensayos in vitro de viabilidad celular para los nanomateriales y formulaciones en base a HNT y PAMAM en oscuridad (intrínseca y quimiotoxicidad)**

Las células se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de suspensiones de nanomateriales no cargados y sus respectivas formulaciones, en concentraciones crecientes de 10 – 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los sistemas en base a HNT y de 0.25 – 16.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los sistemas en base a PAMAM, durante 12 h en oscuridad. Posteriormente, se reemplazó el medio por DMEM fresco y se reincubó hasta completar 24 h. Tras cada tratamiento, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), siguiendo las indicaciones del fabricante

#### **4.7.2.2. Ensayos in vitro de viabilidad celular para las formulaciones en base a HNT y PAMAM bajo radiación lumínica (fototoxicidad y fotoquimiotoxicidad)**

Las células se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de suspensiones de nanomateriales no cargados y sus respectivas formulaciones, en concentraciones crecientes de 10 – 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los sistemas en base a HNT y de 0.25 – 16.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los sistemas en base a PAMAM, durante 12 h en oscuridad. Posteriormente, se reemplazó el medio por DMEM fresco, se irradió con luz LED (150  $\text{mW cm}^{-2}$ ) durante 15 min y se reincubó en oscuridad durante 12 h adicionales. Tras cada tratamiento, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), siguiendo las

indicaciones del fabricante.

El grado de sinergia entre la CT y la PDT se determinó mediante el índice de combinación (CI) [65]. Específicamente, la significancia del efecto del fármaco quimioterapéutico en presencia de nanomateriales fotoactivos se calculó como:

$$IC = \frac{IC_{50}(PCT)}{IC_{50}(CT)} + \frac{IC_{50}(PDT)}{IC_{50}(PDT)} \quad (5)$$

donde la  $IC_{50}$  es determinada mediante el ajuste de la ecuación de Hill dosis-respuesta en GraphPad.  $IC_{50}(PCT)$ ,  $IC_{50}(CT)$  y  $IC_{50}(PDT)$  representan los valores de la  $IC_{50}$  para la PCT, CT y la PDT, respectivamente. Cabe destacar que un  $CI < 1$  indica sinergia, un  $CI = 1$  indica efectos aditivos y un  $CI > 1$  indica antagonismo entre las terapias evaluadas.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Nanomateriales en base a HNT**

#### **5.1.1. Preparación de los nanomateriales**

La elección de los nanotubos de HNT como plataforma de transporte en esta tesis se fundamenta en su estructura tubular, composición química y superficie anisotrópica, altamente favorables para aplicaciones biomédicas. En el marco de esta investigación, se empleó esta estrategia para incorporar grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), con el objetivo de propiciar el anclaje covalente del fotosensibilizador Ce6 mediante sus grupos carboxílicos. La reacción de silanización, se adaptó del protocolo reportado por Campos y col. [60], quienes determinaron que la capacidad máxima de injerto de grupos funcionales sobre HNT alcanza aproximadamente  $1.20 \text{ mmol g}^{-1}$ . En este trabajo se optó por una densidad teórica de  $0.50 \text{ mmol g}^{-1}$ , equivalente al 41.6% de la capacidad máxima. Esta proporción intermedia se seleccionó con el objetivo de preservar parte de los sitios superficiales libres para posteriores conjugaciones covalentes, como el anclaje del agente de dirección PFOL. El agente silanizante utilizado fue APTMS, seleccionado por su mayor reactividad en medios anhidros frente al más común (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) debido a que los grupos  $-\text{OCH}_3$  presentan una hidrólisis/condensación más eficiente sobre superficies ricas en  $\text{Si-OH}$  cuando se emplean en condiciones estrictamente anhidras, favoreciendo la formación de capas homogéneas  $-\text{NH}_2$  superficiales [66]. Una vez obtenido el material  $\text{HNT-NH}_2$ , se procedió a incorporar Ce6 en superficie ( $0.05 \text{ mmol}_{\text{Ce6}} \text{ g}^{-1}$ )

mediante una reacción de acoplamiento dirigida a la formación de enlaces amida. Para ello, se empleó la estrategia de conjugación covalente mediante NHS/DCC sobre los  $\text{-COOH}$  de Ce6, que genera un éster activo Ce6-NHS suficientemente estable para reaccionar con grupos  $\text{-NH}_2$  superficiales y formar enlaces amida bajo condiciones moderadas de reacción a pH 8.5 – 9.0, a 20 °C, y en ambiente oscuro para evitar el fotoblanqueo de Ce6 [63]. El material HNT-Ce6 obtenido se modificó posteriormente mediante el anclaje de un PEG bifuncional comercial, H2N-PFOL (1.0 kDa), con IPTES mediante condensación en tolueno seco para obtener IPTES-PFOL. La incorporación del agente direccionador se realizó mediante reflujo en tolueno seco, con el fin de propiciar la condensación del IPTES en la superficie del material HNT-Ce6 y generar una superficie de 0.05  $\text{mmolPFOL g}^{-1}$  en el sistema final HNT-Ce6-PFOL.

### **5.1.2. Caracterización**

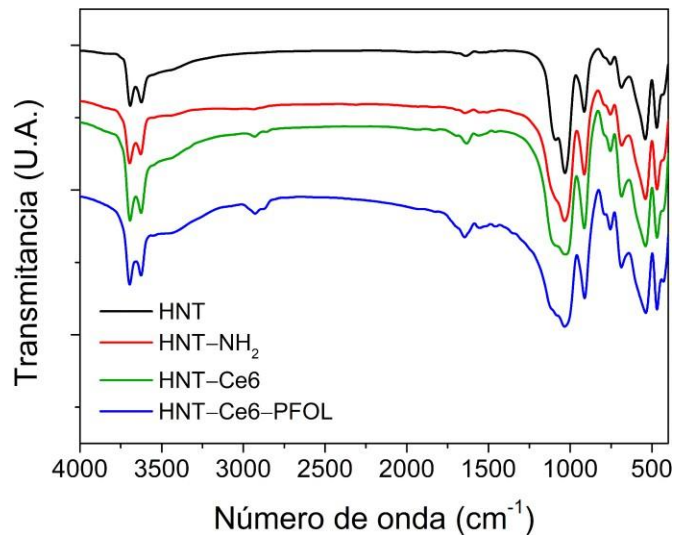
Para comprobar las modificaciones realizadas en HNT en cada una de sus etapas, se realizaron diferentes caracterizaciones fisicoquímicas, tales como FTIR, TGA, DRS UV-vis y medidas de movilidad electrocinética.

### 5.1.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR de los nanomateriales en base a HNT se muestra en la Figura 8. Para la HNT prístina se observaron bandas características alrededor de 3691 y 3696  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se atribuyeron a vibraciones de estiramiento de grupos Al-OH localizados principalmente en la superficie interna y el lumen de la haloisita, mientras que la banda cercana a 913  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyó a vibraciones de deformación de grupos hidroxilo enlazados al aluminio [67, 68]. La señal observada alrededor de 1600  $\text{cm}^{-1}$  puede relacionarse con vibraciones de flexión H-O-H provenientes de moléculas de agua intercaladas en la estructura multicapa de HNT [69, 70]. Las bandas localizadas aproximadamente en 1035, 760 y 689  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de estiramiento Si-O presentes en la red tetraédrica del material, mientras que las señales observadas en la región de 541 y 469  $\text{cm}^{-1}$  se asociaron a la flexión y vibraciones Al-O-Si y Si-O-Si, respectivamente [71].

Tras la modificación con APTMS, las bandas asociadas a grupos Al-OH del lumen permanecieron relativamente conservadas, lo cual podría sugerir que la funcionalización ocurre predominantemente en la superficie externa del nanomaterial, en concordancia con lo reportado para sistemas silanizados basados en HNT [72]. Adicionalmente, se observaron señales alrededor de 2900  $\text{cm}^{-1}$  consistentes con vibraciones de estiramiento C-H de grupos  $-\text{CH}_2$  provenientes del silano [69], así como una banda cercana a 1530  $\text{cm}^{-1}$  asociada

a vibraciones de deformación N-H de grupos amino [67]. En conjunto, estos cambios en el espectro han sido reportados como indicativos de la incorporación de grupos  $-NH_2$  tras la funcionalización con APTMS [73]. De manera complementaria, el incremento y la modificación de la banda cercana a  $1035\text{ cm}^{-1}$  podrían relacionarse con procesos de silanización en la superficie del material, en concordancia con lo reportado para sistemas funcionalizados con organosilanos [74].



**Figura 8.** Espectrogramas de FTIR para los nanomateriales en base a HNT.

En el caso del sistema HNT-Ce6 se observó la aparición de una banda a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de estiramiento C=O lo que se asoció al enlace amídico Ce6-COO-NH-APTMS [63]. Paralelamente, se observa un incremento y un cambio de simetría en las intensidades de las bandas en la

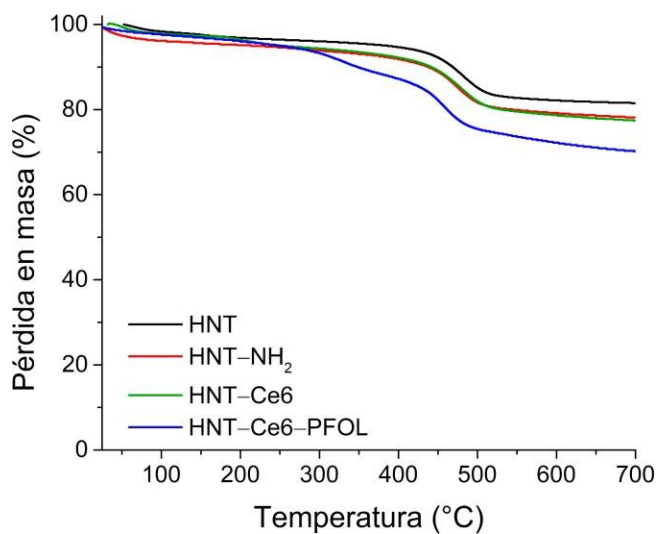
región cercana a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a vibraciones C-N, debido a la incorporación de los constituyentes heterocromáticos de Ce6 (tres anillos de pirrol y un anillo de pirrolina) [75]. Adicionalmente, se observaron incrementos en la vibración de estiramiento C-H, señal alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , lo que reafirma la conjugación de Ce6 en la superficie de HNT-NH<sub>2</sub>. Por otra parte, las señales asociadas a los grupos Al-OH ( $3695$ ,  $3626$  y  $1035\text{ cm}^{-1}$ ) permanecen inalteradas, lo que sugiere que la estructura del lumen de HNT se mantuvo tras la modificación química con Ce6.

Para el sistema HNT-Ce6-PFOL, se observó un incremento de las bandas cercanas a  $2900\text{ cm}^{-1}$  y la aparición de señales a  $2800\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a la incorporación de los grupos -CH<sub>2</sub> y -OCH<sub>2</sub>- presentes en las cadenas del PFOL. También se observa un incremento de la señal en la zona de señales típicas de grupos C=O (aprox.  $1650$ - $1630\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual podría atribuirse la presencia de PFOL y de los enlaces de urea del agente de acople IPTES-PFOL. En la región comprendida entre  $1100$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  se observaron cambios en la intensidad y la simetría de las bandas asociadas a los grupos Si-O-Si, lo cual es consistente con la inmovilización del conjugado IPTES-PFOL sobre la superficie de HNT-Ce6. Finalmente, la conservación relativa de las señales asociadas a grupos Al-OH ( $3695$  y  $3626\text{ cm}^{-1}$ ) podría sugerir que el anclaje del segundo componente ocurrió preferentemente en la superficie externa del nanomaterial

### 5.1.2.2. Análisis termogravimétrico

En la Figura 9 se muestran las curvas termogravimétricas correspondientes a los materiales en base a HNT. El termograma de HNT prístina presentó dos pérdidas de masa: la primera (4.6%) por debajo de 100 °C, atribuida a la eliminación de agua fisisorbida, y la segunda (17.8%), asociada a procesos de pérdida de agua intersticial y deshidroxilación estructural de la HNT [76, 77]. El sistema HNT-NH<sub>2</sub> mostró dos pérdidas principales de masa: debajo de 100 °C (5.4%) asociada a agua o disolvente fisisorbido, y entre 420 – 540 °C atribuida a la deshidroxilación de HNT y a la degradación térmica del APTMS inmovilizado en la superficie del material. Considerando que HNT prístina presenta pérdidas de masa en el mismo intervalo térmico, la cantidad de grupos -NH<sub>2</sub> se estimó a partir de la diferencia de pérdida de masa entre HNT-NH<sub>2</sub> y HNT prístina a 600 °C para asegurar que toda la materia orgánica se volatilizó y que el material se deshidroxiló por completo, lo que dio una densidad de funcionalización de 0.33 mmol g<sup>-1</sup>.

Para HNT-Ce6, se observó un perfil termogravimétrico similar al de HNT-NH<sub>2</sub>, aunque con una pérdida de masa ligeramente mayor entre 30 y 120 °C. Este comportamiento podría asociarse a la eliminación del agua fisisorbida y a la desorción de compuestos residuales del proceso de conjugación de Ce6, fenómeno previamente reportado en sistemas nanoestructurados funcionalizados mediante rutas de síntesis en solución [78].



**Figura 9.** Curvas termogravimétricas para los materiales en base a HNT. Condiciones: atmósfera de N<sub>2</sub> a un flujo de 10 mL min<sup>-1</sup> a una rampa de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> desde temperatura ambiente hasta 700 °C.

La pérdida de masa observada en el intervalo de 350 – 550 °C podría asociarse a procesos superpuestos que incluyen la deshidroxilación estructural de HNT, la degradación térmica residual del silano y la descomposición de Ce6 inmovilizado en la superficie del material. Considerando la contribución térmica del sistema HNT-NH<sub>2</sub> y considerando la diferencia de masa residual a temperatura de 600 °C, se estimó una carga de 0.017 mmol<sub>Ce6</sub> g<sup>-1</sup>.

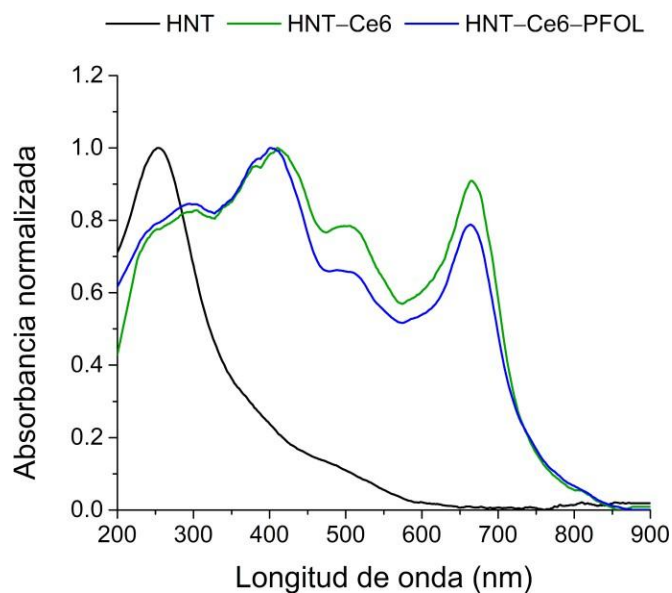
El sistema HNT-Ce6-PFOL exhibió un perfil similar al de HNT-Ce6 a baja temperatura (25 – 150 °C) y una importante pérdida de masa de 280– 520 °C correspondiente aproximadamente al 9.04 % de la masa total de la muestra. Este

evento térmico se asocia principalmente con la degradación del conjugado IPTES–PFOL inmovilizado en la superficie de HNT–Ce6. No obstante, en esta región no puede descartarse la contribución de procesos térmicos superpuestos provenientes de los componentes orgánicos previamente injertados. Considerando la diferencia de pérdida de masa respecto al sistema HNT–Ce6 y realizando la estimación a 600 °C, se obtuvo una densidad superficial aproximada de 0.090 mmol<sub>PFOL</sub> g<sup>-1</sup>.

#### **5.1.2.3. Espectroscopía ultravioleta – visible de reflectancia difusa en estado sólido (DRS UV-vis)**

El análisis DRS UV-vis reveló modificaciones espectrales asociadas con la funcionalización progresiva de los nanomateriales basados en HNT, como se muestra en la Figura 10. El sistema HNT prístino exhibió una banda ancha de absorción entre 200 y 300 nm, atribuida a transiciones electrónicas intrínsecas de la matriz aluminosilicada de SiO<sub>2</sub> y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [79]. En contraste, HNT-Ce6 mostró un perfil óptico distinto que se extiende desde la región UV hasta la visible, con dos bandas de absorción prominentes: una en el rango de 400 – 500 nm y otra entre 600 – 700 nm. Estas señales se asociaron con las transiciones electrónicas características del macrociclo tetrapirrólico de Ce6, correspondientes a la banda de Soret y a las bandas Q, respectivamente [80, 81]. Vélez y col. describieron mediante DRS UV–vis en estado sólido la expansión de la absorción hacia la región visible tras la conjugación covalente de Ce6 sobre nanobarras

mesoporosas de  $\text{TiO}_2$ , atribuyéndola a las transiciones electrónicas características del fotosensibilizador [63]. Esta extensión de la absorción óptica observada para HNT-Ce6 hacia la región visible representa un aspecto relevante para potenciales aplicaciones fotodinámicas, ya que las longitudes de onda en la región roja del espectro presentan una mayor capacidad de penetración tisular en comparación con la radiación UV, lo que favorece una activación más eficiente del fotosensibilizador en tejidos biológicos [82, 83]. En este sentido, la conservación de absorción en la región asociada a las bandas Q de Ce6 sugiere que el sistema podría mantener una adecuada capacidad de excitación fotoinducida bajo irradiación visible, aspecto importante para procesos fotodinámicos mediados por la generación de especies reactivas de oxígeno [84, 85]. La presencia simultánea de las bandas Soret y Q es particularmente relevante, ya que ambas transiciones participan directamente en los procesos de excitación electrónica del fotosensibilizador. Mientras que la banda Soret corresponde a intensas transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del sistema conjugado del anillo clorínico, las bandas Q están asociadas a transiciones de menor energía, responsables de la absorción en la región roja del espectro visible, empleada comúnmente para la activación fotodinámica de Ce6 [81, 82].



**Figura 10.** DRS UV-vis en estado sólido para los materiales en base a HNT.

En sistemas basados en clorinas y porfirinas, se ha descrito que procesos de agregación o interacciones intensas con la matriz pueden alterar las propiedades ópticas y fotofísicas del fotosensibilizador, afectando su respuesta fotodinámica [86, 87]. En este contexto, el hecho de que HNT-Ce6 mantuviera bandas relativamente definidas en las regiones asociadas a Soret y Q, dentro de los intervalos espectrales típicamente reportados para Ce6 en nanosistemas funcionalizados, sugiere que la inmovilización sobre HNT-NH<sub>2</sub> no provocó una perturbación severa del cromóforo fotoactivo ni un apagamiento espectral pronunciado del fotosensibilizador. Estudios previos en nanoplataformas funcionalizadas con Ce6 han relacionado la preservación de estas bandas con el mantenimiento parcial de las propiedades fotofísicas y fotoactivas del

fotosensibilizador tras su inmovilización, particularmente en sistemas en los que se minimizan los fenómenos de agregación o la perturbación electrónica severa del cromóforo [81].

Por otra parte, el sistema HNT-Ce6-PFOL conservó el perfil general de absorción asociado a Ce6, incluyendo las bandas Soret y Q. Este comportamiento sugiere que la incorporación PFOL no alteró significativamente las propiedades ópticas principales del fotosensibilizador. Resultados similares han sido reportados en nanosistemas multifuncionales en los que Ce6 se combina con moléculas vectorizantes o con componentes terapéuticos adicionales [88].

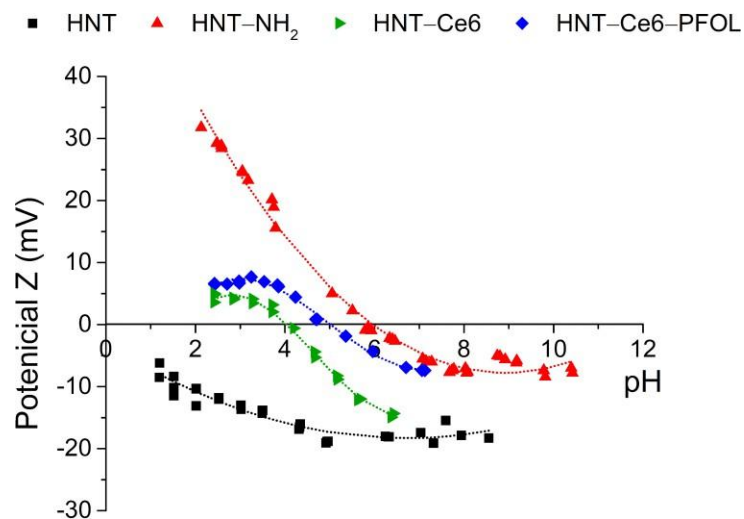
Con el objetivo de evaluar la compatibilidad entre las propiedades ópticas del nanosistema y las condiciones de irradiación empleadas, se comparó el espectro de absorción de los nanomateriales con el perfil de emisión de la fuente LED utilizada en los ensayos (Figura A1, Anexo). La superposición observada entre la región principal de absorción de Ce6 y el espectro de emisión del LED sugiere que los parámetros de irradiación seleccionados ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) podrían favorecer la activación fotoinducida del fotosensibilizador inmovilizado [81].

En conjunto, el perfil DRS observado para los sistemas HNT-Ce6 y HNT-Ce6-PFOL respalda la incorporación del fotosensibilizador en la superficie funcionalizada de HNT y sugiere la preservación parcial de sus propiedades

fotofísicas tras los procesos de conjugación y vectorización superficial. Estos resultados proporcionan una base espectroscópica relevante para interpretar posteriormente los ensayos de generación de ROS y evaluación fotodinámica del nanosistema.

