



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***“Nanopartículas de sílice con revestimiento de metales nobles para uso en fototerapias de tumores”***

---

**Tesista:**

*Martinez Porcel, Joaquin Emiliano*

**Director/a:**

*Mártire, Daniel Osvaldo*

**Codirector/a:**

*Arce, Valeria Beatriz*

**Año: 2020**

## Siglas y abreviaturas

**A/Abs:** Absorbancia

**ACF:** Función de Autocorrelación

**AuNS:** Nanoestrellas de Oro

**BP:** Paso de Banda

**CHE:** Colesterol Esterasa

**CHOD:** Colesterol Oxidasa

**CW:** Onda Continua

**DADS:** Análisis Diferencial de Espectros Diferencia

**DAPI:** 4', 6-diamidino-2-fenilindol

**DLS:** Dispersión Dinámica de Luz

**DMEM:** Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

**DMPO:** 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EPR:** Permeabilidad y Retención Aumentada

**EPR:** Resonancia Paramagnética de Electrones

**ESR:** Resonancia del Spin Electrónico

**FCS:** Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos

**FFA:** Alcohol Furfurílico

**FRET:** Transferencia de Energía Resonante de Förster

**I-2959:** Irgacure 2959

**I-907:** Irgacure 907

**ICG:** Indocianina Verde

**ICP-AES:** Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente

**LbL:** Capa por Capa

**LFP:** Láser Flash Fotólisis

**LSPR:** Resonancia Localizada Superficial del Plasmón

**MEF:** Fluorescencia Aumentada por Metales

**MB:** Azul de Metileno

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

**NIR:** Infrarrojo cercano

**NMR:** Resonancia Magnética Nuclear

**NP:** Nanopartículas

**NP Ag:** Nanopartículas de Plata

**NP Au:** Nanopartículas de Oro

**NP SiO<sub>2</sub>:** Nanopartículas de Sílice

**NP SiO<sub>2</sub>@Ag:** Nanopartículas de Sílice con recubrimiento de Plata

**NP SiO<sub>2</sub>@Ag-low:** Nanopartículas de Sílice con bajo recubrimiento de Plata

**NP SiO<sub>2</sub>@Au:** Nanopartículas de Sílice con recubrimiento de Oro

**NP SiO<sub>2</sub>@AuNS:** Nanopartículas de Sílice recubiertas de AuNS

**NP SiO<sub>2</sub>-ICG:** Nanopartículas de Sílice con ICG

**NP SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS:** Nanopartículas de Sílice con ICG recubiertas de AuNS

**NP SiO<sub>2</sub>-NH:** Nanopartículas de Sílice funcionalizadas con grupos amino

**NP SiO<sub>2</sub>@nucAg:** Nanopartículas de Sílice con recubrimiento de núcleos de Plata

**NP SiO<sub>2</sub>@nucAu:** Nanopartículas de Sílice con recubrimiento de núcleos de Oro

**NP SiO<sub>2</sub>@Sn<sup>+2</sup>:** Nanopartículas de Sílice con recubrimiento de iones Sn<sup>+2</sup>

**PAH:** Polialilamina

**PEI:** Polietilenimina

**PDT:** Terapia Fotodinámica

**PES:** Espectroscopías Foto-Electrónicas

**POD:** Peroxidasa

**PS:** Fotosensibilizador

**PSS:** Poliestireno Sulfonato

**PTM:** Fotomultiplicador

**PTT:** Terapia Fototérmica

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**RB:** Rosa de Bengala

**Rf:** Riboflavina

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**SDS:** Dodecilsulfato Sódico

**SERS:** Espectroscopía Raman Aumentada por Superficie

**SN2:** Sustitución Nucleofílica bimolecular

**SOSG:** Sensor Verde de Oxígeno Singlete

**SOSG-EP:** Sensor Verde de Oxígeno Singlete Endoperóxido

**TEM:** Microscopio Electrónico de Transmisión

**TEOS:** Tetraetilortosilicato

**TMP:** 2,2,6,6-tetrametilpiperidina

**UV:** Ultra Violeta

**XPS:** Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

## Índice

<b>Capítulo 1: “Introducción General”</b> .....	1
1.1 Cáncer.....	3
1.1.1 Estadísticas del Cáncer.....	4
1.2 Fototerapia.....	7
1.3 Terapia Fotodinámica.....	9
1.4 Terapia Fototérmica.....	12
1.5 Plasmónica.....	14
1.6 Nanotecnología aplicada a sistemas biológicos.....	18
1.7 Referencias.....	20
<b>Capítulo 2: “Objetivos Generales”</b> .....	26
2.1 Objetivos Generales.....	28
2.2 Objetivos Específicos del Capítulo 3.....	28
2.3 Objetivos Específicos del Capítulo 4.....	28
<b>Capítulo 3: “Nanopartículas de Sílice con Revestimiento de Metales Nobles: Síntesis Fotoquímica”</b> .....	31
3.1 Introducción.....	33
3.1.1 Efecto del LSPR sobre la fotofísica de colorantes orgánicos.....	33
3.1.1.1 Fluorescencia aumentada por metales (MEF) .....	33
3.1.2 Síntesis de nanopartículas de sílice por el método Sol-gel.....	39
3.1.3 Recubrimiento de las NPs SiO <sub>2</sub> con metales nobles.....	42
3.1.3.1 Nucleación.....	42
3.1.3.2 Crecimiento.....	44
3.2 Objetivos.....	49
3.3 Materiales y Métodos.....	49
3.3.1 Reactivos.....	49
3.3.2 Síntesis de Nanopartículas de SiO <sub>2</sub> .....	50
3.3.3 Síntesis de Nanopartículas de SiO <sub>2</sub> @Ag.....	50
3.3.4 Síntesis de Nanopartículas de SiO <sub>2</sub> @Au.....	51
3.3.5 Equipos y Técnicas Utilizadas.....	51
3.3.5.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	51
3.3.5.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial ζ.....	52
3.3.5.3 Determinación del Contenido de Plata por ICP.....	52
3.3.5.4 Espectroscopía UV-visible.....	52
3.3.5.5 Espectroscopía de Fluorescencia.....	52
3.3.5.6 Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS).....	53
3.3.5.7 Laser Flash Fotólisis (LFP).....	53
3.3.5.8 Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR).....	53
3.4 Resultados y Discusión.....	54
3.4.1 Caracterización.....	54

3.4.1.1 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	54
3.4.1.2 Dispersión Dinámica de Luz y Potencial $\zeta$ .....	56
3.4.1.3 Localización de la resonancia superficial localizada del plasmón (RSLP) por espectroscopía UV-visible.....	58
3.4.1.4 Espectroscopia de emisión de fotoelectrones por Rayos-X.....	59
3.4.1.5 Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia.....	65
3.4.2 Estudio de la interacción de los estados fundamental y excitado singlete con las nanopartículas, por medio de espectroscopía UV-visible y de Fluorescencia.....	70
3.4.3 Estudio del efecto de las nanopartículas sobre los estados transientes de los colorantes mediante la técnica de Láser Flash Fotólisis.....	90
3.4.4 Estudio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando la técnica Resonancia Paramagnética de Electrones.....	108
3.5 Conclusiones Parciales.....	117
3.6 Referencias.....	118

## **Capítulo 4: “Nanopartículas de Sílice con Revestimiento de Metales Nobles: Síntesis Capa por Capa”**.....

4.1 Introducción.....	130
4.1.1 Desventajas de la utilización de las Terapias Fotodinámicas y Fototérmicas convencionales.....	130
4.1.2 Indocianina Verde (ICG).....	131
4.1.3 Nanomateriales de Oro.....	132
4.1.3.1 Nanovarillas.....	133
4.1.3.2 Nanoshells.....	133
4.1.3.3 Nanoestrellas.....	134
4.1.4 Eficiencia de conversión fototérmica ( $\eta$ ).....	134
4.1.5 Últimos avances en PTT con nanopartícula de oro.....	136
4.1.6 Ensamblado por el método Capa por Capa (LbL).....	138
4.2 Objetivos.....	139
4.3 Materiales y Métodos.....	139
4.3.1 Reactivos.....	139
4.3.2 Síntesis de Nanopartículas SiO <sub>2</sub> @AuNS.....	139
4.3.3 Síntesis de Nanopartículas SiO <sub>2</sub> -ICG@AuNS.....	140
4.3.4 Equipos y Técnicas Utilizadas.....	141
4.3.4.1 Espectroscopía de Absorción UV-Visible de Transmisión.....	141
4.3.4.2 Espectroscopía de Fluorescencia .....	141
4.3.4.3 Potencial $\zeta$ .....	141
4.3.4.4 Microscopía Electrónica (TEM).....	141
4.3.4.5 Consumo de Oxígeno.....	142
4.3.4.6 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	142
4.3.4.7 Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR).....	142
4.3.4.8 Eficiencia Fototérmica.....	143
4.3.4.9 Ensayo de internalización celular.....	143

4.3.4.10 Ensayos de Viabilidad Celular.....	143
4.4 Resultados y Discusión.....	143
4.4.1 Caracterización.....	143
4.4.1.1 Determinación de la estrategia de ensamblado mediante Espectroscopía UV-visible y de Fluorescencia.....	144
4.4.1.2 Potencial $\zeta$ .....	148
4.4.1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	150
4.4.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	153
4.4.2.1 Consumo de oxígeno.....	153
4.4.2.2 Determinación de oxígeno singlete.....	154
4.4.2.3 Determinación de radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).....	158
4.4.2.4 Determinación de radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ).....	161
4.4.3 Constante de reacción de ICG con $^1O_2$ .....	161
4.4.4 Eficiencia fototérmica.....	165
4.4.5 Internalización celular.....	169
4.4.6 Ensayos de Terapia Fotodinámica y Fototérmica.....	173
4.5 Conclusiones Parciales.....	176
4.6 Referencias.....	177
<b>Capítulo 5: “Conclusiones Generales”</b> .....	<b>188</b>
5.1 Conclusiones del Capítulo 3.....	190
5.2 Conclusiones del Capítulo 4.....	190

---

## Capítulo 1

# ***INTRODUCCIÓN GENERAL***



## 1.1 Cáncer

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas»<sup>1</sup>. En todos los tipos de cáncer, algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos de alrededor. El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y se forman células nuevas cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman «tumores».

Muchos cánceres forman tumores sólidos, que son masas de tejido. Los cánceres de la sangre, como las leucemias, en general no forman tumores sólidos. Los tumores pueden clasificarse en dos grandes grupos: benignos o malignos. Un tumor benigno está rodeado por una capa fibrosa, la cual impide que se extienda a otras partes del cuerpo y, generalmente, no tiene consecuencias graves para el organismo. Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que pueden extenderse a los tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, proceso denominado «metástasis».

Las células cancerosas pueden tener la capacidad de influir a las células normales. Existe una zona que se conoce como el microambiente donde se encuentran las moléculas y vasos sanguíneos que rodean y alimentan las células de un tumor. Por ejemplo, las células cancerosas pueden inducir a las células normales cercanas a que formen vasos sanguíneos que suministren oxígeno y nutrientes, necesarios para que crezcan los tumores. Estos vasos sanguíneos también retiran los productos de desecho de los tumores.

El cáncer es una enfermedad genética, es decir, es causado por cambios en los genes que controlan la forma en cómo funcionan nuestras células. El cáncer de cada persona tiene una combinación única de cambios genéticos. Conforme sigue creciendo el cáncer, ocurrirán cambios adicionales. Aun dentro de cada tumor, células diferentes pueden tener cambios genéticos diferentes.

En general, las células cancerosas tienen más cambios genéticos, como mutaciones en el ADN, que las células normales. Algunos de estos cambios pueden no estar relacionados con el cáncer; pueden ser el resultado del cáncer y no su causa.<sup>2</sup>

Existen diferentes tipos de cáncer:

- Carcinomas → células epiteliales; ej: mama, colon, próstata (adenocarcinomas).
- Sarcomas → hueso y tejidos blandos; ej: músculo, tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejidos fibrosos (tendones y ligamentos).
- Leucemias → células sanguíneas de la médula ósea; ej: linfoblastoma (linfocitos T o B), mieloma (células plasmáticas de la médula ósea).
- Melanomas → melanocitos (productores de melanina); ej: piel y ojos.
- Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) → ej: tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, gliomas mixtos, tumores ependimarios, meduloblastomas, tumores de parénquima pineal, tumores menínges, tumores de células germinativas, craneofaringioma. (Todos estos tumores pueden ser benignos o malignos, sin embargo, aún los tumores benignos ubicados en el cerebro pueden ser muy peligrosos).
- Tumores neuroendócrinos → células que secretan hormonas en la sangre como respuesta a una señal del sistema nervioso; ej: tumores carcinoides (aparato gastrointestinal, en particular recto e intestino delgado).

### 1.1.1 Estadísticas del Cáncer

El cáncer tiene grandes repercusiones en la sociedad argentina y en todo el mundo. Las estadísticas del cáncer describen lo que ocurre en grandes grupos de personas y ofrecen una imagen a través del tiempo de la carga que representa el cáncer en la sociedad. Las estadísticas nos dicen cosas como cuántas personas reciben un diagnóstico de cáncer y mueren por la enfermedad cada año, el número de personas que actualmente están viviendo después de un diagnóstico de cáncer, la edad promedio al momento del diagnóstico y la cantidad de personas que todavía están vivas en un momento dado después del diagnóstico. También nos dicen sobre diferencias entre grupos de personas definidas por edad, sexo, grupo racial y étnico, ubicación geográfica y otras categorías.

#### Situación internacional

El cáncer es una de las causas principales de muerte alrededor del mundo. En 2012, hubo 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 muertes relacionadas con el cáncer. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones.

Los cinco tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos en 2015 son los siguientes:<sup>1</sup>

1° Pulmonar (1,69 millones de defunciones).

2° Hepático (788 000 defunciones).

3° Colorrectal (774 000 defunciones).

4° Gástrico (754 000 defunciones).

5° Mamario (571 000 defunciones).

## Situación en la Argentina

En el año 2017 la mortalidad por cáncer registrada en Argentina fue de 118 y 87 defunciones por cada 100.000 varones y mujeres, respectivamente (tasas estandarizadas por población mundial estándar). Con algo más de 62.000 fallecimientos registrados y sumados a las defunciones por tumores de comportamiento incierto o benigno, representaron el 19% del total de las defunciones, precedidas por las enfermedades cardiovasculares (29%) y seguidas por las respiratorias (19%). Esta enfermedad, junto a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, integra el grupo de las ENT (enfermedades no transmisibles) más relevantes; las cuales concentraron el 50% de todas las defunciones registradas en 2017 (Tabla I).

CAPITULOS	TOTAL	%	REG. CENTRO	REG. CUYO	REG. NEA	REG. NOA	REG. SUR
Cardiovasculares	97219	28,5	30,0	29,4	25,0	22,2	22,8
Tumores	65488	19,2	19,3	19,8	18,6	16,0	23,6
Respiratorias	64869	19,0	20,1	16,1	15,3	17,5	15,6
Lesiones	19419	5,7	4,8	6,7	8,1	7,9	7,3
Infecciosas	14495	4,2	4,2	2,6	3,5	6,8	3,1
DBT	8893	2,6	2,1	4,5	4,4	2,7	4,1
Perinatales	3388	1,0	0,8	1,1	1,8	1,7	1,2
Malformaciones	2365	0,7	0,6	0,9	1,2	0,9	0,8
Mentales	2286	0,7	0,5	1,7	0,6	0,9	1,0
Desnutrición	873	0,3	0,2	0,4	0,3	0,8	0,3
Maternas	246	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Otras definidas	41603	12,2	11,6	13,3	11,8	15,3	14,1
Mal definidas	20544	6,0	5,7	3,6	9,3	7,2	6,0
Total general	341,688	100,0	240,905	25,102	26,155	32,251	16,217

**Tabla 1.** Importancia relativa de las defunciones registradas en el país y sus regiones geográficas agrupadas en grandes capítulos de mortalidad. (Referencia: elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEIS, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer INC), Argentina 2019).

En el año 2017 se registraron en Argentina 62.618 defunciones por cáncer, 52% de las cuales se produjeron en varones (32.393) y 48% en mujeres (30.225).

El cáncer de pulmón determinó el mayor número de defunciones por tumores malignos en el año 2017 (9.485), concentrando el 15% del total de las defunciones por cáncer y el 20% de las muertes por esta causa en varones. El cáncer colorrectal se ubicó en el segundo lugar de frecuencia, con el 12% del total de defunciones (7.499).

En mujeres, el cáncer de mama (6.049 defunciones) representó el 20% del total de las defunciones por cáncer – ubicándose, por su frecuencia, en tercer lugar, de importancia en ambos sexos. Le siguen el cáncer de páncreas (4.302) y próstata (3.771), los que representan aproximadamente el 6% de las más de 60.000 defunciones registradas por esta causa.



**Figura 1.** Gráfico de mortalidad por cáncer en varones y mujeres según principales localizaciones tumorales. Tasas ajustadas por edad por cada 100.000 habitantes. Argentina 2017. (Referencia: elaborado por el SIVER-Ca en base a los registros de mortalidad de la DEIS, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Instituto Nacional del Cáncer INC), Argentina 2019).

En la Figura 1 se presentan las tasas ajustadas por edad según población mundial estándar en varones y mujeres para las localizaciones topográficas que concentran aproximadamente el 80% de la mortalidad por tumores malignos en Argentina en 2017.<sup>3</sup>

Aunque las tendencias estadísticas generalmente no corresponden directamente a pacientes individuales, son esenciales para que gobiernos, personas encargadas de formular políticas, profesionales de salud e investigadores entiendan las repercusiones que tiene el cáncer en la población y diseñen estrategias para abordar los desafíos que representa el cáncer para la sociedad en su conjunto. Las tendencias estadísticas también son importantes para medir el éxito de los esfuerzos para controlar y atender el cáncer.

Hay muchas técnicas estándares bien conocidas para el tratamiento del cáncer tales como la cirugía, la radiación, y la quimioterapia.<sup>4,5</sup> Sin embargo, estos métodos no pueden cumplir eficientemente las necesidades en el tratamiento del cáncer por causa de varias limitaciones, como la dificultad en alcanzar la zona en la que se encuentra el tumor, la localización cercana de otros tumores, las opciones del paciente, y las condiciones de sanidad. Además, los tumores cancerígenos pueden crear protección frente a numerosos agentes quimioterapéuticos, causando obstáculos adicionales para el tratamiento.<sup>6</sup> Por este motivo, es de vital importancia la generación de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer, o el desarrollo y mejoramiento de terapias ya conocidas pero que no alcanzan a ser lo suficientemente eficientes a la hora de combatir los tumores.

## 1.2 Fototerapia

El origen de la luz como terapia en medicina y cirugía se remonta desde tiempos antiguos. La fototerapia comenzó en el Antiguo Egipto, Grecia e India, pero desapareció por muchos siglos y fue redescubierta por civilizaciones occidentales recién en los comienzos del siglo XX.<sup>7</sup>

La práctica de la fototerapia, o helioterapia como se llamó alguna vez, data de tiempos ancestrales. Los primeros reportes que se encontraron del uso de la helioterapia se remontan a alrededor del año 3000 a.C. en el Antiguo Egipto e India.<sup>8,9</sup> En el papiro de Ebers (uno de los más antiguos tratados de medicina y farmacopea), en 1550 a.C., los antiguos egipcios utilizaban la fototerapia usando plantas tales como la *Ammi majus*, chirivía, perejil, y la hierba de San Juan para hacer un polvo que era aplicado en lesiones de despigmentación.<sup>8</sup> Cuando el paciente era expuesto a la luz solar, esto conducía a la pigmentación de la piel, un efecto similar al bronceado.<sup>8,9</sup> También, en uno de los libros sagrados de la India, el Atharava-Veda en el 1400 a.C., a los pacientes que sufrían vitíligo se les daba ciertos extractos de planta Bavachee, y de *Psoralea corylifolia*, y se les pedía que permanecieran a la luz del sol por un tiempo.<sup>8</sup>

La fototerapia fue introducida en China por Lingyan Tzu-Ming en el primer siglo a.C. durante la dinastía Han.<sup>9</sup> Cuatro siglos después, durante la dinastía Tang, se volvió una práctica ritual donde las personas solían exponer un pedazo de papel verde con

colorante rojo a la luz solar, empapararlo en agua, y consumirlo para beneficiarse de alguno de los poderes sanadores del sol.<sup>9,10</sup>

Fue durante el segundo siglo a.C. que la fototerapia fue llamada por primera vez “helioterapia” por el doctor griego Hipócrates, quien fuese llamado el “padre” de la ciencia médica.<sup>11</sup> Él fue el primer griego en practicar la medicina como una ciencia empírica en los tiempos en el que solo era practicada por los sacerdotes. Hipócrates recomendaba la luz solar para la restauración de la salud. Él supo por primera vez acerca de los poderes curativos de la luz solar de sus viajes a Egipto, donde los tratamientos con la luz del sol eran bien conocidos.<sup>8,9,12</sup>

Los romanos fueron los que continuaron con la utilización de la luz solar como tratamiento, especialmente para enfermedades de la piel. Ellos inventaron las “Termas”, las cuales eran baños públicos romanos famosos históricamente por estar establecidos a la luz del sol. Con la caída del Imperio Romano y la propagación del cristianismo, los baños romanos y el concepto de la helioterapia desaparecieron.<sup>8,9,12</sup>

Más tarde, en el siglo XIII, Ibn El-bitar describió en su libro, Mofradat Al Adwiya “Terminologías de Productos Farmacéuticos”, el tratamiento de vitíligo con una tintura de miel y polvo de semillas de Aatrillal (que luego fue clasificada como Ammi majus). La administración de esta tintura era tanto tópica como oral seguida de la exposición directa a la luz solar por 1-2 h.<sup>13</sup>

No fue antes de finales de 1800 y comienzos de 1900 que la fototerapia comenzó a florecer nuevamente. Arnold Rikli, el sanador natural y físico suizo, reintrodujo los poderes sanadores de la luz solar que habían sido olvidados por varios siglos.<sup>12</sup> Es por esto que él suele ser considerado el pionero de la fototerapia moderna. Aunque fue uno de los primeros en llamar la atención del mundo hacia el valor de la luz, el aire y los baños solares, no fue muy conocido dado que la mayoría de sus escritos no fueron traducidos al inglés.<sup>14</sup> Uno de sus primeros grandes logros fue el establecimiento del Instituto Nacional de Medicina en el año 1855, en Bled, Eslovenia. A lo largo de 50 años, Arnold Rikli trabajó en el desarrollo de terapias naturales que aún hoy siguen siendo válidas. Su famosa cita: “El agua es buena, el Aire es mejor y la Luz es lo mejor de todo”, es considerado como el corazón de la helioterapia.<sup>8</sup>

La fototerapia fue encontrada útil en el tratamiento de lupus vulgaris (tuberculosis de la piel), tuberculosis pulmonar y raquitismo. Siguiendo el mismo proceso de evolución, los intentos de tratamiento comenzaron con la utilización de la luz solar la cual fue luego reemplazada por fuentes de luz ultravioleta (UV) artificial. Hacia finales del primer cuarto del siglo XX, la fototerapia se volvió famosa y ampliamente aplicada en el norte de Europa y en ciudades del norte de América del Norte.<sup>8,9,15</sup>

Un gran contribuyente a la fundación de la fototerapia moderna fue el doctor danés Niels Ryberg Finsen (1860–1904).<sup>8</sup> Era dueño de un instituto médico en Copenhague en

el que adjuntaba un jardín solar, donde permitía a sus pacientes tomar sol con la intención de curar el lupus vulgaris y prevenir la cicatrización de pacientes con viruela.<sup>8,16</sup> En sus primeros intentos utilizó luz solar natural, pero pronto cambió a fuentes de luz artificial o luz solar filtrada. En 1893, se dio cuenta de que la piel de pacientes con viruela mostraba mejores resultados con luz roja. Luego, en 1903, demostró el efecto beneficioso de los rayos UV en el cuerpo humano; esto lo llevó a intentar la generación artificial de rayos UV. Primero, separó la radiación UV de la visible y de la infrarroja usando dispositivos con lentes de cuarzo y filtros. Entonces, utilizó la radiación UV de una lámpara de arco de carbono para el tratamiento de la tuberculosis de la piel. Como consecuencia de este invento, obtuvo el Premio Nobel de Medicina.<sup>8</sup>

Hoy en día, un amplio rango de fuentes coherentes y no coherentes pueden ser utilizadas. Las fuentes láser incluyen: láseres de colorantes bombeados por argón, láseres de vapores metálicos, y láseres de doble frecuencia de granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio (Nd:YAG). Las fuentes que no son láseres incluyen filamentos de tungsteno, arcos de xenón, haluros metálicos, y lámparas fluorescentes. Los nuevos desarrollos en excitación, tales como los diodos emisores de luz (LED, del inglés: light emitting diodes) y láseres de femtosegundo también están siendo aplicados.<sup>17</sup>

### 1.3 Terapia fotodinámica

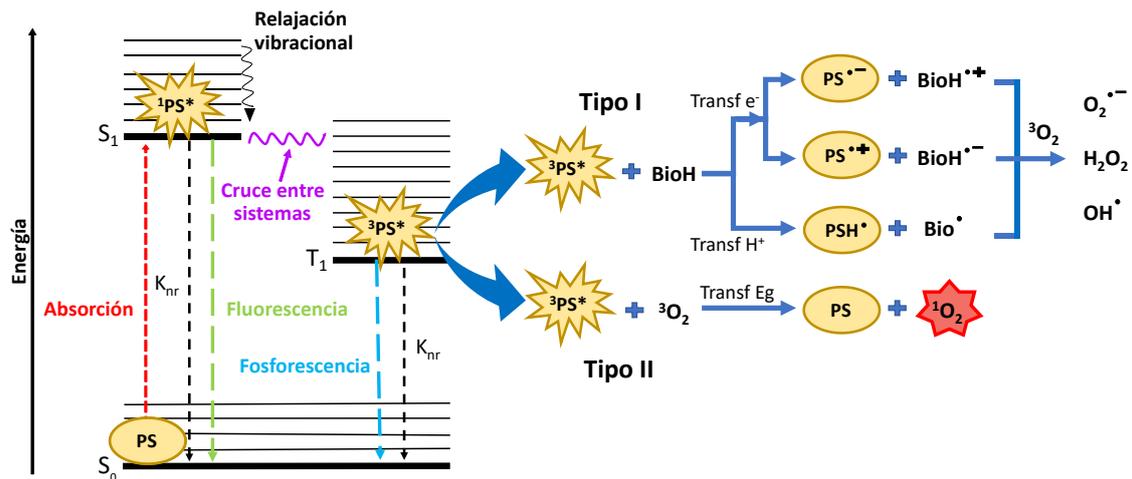
La terapia fotodinámica (PDT, del inglés: Photodynamic Therapy) es una forma de fototerapia que involucra tres componentes claves: un fotosensibilizador, una fuente de luz, y oxígeno tisular. Cuando estos tres componentes están combinados entre sí, se vuelven tóxicos para las células diana.<sup>18</sup> La PDT para el tratamiento de tumores se basa en la administración de un agente fotosensibilizador (PS), el cual es retenido selectivamente en cantidad suficiente por los tejidos neoplásicos. La iluminación posterior del área afectada, utilizando longitud de onda apropiada en presencia de oxígeno, conduce a la muerte específica de las células tumorales. El mecanismo de acción de PDT puede involucrar: un daño directo de las células tumorales, o también una muerte celular indirecta debido a una alteración en el sistema vascular que impide la irrigación sanguínea normal.

La idea de usar un colorante como PS provino de una observación hecha por Oscar Raab, un estudiante del profesor H. Tappeiner en el Instituto Farmacológico de la Universidad Ludwig Maximilian de Munich, en el invierno de 1897–1898. Él notó que el efecto tóxico del colorante acridina en los paramecios era mínimo en los días de tormenta en comparación con su eficacia en los días normales. De esta observación, concluyó que la luz, de alguna manera, activa a la acridina para matar al paramecio. En otras palabras, el hipotetizó que el colorante acridina convierte la luz en una energía química activa, un descubrimiento que forma las bases de la PDT.<sup>8</sup>

El profesor H. Tappeiner fue considerado uno de los pioneros de la fotobiología. Él introdujo el término “Acción Fotodinámica” (Photodynamische Wirkung) en 1904. Entre 1903–1905, el grupo de Tappeiner comenzó a investigar la eficacia de la PDT en tumores y otras enfermedades de la piel como el lupus de la piel y los condilomas (verrugas) de los genitales femeninos usando diferentes colorantes tales como eosina, fluoresceína, disulfonato de dicloroantraceno sódico y Magdalena roja de Grubler. Estos colorantes fueron mayormente aplicados de manera tópica, sin embargo, en algunos casos, se intentaron inyecciones intratumorales. Los resultados de estos estudios fueron favorables.<sup>8</sup> En 1905, H. Tappeiner y H. Jesionek investigaron el efecto del PS eosina en carcinoma de células basales faciales luego de exposiciones prolongadas a luz solar o luz de lámpara de arco. Este tratamiento causó la remoción total del tumor y un período libre de recaída de 12 meses en dos tercios de los pacientes. El grupo de Tappeiner realizó varios estudios posteriores sobre PDT y encontró que el mecanismo fundamental de la PDT involucra ROS lo cual implica que el oxígeno es requerido para este tipo de terapia.<sup>15</sup>

La longitud de onda de la fuente de luz tiene que ser apropiada para excitar al fotosensibilizador (PS) y así producir especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: Reactive Oxygen Species). Estas ROS son generadas durante la PDT a través de dos tipos de reacciones. Las reacciones de Tipo I involucran transferencia de electrón/átomo de hidrógeno directamente desde el fotosensibilizador, produciendo iones, o extracción de electrón/átomo de hidrógeno de una molécula sustrato para formar radicales libres. Las reacciones de Tipo II producen el estado electrónicamente excitado y altamente reactivo del oxígeno conocido como oxígeno singlete.<sup>19</sup> Estos procesos puede ocurrir simultáneamente y la relación entre ambos depende del fotosensibilizador, del sustrato y de la naturaleza del medio. La PDT es usada clínicamente para tratar un amplio rango de condiciones médicas oncológicas y no oncológicas<sup>20</sup> y es reconocida como una estrategia de tratamiento que es tanto mínimamente invasiva como mínimamente tóxica.<sup>11</sup>

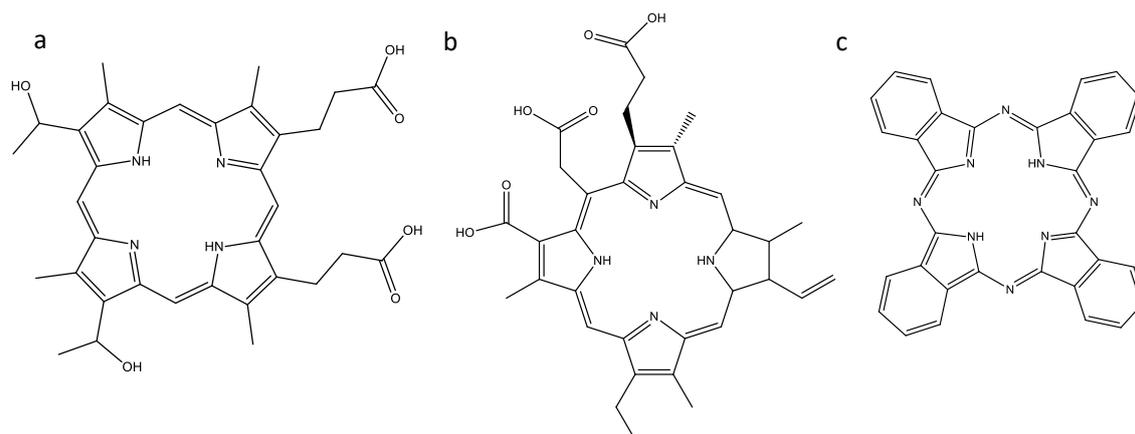
La PDT ha sido utilizada por muchos años, pero es recién ahora que se está volviendo ampliamente aceptada, a pesar de tener muchas ventajas por sobre otros tipos de tratamientos. Primero, la PDT evita el tratamiento sistémico cuando se trata de una enfermedad localizada, dado que el efecto ocurre solo donde la luz es dirigida. Por lo tanto, también se evitan los efectos secundarios de largo plazo. Otra ventaja es que la PDT es selectiva. Los agentes fotosensibilizadores se acumulan selectivamente en las células cancerígenas y los tejidos normales circundantes permanecen inalterados.



**Figura 2.** Esquema representativo de los procesos que le ocurren a un fotosensibilizador (PS) durante la PDT. Como puede verse, ya sea a través del mecanismo Tipo I o Tipo II, el fotosensibilizador en su estado excitado triplete interacciona con el oxígeno en su estado fundamental para generar ROS ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ). BioH representa a una biomolécula que interactúa con el fotosensibilizador.

La PDT puede ser también utilizada cuando no es posible hacer una cirugía. Si un paciente tiene cáncer en un órgano o parte de un órgano que no puede ser removido quirúrgicamente, aun así, la PDT puede tratar esa zona. Por otra parte, es un procedimiento de bajo costo. Finalmente, la PDT es una terapia repetible. A diferencia de la terapia radiativa, la PDT puede ser aplicada una y otra vez. Por lo tanto, ofrece un medio para el tratamiento del cáncer a largo plazo, incluso si no es posible una cura completa. Por último, la PDT puede combinarse junto con otras terapias para aumentar la eficiencia del tratamiento contra el tumor.<sup>11</sup>

Recientemente, los PS fueron categorizados de acuerdo a su estructura química dentro de tres grandes familias: Porfirinas, Clorinas y Colorantes. La primera familia consiste en la hematoporfirina (HP) y sus derivados, tales como Photofrin®, Photosan y Photocan.<sup>21</sup> Estos difieren en las fracciones de sus monómeros, dímeros y oligómeros.<sup>17</sup> En la segunda familia, las sustancias del tipo de las clorofilas, llamadas clorinas, se descubrieron del proceso de fotosíntesis (el primer proceso natural que involucra luz). Se encontró que los productos de degradación de la clorofila, las purinas y las sustancias del tipo de las clorofilas en bacterias y algas, como las bacterioclorinas, poseen excelentes propiedades fotosensibilizadoras. La tercera familia, que fue descubierta anteriormente pero sigue siendo de gran potencial, la constituyen los colorantes descubiertos por Raab en 1897, como las Ftalocianinas y Naftalocianinas.<sup>21</sup>



**Figura 3.** Estructura química de: a) hematoporfirina (porfirina), b) clorina e6 (clorina), y c) ftalocianina (colorante).

Estas familias pueden ser categorizadas adicionalmente dentro de tres generaciones. Ejemplos de la primera generación de PS de la familia de porfirinas son la HP y sus derivados los cuales se componen de PS endógenos que se originan en células que producen sus propios PS.<sup>22</sup> Ejemplos de la segunda generación de PS son la Clorina e6 “Ce6”, Ftalocianina y Naftalocianina (colorantes), entre otros. La tercera generación incluye anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a un antígeno o a células cancerígenas, los cuales están aún en progreso.<sup>21,22</sup>

Muchos PS han sido sintetizados o descubiertos. Estos PS tienen diferentes características y diferentes beneficios. Por lo tanto, a través de los años, varios estudios han tenido lugar con el fin de investigar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de cada PS y explorar sus potenciales aplicaciones clínicas.

## 1.4 Terapia fototérmica

La ablación térmica es una técnica usada en terapia contra el cáncer para eliminar células o tejido dañado mediante la aplicación de ondas electromagnéticas externas y la generación de aumento de temperatura en la zona irradiada. Estas técnicas utilizan radiofrecuencia, frecuencias de microondas, y se focalizan en el ultrasonido (US) y la luz laser.<sup>23,24</sup> Las ventajas de la ablación térmica sobre otros métodos convencionales son la flexibilidad, el bajo costo, y su mínima invasividad.<sup>25</sup> Sin embargo, la elección de una adecuada ruta de distribución del calor hacia el tumor es una preocupación vital y un desafío en la ablación térmica.<sup>26</sup> Además, los métodos existentes de calentamiento tienen dificultades para diferenciar tumores de tejido circundante sano, lo cual tiene como consecuencia el daño de las células vecinas.<sup>27</sup>

La terapia fototérmica (PTT, del inglés: Photothermal Therapy) es un uso experimental de la radiación electromagnética (más a menudo en forma de rayos infrarrojos) que se propone para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo cáncer. El modelo básico para su utilización se deriva en parte de la terapia fotodinámica, en el que un fotosensibilizador se excita con luz de banda específica. Esta activación lleva al sensibilizador a un estado excitado en el que luego libera energía por una vía de decaimiento no radiativa (calor). El calor es el método actual de la terapia que mata a las células diana.

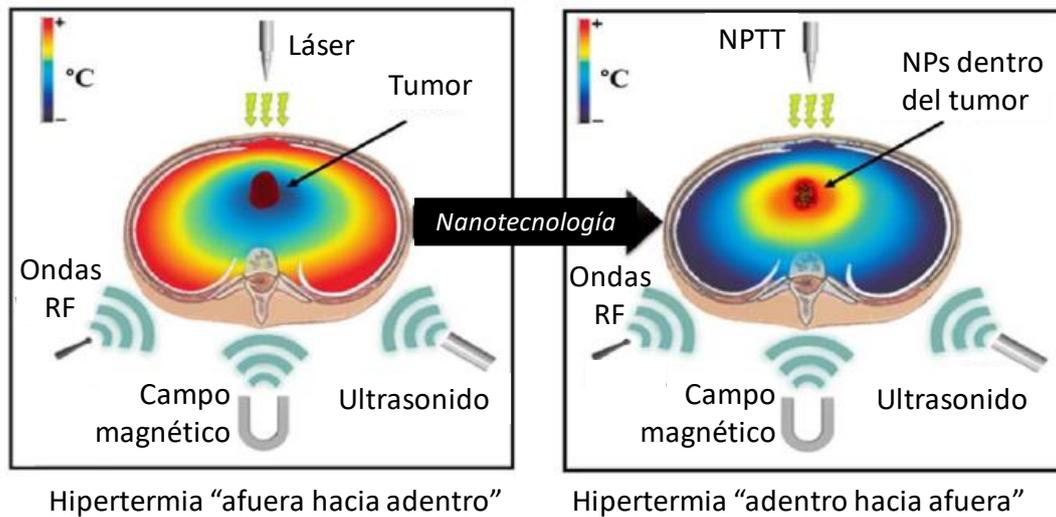
La terapia fototérmica, a diferencia de la PDT, no requiere oxígeno para interactuar con las células o tejidos. Estudios recientes también muestran que la terapia fototérmica es capaz de usar radiación NIR (NIR, del inglés: Near-Infrared), que es transparente para el tejido biológico, sangre y agua (ventanas terapéuticas). La primera ventana NIR corresponde al rango 650–850 nm, mientras que la segunda corresponde al rango 950–1350 nm. El uso de esta radiación permite una mayor penetración en el tejido, y además por ser menos energética resulta tanto menos dañina para las células y tejidos sanos.

La PTT basada en nanomateriales fotoabsorbentes ha sido sugerida como un procedimiento alternativo a los enfoques convencionales como la cirugía, terapia radiativa y la quimioterapia. Un agente fototérmico ideal puede transferir eficientemente la luz NIR absorbida en calor sin causar efectos secundarios tóxicos, lo cual es un prerrequisito para un tratamiento de PTT exitoso. Además, la combinación de la nanotecnología y la PTT surge como un método prometedor para superar las limitaciones más relevantes de las terapias térmicas convencionales.

La nanotecnología está ganando gran atención en el campo de la biomedicina debido a su posible aplicación en diagnóstico y técnicas de tratamiento.<sup>28,29,30,31</sup> Los nanomateriales, en particular los nanocompositos, ofrecen muchas ventajas por sobre los métodos convencionales. Debido a sus propiedades ópticas, los nanomateriales pueden provocar un incremento de temperatura en las regiones tumorales por la absorción de luz NIR.<sup>32,33</sup> Además, la funcionalización superficial de los nanomateriales permite que estos se unan específicamente a las células cancerígenas y esto permite la destrucción selectiva del tumor por calor y también la posibilidad multifuncional de obtención de imágenes.<sup>34,35</sup> Como se esquematiza en la figura 4, los nanomateriales permiten el incremento de temperatura en una zona específica de interés y previene la generación de calor en las regiones de los alrededores, mejorando así la selectividad del tratamiento.

El tratamiento de hipertermia tradicional contra el cáncer resulta en el daño térmico y temperaturas en el entorno de la matriz extracelular que van desde 41 a 48 °C. La muerte de las células cancerígenas con este tratamiento puede resultar del daño en la membrana celular, desnaturalización de las proteínas intracelulares, daño/impedimento en la síntesis de ARN/ADN, cambios en la expresión génica, y la

inducción de la muerte celular vía apoptosis.<sup>36</sup> Es probable que el calentamiento también aumente la susceptibilidad o sensibilidad de las células cancerígenas a otros tratamientos, incluyendo la radiación y quimioterapia.<sup>37</sup>



**Figura 4.** Distribución del calor liberado durante un proceso de hipertermia térmica en un tumor (izquierda) y un tumor conteniendo en su interior nanopartículas (derecha) que absorben energía de diferentes fuentes: radiofrecuencia, ultrasonido, campo magnético, láser (terapia fototérmica).<sup>26</sup>

Los efectos del calentamiento fototérmico pueden ser similares a los de la hipertermia tradicional. Sin embargo, considerando los debates en la literatura entre la muerte por apoptosis o necrosis, no es suficiente un solo mecanismo para describir los efectos de la terapia fototérmica con nanopartículas de oro.<sup>38</sup> La apoptosis, también llamada muerte celular programada, se caracteriza por la formación de ampollas en la membrana, fragmentación nuclear, y la formación de cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son reconocidos eventualmente por el sistema inmune y removidos por fagocitosis. La necrosis, originalmente pensada como una forma más pasiva de muerte celular, resulta de la toxicidad o el daño celular, y se caracteriza por el colapso de la membrana e hinchazón celular, resultando en la ruptura y liberación del contenido celular.<sup>39</sup>

## 1.5 Plasmónica

El efecto de superficies metálicas sobre los espectros ópticos depende fuertemente de la naturaleza de la superficie metálica y/o de las partículas metálicas. En general, los efectos más dramáticos se observan para coloides metálicos más que para superficies planas espejadas.<sup>40</sup>

Cuando la luz incidente interacciona con pequeñas partículas metálicas induce oscilaciones en sus electrones. El campo oscilante puede generar radiación de campo

lejano de la misma longitud de onda. El resultado es que la luz incidente es dispersada por los coloides. Sin embargo, la situación que aquí se plantea es un poco más compleja ya que estos coloides también pueden absorber parte de la luz.

Aquí introduciremos una de las excitaciones fundamentales de la plasmónica: los plasmones superficiales localizados (LSP, del inglés: localized surface plasmons). Estos son excitaciones no propagantes de los electrones de conducción de nanoestructuras metálicas acoplados al campo electromagnético. Estos modos surgen naturalmente del problema de dispersión de nanopartículas conductoras pequeñas, por debajo de la longitud de onda incidente, en un campo electromagnético oscilante. La superficie curva de las partículas ejerce una fuerza de restauración efectiva sobre los electrones dirigidos, de modo que surge una resonancia, llevando a una amplificación del campo a ambos lados y en la zona cercana al campo por fuera de la partícula. Esta resonancia se conoce como resonancia localizada superficial del plasmón (LSPR). Otra consecuencia de la superficie curva es que la resonancia del plasmón puede ser excitada por iluminación directa.