#### **5.1.2.4. Movilidad electrocinética**

El análisis de movilidad electrocinética se empleó para evaluar los cambios de carga superficial de los materiales basados en HNT en función del pH, a partir de las modificaciones de la carga superficial derivadas de las modificaciones químicas en cada etapa de la funcionalización (Figura 11). La naturaleza anisotrópica de la HNT, con una superficie externa compuesta por grupos siloxano y silanol y un lumen que contiene grupos aluminol, se traduce en una distribución química que genera un comportamiento electrostático dependiente del pH [89]. Este comportamiento puede influir tanto en la estabilidad coloidal, como en las interacciones del material con moléculas cargadas, membranas celulares y componentes del medio biológico [90]. En la Figura 11 se observa que HNT prístina mostró una carga superficial consistentemente negativa en todo el rango de pH evaluado. Este comportamiento indica un punto de carga cero (ZPC) a  $\text{pH} < 1.0$  tal como se ha descrito ampliamente en la literatura para este tipo de nanomateriales [91, 92]. El sistema HNT-NH<sub>2</sub> mostró un cambio significativo en el comportamiento electrocinético, con la aparición de ZPC a  $\text{pH} 5.9$ , consistente con modificaciones químicas en la superficie externa del nanotubo.



**Figura 11.** Movilidad electrocinética de nanomateriales basados en HNT.

El proceso de silanización provoca un cambio en la naturaleza fisicoquímica de la superficie externa, mediado por la formación de ésteres de silano  $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ , los que disminuyen la población de especies  $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ , responsables de la formación de las cargas  $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$ , así como el cambio de la densidad de carga superficial atribuida a la presencia de grupos protonables ( $-\text{NH}_3^+$  con un  $\text{pK}_a = 9.8$  [93]), que compensan las cargas negativas intrínseca de HNT. En conjunto, el desplazamiento del punto isoeléctrico aparente y la inversión de la carga superficial respaldan la modificación de la superficie del HNT tras el proceso de silanización con APTMS.

En el sistema HNT-Ce6, se observó que el ZPC se desplazó a pH 4.1. Este comportamiento electrocinético sugiere una redistribución de la carga superficial

asociada tanto al consumo parcial de los grupos amino protonables del APTMS durante la inmovilización covalente del FS, mediante la formación de enlaces de amida, como a la incorporación de grupos carboxilo provenientes de Ce6 sobre la superficie del nanosistema, como se discutió previamente a partir de los resultados de FTIR y TGA. En consecuencia, la superficie de HNT-Ce6 presentó una distribución de carga más negativa que la de HNT-NH<sub>2</sub>, lo cual es consistente con la conjugación del Ce6. Resultados similares han sido reportados en nanosistemas funcionalizados con Ce6, donde la conjugación covalente del fotosensibilizador produce desplazamientos del potencial zeta hacia valores más negativos debido a la contribución superficial de grupos carboxílicos y modificaciones en el equilibrio de protonación superficial [94].

Finalmente, la adición de IPTES-PFOL a la superficie HNT-Ce6 provocó un nuevo desplazamiento del ZPC hacia un pH de 5.0. Esta modificación probablemente se produjo mediante reacciones con los grupos  $\equiv\text{Si-OH}$  disponibles en la superficie de HNT-NH<sub>2</sub> [95]. La formación de enlaces Si-O-Si-PFOL puede alterar la densidad de carga superficial total, dejando únicamente grupos Si-OH residuales que contribuyen al potencial superficial tras la hidratación. Este cambio en el ZPC sugiere que la vectorización de PFOL modifica de manera considerable las propiedades superficiales del nanotransportador. Junto con los datos de caracterización previos, estos resultados indican una inmovilización exitosa y progresiva de todos los componentes previstos en la superficie del HNT.

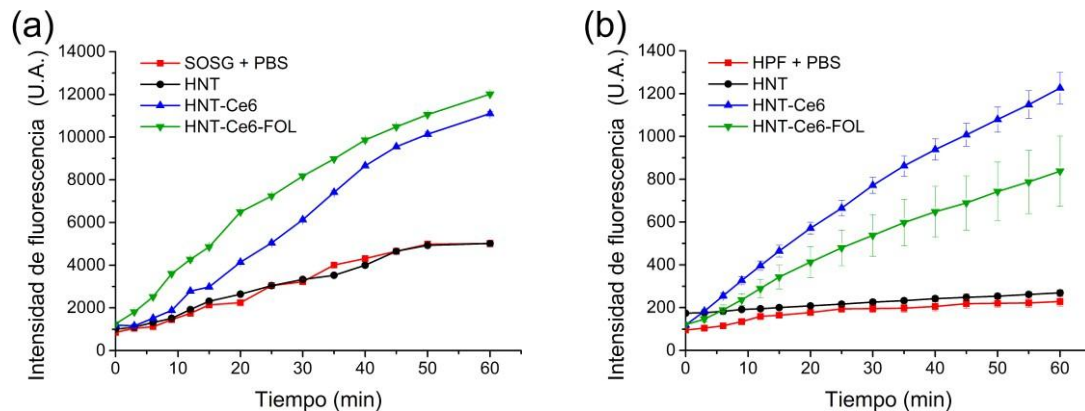
### 5.1.3. Producción de ROS

La generación de  $^1\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$  se evaluó mediante sondas fluorescentes comerciales para la detección de ROS, como se muestra en la Figura 12. Las suspensiones de nanomateriales ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se irradiaron con luz LED blanca ( $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) en presencia de las sondas fluorescentes SOSG y HPF, utilizadas para la detección de  $^1\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$ , respectivamente. La intensidad de fluorescencia se monitoreó a lo largo del tiempo con un lector de microplacas equipado con filtros de excitación y emisión a 488/525 nm, respectivamente. Como se muestra en la Figura 12a, el HNT prístino exhibió baja fluorescencia durante todo el período de irradiación, lo que indica una generación nula de  $^1\text{O}_2$  bajo las condiciones evaluadas. Comportamiento esperable, dado que la HNT carece de una respuesta fotoactiva significativa en la región visible y se emplea principalmente como soporte, por lo que la generación de ROS en sistemas basados en HNT suele depender de la incorporación de fotosensibilizadores o de componentes fotocatalíticos activos [32].

En contraste, tanto el HNT-Ce6 como el HNT-Ce6-PFOL mostraron un incremento progresivo y dependiente del tiempo de la fluorescencia de SOSG, lo que evidencia que la conjugación de Ce6 confiere actividad fotooxidativa a los nanotransportadores. El aumento de señal observado se atribuyó a la formación de aductos de endoperóxido característicos entre SOSG y  $^1\text{O}_2$ , un mecanismo previamente reportado para PS basados en porfirinas activados por luz visible

[96]. Esta respuesta sugiere que Ce6 mantiene su capacidad fotodinámica incluso tras su inmovilización en la superficie funcionalizada de HNT, lo que favorece la generación de  $^1\text{O}_2$  bajo irradiación visible, en concordancia con reportes previos sobre nanosistemas basados en clorinas [10, 97].

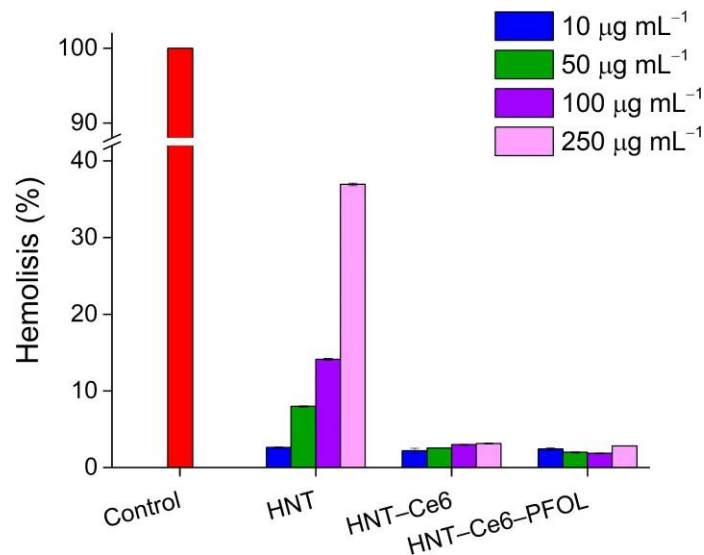
De manera similar, la producción de  $\text{HO}\cdot$  se evaluó mediante sonda HPF en condiciones idénticas. Como se muestra en la Figura 12b, los materiales conjugados con Ce6 mostraron un aumento sostenido de la fluorescencia tras la irradiación, mientras que el HNT prístino no presentó una variación notable en la señal. Estos resultados sugieren que la activación [98] de Ce6 por luz visible conduce a la generación de ROS a través de vías fotoquímicas de tipo I y tipo II, consistente con informes anteriores sobre sistemas fotodinámicos basados en Ce6 [99]. En general, este análisis confirma el potencial fotodinámico de los nanotransportadores funcionalizados con Ce6. La generación de ROS inducida por la luz observada indica su idoneidad para inducir estrés oxidativo en células cancerosas tras la irradiación localizada, un requisito crucial para una PDT efectiva [100].



**Figura 12.** Detección de ROS para los nanomateriales en base a HNT bajo irradiación con luz LED (60 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ). (a) Generación de  $^1O_2$  y (b)  $\cdot OH$ . Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, empleando suspensiones a  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  y las sondas fluorescentes SOSG ( $40 \text{ }\mu\text{M}$ ) y HPF ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ). La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 525 nm, respectivamente.

#### 5.1.4. Ensayos de Hemólisis

El ensayo de actividad hemolítica permite evaluar la interacción inicial entre los nanomateriales y las membranas eritrocitarias, lo que constituye un parámetro relevante en estudios de biocompatibilidad sanguínea. La Figura 13 muestra la actividad hemolítica de los sistemas basados en HNT en el rango de concentración de  $10 - 250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  en una solución de eritrocitos (RBCs).



**Figura 13.** Experimentos de actividad hemolítica para nanomateriales basados en HNT.

El HNT prístino presentó una marcada actividad hemolítica a concentraciones superiores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , alcanzando aproximadamente un 36 % de hemólisis a  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , consistente con las interacciones previamente reportadas entre materiales aluminosilicáticos y las membranas de los eritrocitos [101]. Además, se observó una clara dependencia concentración-respuesta, evidenciada por el incremento progresivo de la hemólisis con el aumento de la concentración del nanomaterial. HTN posee una superficie rica en grupos  $\equiv\text{Si-OH}/\equiv\text{Si-O}^-$ , capaces de interactuar con los fosfolípidos de la membrana de las RBCs mediante interacciones moleculares (como enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals), fundamentalmente

con la fosfatidilcolina. Esta interacción desestabiliza la bicapa lipídica de las RBC, provocando la ruptura de la membrana y la posterior liberación de hemoglobina [102, 103]. En contraste, el HNT-Ce6 mostró una actividad hemolítica considerablemente menor, en todo el rango de concentraciones evaluadas, manteniendo valores inferiores al 5 % incluso a  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta disminución se relaciona con las modificaciones fisicoquímicas inducidas en la superficie del material tras la funcionalización. En particular, el ZPC se desplazó hacia valores cercanos a  $\text{pH} = 4.1$  para HNT-Ce6, en comparación con el HNT prístino, cuyo ZPC es a  $\text{pH} < 1.0$ . Este cambio sugiere una alteración de las propiedades superficiales asociada a la inmovilización de APTMS y a la posterior conjugación de Ce6, lo que disminuye la accesibilidad de los grupos superficiales  $\equiv\text{Si-OH}/\equiv\text{Si-O}^-$  en comparación con el HNT no modificado.

HNT-Ce6-PFOL presentó la menor actividad hemolítica entre los sistemas evaluados ( $3.4 \% \pm 0.5 \%$ ) a  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  y mantuvo valores relativamente similares en todo el rango de concentraciones estudiado. Este comportamiento está en línea con la modificación superficial tras la incorporación de PFOL tal como se evidencia por el desplazamiento del ZPC hacia un valor de  $\text{pH} 5.0$ . Dicho comportamiento sugiere cambios adicionales en la densidad y la accesibilidad de los grupos  $\equiv\text{Si-OH}/\equiv\text{Si-O}^-$  superficiales, así como en las propiedades de hidratación e interacción interfacial, pues la presencia de segmentos PFOL contribuye a reducir el contacto directo entre la superficie de HNT y la membrana

de las RBCs mediante efectos de hidratación superficial e impedimento estérico, lo que disminuiría la acción hemolítica [104, 105].

En conjunto, estos resultados sugieren que la funcionalización superficial reduce las interacciones adversas entre los nanomateriales basados en HNT y la membrana de las RBCs. En términos de actividad hemolítica, todos los sistemas funcionalizados presentaron valores  $< 5\%$ , un rango frecuentemente considerado no hemolítico en evaluaciones de hemocompatibilidad de biomateriales, de acuerdo con los criterios establecidos en la norma ISO 10993-4 [106].

#### **5.1.5. Evaluación de la capacidad encapsulación y liberación de DOX**

Se evaluó la capacidad de los nanomateriales en base a HNT para encapsular el agente quimioterapéutico DOX, como se resume en la Tabla 1. HNT prístino presentó la mayor eficiencia de encapsulación y capacidad de carga, con valores de  $EE = 100\%$  y  $LC = 13.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ , mientras que HNT-Ce6@DOX y HNT-Ce6-PFOL@DOX mostraron una disminución de EE y LC, la cual se correlaciona con la funcionalización superficial. A medida que incrementa la incorporación de componentes en la superficie de HNT se modifica la afinidad global del nanotransportador por DOX y se altera la disponibilidad de sitios accesibles para la adsorción del fármaco.

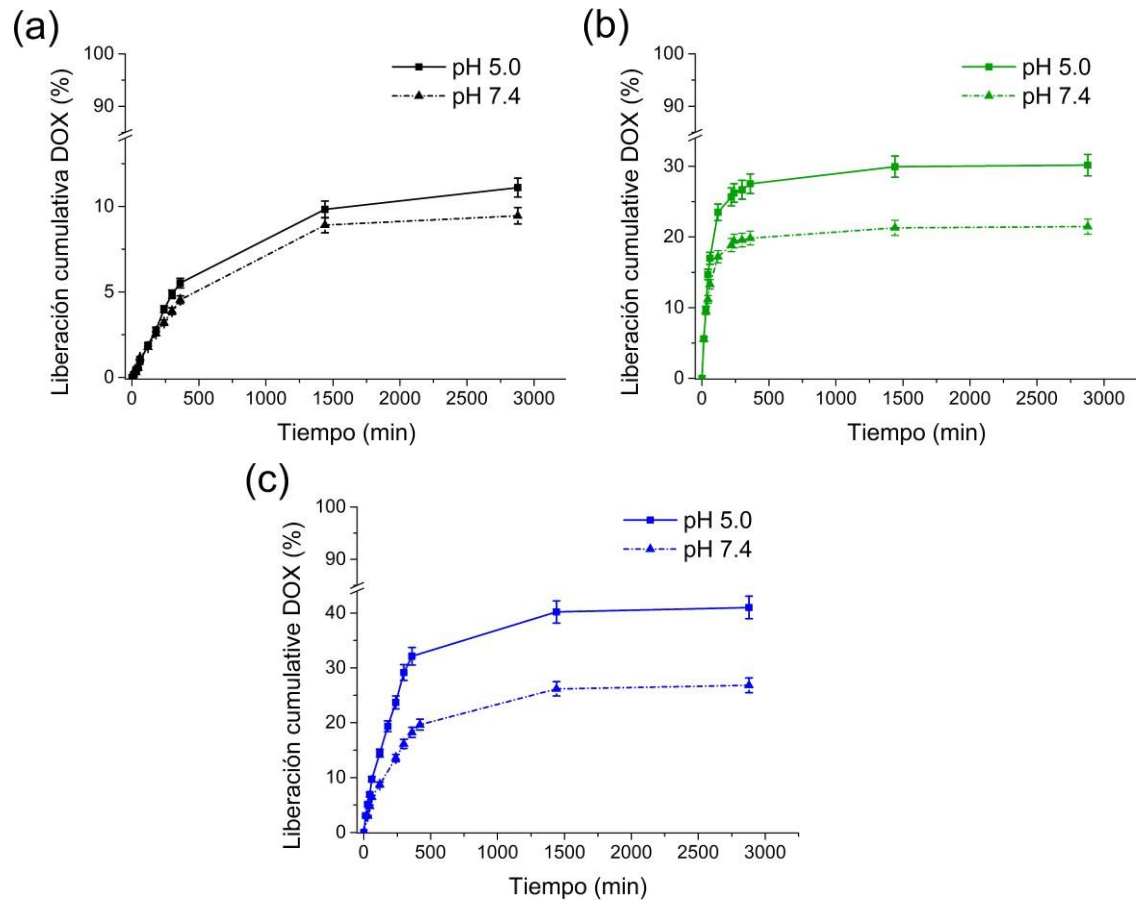
**Tabla 1.** Eficiencia de encapsulación de DOX en nanotransportadores basados en HNT y ajuste del modelo cinético matemático de Korsmeyer-Peppas a los datos de liberación del fármaco a diferentes pH en formulaciones basadas en HNT cargadas con DOX.

Sample	EE (%)	LC ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas					
			pH =7.4			pH = 5.0		
			k ( $\text{min}^{-n}$ )	n	R <sup>2</sup>	k ( $\text{min}^{-n}$ )	n	R <sup>2</sup>
DOX@HNT	100	13.6	0.0014	1.00	0.9750	0.0012	1.01	0.9808
DOX@HNT-Ce6	61.1	8.2	0.0220	0.80	0.9803	0.0524	0.60	0.9810
DOX@HNT-Ce6-PFOL	47.4	6.8	0.0153	0.64	0.9895	0.0120	0.71	0.9901

La elevada capacidad de carga observada en el HNT prístino puede relacionarse con la arquitectura tubular y la química superficial heterogénea características del HNT. Liao y col. han reportado estudios de adsorción de DOX en HNT basados en resultados tanto experimentales como teóricos [107]. Ellos proponen que el DOX puede adsorberse en las superficies externa e interna, así como en la intercapa. No obstante, mediante cálculos de energía libre superficial, proponen que los grupos hidroxilo expuestos ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) y los sitios de base de Lewis ( $\equiv\text{Si-O}^-$ ), predominantes en HNT, son los principales sitios de adsorción de DOX.

En los sistemas HNT-Ce6 y HNT-Ce6-PFOL se observa una correlación entre ZPC y LC. El aumento del ZPC refleja modificaciones en la densidad relativa de los grupos superficiales  $\equiv\text{Si-OH}$  y  $\equiv\text{Si-O}^-$  y, por tanto, cambios en la adsorción de DOX en el nanotransportador. Tal como se ha discutido en secciones previas, la inmovilización de Ce6 y PFOL produce un efecto combinado de: (1) ocupación de sitios superficiales más favorecidos de adsorción y (2) restricción parcial de accesibilidad a regiones adsorbentes del nanocarrier HNT, los que deberían modificar la afinidad química fármaco-nanotransportador. No obstante, estas sustancias en superficies también permiten nuevas interacciones entre DOX y nanotransportador mediante fuerzas de enlace de hidrógeno (PFOL), interacciones  $\pi$ - $\pi$  (Ce6) y fuerzas de van der Waals [108, 109]. En su conjunto, la inmovilización covalente de sustancias orgánicas mediada por fenómenos de silanización en HNT modifica las propiedades de adsorción y, como consecuencia, la acción de estas como nanotransportadores de DOX.

El comportamiento de liberación del fármaco desde los nanomateriales cargados con DOX se evaluó mediante diálisis a pH 7.4 y 5.0, en condiciones de exceso de disolvente, para asegurar la completa solubilización de DOX (Figura 14).



**Figura 14.** Porcentajes de liberación acumulativa del fármaco a partir de nanotransportadores basados en HNT cargados con DOX a pH 7.4 y 5.0. (a) DOX@HNT, (b) DOX@HNT-Ce6 y (c) DOX@HNT-Ce6-PFOL.

El sistema DOX@HNT mostró un perfil de liberación limitado. Después de 48 h, solo se liberó el 9.5 % y el 11.0 % de DOX a pH 7.4 y pH 5.0, respectivamente.

En contraste, DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL mostraron una liberación rápida antes de las 6 h, seguida de una liberación mínima entre las 6 y las 48 h. La tendencia de liberación del fármaco siguió el orden DOX@HNT-Ce6-PFOL > DOX@HNT-Ce6 > DOX@HNT en ambos pH estudiados.

Este fenómeno puede interpretarse a partir de los resultados propuestos por Liao y col. [107]. La adsorción de DOX ocurre preferentemente en los sitios siloxanos superficiales e interlaminares de HNT, lo que se traduce en una liberación sensible al pH de la droga. Sin embargo, según cálculos de DFT, los autores determinaron que la adsorción es más fuerte en los sitios Al-OH que en los del tipo siloxano, lo que limitaría su desorción durante el proceso de liberación. Además, DOX presenta un pKa de 8.01 para el grupo -NH<sub>2</sub> y de 8.8 para el grupo -OH del fenol [110], por lo que predomina la especiación en su forma catiónica en ambos pH estudiados. Este efecto combinado sugiere que DOX se mantiene adsorbida con mayor afinidad en HNT prístina a pH 7.4 mientras que a pH 5.0 se observa un sutil incremento en la liberación del fármaco, asociado a una disminución de la adsorción como consecuencia del cambio en la distribución de cargas superficiales.

El caso de DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL, los valores de LC fueron menores, atribuidos a la disminución de los sitios ≡Si-OH y ≡Si-O<sup>-</sup> preferenciales de adsorción para DOX como consecuencia de la incorporación

de los componentes Ce6 y PFOL. No obstante, en el perfil de liberación (Figuras 14b-c) se observa que el porcentaje de liberación de DOX en estos materiales es mayor que del sistema DOX@HNT. En medio acuoso, los cambios en el estado de protonación y de solvatación de los grupos superficiales orgánicos y del aluminosilicato modifican las interacciones y, en consecuencia, afectan la liberación del fármaco [109]. En este contexto, el ZPC constituye un parámetro relevante para interpretar parcialmente el comportamiento de liberación, ya que refleja cambios en la densidad relativa de carga de los grupos superficiales. En el caso de DOX@HNT-Ce6, la posible especiación del material dependerá de la naturaleza de los grupos  $-NH_2$  libres, remanentes de la síntesis, y de la especiación del Ce6 en el medio. Con los resultados obtenidos de la caracterización del sistema, no se tiene certeza de la estequiometría de la inmovilización del Ce6, pero en la literatura se reporta que los pKa de los 3 grupos  $-COOH$  están en el intervalo de 7.9 – 8.3 [111] lo que asegura que en medio acuoso este componente se encuentra en su forma neutra. La formulación, al entrar en contacto con PBS 7.4, induce la protonación de la superficie, lo que desencadena la liberación de la DOX adsorbida. El proceso se verá potenciado en aquellos sitios donde el fármaco se adsorbió en la superficie externa, alrededor de APTMS, donde primará el fenómeno de repulsión electrostática entre los grupos  $-NH_3^+$  tanto de la superficie del nanocarrier como de la DOX en conjunto con la solvatación del fármaco, lo que favorecerá su desorción a la fase líquida en comparación con el soporte prístino. En el caso del sistema a PBS 5.0,

la cantidad de DOX liberada aumenta debido al cambio más pronunciado en la densidad de cargas, lo que incrementa la desorción de DOX como consecuencia de la disminución del pH. Finalmente, el sistema DOX@HNT-Ce6-PFOL presentó la mayor liberación, alcanzando ~42% del valor de LC (ver Tabla 1). Tal como se ha discutido previamente, la inmovilización de IPTES-PFOL disminuye la proporción relativa de especies  $\equiv\text{Si-OH}/\equiv\text{Si-O}^-$ , en comparación con HNT-Ce6, e incorpora la adición de un polímero hidrofílico. Las interacciones en la adsorción DOX se verán potenciadas por la posible formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$  de la cadena principal del PFOL y el fármaco, mientras que en la desorción estas cadenas se hidratan, lo que permite desorber la DOX en íntimo contacto con el polímero en superficie.

Para interpretar el efecto del pH sobre la cinética de liberación, los datos del perfil de liberación se ajustaron al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas [112]. El ajuste matemático se muestra en la sección de anexos (Figura A2). Los parámetros  $n$ ,  $k$  y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) se resumen en la Tabla 1. Para la formulación DOX@HNT, tanto a pH 7.4 como a pH 5.0,  $n \sim 1$ , típico de una liberación de orden cero, es decir, a velocidad constante. En general, este comportamiento es beneficioso para prolongar el efecto terapéutico y evitar los efectos adversos de los fármacos [113]. Sin embargo, la cantidad de fármaco liberado fue mínima, lo que limita la eficacia de DOX@HNT como sistema de administración de fármacos debido a la desorción limitada, consecuencia de la naturaleza de la superficie de HNT prístina. Para DOX@HNT-Ce6,  $n = 0.80$  (pH

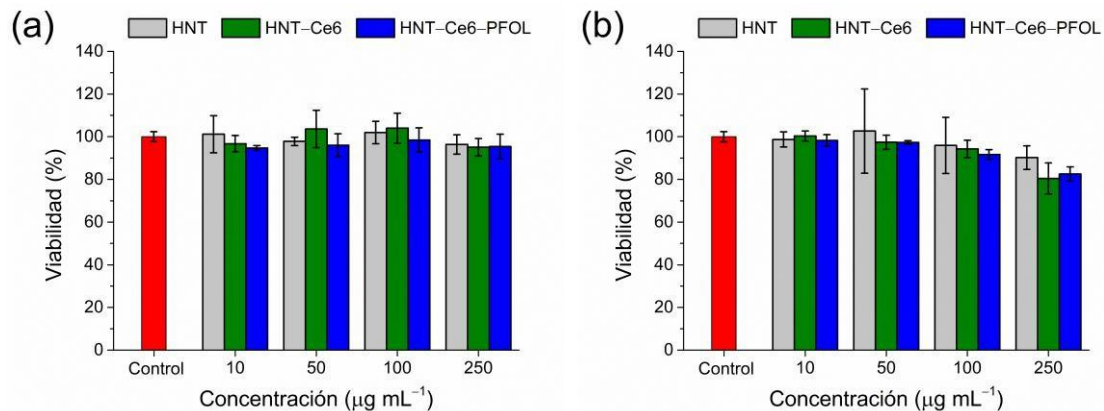
= 7.4) y  $n = 0.60$  (pH = 5.0), mientras que para DOX@HNT-Ce6-PFOL,  $n = 0.64$  (pH = 7.4) y  $n = 0.71$  (pH = 5.0). Estos valores suelen indicar un mecanismo de liberación de DOX no Fickiano (transporte anómalo) [114]. Además, las formulaciones DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL mostraron una dependencia de la cinética de liberación respecto al pH. En el caso de DOX@HNT-Ce6, el valor de  $k$  aumentó desde  $0.0220 \text{ min}^{-n}$  a pH 7.4 hasta  $0.0524 \text{ min}^{-n}$  a pH 5.0, lo que representa un incremento de aproximadamente 2.4 veces y evidencia una liberación de DOX más rápida en medio ácido. En contraste, para DOX@HNT-Ce6-PFOL el valor de  $k$  disminuyó levemente desde 0.0153 hasta  $0.0120 \text{ min}^{-n}$  al reducir el pH, sugiriendo una liberación más controlada del fármaco en presencia del recubrimiento PFOL. Este comportamiento probablemente puede explicarse en función del ZPC y la funcionalización superficial. A medida que el pH se acerca al ZPC (4.1), la densidad de  $\equiv\text{Si-O}^-$  superficiales disminuye, mientras que la de  $-\text{NH}^+$  aumenta, lo que se traduce en interacciones más débiles entre DOX y HNT-Ce6 y en una mayor rapidez de liberación. En contraste, el DOX@HNT-Ce6-PFOL mostró valores de  $k$  similares en ambos pH y, en comparación con la formulación DOX@HNT-Ce6, presentó una liberación gradual de DOX durante las primeras 6 h debido a la presencia de PFOL en la superficie del nanomaterial. Las principales interacciones fármaco-nanotransportador son la atracción electrostática entre la DOX, con carga positiva, y los grupos superficiales externos  $\equiv\text{Si-O}^-$  y la que se manifiesta entre la DOX y las cadenas de PEG en el sistema HNT-Ce6-PFOL

(ZPC a pH = 5.0). No obstante, las cadenas de PFOL (a pesar de que se solvatan en medio acuoso) dificultan la liberación de DOX adsorbido al nanotransportador, lo que se traduce en una liberación del fármaco más controlada y tortuosa en comparación con el DOX@HNT y DOX@HNT-Ce6 (Figuras 8a-b). Estos hallazgos respaldan el potencial de los nanomateriales bifuncionales modificados basados en HNT como transportadores de DOX.

### **5.1.6. Ensayos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7**

#### **5.1.6.1. Viabilidad intrínseca (oscuridad)**

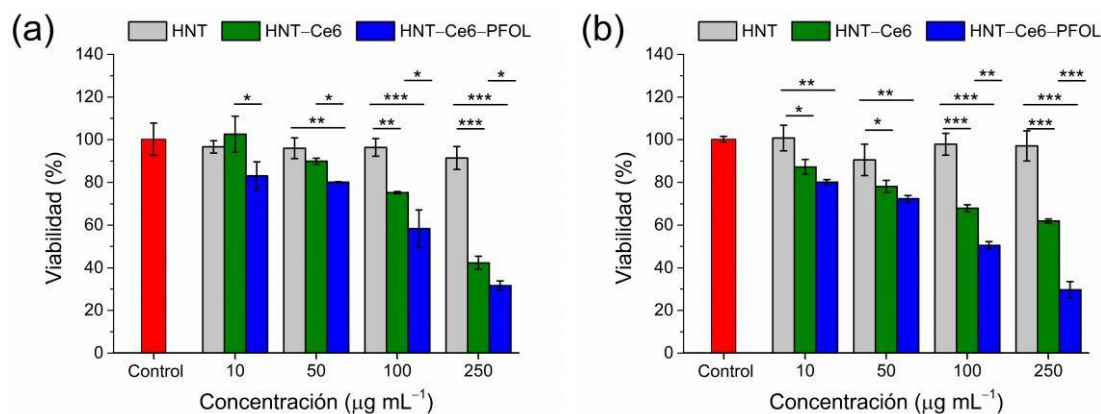
Para evaluar los efectos citotóxicos, se probaron HNT puro, HNT-Ce6 y HNT-Ce6-PFOL en células HeLa y MCF-7 en oscuridad a concentraciones de 10, 50, 100 y 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas las evaluaciones se realizaron tras 24 h de incubación. La Figura 15 muestra que, en condiciones de oscuridad, todos los nanomateriales demostraron citotoxicidad mínima, manteniendo una viabilidad celular superior al 80% en todas las concentraciones evaluadas. Estos resultados indican que los nanomateriales basados en HNT ejercen efectos insignificantes sobre la viabilidad celular y exhiben una toxicidad intrínseca mínima en condiciones de oscuridad evaluadas.



**Figura 15.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar la citotoxicidad intrínseca. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns no significativo;  $n = 3$ ).

#### 5.1.6.2. Viabilidad bajo irradiación de luz LED (fototoxicidad)

Se evaluó el potencial fototerapéutico de los nanomateriales HNT prístino y fotosensibilizados mediante ensayos de fototoxicidad en células HeLa y MCF-7 como se muestra en la Figura 16. Tras la irradiación lumínica, las células control mantuvieron una alta viabilidad, entre el 90% y el 100%. De forma similar, no se observaron efectos no fototóxicos en los sistemas incubados con HNT prístinos, incluso a 250 µg mL<sup>-1</sup>, en ambas líneas celulares.



**Figura 16.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar fototoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns, no significativo;  $n = 3$ ).

Esta tendencia se correlaciona de forma directa con los ensayos de producción de ROS, que indicaron que el sistema HNT prístino no muestra producción de ROS bajo las condiciones de irradiación con luz LED empleadas. Por el contrario, los HNT-Ce6 y HNT-Ce6-PFOL fotosensibilizados mostraron efectos fototóxicos dependientes de la concentración a partir de  $\geq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los valores de  $\text{IC}_{50}$  y  $R^2$  de los nanomateriales basados en HNT se presentan en la

Tabla 2. Además, como control, se realizaron ensayos de viabilidad celular en ambas líneas empleando Ce6 libre bajo las mismas condiciones que las empleadas para los nanomateriales, con irradiación con luz LED a  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  durante 15 minutos (Anexo, Figura A3a-c).

**Tabla 2.** Valores de  $IC_{50}$  calculados a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  de cada nanotransportador en líneas celulares HeLa y MCF-7.

Muestra	HeLa		MCF-7	
	$IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$R^2$	$IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$R^2$
Ce6 libre	$1.10 \pm 0.40$	0.9934	$1.05 \pm 0.16$	0.9926
HNT	> 250	---	> 250	---
HNT-Ce6	$200 \pm 14$ ( $2.02 \pm 0.14$ )	0.9641	> 250	---
HNT-Ce6-PFOL	$122 \pm 14$ ( $1.13 \pm 0.13$ )	0.8995	$103 \pm 4$ ( $0.95 \pm 0.04$ )	0.9674

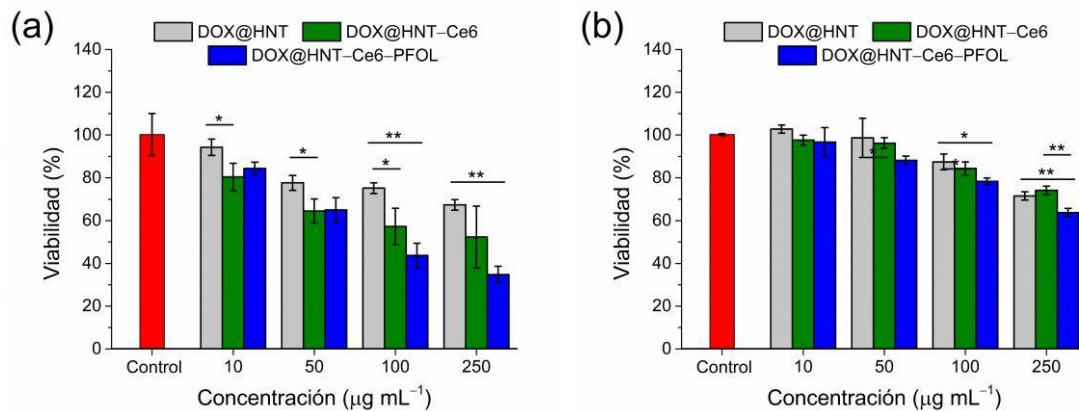
Entre paréntesis, el valor de  $IC_{50}$  normalizado por cantidad de Ce6 ( $\mu\text{g}_{\text{Ce6}} \text{ mL}^{-1}$ ) en los nanomateriales fotosensibilizados.

En el caso de la línea HeLa, HNT-Ce6 mostró una actividad fototóxica moderada, alcanzando un valor de  $IC_{50} = 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que el sistema HNT-Ce6-PFOL mostró un  $IC_{50}$  de  $122 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que es significativamente inferior. En comparación con el Ce6 libre (Tabla 2), se observa que el sistema HNT-Ce6 muestra un  $IC_{50}$  mayor, a diferencia del sistema HNT-Ce6-PFOL, que presenta un valor normalizado por Ce6 similar al  $IC_{50}$  del fotosensibilizador libre. En el caso de la línea MCF-7, se observa la misma tendencia, donde solo el sistema vectorizado HNT-Ce6-PFOL muestra una respuesta de  $IC_{50}$  cuantificable, a las concentraciones estudiadas, alcanzando un valor muy similar al del Ce6 libre. Esto permite inferir que los materiales, luego de ser incubados durante 12 h y retirados del medio de cultivo, fueron capaces de inducir un efecto fototóxico mediante la producción de ROS durante la irradiación de 15 minutos. Cabe señalar, que esto es una evidencia que permite sugerir que los materiales se bioacumularon en las células estudiadas donde el efecto del agente PFOL muestra un incremento en la respuesta deseada.

#### **5.1.6.3. Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores (quimiotoxicidad)**

La idoneidad de los nanomateriales basados en HNT para CT se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad en células HeLa y MCF-7 para las formulaciones DOX@HNT, DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL. Los porcentajes de

proliferación celular basados en MTT en los sistemas incubados y de control en células estudiadas se resumen en la Figura 17.



**Figura 17.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en HNT para evaluar la quimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns no significativo;  $n = 3$ ).

Los sistemas incubados con DOX@HNT, DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL en células HeLa mostraron viabilidades inferiores al 80% a concentraciones superiores a 10 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 17a). La formulación DOX@HNT-Ce6-PFOL redujo la viabilidad de las células HeLa al 36% a 250 µg mL<sup>-1</sup> después de 24 h, mientras que las formulaciones DOX@HNT y

DOX@HNT–Ce6 mostraron viabilidades de 77% y 58%, respectivamente, a la misma concentración. Para comparar el efecto quimioterapéutico de DOX en células HeLa, se midió el IC<sub>50</sub> de las formulaciones a las 24 h mediante el ensayo MTT, como se resume en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Valores IC<sub>50</sub> calculados a partir de los datos de citotoxicidad de las formulaciones de DOX encapsuladas en cada nanotransportador basado en HNT en las líneas celulares HeLa y MCF-7.

Muestra	HeLa		MCF-7	
	IC <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
DOX libre	4.43 ± 0.89	0.9158	9.04 ± 0.70	0.9781
HNT@DOX	> 250	---	> 250	---
HNT–Ce6@DOX	224 ± 44 (1.84 ± 0.36)	0.9641	> 250	---
HNT–Ce6–PFOL @DOX	80 ± 5 (0.54 ± 0.04)	0.9486	> 250	0.9674

Entre paréntesis, el valor de IC<sub>50</sub> normalizado por cantidad de DOX encapsulada (μg<sub>DOX</sub> mL<sup>-1</sup>).

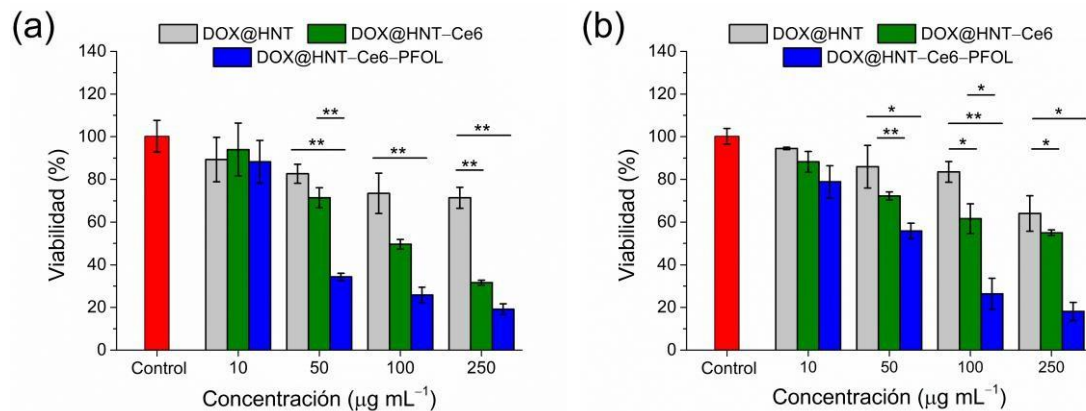
Además, como control, se realizaron ensayos de viabilidad celular en ambas líneas con DOX libre, bajo las mismas condiciones que las empleadas para las formulaciones, como se resume en la sección de anexos (Figura A3b-d). Para DOX@HNT el valor de  $IC_{50}$  fue  $>250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL mostraron valores de  $IC_{50}$  de 224 y  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados muestran que DOX@HNT-Ce6-PFOL es casi 2.8 veces más quimiotóxico que HNT-Ce6@DOX. En relación con DOX libre, ambas formulaciones mostraron valores de  $IC_{50}$  inferiores a los observados con el fármaco, siendo más marcado el efecto en el sistema DOX@HNT-Ce6-PFOL. Esta evidencia permite sugerir que la funcionalización con PFOL logra generar sistemas que se bioacumulan en células HeLa ejerciendo una acción citotóxica eficiente en comparación con los nanotransportadores basados en HNT y HNT-Ce6.

En las células MCF-7 se observa un comportamiento distinto al de la línea HeLa, pues las concentraciones de las formulaciones empleadas muestran una baja respuesta de quimiotoxicidad alcanzando elevada viabilidad incluso a  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En relación con la evaluación del  $IC_{50}$ , no se obtienen valores experimentales que permitan determinarlo. Para DOX libre el  $IC_{50}$  para MCF-7 es de  $9.04 \pm 0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ , superior al observado en la línea HeLa (Tabla 3). Lo anterior sugiere que la cantidad transportada y liberada por las formulaciones estudiadas, en el caso de la línea de cáncer MCF-7, no es suficiente para ejercer un efecto quimiotóxico importante en las condiciones evaluadas.

#### **5.1.6.4. Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores bajo irradiación de luz LED (fotoquimiotoxicidad)**

Se realizaron experimentos combinados de fotoquimiotoxicidad incubando células HeLa y MCF-7 con las formulaciones basadas en HNT durante 12 h, seguidos de un lavado y de una irradiación con luz LED visible (15 min, 150 mW cm<sup>-2</sup>). Posteriormente, las células se incubaron en la oscuridad durante 24 h para permitir la manifestación de los efectos fototóxicos inducidos por la producción de ROS, como se muestra en la Figura 18. Para ambas líneas celulares, la formulación DOX@HNT mostró un efecto citotóxico limitado, alcanzando viabilidades inferiores al 80% solo a concentraciones superiores a 100 µg mL<sup>-1</sup>, en concordancia con lo observado en los ensayos de quimiotoxicidad en oscuridad (Figura 17). Este comportamiento sugiere que, en ausencia de un fotosensibilizador, la reducción de la viabilidad asociada a DOX@HNT se debe principalmente al efecto citotóxico de la DOX liberada.

En el caso de la línea HeLa, tras el segundo período de incubación, los sistemas DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL mostraron una disminución considerable de la viabilidad celular en comparación con HNT@DOX, lo que confirma la potenciación de los efectos antiproliferativos por la acción combinada de la citotoxicidad de DOX y la actividad fotodinámica de Ce6.



**Figura 18.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con las formulaciones basadas en HNT para evaluar la fotoquimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns, no significativo;  $n = 3$ ).

Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para DOX@HNT-Ce6 y de  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  para DOX@HNT-Ce6-PFOL tal como se resume en la Tabla 4. Estos valores demuestran una mejora sustancial en la eficacia del tratamiento en comparación con PDT o CT por separado. El grado de sinergia del tratamiento se midió mediante el índice de combinación (CI). Los valores estimados del CI fueron de aproximadamente 1.0 para HNT-Ce6 y de 0.75 para HNT-Ce6-PFOL. En otras palabras, se observó un efecto aditivo de las terapias con HNT-Ce6, mientras que se observó un efecto sinérgico con HNT-Ce6-PFOL ( $\text{CI} < 1$ ). Estos

resultados demuestran que la incorporación de PFOL promueve la acción terapéutica de la formulación en la línea HeLa, sugiriendo que su presencia incrementa la bioacumulación del nanomaterial, permitiendo que pueda ejercer la acción dual de una manera más efectiva en comparación con lo observado en el caso de la formulación DOX@HNT-Ce6 donde solo se observan efectos aditivos por parte de las terapias. Sin embargo, con los resultados que se tienen de esta investigación faltan evidencias que permitan confirmar la acción si la acción del nanocarrier es una consecuencia de procesos de internalización o simplemente por acción extracelular.

Para la línea MCF-7 se observó un comportamiento similar en el efecto citotóxico dependiente de la concentración, siendo más evidente en la formulación DOX@HNT-Ce6-PFOL, donde se alcanzan viabilidades inferiores al 40% a concentraciones  $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En efecto, en estos sistemas, en las concentraciones evaluadas, se logra evidenciar el valor del  $\text{IC}_{50}$  solo para la formulación DOX@HNT-Ce6-PFOL alcanzando un valor de  $75 \pm 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos resultados evidencian la capacidad de generar efectos combinados en PCT superiores a los observados en PDT y CT. Sin embargo, el alcance de las medidas de CI para las formulaciones DOX@HNT-Ce6 y DOX@HNT-Ce6-PFOL no se puede determinar pues no se cuentan con los valores de  $\text{IC}_{50}$  necesarios para estimar si se está evidenciando un proceso sinérgico o aditivo en la potenciación de PCT. Sin embargo, se puede sugerir que el efecto más probable corresponde a una sinergia en las terapias en ambos

casos, siendo mucho más evidente en el caso de la formulación DOX@HNT-Ce6-PFOL. En efecto, en esta línea celular el efecto fotodinámico fue importante, alcanzando un valor de  $IC_{50} = 103 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y en la PCT se obtuvo un valor de  $IC_{50} = 75 \pm 6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , lo que demuestra una mejora al incorporar el fármaco DOX en el tratamiento dual (CT con  $IC_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabla 4.** Valores  $IC_{50}$  y CI calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  de cada formulación de DOX encapsulada en los nanotransportadores en base a HNT en líneas celulares HeLa y MCF-7.