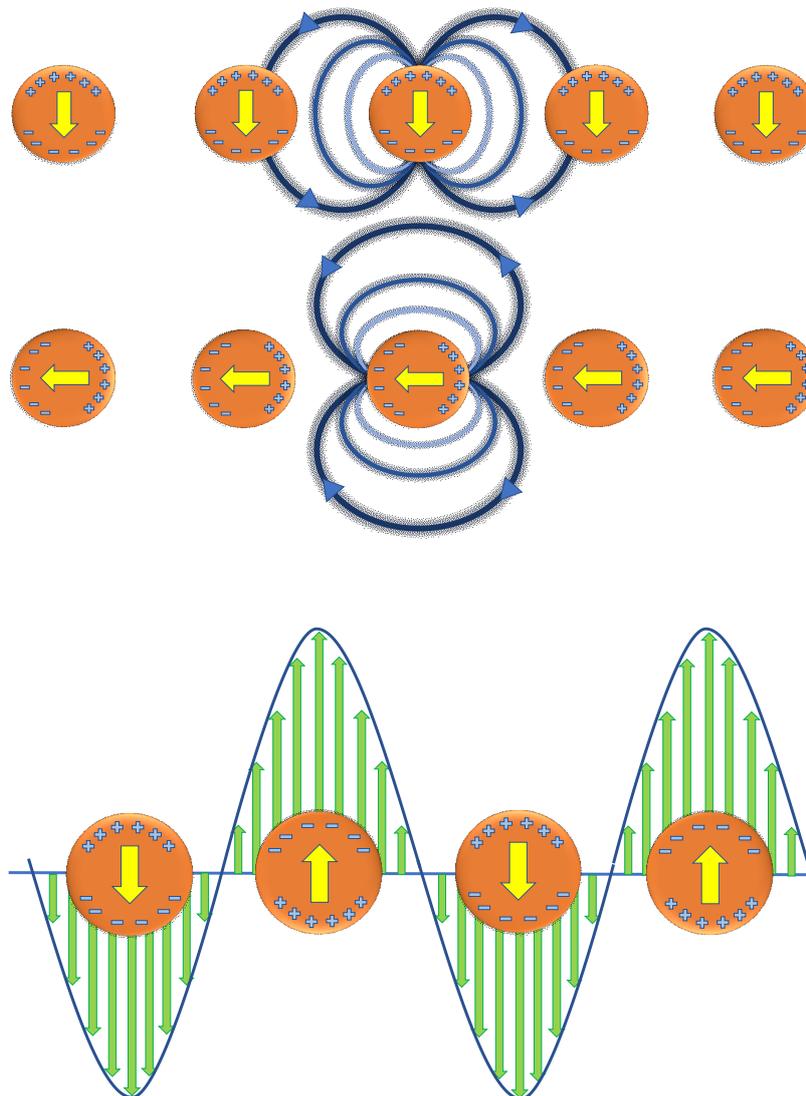
Para nanopartículas de oro y plata, esta resonancia cae dentro de la región visible del espectro electromagnético. Una consecuencia notable de esto son los colores brillantes exhibidos por las partículas tanto en luz transmitida y reflejada, debido al aumento resonante de la absorción y dispersión. A este efecto se le han encontrado aplicaciones durante muchos cientos de años, por ejemplo, en la tinción de vidrio para ventanas o copas ornamentales. Otras aplicaciones modernas de la resonancia localizada del plasmón son el incremento de emisión y el sensado óptico.

La teoría de dispersión y absorción de la radiación por pequeñas esferas predice el incremento del campo resonante debido a la resonancia de la polarizabilidad. Bajo estas circunstancias, las nanopartículas actúan como un dipolo eléctrico, absorbiendo y emitiendo resonantemente los campos electromagnéticos. Esta teoría de la resonancia del plasmón de la partícula dipolo es válida estrictamente para partículas extremadamente pequeñas; sin embargo, en la práctica, los cálculos de la teoría expresada anteriormente, provee una aproximación razonablemente buena para partículas esféricas o elipsoidales con dimensiones por debajo de los 100 nm que son iluminadas con radiación visible o infrarroja cercana.

Sin embargo, para partículas de mayores dimensiones, donde la aproximación cuasi estática no está justificada debido a los significantes cambios de fase del campo a lo largo del volumen de la partícula, se requiere un enfoque electrodinámico riguroso. En 1908, Mie desarrolló una teoría completa de la dispersión y la absorción de radiación electromagnética por una esfera, para entender los colores de las partículas de oro coloidales en solución.<sup>41</sup> Este abordaje, que ahora es conocido como la teoría de Mie, expande los campos internos y dispersados en un conjunto de modos normales descritos por armónicos vectoriales. Los resultados cuasi estáticos válidos para esferas

con tamaños por debajo de la longitud de onda incidente son entonces recuperados por una expansión de series de potencias de los coeficientes de absorción y dispersión.

Podemos resumir que la resonancia del plasmón de las partículas más allá del régimen cuasi estático es disminuido por dos procesos competitivos: un proceso de decaimiento radiativo en fotones, dominante en partículas grandes, y un proceso no radiativo debido a la absorción. El decaimiento no radiativo es debido a la creación de un par electrón-hueco tanto por excitaciones intrabanda dentro de la banda de conducción como por transiciones interbanda desde las bandas-d inferiores a la banda de conducción sp (para partículas metálicas).



**Figure 5.** Esquema de campo cercano acoplado entre nanopartículas metálicas para dos polarizaciones diferentes.

Una de las aplicaciones más espectaculares de la plasmónica hasta el día de hoy es la dispersión Raman aumentada por superficie (SERS, del inglés: Surface Enhanced Raman Scattering), la cual explota la generación de campos de luz altamente localizados en la

zona cercana de las nanoestructuras metálicas para el aumento espontáneo de la dispersión Raman de determinadas moléculas. Utilizando superficies de plata con rugosidades generadas químicamente, se registraron eventos de dispersión Raman de moléculas únicas<sup>42,43</sup> con aumentos estimados de la sección transversal de la dispersión por factores por encima de  $10^{14}$ . La mayor parte de este incremento se cree que surge de los campos altamente aumentados en las uniones de las nanopartículas metálicas debido a las LSPR. Llamados puntos calientes, estos campos altamente confinados también permiten un incremento de la emisión de fluorescencia, aunque con factores de aumento mucho más modestos. Un entendimiento y control apropiado sobre la generación de estos puntos calientes, por ejemplo, en la formación de cavidades plasmónicas en la nanoescala, es actualmente uno de los principales desafíos detrás del diseño de nanopartículas ensambladas con propiedades ópticas sintonizadas.

El camino libre medio de un electrón (la distancia media que alcanza a recorrer un electrón entre dos colisiones) en el oro es de alrededor de 50 nm; consecuentemente, las colisiones entre los electrones de la banda de conducción con la superficie de la nanopartícula de oro son fuertemente dependientes del diámetro de la partícula (lo mismo ocurre para la plata). Por lo tanto, la longitud de onda del LSPR ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) y la sección eficaz de extinción molar de los coloides de nanopartículas metálicas dependen de la forma y el tamaño.<sup>44</sup> La LSPR es altamente sensible al recubrimiento y al medio dieléctrico de los alrededores, especialmente al índice de refracción en la superficie de la nanopartícula.<sup>45,46,47</sup> La absorción óptica puede ser entonces ajustada desde el visible al infrarrojo cercano (NIR) y esto ha sido establecido tanto experimental como teóricamente.<sup>48</sup> En nanopartículas anisotrópicas, la banda de resonancia del plasmón puede separarse en varios picos debido a la oscilación de los electrones a lo largo de cada uno de los ejes.

La fuerte absorción óptica y la subsecuente disipación de energía no-radiativa permite la aplicación de las nanopartículas de oro en la terapia fototérmica plasmónica. Link y colaboradores<sup>49</sup> describieron el proceso de calentamiento fototérmico en nanopartículas de oro, el cual fue observado usando espectroscopía femtosegundo de absorción de transientes. Los pulsos de laser NIR absorbidos por las nanopartículas de oro excitan los electrones libres de la banda del plasmón, creando un pulso de electrones calientes. El pulso de electrones calientes se enfría rápidamente a través de interacciones electrón-fonón por choques con la estructura cristalina del oro, calentándola miles de grados (dependiendo de la potencia del láser) en  $\sim 1$  ps. El calor es luego transferido desde la nanopartícula a los alrededores a través de interacciones fonón-fonón en una escala de tiempo de  $\sim 100$  ps, resultando en un incremento de la temperatura del medio circundante de decenas de grados.

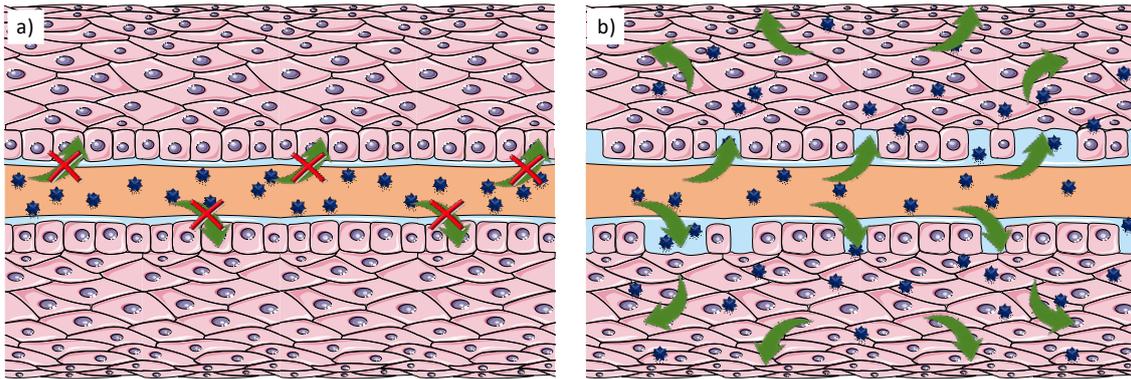
Dado que el proceso fototérmico requiere la absorción de luz, la extinción de las nanopartículas (el término extinción se refiere a la atenuación de la luz a medida que atraviesa una muestra. La extinción se debe tanto a la absorción como a la dispersión de

la luz) influye en los cambios resultantes del aumento de temperatura del entorno. La sección eficaz de extinción de las nanopartículas de oro en el NIR es  $10^8$ – $10^{10}$   $M^{-1}cm^{-1}$ , varios órdenes de magnitud superior que el del cromóforo orgánico de mayor absorción.<sup>50</sup> La absorbancia es generalmente el mayor contribuyente de la extinción, y dado que las nanopartículas de oro pequeñas usualmente tienen mayor sección eficaz de absorción que las nanopartículas grandes (la contribución de la dispersión aumenta con el tamaño de las nanopartículas), estas pueden ser “nanocalentadores” más eficientes. Por otra parte, la LSPR de las nanopartículas de oro pueden ajustarse a una longitud de onda deseada para maximizar la absorción de la luz. Esto es especialmente útil en regiones tales como la “ventana del agua” (o “ventana terapéutica”, como se la mencionó anteriormente) donde los tejidos corporales son ópticamente más transparentes (700–1200 nm), haciendo posible el calentamiento de las nanopartículas de oro in vivo.<sup>48</sup>

## 1.6 Nanotecnología aplicada a sistemas biológicos.

El tamaño y la forma de las nanopartículas son factores críticos que determinan su desempeño: la habilidad de penetrar los vasos sanguíneos, alcanzar la región deseada, afectar la velocidad de internalización por los macrófagos, y finalmente ser eliminadas del cuerpo. Por ejemplo, nanopartículas más grandes que 10 nm serán demasiado grandes para salir a través de los capilares normales.<sup>51</sup> Además, el transporte de nanopartículas más pequeñas exhibe velocidades de difusión relativamente mayores, lo cual les permiten moverse lateralmente en los vasos sanguíneos con gran facilidad. Sin embargo, las partículas más grandes pueden penetrar el tumor a través de los espacios presentes entre las células epiteliales de la vasculatura tumoral permeable y permanecen ahí por un largo período de tiempo por el efecto de aumento de la permeabilidad y retención (EPR del inglés: Enhanced Permeability and Retention). Principalmente, este efecto es beneficioso para distribuir nanopartículas cargadas con una droga. Las nanopartículas más grandes pueden permear y acumularse en el sitio del tumor por un tiempo largo, causando el efecto del tratamiento y evitando los efectos secundarios debidos a que no penetran el tejido normal. La desventaja del efecto EPR es la heterogeneidad en los huecos intersticiales, la cual afecta la penetración y distribución uniforme de las nanopartículas dentro del tumor.<sup>52,53</sup> Nanomateriales de diferentes formas tienen diferentes áreas activas, lo cual resulta en variaciones en la circulación en sangre, y en la habilidad de unirse a receptores de membrana. De esta manera, la forma de los nanomateriales afecta la eficiencia terapéutica.<sup>52</sup>

Además, las propiedades de la química superficial de las nanopartículas y su cobertura juegan un rol crucial en la interacción con las células cancerígenas. Notablemente, se considera que los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas son los factores que determinan la solubilidad, interacción, y la unión a las células.



**Figura 6.** Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR). La figura 6a representa la vasculatura del tejido normal, mientras que la imagen 6b esquematiza la vasculatura endeble y permeable del tejido tumoral y como las partículas de gran tamaño pueden trasvasarse a las células cancerígenas.

Dependiendo de la cobertura superficial, las nanopartículas pueden definirse como positiva o negativamente cargadas. Las nanopartículas positivamente cargadas son las más beneficiosas para el pasaje a través de las barreras de la membrana celular (ya que, al estar compuesta por fosfolípidos, estas presentan una carga negativa debido a los grupos fosfato) y se concentran en el citosol o el núcleo.<sup>54</sup>

La funcionalización activa es efectiva en el incremento de la unión/internalización de nanopartículas de oro en las células *in vitro*, pero *in vivo* la acumulación dentro del tumor es menor al 10% de la dosis intravenosa.<sup>55,56</sup> Una razón para la limitación en la incorporación en el tumor es la fuerte acumulación de las nanopartículas por parte del sistema fagocítico mononuclear (antiguamente llamado sistema retículo-endotelial).<sup>57</sup> Los monocitos, células dendríticas, y macrófagos, las cuales están presentes en el hígado, bazo, y la sangre, secuestran nanopartículas mayores a 100 nm. Las partículas menores a ~5 nm son eliminadas rápidamente por los riñones. Un gran porcentaje de partículas entre ~5–100 nm pueden también ser incorporadas por macrófagos, pero es probable que no en el mismo grado que las partículas más grandes. Es sabido que los ligandos específicos de direccionamiento previenen la incorporación de las NPs por parte de los macrófagos, pero se cree que la PEGilación de las partículas disminuye la internalización por parte del sistema fagocítico mononuclear.<sup>58</sup> Esta suposición se basa en la vasta mayoría de nanopartículas que se encontraron *in vivo* en el hígado y el bazo, salvo diferencias según el diseño de las nanopartículas. Es posible que otra razón para la limitación en la acumulación en el tumor sea la formación de una corona de proteínas alrededor de las nanopartículas de oro en matrices fisiológicas y biológicas. La unión de proteínas sobre la superficie de las nanopartículas, lo que resulta en la formación de una corona “dura” más interna y otra “blanda” más externa, está muy bien documentada en la literatura y es un área actual de interés en investigación.<sup>59</sup> La habilidad para entender la adsorción de proteínas a varias construcciones de nanopartículas quizás permita a los científicos predecir mejor y potencialmente controlar la “cara” que

presentan las nanopartículas y, entonces, su destino en el entorno fisiológico.<sup>60</sup> Sin embargo, las coronas de proteínas de las nanopartículas también se vuelven más complicadas in vivo. La corona biomolecular podría jugar un rol en la reducción de la efectividad de los agentes diana en la unión a las células cancerígenas debido a que las proteínas hacen de escudo de los ligandos y reducen su función de direccionamiento.<sup>61</sup> Por lo tanto, mientras que el direccionamiento activo al tumor puede mejorar la acumulación intracelular de las nanopartículas, el efecto de la acumulación en el seno del tumor es baja y quizás no valga la pena el esfuerzo involucrado.<sup>62</sup>

En conjunto, estos estudios demuestran que el diseño de las nanopartículas de oro parece afectar su biodistribución y por lo tanto el éxito de la terapia fototérmica in vivo. Solo uno de estos estudios in vivo mencionados realiza una inyección intratumoral, y la mayoría de los investigadores inyectan las nanopartículas de oro de manera intravenosa, confiando en el efecto de EPR para incrementar la acumulación en el tumor.

Las estrategias en la forma, el tamaño, los ligandos de direccionamiento, y la dosis parece influenciar si las nanopartículas se extravasan en los tumores, se acumulan en el hígado/bazo, o si son eliminadas por los riñones. Además, la localización de las nanopartículas en un tumor es un factor a tener en cuenta dado que aquellas nanopartículas que viajan al centro del tumor son efectivas en el proceso de destrucción fototérmica del tumor. Sin embargo, a pesar de que el efecto EPR es bien conocido en tumores, también se sabe que no ocurre en todo el tumor, que además es heterogéneo y que pareciera estar limitado dado que usualmente menos del 10% de las nanopartículas inyectadas de manera intravenosa en realidad terminan en el tumor. Las nanopartículas se extravasan dentro de los tumores debido a la permeabilidad de la vasculatura, pero los tamaños de los poros en el tumor pueden variar dependiendo del tipo de cáncer, el tamaño del tumor, y el estado del tumor (primario o metastático).

## 1.7 Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud. Cáncer. Available at: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>, . (Accessed: 22nd January 2020)
2. Instituto Nacional del Cáncer. Available at: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>. (Accessed: 22nd January 2020)
3. Instituto Nacional del Cáncer. Argentina.gob.ar. Available at: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>. (Accessed: 22nd October 2020)
4. Hergt, R., Dutz, S., Müller, R. & Zeisberger, M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys.*

- Condens. Matter* (2006). doi:10.1088/0953-8984/18/38/S26
5. Ren, Y., Qi, H., Chen, Q. & Ruan, L. Thermal dosage investigation for optimal temperature distribution in gold nanoparticle enhanced photothermal therapy. *Int. J. Heat Mass Transf.* (2017). doi:10.1016/j.ijheatmasstransfer.2016.10.067
  6. Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* (2002).
  7. Hill, M. D. Daniell, J. S. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. *Aust. N. Z. J. Surg.* (1991).
  8. Moan, J. & Peng, Q. An Outline of the Hundred-Year History of PDT. *Anticancer Research* (2003).
  9. McDonagh, A. F. Phototherapy: From ancient egypt to the new millennium. *J. Perinatol.* (2001). doi:10.1038/sj.jp.7210625
  10. Needham, J. *Science and Civilisation in China Vol.2 History of Scientific Thought.* Cambridge Univ. Press, London (1963).
  11. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA. Cancer J. Clin.* (2011). doi:10.3322/caac.20114
  12. Roberts, D. The healing sun: Sunlight and health in the 21st century. *Int. J. Epidemiol.* (2001). doi:10.1093/ije/30.3.632-a
  13. FAHMY, I. R. & ABU-SHADY, H. The isolation and properties of ammoidin, ammidin and majudin, and their effect in the treatment of leukodermia. *Q. J. Pharm. Pharmacol.* (1948).
  14. Koeing, C. *Specialized Hydro-, Balneo- and Medicinal Bath Therapy.* (2005).
  15. Abdel-Kader, M. H. History of photodynamic therapy. in *Photodynamic Therapy: From Theory to Application* (2014). doi:10.1007/978-3-642-39629-8\_1
  16. Finsen, N. R. Remarks on the red-light treatment of small-pox. *Br. Med. J.* (1903). doi:10.1136/bmj.1.2214.1297
  17. Brancalion, L. & Moseley, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* (2002). doi:10.1007/s101030200027
  18. Chen, J. *et al.* New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. *Cancer Journal* (2002). doi:10.1097/00130404-200203000-00009
  19. Dougherty T., Gomer C., Henderson B., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., P. Q. P. T. Review - Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* (1998).
  20. Huang, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment* (2005). doi:10.1177/153303460500400308
  21. Allison, R. R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2004). doi:10.1016/S1572-1000(04)00007-9
  22. Nyokong, T. & Ahsen, V. *Photosensitizers in medicine, environment, and security.*

- Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security* (2012).  
doi:10.1007/978-90-481-3872-2
23. Ahmed, M., Brace, C. L., Lee, F. T. & Goldberg, S. N. Principles of and advances in percutaneous ablation. *Radiology* (2011). doi:10.1148/radiol.10081634
  24. Schena, E., Saccomandi, P. & Fong, Y. Laser Ablation for Cancer: Past, Present and Future. *J. Funct. Biomater.* (2017). doi:10.3390/jfb8020019
  25. Carrafiello, G. *et al.* Microwave tumors ablation: Principles, clinical applications and review of preliminary experiences. *Int. J. Surg.* (2008). doi:10.1016/j.ijsu.2008.12.028
  26. Beik, J. *et al.* Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release* (2016). doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.062
  27. Day, E. S., Morton, J. G. & West, J. L. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *Journal of Biomechanical Engineering* (2009). doi:10.1115/1.3156800
  28. Mansoori, G. A., Mohazzabi, P., McCormack, P. & Jabbari, S. Nanotechnology in cancer prevention, detection and treatment: Bright future lies ahead. *World Review of Science, Technology and Sustainable Development* (2007). doi:10.1504/WRSTSD.2007.013584
  29. Bañobre-López, M., Teijeiro, A. & Rivas, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* (2013). doi:10.1016/j.rpor.2013.09.011
  30. Lu, B. Q., Zhu, Y. J., Ao, H. Y., Qi, C. & Chen, F. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide/calcium silicate mesoporous nanocomposites as a promising vehicle for drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2012). doi:10.1021/am3021284
  31. Fekrazad, R., Naghdi, N., Nokhbatolfoghahaei, H. & Bagheri, H. The combination of laser therapy and metal nanoparticles in cancer treatment originated from epithelial tissues: A literature review. *Journal of Lasers in Medical Sciences* (2016). doi:10.15171/jlms.2016.13
  32. Manthe, R. L., Foy, S. P., Krishnamurthy, N., Sharma, B. & Labhasetwar, V. Tumor ablation and nanotechnology. *Molecular Pharmaceutics* (2010). doi:10.1021/mp1001944
  33. Jordan, A. *et al.* Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* (2009). doi:10.3109/02656730903287790
  34. Letfullin, R. R., Iversen, C. B. & George, T. F. Modeling nanophotothermal therapy: Kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2011). doi:10.1016/j.nano.2010.06.011
  35. Wang, C. & Irudayaraj, J. Multifunctional magnetic-optical nanoparticle probes

- for simultaneous detection, separation, and thermal ablation of multiple pathogens. *Small* (2010). doi:10.1002/sml.200901596
36. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2002). doi:10.1016/S1040-8428(01)00179-2
  37. Jaque, D. *et al.* Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* (2014). doi:10.1039/c4nr00708e
  38. Melamed, J. R., Edelstein, R. S. & Day, E. S. Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS Nano* (2015). doi:10.1021/acs.nano.5b00021
  39. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* (2004). doi:10.1016/j.ceb.2004.09.011
  40. Weitz, D. A., Gersten, J. I., Garoff, S., Hanson, C. D. & Gramila, T. J. Fluorescent lifetimes of molecules on silver-island films. *Opt. Lett.* (1982). doi:10.1364/ol.7.000089
  41. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* (1908). doi:10.1002/andp.19083300302
  42. Kneipp, K. *et al.* Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* (1997). doi:10.1103/PhysRevLett.78.1667
  43. Nie, S. & Emory, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* (80-. ). (1997). doi:10.1126/science.275.5303.1102
  44. Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212–4217 (1999).
  45. Miller, M. M. & Lazarides, A. A. Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* (2005). doi:10.1021/jp054227y
  46. Mulvaney, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir* (1996).
  47. Underwood, S. & Mulvaney, P. Effect of the Solution Refractive Index on the Color of Gold Colloids. *Langmuir* (1994). doi:10.1021/la00022a011
  48. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *J. Phys. Chem. B* (2006). doi:10.1021/jp057170o
  49. Link, S. & El-Sayed, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry* (2000). doi:10.1080/01442350050034180

50. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* (2008). doi:10.1007/s10103-007-0470-x
51. Toy, R., Peiris, P. M., Ghaghada, K. B. & Karathanasis, E. Shaping cancer nanomedicine: The effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine* (2014). doi:10.2217/nnm.13.191
52. Gui, C. & Cui, D. X. Functionalized gold nanorods for tumor imaging and targeted therapy. *Cancer Biol. Med.* (2012). doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2012.04.002
53. Gajbhiye, K. R. & Gajbhiye, J. M. EPR effect based nanocarriers targeting for treatment of cancer. *Int. J. Drug Deliv.* (2017). doi:10.5138/09750215.1974
54. Verma, A. & Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* (2010). doi:10.1002/smll.200901158
55. Huang, X. *et al.* A reexamination of active and passive tumor targeting by using rod-shaped gold nanocrystals and covalently conjugated peptide ligands. *ACS Nano* (2010). doi:10.1021/nn102055s
56. Chanda, N. *et al.* Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010). doi:10.1073/pnas.1002143107
57. Kai, M. P. *et al.* Tumor presence induces global immune changes and enhances nanoparticle clearance. *ACS Nano* (2016). doi:10.1021/acsnano.5b05999
58. García, K. P. *et al.* Zwitterionic-coated ‘stealth’ nanoparticles for biomedical applications: Recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system. *Small* (2014). doi:10.1002/smll.201303540
59. Lundqvist, M. *et al.* Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008). doi:10.1073/pnas.0805135105
60. Lin, W. *et al.* Control of Protein Orientation on Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* (2015). doi:10.1021/acs.jpcc.5b07701
61. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews* (2012). doi:10.1039/c1cs15233e
62. Cheng, Z., Al Zaki, A., Hui, J. Z., Muzykantov, V. R. & Tsourkas, A. Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* (2012). doi:10.1126/science.1226338



---

## Capítulo 2

# ***OBJETIVOS GENERALES***



## 2.1 Objetivos generales

En esta tesis nos proponemos desarrollar nanomateriales híbridos de sílice con recubrimiento de metales nobles (Ag y Au) para poder ser utilizados en terapias alternativas contra tumores: la terapia fotodinámica y terapia fototérmica.

Intentaremos obtener estos materiales a partir de dos metodologías de síntesis diferentes. Por un lado, una estrategia de síntesis fotoquímica utilizando como agente fotorreductor al I-2959 para generar las nanopartículas metálicas en la superficie de la sílice. Por otro lado, ensamblaremos las nanoestrellas de oro sobre esferas de SiO<sub>2</sub> por el método capa por capa, utilizando un polielectrolito positivo y otro negativo, lo cual nos permitirá también incorporar el fotosensibilizador Indocianina verde a nuestro sistema.

Estudiaremos el efecto de estos nanomateriales en la fotofísica de colorantes en suspensión y en la generación de especies reactivas de oxígeno, así como su efecto en la viabilidad de células cancerígenas, al ser irradiadas con luz visible o NIR.

## 2.2 Objetivos específicos del capítulo 3

- (1) Sintetizar y caracterizar nanopartículas (NPs) de sílice con revestimientos de metales nobles (Ag y Au).
- (2) Examinar el efecto de la presencia de dispersiones de los nanomateriales sobre la fluorescencia, fosforescencia y el rendimiento cuántico de generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\phi_{\Delta}$ ) de sensibilizadores orgánicos.
- (3) Obtener información sobre la generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de fotosensibilizadores en solución junto con suspensiones de nanopartículas coloidales.

## 2.3 Objetivos específicos del capítulo 4

- (1) Sintetizar y caracterizar nanopartículas híbridas de sílice y nanoestrellas de oro, cargadas con el colorante Indocianina Verde, por el método de ensamblado capa por capa.
- (2) Obtener información cinética sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la producción de aumento de temperatura de suspensiones de las nanopartículas cargadas con la droga.

- (3) Investigar mediante espectroscopías confocal y de fluorescencia la localización celular de los nanomateriales.
- (4) Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas mediante ensayos de viabilidad celular MTT y Rojo Neutro.
- (5) Estudiar el efecto fotodinámico y fototérmico de los nanomateriales incubados en células tumorales, bajo irradiación con luz NIR durante diferentes tiempos.



---

## Capítulo 3

# ***NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON REVESTIMIENTO DE METALES NOBLES: SÍNTESIS FOTOQUÍMICA***



## 3.1 Introducción

### 3.1.1 Efecto del LSPR sobre la fotofísica de colorantes orgánicos

Las oscilaciones colectivas de los electrones en nanoestructuras metálicas o resonancia localizada superficial del plasmón (LSPR, del inglés: localized surface plasmon resonance) puede afectar fuertemente la dinámica de los estados excitados singlete y triplete de moléculas orgánicas.<sup>1,2</sup> Debido al LSPRs, las nanopartículas (NPs) metálicas pueden interactuar intensamente con moléculas orgánicas adyacentes a través de diferentes mecanismos, incluyendo transferencia electrónica, transferencia de energía, y afectando tanto los procesos de desactivación radiativa y no radiativa de los estados excitados de las moléculas orgánicas.<sup>3,4</sup> Pacioni y colaboradores reportaron el incremento en el rendimiento cuántico del estado triplete del azul de metileno por NPs de oro.<sup>2</sup> El incremento del rendimiento cuántico del triplete de fotosensibilizadores orgánicos en los alrededores de las NPs metálicas pueden conducir al proceso conocido como producción de oxígeno singlete aumentada por metales, el cual puede ser aplicado para tratamiento de tumores en la terapia fotodinámica.<sup>5</sup>

#### 3.1.1.1 Fluorescencia aumentada por metales (MEF, del inglés: Metal Enhanced Fluorescence)

Un fluoróforo en el estado excitado tiene las propiedades de un dipolo oscilante. El fluoróforo excitado puede inducir oscilaciones de los electrones de un metal ubicado en las cercanías de la molécula orgánica. El campo eléctrico creado por el metal, a causa de esta oscilación, puede interactuar con el estado excitado del fluoróforo y alterar su emisión. Esta interacción es casi siempre bidireccional de modo que las oscilaciones inducidas por la luz en el metal pueden afectar al fluoróforo. Las interacciones de fluoróforos con superficies metálicas pueden tener numerosos efectos útiles, incluyendo aumentos de rendimientos cuánticos, incremento en la fotoestabilidad, aumento en las distancias para transferencia de energía resonante de Förster (FRET), y disminución de los tiempos de vida. Estos cambios pueden resultar en incrementos de sensibilidad, fotoestabilidad, y disminución de interferencias de emisión de fondo no deseadas.

Generalmente las medidas de fluorescencia se realizan en soluciones macroscópicas, o por lo menos macroscópicas en comparación con el tamaño del fluoróforo. Las soluciones son típicamente transparentes a la radiación emitida. En soluciones homogéneas, los fluoróforos emiten en espacio libre (cuando hablamos de espacio libre nos referimos a un medio transparente, no conductor) y la radiación emitida se observa en el campo lejano. Efectos locales debido a superficies no son observados usualmente

debido al pequeño tamaño de los fluoróforos en relación con el volumen experimental. Las propiedades espectrales del fluoróforo en el estado excitado están bien descritas por las ecuaciones de Maxwell para un dipolo oscilante radiante en espacio libre y detectada su radiación de campo lejano como luz.

Los efectos de una superficie, cercana a una molécula fluorescente, altera las condiciones de “espacio libre”, y modifica las contrapartes de espacio libre en las ecuaciones de Maxwell. Un fluoróforo es un dipolo oscilante, como una antena radiante, pero uno que oscila a altas frecuencias e irradia longitudes de onda corta. Superficies metálicas cercanas pueden responder al dipolo oscilante y modificar la velocidad de emisión y la distribución espacial de la energía irradiada. El campo eléctrico que percibe el fluoróforo se ve afectado por las interacciones de la luz incidente con la superficie metálica próxima y también por la interacción del dipolo oscilante (fluoróforo excitado) con la superficie del metal. Adicionalmente, el dipolo oscilante induce un campo en el metal. Estas interacciones pueden incrementar o disminuir la incidencia del campo sobre el fluoróforo e incrementar o disminuir la tasa de decaimiento radiativo.

En primera instancia parece inusual considerar la utilización de superficies metálicas para aumentar la fluorescencia. Es sabido que los metales desactivan la fluorescencia. Por ejemplo, superficies de plata de 5 nm de espesor se utilizan en microscopía para desactivar la emisión de regiones cercanas al metal. Ahora sabemos que los metales pueden también aumentar la fluorescencia a través de varios mecanismos. Las partículas metálicas pueden causar incrementos en las tasas de excitación debido a un campo eléctrico más concentrado alrededor de la partícula. Los metales también pueden aumentar las velocidades de decaimiento radiativo ( $\Gamma$ ). Sin embargo, la física es compleja y no siempre es claro quien está emitiendo la luz: si el fluoróforo o el metal.

En ausencia de metales el rendimiento cuántico y los tiempos de vida de fluorescencia vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$Q_0 = \frac{\Gamma}{(\Gamma + k_{nr})} \quad (E1)$$

$$\tau_0 = (\Gamma + k_{nr})^{-1} \quad (E2)$$

donde  $\Gamma$  y  $k_{nr}$  son las constantes de velocidad del decaimiento radiativo y no radiativo, respectivamente.<sup>6</sup>

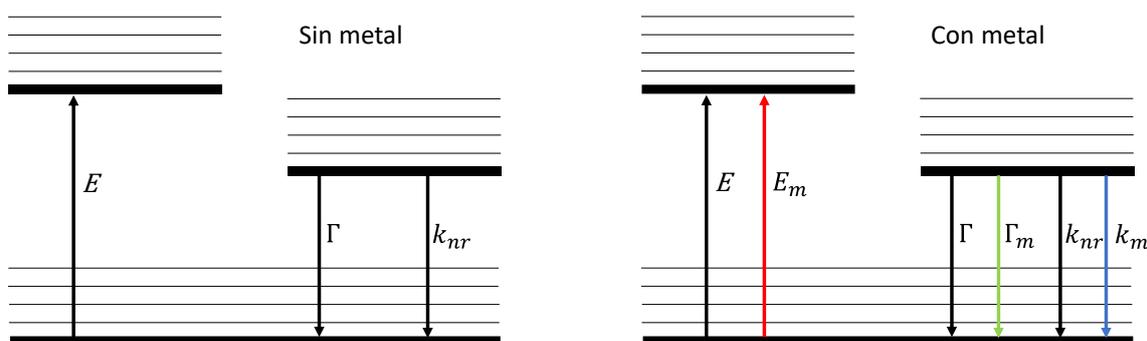
Sabemos que la constante de velocidad de decaimiento radiativo ( $\Gamma$ ) está determinada por el coeficiente de extinción del fluoróforo. Los coeficientes de extinción no cambian sustancialmente en diferentes entornos. De manera similar, las constantes de decaimiento radiativo permanecen prácticamente iguales en la mayoría de las condiciones. Los cambios en el rendimiento cuántico o en el tiempo de vida que presentan los fluoróforos en diferentes entornos son debido a cambios en las constantes de decaimiento no radiativo.

Ahora consideremos el efecto del metal. Si la presencia del metal resulta en un incremento en la tasa de excitación ( $E + E_m$ ), esto resultara en un aumento en el brillo, pero sin cambios en el rendimiento cuántico o el tiempo de vida. Este es un efecto útil ya que permite disminuir las intensidades de radiación incidente y disminuir el fondo. La excitación aumentada por metales puede resultar también en una excitación selectiva de un fluoróforo cercano al metal. Otro efecto posible es un incremento en la velocidad de decaimiento radiativo (Figura 1). En este caso el rendimiento cuántico y el tiempo de vida del fluoróforo en la cercanía de la superficie metálica viene dado por<sup>6</sup>

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{(\Gamma + \Gamma_m + k_{nr})} \quad (E3)$$

$$\tau_m = (\Gamma + \Gamma_m + k_{nr})^{-1} \quad (E4)$$

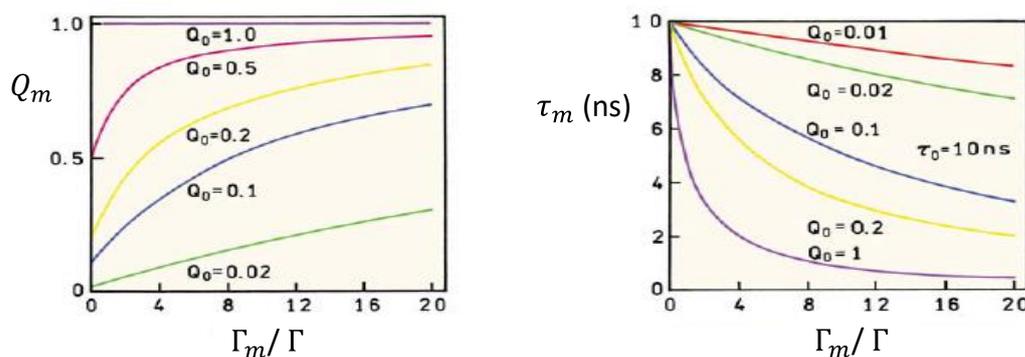
Estas ecuaciones resultan en predicciones inusuales para un fluoróforo cerca de una superficie metálica. A medida que el valor de  $\Gamma_m$  aumenta el rendimiento cuántico se incrementa mientras que el tiempo de vida disminuye.



**Figura 1.** Diagramas de Jablonski para los procesos fotofísicos que tienen lugar en la irradiación de colorantes orgánicos en ausencia y en presencia de metales.

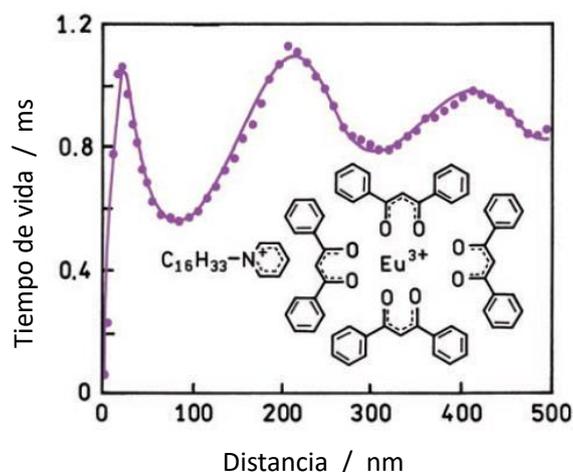
Acabamos de decir que un incremento en  $\Gamma_m$  disminuye el tiempo de vida. Una disminución en el tiempo de vida está asociada, generalmente, a una disminución en el rendimiento cuántico. Sin embargo, esto es a causa de que la disminución en el tiempo de vida se debe en su mayoría a un incremento en  $k_{nr}$ .

Cuando la velocidad de decaimiento radiativo total,  $\Gamma_T = \Gamma + \Gamma_m$ , aumenta el rendimiento cuántico también aumenta. Este incremento ocurre porque más moléculas de fluoróforo emiten antes de que puedan decaer a través de una vía no radiativa. El efecto es mayor para fluoróforos con bajos rendimientos cuánticos debido a que el incremento en  $\Gamma_m$  no tiene efecto en  $Q$  si este es muy próximo a la unidad (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto del incremento en la constante de velocidad del decaimiento radiativo ( $\Gamma_m$ ) sobre el rendimiento cuántico ( $Q_m$ ) y el tiempo de vida ( $\tau_m$ ) de fluorescencia.<sup>7</sup>

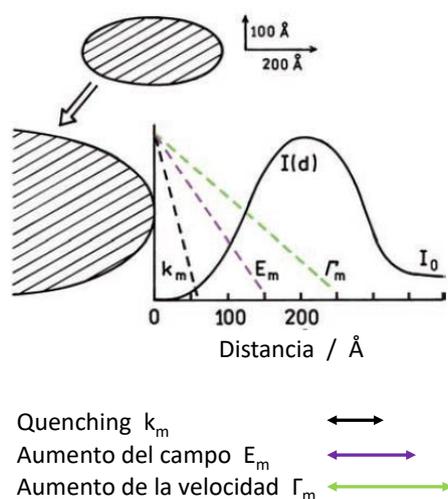
La posibilidad de alterar las constantes de decaimiento radiativo fue demostrada experimentalmente midiendo los tiempos de decaimiento de complejos de europio ( $\text{Eu}^{+3}$ ) posicionados a varias distancias desde un espejo plano de plata.<sup>8,9,10,11</sup> En un espejo, la lámina metálica es continua y más gruesa que la longitud de onda óptica. Los tiempos de vida oscilan con respecto a la distancia, pero permanecen como una exponencial simple para cada distancia. Este efecto puede explicarse por los cambios en la fase del campo reflejado con la distancia y los efectos de este campo cercano reflejado sobre el fluoróforo. Los cambios en el tiempo de vida con la distancia no son a causa de interacciones entre el fluoróforo con los fotones emitidos. La disminución en el tiempo de vida se observa cuando el campo reflejado está en fase con el dipolo oscilante del fluoróforo excitado. Un incremento en el tiempo de vida se encuentra si el campo reflejado está fuera de fase respecto al dipolo oscilante. A medida que aumenta la distancia, la amplitud de las oscilaciones disminuye (Figura 3). Los efectos de un espejo plano ocurren por encima de distancias comparables con las longitudes de onda de excitación y emisión. A distancias cortas, por debajo de 20 nm, la emisión es desactivada.



**Figura 3.** Tiempo de vida de iones  $\text{Eu}^{+3}$  frente a un espejo de plata en función de la separación entre los iones europio y el espejo metálico. La curva sólida corresponde a un ajuste teórico.<sup>6</sup>

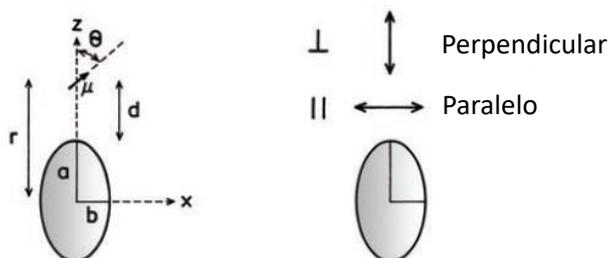
Si bien los detalles no se conocen con certeza, es probable que haya tres interacciones dominantes entre el fluoróforo y los metales dependiendo de la distancia a la que se encuentren uno del otro (Figura 4). Los fluoróforos pueden ser desactivados a cortas distancias respecto del metal ( $k_m$ ). A medida que se aleja de la superficie metálica, el fluoróforo puede sufrir un incremento en la tasa de excitación ( $E_m$ ), efecto conocido como “pararrayos”, y a distancias mayores puede ocurrir un incremento de la velocidad de decaimiento radiativo ( $\Gamma_m$ ).

Las interacciones entre fluoróforos y coloides metálicos han sido consideradas teóricamente.<sup>12,13,14,15</sup> Un típico modelo teórico se esquematiza en la figura 5.



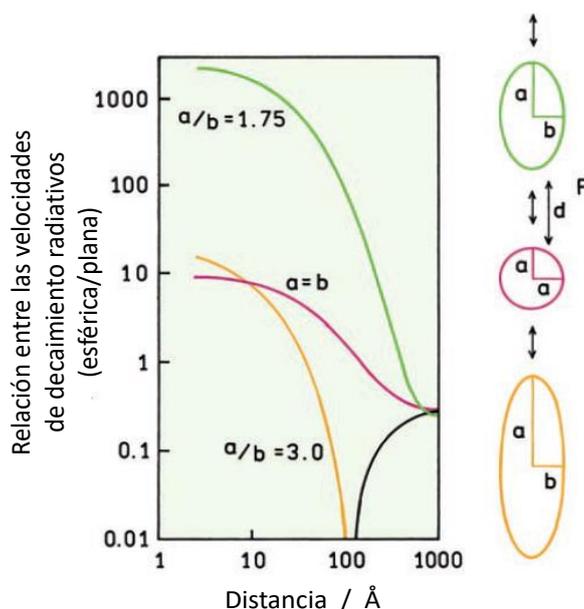
**Figura 4.** Efecto de una partícula metálica sobre las transiciones de un fluoróforo. Las partículas metálicas pueden causar quenching ( $K_m$ ), concentrar el campo de la luz incidente ( $E_m$ ), y pueden aumentar la velocidad de decaimiento radiativo ( $\Gamma_m$ ).<sup>6</sup>

En este caso se asume que la partícula es un elipsoide metálico con un fluoróforo posicionado cerca de la partícula. La molécula está localizada fuera de la partícula a una distancia  $r$  del centro del elipsoide y una distancia  $d$  de la superficie. El fluoróforo se encuentra sobre el eje mayor y puede estar orientado de manera paralela o perpendicular a la superficie metálica (Figura 5).