Muestra	HeLA			MCF-7		
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$	CI	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$	CI
HNT@DOX	> 250	---	---	> 250	0.9859	---
HNT-Ce6@DOX	$100 \pm 15$	0.9092	1.01	> 250	0.9507	---
HNT-Ce6-PFOL@DOX	$36 \pm 6$	0.9681	0.75	$75 \pm 6$	0.9559	---

Los resultados obtenidos en cada una de las monoterapias en conjunto con la terapia dual sugieren que la incorporación de PFOL como agente direccionador aumenta la respuesta citotóxica gracias a la acumulación del nanotransportador en las células diana, promoviendo la producción de ROS bajo irradiación de luz LED-visible, así como la liberación controlada de DOX. De ellas, la línea HeLa

demuestra un mayor efecto en comparación con MCF-7 alcanzado un efecto sinérgico de PCT. Lo anterior sugiere que la naturaleza de las líneas celulares limita la acción citotóxica de la terapia dual empleada. En efecto, la línea HeLa sobreexpresa de forma importante el receptor de folato en comparación con la línea MCF-7 [115, 116], lo que podría estar limitando la asociación, la bioacumulación y/o la internalización del material en su acción citotóxica. De acuerdo con los criterios de clasificación ISO 10993-5 [63], el nanotransportador HNT-Ce6-PFOL es un compuesto fotoquimiotóxico efectivo (< 40% de viabilidad) a concentraciones superiores a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en las condiciones evaluadas, lo que respalda su potencial aplicación como material activo en PCT contra el cáncer cervicouterino.

## 5.2. Nanomateriales en base a PAMAM

Como segunda plataforma nanotransportadora, se estudió el dendrímero PAMAM de cuarta generación. Su incorporación en esta tesis se fundamenta en su arquitectura altamente ramificada, su elevada monodispersidad y su alta densidad de grupos amino terminales, propiedades que lo posicionan como un nanomaterial altamente versátil y eficiente para procesos de bioconjugación, transporte controlado de fármacos y el desarrollo de estrategias terapéuticas combinadas [35]. PAMAM ofrece una superficie tridimensional homogénea, rica en grupos  $-NH_2$  accesibles, y un núcleo interno con cavidades nanométricas capaces de actuar como reservorio de fármacos y de funcionar como nanotransportador en medio fisiológico, gracias a su elevada solubilidad en agua. En este contexto, PAMAM emerge como una alternativa interesante para su empleo en terapia combinada, gracias a su capacidad de encapsular fármacos, así como de conjugar de forma covalente una serie de moléculas de interés en biomedicina. De ellas, se ha elegido el Ce6 pues constituye un fotosensibilizador ideal para su anclaje sobre dendrímeros, debido a su elevada eficiencia cuántica de generación de  $^1O_2$  y a la presencia de tres grupos carboxilo ( $-COOH$ ) susceptibles de activación mediante agentes carbodiimida [117]. En efecto, Ce6 presenta una solubilidad limitada y una marcada tendencia a la agregación  $\pi-\pi$  en medios fisiológicos, lo que reduce su actividad fotodinámica y dificulta su administración directa. Por esta razón, su conjugación a nanovehículos poliméricos, como PAMAM, constituye una de las estrategias más robustas para

mejorar su biodistribución, estabilidad coloidal, internalización celular y eficiencia terapéutica.

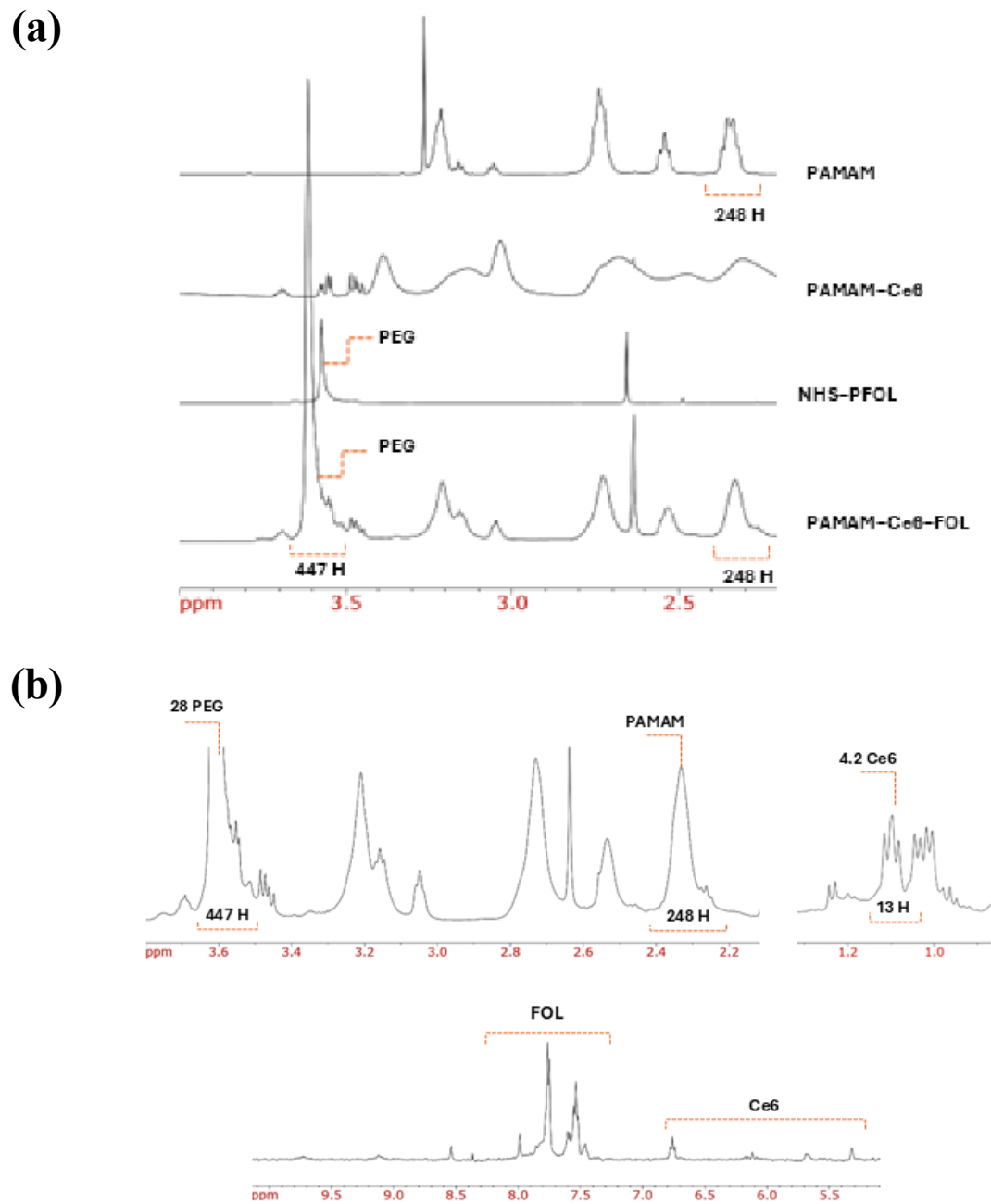
### **5.2.1. Preparación de los nanoconjugados**

El dendrímero PAMAM se conjugó superficialmente con Ce6 mediante síntesis en un solo paso, empleando DMSO y acoplamiento EDC/NHS. El conjugado PAMAM–Ce6 crudo se purificó exhaustivamente mediante diálisis hasta que no se detectó Ce6 libre en el dializado. La elección de la proporción molar Ce6:PAMAM se estableció considerando estudios que reportan que una sobrecarga de fotosensibilizador induce cambios indeseados en el tamaño hidrodinámico, neutraliza la carga positiva del dendrímero y puede generar autoagregación del conjugado PAMAM-fotosensibilizador o incluso el colapso parcial de la estructura macromolecular [118].

### **5.2.2. Caracterización**

#### **5.2.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN $^1\text{H}$ )**

Los sistemas preparados en base a PAMAM se purificaron y caracterizaron mediante espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  para confirmar su grado de funcionalización tal como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de los nanoconjugados preparados a partir de PAMAM. (a) (a) PAMAM, PAMAM-Ce6, NHS-PFOL y PAMAM-Ce6-PFOL; y (b) espectros ampliados del nanoconjugado PAMAM-Ce6-PFOL.

El espectro del PAMAM–Ce6 muestra un ensanchamiento de las bandas asociadas a los hidrógenos del PAMAM debido a la conjugación con fotosensibilizador [119] (Figura 19a). Este efecto se ha descrito previamente en literatura y se atribuye a la interacción entre los núcleos del PAMAM y el campo magnético generado por las corrientes de anillo electrónicas del núcleo de porfirina Ce6 [46]. Para determinar el grado de conjugación de Ce6, seleccionó la señal correspondiente a los hidrógenos del metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) adyacentes a los grupos carbonilo de las ramas del PAMAM, que aparecen como un multiplete centrado en 2.33 ppm tal como se resume en la Figura 19<sup>a</sup>. Esta señal se emplea como base para determinar la estequiometría de los grupos que se conjugan en la superficie de PAMAM, tal como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación [46, 120]. Con base en lo anterior y considerando que el PAMAM empleado es de cuarta generación, se asigna que esta señal integra 248 hidrógenos.

La conjugación del FS se determinó mediante la identificación del triplete característico correspondiente al grupo metilo terminal del sustituyente etilo en el núcleo de porfirina de Ce6, en torno a 1.10 ppm, que integra 13 hidrógenos, lo que indica un grado de sustitución de 4.2 unidades de Ce6 por fragmento de dendrímero. Esta cifra es coherente con lo observado en sistemas PAMAM-fotosensibilizador reportados en la literatura, donde la funcionalización suele situarse entre 2 y 8 moléculas de FS por dendrímero, dependiendo del grado de protonación superficial y de la disponibilidad estérica [118, 121]. La

espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  no proporciona evidencia concluyente sobre el sitio del enlace covalente entre las unidades de Ce6 y el dendrímero. El FS presenta tres grupos  $-\text{COOH}$  que permiten la conjugación con los grupos  $-\text{NH}_2$  de la superficie del dendrímero mediante la formación de enlaces  $-\text{CONH}-$ . Dada su mayor libertad conformacional y accesibilidad al disolvente, el grupo carboxietilo unido al núcleo de porfirina es el sitio primario previsto para la conjugación de Ce6. Sin embargo, también puede producirse la conjugación mediante los dos grupos carboxilo restantes. Independientemente del sitio específico, la conjugación con PAMAM fue confirmada por datos de RMN  $^1\text{H}$  y se espera que mejore la solubilización y estabilización de Ce6 en el medio fisiológico.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del sistema PAMAM-Ce6-PFOL muestra un cambio significativo en las señales en el rango de 3.00 – 3.50 ppm, atribuible a la incorporación del PFOL a la superficie de PAMAM-Ce6. Comparando con el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de NHS-PFOL, la aparición de las señales en ese intervalo de desplazamiento químico corresponde a los H de los grupos metileno  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$  de la cadena principal del PFOL. Se ha empleado el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de NHS-PFOL con el fin de conocer la composición en H para poder cuantificar el grado de PEGilación se alcanzó el sistema PAMAM-Ce6. El espectro de NHS-PFOL muestra una proporción entre integrales que indica la presencia de 4 unidades monoméricas de  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$  por cadena de polímero (eso indica que la señal de PFOL equivale a 16 H, por cada cadena). Además, aparecen señales características del ácido fólico a 7.0 y 7.7 ppm, pero

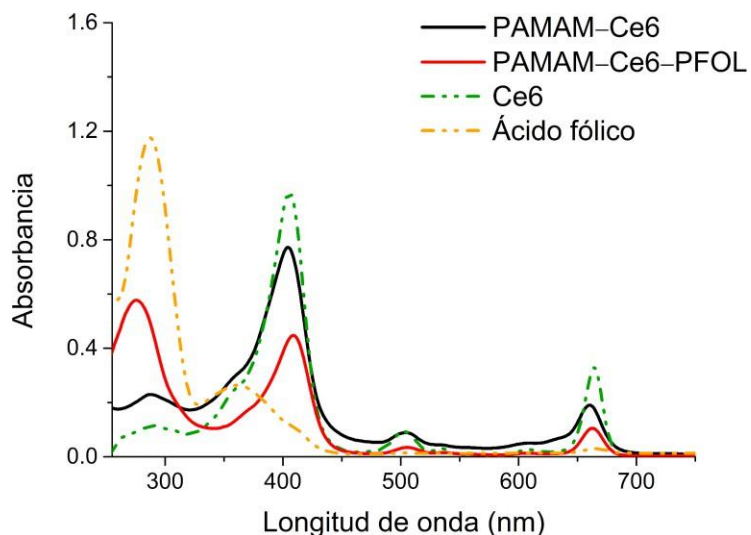
están muy distorsionadas y no tienen suficiente resolución para cuantificarlas mediante su integración.

El espectro PAMAM–Ce6–FOL en la Figura 19b muestra que la señal a 2.33 ppm se atribuye al núcleo de PAMAM e integra 248 hidrógenos. La señal atribuida a los H de la cadena polimérica de PFOL está integrada por 447 hidrógenos, lo cual permite estimar que existen 28 unidades de PFOL conjugadas en la superficie de PAMAM, generando un 44% de modificación de los grupos –NH<sub>2</sub> terminales. Para determinar la cantidad de Ce6 que queda remanente en el nanoconjugado, se utilizaron las señales empleadas para el sistema PAMAM–Ce6, donde se confirma que la conjugación sigue siendo de 4.2 unidades de Ce6, demostrando que la modificación con NHS-PFOL no generó cambios en el sistema PAMAM–Ce6, preservando la conjugación del FS en su superficie.

#### **5.2.2.2. Espectroscopía de ultravioleta – visible (UV-vis)**

Los hallazgos de RMN se confirmaron mediante espectroscopía UV-Vis, como se muestra en la Figura 20. Una muestra liofilizada del nanomaterial PAMAM–Ce6 se suspendió en DMSO para preparar una solución madre a 59,7 µg mL<sup>-1</sup>. Se realizó una dilución 1:10 para obtener una muestra a 5.9 µg mL<sup>-1</sup>. Se midió la absorbancia máxima a 405 nm del Ce6 en esta solución, a fin de estimar la concentración nominal de Ce6 en el nanoconjugado, utilizando los datos de la curva de calibración correspondiente al Ce6. Los resultados mostraron una

estequiometría de 4.1 moléculas de Ce6 por PAMAM, lo que valida los resultados obtenidos por RMN de  $^1\text{H}$ .



**Figura 20.** Espectro UV-vis de los nanoconjugados PAMAM-Ce6 y PAMAM-Ce6-FOL.

En el caso de PAMAM-Ce6-PFOL, se realizó un protocolo preparando una disolución de la misma concentración a partir del material liofilizado donde se detecta un espectro de absorción similar al del PAMAM-Ce6 observándose la aparición de una nueva banda de absorción a los 276 nm asociada a la incorporación de FOL la que se cuantificó a partir de una curva de calibración, empleando ácido fólico como analito, encontrándose una cantidad conjugada equivale a 26 cadenas de PFOL en el nanotransportador, siendo un valor muy cercano al determinado por medio de RMN de  $^1\text{H}$ . Esta información confirma que

las rutas de síntesis empleadas permitieron obtener la modificación de PAMAM en la que se incorporaron los componentes Ce6 y PFOL.

### **5.2.2.3. Espectroscopía de dispersión de luz dinámica (DLS) y medidas de potencial zeta**

Los experimentos de DLS se realizaron con el fin de determinar el radio hidrodinámico ( $R_H$ ), el índice de polidispersidad (PDI) y la potencial zeta en condiciones que simularon el medio fisiológico (PBS a pH 7.4), tal como se resume en la Tabla 5. Estos resultados revelaron un aumento sustancial en el radio hidrodinámico del conjugado PAMAM-Ce6 ( $84.1 \pm 2.1$  nm) y PAMAM-Ce6-PFOL ( $165.1 \pm 8.5$  nm) en comparación con el dendrímero PAMAM nativo ( $4.5 \pm 0.9$  nm) [111]. En el caso del nanoconjugado PAMAM-Ce6, el aumento probablemente se debe a la mayor hidrofobicidad superficial del conjugado, causada por los grupos Ce6 unidos, junto con una reducción de la carga positiva superficial; ambos factores favorecen la agregación entre dendrímeros en solución acuosa en comparación con la forma nativa. De acuerdo con reportes de Vermathen y colaboradores [111], la especiación del Ce6 muestra que en PBS a pH = 7.4 la estructura del FS está desplazada a su forma neutra, pues posee valores de  $pK_a = 7.9 - 8.3$  para los grupos  $-COOH$  ionizables. Independientemente del grupo  $-COOH$  anclado a la superficie, los grupos remanentes se encuentran en sus formas protonada y neutra en las condiciones en que se realizó la medición de DLS. Esto favorece la asociación del

nanoconjugado PAMAM–Ce6, lo que da lugar a agregados de mayor tamaño que los del PAMAM nativo. En el caso del sistema PAMAM–Ce6–PFOL, el incremento del radio hidrodinámico se atribuye a la incorporación de las cadenas de PFOL, alcanzando un valor 37 veces superior al del PAMAM nativo y aproximadamente el doble que el del sistema PAMAM–Ce6. El PDI de los nanoconjugados PAMAM–Ce6 y PAMAM–Ce6–PFOL es  $< 0.4$ , lo que indica un alto grado de homogeneidad estructural en los sistemas estudiados [122].

**Tabla 5.** Parámetros obtenidos a partir de mediciones de DLS y potencial zeta para nanoconjugados en base a PAMAM en PBS a pH = 7.4. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de tres réplicas independientes.

Nanoconjugado	R <sub>H</sub> (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
PAMAM	4.5 $\pm$ 0.9	0.169 $\pm$ 0.117	+20.4 $\pm$ 0.8
PAMAM–Ce6	84.1 $\pm$ 2.1	0.201 $\pm$ 0.171	+17.1 $\pm$ 1.1
PAMAM–Ce6–PFOL	165.1 $\pm$ 8.5	0.295 $\pm$ 0.101	+6.9 $\pm$ 2.5

Las mediciones del potencial zeta arrojaron un valor de +17.1  $\pm$  1.1 mV para el conjugado PAMAM–Ce6, lo cual es consistente con la estabilidad moderada a alta de las nanopartículas en disolución. El potencial electrostático del conjugado

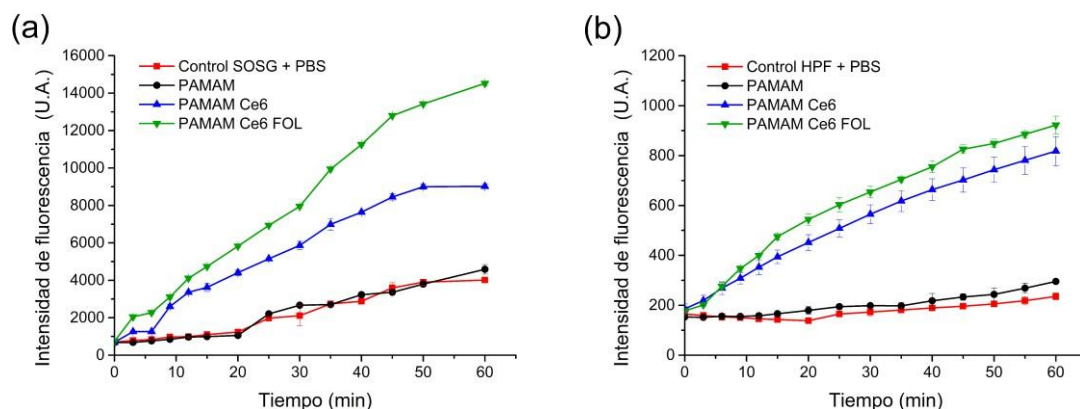
es menor que el del PAMAM nativo, lo cual concuerda con la reducción de la carga positiva superficial a medida que los grupos  $-NH_2$  del dendrímero se conjugan con Ce6. En el caso del sistema PAMAM-Ce6-PFOL, se observa una disminución importante de las cargas catiónicas, alcanzando un valor de  $+6.9 \pm 2.5$  mV, lo cual se debe a la modificación del 44% de los grupos  $-NH_2$  superficiales, determinada por RMN de  $^1H$  y UV-vis. A pesar de la importante caída del potencial zeta observada en el sistema PAMAM-Ce6-PFOL, la presencia de las cadenas de polímero en la superficie externa genera un efecto estabilizador en el nanoconjugado, lo que se refleja en su valor de PDI, lo que permite sugerir que este sistema presenta características adecuadas para su empleo como nanotransportador de fármacos.

### **5.2.3. Producción de ROS**

Se evaluó la capacidad de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los sistemas en base a PAMAM bajo irradiación con luz LED blanca, mediante sensores específicos para la detección por fluorescencia de  $^1O_2$  y  $HO\cdot$  (Figura 21). Los resultados revelaron la generación sostenida de ambas especies por PAMAM-Ce6 y PAMAM-Ce6-PFOL durante todo el período de irradiación, lo que indica que los nanoconjugados mantienen la capacidad del fotosensibilizador para generar ROS a través de las posibles vías fotoquímicas de tipo I y tipo II, en consonancia con informes previos sobre sistemas fotodinámicos basados en Ce6 [99]. Las soluciones de PAMAM nativo a concentraciones idénticas (utilizadas

como control) no mostraron aumentos en la intensidad de fluorescencia atribuibles a la generación de ROS.

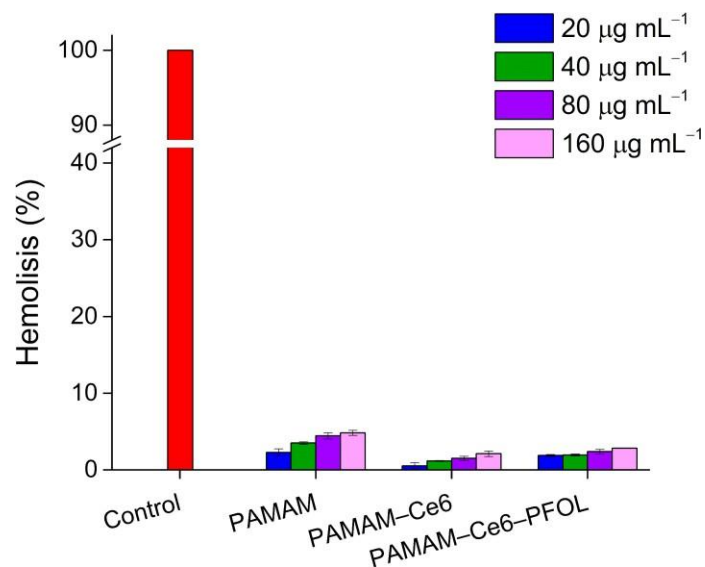
La correlación entre la estabilidad coloidal, un potencial zeta moderado y la maximización de ROS respalda la hipótesis de que PAMAM–Ce6–FOL constituye una plataforma fotoactiva más eficiente y con mejores propiedades para su empleo en los ensayos celulares posteriores, donde se evaluará su capacidad fotodinámica en condiciones biológicas reales.



**Figura 21.** Detección de ROS en nanoconjugados basados en PAMAM bajo irradiación con luz LED (60 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ). (a) Generación de  $^1O_2$  y (b)  $HO\cdot$ . Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, empleando suspensiones a  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  y las sondas fluorescentes SOSG ( $40 \mu\text{M}$ ) y HPF ( $10 \mu\text{M}$ ). La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 525 nm, respectivamente.

#### 5.2.4. Ensayos de Hemólisis

La hemocompatibilidad de los nanomateriales es una propiedad esencial que debe evaluarse previamente para su administración intravenosa. La literatura reporta extensamente la hemólisis relacionada con dendrímeros PAMAM, sugiriendo que estos interactúan con las membranas de las RBCs demostrándose que aquellos de alta generación alteran las vesículas lipídicas aniónicas [123]. La superficie de las RBCs tiene carga negativa debido a la presencia de glucolípidos y de algunas proteínas integrales periféricas glicadas, lo que provoca repulsión electrostática entre los glóbulos rojos e impide su autoagregación y adhesión a las paredes de los vasos sanguíneos. En ese contexto, los dendrímeros PAMAM, al ser especies catiónicas en medio fisiológico, interactúan con la membrana de las RBCs como resultado de interacción electrostática, induciendo hemólisis [124]. Los resultados de hemólisis de los nanoconjugados en base a PAMAM en concentraciones de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se muestran en la Figura 22. El sistema PAMAM nativo generó hemólisis moderada, a la concentración de 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  siendo congruente con la literatura que describe una hemólisis marcada para dendrímeros PAMAM de cuarta generación [125]. Los nanoconjugados PAMAM-Ce6 y PAMAM-Ce6-FOL generaron una respuesta hemolítica dependiente de la concentración, inferior al 5%, lo que los sitúa como materiales no hemotóxicos de acuerdo con el límite establecido en la norma internacional ISO 10993-4 [106].



**Figura 22.** Experimentos de actividad hemolítica para nanomateriales basados en PAMAM.

En nuestro caso, la funcionalización con Ce6 y PFOL atenúa de forma efectiva la hemotoxicidad intrínseca del PAMAM nativo, debido a la disminución del número de grupos  $-\text{NH}_2$  terminales libres al formar enlaces amida con los grupos carboxílicos del Ce6 y PFOL, tal como se verificó por las medidas de potencial zeta. Adicionalmente, la presencia de Ce6 y PFOL contribuye a reducir la exposición de cargas catiónicas debido al impedimento estérico, como se verificó mediante caracterización por DLS. Estos resultados confirman el efecto positivo de la funcionalización de PAMAM con Ce6 y PFOL.

### 5.2.5. Evaluación de la capacidad encapsulación y liberación de DOX

La capacidad de carga de los nanomateriales se determinó a partir de la diferencia entre las concentraciones inicial y final de DOX en la solución tras el tiempo de contacto, ajustando el medio líquido con TEA para llevar a DOX a la especiación con la menor solubilidad en agua, de aproximadamente  $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$  [110], lo que dio como resultado los valores presentados en la Tabla 6. Se observa que todos los nanoconjugados son capaces de encapsular el fármaco de interés. En el caso de los sistemas DOX@PAMAM y DOX@PAMAM-Ce6 se logra una eficiencia de alrededor del 100% y una LC  $\sim 440 \text{ mg g}^{-1}$ , alcanzando estequiometrías de encapsulación de 12 y 14 moléculas de DOX por mol de PAMAM y PAMAM-Ce6, respectivamente. Estos resultados se sitúan en el rango superior de lo reportado para PAMAM de cuarta y quinta generación cargados con DOX, donde la encapsulación se atribuye principalmente al confinamiento del fármaco en cavidades internas relativamente hidrofóbicas y a interacciones no covalentes, tales como fuerzas de dispersión, interacciones  $\pi$ - $\pi$  y puentes de hidrógeno, más que a una complejación electrostática directa con el polímero [126]. En línea con este resultado, se observa que la incorporación del fotosensibilizador en la superficie de PAMAM no afecta de manera significativa su capacidad de carga, lo que sugiere que la encapsulación se manifiesta principalmente a nivel de la estructura interna del polímero.

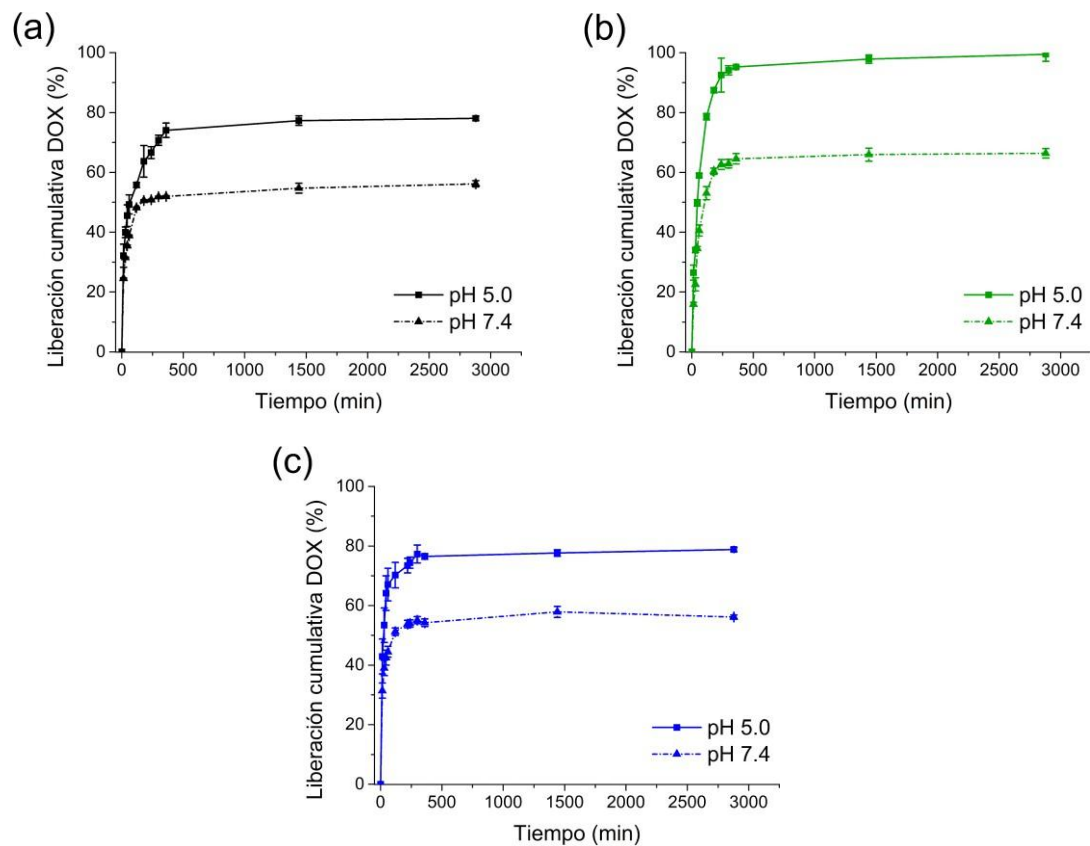
**Tabla 6.** Eficiencia y estequiometría de encapsulación de DOX para los nanoconjugados en base a PAMAM, y ajuste del modelo cinético matemático de Korsmeyer-Peppas de los datos de liberación del fármaco a diferentes pH.

Nanoconjugado	EE (%)	LC ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Estequiometría encapsulación  PAMAM:DOX	Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas					
				pH = 7.4			pH = 5.0		
				k ( $\text{min}^{-n}$ )	n	R <sup>2</sup>	k ( $\text{min}^{-n}$ )	n	R <sup>2</sup>
DOX@PAMAM	97.8	440	1:12	0.173	0.32	0.9976	0.179	0.31	0.9993
DOX@PAMAM-Ce6	99.3	437	1:14	0.056	0.51	0.9676	0.078	0.53	0.9978
DOX@PAMAM-Ce6-PFOL	59.0	263	1:10	0.031	0.63	0.9799	0.043	0.64	0.9897

En este sentido, diversos autores han descrito que la introducción de cromóforos aromáticos o macrociclos porfirínicos en dendrímeros PAMAM genera microdominios más hidrofóbicos y ricos en sistemas  $\pi$ , capaces de estabilizar fármacos aromáticos como la DOX mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  y fuerzas hidrofóbicas [127, 128]. En contraste, el sistema DOX@PAMAM-Ce6-FOL, que incorpora además 26 cadenas de PFOL por PAMAM, presentó una disminución significativa de EE (59 %) y LC (263 mg g<sup>-1</sup>) mostrando una estequiometría de encapsulación moderadamente menor que las formulaciones PAMAM@DOX y PAMAM-Ce6@DOX (Tabla 6). Esta reducción indica que la introducción de la cadena PFOL limita la penetración de DOX en el dendrímero durante el proceso de carga. Este efecto puede atribuirse a una combinación de impedimento estérico, aumento de la hidratación superficial y modificaciones en la conformación global del nanotransportador. Estudios recientes sobre PAMAM PEGilados han demostrado que, si bien la PEGilación mejora la estabilidad coloidal y la compatibilidad biológica, suele reducir la accesibilidad a las cavidades internas y, en consecuencia, la capacidad de carga de fármacos hidrofóbicos o anfifílicos [129, 130].

En la Figura 23 se observan los perfiles de liberación de las formulaciones a pH 7.4 y 5.0, respectivamente. El perfil de liberación indica una significativa dependencia del pH, ya que todas las formulaciones muestran una mayor liberación de DOX a pH = 5.0. En el caso de la formulación DOX@PAMAM, se observa un máximo de liberación del 59.1% a pH 7.4, que aumenta al 78.0% a

pH 5.0. En el caso de PAMAM-Ce6 se observa un comportamiento similar, alcanzando un máximo de liberación del 66.1% a pH 7.4, que aumenta al 99.4% a pH 5.0. La correlación entre los valores de potencial zeta de los nanoconjugados pone de manifiesto que la capacidad de liberación de DOX depende del equilibrio entre la densidad de carga positiva, la accesibilidad estructural y los efectos estéricos inducidos por los sustituyentes superficiales.



**Figura 23.** Porcentajes de liberación cumulativa del fármaco a partir de nanoconjugados basados en PAMAM cargados con DOX a pH 5.0 y 7.4. (a) DOX@PAMAM, (b) DOX@PAMAM-Ce6 y (c) DOX@PAMAM-Ce6-PFOL.

En particular, el aumento de la capacidad de liberación de DOX en PAMAM–Ce6, pese a la ligera disminución del potencial zeta respecto al PAMAM, se debe al equilibrio iónico de las interacciones fármaco-nanotransportador. La encapsulación de DOX se realizó en condiciones que favorecen la especiación de su forma neutra (de baja solubilidad) en el medio líquido (pH ~ 8.5), lo que incrementa la capacidad de encapsulación en los bolsillos de PAMAM–Ce6. Al momento de evaluar la liberación en PBS a pH 7.4, la especiación de DOX cambia de la forma neutra a la predominantemente catiónica, lo que genera que el fármaco manifieste una mayor afinidad por el medio acuoso migrando desde el bolsillo hidrofóbico a la zona externa. En línea con este comportamiento, se observa que a un pH 5.0 se libera una mayor cantidad de fármaco en comparación a pH 7.4; el descenso del pH desplaza el equilibrio iónico de DOX disminuyendo la concentración de especies neutras (hidrofóbicas) incrementando la contribución de especies catiónicas a pH = 5.0 favoreciendo la difusión de una mayor cantidad fármaco fuera de los bolsillos del nanotransportador.

En el caso de la formulación DOX@PAMAM–Ce6–PFOL se observa un comportamiento similar al de DOX@PAMAM llegando a valores de liberación similares en ambos pH evaluados. El desplazamiento del potencial zeta en PAMAM–Ce6–FOL indica un carácter menos catiónico desde la perspectiva electroestática, lo que conduce a sistemas que restringen la liberación de DOX debido a las cadenas de PFOL, las cuales retienen la difusión del fármaco durante el proceso de liberación.

La cinética del proceso se ajustó al modelo Korsmeyer-Peppas (Figura 23) donde los valores de  $k$  y  $n$  dependen de la naturaleza del nanoconjugado y del pH del medio en que se realiza el proceso de liberación, tal como se muestra en la Tabla 6. La formulación DOX@PAMAM mostró un perfil cinético donde la liberación del fármaco es muy rápida alcanzando valores de  $k$  y  $n$  similares a ambos pH manifestando un régimen del tipo Fickiano ( $n < 0.45$ ) donde la velocidad de liberación del fármaco es más lenta que la relajación de la cadena poliméricas de PAMAM, estando el proceso controlado primordialmente por la difusión de la DOX a través de la matriz hinchada [131]. Esta información confirma que el sistema PAMAM nativo propicia liberaciones del fármaco dominadas por interacciones electroestáticas repulsivas, lo que limita su liberación controlada [110]. En el caso de la formulación DOX@PAMAM-Ce6 se observa un comportamiento cinético diferente, en el que los valores de  $k$  disminuyen a  $0.056 \text{ min}^{-0.51}$  a pH = 7.4 y a  $0.078 \text{ min}^{-0.53}$  a pH = 5.0, respectivamente. Esta información confirma que la cinética del proceso se ajusta a un régimen no Fickiano, donde el fármaco se libera bajo una combinación de difusión y relajación (hinchamiento) de la matriz polimérica. En este caso, la incorporación del FS en la superficie externa de PAMAM limita la libertad conformacional del polímero en medio acuoso [131], lo que modifica el proceso de liberación de DOX en comparación con el observado en la formulación DOX@PAMAM. Finalmente, en el caso del sistema PAMAM-Ce6-PFOL@DOX se observa un comportamiento similar al observado en el caso de DOX@PAMAM-Ce6 donde se detectan valores de  $k = 0.031$

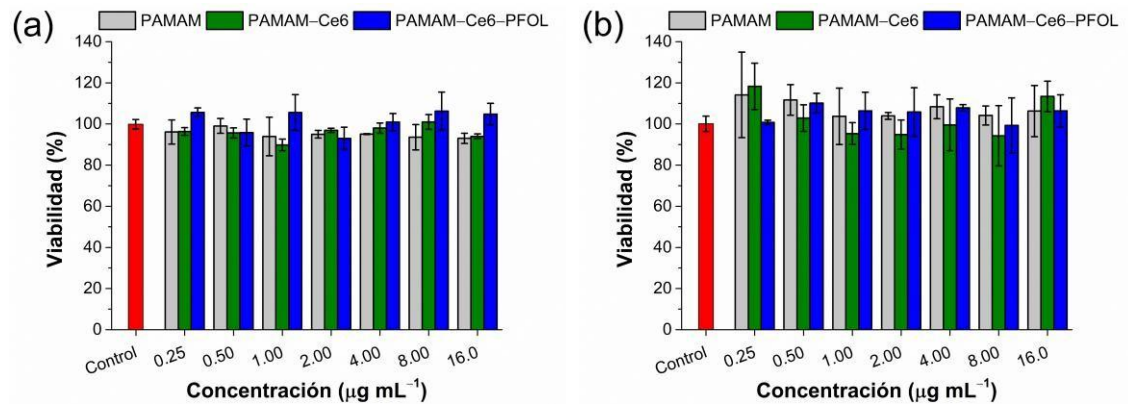
$\text{min}^{-0.63}$  a  $\text{pH} = 7.4$  y  $k = 0.043 \text{ min}^{-0.64}$  a  $\text{pH} = 5.0$ , respectivamente. De acuerdo con estos resultados, el fenómeno de liberación se describe mediante una difusión no Fickiana, similar a la observada en la liberación del sistema DOX@PAMAM-Ce6. La incorporación de las cadenas de PFOL modifica significativamente la configuración final del polímero y altera la dinámica de relajación (hinchamiento) de la matriz polimérica, lo que propicia una difusión del fármaco tortuosa durante el proceso de liberación.

En conjunto, el análisis integrado de EE, LC y cinéticas de liberación demuestra que la carga de DOX en nanoconjugados basados en PAMAM es altamente sensible al grado de funcionalización superficial y al estado de protonación global del dendrímero. Esta relación constituye la base fisicoquímica para interpretar, en los apartados siguientes, la interacción de estos nanotransportadores con componentes biológicos.

## **5.2.6. Ensayos de viabilidad celular en líneas de HeLa y MCF-7**

### **5.2.6.1. Viabilidad intrínseca (oscuridad)**

Para evaluar la citotoxicidad de los materiales en oscuridad, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando cultivos de células HeLa y MCF-7 incubados con disoluciones de los nanomateriales preparados en condiciones fisiológicas a concentraciones crecientes ( $0.25 - 16.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en oscuridad, tal como se muestra en la Figura 24.

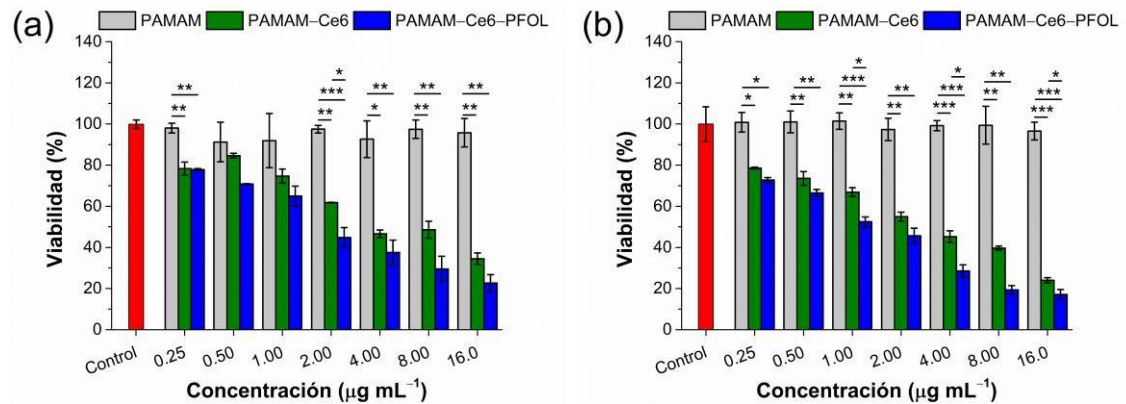


**Figura 24.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar la citotoxicidad intrínseca. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns no significativo;  $n = 3$ ).

Los resultados, para ambas líneas estudiadas, evidenciaron valores de viabilidad celular sin diferencias significativas respecto del control negativo en todo el rango de concentraciones evaluado. Este comportamiento sugiere una baja citotoxicidad intrínseca de los nanoconjugados en condiciones de oscuridad. Aunque los dendrímeros PAMAM pueden presentar citotoxicidad dependiente de la generación y la concentración, en las condiciones evaluadas no se evidenció un efecto significativo, lo cual se ha atribuido a interacciones electrostáticas limitadas con la membrana celular a bajas concentraciones [132].

### **5.2.6.2. Viabilidad bajo irradiación de luz LED (fototoxicidad)**

El potencial fotodinámico de los nanoconjugados en base a PAMAM se evaluó a partir de experimentos de irradiación con luz LED a  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  de cultivos de células HeLa y MCF-7 como se muestra en la Figura 25. El sistema PAMAM nativo mantiene una viabilidad celular superior al 80% en todo el rango de concentraciones evaluadas, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en el ensayo de producción de ROS y confirma la ausencia de actividad fotodinámica bajo las condiciones experimentales empleadas. En contraste, los sistemas PAMAM-Ce6 y PAMAM-Ce6-PFOL muestran una respuesta fotodinámica dependiente de la concentración, con diferencias estadísticamente significativas entre ambos nanoconjugados en todo el rango de concentraciones evaluado ( $0.25\text{--}16.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en ambas líneas celulares. La respuesta fototóxica observada se atribuye a la activación fotoquímica del Ce6 bajo irradiación con luz LED, lo que promueve su transición al estado excitado y la subsecuente generación de ROS, que podrían inducir daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. No obstante, la fototoxicidad varía según el nanoconjugado, pues se observa un mayor efecto sobre la viabilidad celular en el sistema PAMAM-Ce6-PFOL en ambas líneas celulares.



**Figura 25.** Experimentos de viabilidad celular de líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar fototoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min, 150 mW cm<sup>-2</sup>) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 y ns, no significativo; n = 3).

Con el fin de comparar los sistemas, se ha determinado el IC<sub>50</sub> de los nanoconjugados, como se muestra en la Tabla 7. El fotosensibilizador Ce6 libre presenta valores de IC<sub>50</sub> similares en las líneas celulares HeLa y MCF-7, lo que sugiere la ausencia de una respuesta fotodinámica preferencial entre ambas líneas bajo las condiciones experimentales evaluadas. Al analizar los valores de IC<sub>50</sub> función de la cantidad normalizada de Ce6 presente en los sistemas, se evidencia una disminución significativa de este parámetro para ambos nanoconjugados para ambas líneas celulares en comparación con el FS libre,

indicando una mayor eficiencia intrínseca del fotosensibilizador tras su conjugación al dendrímero PAMAM. Este comportamiento sugiere que la conjugación de Ce6 al dendrímero no solo mejora su dispersión en medio fisiológico, evitando procesos de agregación y autoextinción, sino que también favorece su interacción con las células, posiblemente mediante mecanismos de internalización endocítica que incrementan su acumulación intracelular y, en consecuencia, su actividad fotodinámica.

Resultados similares han sido reportados en sistemas dendriméricos funcionalizados con fotosensibilizadores, donde la conjugación a macromoléculas como PAMAM mejora la estabilidad coloidal y la biodisponibilidad celular del fotosensibilizador, incrementando su eficacia fotodinámica a pesar de aparentes incrementos en el  $IC_{50}$  cuando se expresa en función de la masa total del sistema [133, 134].