**Figura 5.** Diseño teórico para el estudio de un fluoróforo próximo a un esferoide metálico.

Como podemos observar en la Figura 6, el efecto más importante ocurre para un fluoróforo alineado a lo largo del eje mayor y de manera perpendicular a la superficie del esferoide con una relación de aspecto  $a/b = 1,75$ . En este caso, la constante de velocidad de decaimiento radiativo puede incrementarse en un factor de 1000 veces o más. Este efecto es mucho menor para una partícula esférica ( $a/b = 1,0$ ) y para un esferoide más elongado ( $a/b = 3,0$ ). Para este último esferoide la transición óptica no está en resonancia con el fluoróforo. En este caso la constante de decaimiento radiativo puede disminuir más de 100 veces. Si el fluoróforo experimenta un aumento en el rendimiento cuántico o un menor valor de  $k_{nr}$ , este efecto podría resultar en tiempos de vida más largos. La magnitud de estos efectos depende de la localización del fluoróforo alrededor de la partícula y de la orientación de su momento dipolar relativo a la superficie metálica. El efecto dominante de la orientación perpendicular se supone que se debe a un incremento del campo local a través del eje mayor de la partícula.



**Figura 6.** Efecto de un esferoide metálico sobre la velocidad de decaimiento radiativo de un fluoróforo. El volumen del esferoide es igual al de una esfera de 20 nm de diámetro.<sup>6</sup>

No todas las preparaciones de partículas metálicas resultan en un incremento en la fluorescencia. Es importante conocer qué tipos de partículas son las más efectivas para que se produzca la MEF y las propiedades de esas partículas que resultan en dicho fenómeno. La teoría de Mie puede utilizarse para calcular las propiedades ópticas de coloides de tamaño menor al de la longitud de onda incidente. Estos cálculos muestran que la extinción de los coloides se debe tanto a la absorción como a la dispersión de la luz. La contribución relativa de la absorción y la dispersión depende del tamaño y la forma de los coloides. En general, las partículas más grandes y no esféricas muestran

mayores contribuciones de dispersión sobre la extinción total. Hasta el momento se cree que esta contribución de la dispersión es el origen del MEF. El componente de dispersión representa la radiación de campo lejano del dipolo oscilante inducido. En cierto modo este efecto es similar a la emisión. Parece lógico que el fluoróforo excitado en cercanías de una partícula metálica colabore en la producción de radiación de campo lejano a la longitud de onda de emisión. Nos referimos a este concepto como modelo del plasmón resonante (RP, del inglés: resonant plasmon).<sup>16</sup> De ser correcto, el modelo RP provee una aproximación racional para el diseño de partículas metálicas para MEF. La partícula, o su estructura, deberían escogerse teniendo en cuenta una alta sección transversal para la dispersión y que posea un componente de dispersión que sea dominante por sobre la absorción.

### **Antecedentes en nuestro grupo**

En un trabajo de nuestro grupo publicado recientemente<sup>17</sup> se reportó que en presencia de nanopartículas de plata recubiertas de pectina, el complejo Riboflavina-Ag aumenta la población del estado triplete de la flavina. Como consecuencia, se forman mayores concentraciones de oxígeno singlete y radical anión superóxido en soluciones aireadas. También se observó que en células HeLa se produce una alta fototoxicidad del fotosensibilizador cuando está complejado con las nanopartículas, como resultado indirecto del aumento de la población del estado excitado triplete de la flavina.<sup>18</sup>

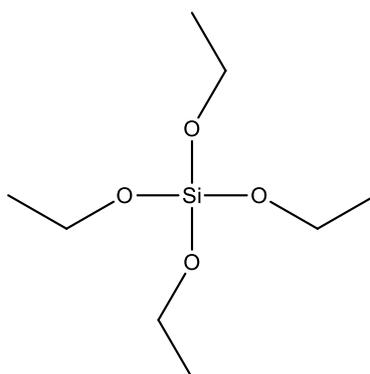
Siguiendo esta línea, en esta tesis hemos sintetizado y caracterizado nanopartículas de sílice con revestimiento de metales nobles, tales como Ag y Au ( $\text{SiO}_2\text{@Ag}$  y  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ , respectivamente). Estos nanomateriales fueron elegidos por dos razones principales: (a) la superficie de las nanopartículas presenta grupos silanoles expuestos del  $\text{SiO}_2$ , los cuales pueden actuar potencialmente como sitios de adsorción de moléculas orgánicas. (b) Al mismo tiempo, las nanopartículas de Ag, o Au, soportadas por la sílice están en proximidad con el colorante. El soporte de sílice actúa como un medio para inmovilizar tanto a la NP metálica como al colorante en un rango muy cercano. Estos nanomateriales también ofrecen la posibilidad de realizar experimentos comparativos con nanopartículas de sílice sin el recubrimiento metálico (NPs  $\text{SiO}_2$ ) con la intención de corroborar si los efectos observados de las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$  o  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  sobre la fotofísica de los fotosensibilizadores son debidos al metal y no solo a la inmovilización del colorante en la superficie de la sílice.

### **3.1.2 Síntesis de nanopartículas de sílice por el método Sol-gel**

Sol-gel es una metodología para producir materiales cerámicos a bajas temperaturas a partir de la formación de una suspensión coloidal de óxidos metálicos (sol) y su posterior gelificación en una red interconectada (gel).<sup>19,20,21</sup> El interés por la síntesis de materiales

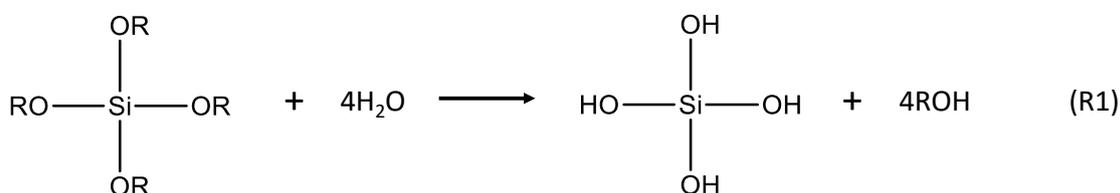
cerámicos y vítreos mediante el proceso sol-gel comenzó a mediados del siglo XIX gracias a distintos trabajos realizados por los investigadores Vaia, Ebelmen y Graham en geles de sílice.<sup>22,23</sup> Encontraron que la hidrólisis de tetraetilortosilicato (TEOS) en condiciones ácidas resulta en sílice (SiO<sub>2</sub>) en forma vítrea.

Existen distintos tipos de iniciadores para la síntesis de SiO<sub>2</sub> por el método sol-gel. Los más comunes incluyen clorosilanos y ortosilanos, entre los que destaca el tetraetilortosilicato:



**Figura 7:** Estructura tetraetilortosilicato (TEOS)

A partir de un iniciador en solución acuosa, por ejemplo, el TEOS, ocurren reacciones de hidrólisis de los grupos funcionales:



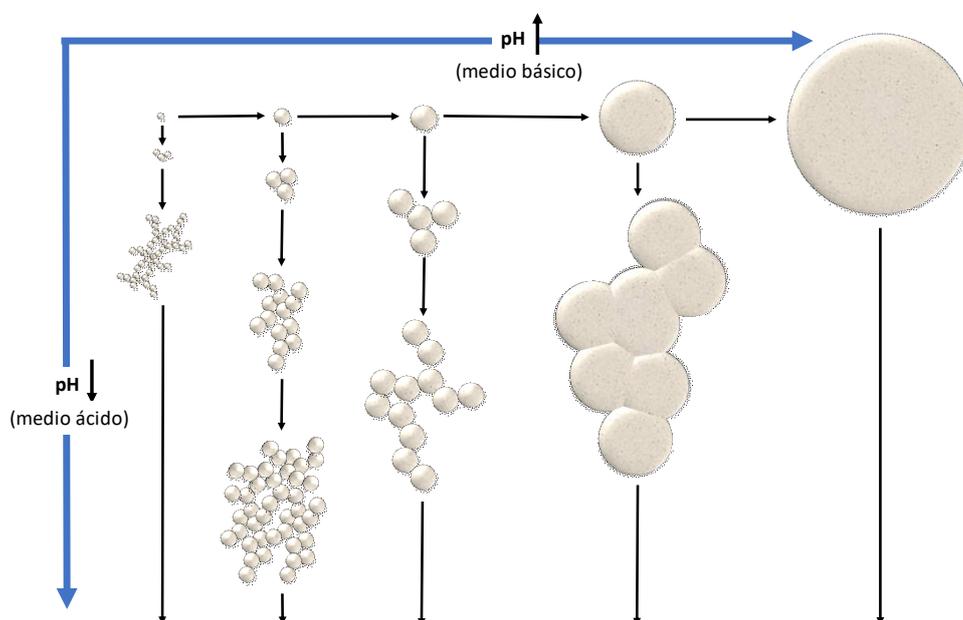
Donde *R* corresponde a un grupo etilo en el caso del TEOS. La hidrólisis no siempre es completa, es decir, solo algunos de los grupos funcionales son hidrolizados. Al mismo tiempo que ocurren la hidrólisis total y parcial tienen lugar las reacciones de condensación entre moléculas, para formar moléculas de mayor peso molecular:



De esta manera, la reacción global es:

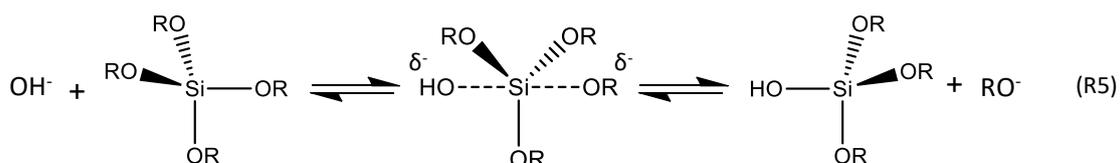


Dado que las distintas reacciones ocurren de manera paralela y sin un orden específico, la sílice sintetizada por este método es de naturaleza amorfa. El mecanismo de estas reacciones dependerá de la naturaleza ácida o básica del medio acuoso. El ácido o base presente actúa como catalizador de la reacción a través del ion hidronio o del ion hidroxilo. En catálisis ácida las reacciones de hidrólisis ocurren rápidamente en relación a la condensación, por lo que se genera un gran número de núcleos a partir de los cuales comienzan a formarse partículas, las cuales pueden condensar entre ellas para formar redes interconectadas o geles. Por otro lado, en condiciones básicas las reacciones de hidrólisis ocurren más lentamente que la condensación, por lo que la polimerización ocurre principalmente por adición de monómeros a moléculas mayores, formando una menor cantidad de partículas, pero de mayor tamaño (Figura 8). Dado que el interés en esta tesis es producir nanopartículas de sílice sobre las que se depositarán nanopartículas metálicas, se trabajará en condiciones de catálisis básica.<sup>24</sup>



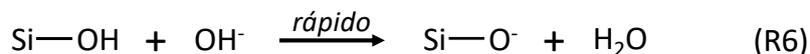
**Figura 8.** Dependencia de pH del medio en la generación de partículas de sílice durante la síntesis Sol-Gel.

En catálisis básica, por ejemplo, en presencia de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , la hidrólisis ocurre mediante un ataque nucleofílico del ion hidroxilo sobre el átomo de silicio, desplazando un grupo OR e invirtiendo el tetraedro (reacción  $\text{S}_\text{N}2$ ):



Por otro lado, en medio básico las especies hidrolizadas son ionizadas rápidamente por la presencia de iones hidroxilos generando repulsión entre ellas, por lo que el

crecimiento y polimerización ocurre mayormente por adición de monómeros a partículas altamente condensadas en vez de agregación interpartículas:



El mecanismo por el cual ocurren estas reacciones ha sido estudiado por distintos autores, los cuales proponen distintas vías que incluyen reacciones de ataque y sustitución nucleofílica SN2, e intermediarios penta y hexa-coordinados.<sup>19</sup>

La sílice es un polímero inorgánico compuesto por tetraedros de SiO<sub>4</sub> interconectados. Sin embargo, en la superficie de la sílice existen distintos grupos terminales, ya sean grupos (o puentes) siloxanos ( $\equiv\text{Si—O—Si}\equiv$ ) con el oxígeno en la superficie o grupos silanoles ( $\equiv\text{Si—OH}$ ). Estos últimos pueden ser divididos en grupos silanoles aislados (o libres), donde el silicio terminal se encuentra unido al seno de la partícula mediante 3 enlaces; grupos silanoles vecinales, donde 2 grupos se encuentran lo suficientemente cercanos para formar un puente de hidrógeno; y los grupos silanoles geminales, donde existen 2 grupos OH terminales unidos al mismo átomo de silicio.

### 3.1.3 Recubrimiento de las NPs de SiO<sub>2</sub> con metales nobles

Para obtener capas metálicas densas y uniformes en la escala nanométrica sobre la superficie de esferas de sílice, deben considerarse las siguientes 2 cuestiones: primero, la unión efectiva entre los núcleos metálicos a la matriz de sílice, y segundo, una estrecha distribución de estos núcleos y su uniformidad sobre la superficie de la sílice durante el proceso de deposición.

En esta síntesis, la formación de las nanopartículas de plata y/u oro, y el correspondiente recubrimiento metálico está dado por dos procesos bien definidos: nucleación y crecimiento, que tienen como finalidad cubrir la superficie de la sílice con el metal en cuestión. Sin embargo, en cada una de estas etapas ocurre un proceso químico distinto.

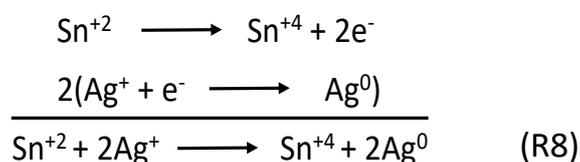
#### 3.1.3.1 Nucleación

En primer lugar, para la nucleación del metal (formación de los centros metálicos a partir de los cuales se forman las nanopartículas) se utiliza la técnica enchapado metálico electrolítico (electroless metal plating) la cual se basa en el uso de un agente reductor químico que permite la reducción de los iones metálicos de la solución sobre la superficie de un sustrato. Para este proceso la superficie no necesita ser conductora y además la cinética de reducción del metal debe ser lo suficientemente lenta para evitar

la reducción de los iones metálicos en la solución. La superficie de las NPs de sílice actúa entonces como un catalizador para asegurar que la reducción solamente ocurra en la superficie, entonces el metal permanece unido.

Para el proceso de nucleación, en la síntesis del recubrimiento de plata, las nanopartículas de sílice deben mezclarse con soluciones de NaOH, SnCl<sub>2</sub> en HCl y AgNO<sub>3</sub> amoniacal, cada una de las cuales cumple una función determinada en el desarrollo de las semillas. Durante esta etapa ocurren los siguientes pasos: adsorción de los iones Sn<sup>+2</sup> sobre la superficie de las esferas de sílice; y luego la reducción de los iones Ag<sup>+</sup> por los iones Sn<sup>+2</sup> para producir núcleos de plata nanométricos sobre la interfaz heterogénea sílice-plata como semillas<sup>25</sup>. Para el primer paso, las nanopartículas de SiO<sub>2</sub> son suspendidas en solución de NaOH de manera que los grupos silanoles (-Si-OH) queden cargados negativamente y puedan interactuar con el Sn<sup>+2</sup> de manera electrostática. A su vez, la solución de SnCl<sub>2</sub> es preparada en HCl para evitar la hidroxilación del Sn<sup>+2</sup>. Para evitar que los iones Ag<sup>+</sup> se reduzcan en el seno de la solución se utiliza NH<sub>4</sub>OH. En esta solución se produce el complejo Ag[NH<sub>3</sub>]<sub>2</sub><sup>+</sup> que tendría 2 efectos: por un lado reduce la velocidad de reducción del ion Ag<sup>+</sup>, y por otro lado se favorece la interacción con la sílice debido a la presencia de los grupos NH.

Durante el proceso de pre-tratamiento, la adsorción de los iones Sn<sup>+2</sup> tiene lugar sobre la superficie de la sílice, y luego ocurre la siguiente reacción:



A través de la reacción anterior, los núcleos de plata se forman sobre la interfaz heterogénea sílice-plata y sirven como semilla.

La nucleación de la plata sobre la sílice depende de la concentración de AgNO<sub>3</sub>. A altas concentraciones, aparecen grandes partículas de plata y esto resulta en una pérdida de plata en la capa con un pobre empaquetamiento de la cobertura sobre la superficie de las esferas de sílice. Por otro lado, para muy baja concentración, los núcleos de plata se forman en tamaños tan pequeños que se disuelven perdiéndose el efecto semilla durante el posterior proceso de crecimiento. Es por eso que, para la nucleación debe utilizarse una concentración adecuada, intermedia, que en este trabajo es de 0,27 M.

La formación del recubrimiento de Au sobre la superficie de la sílice comienza, a diferencia del caso de la Ag, modificando la superficie de la sílice, de manera que los núcleos de oro formados interactúen con las NPs SiO<sub>2</sub>. Para esto, se pone en contacto la sílice con polietilenimina (PEI) de manera que la superficie de las esferas de SiO<sub>2</sub> tengan grupos NH<sub>2</sub> capaces de interactuar con el Au. Una vez obtenidas las NPs SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> se comienza con el proceso de nucleación del oro. Para ello se utiliza citrato de sodio

como estabilizador de los coloides que, debido a su carga negativa, permite la interacción con la superficie de la sílice modificada. Se coloca la sal de oro (en nuestro caso utilizamos acetato de oro (III)) y luego se agrega el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) que actúa como agente reductor, reduciendo los iones  $\text{Au}^{+3}$  a  $\text{Au}^0$ . La presencia del citrato detiene el proceso redox, estabilizando los núcleos formados de aproximadamente 3 a 5 nm de diámetro.

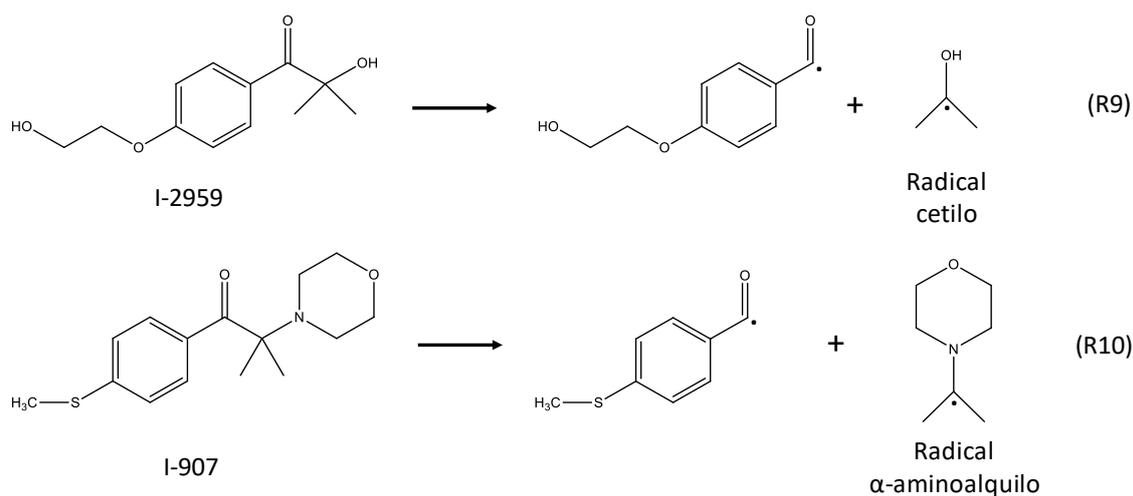
### 3.1.3.2 Crecimiento

Generalmente, el crecimiento de nanopartículas metálicas es un típico proceso nucleación-crecimiento. Como fue mencionado por LaMer<sup>26</sup>, varios parámetros podrían afectar el proceso de reacción tales como la temperatura, la concentración de los reactivos, el pH, etc. Con una alta concentración de reactivos bajo condiciones de supersaturación, los núcleos uniformes se forman abruptamente no pudiendo crecer. Con una concentración relativamente baja sobre la solubilidad de los reactivos, la formación de núcleos se detiene y los núcleos ya formados crecen a través del mecanismo de difusión. La clave del método modificado de semilla para la cobertura por una capa metálica es separar el proceso de formación de núcleos del proceso de crecimiento de la capa metálica.

Muchas síntesis de nanopartículas metálicas están mediadas por radicales libres reductores, los cuales pueden estar o no identificados como intermediarios en el proceso. Entre los radicales libres reductores, los radicales cetilo y los radicales  $\alpha$ -aminoalquilo son fáciles de preparar fotoquímicamente, y muchos precursores están disponibles, dado que estas moléculas son utilizadas frecuentemente como iniciadores de polimerización o como agentes de fotocurado. Dos de los fotoiniciadores más ampliamente utilizados son el Irgacure-2959™ (I-2959) y el Irgacure-907™ (I-907), ambos se muestran en el esquema de la figura 9, junto con sus reacciones de fotoclivaje a través de la reacción de Norrish Tipo I.<sup>27</sup>

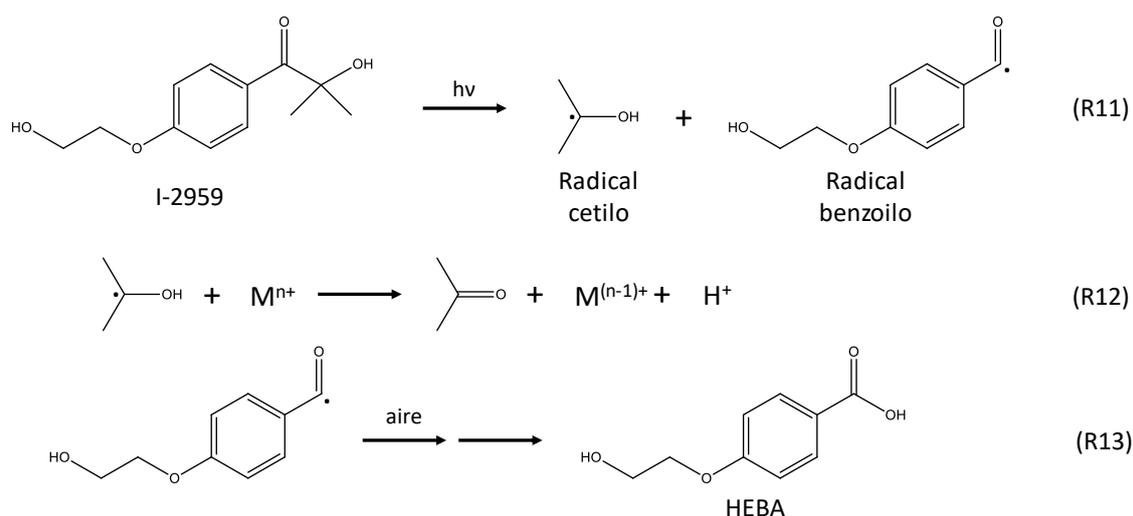
En este trabajo decidimos hacer crecer los núcleos de plata y de oro a partir de un proceso fotoquímico que consiste en la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Au}^{+3}$  utilizando I-2959 como fotorreductor.<sup>28</sup>

El I-2959 tiene un máximo de absorción a 273 nm que puede ser excitado con luz UVA. Tras la excitación, el I-2959 puede experimentar un clivaje de Norrish Tipo II para producir radicales cetilo con una eficiencia cuántica de 0,29<sup>29</sup> (Figura 9). En general, el I-2959 es una conveniente fuente de radicales cetilo que actúan como fuertes agentes reductores, en este caso reduciendo iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Au}^{+3}$  a  $\text{Ag}^0$  y  $\text{Au}^0$  respectivamente<sup>30</sup>.



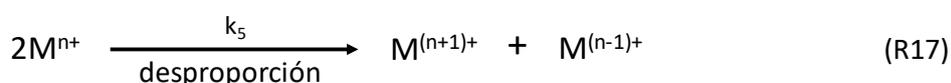
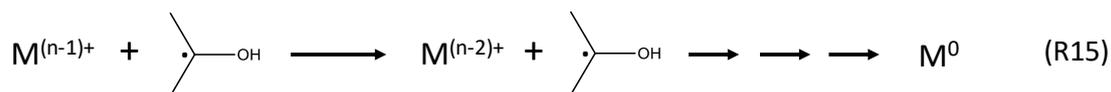
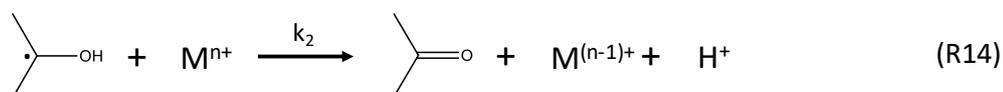
**Figura 9.** Fotorreacción de Norrish Tipo I para los fotoiniciadores I-2959 e I-907.

Inicialmente se asumía que los radicales benzoilos de la Figura 9 no jugaban ningún papel importante, sin embargo, experimentos recientes muestran que la oxidación en aire de estos radicales produce los correspondientes ácidos carboxílicos, y esto contribuye a la estabilización de las nanopartículas en medio acuoso preparadas por este método (Figura 10). A pesar de que los radicales  $\alpha$ -aminoalquilo son agentes reductores potentes<sup>31,32</sup>, incluso más que los radicales cetilo, suele ser preferible utilizar estos últimos como reductores, principalmente debido a que sus precursores (ej I-2959) no son agentes reductores a menos que se produzca el fotoclivaje; por el contrario, se puede anticipar que las aminas libres son capaces de reducir ciertos iones, incluso si alguno de esos procesos fuese demasiado lento.



**Figura 10.** Esquema de la fotólisis del I-2959 y la oxidación del radical producido, durante la síntesis de las nanopartículas metálicas.

La química que permite la generación de radicales es simple y bien comprendida, y se ilustra en la Figura 11 para el sistema del radical cetilo reduciendo iones metálicos para la formación de nanopartículas.



**Figura 11.** Proceso reductivo y de desproporción para la conversión de iones metálicos en átomos metálicos, y, a partir de estos, en nanopartículas.

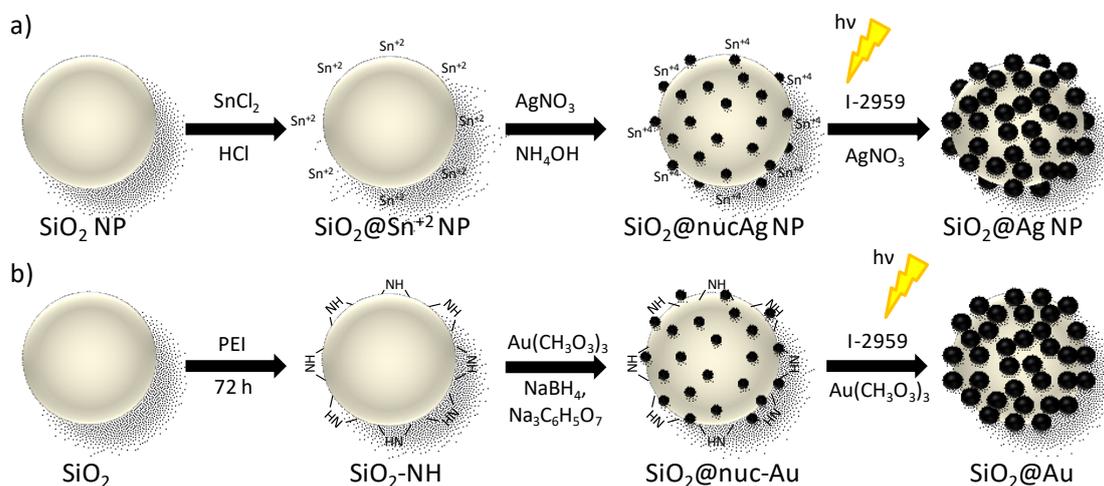
Desde el punto de vista mecanístico, el sistema más simple es el de la plata. Dado que el estado oxidado cambia de +1 a cero, solo las reacciones (14) y (16) son relevantes. Por el contrario, en el caso de las nanopartículas de oro (NP Au) los radicales cetilo están involucrados en la reducción de  $\text{Au(III)} \rightarrow \text{Au(I)}$  y  $\text{Au(I)} \rightarrow \text{Au(0)}$ , ya que  $\text{Au(II)}$  es muy inestable y se desproporciona (reacción 17),  $2 \text{Au(II)} \rightarrow \text{Au(III)} + \text{Au(I)}$ .

Se ha demostrado que el factor clave que controla el tiempo de reacción es el quenching de los estados excitados por parte de los iones de metales nobles<sup>33,34,35</sup>. La excepcional eficiencia del I-2959 (nanopartículas en minutos a irradiaciones de alrededor de  $50 \text{ W m}^{-2}$ ) se debe a tres factores: (i) excelente absorbancia en la región UVA, (ii) alto rendimiento cuántico de reacción ( $\Phi = 0,29$ ), y un tiempo de vida del triplete de solo  $11 \text{ ns}$ <sup>29</sup> (este último parámetro es fundamental para la excelente performance del I-2959). El hecho de que este iniciador sea suficientemente soluble en un amplio rango de solventes, desde agua<sup>36</sup> hasta tolueno<sup>37</sup>, contribuye a su versatilidad.

El fotoiniciador I-2959 ha demostrado tener suficiente versatilidad para permitir la síntesis en estado sólido de AuNPs sobre varios soportes, tales como  $\text{TiO}_2$  y alúmina, sugiriendo así, que los radicales cetilo son lo suficientemente móviles para producir la reducción de las sales de Au incluso en sistemas sólidos, una característica que puede ser atractiva desde la perspectiva de la síntesis verde de catalizadores soportados.

Dado que la propia superficie de las partículas son un sitio de reducción, se intuye que el crecimiento de nuevas capas de partículas será más rápido cuando haya presente mayor cantidad de agente reductor manteniendo constante la concentración de la sal

de oro. Además, se formarán partículas más grandes cuando se agregue menor cantidad de semillas, hecho evidenciado por un gran corrimiento batocrómico y ensanchamiento de la banda del plasmón superficial (SPB, del inglés: Surface Plasmon Band)<sup>38</sup>. El ensanchamiento de la banda de resonancia es también indicativo de la aglomeración de las partículas. En la Figura 12 se resumen las síntesis de  $\text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{SiO}_2@Au$ .

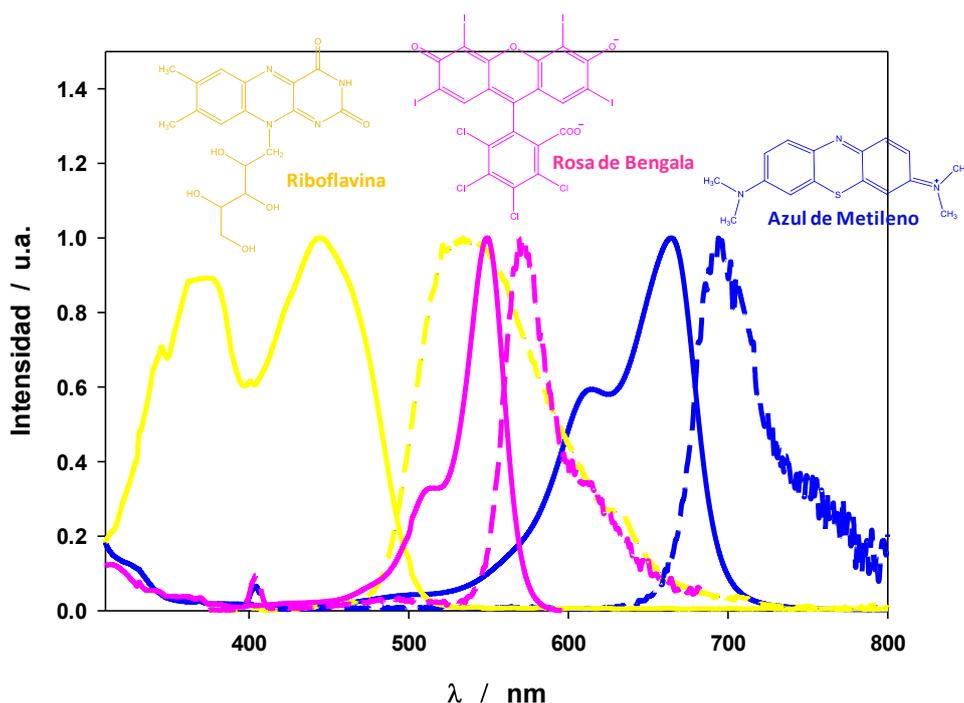


**Figura 12.** Esquema de síntesis de a) nanopartículas  $\text{SiO}_2@Ag$  y b) nanopartículas  $\text{SiO}_2@Au$ .

Como se mencionó al inicio de la introducción, la resonancia localizada superficial del plasmón puede afectar fuertemente la dinámica de los estados excitados singlete y triplete de moléculas orgánicas, y debido a los LSPRs, las nanopartículas metálicas pueden interactuar intensamente con moléculas orgánicas adyacentes. Es por esto, que en esta parte de la tesis nos centramos en el estudio de la interacción de las NPs  $\text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{SiO}_2@Au$  con los diferentes estados energéticos de los fotosensibilizadores Riboflavina (neutro), Rosa de Bengala (negativo) y Azul de Metileno (positivo) (Figura 13).

Para el caso de la interacción de las NPs con el estado fundamental de los colorantes utilizamos la espectroscopía de absorción UV-visible. Esta técnica nos permite evidenciar interacciones químicas (enlaces) o físicas (adsorción) entre las moléculas en su estado basal de energía y las NPs, siguiendo los cambios en la forma del espectro del colorante o la intensidad de este, respectivamente.

Cuando queremos estudiar la interacción entre las NPs y el estado excitado singlete utilizamos la espectroscopía de fluorescencia, la cual nos permite, siguiendo el incremento o la disminución de la intensidad de emisión, determinar si el efecto de las NPs metálicas es de aumento o de quenching de la fluorescencia, respectivamente.

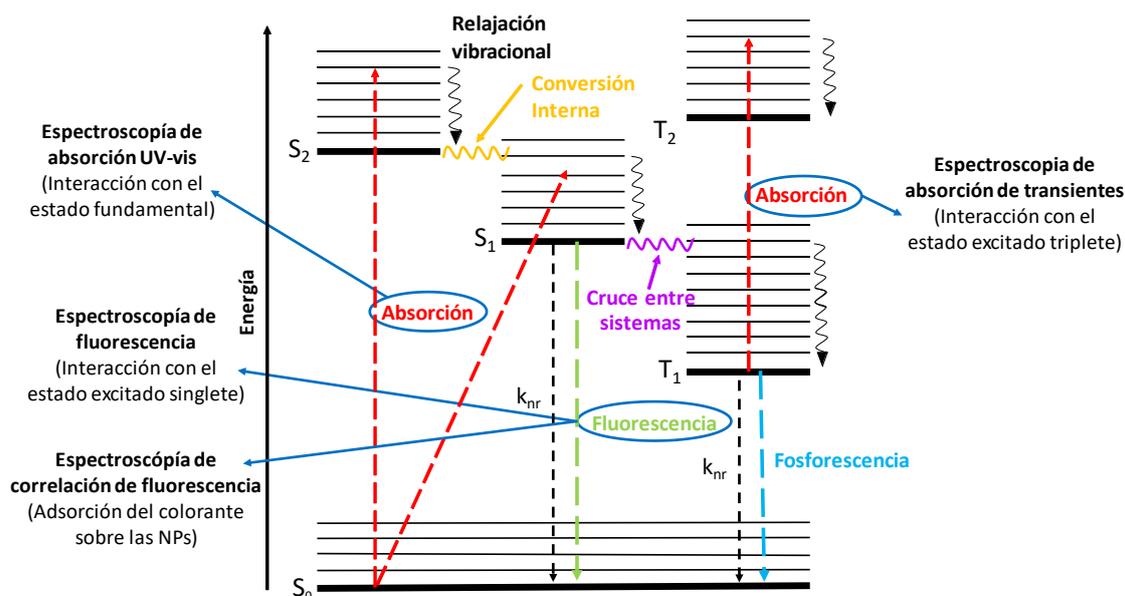


**Figura 13.** Espectros de absorción (líneas continuas) y de emisión (líneas discontinuas) de los tres colorantes: Rf (neutro), RB (negativo) y MB (positivo), con sus respectivas estructuras moleculares.

Además, siguiendo los cambios en el tiempo de vida de emisión del fluoróforo, podemos ser capaces de determinar (en el caso que ocurra) el tipo de quenching: dinámico o estático. Haciendo uso también del decaimiento radiativo del estado singlete, pero en este caso con la espectroscopía de correlación de fluorescencia, podemos determinar si las moléculas orgánicas se adsorben y permanecen unidas a las NPs. Esta técnica nos permite realizar un estudio complementario al de espectroscopía de absorción UV-visible.

Por último, dado que la producción de oxígeno singlete depende de la transferencia de energía entre el estado excitado triplete del fotosensibilizador y el oxígeno molecular, es necesario evaluar el efecto de las NPs en el estado excitado triplete del colorante. Para esto, utilizamos la espectroscopía de absorción de transientes llevada a cabo con un equipo de Laser Flash Fotólisis, donde se analiza los cambios en la absorción del estado triplete, y de posibles especies radicalarias generadas a partir de este estado excitado.

Las técnicas explicadas anteriormente, el proceso fotofísico en el cual se basan, y la aplicación que se les dio en esta tesis, se resumen a continuación en la Figura 13 con un diagrama de Jablonski.



**Figura 13.** Diagrama de Jablonski donde se representan los diferentes procesos fotofísicos por los cuales puede atravesar un fotosensibilizador al ser irradiado. La línea roja representa el proceso de adsorción de luz (del estado fundamental al singlete, o de triplete a triplete), en verde se indica el decaimiento radiativo desde el estado excitado singlete al estado fundamental (fluorescencia), y en celeste se muestra el decaimiento radiativo desde el estado excitado triplete al estado fundamental (fosforescencia).

## 3.2 Objetivos

- (1) Sintetizar y caracterizar nanopartículas (NPs) de sílice con revestimientos de metales nobles (Ag y Au).
- (2) Examinar el efecto de la presencia de dispersiones de los nanomateriales sobre la fluorescencia, fosforescencia y el rendimiento cuántico de generación de  $^1O_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) de sensibilizadores orgánicos.
- (3) Obtener información sobre la generación de  $^1O_2$  de fotosensibilizadores en solución junto con suspensiones de nanopartículas coloidales.

## 3.3 Materiales y métodos

### 3.3.1 Reactivos

Nitrato de Plata, Hidróxido de Sodio, Cloruro de Estaño (II), I-2959, TEOS, Riboflavina, Rosa de Bengala, Azul de Metileno, 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO, del inglés:

5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP, del inglés: 2,2,6,6-tetramethylpiperidine) fueron comprados en Sigma-Aldrich. Hidróxido de Amonio y Ácido Clorhídrico se obtuvieron de Acros Organics, y Etanol Absoluto de Scharlau. Todos los experimentos fueron realizados utilizando agua ultrapura.

### 3.3.2 Síntesis de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>

Para la síntesis de estas nanopartículas nos basamos en el método de Stöber con algunas modificaciones<sup>39</sup>. Se mezclaron 3 mL de una solución de amoníaco 30% con 50 mL de etanol absoluto. Luego, se agregaron 1,5 mL de TEOS, y se dejó agitando la mezcla toda la noche. Estas concentraciones de reactivos producen nanopartículas de sílice con un diámetro de aproximadamente 100 nm.

### 3.3.3 Síntesis de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>@Ag

Se resuspendieron 10 mg de NP SiO<sub>2</sub> en 10 mL de solución de NaOH 0,02 % p/v y se dejó agitando magnéticamente durante 30 min para lograr que la superficie de la sílice quede cargada negativamente. A esta suspensión se agregaron 10 mL de solución de SnCl<sub>2</sub> 3 % p/v en HCl 1 M y se mantuvo en agitación durante 2 h de manera que se produzca la interacción electrostática entre los cationes Sn<sup>+2</sup> y los -O<sup>-</sup> de la sílice. Luego se centrifugó la suspensión a 7000 – 9000 rpm durante 10 min y se lavó con agua ultrapura. Este procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Las NPs SiO<sub>2</sub>@Sn<sup>+2</sup> se resuspendieron en 20 mL de AgNO<sub>3</sub> amoniacal 0,35 M durante 2 h bajo agitación magnética permitiendo que ocurra la reacción redox entre el Sn<sup>+2</sup> y la Ag<sup>+</sup> sobre la superficie de la sílice. Las NPs SiO<sub>2</sub>@nuc-Ag se lavaron como se describió previamente y se resuspendieron en 20 mL de agua ultrapura conteniendo 3,4 mg de AgNO<sub>3</sub> y 4,5 mg de I-2959 en un tubo de cuarzo. Esta suspensión se irradió en un equipo Rayonet con 8 lámparas UV de 253,7 nm durante 15 min. De esta manera, se produjo el aumento del tamaño de los núcleos de plata evidenciado por el cambio en el color de la suspensión (de blanco a marrón-rojizo). Las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag se lavaron de la misma manera que en las etapas previas, se resuspendieron en 20 mL de agua ultrapura y se almacenaron en un frasco color caramelo.

Se sintetizó un segundo juego de nanopartículas de sílice con un menor recubrimiento de plata siguiendo este mismo protocolo, pero utilizando una solución de SnCl<sub>2</sub> 1 % p/v. Estas nanopartículas se llamaron SiO<sub>2</sub>@Ag-low.

Para esta síntesis se disolvió el SnCl<sub>2</sub> en una solución de HCl 6 M para poder obtener una solución final de HCl 1 M. Para ello se pesaron 3 g de SnCl<sub>2</sub> y se disolvieron en 16,67 ml

de HCl 6 M. Se calentó la solución en baño de silicona a 125 °C. Una vez que la solución se volvió transparente, se dejó enfriar bajo campana, y una vez a temperatura ambiente se llevó a 100 mL de volumen final con H<sub>2</sub>O ultrapura.

### 3.3.4 Síntesis de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>@Au

#### -Modificación superficial de NPs SiO<sub>2</sub>

Se sintetizaron las nanopartículas de SiO<sub>2</sub> por el método tradicional de Stöber (50 mL EtOH, 3 mL NH<sub>3</sub> y 1,5 mL TEOS, agitación durante 24 hs). Las partículas se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada (cada paso de lavado consistió en centrifugación a 9500 rpm durante 10 min a 15 °C, eliminación del sobrenadante y resuspensión en H<sub>2</sub>O destilada bajo sonicación por 5-10 min). Una vez lavadas, las NPs se resuspendieron en 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada conteniendo 0,28 G de PEI (polietilenimida) y se dejaron agitando 72 h. Luego se lavaron de la misma manera que se explicó anteriormente (SiO<sub>2</sub>-NH).

#### - Síntesis de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>@Au

En primer lugar, se disolvieron 10 mg de citrato de sodio en 10 mL de suspensión de NPs SiO<sub>2</sub>-NH bajo sonicación y luego agitación magnética (10-15 min). De esta manera se espera que el citrato, cargado negativamente, interaccione con la superficie positiva de las partículas de sílice modificadas (potencial  $\zeta$  +25 mV). Luego se disolvieron 5 mg de acetato de oro (III) de la misma manera que con el citrato, y por último se agregaron gota a gota 400  $\mu$ L de solución de borohidruro de sodio 5 mM bajo agitación magnética. La suspensión pasó de amarillo a marrón-negruzco, lo que denota la formación de nanopartículas de Au (SiO<sub>2</sub>@nucAu).

En segundo lugar, se disolvieron 3 mg de acetato de oro y 4 mg de I-2959 en 10 mL de suspensión de NPs SiO<sub>2</sub>@nucAu (como se ha mencionado anteriormente) y se irradió durante 15 min con 12 lámparas de 254 nm en un fotorreactor Rayonet. La solución pasó de marrón-negruzco a negro-violáceo, indicando el crecimiento de las NPs y la conversión de prácticamente todo el Au<sup>+3</sup> a Au<sup>0</sup>.