Por otra parte, el sistema PAMAM–Ce6–PFOL presenta un efecto fototóxico superior en comparación con PAMAM–Ce6 y Ce6 libre en ambas líneas celulares, lo cual se evidencia mediante valores de  $IC_{50}$  significativamente menores. Este resultado puede atribuirse a la presencia de ácido fólico como agente vectorizador, que podría favorecer la internalización celular mediada por el receptor de folato (FOLR), lo que incrementaría la acumulación intracelular del nanoconjugado y potenciaría la generación de especies reactivas de oxígeno tras la irradiación.

**Tabla 7.** Valores  $IC_{50}$  calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  de cada nanoconjugado en líneas celulares HeLa y MCF-7.

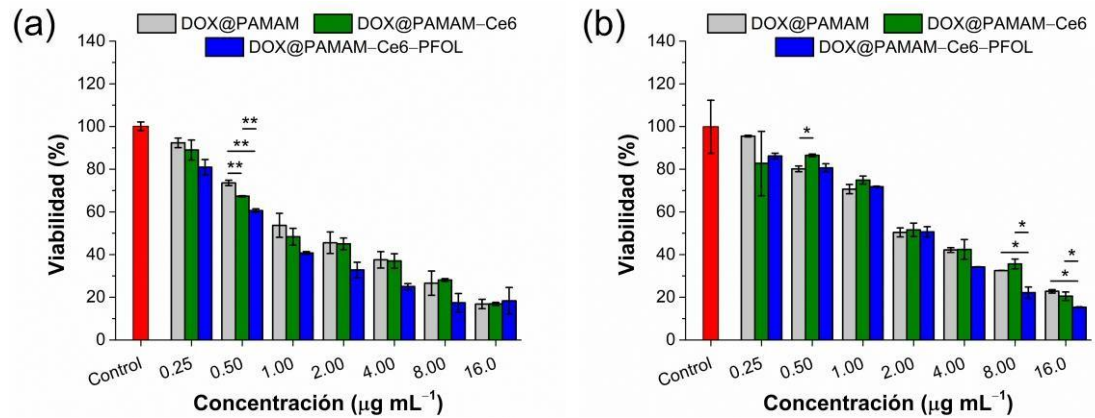
Muestra	HeLa		MCF-7	
	$IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$R^2$	$IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$R^2$
Ce6 libre	$1.10 \pm 0.40$	0.9934	$1.05 \pm 0.16$	0.9926
PAMAM	> 16	---	> 16	---
PAMAM-Ce6	$2.95 \pm 0.56$	0.9273	$2.55 \pm 0.15$	0.9757
	( $0.44 \pm 0.08$ )		( $0.38 \pm 0.02$ )	
PAMAM-Ce6-PFOL	$2.36 \pm 0.15$	0.9867	$1.87 \pm 0.15$	0.9841
	( $0.14 \pm 0.01$ )		( $0.11 \pm 0.01$ )	

Entre paréntesis, el valor de  $IC_{50}$  normalizado por cantidad de Ce6 ( $\mu\text{g}_{\text{Ce6}} \text{ mL}^{-1}$ ) en los nanomateriales fotosensibilizados.

Finalmente, la similitud en los valores de  $IC_{50}$  entre las líneas HeLa y MCF-7 para los sistemas evaluados sugiere que, aunque la vectorización con ácido fólico mejora la eficiencia global del tratamiento, la respuesta fotodinámica no presenta una marcada selectividad entre ambas líneas bajo las condiciones experimentales utilizadas.

### **5.2.6.3. Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores (quimiotoxicidad)**

La capacidad de los nanoconjugados basados en PAMAM para ser empleados en CT se evaluó mediante ensayos de viabilidad en células HeLa y MCF-7 para las formulaciones DOX@PAMAM, DOX@PAMAM-Ce6 y DOX@PAMAM-Ce6-PFOL. Los porcentajes de viabilidad basados en MTT en los sistemas incubados y de control de supervivencia se resumen en la Figura 26. Los nanoconjugados en base a PAMAM incubados en células HeLa mostraron viabilidades celulares inferiores al 80% a concentraciones  $> 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 26a). La formulación DOX@PAMAM-Ce6-PFOL redujo la viabilidad de las células HeLa al 28% a  $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  después de 24 h, mientras que tanto las formulaciones DOX@PAMAM como DOX@PAMAM-Ce6 mostraron viabilidades de ~40% a la misma concentración. Para comparar, el efecto quimioterapéutico de DOX en células HeLa, se determinaron los valores de  $\text{IC}_{50}$  para las formulaciones a 24 h mediante el ensayo MTT tal como se resume en la Tabla 8. Para todas las formulaciones evaluadas, el valor de  $\text{IC}_{50}$  fue significativamente menor que para DOX libre, demostrando que la encapsulación en PAMAM mejora de forma importante el efecto quimiotóxico en ambas líneas celulares.



**Figura 26.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con los nanotransportadores basados en PAMAM para evaluar la quimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en la oscuridad, seguido de un lavado y de una segunda incubación en oscuridad hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con la prueba de Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ns no significativo; n = 3).

Lo anterior sugiere que la cantidad transportada y liberada por las formulaciones estudiadas es suficiente para ejercer un efecto quimiotóxico significativo en las condiciones evaluadas. De ellas, la efectividad en HeLa fue de aproximadamente 8 veces superior para DOX@PAMAM y DOX@PAMAM-Ce6 en comparación con DOX libre, mientras que en el caso de MCF-7 el efecto se encuentra entre 8 – 13 veces superior para los mismos sistemas en base a DOX libre.

**Tabla 8.** Valores  $IC_{50}$  calculado a partir de los datos de citotoxicidad de las formulaciones de DOX encapsulada en cada nanoconjugado basado en PAMAM en líneas celulares HeLa y MCF-7.

Muestra	HeLa		MCF-7	
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$R^2$
DOX libre	$4.43 \pm 0.89$	0.9158	$9.04 \pm 0.70$	0.9781
DOX@PAMAM	$1.32 \pm 0.19$ ( $0.58 \pm 0.08$ )	0.9582	$1.59 \pm 0.15$ ( $0.70 \pm 0.07$ )	0.9827
DOX@PAMAM-Ce6	$1.23 \pm 0.23$ ( $0.54 \pm 0.10$ )	0.9316	$2.72 \pm 0.40$ ( $1.19 \pm 0.17$ )	0.9568
DOX@PAMAM-Ce6-PFOL	$0.98 \pm 0.08$ ( $0.26 \pm 0.02$ )	0.9735	$2.51 \pm 0.07$ ( $0.66 \pm 0.02$ )	0.9974

Entre paréntesis, el valor de  $IC_{50}$  normalizado por cantidad de DOX encapsulada ( $\mu\text{g}_{\text{DOX}} \text{mL}^{-1}$ ).

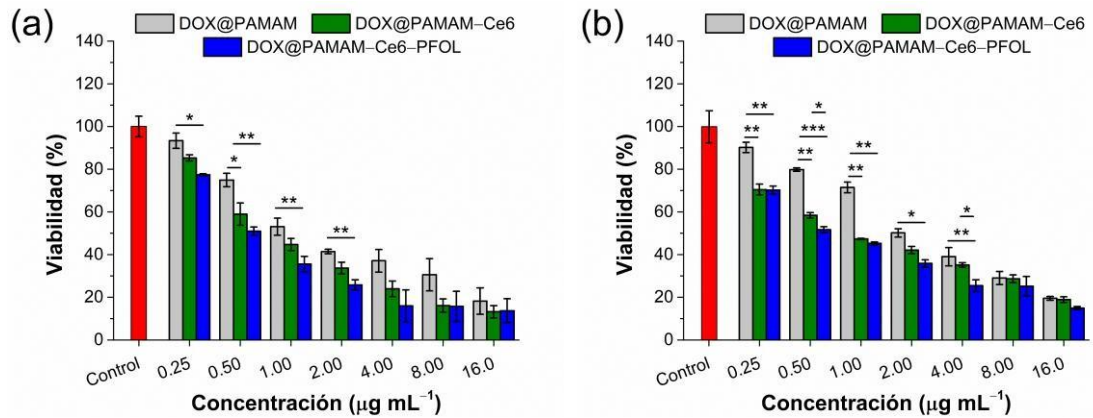
Estos resultados permiten proponer que la encapsulación de DOX en PAMAM favorece la respuesta citotóxica, medida por la elevada afinidad de estos materiales por las células diana, lo que promueve la acción terapéutica del fármaco, probablemente debido a su efectiva internalización en HeLa y MCF-7.

Esto podría estar relacionado con el mecanismo de acción principal de la DOX, que requiere internalización, transporte nuclear e intercalación en el ADN para ejercer su efecto citotóxico, inhibiendo la topoisomerasa II y desencadenando daño genotóxico progresivo [135, 136]. A diferencia de agentes citotóxicos de acción membranal, la DOX presenta una cinética de acción más lenta, lo que explica que, en tiempos de incubación relativamente cortos, el efecto sobre la viabilidad no sea abrupto sino gradual. Por otra parte, este comportamiento bifásico caracterizado por una reducción moderada de la viabilidad seguida de una fase en que no se observa influencia a concentraciones superiores es también consistente con el comportamiento reportado para la DOX [137, 138]

En el caso de la formulación DOX@PAMAM-Ce6-PFOL se lograron  $IC_{50}$  normalizados por cantidad de DOX que son 21 y 16 veces inferiores comparado al de DOX libre para las líneas HeLa y MCF-7, respectivamente. Este incremento en la respuesta citotóxica sugiere un efecto significativo de la modificación con PFOL en los sistemas PAMAM, lo que sugiere una mayor bioacumulación del nanoconjugado incrementando su acción citotóxica de manera análoga a lo discutido en el apartado anterior. No obstante, es importante mencionar que la formulación DOX@PAMAM-Ce6-FOL, comparada con DOX@PAMAM, muestra una disminución a la mitad del  $IC_{50}$  para la línea HeLa, mientras que para la línea MCF-7 el valor de  $IC_{50}$  no muestra una variación significativa ( $\sim 0.70 \mu g_{DOX} mL^{-1}$ ). Esto confirma que la línea MCF-7 presenta una menor respuesta a la vectorización con FOL en comparación con la línea HeLa.

#### **5.2.6.4. Viabilidad de las formulaciones DOX encapsulada en los nanotransportadores bajo irradiación de luz LED (fotoquimiotoxicidad)**

De acuerdo con el potencial de los nanoconjugados en PDT y CT, se llevaron a cabo los estudios de PCT con células HeLa y MCF-7 utilizando los sistemas DOX@PAMAM, DOX@PAMAM-Ce6 y DOX@PAMAM-Ce6-PFOL a concentraciones de 0.25 - 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tal como se muestra en la Figura 27. La formulación DOX@PAMAM muestra un perfil similar, en ambas líneas, al observado con la CT, lo que demuestra que el sistema no presenta potencial fotodinámico en las condiciones empleadas cuando se utiliza como agente fotodinámico. Sin embargo, se observaron diferencias significativas (viabilidad celular inferior al 80%) a partir de concentraciones  $> 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  en los sistemas fotosensibilizados. Estos hallazgos demuestran que, a bajas concentraciones, la PCT muestra una respuesta importante en su acción citotóxica, como complemento de la acción de DOX y de la producción de ROS por parte de Ce6. El sistema DOX@PAMAM-Ce6-PFOL presenta los valores de viabilidad más bajos en todo el rango de concentraciones evaluado, con diferencias significativas respecto de DOX@PAMAM y DOX@PAMAM-Ce6.



**Figura 27.** Experimentos de viabilidad celular de las líneas (a) HeLa y (b) MCF-7 incubadas con las formulaciones basadas en PAMAM para evaluar la fotoquimiotoxicidad. Tratamiento durante 12 h en oscuridad, seguido de un lavado y de una irradiación con luz LED (15 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) y una segunda incubación hasta completar 24 h de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y ns, no significativo;  $n = 3$ ).

Nuestros resultados demuestran que la conjugación covalente del fotosensibilizador a la superficie del dendrímero confiere propiedades fotodinámicas bajo irradiación con luz LED, manteniendo, a su vez, su capacidad de carga y liberación de DOX. Estos hallazgos son consistentes con estudios anteriores que reportan el desarrollo de nanotransportadores basados en PAMAM y Rosa Bengala para lograr sistemas de terapia combinada mediante el uso de DOX como agente quimioterapéutico [139].

**Tabla 9.** Valores IC<sub>50</sub> y CI calculado a partir de los datos de citotoxicidad bajo irradiación lumínica de luz LED 150 mW cm<sup>-2</sup> de cada formulación de DOX encapsulada en los nanoconjugados en base a PAMAM en líneas celulares HeLa y MCF-7.

Muestra	HeLa			MCF-7		
	IC <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	CI	IC <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	CI
DOX@PAMAM	1.22 ± 0.26	0.9155	---	2.04 ± 0.18	0.9859	---
DOX@PAMAM-Ce6	0.92 ± 0.10	0.9746	1.01	1.39 ± 0.26	0.9507	1.04
DOX@PAMAM-Ce6-PFOL	0.56 ± 0.06	0.9829	0.86	0.96 ± 0.22	0.9509	0.89

El grado de sinergia del tratamiento se midió mediante el índice de combinación (CI). Los valores estimados del CI  $\sim 1.0$  para PAMAM–Ce6 en ambas líneas evaluadas. Este resultado evidencia un efecto aditivo en la formulación PAMAM–Ce6. Sin embargo, en el caso de PAMAM–Ce6–PFOL se observa un CI  $< 1$  en ambas líneas celulares, lo que demuestra que genera efectos sinérgicos en PCT superiores a los observados con PDT y CT por separado. Los resultados de las monoterapias y la terapia dual sugieren que la incorporación de PFOL como agente vectorizador aumenta la respuesta citotóxica gracias a la acumulación del nanotransportador en las células diana, promoviendo la producción de ROS bajo irradiación de luz LED-visible, así como la liberación controlada. De ellas, la línea HeLa demuestra un mayor efecto citotóxico de PCT con un IC<sub>50</sub> de  $0.56 \pm 0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con MCF–7 que llega a  $0.96 \pm 0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Lo anterior sugiere que la naturaleza de las líneas celulares limita la actividad citotóxica de la terapia dual empleada. En efecto, al igual que la tendencia observada en el caso de los nanotransportadores en base a HNT, la línea HeLa sobreexpresa de forma importante el receptor de folato en comparación con la línea MCF–7, lo que podría estar limitando su acción en el direccionamiento permitiendo que la asociación, bioacumulación y/o internalización del material en su acción citotóxica. De acuerdo con los criterios de clasificación ISO 10993-5 [63], el nanotransportador PAMAM–Ce6–PFOL es efectivo ( $< 40\%$  de viabilidad) a concentraciones  $> 1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  en las condiciones evaluadas, lo que respalda su uso en PCT contra el cáncer cervicouterino y de mama.

## 6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanomateriales en base a HNT y PAMAM fotosensibilizados con Ce6 y vectorizados PFOL para ser empleados como materiales dirigidos en fotoquimioterapia mediada por luz LED visible. Mediante técnicas de caracterización fisicoquímica se determinó la inmovilización covalente de los componentes en ambos nanomateriales y el cambio en las propiedades ópticas atribuible a la incorporación de Ce6 en superficie. Los sistemas fotosensibilizados mostraron la capacidad de generar ROS, al ser irradiados con luz LED visible a una irradiancia de  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ , lo que demuestra su capacidad de inducir el efecto fotodinámico. Los sistemas modificados con Ce6 y PFOL mostraron nula actividad hemolítica y capacidad para actuar como nanovehículos para el transporte y la liberación de DOX, como modelo de fármaco quimioterapéutico, mediante la adsorción en los núcleos de HNT y de PAMAM. Los perfiles de liberación de fármaco mostraron cinéticas que se ajustaron a un modelo de tipo Korsmeyer-Peppas, alcanzando su máximo de liberación a  $\text{pH} = 5.0$ , que emula el medio tumoral, lo que sugiere que los nanomateriales deberían manifestar una mayor acción quimiotóxica en el sitio diana.

Los sistemas no mostraron ser citotóxicos cuando se evaluó su viabilidad celular en oscuridad (intrínseca), mientras que bajo irradiación con luz LED visible a  $150 \text{ mW cm}^{-2}$  mostraron fototoxicidad en las líneas celulares HeLa y MCF-7, siendo más acentuado el efecto en los sistemas a base de PAMAM. Finalmente, la

actividad fotoquimioterapéutica mostró un efecto importante en la disminución de la viabilidad celular de las líneas HeLa y MCF-7, lo que permite confirmar que los materiales en base a HNT y PAMAM conjugados con Ce6 como fotosensibilizador y PFOL como agente vectorizador son nanoplataformas que ejercen efectos sinérgicos en terapia combinada y poseen un elevado potencial para ser empleado como un nanovehículo para el transporte de fármacos quimioterapéuticos, ejercer acción fotodinámica cuando se irradia con luz LED visible y bioacumulación en células que sobreexpresen el receptor de ácido fólico.

De ellos, HNT muestra el mayor potencial de uso en biomedicina para el tratamiento del cáncer cervicouterino, pues logra alcanzar efectos importantes en un modelo in vitro y, al ser un nanomaterial naturalmente abundante, se perfila como un sistema más económico que el uso de materiales sintéticos como PAMAM u otros que requieren síntesis o fabricación adicionales.

Estos resultados permiten proyectar e investigar los sistemas basados en HNT en torno a las rutas de bioacumulación del material en las células HeLa mediante estudios de internalización celular, empleando técnicas como la microscopía confocal y la citometría de flujo, con el fin de conocer las rutas de acción del sistema vectorizado y fotosensibilizado. Además, el nanomaterial HNT se proyecta como un potencial nanotransportador de fármacos para la quimioterapia combinada, pues podría incrementarse la acción quimiotóxica mediante la administración dual de fármacos u otro agente terapéutico, aprovechando la

diferencia entre las superficies interna y externa del nanomaterial. Por otro lado, sería interesante evaluar estos sistemas con otros modelos celulares que sobreexpresen el receptor de ácido fólico, a fin de ampliar estas plataformas para el tratamiento de otros tipos de cáncer.

## 7. PRODUCTIVIDAD

### 7.1. Artículos científicos

1. PAMAM-Chlorin e6 Conjugate as a Dual Photodynamic Agent against Cancer Cells and Bacteria. Journal of Drug Delivery and Technology. Enviado. **Rosa I. Meneau-Hernández**, Carlos Reyes-Escobar, Karla Juárez-Moreno, Tatiana M. Bustamante, Verónica A. Jiménez, Cristian H. Campos\* and Joel B. Alderete\*
2. Visible-Light-Triggered Halloysite Nanotubes Modified with Chlorin e6 and Polyethylene Glycol–Folic Acid for Site-Specific Chemo–Photodynamic Therapy. Journal of Drug Delivery and Technology. Aceptado. **Rosa I. Meneau-Hernández**, Carlos Reyes-Escobar, Joaquín Manzo-Merino, Leonardo Guzmán, Karla Juárez-Moreno, Tatiana M. Bustamante, Joel B. Alderete\* y Cristian H. Campos\*

## 7.2. Participación en eventos

- XIII Jornadas Chilenas de Catálisis y Adsorción Termas de Quinamavida, Linares-Chile 19 al 21 de noviembre de 2025. Halosita fotosensibilizada con Clorin e6 como potencial nanotransportador fotodinámico bajo luz LED para el tratamiento del cáncer. **Rosa I. Meneau-Hernández**, Clara I. Villalba-Yepez, Joaquín Manzo-Merino, Tatiana M. Bustamante, Joel Alderete Triviño, Cristian H. Campos
- 33rd International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 17<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup>, 2025. Photosensitized PAMAM-G4 dendrimers with chlorin e6 as a potential photodynamic nanodevice under LED-light for cancer treatment. **Rosa I. Meneau-Hernández**, Karla Oyuky Juárez-Moreno, Tatiana Bustamante, Cristian Campos, Joel Alderete
- 32nd International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 18<sup>th</sup> to 23<sup>rd</sup>, 2024. Vectorized halloysite nanotubes with PEG-folic acid as a drug delivery carrier for doxorubicin. **Rosa I. Meneau-Hernández**, Joaquín Manzo-Merino, Joel Alderete, Cristian Campos
- XII Jornadas Chilenas de Catálisis y Adsorción Termas de Quinamavida, Linares-Chile 15 al 17 de noviembre 2023. Fotosensibilización de nanotubos de halosita y su aplicación potencial como adsorbente fotoactivo. Keila Barrera, Estefanía Vélez, **Rosa I. Meneau-Hernández**, Joel B. Alderete y Cristian H. Campos

## 8. BIBLIOGRAFÍA

[1] J.S. Brown, S.R. Amend, R.H. Austin, R.A. Gatenby, E.U. Hammarlund, K.J. Pienta, Updating the Definition of Cancer, *Molecular Cancer Research*, 21 (2023) 1142-1147.

[2] A.S. Alzahrani, M.J. Price, S.M. Greenfield, V. Paudyal, Global prevalence and types of complementary and alternative medicines use amongst adults with diabetes: systematic review and meta-analysis, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 77 (2021) 1259-1274.

[3] A look back at 2025, *Nature Cancer*, 6 (2025) 1901-1901.

[4] E. Dickens, S. Ahmed, Principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery (Oxford)*, 39 (2021) 215-220.

[5] S. Duan, Y. Hu, Y. Zhao, K. Tang, Z. Zhang, Z. Liu, Y. Wang, H. Guo, Y. Miao, H. Du, D. Yang, S. Li, J. Zhang, Nanomaterials for photothermal cancer therapy, *RSC Advances*, 13 (2023) 14443-14460.

[6] X. Zhang, S. Wang, G. Cheng, P. Yu, J. Chang, Light-Responsive Nanomaterials for Cancer Therapy, *Engineering*, 13 (2022) 18-30.

[7] U. Chilakamarthi, L. Giribabu, Photodynamic Therapy: Past, Present and Future, *Chemical Record*, 17 (2017) 775-802.

[8] I.O. Bacellar, T.M. Tsubone, C. Pavani, M.S. Baptista, Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (2015) 20523-20559.

[9] D. van Straten, V. Mashayekhi, H.S. de Bruijn, S. Oliveira, D.J. Robinson, Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions, *Cancers*, 9 (2017) 19.

[10] A. Hak, M.S. Ali, S.A. Sankaranarayanan, V.R. Shinde, A.K. Rengan, Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine, *ACS Applied Bio Materials*, 6 (2023) 349-364.