### 3.3.5 Equipos y técnicas utilizadas

**3.3.5.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).** Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión fueron adquiridas utilizando un microscopio JEOL JEM 1010 operado con un voltaje de aceleración de 100 kV. Se usaron grillas con una malla de cobre de 400 huecos, recubierta por una capa de carbono. Se colocaron 5  $\mu$ L de suspensión sin diluir de NPs SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@nucAg, SiO<sub>2</sub>@Ag-low, SiO<sub>2</sub>@Ag, SiO<sub>2</sub>-NH,

SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au a la grilla y se incubaron por 1 min. El exceso de muestra se removió utilizando papel de filtro.

**3.3.5.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial  $\zeta$ .** Las medidas de DLS se llevaron a cabo con un equipo  $\zeta$ -Sizer Malvern en modo backscattering. Todas las corridas se realizaron con un ángulo de dispersión de 173° y temperatura controlada a 25 °C en cubetas de poliestireno. Las NPs se caracterizaron en términos de radio hidrodinámico y potencial  $\zeta$ . Para DLS se realizaron 3 medidas consecutivas para cada muestra en un tiempo total de 15 min. El potencial  $\zeta$  se midió en modo automático a 25 °C, realizando 3 medidas consecutivas a cada pH.

**3.3.5.3 Determinación del contenido de Plata por ICP.** Con la intención de determinar el contenido de plata en las NPs, se digirieron 0,5 mL de muestra con 0,5 mL de HNO<sub>3</sub> durante 24 h. Luego se agregó agua ultra pura hasta obtener un volumen final de 10 mL. Las muestras fueron filtradas con filtro de nylon de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro. La solución resultante fue analizada por Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES, del inglés: Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) con un equipo Shimadzu ICPE-9800.

**3.3.5.4 Espectroscopía de absorción UV-visible.** Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz T90 + UV/Vis (PG Instruments Ltd.), con ancho de banda entre 0,2 y 4,0 nm según el ancho de rendija seleccionado y velocidad de barrido de 300 nm/min. Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo Helma de 1,0 cm de camino óptico y 2 mL de volumen total.

Muestra	Vol NP ( $\mu$ L)	[SiO <sub>2</sub> ] (M)
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 1	7,50	1,1x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 2	15,0	2,1x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 3	30,0	4,3x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 4	45,0	6,4x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 5	60,0	8,5x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 6	75,0	1,1x10 <sup>-3</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 7	90,0	1,3x10 <sup>-3</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 8	300	4,3x10 <sup>-3</sup>

**3.3.5.5 Espectroscopía de Fluorescencia.** Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con un fluorímetro HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11. Para las medidas en estado estacionario se utilizaron soluciones acuosas de los colorantes con absorbancias de 0,1 en la longitud de onda del máximo de absorción. Los volúmenes de nanopartículas utilizados en este ensayo, y sus respectivas concentraciones (expresadas en función de la concentración de SiO<sub>2</sub>) se detallan en la siguiente tabla

**3.3.5.6 Espectroscopía de Correlación de Fluorescencia (FCS).** Los experimentos de FCS se desarrollaron con un Microscopio Confocal ZeissNLO 880 (Carl Zeiss GmbH). La adquisición y el análisis fueron controlados a través del software Zen black. Como fuente de excitación se usaron los láseres de Ar a 458 nm y de He-Ne a 633 nm. Los detectores GaAsP y PTM fueron usados para la detección de moléculas fluorescentes únicas y para la caracterización dinámica. Las medidas fueron realizadas con un objetivo de inmersión de agua Zeiss C-Apochromat 40, NA 1.2. Se midió un 1 mL de dispersión en portaobjetos Lab-Tek Q5 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el software gratuito QuickFit 3.0 para el análisis de los datos de FCS.

**3.3.5.7 Láser Flash-Fotólisis (LFP, del inglés: Laser Flash-Photolysis).** Para estas medidas se utilizó un equipo LP980 de la empresa Edinburgh instruments. El tercer armónico (355 nm) del láser Continuum Surelite Nd:YAG (20 ns fwhm) fue la fuente de excitación (1 Hz, 10 mJ/pulso). Dado que varias especies contribuyen a las trazas de absorción, debimos realizar un análisis global de absorción de transientes (DADS) con el software gratuito Glotaran.<sup>40</sup> Todas las muestras contenían una cantidad de colorante tal que la Abs del mismo a 355 nm fuese 0,5 aproximadamente y cantidades crecientes de nanopartículas que se detallan en la siguiente tabla. En todos los casos las concentraciones de SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au fueron tales que la A<sup>355</sup> de las NPs siempre fue ≤ 0,20.

Muestra	Vol NP (μL)	[SiO <sub>2</sub> ] (mM)
NP1	25,0	0,178
NP2	50,0	0,355
NP3	75,0	0,533
NP4	100	0,710
NP5	125	0,888
NP6	150	1,06

**3.3.5.8 Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR, del inglés: Electron Paramagnetic Resonance).** Las medidas fueron realizadas en un Espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica EPR Bruker Elexsys E500 banda X, operado en modo onda continua (CW, del inglés: continuous wave), y con muestras alojadas en tubos cilíndricos de cuarzo en cavidad estándar. Las concentraciones de DMPO y TMP utilizadas en los ensayos fueron 50 mM. Se colocaron 100 μL de cada colorante, Riboflavina o Rosa de Bengala, en 1 mL de volumen final ([Rf] = 5,4 μM y [RB<sup>2-</sup>] = 29,4 μM) y se irradiaron durante 10 min con lámparas de 350 nm y 575 nm, respectivamente.

## 3.4 Resultados y discusión

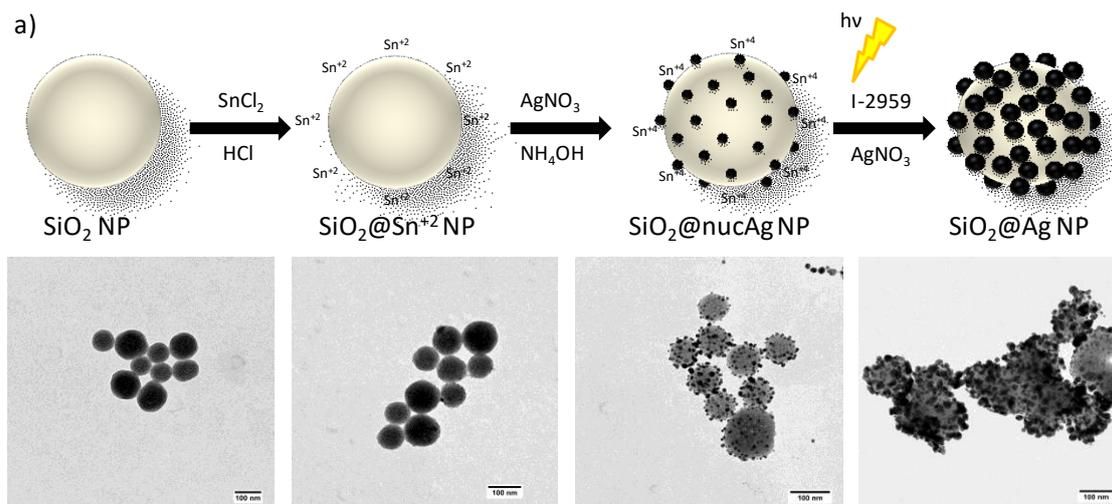
### 3.4.1 Caracterización

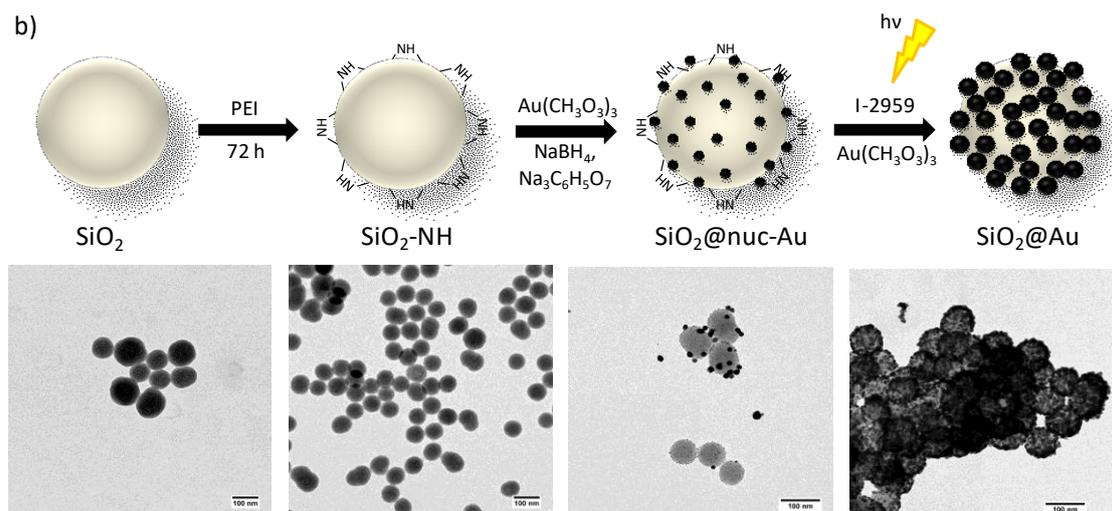
Para la síntesis de nuestras nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  a partir de partículas de  $\text{SiO}_2$  utilizamos una nueva combinación de estrategias ya reportadas. Como se mencionó en la introducción, esta metodología de síntesis consiste en una primera etapa en la cual se generan los núcleos metálicos sobre la superficie de la sílice a partir de la reducción química (redox) de sales de los cationes metálicos de interés ( $\text{Ag}^+$  y  $\text{Au}^{+3}$ ), y una fase posterior, en la cual los núcleos metálicos se hacen crecer a partir de un proceso fotoquímico en el cual se generan radicales cetilo por fotólisis del I-2959, los cuales reducen iones metálicos en solución sobre los núcleos previamente formados.

Para poder corroborar que nuestra estrategia de síntesis estuviese ocurriendo de la manera propuesta, realizamos una exhaustiva caracterización del sistema, durante los diferentes pasos de la síntesis.

#### 3.4.1.1 Microscopía electrónica de Transmisión

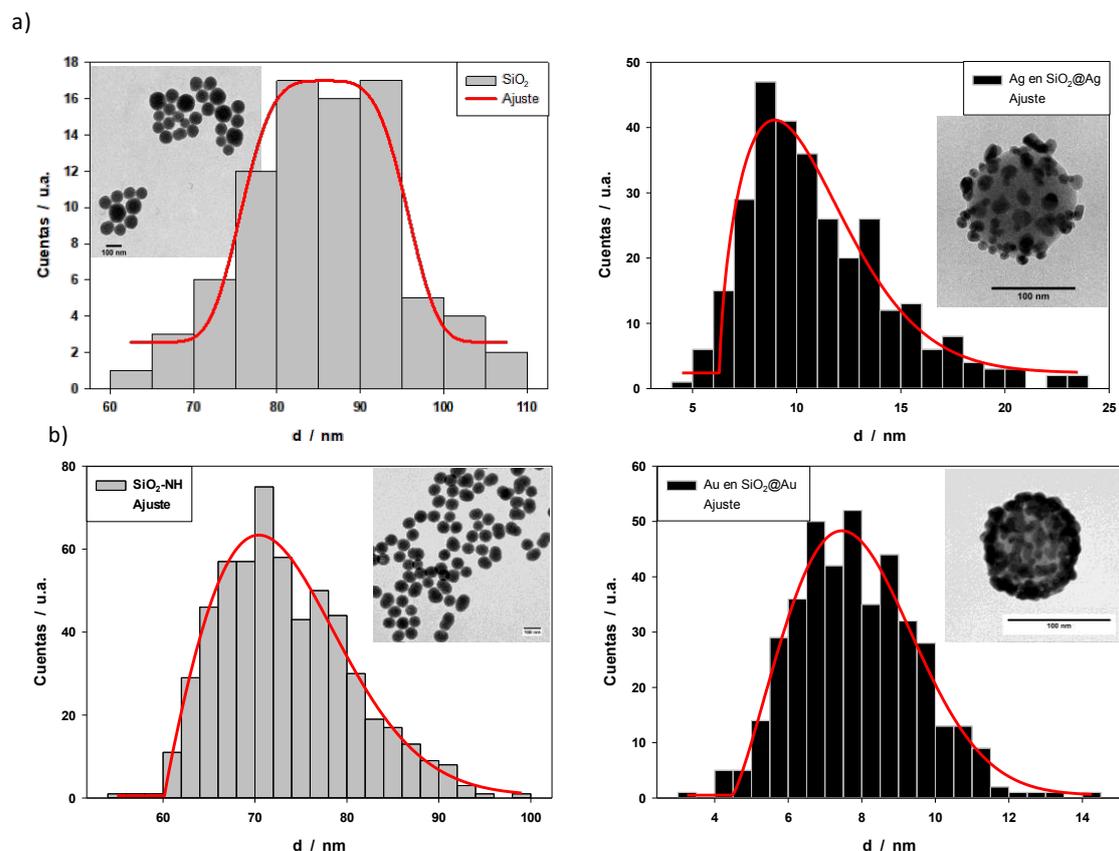
Las micrografías de TEM para las NPs  $\text{SiO}_2@\text{nucAg}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  (Figura 14a) muestran depósitos discontinuos y al azar de partículas de Ag nanométricas (que se ven como pequeñas esferas oscuras) sobre la superficie de la sílice, confirmando la formación de nanopartículas core-shell sílice-plata. Del mismo modo, la Figura 14b muestra la misma configuración para las NPs  $\text{SiO}_2@\text{nucAu}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , con los núcleos metálicos y las nanopartículas de oro depositadas sobre la superficie de las esferas de  $\text{SiO}_2\text{-NH}$ , respectivamente.





**Figura 14.** Esquema de síntesis de las nanopartículas paso a paso (parte superior). Micrografías de TEM de las NPs en los diferentes pasos de la síntesis (parte inferior) para: a) NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y b) NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .

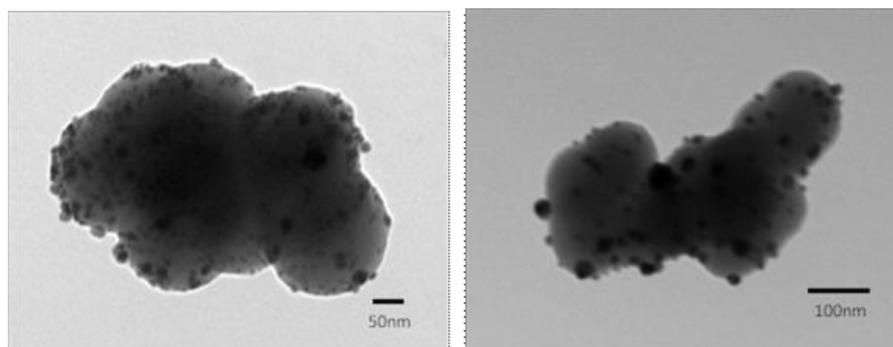
El histograma de distribución de tamaño de las NPs de  $\text{SiO}_2$  obtenidas a partir de las imágenes de TEM muestran una población de partículas con un diámetro de  $85 \pm 15$  nm (Figura 15a). El tamaño promedio de las nanopartículas de Ag en la superficie de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  es  $7 \pm 3$  nm (Figura 15a).



**Figura 15.** Histograma de distribución de tamaños de: a) NPs  $\text{SiO}_2$  (izquierda) y NPs Ag en la superficie de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  (derecha); y b) NPs  $\text{SiO}_2\text{-NH}$  (izquierda) y NPs Au en la superficie de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , obtenidos a partir de las imágenes de TEM.

Para las NPs de SiO<sub>2</sub>-NH, el histograma de distribución de tamaño arrojó un valor de  $70 \pm 15$  nm, mientras que para las de Au en la superficie de la sílice fue de  $7 \pm 4$  nm (Figura 15b).

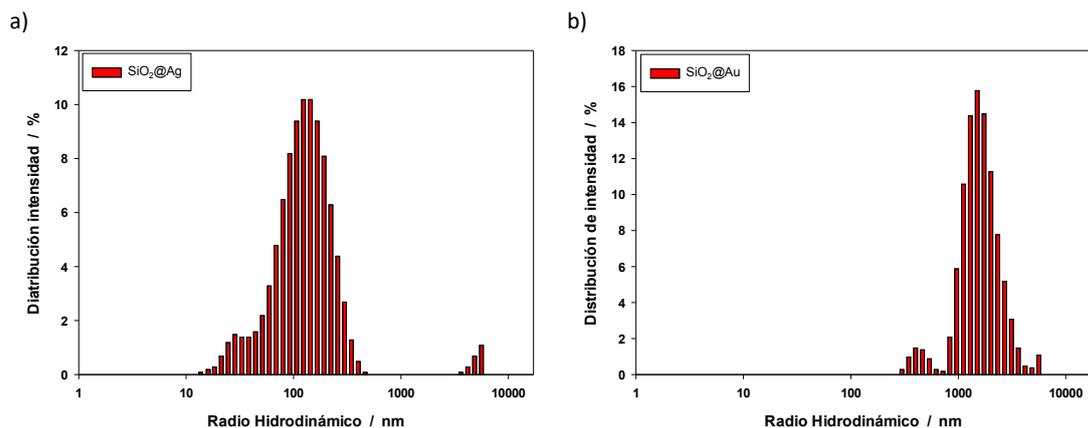
Las imágenes de TEM obtenidas para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low se muestran en la Figura 16. Se puede ver claramente el menor recubrimiento de la superficie de las NPs SiO<sub>2</sub>, debido, probablemente, a que al utilizarse una solución de SnCl<sub>2</sub> más diluida durante la primera etapa de la síntesis, una menor cantidad de iones Sn<sup>+2</sup> pudieron haberse adsorbido sobre la sílice, paso fundamental para que se produzca la reducción de los iones Ag<sup>+</sup> y por ende la formación de los núcleos de Ag, lo que trajo como consecuencia que se formaran menos NPs metálicas.



**Figura 16.** Micrografías de TEM de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low.

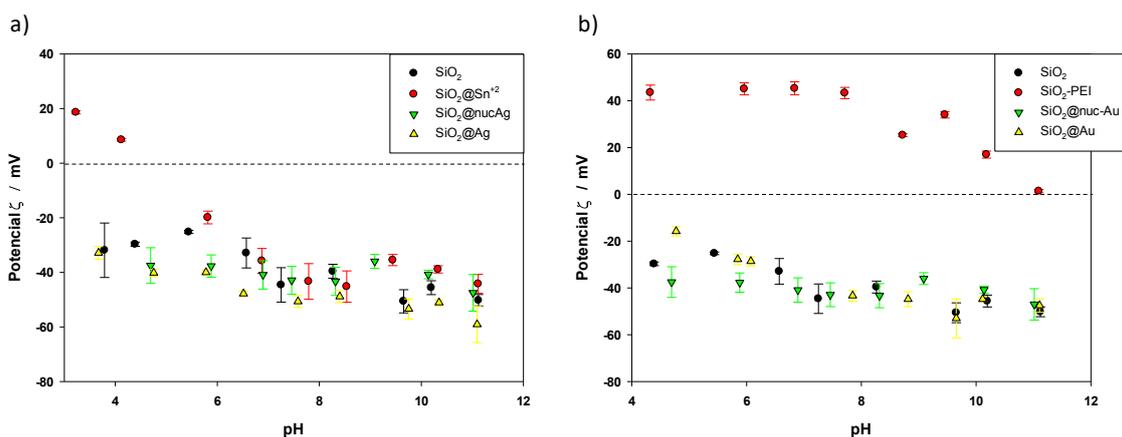
#### 3.4.1.2 Dispersión dinámica de la luz y potencial $\zeta$

Para corroborar los tamaños obtenidos de nuestras nanopartículas y la polidispersidad de tamaños realizamos medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés: Dynamic Light Scattering). El diámetro hidrodinámico promedio que se obtuvo por DLS para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag fue  $133 \pm 86$  nm. Se detectó además un pico adicional en la distribución de intensidad (Figura 17a). Este pico, que corresponde a un 3% del total de la luz dispersada, corresponde a un diámetro hidrodinámico promedio de  $4,6 \mu\text{m}$ , lo que nos está indicando que un muy bajo porcentaje de las NPs se encuentran formando agregados. Para el caso de las NPs SiO<sub>2</sub>@Au se obtuvieron dos picos de distribución de intensidad, uno correspondiente al 16,2% y otro al 83,8% del total de intensidad cuyos diámetros hidrodinámicos promedio son  $396 \pm 12$  nm y  $1597 \pm 80$  nm, respectivamente (Figura 17b). Esto nos indica que existen 2 poblaciones bien marcadas de partículas aglomeradas. Cuando analizamos la distribución de tamaños observamos que el porcentaje del pico de menor diámetro es de 26,4%, lo que nos dice que aproximadamente la cuarta parte de las nanopartículas se encuentra formando agregados de unas pocas partículas, mientras que tres cuartas partes forman aglomerados conteniendo un gran número de esferas de sílice recubiertas con oro (esto mismo pudo observarse en las micrografías de TEM).



**Figura 17.** Histograma de distribución de intensidad para la determinación del radio hidrodinámico: a) NPs SiO<sub>2</sub>@Ag, y b) NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

Una manera de corroborar el pretratamiento de la sílice para la posterior generación de nanopartículas metálicas es a través de medidas de potencial  $\zeta$ , de manera de poder seguir los cambios en la distribución de cargas alrededor de las partículas, lo que nos da una idea de que está sucediendo sobre la superficie del SiO<sub>2</sub>. La figura 18a muestra la dependencia del potencial zeta en función del pH para las NPs generadas en cada paso de la síntesis: SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@Sn<sup>+2</sup>, SiO<sub>2</sub>@nucAg, y SiO<sub>2</sub>@Ag NPs. Para las NPs SiO<sub>2</sub> se obtuvieron valores negativos en todo el rango de pH analizado (4 - 12), como resultado de la desprotonación de los grupos silanoles de la superficie de la sílice<sup>41</sup>. Por el contrario, para SiO<sub>2</sub>@Sn<sup>+2</sup> se obtuvo un punto de carga cero en aproximadamente 4,5. Dado que a este pH el potencial  $\zeta$  medido para el SiO<sub>2</sub> fue negativo, el valor cero medido para estas NPs es indicativo de que la adsorción de los iones Sn<sup>+2</sup> sobre la superficie de la sílice fue exitosa.



**Figura 18.** Dependencia del potencial zeta ( $\zeta$ ) en función del pH para las nanopartículas a) SiO<sub>2</sub>@Ag y b) SiO<sub>2</sub>@Au en los diferentes estados de la síntesis.

Los valores de potencial  $\zeta$  para las NPs SiO<sub>2</sub>@nucAg y SiO<sub>2</sub>@Ag fueron negativos también en el rango de pH 4 – 12, en concordancia con la contribución negativa de los grupos

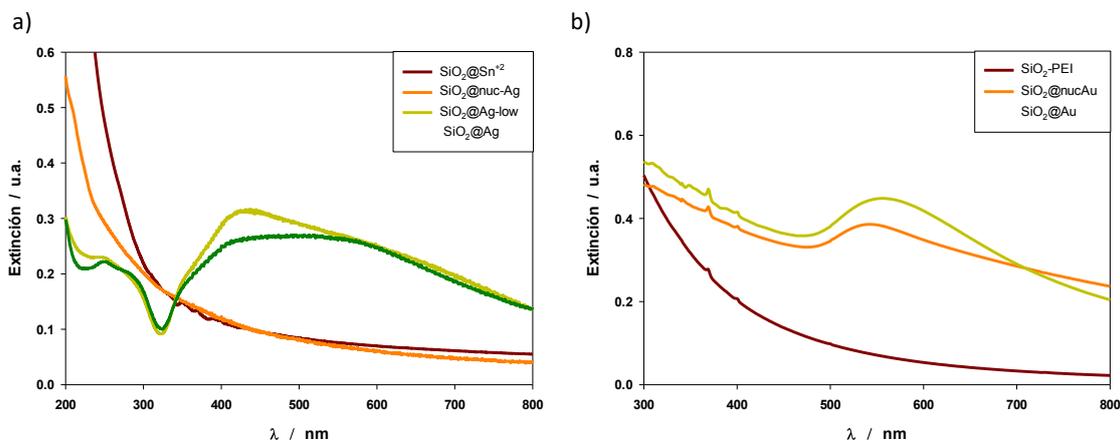
silanoles y posiblemente la desprotonación del grupo carboxílico presente en el HEBA, que es el estabilizante de las NPs de Ag. Además, se ha visto que las nanopartículas de plata tienen potencial zeta negativo por encima de pH 8<sup>42</sup>.

El mismo análisis se puede hacer para los resultados del gráfico de la figura 18b, en el cual se muestran los valores de potencial zeta para los diferentes estadios de la síntesis de las nanopartículas con recubrimiento de oro: SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-NH, SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au. Del mismo modo que observamos para las nanopartículas de plata, las NPs de sílice presentan valores de potencial zeta negativos en todo el rango de pH, mientras que las partículas SiO<sub>2</sub>-NH presentan valores positivos de potencial zeta en la misma zona de análisis. Esto es un indicativo de la correcta modificación de la sílice con PEI, debido a la presencia de los grupos amino sobre la superficie de las nanopartículas. Para el caso de las NPs SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au vemos nuevamente que los valores de potencial zeta se encuentran por debajo de cero para todos los pH estudiados, del mismo modo que observamos para la plata. Esto es consistente con los valores de potencial  $\zeta$  reportados para NPs Au, y además teniendo en cuenta que el agente estabilizante de las nanopartículas metálicas es el mismo, tanto para las de Ag como las de Au (el HEBA).

#### **3.4.1.3 Localización de la resonancia superficial localizada del plasmón (RSLP) por espectroscopía UV-visible**

Uno de los parámetros característicos de las nanopartículas de metales nobles (en este caso Ag y Au) que define su forma y tamaño, es la posición de la banda de absorción correspondiente a la resonancia localizada superficial del plasmón. La Figura 19a muestra el espectro de extinción de las suspensiones de SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@Sn<sup>2+</sup>, SiO<sub>2</sub>@nucAg, SiO<sub>2</sub>@Ag-low y SiO<sub>2</sub>@Ag. El espectro de extinción de suspensiones acuosas de SiO<sub>2</sub>@Ag muestra la característica banda de resonancia del plasmón con el máximo localizado a 432 nm indicando la correcta formación de nanopartículas de Ag. Esta banda se encuentra montada sobre la dispersión generada por las esferas de sílice. Generalmente, un pico angosto del plasmón es característico de nanopartículas individuales monodispersas en suspensión. Sin embargo, en nuestro caso observamos que el pico del plasmón de nuestras NPs de plata es mucho más ancho que el que se esperaría para el tamaño y la forma de las partículas formadas. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, en nuestro sistema, las NPs metálicas están soportadas sobre la superficie de la sílice y se encuentran muy próximas unas con otras, lo cual podría permitir que ocurra un acoplamiento entre los plasmones individuales de las partículas, generando un ensanchamiento de la banda de absorción del coloide. En el caso del espectro de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag vemos que el ensanchamiento es mucho más marcado, al punto de convertir el punto máximo de extinción en un rango máximo de longitudes de onda de extinción, debido a un mayor acoplamiento de los plasmones

individuales generado por el aumento del tamaño y la cantidad de nanopartículas de plata y su mayor cercanía.



**Figura 19.** Espectroscopía UV-vis de las nanopartículas (a)  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y (b)  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , en los diferentes pasos de la síntesis.

Cuando analizamos la Figura 19b podemos corroborar la formación de los núcleos de oro debido a la aparición de la banda de absorción del plasmón característica de las NPs Au con el máximo ubicado en 540 nm. Cuando observamos el espectro de extinción de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , vemos que ahora la banda de plasmón sufrió un corrimiento hacia longitudes de onda mayores junto con un ensanchamiento del pico, lo cual se explica, del mismo modo que para las partículas de plata, por un acoplamiento mayor de las NPs Au luego de haber sido crecidas fotoquímicamente.

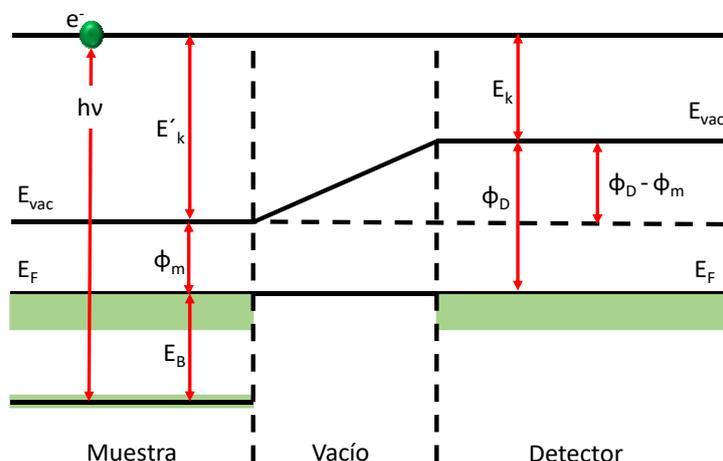
#### 3.4.1.4 Espectroscopia de emisión de fotoelectrones por Rayos-X

La Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS, del inglés: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) es una técnica espectroscópica cuantitativa que permite conocer la composición y estado químico de una superficie hasta una profundidad de unos aproximadamente 10 a 12 nm, de forma no destructiva. XPS hace uso del efecto fotoeléctrico descrito por Einstein en 1901,<sup>43</sup> por lo cual pertenece a la familia de las técnicas conocidas como Espectroscopías Fotoelectrónicas (PES, del inglés: Photoelectron Spectroscopies).

Cuando se irradia a un electrón de la superficie de una muestra sólida con un fotón de frecuencia  $\nu$ , la energía  $h\nu$  del fotón es transferida al electrón (sin considerar la dispersión de Compton ni la dispersión inversa de Compton, ya que estos procesos no se dan en forma significativa). Si la energía recibida por el electrón es tal que permite que sea eyectado de la superficie sin regresar a la misma, entonces, en ausencia de otros campos, además del ejercido por la superficie, la energía cinética  $E_k$  con la que se aleja el electrón a una distancia infinita de esta viene dada por

$$E'_k = h\nu - E_B - \Phi_m \quad (E5)$$

donde  $E_B$  es la energía de enlace (diferencia entre la energía de Fermi y la energía de un electrón que forma parte del sólido) y  $\Phi_m$  es la función trabajo de la muestra (diferencia entre la energía del vacío y la energía del nivel de Fermi).



**Figura 20.** Esquema del diagrama energético para la muestra y el detector en una medida de XPS.

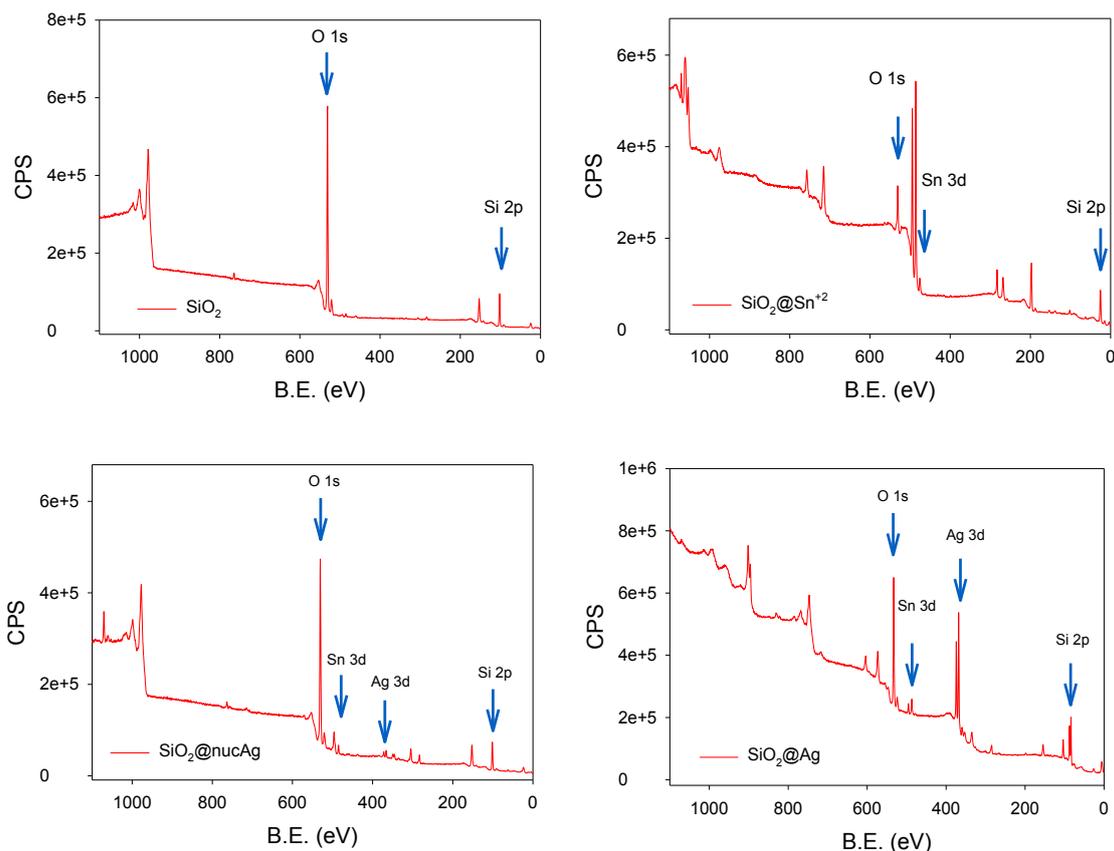
En XPS la muestra y el detector se conectan mediante conectores, de modo que el sistema progresará hasta que los potenciales electroquímicos de los electrones en la muestra y en el detector sean los mismos. Si ambos, la muestra y el detector están aislados, el nivel vacío será idéntico para ambos (consideramos que los niveles de Fermi de la muestra y el detector son iguales a efectos prácticos).

El detector tendrá asociada su propia función trabajo  $\Phi_D$ . Si  $\Phi_D$  y  $\Phi_m$  son distintos, en el nivel vacío el electrón tendrá distinta energía sobre la muestra que sobre el detector (Figura 20). La razón de esto es que se encuentran a distinto potencial debido a la difusión de electrones que acompaña a la igualación de los potenciales electroquímicos y que produce un desbalance de cargas. La diferencia  $\Phi_m - \Phi_D$  corresponde entonces a la energía cinética ganada por un electrón al acercarse al detector, por lo que la energía de movimiento detectada será

$$E_k = E'_k + (\Phi_m - \Phi_D) = h\nu - E_B - \Phi_m + (\Phi_m - \Phi_D)$$

$$E'_k = h\nu - E_B - \Phi_D \quad (E6)$$

Este es el principal resultado para la aplicación de XPS ya que puede llevarse a cabo (para obtener  $E_B$ ) sin conocer la función trabajo de la muestra ( $\Phi_m$ ).



**Figura 21.** Evolución del espectro XPS de las esferas de sílice durante los sucesivos pasos de la síntesis de las NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ .

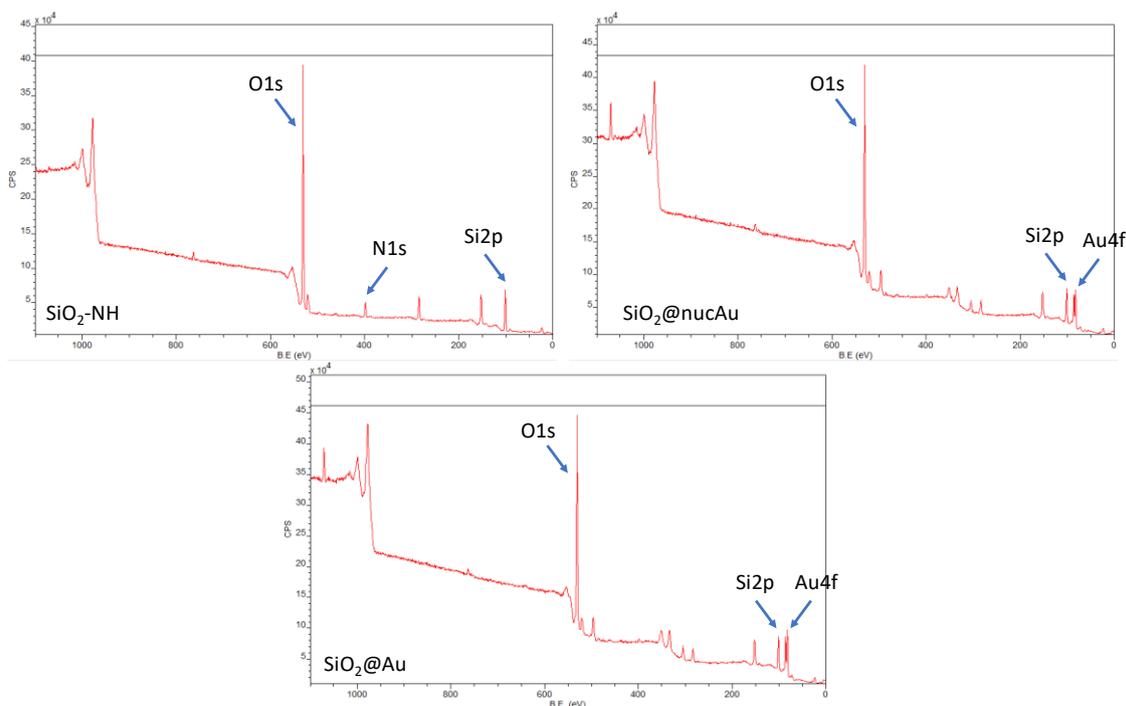
La Figura 21 muestra la evolución del espectro XPS de las esferas de sílice durante los sucesivos pasos de la síntesis. La deconvolución de los espectros XPS de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2@Sn^{+2}$ , and  $\text{SiO}_2@nucAg$  muestra los picos  $\text{Si}2p$  en el rango 101 - 102 eV (Tabla 1), los cuales son característicos del  $\text{Si}^{+2}$  y  $\text{Si}^{+3}$  presente en los subóxidos  $\text{S}_x\text{O}_y$ <sup>44</sup>. Adicionalmente, los picos  $\text{Si}2p$  en la región 101 - 102 eV son también asignados a especies  $\text{SiO}_x\text{C}_y$ <sup>45</sup>. Sin embargo, la muestra  $\text{SiO}_2@Ag$ , que fue fotoirradiada a 253,7 nm, tiene la señal característica de  $\text{SiO}_2$  a 103,5 eV.<sup>44,46</sup> Aminuzzaman y colaboradores<sup>46</sup> reportaron que luego de la exposición de luz a 254 nm, el pico  $\text{Si}2p$  de películas de polisilsesquioxano se desplaza de 102,22 eV a 103,50 eV. Sus resultados fueron explicados considerando una conversión química de la forma caja T a  $\text{SiO}_2$  del polisilsesquioxano.

Para las NPs  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2@Sn^{+2}$ , y  $\text{SiO}_2@nucAg$  se observa la señal  $\text{O}1s$  del Si-O cerca de 531 eV.<sup>47</sup> Pero la muestra  $\text{SiO}_2@Ag$  presenta la típica señal del  $\text{SiO}_2$  cerca de 533 eV, en completo acuerdo con el corrimiento en la señal de  $\text{Si}2p$  debido a la irradiación a 254 nm.<sup>46</sup> El hombro cerca de 534 eV presente en  $\text{SiO}_2@Sn^{+2}$  puede atribuirse a grupos -OH.<sup>48</sup> La señal a 529,9 - 529,8 eV, cerca de la observada para  $\text{SiO}_2@Sn^{+2}$  (529,7 eV), fue asignada al O unido al  $\text{Sn}^{2+}$ .<sup>49</sup>

Muestra	Si2p					
	Pico 1(eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)	Pico 3 (eV)	Área (%)
SiO <sub>2</sub>	101,97	83,88	101,8	16,12	---	---
SiO <sub>2</sub> @Sn <sup>+2</sup>	101,88	97,84	101,4	2,160	---	---
SiO <sub>2</sub> @nucAg	101,20	100,0	---	---	---	---
SiO <sub>2</sub> @Ag	103,55	84,29	103,2	15,71	---	---
Muestra	O 1s					
	Pico 1(eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)	Pico 3 (eV)	Área (%)
SiO <sub>2</sub>	531,3	61,79	531,3	38,21	---	---
SiO <sub>2</sub> @Sn <sup>+2</sup>	530,9	60,80	529,1	23,49	533,93	15,71
SiO <sub>2</sub> @nucAg	530,2	54,89	530,8	45,11	---	---
SiO <sub>2</sub> @Ag	532,9	96,04	530,6	3,960	---	---
Muestra	Ag 3d 5/2		Ag 3d 3/2			
	SiO <sub>2</sub> @nucAg	366,0		372,0		
SiO <sub>2</sub> @Ag	367,9		373,9			

**Tabla 1.** Detalles de los picos Si2p y O1s de XPS obtenidos por la deconvolución de las señales experimentales.

Los picos a 530,2 eV para SiO<sub>2</sub>@nucAg y a 530,6 eV para SiO<sub>2</sub>@Ag fueron asignados a Sn-O.<sup>50</sup> Las nanopartículas metálicas de plata muestran un pico de Ag 3d<sub>5/2</sub> cerca de 368 eV<sup>51</sup> en concordancia con la señal a 367,9 eV obtenida para SiO<sub>2</sub>@Ag. La menor energía de enlace de 366,0 eV detectada para las NPs SiO<sub>2</sub>@nucAg fue obtenida previamente por la emisión de los fotoelectrones 3d<sub>5/2</sub> de Ag<sup>0</sup> en nanoclusters.<sup>52</sup>



**Figura 22.** Evolución del espectro XPS de las esferas de sílice durante los sucesivos pasos de la síntesis de las NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

Es muy difícil distinguir entre los iones  $\text{Sn}^{2+}$  y  $\text{Sn}^{4+}$  en los datos de XPS.<sup>25</sup> Sin embargo, de los picos observados de  $\text{Sn } 3d_{5/2}$  cerca de 486 eV podemos excluir definitivamente la presencia de  $\text{Sn}^0$  en las muestras de  $\text{SiO}_2@n\text{Sn}^{+2}$ ,  $\text{SiO}_2@n\text{ucAg}$ , y  $\text{SiO}_2@n\text{Ag}$ .<sup>25</sup>

La Figura 22 muestra la evolución del espectro XPS de las esferas de sílice durante los sucesivos pasos de la síntesis de las NPs  $\text{SiO}_2@n\text{Au}$ .

La Tabla 2 muestra la evolución de las señales de XPS de Si2p, O1s, C1s y N1s durante el proceso de síntesis de las nanopartículas  $\text{SiO}_2@n\text{Au}$ .

Muestra		Si2p		
	Pico 1 (eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)
$\text{SiO}_2$	101,9	100,0		
$\text{SiO}_2\text{-NH}$	101,3	100,0		
$\text{SiO}_2@n\text{ucAu}$	101,2	100,0		
$\text{SiO}_2@n\text{Au}$	101,2	100,0		
Muestra		O1s		
	Pico 1 (eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)
$\text{SiO}_2$	531,3	100,0	---	---
$\text{SiO}_2\text{-NH}$	530,7	96,70	528,6	3,300
$\text{SiO}_2@n\text{ucAu}$	530,6	92,50	528,6	7,500
$\text{SiO}_2@n\text{Au}$	530,6	99,10	528,7	0,100
Muestra		C1s		
	Pico 1 (eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)
$\text{SiO}_2$	283,4	66,50	284,9	33,50
$\text{SiO}_2\text{-NH}$	283,9	93,30	286,4	6,700
$\text{SiO}_2@n\text{ucAu}$	282,9	66,00	285,1	34,00
$\text{SiO}_2@n\text{Au}$	283,0	76,00	285,4	24,00
Muestra		N1s		
	Pico 1 (eV)	Área (%)	Pico 2 (eV)	Área (%)
$\text{SiO}_2$	---	---	---	---
$\text{SiO}_2\text{-NH}$	398,3	85,80	397,3	14,20
$\text{SiO}_2@n\text{ucAu}$	397,9	100,0	---	---
$\text{SiO}_2@n\text{Au}$	398,0	100,0	---	---

**Tabla 2.** Detalle de los picos de XPS obtenidos para Si2p, O1s, C1s y N1s por deconvolución de las señales experimentales.

La señal de Si2p aparece a 101,9 eV en las nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , observándose un desplazamiento a menores valores de energía cuando las mismas son recubiertas por PEI. El mismo efecto fue reportado por Islam et al.<sup>53</sup> luego de recubrir sílice con PEI. Los

picos de Si2p se mantienen constantes entre 101,2 y 101,3 eV también para SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au, en las que la capa de PEI se espera permanezca sobre las partículas.

En todas las etapas de síntesis se observa una señal de O1s que corresponde a Si-O a una energía próxima a los 531 eV.<sup>47</sup> Para SiO<sub>2</sub>-NH, SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au, aparece una muy pequeña señal adicional a 528,6 eV que puede atribuirse a oxígeno adsorbido.<sup>54</sup>

La señal del C1s de contaminación ubicua de las muestras durante la exposición al aire es conocida como carbono adventicio.<sup>55</sup> La presencia de este componente, en muchos casos mayoritario, dificulta la interpretación de los picos resultantes de la deconvolución de esta señal y esa fue la razón por la que no se hizo un análisis detallado de la misma en este trabajo. Por esta razón aparece una señal muy pequeña en la muestra de SiO<sub>2</sub> aún no modificada. Sin embargo, la señal aumenta más de 3 veces en la muestra de SiO<sub>2</sub>-NH, debido a la presencia de los grupos orgánicos sobre la superficie de las nanopartículas. Zhang et al. asignaron las señales de XPS de C1s en nanopartículas de SiO<sub>2</sub> recubiertas con PEI que aparecen a valores de entre 283,4 y 284,8 eV a C-N y C-O, respectivamente. Para SiO<sub>2</sub>-NH puede verse en la Tabla XX una señal a 283,9 eV, intermedia entre los valores reportados por Zhang y colaboradores<sup>56</sup> y otra a 286,4 eV, esta última con el valor publicado por Kim y colaboradores<sup>57</sup> para este tipo de nanopartículas. Valores de energía similares se observan también para SiO<sub>2</sub>@nucAu y SiO<sub>2</sub>@Au.

Zhang y colaboradores reportaron que las señales de XPS de N1s en nanopartículas de SiO<sub>2</sub> recubiertas con PEI aparecen a valores de 397,1, 398,1 y 399,9 eV debido a grupos R<sub>2</sub>NH, RNH<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>N, respectivamente.<sup>56</sup> En nuestro caso para SiO<sub>2</sub>-NH observamos contribuciones a la señal experimental de picos a 397,3 y 398,3 eV, que pueden asignarse a los grupos R<sub>2</sub>NH, RNH<sub>2</sub>, respectivamente.<sup>56,58</sup> Cabe señalar que la amplitud de la señal de N1s es casi 60 veces mayor en la muestra de SiO<sub>2</sub>-NH que en la de SiO<sub>2</sub>@nucAu, debido a la cobertura parcial de la superficie por los núcleos de Au. También se observa para SiO<sub>2</sub>@Au una disminución, aunque solo del 10% en la intensidad de la señal en comparación con la de SiO<sub>2</sub>@nucAu.

Para las señales de Au4f se observa el desdoblamiento típico de la señal por el acoplamiento spin-órbita entre Au4f<sub>5/2</sub> y Au4f<sub>7/2</sub>. La diferencia entre ambos picos coincide con los valores reportados de 3,7 eV.<sup>59</sup> Los valores de energía correspondientes a los Au4f<sub>5/2</sub> y Au4f<sub>7/2</sub> se resumen en la Tabla 3.

Muestra	Pico de Au4f <sub>5/2</sub> (eV)	Pico de Au4f <sub>7/2</sub> (eV)
SiO <sub>2</sub> @nucAu	85.7	81.9
SiO <sub>2</sub> @Au	85.8	82.1

**Tabla 3.** Detalle de los picos de XPS obtenidos para Au4f<sub>5/2</sub> y Au4f<sub>7/2</sub> por deconvolución de las señales experimentales.

Hay cuatro posibles estados electrónicos para el oro que corresponderían a los cationes ( $\text{Au}^+$  y  $\text{Au}^{3+}$ ), al estado neutro ( $\text{Au}^0$ ), al oro parcialmente cargado con carga positiva ( $\text{Au}^{\delta+}$ ) y parcialmente cargado con carga negativa ( $\text{Au}^{\delta-}$ ).<sup>60,61</sup> Los valores de los picos de  $\text{Au}4f_{5/2}$  y  $\text{Au}4f_{7/2}$  que encontramos para de  $\text{SiO}_2@\text{nucAu}$  y de  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  a  $85,7 \pm 0,1$  y  $82,0 \pm 0,1$  eV corresponden a una carga superficial negativa sobre el oro. Resultados similares observados para nanopartículas de oro recubiertas con citrato y composites de esas nanopartículas con proteínas de seda se interpretaron mediante una transferencia de carga desde el citrato a la partícula de oro.<sup>62</sup> En nuestro caso, el estabilizante (capping) de citrato o HEBA podrían ser responsables de este comportamiento.

### 3.4.1.5 Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS)

La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, del inglés: Fluorescence Correlation Spectroscopy) es un método bien establecido para el análisis de soluciones de biomoléculas a bajas concentraciones, desde nanomolar hasta unos pocos micromoles por litro. Una de las ventajas de FCS es que solo requiere pequeños volúmenes de muestras. En un típico experimento básico, el volumen (femtolitro) del FCS, delimitado ópticamente, está localizado dentro de una gota de unos pocos microlitros de la solución homogénea de la muestra.

La FCS suele referirse como una técnica de molécula única dado que las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia surgen de las fluctuaciones en el número o el brillo de partículas fluorescentes individuales. Sin embargo, no se monitorea y analiza cada partícula individualmente, por lo que la FCS sería más correctamente descrita como una técnica sensible a moléculas individuales.

Los fundamentos teóricos de la FCS se basan en las leyes de la difusión molecular, formuladas de las observaciones de Brown del movimiento aleatorio de partículas, y de su análisis por Einstein y Smoluchowski en los comienzos de del siglo XX.<sup>63</sup> La FCS fue desarrollada como técnica a principios de 1970<sup>64,65</sup> como una “miniaturización” de la dispersión dinámica de la luz (DLS). La novedad de FCS recae en el análisis de las fluctuaciones en la emisión de fluorescencia de las moléculas de la muestra, inducidas por fluctuaciones espontáneas de parámetros físicos.

Un buen fluoróforo experimenta, en promedio, aproximadamente 106 ciclos de excitación antes de ser destruido irreversiblemente por el fotoblanqueamiento. Para obtener buenos resultados, es importante elegir un fluoróforo fotoestable dentro del rango de longitudes de onda apropiado. La elección de colorantes fluorescentes puede estar limitada por la disponibilidad de líneas de láser y los correspondientes sistemas de filtro. Para aplicaciones de un solo color, puede utilizarse un amplio rango de longitudes de onda de emisión, aunque cuando se aproximan a la zona del UV o infrarrojo, las limitaciones en la región espectral causadas por la sensibilidad del detector y las curvas

de transmisión de los componentes ópticos relevantes tienen que ser tenidas en cuenta. Las aplicaciones multicolor requieren que los cromóforos sean distinguibles espectralmente (es decir, tengan un solapamiento espectral mínimo). Este requerimiento depende de la forma del espectro de emisión y de los filtros seleccionados, pero generalmente, es mejor la mayor separación posible entre los picos de emisión.

Continuamente ocurren fluctuaciones minúsculas en la señal de fluorescencia de moléculas excitadas dentro del volumen focal a temperatura ambiente. Generalmente son observadas como patrones de ruido (no deseado) de la señal medida. Estas fluctuaciones pueden ser cuantificadas con respecto a su fuerza y duración por autocorrelación temporal de la señal de intensidad grabada. El análisis de autocorrelación provee una medida de la similitud de una serie de señales en el tiempo y, por lo tanto, describe la persistencia de la información que contienen. Información esencial sobre procesos que gobiernan la dinámica molecular pueden, por ende, ser derivados desde el patrón temporal por el cual las fluctuaciones en la fluorescencia surgen y decaen. En consecuencia, la función de autocorrelación normalizada para las fluctuaciones de fluorescencia  $\delta F(t)$  de la señal  $F(t)$  se define como

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (E7)$$

donde

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (E8)$$

y

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (E9)$$

Esto es un promedio temporal de la señal  $F$  al tiempo  $t$  multiplicado por la señal  $F$  al tiempo posterior  $t + \tau$ , normalizado por el cuadrado del promedio de  $F$  sobre el tiempo de adquisición  $T$  (tiempo total de la medida). Esta rutina de autocorrelación provee una medida de la similitud (la memoria) de una señal temporal luego de un tiempo de retraso (lag)  $t$  y revela constantes temporales características del proceso subyacentes.

Debido a que las fluctuaciones relativas se vuelven más pequeñas con el incremento en el número de partículas medidas, es importante tener un pequeño número de moléculas en el volumen focal. Aproximadamente, el promedio temporal del número de partículas debería ser entre 0,1 y 1000, el cual corresponde a concentraciones entre subnanomolar ( $10^{-10}$  M) y micromolar ( $10^{-6}$  M) para un volumen focal limitado por difracción ( $<1$  fL). El modelo más común para el volumen de observación es un simple perfil Gaussiano en tres dimensiones, el cual fue introducido por Aragón y Pecora<sup>66</sup> (1975) y se encontró que fue una buena aproximación para la configuración confocal.<sup>67</sup> En la dirección radial, el

radio  $1/e^2$  viene dado por  $r_0$ ; en la dirección axial, está dado por  $z_0$ . El volumen focal efectivo puede definirse como

$$V_{ef} = \pi^{3/2} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (E10)$$

Hay que tener en cuenta que los parámetros  $r_0$  y  $z_0$  sirven para caracterizar el tamaño y la forma del volumen de detección. El volumen de detección no solo depende del haz de iluminación sino también de otros parámetros ópticos.

Considerando solamente la difusión traslacional para especies simples y en un elemento de volumen Gaussiano tridimensional, la función de autocorrelación es

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle \cdot V_{ef}} \cdot \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (r_0^2/z_0^2)(\tau/\tau_D)}} \quad (E11)$$

Primero, el tiempo de difusión lateral  $\tau_D$  que una molécula permanece en el volumen focal depende de la dimensión  $r_0$  y del coeficiente de difusión ( $D_c$ ) independiente de la configuración:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D} \quad (E12)$$

(para la excitación con un fotón)

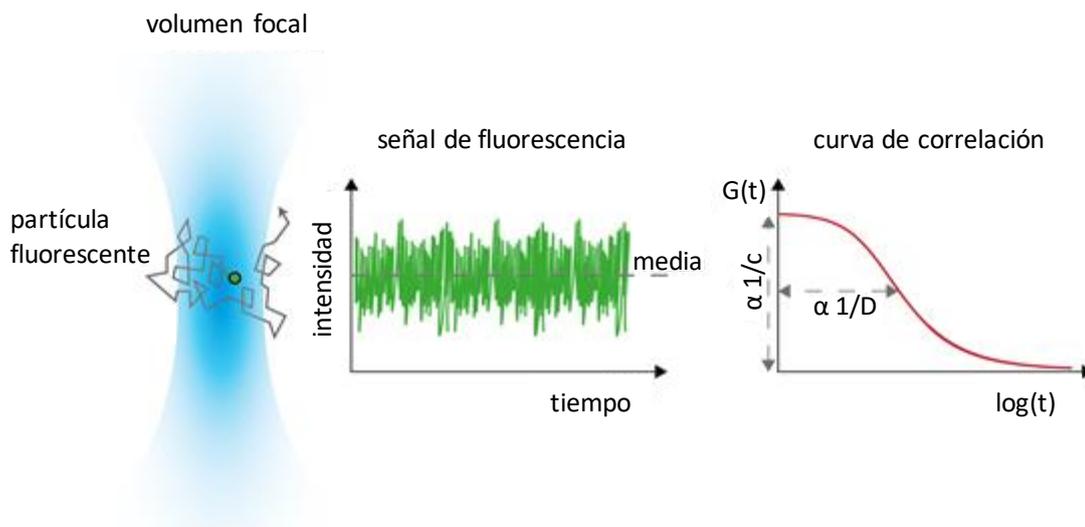
Para propiedades conocidas de las partículas, la viscosidad local puede derivarse del coeficiente de difusión, el cual es inversamente proporcional a la viscosidad  $\eta_V$  del medio:

$$D_i = \frac{kT}{6\pi\eta_V R_{h,i}} \quad (E13)$$

(Ecuación de Stokes-Einstein)

donde  $R_{h,i}$  es el radio hidrodinámico de la partícula,  $T$  es la temperatura, y  $k$  es la constante de Boltzmann. Para temperatura y viscosidad constante, el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al radio hidrodinámico.

Aunque las curvas de FCS son fáciles de obtener, su interpretación puede no ser sencilla. Muchos parámetros libres en el procedimiento del ajuste arrojarán resultados aparentemente buenos, incluso si los valores para esos parámetros no reflejan las propiedades de la muestra o no tienen significado físico alguno. Conocimientos previos sobre el sistema biológico puede, de esta manera, ayudar a eliminar conclusiones incorrectas. Las sustancias a utilizar deben ser caracterizadas lo más cuidadosamente posible antes de comenzar con las medidas de FCS.



**Figura 23.** A la izquierda se representa el volumen focal en el cual se analiza el movimiento del fluoróforo. En el centro de la imagen tenemos un gráfico de intensidad de fluorescencia en función del tiempo (es la señal cruda que recoge el detector). A la derecha, tenemos la función de autocorrelación en función del tiempo.

Además, los cambios en la masa molecular, causada por la unión tiene que ser suficientemente grande para tener una influencia resoluble en el coeficiente de difusión. Dado que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al radio hidrodinámico, el cual, en parte, depende de la raíz cúbica de la masa molecular de las partículas esféricas, un aumento en la masa en un factor de 8 solo reducirá a la mitad al coeficiente de difusión. Este efecto es difícilmente visible en la escala de tiempo logarítmica usada para las curvas de FCS. Por el contrario, la unión de pequeñas moléculas fluorescentes a grandes moléculas no marcadas o a receptores de membrana de baja difusión será fácilmente discernible.

Cualquier cambio en la forma o el tamaño molecular por unión o ruptura que afecte al radio hidrodinámico de la partícula se ve también reflejado en el coeficiente de difusión y, de este modo, en el tiempo de difusión promedio a través del volumen de observación. Para estudios de unión o interacción, en el cual solo el ligando pequeño está marcado, al menos dos especies difusoras distintas deben ser tenidas en cuenta.

De las señales de fluorescencia dependientes del tiempo en el volumen focal es posible obtener funciones de autocorrelación para determinar el tiempo de difusión de una sonda fluorescente. De esta información luego se calculan los coeficientes de difusión.

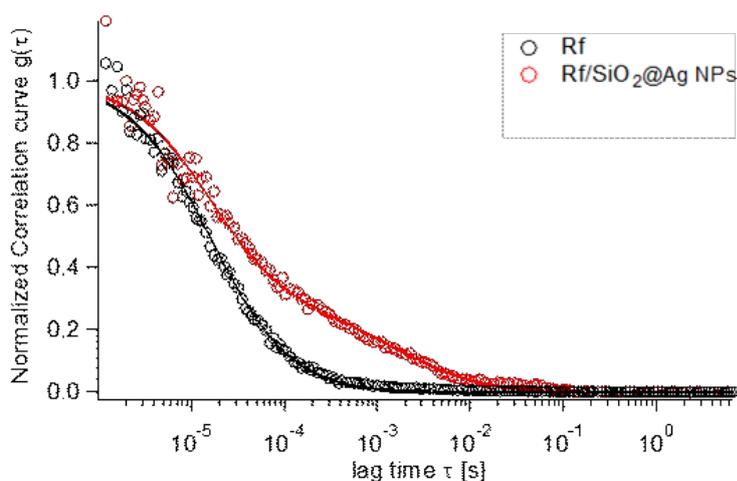
Hay que ser cuidadosos cuando se realizan experimentos de FCS con suspensiones coloidales de nanopartículas porque además de las fluctuaciones de fluorescencia detectadas con esta técnica, el movimiento Browniano de una partícula simple en un pequeño volumen focal de detección (menos de 1,0 fL) genera fluctuaciones de dispersión de luz resonante<sup>50</sup>.

Por las razones anteriores, hemos realizado varios ensayos de FCS con suspensiones de NPs de SiO<sub>2</sub>@Ag, soluciones del fluoróforo y mezclas de ambos, de manera de diferenciar entre las señales surgidas de la fluorescencia y de la dispersión. El criterio empleado para esta distinción se basó en la intensidad de la señal, la cual se espera que sea mucho más alta para la fluorescencia que para el efecto de dispersión.

En este trabajo, la técnica de FCS se utilizó para determinar el grado de asociación de la droga con las nanopartículas. Midiendo FCS es posible distinguir entre la droga libre (difusión rápida) y la droga asociada a las nanopartículas, cuya difusión es más lenta.

Las funciones de correlación obtenidas de los experimentos de FCS ( $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}}$  en el rango de 500 – 700 nm) realizados con soluciones de Rf de concentración 9,3  $\mu\text{M}$  a 37 °C fueron ajustadas con una ecuación de una componente, la cual arrojó un coeficiente de difusión  $D_{c1} = (485 \pm 15) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ . Este valor puede ser atribuido a la difusión de las moléculas libres en solución. Ensayos similares fueron llevados a cabo con muestras conteniendo 9,3  $\mu\text{M}$  de Rf y 13,905 a 41,715  $\mu\text{M}$  de Ag en las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag. Bajo estas condiciones, la función de autocorrelación se ajustó con una ecuación de dos componentes evidenciando la existencia de una segunda especie fluorescente con un coeficiente de difusión  $D_{c2} = (4,2 \pm 0,4) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ , el cual está relacionado a la difusión de la droga adsorbida sobre las NPs (Figura 24). De hecho, los tamaños calculados para las especies difusoras a partir de los coeficientes de difusión aplicando la ecuación de Stokes- Einstein es muy similar a los tamaños medidos por TEM y DLS, confirmando que el coeficiente de difusión determinado corresponde a la droga unida sobre la NP (Figura 24 y Tabla 4).

Experimentos de FCS realizados con RB<sup>2-</sup> no arrojaron buenos diagramas de correlación debido al bajo rendimiento cuántico de este colorante.<sup>68</sup> Por lo tanto, no fue posible emplear la técnica de FCS con esta droga para ver su unión a las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag.



**Figura 24.** Curvas de autocorrelación normalizadas de Riboflavina sola (círculos negros) y Riboflavina con NPs SiO<sub>2</sub>@Ag (círculos rojos). Las líneas sólidas son los respectivos ajustes.

	$t_{D1}$ ( $\mu$ s)	$t_{D2}$ ( $\mu$ s)	$D_{c1}$ ( $\mu$ m <sup>2</sup> /s)	$D_{c2}$ ( $\mu$ m <sup>2</sup> /s)
Rf	16,2 ± 0,5	---	485 ± 15	---
Rf-SiO <sub>2</sub> @Ag	16,2 ± 2,5	1886 ± 166	485 ± 75	4,2 ± 0,4

\*El ajuste se obtiene fijando el tiempo de difusión del primer componente al tiempo de difusión de la especie libre.

**Tabla 4.** Datos de FCS obtenidos a partir del fito de las funciones de correlación de la Figura 24. Los tiempos de difusión ( $\tau_D$ ) se obtienen por ajuste de los datos crudos por el Modelo de Difusión Normal-3D con uno o dos componentes. El volumen confocal fue estimado utilizando una solución 25 nM de Rodamina 6G.

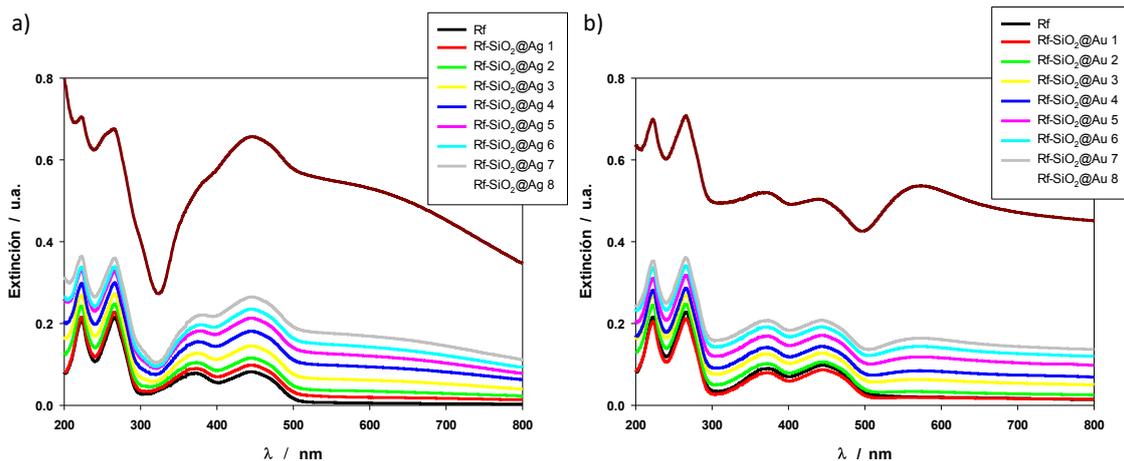
### 3.4.2 Estudio de la interacción de los estados fundamental y excitado singlete con las nanopartículas, por medio de espectroscopía UV-visible y de Fluorescencia.

Para poder comprender el efecto de los nanomateriales sintetizados en esta tesis sobre la fotofísica de colorantes utilizados en PDT, es necesario estudiar la interacción de las partículas con los diferentes estados electrónicos de los fotosensibilizadores orgánicos. Por este motivo, utilizamos, en primer lugar, la espectroscopía UV-visible para evaluar la interacción del estado fundamental de los fotosensibilizadores con las nanopartículas. Medimos espectros de extinción (absorción y dispersión) de Rf, RB<sup>-2</sup> y MB<sup>+</sup> a una concentración fija (Abs de 0,1 aproximadamente en la longitud de onda del máximo de absorción) en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas (ver Tabla 5). Todos los volúmenes de nanopartículas de la suspensión original se llevaron a un volumen final de 2 mL.

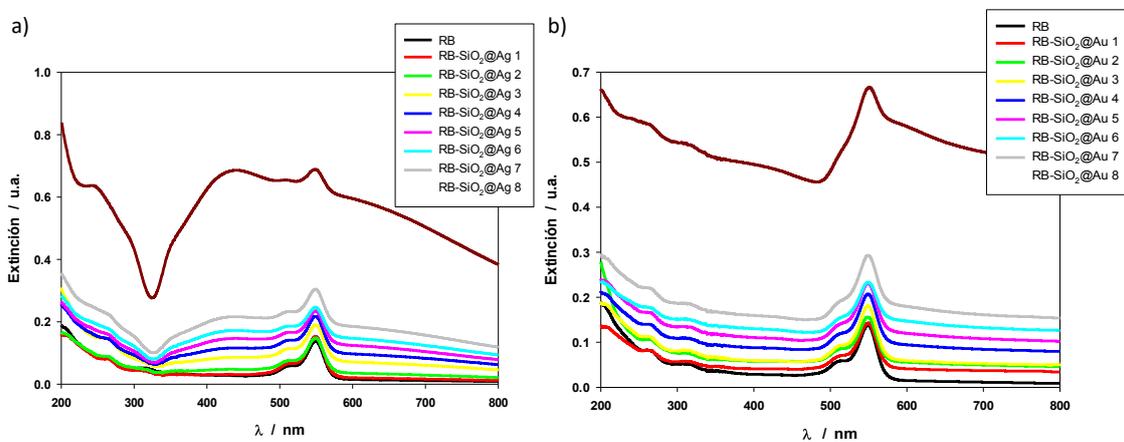
Muestra	Vol NP ( $\mu$ L)	[SiO <sub>2</sub> ] (M)
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 1	7,50	1,1x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 2	15,0	2,1x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 3	30,0	4,3x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 4	45,0	6,4x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 5	60,0	8,5x10 <sup>-4</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 6	75,0	1,1x10 <sup>-3</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 7	90,0	1,3x10 <sup>-3</sup>
SiO <sub>2</sub> @Ag o Au 8	300	4,3x10 <sup>-3</sup>

**Tabla 5.** Volúmenes de nanopartículas utilizados en las medidas de los espectros de extinción y fluorescencia. Las concentraciones se expresan para el SiO<sub>2</sub> ya que ambas nanopartículas contienen la misma cantidad de esferas de sílice.

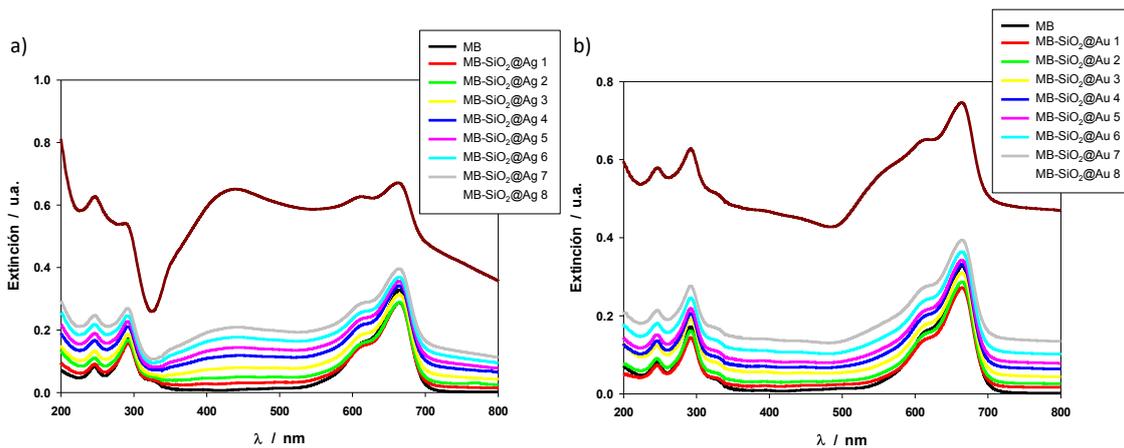
En las Figuras 25-27 se muestran los espectros obtenidos para los tres colorantes en presencia de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au.



**Figura 25.** Espectros de extinción de Rf sola y con cantidades crecientes de nanopartículas a)  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y b)  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .



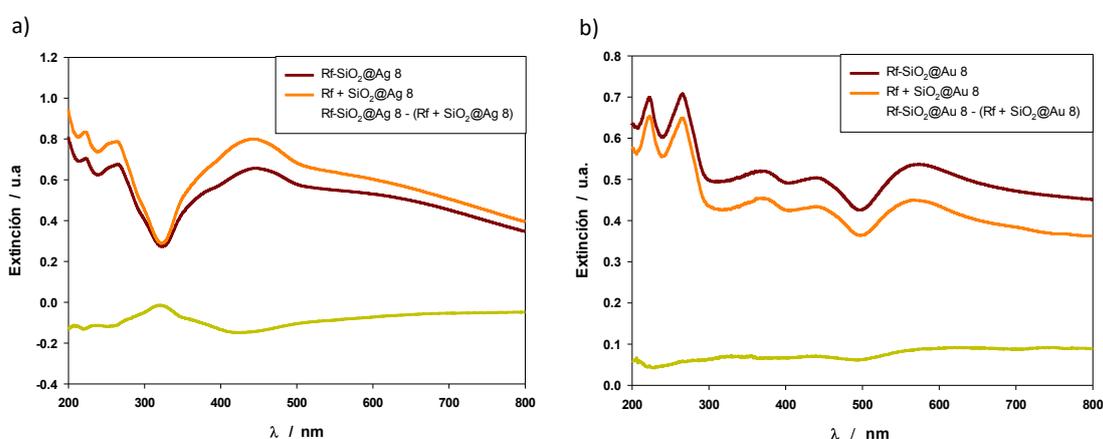
**Figura 26.** Espectros de extinción de  $\text{RB}^{-2}$  sola y con cantidades crecientes de nanopartículas a)  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y b)  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .



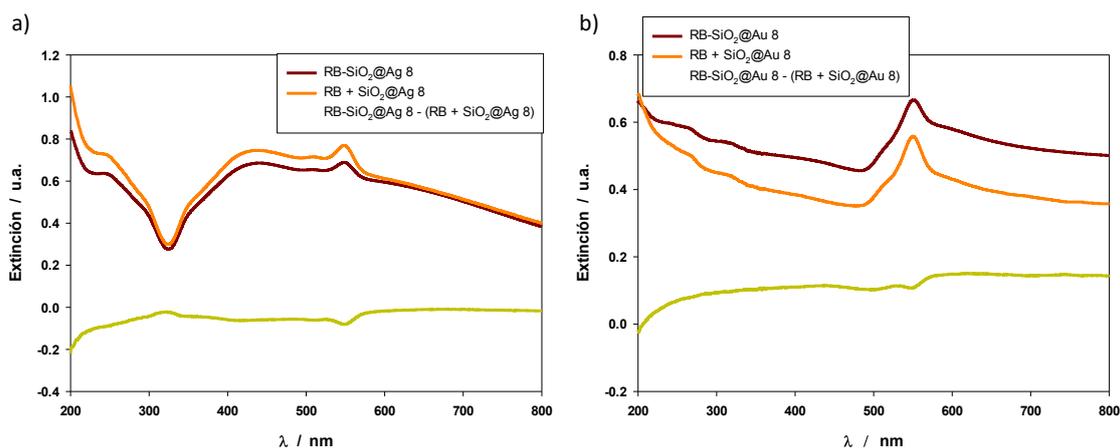
**Figura 27.** Espectros de extinción de MB sola y con cantidades crecientes de nanopartículas a)  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y b)  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .

En todos los casos puede verse que al aumentar la cantidad de nanopartículas se produce un incremento en las bandas de absorción de los colorantes. Este comportamiento podría deberse a que las partículas metálicas generan un incremento en la tasa de excitación (incremento en  $E_m$ , como se explicó en la sección 3.1.2). Pero esto se discutirá más adelante para cada caso en particular.

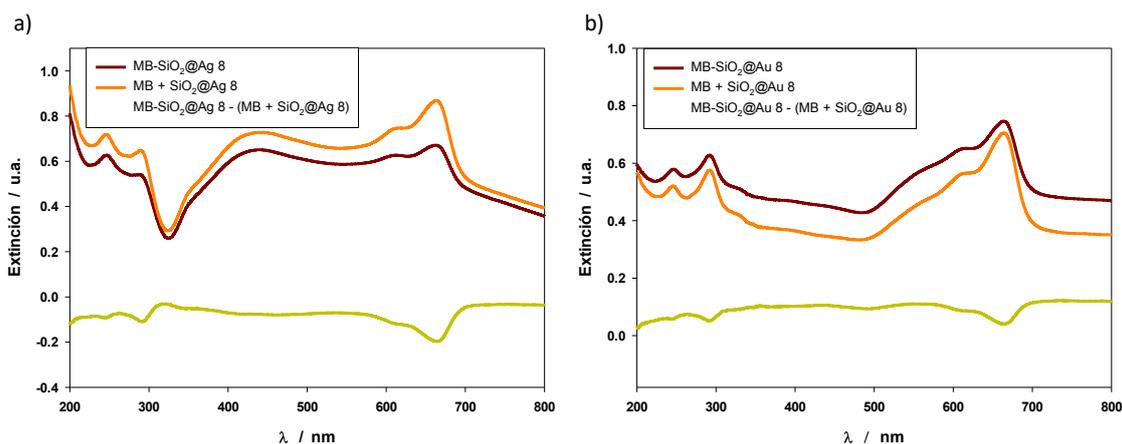
Además, podría existir una interacción química entre los colorantes y las NPs que produjera un cambio en la absorción respecto del colorante libre. Para verificar la posible interacción química entre las nanopartículas y los colorantes, en las Figuras 28-30 se muestran los espectros obtenidos para las mezclas con la mayor concentración de nanopartículas ( $4,3 \times 10^{-3}$  M), la suma de los espectros de los colorantes y las nanopartículas y la diferencia entre los espectros de la mezcla y la suma de los espectros.



**Figura 28.** Espectros de extinción obtenidos para las mezclas con la mayor concentración de nanopartículas, la suma de los espectros de los colorantes y las nanopartículas y la diferencia entre los espectros de la mezcla y la suma de los espectros.



**Figura 29.** Espectros de extinción obtenidos para las mezclas con la mayor concentración de nanopartículas, la suma de los espectros de los colorantes y las nanopartículas y la diferencia entre los espectros de la mezcla y la suma de los espectros.



**Figura 30.** Espectros de extinción obtenidos para las mezclas con la mayor concentración de nanopartículas, la suma de los espectros de los colorantes y las nanopartículas y la diferencia entre los espectros de la mezcla y la suma de los espectros.

Como puede verse en las Figuras 28-30, los espectros diferencia no son nulos, por lo que no puede descartarse la interacción química en ningún caso. La reacción 18 esquematiza esta interacción:



Donde G representa un grupo reactivo superficial de las nanopartículas.

Los grupos G podrían ser los grupos silanoles de las nanopartículas o átomos metálicos (Au o Ag). Se ha reportado la interacción química entre Ag metálica y distintos compuestos orgánicos, como por ejemplo ácidos orgánicos derivados del pireno<sup>69</sup>, melanina.<sup>70</sup> En particular se ha encontrado evidencia experimental y teórica sobre la interacción de Ag metálica con los colorantes: índigo,<sup>71</sup> o-safranina,<sup>72</sup> malva,<sup>73</sup> rojo allura,<sup>74</sup> cianinas,<sup>75</sup> entre otros.

Son menos numerosos los trabajos publicados sobre la interacción química entre oro metálico y colorantes orgánicos u organometálicos. Entre ellos podemos mencionar los complejos de Au con colorantes BODIPY (abreviatura de borodipirrometano),<sup>76</sup> con colorantes de rutenio<sup>77</sup> y la formación de clusters de oro con colorantes perilénicos.<sup>78</sup>

En resumen, existe bibliografía que respalda la posible interacción química de plata u oro metálico con colorantes orgánicos.

Para cuantificar la interacción química, cuando sea posible se aplicará el método de Benesi Hildebrand.<sup>79</sup>

El método emplea la ecuación E14.

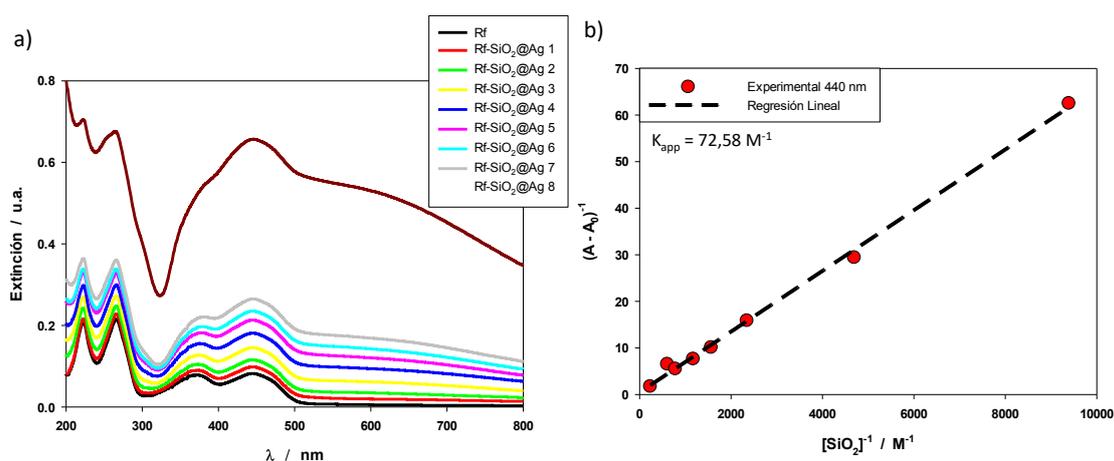
$$\frac{1}{(A - A_d)} = \frac{1}{(A_c - A_d)} + \frac{1}{K_{app}(A_c - A_d)[G]} \quad (\text{E14})$$

donde  $A$  es la absorbancia corregida a la longitud de onda de análisis ( $\lambda_{an}$ ) de las muestras de los colorantes en presencia de diferentes cantidades de nanopartículas, y  $A_d$  (del inglés: dye) y  $A_c$  (del inglés: complex) son las absorbancias del colorante y del complejo en la  $\lambda_{an}$ , respectivamente.

Según este método el gráfico del miembro de la izquierda de la ecuación E14 vs.  $[NP]^{-1}$  debería ser lineal y del cociente entre la ordenada al origen y la pendiente puede obtenerse la constante de equilibrio aparente para el complejo formado entre las NPs y el colorante. En todos los casos utilizaremos la concentración de  $SiO_2$  como representativa de la concentración de nanopartículas.

Este método supone una estequiometría 1:1 entre el colorante y los sitios de las NPs que formen el complejo con el colorante. Además, para que este método sea válido la concentración inicial de los grupos presentes en las nanopartículas capaces de complejar al colorante debe ser mucho mayor a la concentración inicial del colorante. En caso de no cumplirse esa condición, que en nuestro caso es válida, habría desviaciones con respecto a la linealidad.<sup>80</sup>

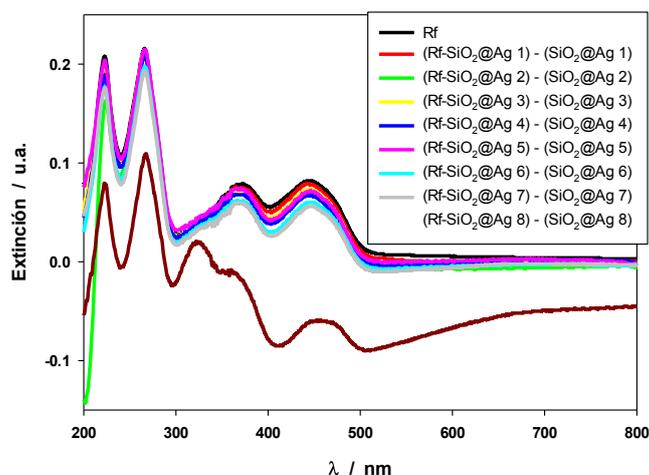
Comencemos con el análisis de las nanopartículas  $SiO_2@Ag$  y  $SiO_2@Au$  con Riboflavina. En la Figura 31a, a medida que aumenta la concentración de nanopartículas, puede observarse un incremento en la absorción en todo el rango de longitudes de onda evaluado (200 - 800 nm). Este cambio en el espectro de extinción podría deberse a la formación de un complejo entre la Rf y las NPs que produjera un cambio en la absorción respecto de la Rf libre, o bien que las partículas metálicas generen un incremento en la tasa de excitación (incremento en  $E_m$ , como se explicó en la sección 3.1.2). La aplicación del método de Benesi Hildebrand se muestra en la Figura 31b.



**Figura 31.** a) Espectros de extinción de Rf sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $SiO_2@Ag$ . b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[SiO_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand, a partir del cual puede obtenerse la constante de unión ( $K_{app}$ ).

En la Figura 31b y en las siguientes en las que se aplicó el método de Benesi-Hildebrand se optó por representar el gráfico en función de  $[\text{SiO}_2]^{-1}$ .

Según el gráfico de la Figura 31b, pudimos obtener una constante de unión ( $K_{\text{app}}$ ) de  $72,58 \text{ M}^{-1}$ , lo cual indicaría la formación de un complejo de la Riboflavina en el estado fundamental con las nanopartículas de sílice recubiertas con plata (Rf-SiO<sub>2</sub>@Ag). Los espectros diferencia entre la mezcla de Rf con las diferentes cantidades de nanopartículas y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas (Figura 32), contienen información sobre la absorción del colorante libre y ligado a las nanopartículas (complejo).

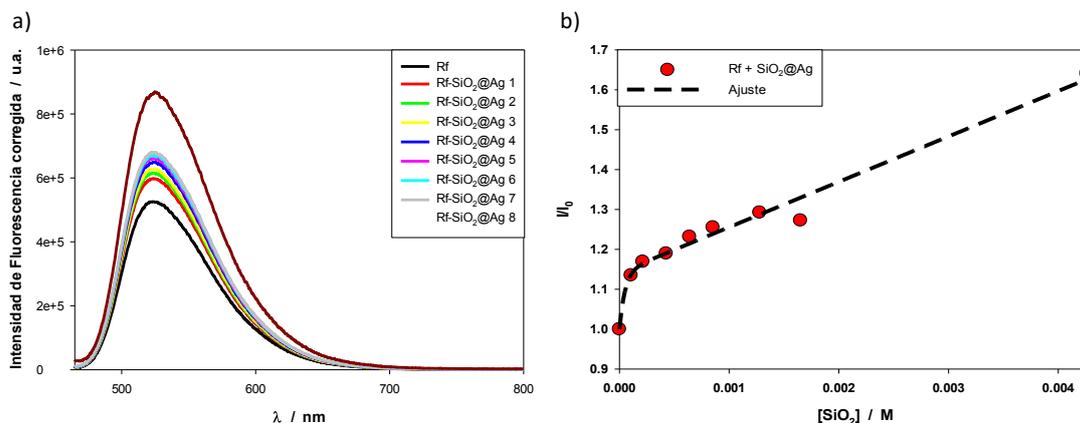


**Figura 32.** Espectros diferencia entre las mezclas de Rf con diferentes cantidades de SiO<sub>2</sub>@Ag y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

Como puede inferirse de la Figura 32, el complejo Rf-SiO<sub>2</sub>@Ag tiene menor absorción que el colorante libre, dado que a medida que aumenta la cantidad de nanopartículas (y por ende la cantidad de complejo con el colorante) disminuye la absorción.

Ahora que hemos determinado la interacción existente entre la Rf y las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag, estudiaremos si esto tiene efecto en la formación del estado excitado singlete del colorante. Para este estudio, utilizamos la espectroscopía de fluorescencia y realizamos medidas de los espectros de emisión de las mismas muestras utilizadas en la espectroscopía UV-visible. Como vimos en el diagrama de Jablonski de la Figura 13, cualquier interacción entre el estado S<sub>1</sub> del fotosensibilizador orgánico y la nanopartícula tendría como consecuencia un efecto en el decaimiento radiativo (fluorescencia) o no radiativo al estado fundamental, que se vería evidenciado en los espectros de emisión. Teniendo en cuenta esto, existen, en principio, tres posibles efectos: por un lado, que la presencia de las NPs genere un aumento en la fluorescencia del colorante (fluorescencia aumentada por metales, MEF), por el otro, que el metal genera una disminución en la emisión (desactivación no radiativa del estado excitado,

quenching), o que forme un complexo con fluorescencia diferente de la del colorante libre.