[11] B. Wang, S. Hu, Y. Teng, J. Chen, H. Wang, Y. Xu, K. Wang, J. Xu, Y. Cheng, X. Gao, Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9 (2024) 200.

[12] D. Yadav, R. Malviya, Novel nanomaterials as photo-activated cancer diagnostics and therapy, *Medicine Advances*, 1 (2023) 190-209.

- [13] J. Yi, L. Liu, W. Gao, J. Zeng, Y. Chen, E. Pang, M. Lan, C. Yu, Advances and perspectives in phototherapy-based combination therapy for cancer treatment, *Journal of Materials Chemistry B*, 12 (2024) 6285-6304.
- [14] B. Wang, Y. Li, H. Chen, Q. Pan, J. Sun, X. Zhang, W. Wang, Carbohydrate polymer nanoplateforms enable multimodal cancer therapy via targeted photothermal, photodynamic, chemotherapy, gene, and immunotherapy synergies, *Industrial Crops and Products*, 234 (2025) 121572.
- [15] M. Eftekharifar, R. Heidari, N. Mohaghegh, A.H. Najafabadi, H. Heidari, Advances in photoactivated carbon-based nanostructured materials for targeted cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 222 (2025) 115604.
- [16] P. Pashootan, F. Saadati, H. Fahimi, M. Rahmati, R. Strippoli, A. Zarrabi, M. Cordani, M.A. Moosavi, Metal-based nanoparticles in cancer therapy: Exploring photodynamic therapy and its interplay with regulated cell death pathways, *International Journal of Pharmaceutics*, 649 (2024) 123622.
- [17] J. Sidhic, M.K. Aswathi, A. Prasad, A. Tom, P. Mohan, P. Sarbadhikary, A. Narayanankutty, S. George, H. Abrahamse, B.P. George, Advancements in metal and metal oxide nanoparticles for targeted cancer therapy and imaging: Mechanisms, applications, and safety concerns, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105 (2025) 106622.
- [18] Z.-X. Wang, S.-Y. Wang, Z. Wang, Y. Liu, F.-G. Wu, Smart photo-enabled micelles for cancer therapy: Mechanisms, challenges, and innovations, *Journal of Controlled Release*, 390 (2026) 114474.
- [19] Z. Jiang, S. Sun, J. Liu, X. Sun, Recent Advances of Halloysite Nanotubes in Biomedical Applications, *Small*, 20 (2024) e2306169.
- [20] Y. Li, X. Yuan, L. Jiang, H. Dai, Y. Zhao, X. Guan, J. Bai, H. Wang, Manipulation of the halloysite clay nanotube lumen for environmental remediation: a review, *Environmental Science: Nano*, 9 (2022) 841-866.
- [21] M. Massaro, R. Noto, S. Riela, Past, Present and Future Perspectives on Halloysite Clay Minerals, *Molecules*, 25 (2020) 4863.
- [22] J. Jin, S. Assemi, H. Asgar, G. Gadikota, T. Tran, W. Nguyen, J.D. McLennan, J.D. Miller, Characterization of Natural Consolidated Halloysite Nanotube Structures, *Minerals*, 11 (2021).
- [23] T. Liu, J. Zhang, P. Ouyang, L. Fu, H. Yang, The relation between nanotube diameter, length and surface area and pore volume of multi-walled spiral

halloysite nanotubes: A theoretical study, *Applied Clay Science*, 215 (2021) 106303.

[24] M.M. Calvino, L. Lisuzzo, G. Cavallaro, G. Lazzara, R.P. Yadav, K. Dolgan, Y.M. Lvov, The Emerging Role of Halloysite Clay Nanotube Formulations in Cosmetics and Topical Drug Delivery, *ACS Applied Bio Materials*, 8 (2025) 2674-2690.

[25] O.Y. Golubeva, Y.A. Alikina, E.Y. Brazovskaya, N.M. Vasilenko, Hemolytic Activity and Cytotoxicity of Synthetic Nanoclays with Montmorillonite Structure for Medical Applications, *Nanomaterials*, 13 (2023).

[26] Y.-P. Wu, J. Yang, H.-Y. Gao, Y. Shen, L. Jiang, C. Zhou, Y.-F. Li, R.-R. He, M. Liu, Folate-Conjugated Halloysite Nanotubes, an Efficient Drug Carrier, Deliver Doxorubicin for Targeted Therapy of Breast Cancer, *ACS Applied Nano Materials*, 1 (2018) 595-608.

[27] M. Massaro, S. Riela, C. Baiamonte, J.L.J. Blanco, C. Giordano, P. Lo Meo, S. Milioto, R. Noto, F. Parisi, G. Pizzolanti, G. Lazzara, Dual drug-loaded halloysite hybrid-based glycocluster for sustained release of hydrophobic molecules, *RSC Advances*, 6 (2016) 87935-87944.

[28] R. Taheri-Ledari, M.R. Ahghari, F. Ansari, M. Forouzandeh-Malati, S.S. Mirmohammadi, S. Zarei-Shokat, S. Ramezanpour, W. Zhang, Y. Tian, A. Maleki, Synergies in antimicrobial treatment by a levofloxacin-loaded halloysite and gold nanoparticles with a conjugation to a cell-penetrating peptide, *Nanoscale Advances*, 4 (2022) 4418-4433.

[29] E. Gianni, M. Pospíšil, E. Scholtzová, Halloysite as a carrier/sorbent of diclofenac: A molecular simulations study, *Surfaces and Interfaces*, 70 (2025).

[30] E. Nyankson, D. Awuzah, E.K. Tiburu, J.K. Efavi, B. Agyei-Tuffour, L. Paemka, Curcumin loaded Ag–TiO<sub>2</sub>-halloysite nanotubes platform for combined chemo-photodynamic therapy treatment of cancer cells, *RSC Advances*, 12 (2022) 33108-33123.

[31] I. Adams, O. Adi-Dako, R. Appiah-Opong, E. Ofori-Attah, A. Aning, E.K. Ofori, E. Nyankson, S.K. Amponsah, In Vitro Anticancer Activities of Curcumin-Loaded Copper Oxide–Halloysite Nanotubes Composite, *Journal of Nanotechnology*, 2025 (2025) 7535486.

[32] H. Hamza, V. Schifano, G. Colciago, M.A. Ortenzi, A.M. Ferretti, G. Di Carlo, M.V. Dozzi, R. Vago, F. Tessore, D. Maggioni, Halloysite nanotubes as a vector for hydrophobic perfluorinated porphyrin-based photosensitizers for singlet oxygen generation, *Nanoscale*, 17 (2025) 18935-18947.

- [33] M. Massaro, F. Leone, A. Nicosia, G. Lazzara, G. Cavallaro, G.M.L. Messina, C. Viseras, R. Sánchez-Espejo, M. Notarbartolo, R. Puglisi, P.G. Mineo, R. de Melo Barbosa, S. Riela, Protoporphyrin-grafted halloysite nanotubes for boosted photodynamic activity in chitosan nanocomposite films, *Applied Clay Science*, 276 (2025) 107942.
- [34] L.-Y. Li, Y.-M. Zhou, R.-Y. Gao, X.-C. Liu, H.-H. Du, J.-L. Zhang, X.-C. Ai, J.-P. Zhang, L.-M. Fu, L.H. Skibsted, Naturally occurring nanotube with surface modification as biocompatible, target-specific nanocarrier for cancer phototherapy, *Biomaterials*, 190-191 (2019) 86-96.
- [35] S. Alamos-Musre, D. Beltran-Chacana, J. Moyano, V. Marquez-Miranda, Y. Duarte, S. Miranda-Rojas, Y. Olguin, J.A. Fuentes, D. Gonzalez-Nilo, M.C. Otero, From Structure to Function: The Promise of PAMAM Dendrimers in Biomedical Applications, *Pharmaceutics*, 17 (2025).
- [36] S.F. Kokaz, P.K. Deb, P. Borah, R. Bania, K.N. Venugopala, A.B. Nair, V. Singh, N.A. Al-Shar'i, W. Hourani, G. Gupta, R.K. Tekade, Dendrimers: Properties and Applications in Biomedical Field, *Nanoengineering of Biomaterials 2022*, pp. 215-243.
- [37] R.Y. Patle, J.S. Meshram, The advanced synthetic modifications and applications of multifunctional PAMAM dendritic composites, *Reaction Chemistry & Engineering*, 7 (2022) 9-40.
- [38] S.A. Torres-Pérez, L. Vallejo-Castillo, S. Vázquez-Leyva, L.G. Zepeda-Vallejo, J.E. Herbert-Pucheta, C. Severac, E. Dague, S.M. Pérez-Tapia, E. Ramón-Gallegos, Structural and physicochemical characteristics of one-step PAMAM dendrimeric nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 633 (2022) 127819.
- [39] F. Vidal, L. Guzman, Dendrimer nanocarriers drug action: perspective for neuronal pharmacology, *Neural Regeneration Research*, 10 (2015) 1029-1031.
- [40] K.H. Wong, Z. Guo, M.K. Law, M. Chen, Functionalized PAMAM constructed nanosystems for biomacromolecule delivery, *Biomaterials Science*, 11 (2023) 1589-1606.
- [41] J. Tang, H. Zhou, X. Hou, L. Wang, Y. Li, Y. Pang, C. Chen, G. Jiang, Y. Liu, Enhanced anti-tumor efficacy of temozolomide-loaded carboxylated poly(amido-amine) combined with photothermal/photodynamic therapy for melanoma treatment, *Cancer Letters*, 423 (2018) 16-26.
- [42] P.-Y. Wu, Z.-C. Shen, J.-L. Jiang, B.-C. Zhang, W.-Z. Zhang, J.-J. Zou, J.-F. Lin, C. Li, J.-W. Shao, A multifunctional theranostics nanosystem featuring self-

assembly of alcohol-abuse drug and photosensitizers for synergistic cancer therapy, *Biomaterials Science*, 10 (2022) 6267-6281.

[43] W.S. Saw, T. Anasamy, T.T.A. Do, H.B. Lee, C.F. Chee, U. Isci, M. Misran, F. Dumoulin, W.Y. Chong, L.V. Kiew, T. Imae, L.Y. Chung, Nanoscaled PAMAM Dendrimer Spacer Improved the Photothermal–Photodynamic Treatment Efficiency of Photosensitizer-Decorated Confeito-Like Gold Nanoparticles for Cancer Therapy, *Macromolecular Bioscience*, 22 (2022) 2200130.

[44] E. Bastien, R. Schneider, S. Hackbarth, D. Dumas, J. Jasniewski, B. Röder, L. Bezdetnaya, H.-P. Lassalle, PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14 (2015) 2203-2212.

[45] A. Yuan, B. Yang, J. Wu, Y. Hu, X. Ming, Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy, *Acta Biomaterialia*, 21 (2015) 63-73.

[46] C.F. Díaz, L. Guzmán, V.A. Jiménez, J.B. Alderete, Polyamidoamine dendrimers of the third generation–chlorin e6 nanoconjugates: Nontoxic hybrid polymers with photodynamic activity, *Journal of Applied Polymer Science*, 139 (2021).

[47] M. Jing, Y. Li, M. Wang, H. Zhang, P. Wei, Y. Zhou, N. Ishimwe, X. Huang, L. Wang, L. Wen, W. Wang, Y. Zhang, Photoresponsive PAMAM-Assembled Nanocarrier Loaded with Autophagy Inhibitor for Synergistic Cancer Therapy, *Small*, 17 (2021) e2102295.

[48] M. Domsicova, J. Korcekova, A. Poturnayova, A. Breier, New Insights into Aptamers: An Alternative to Antibodies in the Detection of Molecular Biomarkers, *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (2024).

[49] D.A. Real, K. Bolanos, J. Priotti, N. Yutronic, M.J. Kogan, R. Sierpe, O. Donoso-Gonzalez, Cyclodextrin-Modified Nanomaterials for Drug Delivery: Classification and Advances in Controlled Release and Bioavailability, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 2131.

[50] X. Mo, F. Wu, Y. Li, X. Cai, Hyaluronic acid-functionalized halloysite nanotubes for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells, *Materials Today Communications*, 28 (2021) 102682.

[51] C. Tan, J. Zheng, Y. Feng, M. Liu, Cell Membrane-Coated Halloysite Nanotubes for Target-Specific Nanocarrier for Cancer Phototherapy, *Molecules*, 26 (2021) 4483.

- [52] R. Ge, J. Cao, J. Chi, S. Han, Y. Liang, L. Xu, M. Liang, Y. Sun, NIR-guided dendritic nanoplatform for improving antitumor efficacy by combining chemophototherapy, *International Journal of Nanomedicine*, 14 (2019) 4931-4947.
- [53] K.P. Marrugo, J. Manzo-Merino, V.A. Jiménez, C.H. Campos, J.B. Alderete, Dual-Peptide PAMAM Dendrimer Conjugates for Enhanced Cell Uptake via E-Selectin Targeting, *Bioconjugate Chemistry*, 36 (2025) 2608-2617.
- [54] B. Farran, R.C. Montenegro, P. Kasa, E. Pavitra, Y.S. Huh, Y.-K. Han, M.A. Kamal, G.P. Nagaraju, G.S. Rama Raju, Folate-conjugated nanovehicles: Strategies for cancer therapy, *Materials Science and Engineering: C*, 107 (2020) 110341.
- [55] Y. Lu, E. Segal, C.P. Leamon, P.S. Low, Folate receptor-targeted immunotherapy of cancer: mechanism and therapeutic potential, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (2004) 1161-1176.
- [56] W. Qu, B. Meng, Y. Yu, S. Wang, Folic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles for enhanced therapeutic efficacy of topotecan in retina cancers, *International Journal of Nanomedicine*, 13 (2018) 4379-4389.
- [57] X. Mo, F. Wu, B. Yu, W. Wang, X. Cai, Folate-PG modified halloysite nanotube for enhancing tumor targeting and anticancer efficacy, *Applied Clay Science*, 193 (2020) 105664.
- [58] Y. Hu, J. Chen, X. Li, Y. Sun, S. Huang, Y. Li, H. Liu, J. Xu, S. Zhong, Multifunctional halloysite nanotubes for targeted delivery and controlled release of doxorubicin in-vitro and in-vivo studies, *Nanotechnology*, 28 (2017) 375101.
- [59] M. Fatima, A. Sheikh, N. Hasan, A. Sahebkar, Y. Riadi, P. Kesharwani, Folic acid conjugated poly(amidoamine) dendrimer as a smart nanocarriers for tracing, imaging, and treating cancers over-expressing folate receptors, *European Polymer Journal*, 170 (2022) 111156.
- [60] C.H. Campos, K. Shanmugaraj, T.M. Bustamante, E. Leal-Villaruel, V. Vinoth, R. Aepuru, R.V. Mangalaraja, C.C. Torres, Catalytic production of anilines by nitro-compounds hydrogenation over highly recyclable platinum nanoparticles supported on halloysite nanotubes, *Catalysis Today*, 394-396 (2022) 510-523.
- [61] V.A. Jiménez, N. Moreno, L. Guzmán, C.C. Torres, C.H. Campos, J.B. Alderete, Visible-light-responsive folate-conjugated titania and alumina nanotubes for photodynamic therapy applications, *Journal of Materials Science*, 55 (2020) 6976-6991.

- [62] Z. Xia, V. Rozyyev, A.U. Mane, J.W. Elam, S.B. Darling, Surface Zeta Potential of ALD-Grown Metal-Oxide Films, *Langmuir*, 37 (2021) 11618-11624.
- [63] E. Velez-Pena, V.A. Jimenez, J. Manzo-Merino, J.B. Alderete, C.H. Campos, Chlorin e6-Conjugated Mesoporous Titania Nanorods as Potential Nanoplatform for Photo-Chemotherapy, *Nanomaterials*, 14 (2024) 933.
- [64] H. Liao, H. Liu, Y. Li, M. Zhang, H. Tomás, M. Shen, X. Shi, Antitumor efficacy of doxorubicin encapsulated within PEGylated poly(amidoamine) dendrimers, *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (2014) 40358.
- [65] D. Wu, A. Pusuluri, D. Vogus, V. Krishnan, C.W. Shields, J. Kim, A. Razmi, S. Mitragotri, Design principles of drug combinations for chemotherapy, *Journal of Controlled Release*, 323 (2020) 36-46.
- [66] F. Hajareh Haghighi, M. Mercurio, S. Cerra, T.A. Salamone, R. Bianymotlagh, C. Palocci, V. Romano Spica, I. Fratoddi, Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with organic molecules and their biological applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 11 (2023) 2334-2366.
- [67] S.N. Ahmad Shah, S. Zulfiqar, F. Ruipérez, M. Rafique, M. Iqbal, M.J. Forrester, M.I. Sarwar, E.W. Cochran, An integrated experimental and theoretical approach to probe Cr(vi) uptake using decorated halloysite nanotubes for efficient water treatment, *RSC Advances*, 14 (2024) 2947-2960.
- [68] C. Pellerito, A. Presentato, G. Lazzara, G. Cavallaro, R. Alduina, T. Fiore, New Biocide Based on Tributyltin(IV) Ferulate-Loaded Halloysite Nanotubes for Preserving Historical Paper Artworks, *Molecules*, 28 (2023) 7953.
- [69] Z. Bao, Y. Yan, W. Han, Investigation of  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-Modified Halloysite Nanotubes on the Reinforcement of Halloysite/Polypropylene (PP) Nanocomposites, *Polymers*, 16 (2024) 3332.
- [70] C. Li, Y. Zhao, T. Zhu, Y.g. Li, J. Ruan, G. Li, Effective solvent-free oxidation of cyclohexene to allylic products with oxygen by mesoporous etched halloysite nanotube supported Co<sup>2+</sup>, *RSC Advances*, 8 (2018) 14870-14878.
- [71] S. Farshbaf Taghinezhad, A. Abbasi, G. Abdeali, M. Ahmadi, D.P. Fitzpatrick, I. Major, R. Pezzoli, Bio-based functionalization of halloysite nanotubes: Rheokinetics and surface modification with epoxidized linseed and soybean oils, *Applied Clay Science*, 277 (2025) 107979.
- [72] B. Boumhidi, N. Katir, J. El Haskouri, K. Draoui, A. El Kadib, Amphoteric Halloysite and Sepiolite Adsorbents by Amino and Carboxy Surface Modification

for Effective Removal of Cationic and Anionic Dyes from Water, *Minerals*, 15 (2025) 841.

[73] L. Song, K. Tan, Y. Ye, B. Zhu, S. Zhang, W. Huang, Amine-Functionalized Natural Halloysite Nanotubes Supported Metallic (Pd, Au, Ag) Nanoparticles and Their Catalytic Performance for Dehydrogenation of Formic Acid, *Nanomaterials*, 12 (2022) 2414.

[74] M. Wieczorek, T. Tatarchuk, K. Skórczewska, J. Szulc, J. Tomaszewska, The Effect of Silanized Halloysite Nanotubes on the Structure of Polyethylene–Based Composite, *Materials*, 17 (2024) 3260.

[75] O.L. Gladkova, M.V. Parkhats, A.N. Gorbachova, S.N. Terekhov, FTIR spectra and normal-mode analysis of chlorin e6 and its degradation-induced impurities, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 76 (2010) 388-394.

[76] K. Benyahia, H. Sehil, A. Chougui, A.-H.I. Mourad, A. Dehbi, N. Cherupurakal, R.H. Alzard, Synthesis and characterization of novel halloysite-agar-Ni<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>Mn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> composite for efficient methylene blue dye removal, *Next Materials*, 8 (2025) 100588.

[77] A. Abotaleb, I. Gladich, K. Mroue, N. Abounahia, A. Alkhateeb, A. Al-Shammari, Y. Tong, D. Al-Masri, A. Sinopoli, Impact of thermal treatment on halloysite nanotubes: A combined experimental-computational approach, *Heliyon*, 10 (2024) e39952.

[78] R. Krakowiak, R. Frankowski, K. Mylkie, M. Kotkowiak, D.T. Mlynarczyk, A. Dudkowiak, B.J. Stanis, A. Zgoła-Grześkowiak, M. Ziegler-Borowska, T. Goslinski, Titanium(IV) oxide nanoparticles functionalized with various mesoporphyrins for efficient photocatalytic degradation of ibuprofen in UV and visible light, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10 (2022) 108432.

[79] L. Li, F. Wang, Y. Lv, J. Liu, D. Zhang, Z. Shao, Halloysite nanotubes and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles enhanced adsorption removal of heavy metal using electrospun membranes, *Applied Clay Science*, 161 (2018) 225-234.

[80] K. Efendiev, P. Alekseeva, A. Shiryayev, A. Voitova, K. Linkov, T. Pisareva, I. Reshetov, V. Loschenov, Near-infrared phototheranostics of tumors with protoporphyrin IX and chlorin e6 photosensitizers, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 42 (2023) 103566.

[81] C. Pucci, D. De Pasquale, A. Degl'Innocenti, M. Montorsi, A. Desii, M. Pero, C. Martinelli, M. Bartolucci, A. Petretto, G. Ciofani, Chlorin e6-Loaded

Nanostructured Lipid Carriers Targeted by Angiopep-2: Advancing Photodynamic Therapy in Glioblastoma, *Advanced Healthcare Materials*, 14 (2025) e2402823.

[82] Y. Allamyradov, J. ben Yosef, B. Annamuradov, M. Ateyeh, C. Street, H. Whipple, A.O. Er, Photodynamic Therapy Review: Past, Present, Future, Opportunities and Challenges, *Photochem*, 4 (2024) 434-461.

[83] M.Z. El-Sadek, M.K.A. El-Aziz, A.H. Shaaban, S.A. Mostafa, A.S. Wadan, Advancements and emerging trends in photodynamic therapy: innovations in cancer treatment and beyond, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 24 (2025) 1489-1511.

[84] A. Marconi, E.J. Mattioli, F. Ingargiola, G. Giugliano, T.D. Marforio, L. Prodi, M. Di Giosia, M. Calvaresi, Dissecting the Interactions between Chlorin e6 and Human Serum Albumin, *Molecules*, 28 (2023) 2348.

[85] M. Di Sante, A. Kaltenbrunner, M. Lombardo, A. Danielli, P.E. Costantini, M. Di Giosia, M. Calvaresi, Putting a "C(60) Ball" and Chain to Chlorin e6 Improves Its Cellular Uptake and Photodynamic Performances, *Pharmaceuticals*, 16 (2023).

[86] H.E. McAnlis, J.R. Stewart, S.T. Burton, S.J. Steinke, C. Turro, P.A. Bonvallet, Design, synthesis, and photophysical properties of hybrid porphyrin-natural product compounds, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 343 (2025) 126512.