**Figura 33.** a) Espectros de emisión de Rf en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ , con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la Rf libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

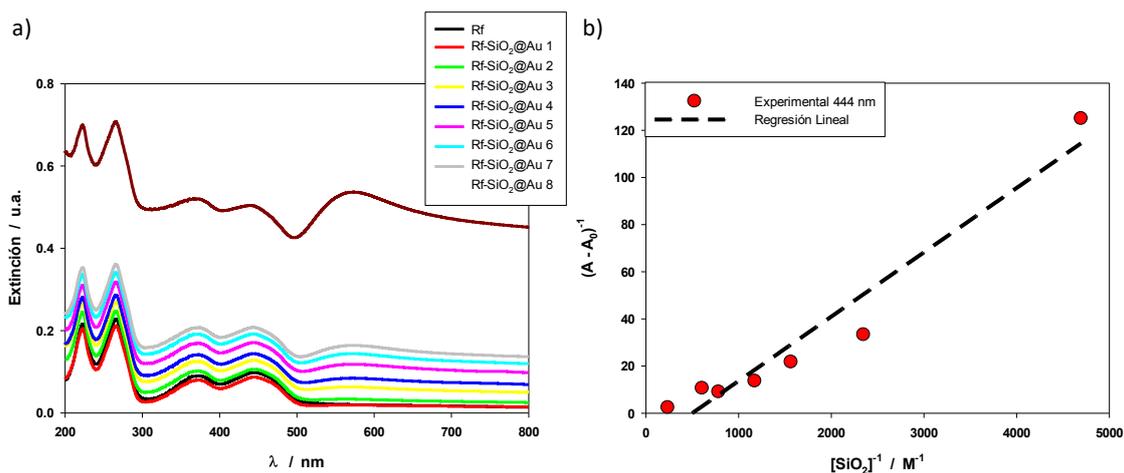
En la Figura 33a vemos los espectros de emisión corregidos de la Riboflavina en ausencia y en presencia de nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ , los cuales se obtuvieron aplicando la siguiente ecuación (2)<sup>81</sup> a los espectros crudos obtenidos de las muestras utilizadas en espectroscopía UV-visible:

$$I_c = I_0 \cdot 10^{(A_{exc} + A_{em})/2} \quad (E15)$$

donde  $I_c$  es la intensidad de fluorescencia corregida,  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia de la mezcla,  $A_{exc}$  y  $A_{em}$  son la absorbancia de la mezcla en la longitud de onda de excitación y en la longitud de onda del máximo de emisión, respectivamente. El factor 2 considera que la absorción y la emisión tienen lugar en el centro de la celda. Si graficamos la relación entre la intensidad de fluorescencia corregida para las mezclas y la intensidad de fluorescencia de la Rf libre vs. la concentración de nanopartículas (expresada en función de la concentración de  $\text{SiO}_2$ ), tal cual se muestra en la Figura 33b, observamos que la emisión de la mezcla aumenta a medida que se incrementa la cantidad de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ .

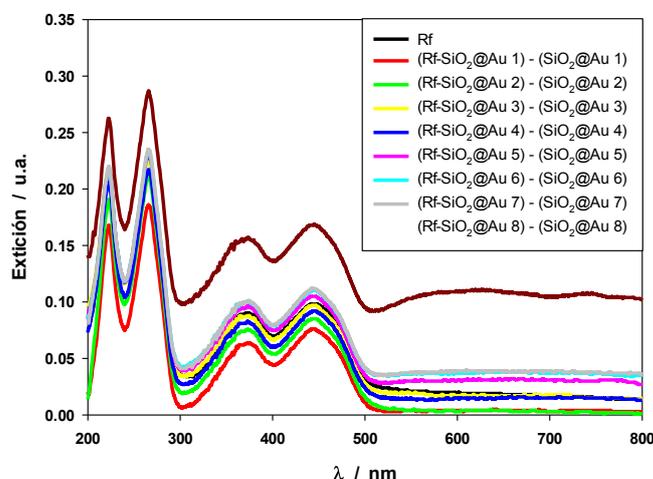
Luego de analizar los resultados obtenidos de la espectroscopía UV-visible y de fluorescencia para las mezclas de Rf y NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ , podemos concluir que se forma un complejo entre el estado fundamental de la Riboflavina y las partículas de sílice recubiertas con plata, que tiene una absorción menor que la Rf libre, pero que produce un aumento en la fluorescencia de la misma. Este resultado podría deberse a una disminución de la constante de velocidad de la desactivación no radiativa del estado singlete del complejo comparada con la del colorante libre, lo que resulta en un aumento de su rendimiento cuántico de fluorescencia.

Podemos realizar el mismo análisis general para la Riboflavina en presencia de NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ . En este caso vemos nuevamente un incremento en la absorción en todo el rango de longitudes de onda evaluado (Figura 34a). Sin embargo, cuando analizamos la formación de complejo entre el colorante y las partículas utilizando la ecuación de Benesi y Hildebrand (Figura 34b), no somos capaces de determinar una constante de unión, ya que de la pendiente y la ordenada al origen del gráfico  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  obtenemos un valor negativo de  $K_{\text{app}}$ . Este es el resultado indica que el complejo no se forma o que es muy débil.<sup>82</sup>



**Figura 34.** a) Espectros de extinción de Rf sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ . b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

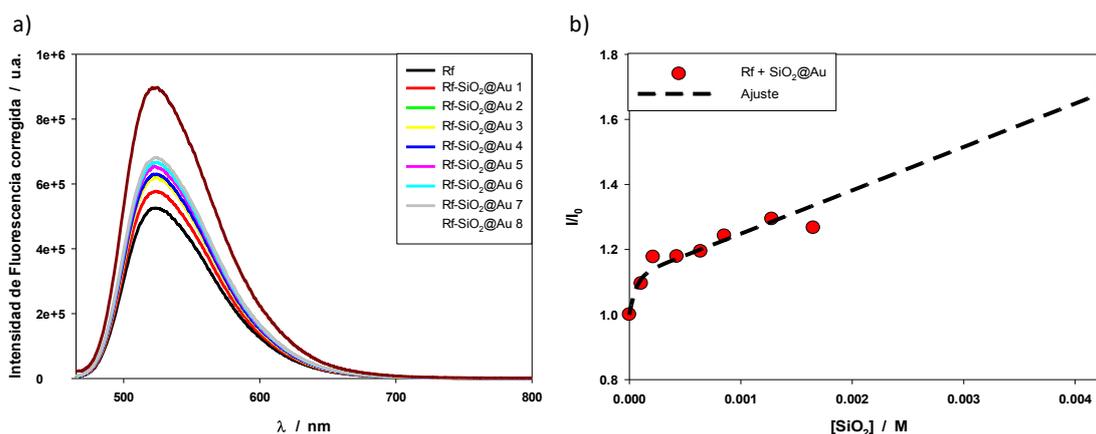
Si graficamos los espectros diferencia entre las mezclas de Rf con diferentes cantidades de NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  y los correspondientes espectros de absorción de las partículas solas vemos que (Figura 35), a diferencia de lo que ocurría con las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$ , la absorción del colorante aumenta a medida que se incrementa la cantidad de nanopartículas.



**Figura 35.** Espectros diferencia entre las mezclas de Rf con diferentes cantidades de  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

Si bien es cierto que luego del agregado de la mínima cantidad de NPs la absorción de la Rf es mucho menor respecto a la Rf libre, a medida que subimos la concentración de partículas en la mezcla, la absorción del fotosensibilizador aumenta paralelamente.

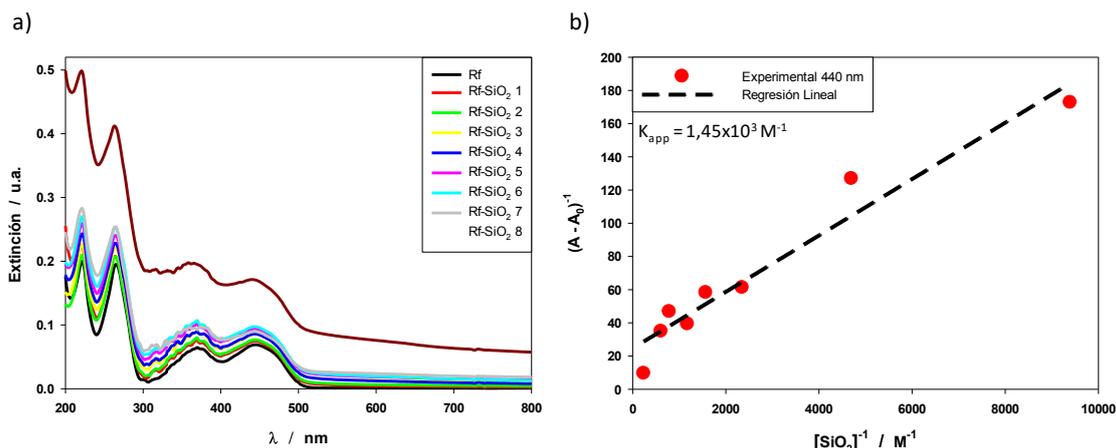
Dado que podríamos descartar la formación de un complejo entre el estado fundamental de la Rf y las NPs  $\text{SiO}_2@Au$ , o que en caso de formarse este sería muy débil y que observamos un incremento en la absorción del colorante en presencia de las partículas, pasamos a estudiar el efecto de las mismas en el estado excitado singlete.



**Figura 36.** a) Espectros de emisión de Rf en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2@Au$ , con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la Rf libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

Como podemos observar de los gráficos de la Figura 36, la intensidad de fluorescencia corregida de la Rf aumenta a medida que incrementamos la cantidad de NPs  $\text{SiO}_2@Au$ . Teniendo en cuenta que, de los espectros de extinción, concluimos que las nanopartículas no forman un complejo con la Riboflavina, sino que producen un aumento en la tasa de excitación del colorante, descartamos la posibilidad de que esté ocurriendo MEF. Esto se debe a que el aumento en la fluorescencia del fotosensibilizador es a causa del incremento en la tasa de excitación, lo cual incrementa la población del estado excitado singlete y hace que un número mayor de moléculas decaigan radiativamente al estado fundamental, sin modificar ni la constante de decaimiento radiativo, ni el tiempo de vida de fluorescencia (lo que produciría un cambio en el rendimiento cuántico de fluorescencia).

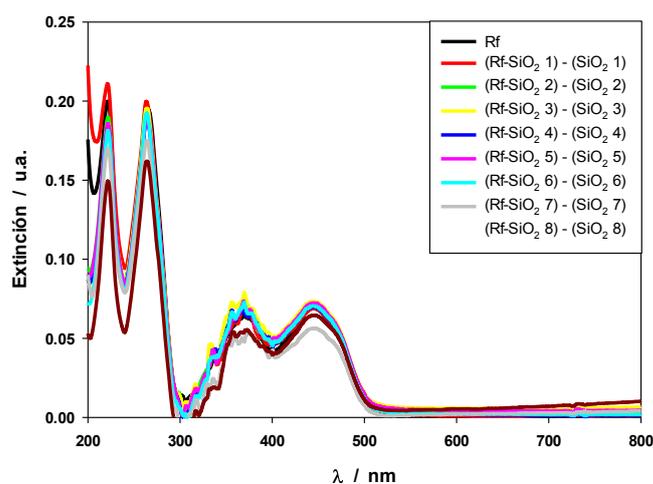
Para comprobar si estos efectos que vemos sobre la fotofísica de la Rf se deben a la presencia de las nanopartículas metálicas, hicimos los mismos ensayos espectroscópicos para mezclas del colorante con cantidades crecientes de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  sin recubrimiento.



**Figura 37.** a) Espectros de extinción de Rf sola y con cantidades crecientes de nanopartículas SiO<sub>2</sub>. b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

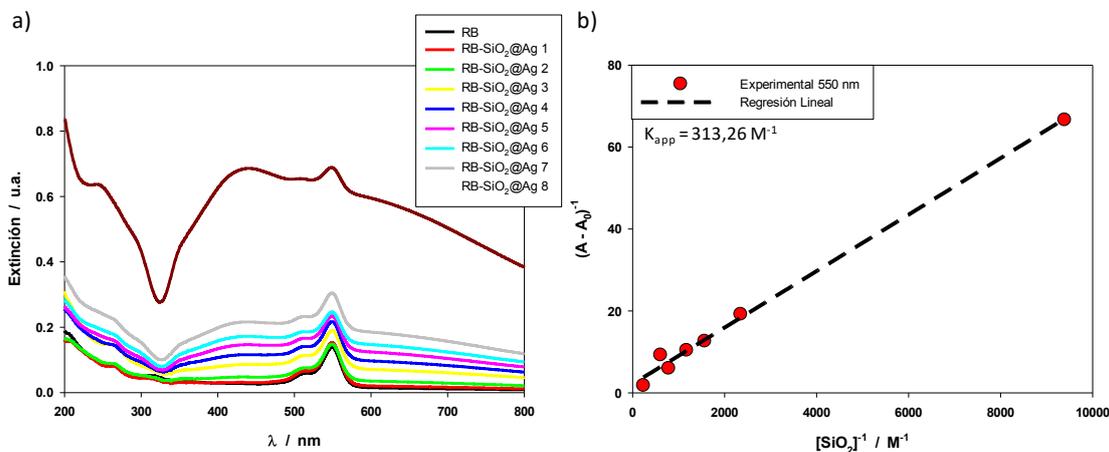
De los parámetros obtenidos del gráfico de la Figura 37b, calculamos el valor de  $K_{\text{app}}$  para formación del complejo Rf-SiO<sub>2</sub>, la cual dio un valor de  $1,45 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Esto nos dice que, no solo se forma un complejo entre el estado fundamental del colorante y las partículas de sílice, sino que además la afinidad del fotosensibilizador por las NPs SiO<sub>2</sub> es mucho mayor que por las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag ya que el valor de  $K_{\text{app}}$  es 2 órdenes de magnitud mayor que el obtenido para las partículas recubiertas con Ag.

Cuando analizamos los gráficos de la Figura 38, vemos que en los espectros de absorción diferencia no hay ningún efecto de las nanopartículas sobre la Riboflavina, por lo que podemos concluir que los cambios observados anteriormente para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au son causados por la interacción del colorante con las nanopartículas metálicas.



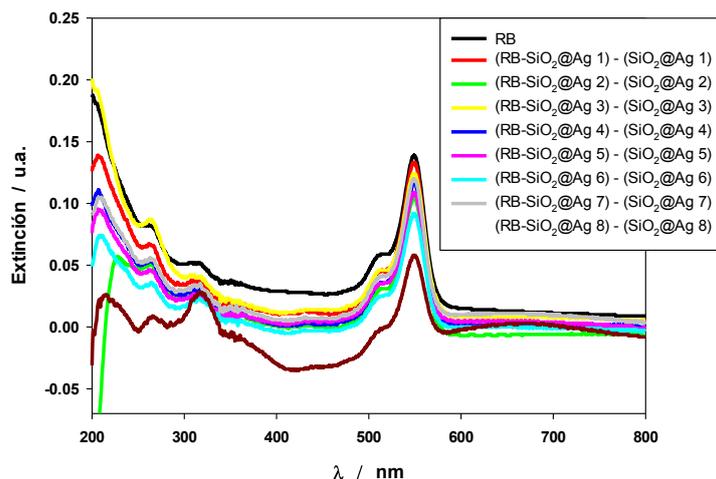
**Figura 38.** Espectros diferencia entre las mezclas de Rf con diferentes cantidades de SiO<sub>2</sub> y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

Ahora pasemos al análisis de la interacción entre las nanopartículas  $\text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{SiO}_2@Au$  con el Rosa de Bengala. Comenzamos, del mismo modo que para la Rf, con el estudio de espectroscopia UV-visible del  $\text{RB}^{-2}$  con diferentes cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ .



**Figura 39.** a) Espectros de extinción de  $\text{RB}^{-2}$  sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2@Ag$ . b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

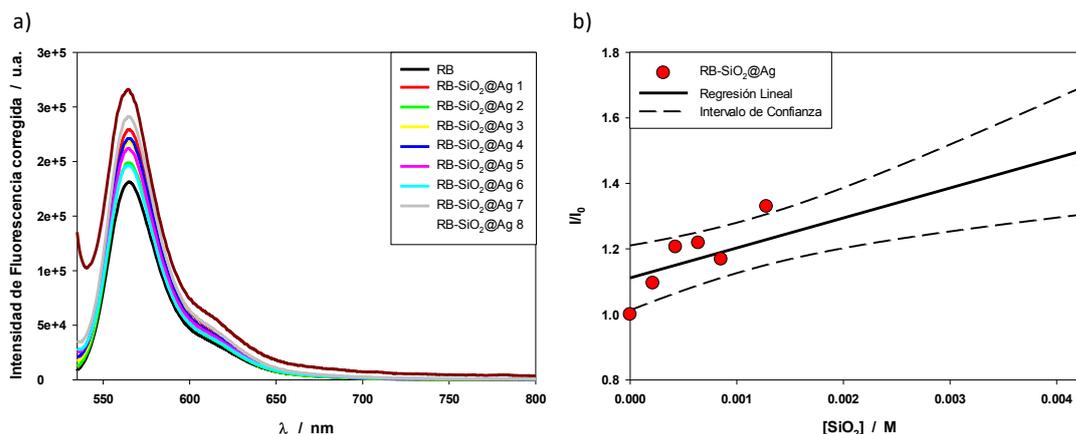
En la Figura 39a vemos que hay un aumento en todo el espectro de absorción del  $\text{RB}^{-2}$  a medida que se incrementa la cantidad de nanopartículas en la mezcla. Cuando aplicamos la ecuación de Benesi y Hildebrand a este sistema obtenemos un valor de  $K_{app}$  de  $313,26 \text{ M}^{-1}$ , lo cual es indicativo de la formación de complejo entre las NPs y el estado fundamental del colorante (Figura 39b).



**Figura 40.** Espectros diferencia entre las mezclas de  $\text{RB}^{-2}$  con diferentes cantidades de  $\text{SiO}_2@Ag$  y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

Si analizamos los espectros diferencia (Figura 40) podemos ver que ocurre algo similar a lo que observamos para el complejo  $\text{Rf-SiO}_2\text{@Ag}$ , dado que a medida que incrementamos la concentración de NPs, y por ende la del complejo, hay una disminución en la absorción.

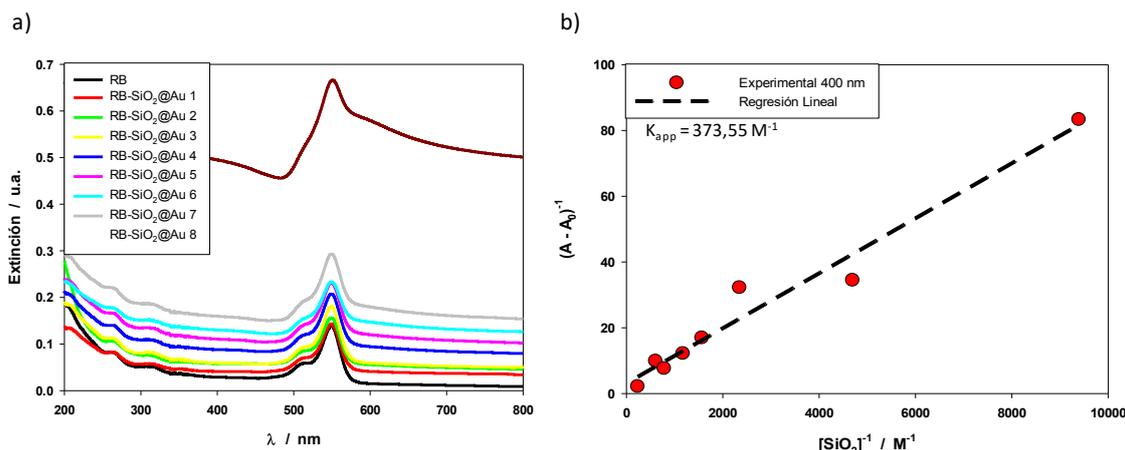
Las medidas de los espectros de fluorescencia de los complejos  $\text{RB-SiO}_2\text{@Ag}$  se muestran en la figura 41a. A medida que aumentamos la concentración de NPs en la mezcla vemos que hay un incremento en la intensidad de emisión corregida del colorante, cuando graficamos  $I/I_0$  vs  $[\text{SiO}_2]$  (Figura 41b).



**Figura 41.** a) Espectros de emisión de RB en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ , con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la RB libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

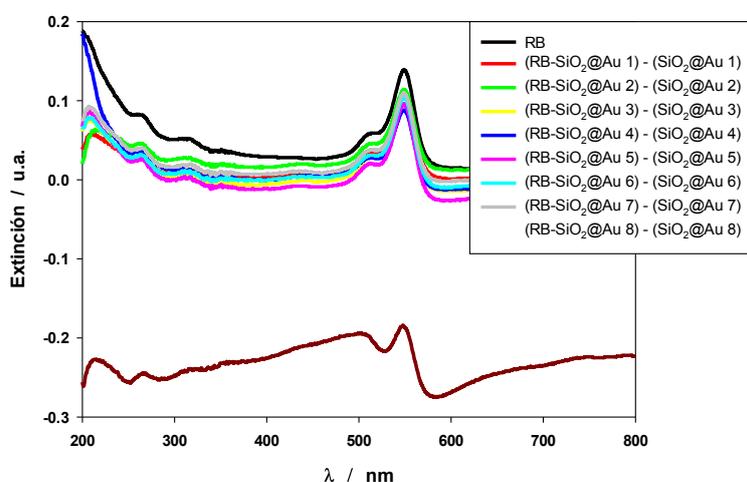
Por lo tanto, concluimos que el estado fundamental del  $\text{RB}^{-2}$  forma un complejo con las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$ , el cual tiene una absorción menor que la del colorante libre y, además, la formación de este complejo aumenta la intensidad de emisión del Rosa de Bengala.

Para las mezclas de  $\text{RB}^{-2}$  con NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ , vemos que ocurre algo similar al caso anterior. Los espectros de extinción del colorante con las distintas cantidades de nanopartículas muestran una vez más un incremento en la intensidad de absorción a medida que aumenta la cantidad de NPs (Figura 42a). La  $K_{\text{app}}$  calculada a partir del gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la Figura 42b dio un valor de  $373,55 \text{ M}^{-1}$ , muy similar al obtenido para el complejo  $\text{RB-SiO}_2\text{@Ag}$ .



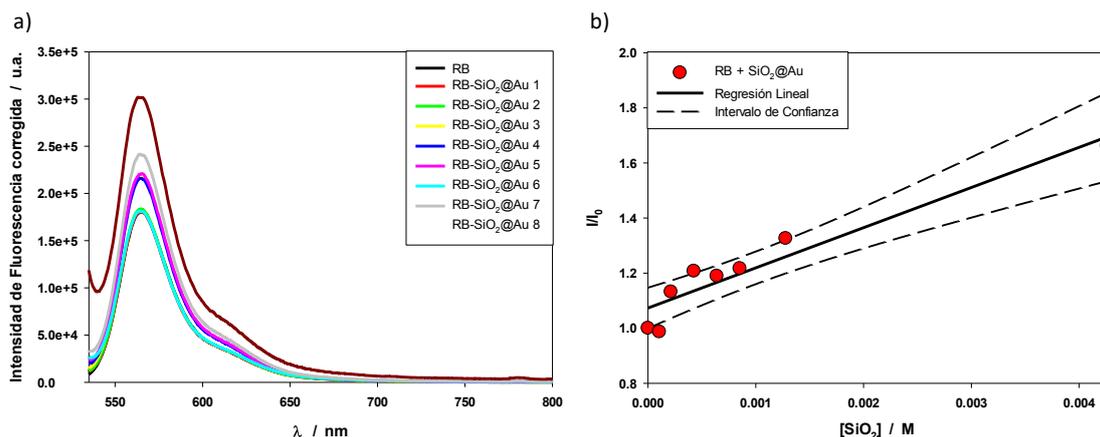
**Figura 42.** a) Espectros de extinción de RB<sup>-2</sup> sola y con cantidades crecientes de nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Au. b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Del mismo modo, los espectros de absorción diferencia (Figura 43) para el complejo RB-SiO<sub>2</sub>@Au presentan una disminución en la intensidad de absorción a medida que aumenta la cantidad de nanopartículas en la mezcla, indicando que la formación del complejo disminuye la absorción del RB<sup>-2</sup>.



**Figura 43.** Espectros diferencia entre las mezclas de RB<sup>-2</sup> con diferentes cantidades de SiO<sub>2</sub>@Au y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

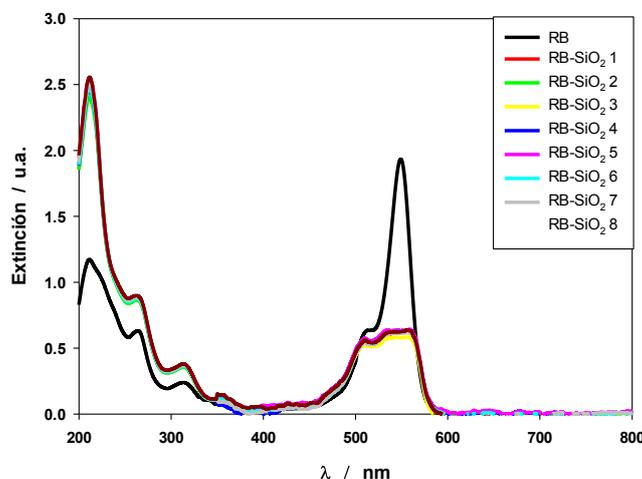
Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el complejo RB-SiO<sub>2</sub>@Ag, podemos ver en la Figura 44 que la emisión del complejo aumenta a medida que incrementamos la cantidad de nanopartículas en la mezcla. Como vimos que el complejo tiene una absorción menor que el del colorante libre, en este caso la fluorescencia aumentada estaría ocurriendo a causa del fenómeno conocido como MEF.



**Figura 44.** a) Espectros de emisión de RB en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ , con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la RB libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

Por lo tanto, lo que podemos concluir de estos resultados es que las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  forman un complejo con el estado fundamental del Rosa de Bengala que tiene una absorción menor que el colorante libre, y que, a diferencia de lo que ocurre con las nanopartículas recubiertas por Ag, aumentan la emisión del fotosensibilizador debido a la interacción de fotosensibilizador con las nanopartículas de Au en la superficie de la sílice.

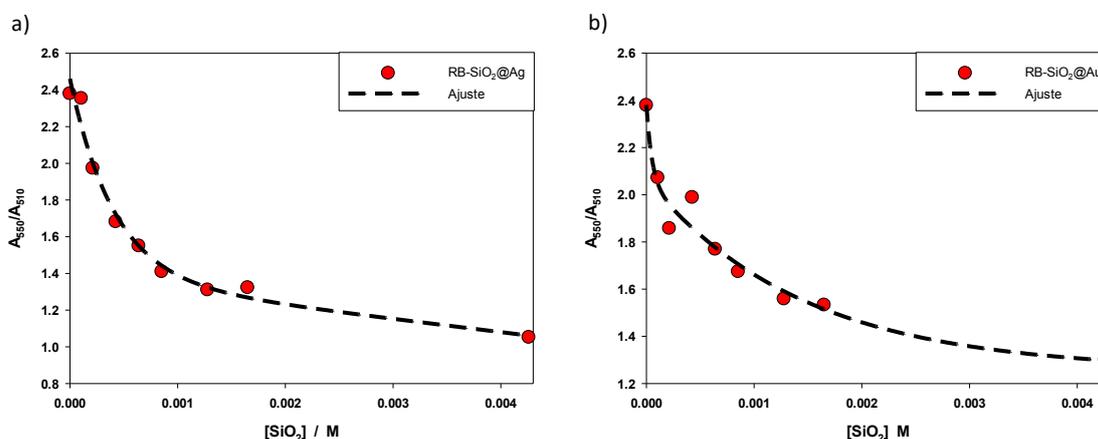
Nuevamente, para corroborar que estos efectos se deben a la presencia de las NPs metálicas, repetimos los experimentos para mezclas de  $\text{RB}^{2-}$  con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2$ . El espectro de absorción del  $\text{RB}^{2-}$  en ausencia de nanopartículas (Figura 45) muestra un pico a 550 nm, el cual es característico del monómero, con un hombro en 510 nm asignado al dímero.<sup>83,84</sup>



**Figura 45.** Espectros de extinción de  $\text{RB}^{2-}$  sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2$ .

Cuando adicionamos NPs SiO<sub>2</sub>, incluso en pequeñas cantidades, se produce un cambio significativo en el espectro de absorción: la banda del monómero aparece truncada, mientras que el hombro permanece aproximadamente constante. Por ende, la presencia de las nanopartículas lleva a la dimerización del colorante en la interfaz agua/sílice.

Experimentos similares realizados con NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y NPs SiO<sub>2</sub>@Au en lugar de NPs SiO<sub>2</sub> (Figura 46) muestran un incremento gradual del hombro en 510 nm acompañado de una disminución en la relación  $A_{550}/A_{510}$ , como una medida de la agregación del colorante (Figura 46a y 46b). Estos resultados muestran que la agregación es indicativa de la adsorción del RB<sup>-2</sup> sobre las nanopartículas, y de la comparación de las Figuras 45 y 46 se concluye que hay una menor afinidad del colorante por las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au que por las NPs SiO<sub>2</sub>.

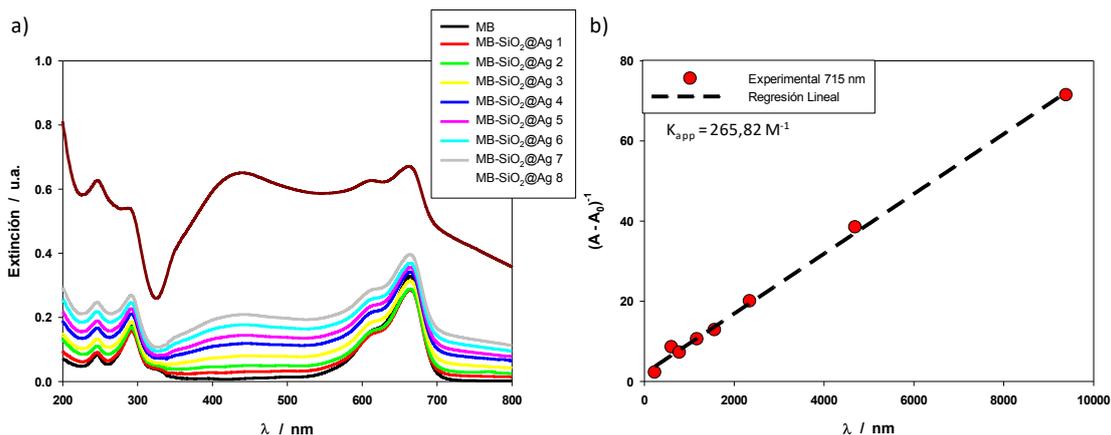


**Figura 46.** Gráfico de la relación  $A_{550}/A_{510}$  como medida de la agregación vs.  $[\text{SiO}_2]$  para a) NPs SiO<sub>2</sub>@Ag, y b) NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

Por último, analizaremos los resultados del análisis espectroscópico para el Azul de Metileno, el último de los colorantes estudiados, en mezclas con cantidades crecientes de las nanopartículas.

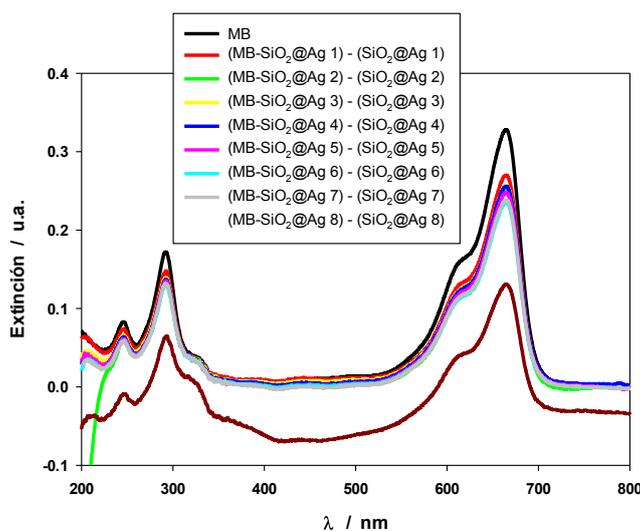
Comenzaremos con los espectros de extinción del MB<sup>+</sup> en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag.

Podemos ver en la Figura 47a que a medida que aumentamos la cantidad de nanopartículas, se produce un incremento de la absorción en todo el rango de longitudes de onda experimental, al igual que lo que viene ocurriendo en los casos anteriores.



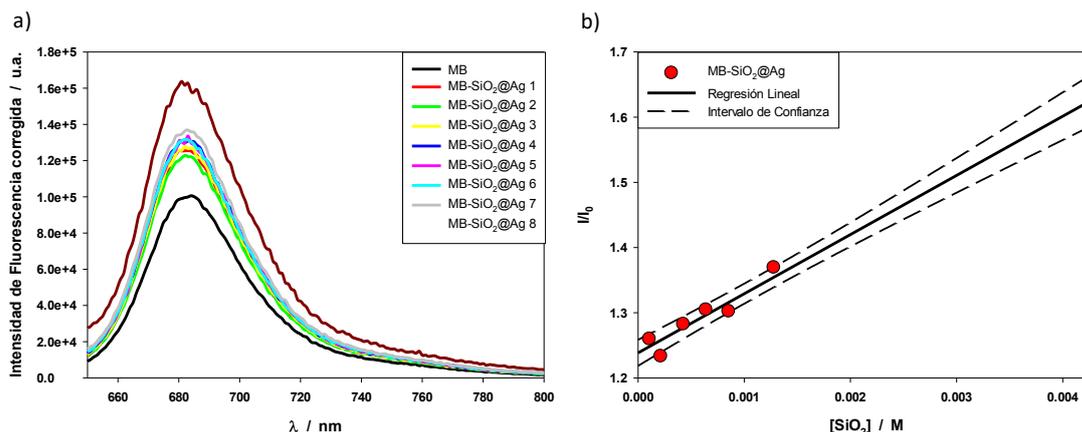
**Figura 47.** a) Espectros de extinción de MB sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$ . b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Cuando analizamos estos incrementos con la ecuación de Benesi y Hildebrand (Figura 47b) a la  $\lambda_{an} = 715 \text{ nm}$ , obtenemos una  $K_{app}$  de  $265,82 \text{ M}^{-1}$ , indicando la formación del complejo  $\text{MB-SiO}_2\text{@Ag}$ . Los espectros de absorción diferencia del complejo (Figura 48) muestran una disminución en la intensidad de absorción respecto al  $\text{MB}^+$  libre.



**Figura 48.** Espectros diferencia entre las mezclas de  $\text{MB}^+$  con diferentes cantidades de  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$  y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

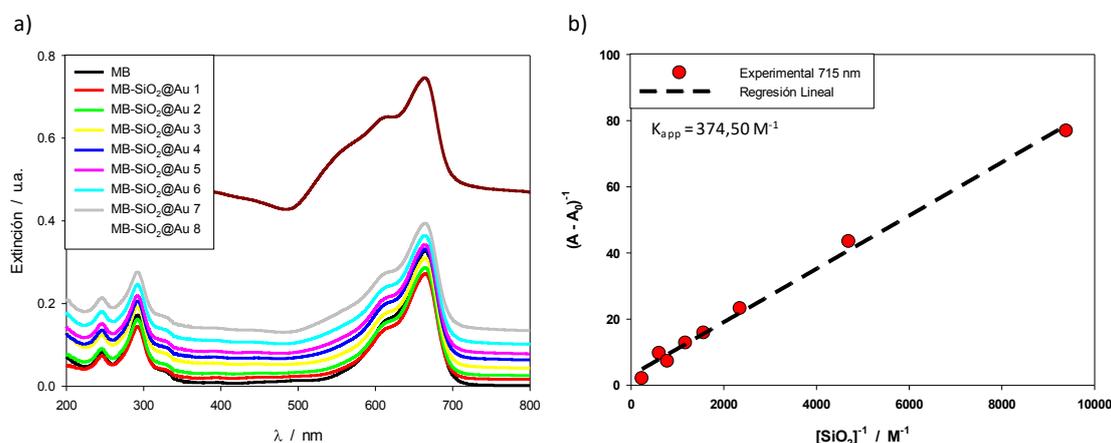
Para evaluar el efecto de la formación del complejo en la fluorescencia del MB graficamos los espectros de emisión para la mezcla del colorante con las nanopartículas, los cuales están presentes en la Figura 49a. Observamos que hay un incremento en la intensidad de emisión corregida por filtro interno, a medida que aumenta la cantidad de partículas  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$ , lo cual queda más evidente al graficar la intensidad de fluorescencia corregida en el máximo de emisión sobre la intensidad de emisión corregida del colorante libre en función de la concentración de nanopartículas (Figura 49b).



**Figura 49.** a) Espectros de emisión de MB en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Ag, con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la MB libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

Dado que la formación del complejo MB-SiO<sub>2</sub>@Ag disminuye la absorción del colorante, y que, a pesar de esto, la fluorescencia aumenta a medida que aumentamos la cantidad de complejo, podemos decir que estamos en presencia del fenómeno de MEF, como ocurrió con el complejo RB-SiO<sub>2</sub>@Au.

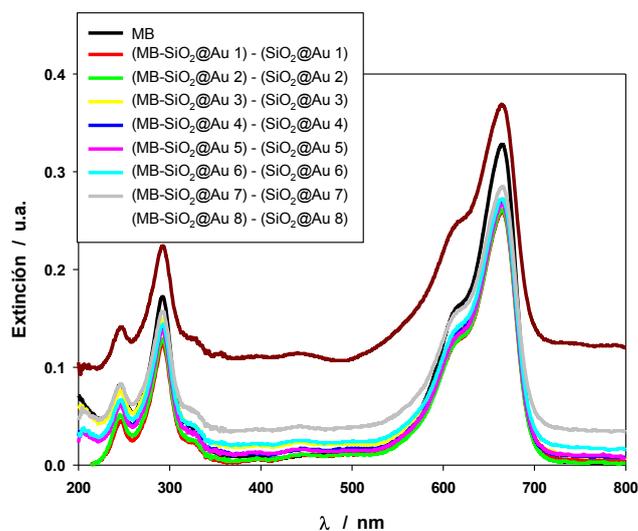
Realizamos el mismo análisis para los resultados espectroscópicos obtenidos de las mezclas de MB con cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Au.



**Figura 50.** a) Espectros de extinción de MB sola y con cantidades crecientes de nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Au. b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Al igual que lo que ocurre para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag, a medida que aumentamos la cantidad de NPs SiO<sub>2</sub>@Au vemos un incremento de la absorción en todo el rango de longitudes de onda estudiado (Figura 50a). A partir de los parámetros obtenidos de la ecuación de Benesi y Hildebrand obtuvimos un valor de  $K_{app}$  de  $374,50 \text{ M}^{-1}$ , indicando la formación

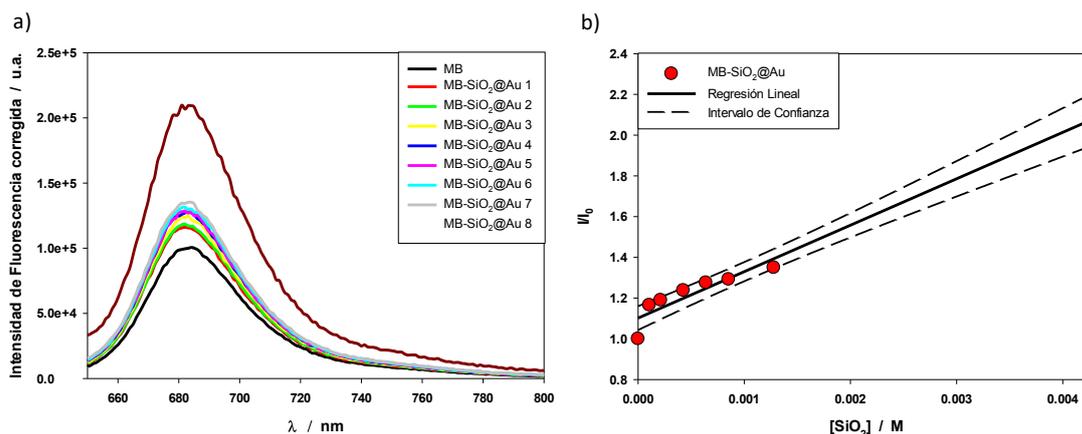
de un complejo MB-SiO<sub>2</sub>@Au (Figura 50b). Ahora vemos que ocurre con la absorción del complejo al graficar los espectros de absorción diferencia.



**Figura 51.** Espectros diferencia entre las mezclas de MB con diferentes cantidades de SiO<sub>2</sub>@Au y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

En la Figura 51 vemos que, a medida que aumentamos la cantidad de NPs SiO<sub>2</sub>@Au, la intensidad de absorción también aumenta.

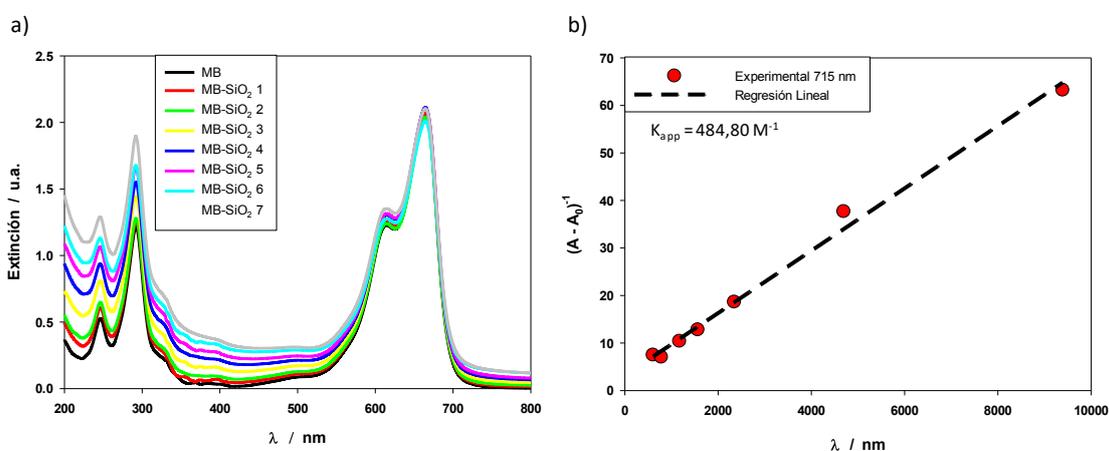
Los espectros de emisión corregidos de las mezclas de MB con las nanopartículas (Figura 52a) muestran un incremento en la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de NPs SiO<sub>2</sub>@Au, al igual que queda evidenciado en el gráfico de  $I/I_0$  vs [SiO<sub>2</sub>] (Figura 52b).



**Figura 52.** a) Espectros de emisión de MB en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Au, con corrección de filtro interno. b) Gráfico de la relación de la intensidad de fluorescencia (en el máximo de emisión) corregida de las mezclas y la MB libre vs. la concentración de nanopartículas (en función de la concentración de sílice).

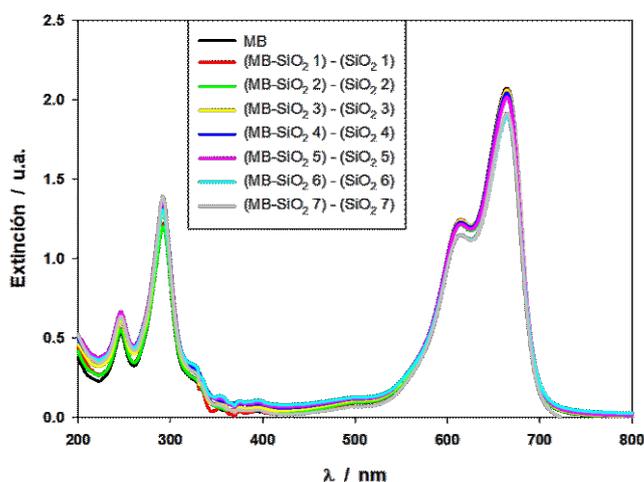
Teniendo en cuenta que los espectros de absorción aumentan a medida que se incrementa la concentración de nanopartículas, el efecto de aumento en la emisión del colorante puede explicarse debido a una mayor tasa de excitación producida por las NPs metálicas (aumento de  $E_m$ ), que generan una mayor fluorescencia por haber una mayor población del estado excitado singlete.

Finalmente, con la intención de poder asignar estos efectos observados sobre la absorción y la emisión del MB a las partículas metálicas, repetimos los ensayos para mezclas de MB con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2$ . Del análisis de los espectros de extinción de las mezclas (Figura 53a) y del gráfico de la ecuación de Benesi y Hildebrand (Figura 53b), donde obtenemos una  $K_{app} = 484,80 \text{ M}^{-1}$ , podemos establecer la formación de un complejo MB- $\text{SiO}_2$ , del mismo modo que ocurre con las otras NPs.



**Figura 53.** a) Espectros de extinción de MB sola y con cantidades crecientes de nanopartículas  $\text{SiO}_2$ . b) Gráfico de  $(A - A_0)^{-1}$  vs.  $[\text{SiO}_2]^{-1}$  de la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Para ver el efecto de la formación de este complejo entre el estado fundamental del MB y las nanopartículas de sílice sobre la absorción del colorante, graficamos los espectros de absorción diferencia (Figura 54).