[87] M. Zhu, H. Zhang, Y. Yao, M. Wen, G. Ran, Y. Yu, R. Zhang, X.J. Liang, J. Zhang, W. Zhang, J.L. Zhang, More is different: progressive beta-thiolation induced-porphyrin aggregation switches singlet oxygen photosensitization, *Chemical Science*, 15 (2024) 13841-13852.

[88] W. Liu, X. Ma, Y. Jin, J. Zhang, Y. Li, Y. Tang, Y. Song, S. Wang, Chlorin e6-Biotin Conjugates for Tumor-Targeting Photodynamic Therapy, *Molecules*, 26 (2021) 7342.

[89] B. Katana, D. Čakara, Proton Binding of Halloysite Nanotubes at Varied Ionic Strength: A Potentiometric Titration and Electrophoretic Mobility Study, *Colloids and Interfaces*, 9 (2025) 79.

[90] I. Ishmukhametov, S. Batasheva, S. Konnova, Y. Lvov, R. Fakhrullin, Self-assembly of halloysite nanotubes in water modulated via heterogeneous surface charge and transparent exopolymer particles, *Applied Clay Science*, 270 (2025) 107775.

- [91] V. Vergaro, E. Abdullayev, Y.M. Lvov, A. Zeitoun, R. Cingolani, R. Rinaldi, S. Leporatti, Cytocompatibility and Uptake of Halloysite Clay Nanotubes, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 820-826.
- [92] S.R. Levis, P.B. Deasy, Characterisation of halloysite for use as a microtubular drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, 243 (2002) 125-134.
- [93] K. Shanmugaraj, T.M. Bustamante, C.C. Torres, C.H. Campos, Gold nanoparticles supported on mesostructured oxides for the enhanced catalytic reduction of 4-nitrophenol in water, *Catalysis Today*, 388-389 (2022) 383-393.
- [94] S.A. Abdel Gaber, H. Stepp, M.H. Abdel Kader, M. Lindén, Mesoporous silica nanoparticles boost aggressive cancer response to hydrophilic chlorin e6-mediated photodynamic therapy, *Cancer Nanotechnology*, 14 (2023).
- [95] T. Taroni, D. Meroni, K. Fidecka, D. Maggioni, M. Longhi, S. Ardizzone, Halloysite nanotubes functionalization with phosphonic acids: Role of surface charge on molecule localization and reversibility, *Applied Surface Science*, 486 (2019) 466-473.
- [96] L. Zhang, C. Zhu, R. Huang, Y. Ding, C. Ruan, X.-C. Shen, Mechanisms of Reactive Oxygen Species Generated by Inorganic Nanomaterials for Cancer Therapeutics, *Frontiers in Chemistry*, Volume 9 - 2021 (2021).
- [97] A.A. Obalola, H. Abrahamse, S.S. Dhilip Kumar, Chlorin e6-Based Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma: An In Vitro Efficacy Study, *ACS Omega*, 11 (2026) 25004-25013.
- [98] S. Cui, X. Guo, S. Wang, Z. Wei, D. Huang, X. Zhang, T.C. Zhu, Z. Huang, Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy, *Pharmaceutics*, 17 (2024) 1274.
- [99] R. Edge, T.G. Truscott, The Reactive Oxygen Species Singlet Oxygen, Hydroxy Radicals, and the Superoxide Radical Anion—Examples of Their Roles in Biology and Medicine, *Oxygen*, 1 (2021) 77-95.
- [100] M. Przygoda, D. Bartusik-Aebisher, K. Dynarowicz, G. Ciešlar, A. Kawczyk-Krupka, D. Aebisher, Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023) 16890.
- [101] K. Wu, R. Feng, Y. Jiao, C. Zhou, Effect of halloysite nanotubes on the structure and function of important multiple blood components, *Materials Science and Engineering: C*, 75 (2017) 72-78.

- [102] C. Fruijtier-Pölloth, The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material, *Toxicology*, 294 (2012) 61-79.
- [103] A.K. Singh, S.S. Singh, A.S. Rathore, S.P. Singh, G. Mishra, R. Awasthi, S.K. Mishra, V. Gautam, S.K. Singh, Lipid-Coated MCM-41 Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Berberine Improved Inhibition of Acetylcholine Esterase and Amyloid Formation, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7 (2021) 3737-3753.
- [104] J. Zhan, Q.S. Liu, Y. Zhang, Z. Sun, Q. Zhou, G. Jiang, Silica nanoparticles trigger phosphatidylserine exposure in red blood cells and induce thrombosis risk, *Environmental Pollution*, 327 (2023) 121591.
- [105] J.W. Grunberger, M.A. Dobrovolskaia, H. Ghandehari, Immunological properties of silica nanoparticles: a structure-activity relationship study, *Nanotoxicology*, 18 (2024) 542-564.
- [106] Biological evaluation of medical devices?Part 4: Selection of tests for interactions with blood, ANSI/AAMI/ISO 10993-4:2017; Biological evaluation of medical devices?Part 4: Selection of tests for interactions with blood2022.
- [107] J. Liao, Y. Qian, Z. Sun, J. Wang, Q. Zhang, Q. Zheng, S. Wei, N. Liu, H. Yang, In Vitro Binding and Release Mechanisms of Doxorubicin from Nanoclays, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 13 (2022) 8429-8435.
- [108] G. Biddeci, G. Spinelli, P. Colomba, F. Di Blasi, Nanomaterials: A Review about Halloysite Nanotubes, Properties, and Application in the Biological Field, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 11518.
- [109] E. Stodolak-Zych, A. Rapacz-Kmita, M. Gajek, A. Rozycka, M. Dudek, S. Kluska, Functionalized Halloysite Nanotubes as Potential Drug Carriers, *Journal of Functional Biomaterials*, 14 (2023) 167.
- [110] C. Thedrattanawong, C. Manaspon, N. Nasongkla, Controlling the burst release of doxorubicin from polymeric depots via adjusting hydrophobic/hydrophilic properties, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46 (2018) 446-451.
- [111] M. Vermathen, M. Marzorati, P. Vermathen, P. Bigler, pH-Dependent Distribution of Chlorin e6 Derivatives across Phospholipid Bilayers Probed by NMR Spectroscopy, *Langmuir*, 26 (2010) 11085-11094.
- [112] M.A. González-Reyna, G.A. Molina, K. Juarez-Moreno, A. Rodríguez-Torres, R. Esparza, M. Estevez, Green nanoarchitectonics of carbon quantum

dots from *Cinchona Pubescens* Vahl as targeted and controlled drug cancer nanocarrier, *Biomaterials Advances*, 153 (2023) 213561.

[113] X. Li, Q. Li, C. Zhao, Zero-Order Controlled Release of Water-Soluble Drugs Using a Marker Pen Platform, *ACS Omega*, 6 (2021) 13774-13778.

[114] V. de Abreu Pereira, I. dos Santos Paz, A.L. Gomes, L.A. Leite, P.B.A. Fachine, M. de Sá Moreira de S. Filho, Effects of acid activation on the halloysite nanotubes for curcumin incorporation and release, *Applied Clay Science*, 200 (2021) 105953.

[115] C.A.P. Monteiro, A.D.P.R. Oliveira, R.C. Silva, R.R.M. Lima, F.O. Souto, M.O. Baratti, H.F. Carvalho, B.S. Santos, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209 (2020) 111918.

[116] F. Sonvico, C. Dubernet, V. Marsaud, M. Appel, H. Chacun, B. Stella, M. Renoir, P. Colombo, P. Couvreur, Establishment of an in vitro model expressing the folate receptor for the investigation of targeted delivery systems, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15 (2005) 407-410.

[117] Y. Liu, S. Xu, Q. Lyu, Y. Huang, W. Wang, Ce6 nanoassemblies: Molecular mechanism and strategies for combinational anticancer therapy, *Aggregate*, 5 (2023) e443.

[118] S.-R. Lee, Y.-J. Kim, Hydrophilic Chlorin e6-Poly(amidoamine) Dendrimer Nanoconjugates for Enhanced Photodynamic Therapy, *Nanomaterials*, 8 (2018) 445.

[119] F. Nardelli, S. Borsacchi, L. Calucci, E. Carignani, F. Martini, M. Geppi, Anisotropy and NMR spectroscopy, *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 31 (2020) 999-1010.

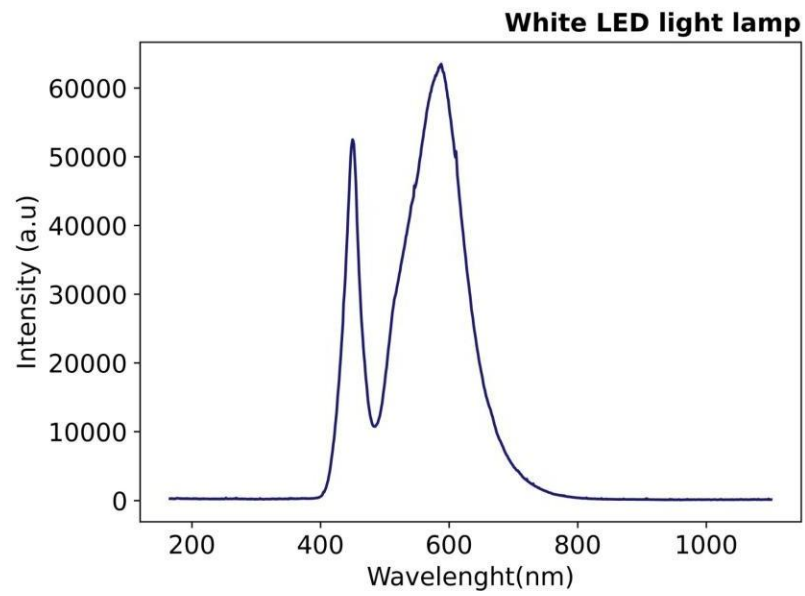
[120] C. Diaz, C. Benitez, F. Vidal, L.F. Barraza, V.A. Jiménez, L. Guzman, J. Fuentealba, G.E. Yevenes, J.B. Alderete, Cytotoxicity and in vivo plasma kinetic behavior of surface-functionalized PAMAM dendrimers, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14 (2018) 2227-2234.

[121] D.C. Fernanda, Efecto de la modificación superficial de dendrímeros PAMAM en la cinética plasmática y formación de complejos con aplicación farmacológica, Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas Universidad de Concepción, Universidad de Concepción, 2018, pp. 101.

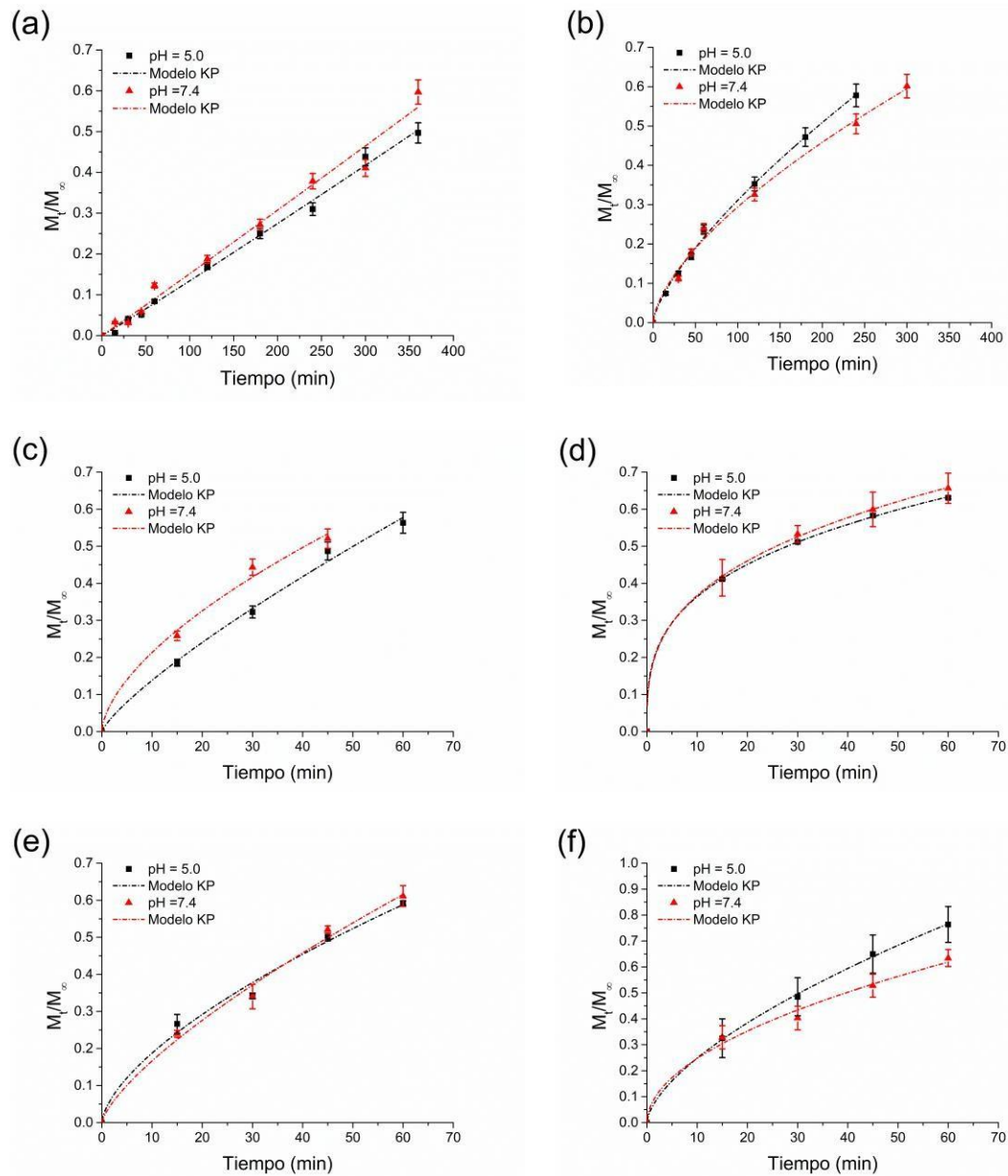
- [122] R. Ahmed, M. Aucamp, N. Ebrahim, H. Samsodien, Supramolecular assembly of rifampicin and PEGylated PAMAM dendrimer as a novel conjugate for tuberculosis, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66 (2021) 102773.
- [123] A.D. Dey, A. Bigham, Y. Esmaeili, M. Ashrafizadeh, F.D. Moghaddam, S.C. Tan, S. Yousefiasl, S. Sharma, A. Maleki, N. Rabiee, A.P. Kumar, V.K. Thakur, G. Orive, E. Sharifi, A. Kumar, P. Makvandi, Dendrimers as nanoscale vectors: Unlocking the bars of cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, 86 (2022) 396-419.
- [124] N. Mina, V.S. Guido, B.C. Prezoto, M.L.V. Oliva, A.A. Sousa, How Dendrimers Impact Fibrin Clot Formation, Structure, and Properties, *ACS Omega*, 9 (2024) 51306-51319.
- [125] D.M. Domanski, B. Klajnert, M. Bryszewska, Influence of PAMAM dendrimers on human red blood cells, *Bioelectrochemistry*, 63 (2004) 189-191.
- [126] P. Chanphai, L. Bekale, S. Sanyakamdhorn, D. Agudelo, G. Bérubé, T.J. Thomas, H.A. Tajmir-Riahi, PAMAM dendrimers in drug delivery: loading efficacy and polymer morphology, *Canadian Journal of Chemistry*, 95 (2017) 891-896.
- [127] M.-J. Shieh, C.-L. Peng, P.-J. Lou, C.-H. Chiu, T.-Y. Tsai, C.-Y. Hsu, C.-Y. Yeh, P.-S. Lai, Non-toxic phototriggered gene transfection by PAMAM-porphyrin conjugates, *Journal of Controlled Release*, 129 (2008) 200-206.
- [128] M. Rajasekar, S.G. Sree Agash, K. Rajasekar, Review of photoresponsive and glycoside dendrimers in biomaterials and sensors applications, *RSC Advances*, 12 (2022) 35123-35150.
- [129] J. Wang, B. Li, L. Qiu, X. Qiao, H. Yang, Dendrimer-based drug delivery systems: history, challenges, and latest developments, *Journal of Biological Engineering*, 16 (2022) 18.
- [130] P. Kesharwani, V. Puri, T. Alqahtani, H. Al Shmrany, G. Gupta, K.W. Goh, A. Sahebkar, PEGylated dendrimers for precision cancer therapy: Advances in tumor targeting, drug delivery, and clinical translation, *Biomaterials Advances*, 179 (2026) 214493.
- [131] V. Uskoković, Mechanism of formation governs the mechanism of release of antibiotics from calcium phosphate nanopowders and cements in a drug-dependent manner, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (2019) 3982-3992.

- [132] S. Lee, S.J. Son, S.J. Song, T.H. Ha, J.S. Choi, Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Modified with Cathepsin-B Cleavable Oligopeptides for Enhanced Gene Delivery, *Polymers*, 9 (2017) 224.
- [133] G.M. Calixto, J. Bernegossi, L.M. de Freitas, C.R. Fontana, M. Chorilli, Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, *Molecules*, 21 (2016) 342.
- [134] W. Zhao, L. Wang, M. Zhang, Z. Liu, C. Wu, X. Pan, Z. Huang, C. Lu, G. Quan, Photodynamic therapy for cancer: mechanisms, photosensitizers, nanocarriers, and clinical studies, *MedComm* (2020), 5 (2024) e603.
- [135] M. Kciuk, A. Gielecińska, S. Mujwar, D. Kołat, Ż. Kałuzińska-Kołat, I. Celik, R. Kontek, Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity, *Cells*, 12 (2023).
- [136] J.L. Nitiss, Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 9 (2009) 338-350.
- [137] A. Saovapakhiran, A. D'Emanuele, D. Attwood, J. Penny, Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization, *Bioconjugate Chemistry*, 20 (2009) 693-701.
- [138] S. Parimi, T.J. Barnes, D.F. Callen, C.A. Prestidge, Mechanistic Insight into Cell Growth, Internalization, and Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 382-389.
- [139] Y. Zhou, Wang, H., Wang, C., et al., Dual-modality chemo-photodynamic therapy using Rose Bengal and doxorubicin co-loaded PAMAM dendrimer nanoparticles for enhanced anticancer efficacy. *Current Nanoscience*, 2017, 13(6): p. 584–593., *Current Nanoscience* 13(6) (2017) 584–593.

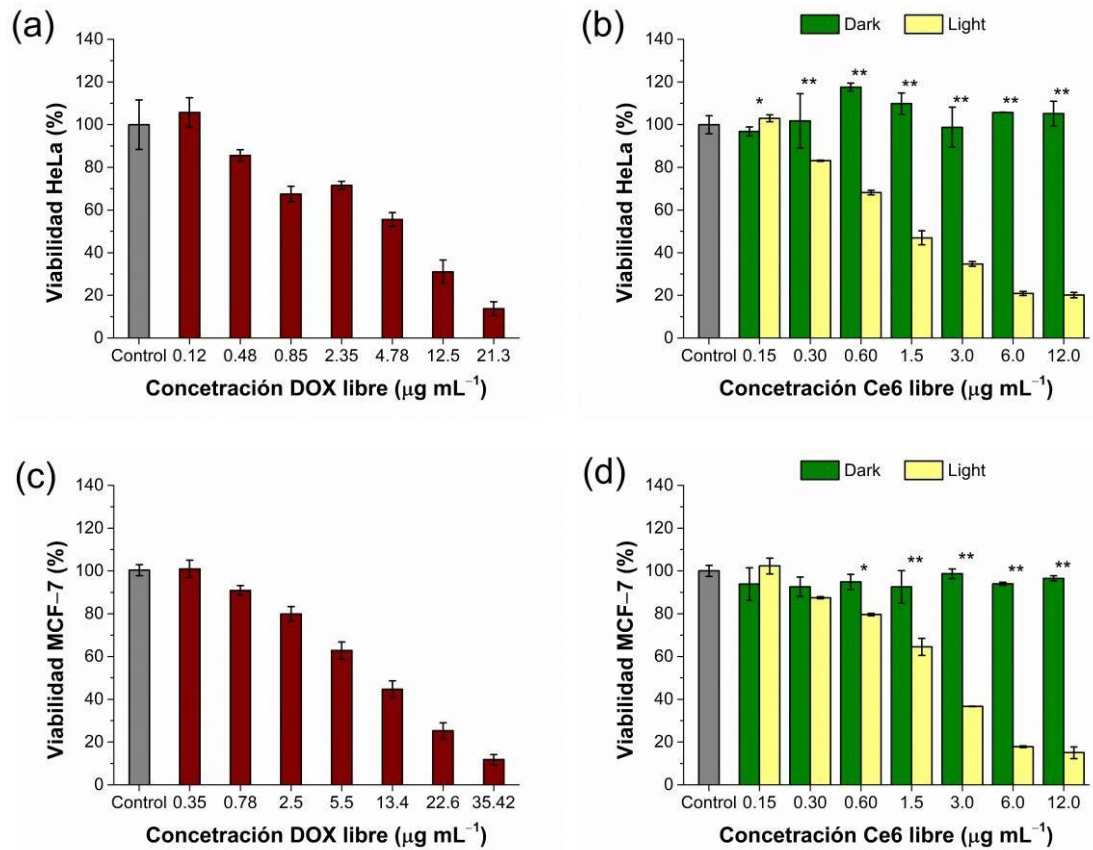
## 9. ANEXOS



**Figure A1.** Espectro de emisión de la lámpara empleada para los ensayos fotodinámicos



**Figure A2.** Ajuste del modelo cinético de Korsmeyer-Peppas (KP) para la liberación del fármaco en nanotransportadores basados en HNT y PAMAM cargados con DOX. (a) DOX@HNT, (b) DOX@HNT-Ce6, (c) DOX@HNT-Ce6-PFOL, (d) DOX@PAMAM, (e) DOX@PAMAM-Ce6, (f) DOX@PAMAM-Ce6-PFOL.



**Figure A3.** Experimentos de viabilidad celular con células HeLa y MCF-7 incubadas con nanotransportadores de Ce6 y DOX libres. (a) – (c) 12 h en la oscuridad seguidas de irradiación con luz LED (15 min,  $150 \text{ mW cm}^{-2}$ ) para completar un total de tratamiento de 24h y (b) – (d) en la oscuridad por un periodo de 24 h. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) con la prueba de Tukey (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , ns, no significativo;  $n = 3$ ).