**Figura 54.** Espectros diferencia entre las mezclas de MB con diferentes cantidades de  $\text{SiO}_2$  y los correspondientes espectros de extinción de las nanopartículas solas.

Como podemos observar, no hay diferencias prácticamente en los espectros de absorción diferencia para las distintas cantidades de nanopartículas, por lo que nos estaría indicando que la formación del complejo no tiene efectos sobre la absorción del fotosensibilizador.

En resumen, teniendo en cuenta los valores de  $K_{app}$  presentados en la Tabla 6, vemos que todos los colorantes Rf,  $RB^{-2}$  y  $MB^{+}$  se adsorben preferentemente sobre los sitios del  $SiO_2$  (silanos), siendo los valores de  $K_{app}$  mayores para estas nanopartículas que para las recubiertas con Ag o Au (si bien para las mezclas de  $RB^{-2}$  con NPs  $SiO_2$  no pudimos obtener un valor de  $K_{app}$  esto es a causa de la dimerización del colorante sobre las nanopartículas, pero observamos claramente que la adsorción del  $RB^{-2}$  es mayor en la sílice que en las NPs  $SiO_2@Ag$  y  $SiO_2@Au$ ).

Colorante	Nanopartícula	$K_{app}$ ( $M^{-1}$ )
Riboflavina (Rf) <sup>(a)</sup>	$SiO_2$	$1,45 \times 10^3$
	$SiO_2@low-Ag^{(b)}$	198
	$SiO_2@Ag$	72,58
	$SiO_2@Au$	---
Rosa de Bengala ( $RB^{-2}$ ) <sup>(c)</sup>	$SiO_2$	---
	$SiO_2@Ag$	313,26
	$SiO_2@Au$	373,55
Azul de Metileno (MB) <sup>(d)</sup>	$SiO_2$	484,80
	$SiO_2@Ag$	265,82
	$SiO_2@Au$	374,50

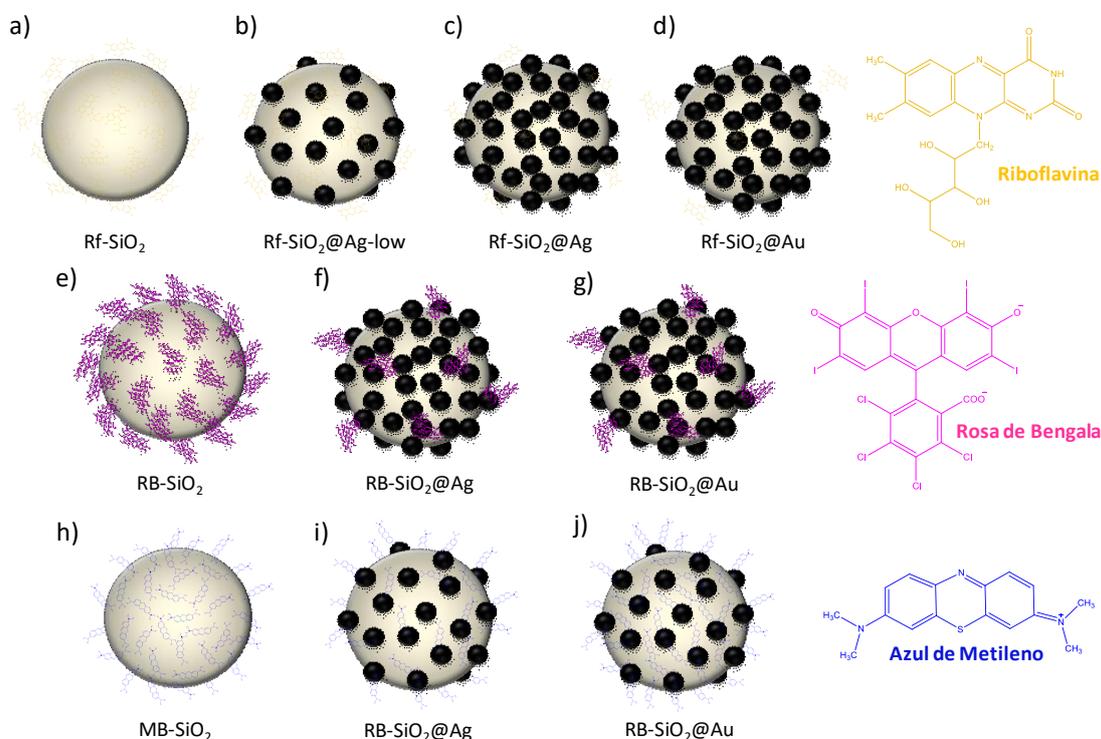
(a) Datos obtenidos a  $\lambda_{an} = 440$  nm. (b) Muestra preparada con el precursor  $SnCl_2$  de menor concentración. (c) Datos obtenidos a  $\lambda_{an} = 400$  nm y 550 nm. (d) Datos obtenidos a  $\lambda_{an} = 715$  nm.

**Tabla 6.** Valores de  $K_{app}$  a las longitudes de onda de análisis  $\lambda_{an}$  para los colorantes en presencia de los diferentes tipos de NPs.

En el caso particular de la Rf vemos que los valores de  $K_{app}$  siguen la tendencia  $SiO_2 > SiO_2@Ag-low > SiO_2@Ag$  (no pudimos determinar una  $K_{app}$  para  $SiO_2@Au$ ), la cual es indicativa de la preferencia de la Rf por la adsorción sobre los sitios de  $SiO_2$  comparado con los de Ag y Au. Para el caso del  $RB^{-2}$  vemos que los valores de  $K_{app}$  para las NPs  $SiO_2@Ag$  y  $SiO_2@Au$  son prácticamente iguales, siguiendo la tendencia  $SiO_2 > SiO_2@Ag \approx SiO_2@Au$ . A medida que aumenta la cantidad de nanopartículas en la mezcla aumenta la relación  $A_{550}/A_{510}$  nm, lo que indica un incremento en la dimerización del colorante. Por último, para el  $MB^{+}$  los valores de  $K_{app}$  obtenidos para las mezclas con las NPs siguen

la tendencia  $\text{SiO}_2 > \text{SiO}_2@Au > \text{SiO}_2@Ag$ , aunque las 3 constantes tienen valores similares (del mismo orden).

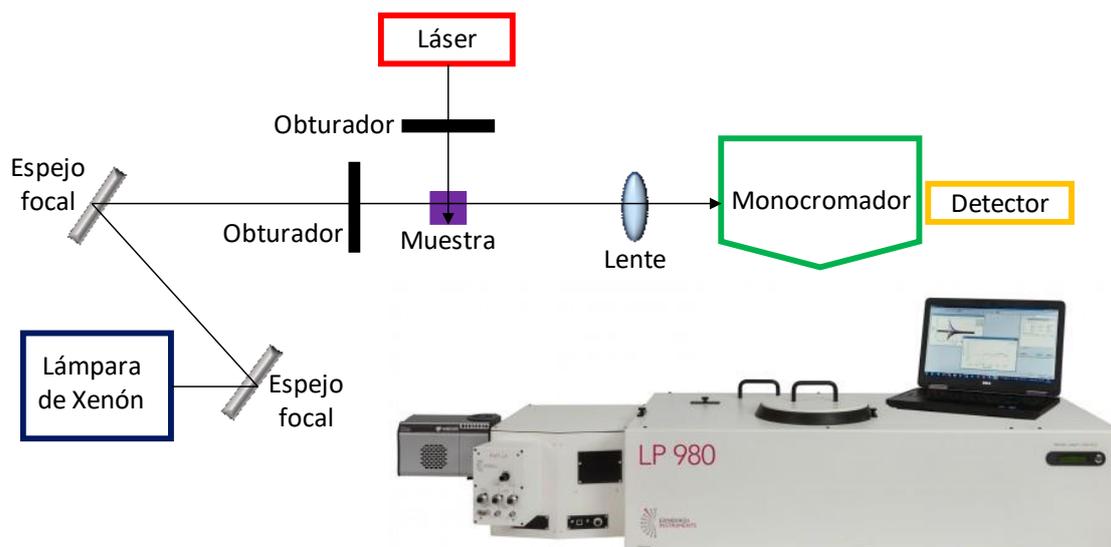
El esquema de la Figura 55 muestra cualitativamente este comportamiento.



**Figura 55.** Esquema representativo de la adsorción de: (a) Rf sobre NPs  $\text{SiO}_2$ ; (b) Rf sobre NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ -low; (c) Rf sobre NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ ; (d) Rf sobre NPs  $\text{SiO}_2@Au$ ; (e)  $\text{RB}^{2-}$  sobre NPs  $\text{SiO}_2$ ; (f)  $\text{RB}^{2-}$  sobre NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ ; (g)  $\text{RB}^{2-}$  sobre NPs  $\text{SiO}_2@Au$ ; (h) MB sobre NPs  $\text{SiO}_2$ ; (i) MB sobre NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ ; y (j) MB sobre NPs  $\text{SiO}_2@Au$ .

### 3.4.3 Estudio del efecto de las nanopartículas sobre los estados transientes de los colorantes mediante la técnica de Láser Flash Fotólisis.

La técnica de Flash Fotólisis (si bien la palabra fotólisis implica la ruptura de enlaces químicos, en flash fotólisis no siempre se rompen los enlaces. No obstante, el término “flash fotólisis” es comúnmente usado incluso si no hay ruptura de enlaces y se utilizará de esta manera a lo largo de esta tesis) introducida en 1949<sup>85</sup>, es un instrumento muy potente para estudiar los efectos fisicoquímicos iniciales de la luz sobre la materia. La técnica consiste en la irradiación de una muestra con un pulso muy corto de luz con alta intensidad, detectando los cambios resultantes en la absorción de la luz siendo monitoreada tanto fotográficamente en un amplio rango de longitudes de onda por medio de una segunda irradiación más débil activada un tiempo determinado después del pulso de fotólisis de alta intensidad, o, más comúnmente, fotoeléctricamente como una función del tiempo a una longitud de onda específica, utilizando una fuente continua de luz para monitorear la muestra.



**Figura 56.** En la parte superior de la imagen vemos un esquema del sistema óptico utilizado en el ensayo de LFP. En la parte inferior, una imagen del equipo LP 980 de la empresa Edinburgh Instruments.

El principio de Flash Fotólisis con detección fotoeléctrica se ilustra en la Figura 56. La lámpara de análisis provee un haz de luz continuo, el cual atraviesa la muestra, generalmente en ángulo recto con el camino del pulso de irradiación de excitación. El pulso corto de radiación resulta en la formación de especies transientes. Se utiliza un monocromador para seleccionar la longitud de onda a la cual los intermediarios transientes absorben. La transmitancia de la muestra antes, durante y luego del pulso de radiación es entonces escaneado por un fotodetector, el cual convierte cambios en intensidad de luz en señales eléctricas que son observadas en un osciloscopio. Los cambios en la trasmisión son normalmente transformados en cambios de absorbancia.

Llevando a cabo estas medidas para una variedad de longitudes de onda es posible trazar un espectro de absorción del transiente. En regiones espectrales donde el transiente y la especie original se solapan se obtiene un espectro diferencia, y el cambio en la absorbancia observada es:

$$\Delta A = (\varepsilon_T - \varepsilon_{gs})cl \quad (E16)$$

donde  $\varepsilon_T$  es el coeficiente de extinción molar del transiente,  $\varepsilon_{gs}$  el coeficiente de extinción molar del estado fundamental,  $c$  es la concentración del estado fundamental convertido en transiente y  $l$  es la longitud del camino óptico.

En la literatura física, la relación entre la intensidad de un haz incidente  $I_0$  y el haz transmitido a través de un material de espesor  $l$ ,  $I(l)$ , es

$$I(l) = I_0 e^{-\mu(\lambda)l} \quad (E17)$$

donde  $\mu(\lambda)$  es el coeficiente de atenuación lineal del medio material.

En la literatura química, sobre todo al tratar con soluciones (diluidas), la relación entre la intensidad de un haz incidente  $I_0$  y el haz transmitido a través de un espesor  $l$  de solución,  $I(l)$ , es

$$I(l) = I_0 e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l} \quad (E18)$$

donde  $c_{gs}(t^-)$  es la concentración del estado fundamental de la especie que se encuentra en solución;  $\varepsilon_{gs}(\lambda)$  es un coeficiente análogo al coeficiente de atenuación lineal, llamado coeficiente de extinción molar o absorptividad molar.

Se define la absorbancia  $A$  del siguiente modo:

$$A = c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l = -\log\left(\frac{I(l)}{I_0}\right) = -\log(T) \quad (E19)$$

Previo al disparo del láser, se tiene la siguiente intensidad registrada por el detector para una cierta longitud de onda  $\lambda$ :

$$I(l, \lambda) = I_0 e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l} \quad (E20)$$

Luego del disparo del láser, se han producido especies excitadas (ver un esquema del diagrama de Jablonski para moléculas orgánicas en la Figura 57), y se tiene para todo  $t$ :

$$c_{gs}(t^-) = c_{gs}(t) + c_s(t) + c_T(t) \quad (E21)$$

donde  $c_{gs}(t)$  es la concentración del estado fundamental para el tiempo  $t$ ,  $c_s(t)$  es la concentración del estado singlete para el tiempo  $t$ , y  $c_T(t)$  es la concentración del estado triplete para el tiempo  $t$ . Como el singlete tiene un tiempo de vida muy corto, si  $t \gg 1\text{ns}$ , entonces

$$c_{gs}(t^-) = c_{gs}(t) + c_T(t) \quad (E22)$$

Luego de varios ns del disparo del láser, se tiene la siguiente intensidad registrada por el detector para la misma longitud de onda  $\lambda$ :

$$\begin{aligned} I(l, \lambda, t) &= I_0 e^{-[c_{gs}(t)\varepsilon_{gs}(\lambda) + c_T(t)\varepsilon_T(\lambda)]l} = I_0 e^{-[(c_{gs}(t^-) - c_T(t))\varepsilon_{gs}(\lambda) + c_T(t)\varepsilon_T(\lambda)]l} \\ I(l, \lambda, t) &= I_0 e^{-[c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda) + (\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)]l} = I_0 e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l} e^{-(\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)l} \\ I(l, \lambda, t) &= I_0 e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l} e^{-(\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)l} = I(l, \lambda) e^{-(\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)l} \quad (E23) \end{aligned}$$

Se define el delta de absorbancia,  $\Delta A(\lambda, t)$ , o  $\Delta DO$ , del siguiente modo

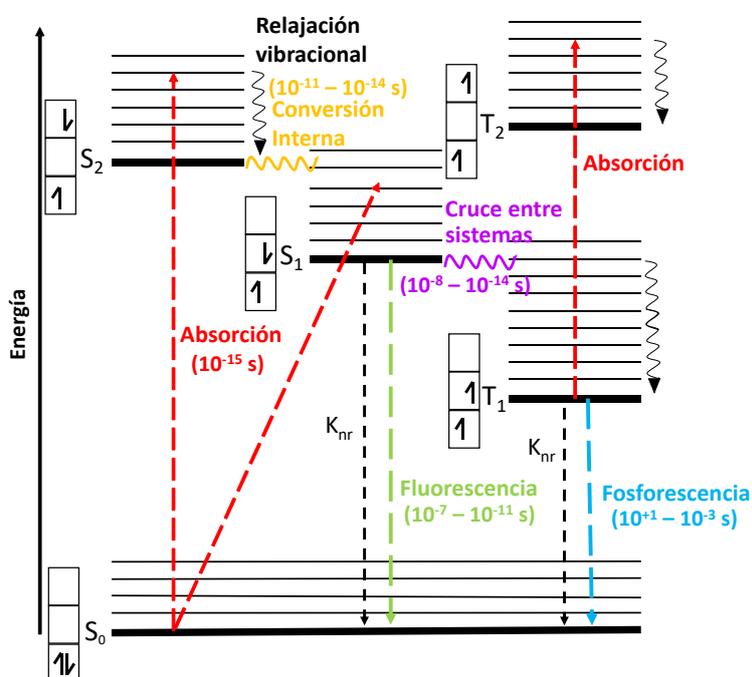
$$\Delta A(\lambda, t) = \log\left(\frac{I(l, \lambda)}{I(l, \lambda, t)}\right) = \log\left(\frac{I_0 e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l}}{I_0 e^{-[c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda) + (\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)]l}}\right) \quad (E24)$$

$$\Delta A(\lambda, t) = \log\left(\frac{e^{-c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda)l}}{e^{-[c_{gs}(t^-)\varepsilon_{gs}(\lambda) + (\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)]l}}\right) = \log\left(e^{(\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda))c_T(t)l}\right) \quad (E25)$$

$$\Delta A(\lambda, t) = (\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_{gs}(\lambda)) c_T(t) l \quad (E26)$$

Por lejos, los intermediarios inestables más comunes inducidos por radiación detectado por Flash Fotólisis son estados excitados electrónicamente o radicales libres.

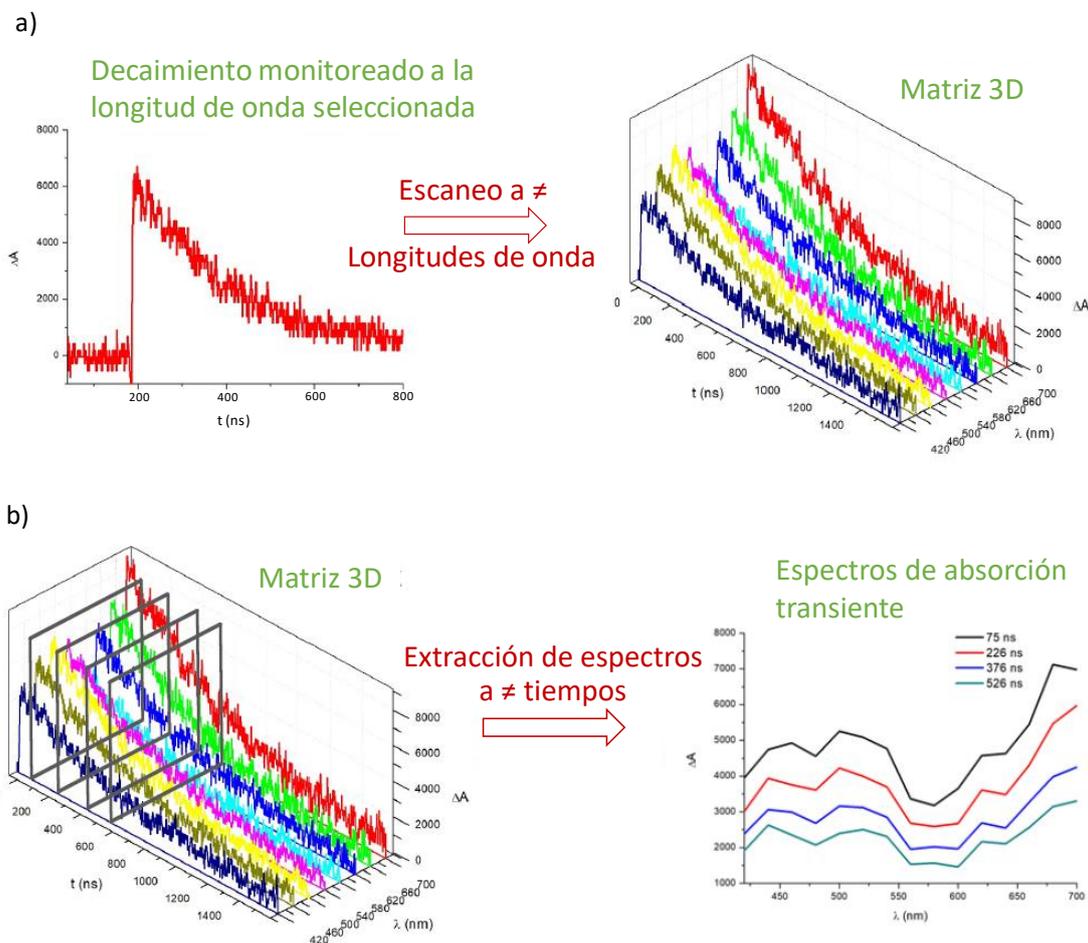
Los estados excitados encontrados normalmente son tanto estados singletes, los cuales no contienen electrones desapareados, como tripletes, los cuales contienen dos electrones desapareados (Figura 57). Los estados triplete tienen tiempos de vida más largos que los estados excitados singlete. Los estados excitados singlete y triplete a menudo decaen emitiendo luz, esta radiación se conoce como fluorescencia y fosforescencia, respectivamente. Las transiciones entre estados electrónicos de la misma multiplicidad (conversión interna IT, del inglés: internal conversion) están permitidas por spin.



**Figura 57.** Diagrama de Jablonski de una molécula orgánica con los tiempos correspondientes a los diferentes procesos fotofísicos que pueden tener lugar en un proceso de excitación. Para cada estado electrónico se detalla el apareamiento (o no) de los electrones.

Las transiciones entre estados de diferente multiplicidad (cruzamiento entre sistemas ISC, del inglés: intersystem crossing) están prohibidas por spin, aunque usualmente algunos cruzamientos sí ocurren. Aunque muchos estados excitados tripletes tienen tiempos de vida intrínsecos de segundos cuando son medidos atrapados en vidrio rígido a temperatura de nitrógeno líquido (77 K), en solución a temperatura ambiente tienden a tener tiempos de vida experimentales que caen en algún lugar dentro del rango de microsegundos – nanosegundos, debido a las reacciones de quenching. Los estados

excitados singlete, por otro lado, siempre tienen tiempos de vida más cortos que 1 microsegundo.

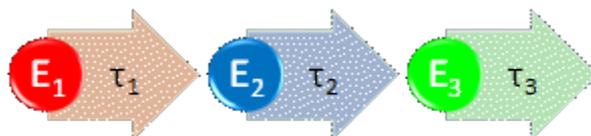


**Figura 58.** a) Decaimiento de la señal de  $\Delta A$  a una longitud de onda determinada y obtención de una matriz 3D a partir del escaneo a diferentes longitudes de onda. b) Obtención de los espectros de absorción de transientes a partir de cortes en el plano  $\lambda$ - $\Delta A$  a diferentes tiempos de la matriz 3D.

Las especies transientes observadas en Flash Fotólisis son, generalmente, debido tanto a radicales libres como a estados excitados.

El oxígeno reacciona con la mayoría de los estados excitados y los radicales, por lo tanto, en las medidas de LFP se llevan a cabo algunos pasos previos para remover el aire de las soluciones. Esto puede realizarse por repetidos congelamientos de la solución, evacuando el espacio sobre el sólido congelado y volviendo a fundir ("freeze-pump-thaw"), o por un método más rápido, que consiste en burbujear la solución con nitrógeno puro, argón o helio. El oxígeno desactiva la mayoría de los estados excitados triplete muy rápidamente (constante de velocidad  $\sim 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Los estados excitados singlete más bajos, por supuesto, no son fácilmente desactivados por el oxígeno a pesar de tener una constante de velocidad de quenching de  $\sim 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , simplemente porque el tiempo de vida del estado  $S_1$  es demasiado corto.

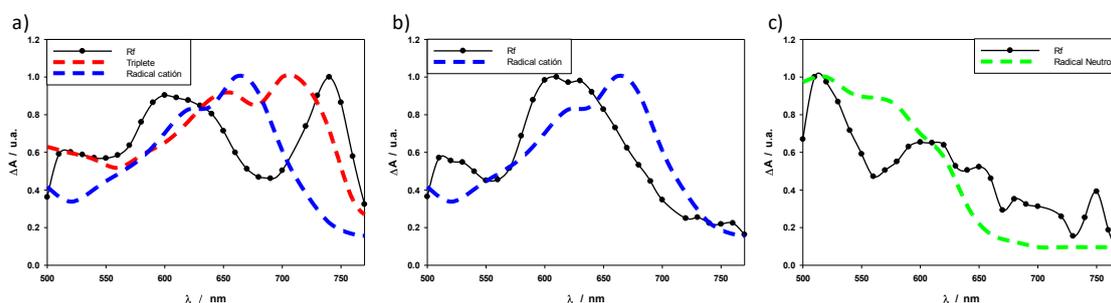
Los datos obtenidos con soluciones de Rf 27  $\mu\text{M}$  saturadas en Ar, en ausencia de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  muestran valores positivos de  $\Delta A$  en el rango de longitudes de onda de 500-770 nm utilizando una ventana de tiempo de 0 - 40  $\mu\text{s}$ . La fotofísica de la Rf es compleja y por lo tanto, varias especies contribuyen a las señales observadas, tales como el estado triplete ( $^3\text{Rf}^*$ ), su radical catión ( $\text{Rf}^{\cdot+}$ ), y su radical neutro ( $\text{HRf}^{\cdot}$ ), formado por la rápida protonación del radical anión ( $\text{Rf}^{\cdot-}$ ).<sup>83</sup> Este tipo de análisis se usa en sistemas complejos, aún en casos en los que se sabe que el mecanismo de reacción no corresponda exactamente a uno secuencial como el de la Figura 59.<sup>86</sup>



**Figura 59.** Modelo secuencial de tres especies utilizado en el programa Glotaran<sup>®</sup> para realizar los análisis de LFP. En este modelo la especie transiente 1 decae formando la especie 2, la cual luego decae generando la especie 3, cada una con sus tiempos de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  y  $\tau_3$ , respectivamente.

Como los espectros obtenidos en estas escalas de tiempo cortas muestran la contribución de varias especies, los análisis de estos resultados se realizaron de forma global. Se presentan espectros diferencia asociados al decaimiento (DADS, del inglés: Decay-Associated Difference Spectra). Los errores asociados a los tiempos de vida obtenidos son  $\leq 5\%$ .

La Figura 60a muestra el DADS de la especie con el tiempo de vida más corto (3,4  $\mu\text{s}$ ), el cual manifiesta una contribución del espectro del  $^3\text{Rf}^*$  y el  $\text{Rf}^{\cdot+}$ . La segunda especie decae con un tiempo de vida de 10,9  $\mu\text{s}$  y tiene DADS muy similar al espectro de absorción del  $\text{Rf}^{\cdot+}$  (Figura 60b), y por tanto se lo asigna a este radical catión.<sup>83</sup> La tercera especie (Figura 60c) se atribuye al  $\text{HRf}^{\cdot}$ <sup>83</sup> y, como era esperado, decae con un tiempo de vida más largo ( $> 50 \mu\text{s}$ ).



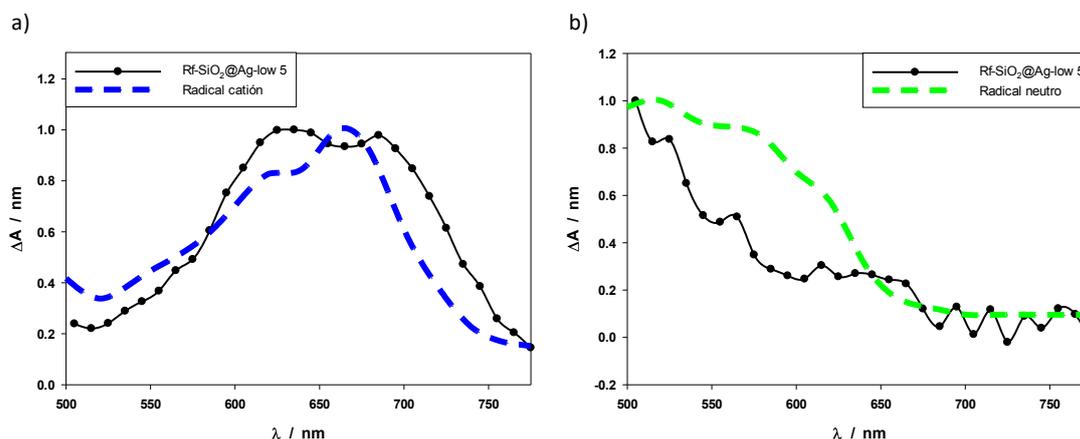
**Figura 60:** DADS normalizados correspondiente a los tiempos de vida de: 3,4  $\mu\text{s}$  (a), 10,9  $\mu\text{s}$  (b), y  $> 1$  ms (c), obtenidos de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{Rf}] = 27 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm. Las líneas discontinuas representan los espectros de absorción reportados para  $3\text{Rf}^*$  (rojo),  $\text{Rf}^{\cdot+}$  (azul), and  $\text{HRf}^{\cdot}$  (verde).<sup>87</sup>

Los volúmenes de suspensiones de nanopartículas utilizados para estos ensayos se muestran en la Tabla 7. La concentración de nanopartículas se expresa en función de la  $[\text{SiO}_2]$ .

Muestra	Vol NP ( $\mu\text{L}$ )	$[\text{SiO}_2]$ (mM)
NP1	25,0	0,1775
NP2	50,0	0,3550
NP3	75,0	0,5325
NP4	100	0,7100
NP5	125	0,8875
NP6	150	1,065

**Tabla 7.** Volúmenes de nanopartículas utilizados en las medidas de LFP. Las concentraciones se expresan para el  $\text{SiO}_2$  ya que ambas nanopartículas contienen la misma cantidad de esferas de sílice.

El análisis con el programa Glotaran de las señales de LFP obtenidas con muestras de Rf  $27 \mu\text{M}$  ( $A^{355} = 0,5$ ) en suspensiones de nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag-low}$  también dieron como resultado tres DADS. El espectro con el tiempo de vida más corto (15 - 40 ns) con contribuciones negativas en todo el rango de longitudes de onda, es atribuido a la respuesta electrónica del set-up de nuestro LFP a la dispersión de las muestras. El segundo DADS (Figura 61a) tiene un tiempo de vida de 9  $\mu\text{s}$ . Este DADS es muy similar al espectro de absorción reportado del  $\text{Rf}^{+\cdot}$  y es asignado a este radical. La tercera especie, asignada al HRf (Figura 61b) muestra un tiempo de vida más largo (50  $\mu\text{s}$ ).



**Figura 61:** DADS correspondientes a las especies de Rf en presencia de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag-low}$ :  $\text{Rf}^{+\cdot}$  (a) y HRf (b) obtenidos de los experimentos de laser flash-photolysis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm. Los experimentos fueron realizados con  $[\text{Rf}] = 27 \mu\text{M}$  y  $[\text{SiO}_2] = 0,8875 \text{ mM}$ . Las líneas discontinuas representan los espectros de absorción reportados para  $\text{Rf}^{+\cdot}$  (azul), y HRf (verde).

La razón por la cual el estado triplete de Rf no se observa en presencia de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag-low}$  podría ser una eficiente transferencia de carga desde las nanopartículas

de plata al estado excitado singlete de Rf ( $^1\text{Rf}^*$ ) (reacción 19). La competencia de esta reacción con el proceso de cruzamiento entre sistemas (20) obstaculiza la detección del  $^3\text{Rf}^*$  en los ensayos de LFP.

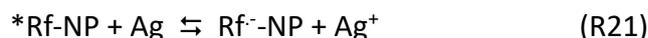


La reacción (19) es termodinámicamente favorable, como lo indica la energía de Gibbs calculada de la ecuación de Rehm-Weller<sup>88</sup>:  $\Delta_{\text{ET}}G^\circ = -111 \text{ kJ/mol}$ . La existencia de esta reacción implica un descenso del tiempo de vida del estado singlete ( $\tau_s$ ) en presencia de las nanopartículas. Sin embargo,  $\tau_s$  no fue afectado por las nanopartículas (ver Tabla 8).

Muestra	[SiO <sub>2</sub> ] (M)	$\tau_s$ (ns)
Rf	—	4,70
Rf-SiO <sub>2</sub> 4	6,4x10 <sup>-4</sup>	4,66
Rf-SiO <sub>2</sub> 8	4,3x10 <sup>-3</sup>	4,62
Rf-SiO <sub>2</sub> @Ag-low 4	6,4x10 <sup>-4</sup>	4,70
Rf-SiO <sub>2</sub> @Ag-low 8	4,3x10 <sup>-3</sup>	4,72

**Tabla 8:** Tiempos de vida de fluorescencia de Rf en ausencia y en presencia de nanopartículas.

Estos resultados apoyan la idea de que la transferencia de carga desde las nanopartículas de plata al estado excitado singlete de Rf en solución ( $^1\text{Rf}^*$ ) no es la responsable de la ausencia en la señal del estado triplete en los ensayos de LFP realizados con las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low. Una posible explicación involucra la reacción de transferencia de carga (21) desde la Ag al estado excitado del complejo no-fluorescente entre Rf y las nanopartículas (\*Rf-NP).

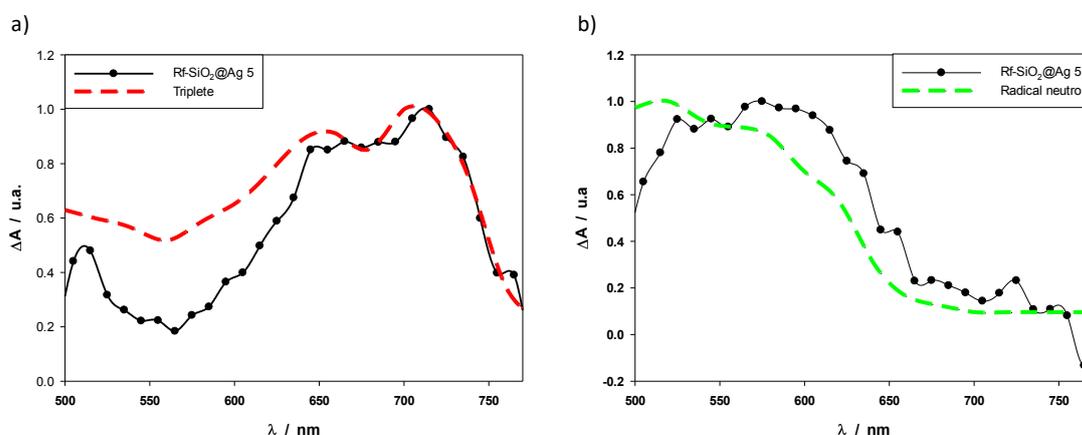


Rf<sup>·-</sup>-NP representa el radical anión adsorbido de Rf.

De la reacción 21, podemos concluir que la presencia de Rf e irradiaciones del láser posteriores van a inducir la generación de iones Ag<sup>+</sup>, los cuales pueden tener interesantes aplicaciones antimicrobiales.

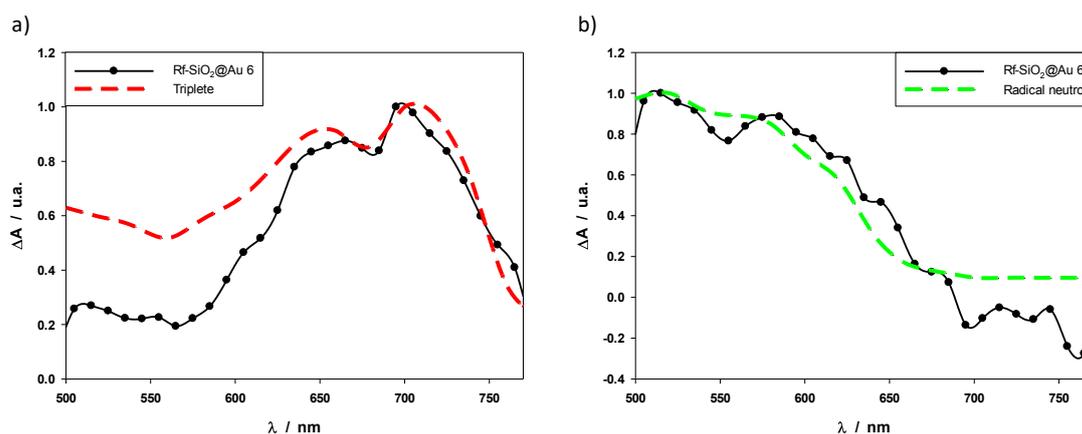
Con el fin de investigar el efecto en el grado de cobertura de plata sobre la superficie de la sílice, se realizó otra serie de experimentos de LFP con Rf en presencia de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag con mayor contenido de Ag. Sorprendentemente, en este caso los resultados fueron diferentes de los obtenidos con NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low. El análisis de Glotaran<sup>®</sup> arrojó tres especies con DADS y cinéticas similares a los datos de la Figura 18 (Figura 62). La especie con el tiempo de vida más corto (11,50 ns) fue asignada a la componente de dispersión. La segunda especie (Figura 62a) con un tiempo de vida de 12,54  $\mu\text{s}$  muestra una contribución inequívoca del  $^3\text{Rf}^*$ . Este resultado está en línea con la menor afinidad

de la Rf por las NPs core-shell con menor cantidad de grupos silanoles superficiales, lo cual es desfavorable para que ocurra la reacción (21). El tercer componente (99,68  $\mu\text{s}$ ) puede ser asignado al radical neutro de la Rf (Figura 62b).



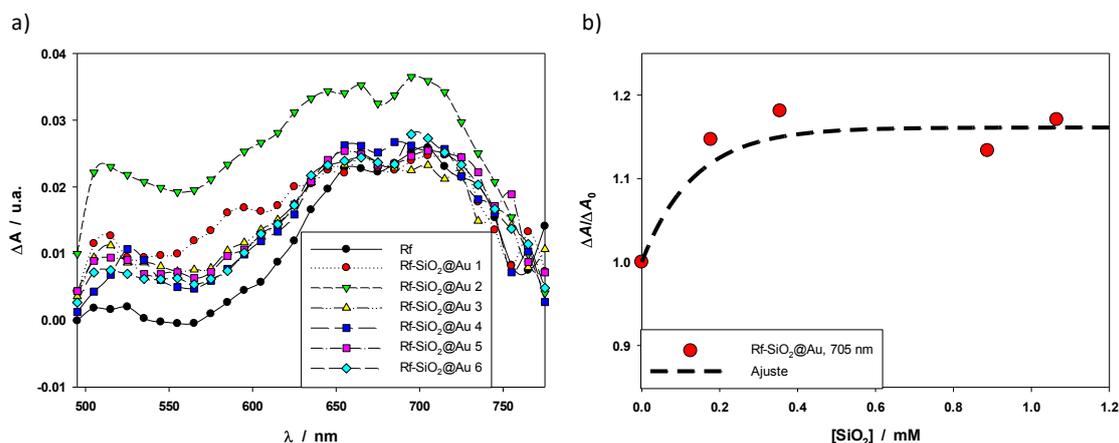
**Figura 62.** DADS normalizados correspondientes a los tiempos de vida: 12,54  $\mu\text{s}$  (a), y 99,68  $\mu\text{s}$  (b), obtenidos de los experimentos de laser flash-fotólisis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm. Los experimentos fueron realizados con  $[\text{Rf}] = 27 \mu\text{M}$  y  $[\text{SiO}_2] = 0,8875 \text{ mM}$  de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag. Las líneas discontinuas representan los espectros de absorción reportados para <sup>3</sup>Rf\* (rojo) y HRf (verde).

Cuando realizamos los ensayos de LFP para muestras de Rf 27  $\mu\text{M}$  en presencia de cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Au obtenemos, al igual que para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag, dos especies, una con un tiempo de vida  $\tau_1$  de 10,21  $\mu\text{s}$  y el otro con un  $\tau_2$  de 85,29  $\mu\text{s}$ , los cuales pueden ser asignados al triplete (<sup>3</sup>Rf\*) y al radical neutro (HRf), respectivamente (Figura 63).



**Figura 63.** DADS normalizados correspondientes a los tiempos de vida: 10,21  $\mu\text{s}$  (a), y 85,29  $\mu\text{s}$  (b), obtenidos de los experimentos de laser flash-fotólisis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm. Los experimentos fueron realizados con  $[\text{Rf}] = 27 \mu\text{M}$  y  $[\text{SiO}_2] = 1,065 \text{ mM}$  de las NPs SiO<sub>2</sub>@Au. Las líneas discontinuas representan los espectros de absorción reportados para <sup>3</sup>Rf\* (rojo) y HRf (verde).

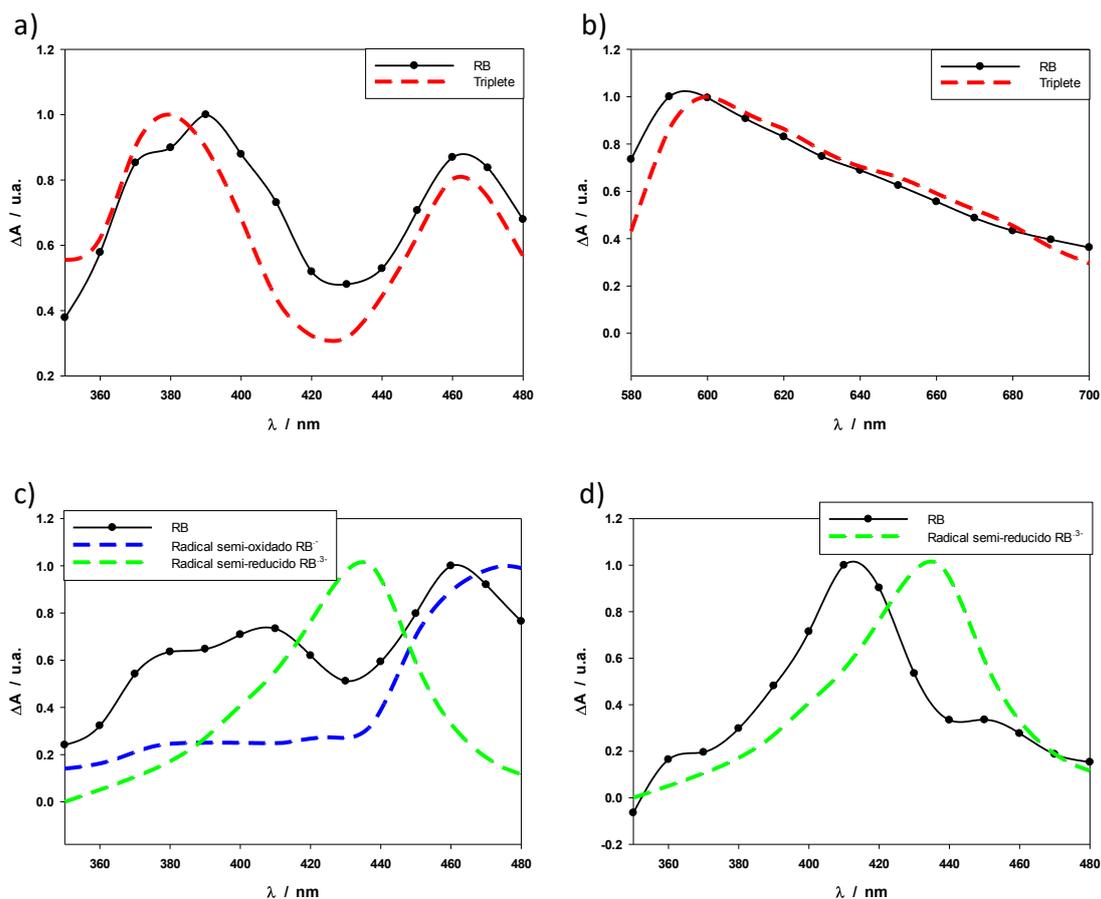
Si bien, el ver los espectros obtenidos, nos hace pensar que posiblemente las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  no tienen ningún efecto sobre los transientes de la Rf, cuando analizamos los espectros DADS sin normalizar, vemos que hay un leve incremento en la cantidad de triplete generado (Figura 64a), el cual se evidencia al graficar el cociente entre la  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A_0$  (de la Rf sin NPs) vs la concentración de nanopartículas (Figura 64b), a la longitud de onda del máximo de absorción del triplete.



**Figura 64.** a) DADS correspondientes al tiempo de vida 10,21  $\mu\text{s}$  obtenidos de los experimentos de laser flash-fotólisis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm, realizados con  $[\text{Rf}] = 27 \mu\text{M}$  y cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ . b) Relación entre  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A$  de la Rf sin NPs en función de la concentración de nanopartículas. Los  $\Delta A$  fueron tomados a la longitud de onda del máximo de absorción del triplete (705 nm).

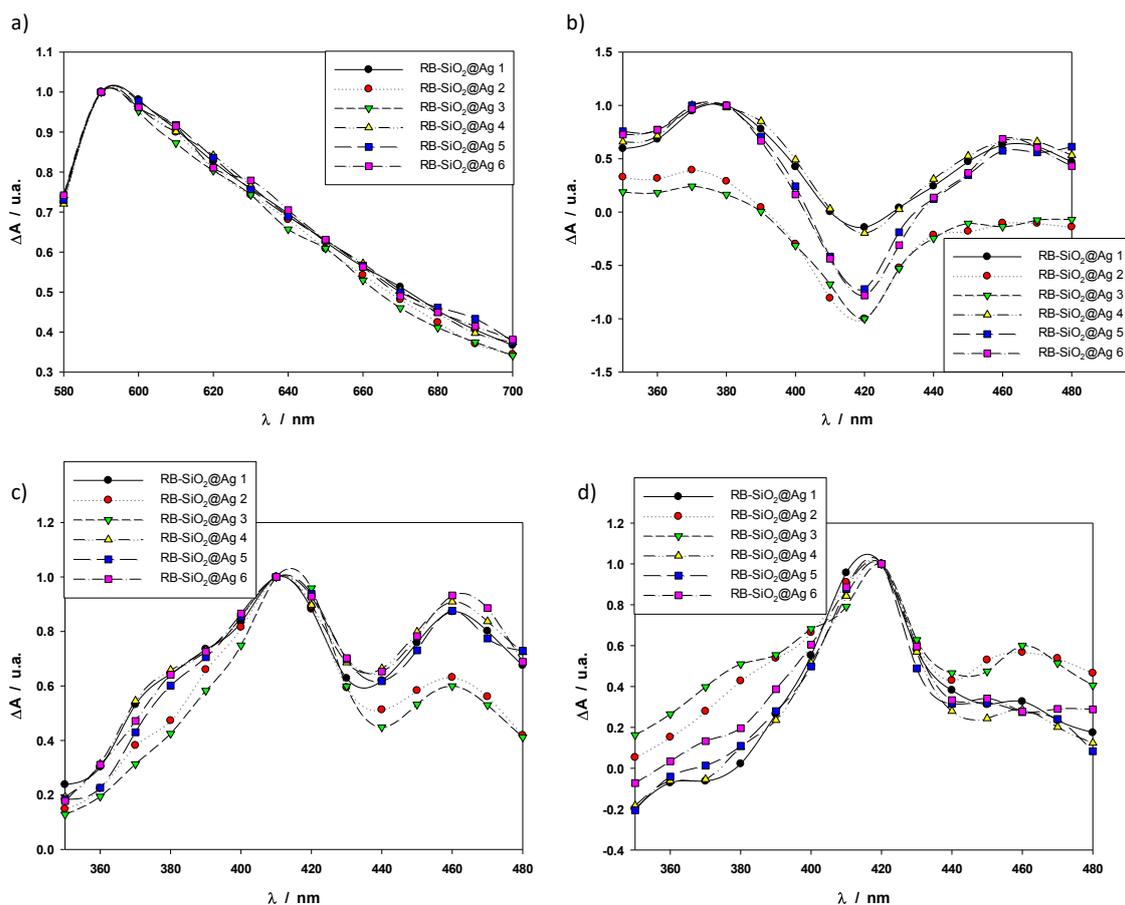
Experimentos de LFP fueron realizados con muestras de  $\text{RB}^{2-}$  en presencia y ausencia de NPs  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$  en los rangos de longitudes de onda de 350 - 480 nm y 580 - 700 nm con una ventana temporal para cada rango de 0 - 1 ms y 0 - 100  $\mu\text{s}$ , respectivamente. En la segunda región la única especie transiente que absorbe en la ventana de tiempo de nuestros experimentos es el estado triplete del colorante,  ${}^3\text{RB}^{2-*}$  (Figura 65a). En la región de longitudes de onda más cortas el estado triplete también absorbe junto con el radical semi-reducido ( $\text{RB}^{\cdot-}$ ) y semi-oxidado ( $\text{RB}^{\cdot}$ ) (Figuras 65b, 65c y 65d). Estos radicales se formaron a través de la desproporción del estado triplete y el estado basal del RB ( $\text{RB}^{2-}$ ).<sup>87</sup>





**Figura 65.** DADS normalizados correspondiente a los tiempos de vida de: 10,25  $\mu$ s (a) y (b), 22,56  $\mu$ s (c), y 239,4  $\mu$ s (d), obtenidos de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[RB^{2-}] = 147 \mu$ M) bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm. Las líneas discontinuas representan los espectros de absorción reportados para  ${}^3RB^{2-*}$  (rojo),  $RB^{\cdot-}$  (azul), and  $RB^{\cdot 3-}$  (verde).<sup>89</sup>

El análisis global de los experimentos realizados bajo saturación de Ar en el rango de 580 – 700 nm mostraron la contribución de una especie solamente con un tiempo de vida de 10,25  $\mu$ s y un espectro de absorción que coincide con el del  ${}^3RB^{2-*}$  (Figura 66a). Tanto el tiempo de vida como los espectros fueron independientes de la presencia de NPs  $SiO_2@Ag$ . En el rango de 350 - 480 nm el programa detectó tres componentes: el tiempo de vida del primer componente fue 10,25  $\mu$ s nuevamente y el DADS mostró absorción positiva en ausencia de partículas, mientras que apareció una región negativa alrededor de 420 nm en presencia de NPs  $SiO_2@Ag$ . Recordemos que los espectros DADS se interpretan en términos de la pérdida o ganancia de absorción asociada a un cierto tiempo de vida.



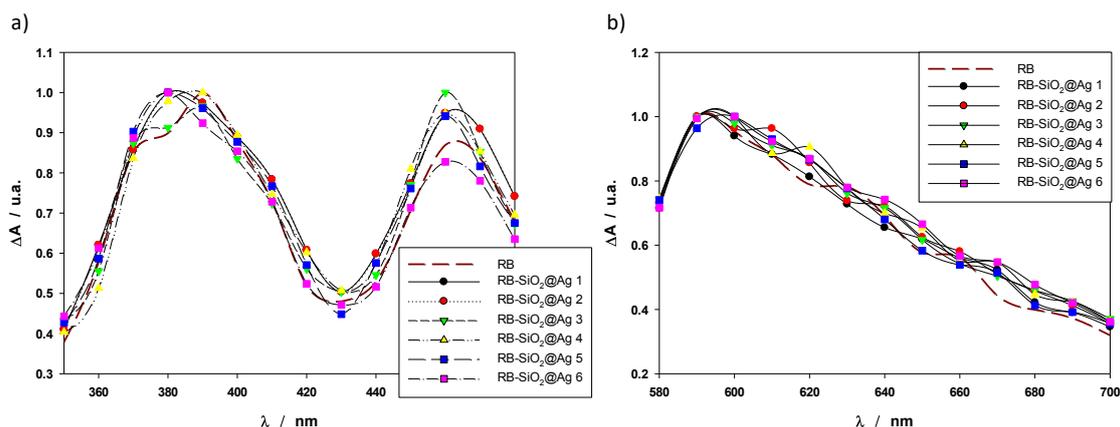
**Figura 66.** DADS normalizados correspondiente a los tiempos de vida de: 10,25  $\mu\text{s}$  (a) y (b), 22,56  $\mu\text{s}$  (c), y 239,4  $\mu\text{s}$  (d), obtenidos de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{RB}^{2-}] = 147 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ .

Como puede verse en la Figura 66b, los espectros DADS que corresponden al tiempo de vida  $\tau_1 = 10,25 \mu\text{s}$  asociado al triplete en la zona de 350 - 480 nm se hacen cada vez más negativos en la zona de 420 nm donde presenta el máximo de absorción el radical semi-reducido  $\text{RB}^{3-}$ .<sup>90</sup> Esto se debe a que el decaimiento del triplete da lugar a la formación del radical  $\text{RB}^{3-}$ . Análogamente, para el DADS asociado al tiempo de vida  $\tau_3 = 239,4 \mu\text{s}$ , con contribución mayoritaria del radical  $\text{RB}^{3-}$ , se espera una ganancia de absorción en la zona de 420 nm, como puede verse en la Figura 66d. El segundo componente con un tiempo de vida de 22,56  $\mu\text{s}$  muestra un DADS con contribuciones de los radicales  $\text{RB}^{\cdot}$  y  $\text{RB}^{3-}$  (Figura 66c), mientras que el DADS del tercer componente con un tiempo de vida de 239,4  $\mu\text{s}$  coincide con el asignado al radical  $\text{RB}^{3-}$  (Figura 66d).<sup>91</sup> Estos resultados concuerdan con el tiempo de vida más largo reportado para el radical semi-reducido  $\text{RB}^{3-}$  comparado con el del radical  $\text{RB}^{\cdot}$ .<sup>92</sup>

El análisis Glotaran de los datos obtenidos de los experimentos realizados con muestras de  $\text{RB}^{2-}$  en presencia y en ausencia de NPs  $\text{SiO}_2@Ag$  en el rango de longitudes de onda de 580 - 700 nm saturadas en aire, dio como resultado un componente con un tiempo

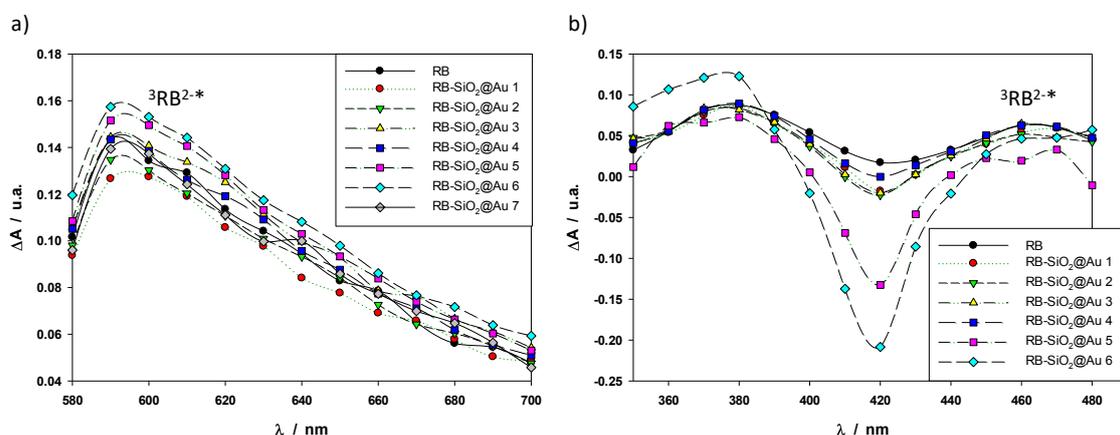
de vida de  $2,150 \mu\text{s}$ . Con este tiempo de vida, el decaimiento obtenido del triplete en muestras saturadas en Ar ( $10 \mu\text{s}$ ), y la concentración de oxígeno molecular de soluciones saturadas en aire ( $0,29 \text{ mM}$ )<sup>90</sup>, se obtuvo una constante de velocidad de quenching del  ${}^3\text{RB}^{2-*}$  por el oxígeno de  $1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , en excelente coincidencia con el valor reportado de  $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .<sup>91</sup> El DADS también fue coincidente con el espectro reportado del estado triplete (Figura 67).

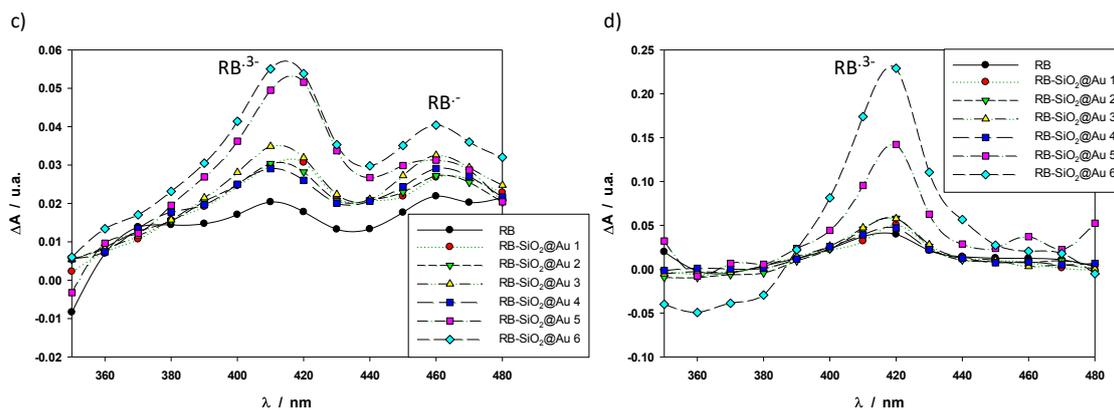
En resumen, a pesar de que el  $\text{RB}^{2-}$  se adsorbe sobre las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ , no puede observarse ningún efecto sobre el estado triplete del colorante.



**Figura 67.** DADS normalizado correspondiente al tiempo de vida de:  $2,150 \mu\text{s}$  (a) y (b) obtenidos de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{RB}^{2-}] = 147 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de aire luego de excitación a  $355 \text{ nm}$  con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ .

Los experimentos de LFP realizados con muestras de  $\text{RB}^{2-}$  en presencia y ausencia de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  en los mismos rangos de longitudes de onda anteriores ( $350 - 480 \text{ nm}$  y  $580 - 700 \text{ nm}$ ) muestran, en la segunda región, una única especie transiente que absorbe en la ventana de tiempo de nuestros experimentos correspondiente al estado triplete del colorante,  ${}^3\text{RB}^{2-*}$  (Figura 68a). En la región de longitudes de onda más cortas el estado triplete también absorbe junto con el radical semi-reducido ( $\text{RB}^{\cdot-}$ ) y semi-oxidado ( $\text{RB}^{\cdot}$ ) (Figuras 68b, 68c y 68d) al igual que lo que encontramos para las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ .

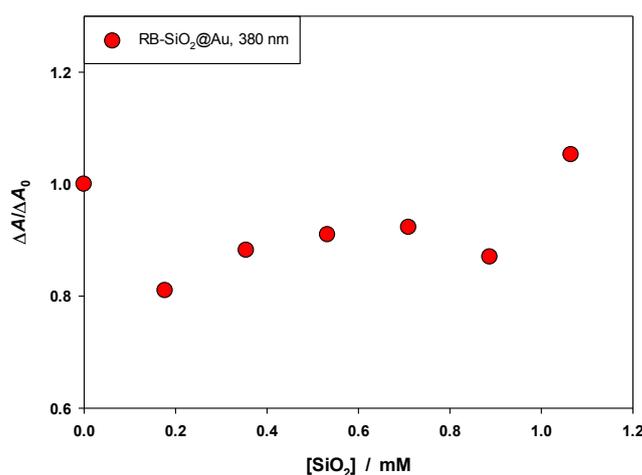




**Figura 68.** DADS correspondiente a los tiempos de vida de: 9,980  $\mu\text{s}$  (a) y (b), 23,73  $\mu\text{s}$  (c), y 285,1  $\mu\text{s}$  (d), obtenidos de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{RB}^{2-}] = 147 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$ .

Como puede verse en la Figura 68b, nuevamente los espectros DADS que corresponden al tiempo de vida  $\tau_1 = 9,98 \mu\text{s}$  asociado al triplete en la zona de 350 - 480 nm se hacen cada vez más negativos en la zona de 420 nm donde presenta el máximo de absorción el radical  $\text{RB}^{3-}$  al igual que ocurría con las nanopartículas recubiertas con plata. Estos cambios relativos de los DADS asociados a los tiempos de vida  $\tau_1 = 9,98 \mu\text{s}$  y  $\tau_3 = 285,1 \mu\text{s}$  en la zona de 420 nm en función de la concentración de nanopartículas pueden explicarse de la misma manera que para los ensayos realizados con  $\text{SiO}_2\text{@Ag}$  NPs.

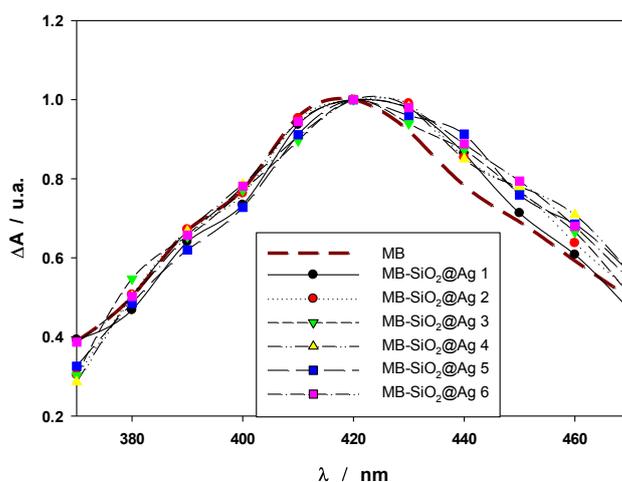
Si analizamos lo que sucede cuando graficamos la relación entre el  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A_0$  del  $\text{RB}^{2-}$  sin partículas vs la concentración de  $\text{SiO}_2$ , vemos que la cantidad de triplete  ${}^3\text{RB}^{2-*}$  no se ve afectada por la presencia de las NPs  $\text{SiO}_2\text{@Au}$  (Figura 69).



**Figura 69.** Relación entre  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A$  de la  $\text{RB}^{2-}$  sin NPs en función de la concentración de nanopartículas. Los  $\Delta A$  fueron tomados a la longitud de onda del máximo de absorción del triplete (380 nm).

Por lo tanto, al igual que lo que sucede con las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ , a pesar de formar un complejo con el  $\text{RB}^{2-}$ , las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  parecieran no tener efecto sobre el estado triplete del colorante.

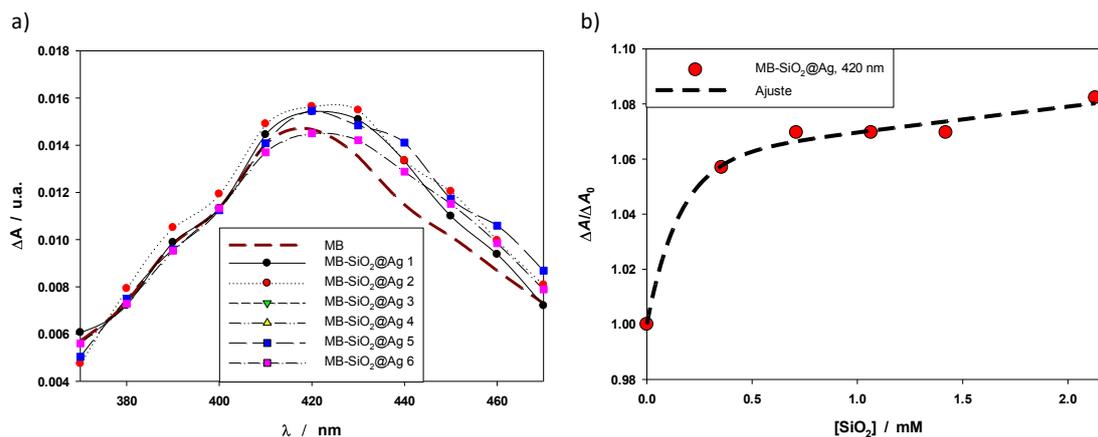
El análisis con el programa Glotaran de las señales de LFP obtenidas con muestras de  $\text{MB}^+$   $412 \mu\text{M}$  ( $A^{355} = 0,5$ ) en suspensiones de nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  dieron como resultado un único DADS con valores positivos de  $\Delta A$  en el rango de longitudes de onda de  $370 - 470 \text{ nm}$  utilizando una ventana de tiempo de  $0 - 200 \mu\text{s}$ . El espectro, con un tiempo de vida de  $17,30 \mu\text{s}$ , es atribuido al triplete  ${}^3\text{MB}^{+*}$  (Figura 70).



**Figura 70.** DADS normalizado correspondiente al tiempo de vida de  $17,30 \mu\text{s}$  obtenido de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{MB}^+] = 412 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de Ar luego de excitación a  $355 \text{ nm}$  con cantidades crecientes de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ .

Si analizamos el decaimiento del  ${}^3\text{MB}^{+*}$  en ausencia de NPs, podemos establecer un ajuste monoexponencial, con un tiempo de vida de  $17,39 \mu\text{s}$ , en total coincidencia con el valor arrojado por Glotaran. En presencia de las NPs, si ajustamos las señales con un decaimiento monoexponencial, los tiempos de vida son bastante más largos que para el  $\text{MB}^+$  solo ( $25,07 \mu\text{s}$ ). Esto va en contra de la posibilidad de un quenching colisional, por lo que realizamos un ajuste biexponencial de los datos con NPs y vimos que hay un tiempo de vida igual al del triplete de  $\text{MB}^+$  solo y otro 3 veces más largo ( $50,95 \mu\text{s}$ ). Dado que solo obtuvimos un espectro DADS en todos los casos analizados, este segundo tiempo de vida fue asociado al  $\text{MB}^+$  adsorbido sobre las nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ .

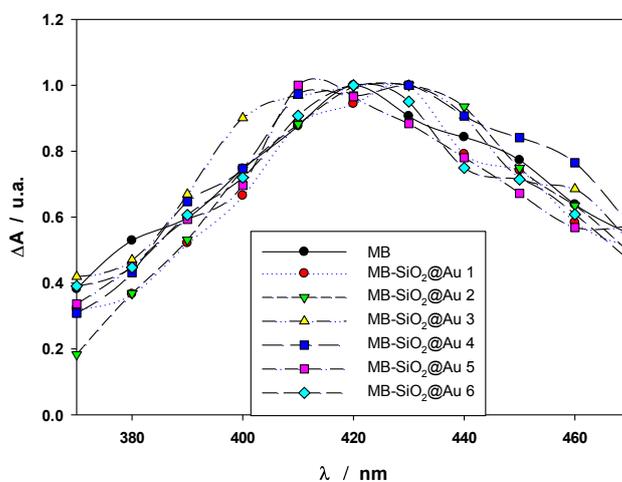
Cuando observamos lo que sucede con la cantidad de triplete  ${}^3\text{MB}^{+*}$ , encontramos que a medida que aumentamos la concentración de nanopartículas hay un incremento en la absorción del triplete (Figura 71a), lo cual se confirma cuando graficamos la relación entre el  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A_0$  del  $\text{MB}^+$  sin partículas en función de la concentración de  $\text{SiO}_2$  (Figura 71b), lo cual nos estaría indicando un aumento muy leve en la cantidad de triplete formado en presencia de las NPs.



**Figura 71.** a) DADS correspondientes al tiempo de vida 17,30  $\mu\text{s}$  obtenidos de los experimentos de laser flash-fotólisis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm, realizados con  $[\text{MB}^+] = 412 \mu\text{M}$  y cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag. b) Relación entre  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A$  de la MB<sup>+</sup> sin NPs en función de la concentración de nanopartículas. Los  $\Delta A$  fueron tomados a la longitud de onda del máximo de absorción del triplete (420 nm).

Por último, estos mismos ensayos de LFP fueron realizado para soluciones de MB<sup>+</sup> 412  $\mu\text{M}$  saturadas en Ar, en presencia y en ausencia de NPs SiO<sub>2</sub>@Au. Las señales obtenidas muestran valores positivos de  $\Delta A$  en el rango de longitudes de onda de 370 - 470 nm utilizando una ventana de tiempo de 0 - 200  $\mu\text{s}$ . Del mismo modo que en el caso anterior, un único DADS fue generado del análisis en Glotaran. Este espectro (Figura 72), con un tiempo de vida de 29,64  $\mu\text{s}$ , puede ser asignado al triplete del colorante (<sup>3</sup>MB<sup>+</sup>).

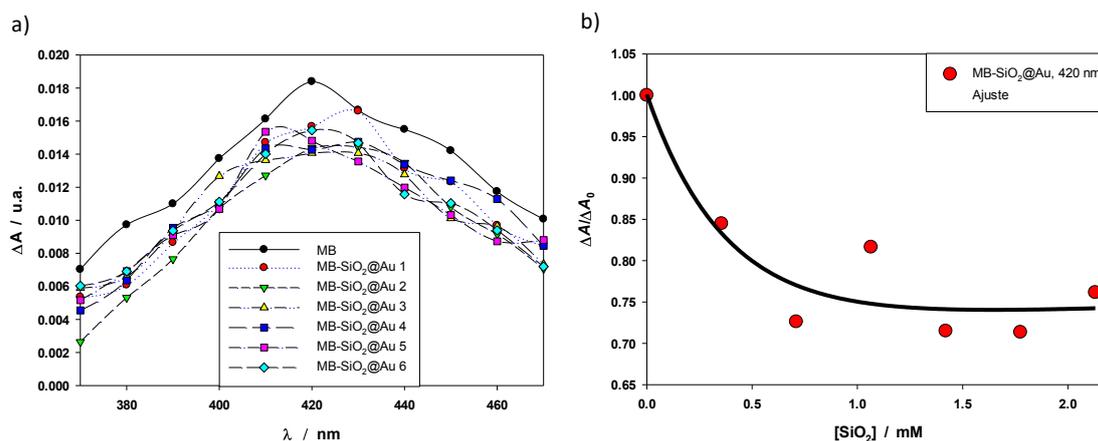
Cuando analizamos el decaimiento del <sup>3</sup>MB<sup>+</sup> en ausencia de NPs, establecimos nuevamente un ajuste monoexponencial, con un tiempo de vida de 28,66  $\mu\text{s}$ , prácticamente el mismo valor arrojado por Glotaran.



**Figura 72.** DADS normalizados correspondiente al tiempo de vida de 29,64  $\mu\text{s}$  obtenido de los experimentos de laser flash fotólisis ( $[\text{MB}^+] = 412 \mu\text{M}$ ) bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm con cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

Luego realizamos un ajuste biexponencial de los datos con NPs y vimos que hay un tiempo de vida igual al del triplete de MB<sup>+</sup> solo y otro más largo de 71,48  $\mu$ s. Al igual que lo que ocurre para las nanopartículas recubiertas con plata, solo obtuvimos un espectro DADS en todos los casos analizados, por este motivo, el segundo tiempo de vida fue asignado al MB<sup>+</sup> adsorbido sobre las nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Au.

Como podemos observar, parecería que ambas nanopartículas tienen el mismo efecto sobre el estado triplete del azul de metileno.



**Figura 73.** a) DADS correspondientes al tiempo de vida 28,66  $\mu$ s obtenidos de los experimentos de laser flash-fotólisis bajo saturación de Ar luego de excitación a 355 nm, realizados con  $[\text{MB}^+] = 0,82 \text{ mM}$  y cantidades crecientes de NPs SiO<sub>2</sub>@Au. b) Relación entre  $\Delta A$  de las mezclas y el  $\Delta A$  de la MB<sup>+</sup> sin NPs en función de la concentración de nanopartículas. Los  $\Delta A$  fueron tomados a la longitud de onda del máximo de absorción del triplete (420 nm).

Sin embargo, cuando analizamos los DADS de las muestras de MB<sup>+</sup> con diferentes concentraciones de NPs SiO<sub>2</sub>@Au, vemos que a medida que aumenta la cantidad de nanopartículas se produce una disminución en la absorción del colorante (Figura 73a), a diferencia de lo que ocurre para las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag (Figura 71a). Este descenso puede verse más claramente en el gráfico de la Figura 73b, lo cual nos indica una disminución en la cantidad de triplete generado en presencia de las NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

La comparación de los datos obtenidos con ambos colorantes indica que la Rf y el RB<sup>2-</sup> se adsorben más favorablemente sobre NPs SiO<sub>2</sub>, mostrando una preferencia por los grupos silanoles de las nanopartículas comparado con los sitios del metal. Las constantes de velocidad aparente  $K_{\text{app}}$  obtenidas para la complejación son similares. Cuando se utilizaron las nanopartículas con bajo recubrimiento de plata (NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low) en los ensayos de LFP, no fue posible observar la absorción del estado excitado triplete de la Rf (<sup>3</sup>Rf\*) y este comportamiento se explicó en términos de una reacción de transferencia de carga desde la Ag al estado excitado del complejo no fluorescente entre la Rf y la nanopartícula (\*Rf-NP) (reacción 21). Sin embargo, ni la cantidad ni el decaimiento del estado triplete del Rosa de Bengala (<sup>3</sup>RB<sup>2-</sup>\*) fueron afectados por la presencia de las NPs

SiO<sub>2</sub>@Ag. Este resultado indica que el complejo de este colorante con las nanopartículas (\*RB<sup>2-</sup>-NP) es incapaz de transferir electrones a las nanopartículas de plata en una reacción similar a la (21). Estos resultados se explican en términos de la factibilidad de la transferencia de un electrón desde la nanopartícula al estado triplete de ambos colorantes.

La Tabla 9 lista los valores de la energía del estado triplete (E<sub>T</sub>), estado fundamental y potenciales redox del estado triplete de los sensibilizadores, y la energía de Gibbs (Δ<sub>ET</sub>G<sup>0</sup>) y las constantes de equilibrio para el proceso de transferencia de un electrón (23) para  ${}^3S^* = {}^3Rf^* \text{ o } {}^3RB^{2-*}$ .



Muestra	E <sub>T</sub> / K <sub>J</sub> .mol <sup>-1</sup>	Potencial Redox del Estado Fundamental vs ENH / V	Potencial Redox del Estado Triplete vs ENH / V	Δ <sub>ET</sub> G <sup>0</sup> / K <sub>J</sub> .mol <sup>-1</sup> <sup>(a)</sup>	K
RB <sup>2-</sup>	175,6 <sup>(b)</sup>	E <sup>0</sup> (RB <sup>2-</sup> /RB <sup>3-</sup> ) = -0,78 <sup>(c)</sup>	E <sup>0</sup> ( <sup>3</sup> RB <sup>2-*</sup> /RB <sup>3-</sup> ) = 1,04 <sup>(b)</sup>	-25,1	2,5 x 10 <sup>4</sup>
MB <sup>+</sup>	138 <sup>(c)</sup>	E <sup>0</sup> (MB <sup>+</sup> /MB <sup>·</sup> ) = -0,062 <sup>(d)</sup>	E <sup>0</sup> ( <sup>3</sup> MB <sup>+*</sup> /MB <sup>·</sup> ) = 1,43 <sup>(d)</sup>	-62,7	1,0 x 10 <sup>11</sup>
Rf	209,0 <sup>(d)</sup>	E <sup>0</sup> (Rf/Rf <sup>·</sup> ) = -0,546 <sup>(e)</sup>	E <sup>0</sup> ( <sup>3</sup> Rf <sup>*</sup> /Rf <sup>·</sup> ) = 1,62 <sup>(f)</sup>	-81,0	1,6 x 10 <sup>14</sup>

(a) Calculado a partir de la ecuación de Rehm-Weller<sup>7</sup> tomando 0,78 V para el potencial redox E<sup>0</sup><sub>(Ag<sup>+</sup>/Ag)</sub> vs. NHE, el cual es el valor reportado para nanopartículas de plata de aprox 10 nm de diámetro.<sup>93</sup> (b) De la ref 33. (c) De la ref 38. (d) De la ref 39. (e) De la ref 40. (f) De la ref 6.

**Tabla 9.** Energía del estado triplete (E<sub>T</sub>), potenciales redox del estado fundamental y triplete de los sensibilizadores, energía libre de Gibbs (Δ<sub>ET</sub>G<sup>0</sup>) y constantes de equilibrio (K) de la reacción (6) para S = RB<sup>2-</sup>, MB<sup>+</sup> y Rf.

Asumiendo que los potenciales redox de estado triplete de los sensibilizadores son similares cuando están libres o adsorbidos sobre las nanopartículas, podemos predecir la reacción (24), un proceso termodinámicamente factible, tiene una constante de equilibrio K diez ordenes de magnitud menor que el de la reacción (21). Esta podría ser la razón por la cual no se observa efecto de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low en el estado triplete del Rosa de Bengala, mientras que las nanopartículas tienen un efecto de quenching drástico en el estado triplete de la Rf.



Es notable también que aunque el RB<sup>2-</sup> se dimeriza en la superficie de las NPs SiO<sub>2</sub>, nuestros ensayos de absorción transiente muestran claramente que el dímero se disocia en el estado excitado triplete, en completa coincidencia con los datos reportados de estados excitados del RB<sup>2-</sup> en la superficie de la sílice.<sup>94</sup> Esta concordancia apoya la ausencia, bajo nuestras condiciones experimentales, de cualquier efecto de las nanopartículas de plata en la fotofísica del RB<sup>2-</sup>. En el caso de MB<sup>+</sup>, aunque la

transferencia de carga sea posible (ver Tabla 9), no tenemos evidencia experimental de que ocurra.

#### **3.4.4 Estudio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) utilizando la técnica Resonancia Paramagnética de Electrones.**

La Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR, del inglés: Electron Paramagnetic Resonance) es una técnica espectroscópica que detecta especies que poseen electrones desapareados. A esta técnica a menudo se la llama Resonancia de Spin Electrónico (ESR, del inglés: Electron Spin Resonance).

Solo la EPR detecta electrones desapareados inequívocamente. Otras técnicas tales como fluorescencia, pueden proveer evidencia indirecta de radicales libres, pero solo EPR arroja evidencia incontrovertible de su presencia. Además, EPR tiene el poder único de identificar las especies paramagnéticas que detecta. Las muestras de EPR son muy sensibles al entorno local. Por lo tanto, esta técnica arroja información sobre la estructura molecular cercana al electrón desapareado. En ciertos casos, los espectros de EPR exhiben cambios dramáticos en patrones de líneas, dando una idea de procesos dinámicos tales como movilidad molecular o fluidez. La técnica de EPR con trampa de spin (EPR spin-trapping), detecta radicales libres reactivos, de tiempo de vida cortos. Esta técnica ha sido vital en el campo de la biomedicina para elucidar el rol de los radicales libres en muchas patologías y toxicidades. La EPR con marcaje de spin (EPR spin-labelling) es una técnica utilizada por bioquímicos donde una molécula paramagnética (el marcador de spin) es empleada para marcar macromoléculas en regiones específicas. Del espectro de EPR reportado para el marcador de spin, se puede determinar el tipo de entorno (hidrofobicidad, pH, fluidez, etc.) en el cual está localizado.

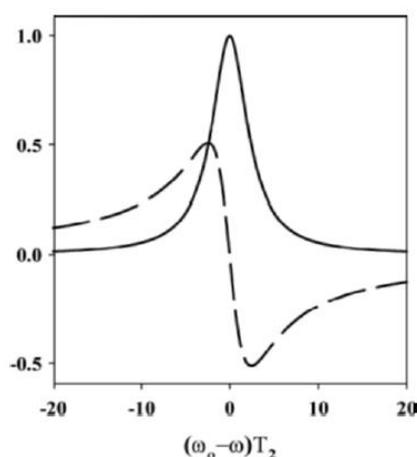
EPR es una técnica de resonancia magnética muy similar a la Resonancia Magnética Nuclear (NMR, del inglés: Nuclear Magnetic Resonance). Sin embargo, en vez de medir transiciones nucleares en la muestra, se detecta las transiciones de los electrones desapareados en un campo magnético aplicado. Al igual que el protón, el electrón posee "spin", el cual le otorga la propiedad magnética conocida como momento magnético. El momento magnético hace que el electrón se comporte como un pequeño imán. Cuando se aplica un campo magnético externo, los electrones paramagnéticos pueden orientarse tanto en dirección paralela o perpendicular a la dirección del campo magnético. Esto crea dos niveles de energía distintos para los electrones desapareados y nos permite medirlos a medida que se desplazan entre los dos niveles. Inicialmente, habrá más electrones en el nivel de menor energía (paralelo al campo) que en el nivel superior (perpendicular). Utilizamos una frecuencia fija de radiación de microondas para excitar algunos electrones del nivel de menor energía al nivel superior de energía. Para que esta transición ocurra debemos tener el campo magnético externo a una intensidad

específica, de manera que la separación entre los estados de menor y mayor energía esté exactamente emparejada con la frecuencia de las microondas. De manera de lograr esta condición, barremos el campo magnético externo mientras exponemos la muestra a una radiación de microondas de frecuencia fija. La condición en la que el campo magnético y la frecuencia de microondas son las “justas” para producir la resonancia EPR (o absorción) se conoce como condición de resonancia.

Las muestras contienen un gran número de spines distribuidos en el campo magnético continuo entre los dos estados de energía permitidos de acuerdo con el equilibrio térmico. La población relativa de los dos niveles se describe por la distribución de Boltzmann

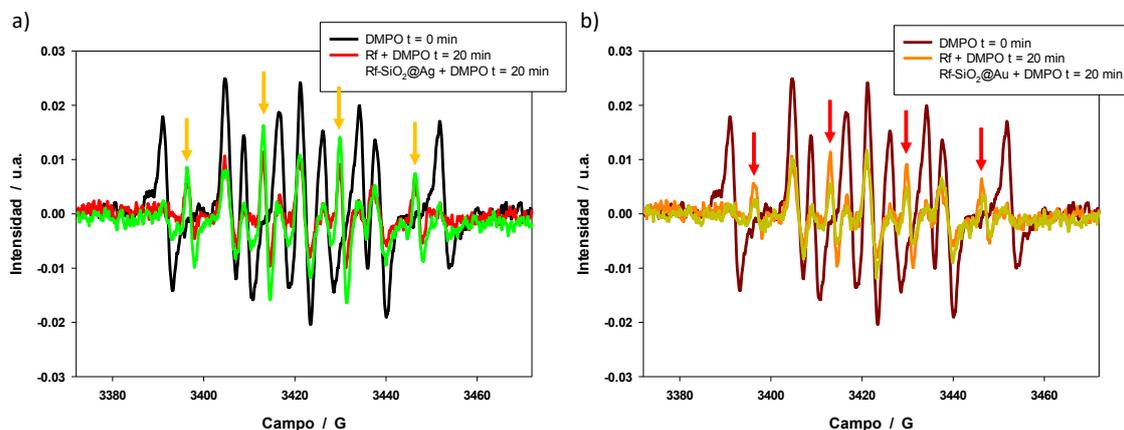
$$\frac{N^+}{N^-} = e^{(\Delta E/kT)} \quad (E27)$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura de la muestra. El campo magnético oscilante a la frecuencia resonante  $\omega_0$  induce transiciones de abajo hacia arriba o de arriba hacia abajo con la misma probabilidad. Sin embargo, la población de baja energía es mayor que la del nivel superior, conduciendo a un mayor número de transiciones al nivel superior, y, como consecuencia, a una absorción de energía por parte de la muestra. Este efecto es la base del enfoque experimental más simple y ampliamente utilizado, conocido como experimento de EPR de onda continua (CW, del inglés: continuous wave), en el cual la muestra que contiene las especies paramagnéticas es irradiada por microondas con una frecuencia fijada por la fuente, y el campo magnético es variado para buscar la absorción de microondas. La dependencia de la absorción de microondas en el campo magnético observado en estos experimentos es el espectro de EPR.



**Figura 74.** Modos de dispersión (línea punteada) y absorción (línea continua) de las transiciones magnéticas resonantes en función de la frecuencia.

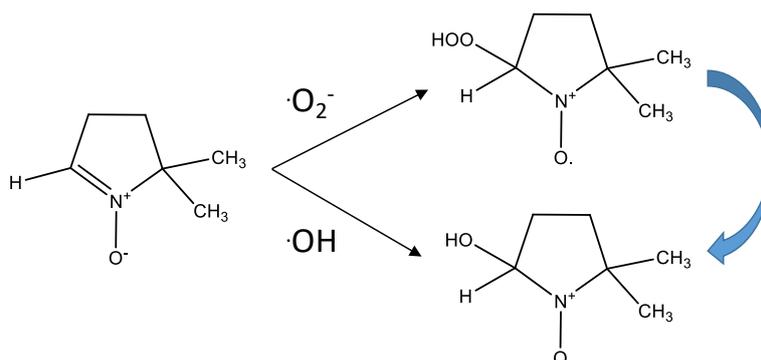
Para determinar la presencia de radicales generados a partir de la irradiación de los fotosensibilizadores Rf y RB<sup>2-</sup>, en presencia de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low y SiO<sub>2</sub>@Au, realizamos medidas de EPR spin-trapping utilizando 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO, del inglés: 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP, del inglés: 2,2,6,6-tetramethylpiperidine) como trampas para radical OH y oxígeno singlete, respectivamente.



**Figura 75.** Espectros EPR de Riboflavina irradiada con lámpara de luz negra ( $\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$ ) en presencia de a) NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low y b) NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

La Figura 75 muestra los espectros del DMPO antes y después de ser irradiado con luz de 350 nm en presencia de Rf con nanopartículas de sílice recubiertas con plata u oro. Como podemos observar, tanto en la Figura 75a y 75b, cuando se irradia la Rf en presencia o ausencia de NPs, aparecen nuevos picos que no están presentes en el espectro del DMPO solo (marcados con flechas) y las señales originales de la trampa disminuyen. Hay reportes que indica que las señales iniciales del DMPO sin irradiar podrían deberse a productos de oxidación de la trampa (DMPOox).<sup>95,96</sup> Las nuevas señales corresponden a un cuarteto 1:2:2:1 similar al que se observa para los aductos de DMPO con OH· o HO<sub>2</sub>·.<sup>97</sup> Sin embargo, si bien el nuevo espectro obtenido podría estar dado por la contribución de ambos aductos, es probable que se deba principalmente al aducto DMPO-OH, ya que el aducto con HO<sub>2</sub>· tiene una duración muy corta y decae rápidamente a hacia la forma del aducto DMPO-OH (Figura 76).<sup>98</sup>

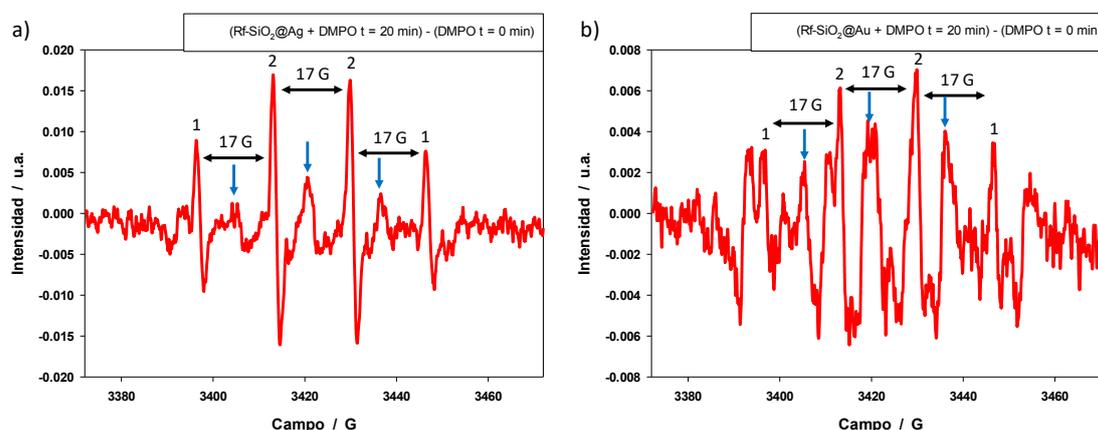
Un parámetro específico en el espectro de cada especie en una condición determinada es la distancia (o separación) entre los picos. En el caso del aducto DMPO-OH, estas constantes de acoplamiento hiperfino (aH y aN) están entre 14 y 15 G (Gauss, unidad del campo magnético). En los espectros obtenidos para Rf irradiado en presencia y ausencia de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low y SiO<sub>2</sub>@Au, la separación de los picos que forman el cuarteto del aducto DMPO-OH es de 17 G, en excelente concordancia con los valores reportados en bibliografía.<sup>99</sup> Estos resultados confirman la generación de radical OH· en las muestras irradiadas.



**Figura 76.** Esquema de generación de los aductos DMPO-OH y DMPO-HO<sub>2</sub>, y el decaimiento de este último hacia la forma del aducto DMPO-OH.

Si al espectro EPR de la Rf irradiada en presencia de NPs y DMPO le restamos el espectro del DMPO sin irradiar (afectado por la relación de picos entre ambos espectros a 3391 G), obtenemos un espectro como el que se observa en la Figura 77.

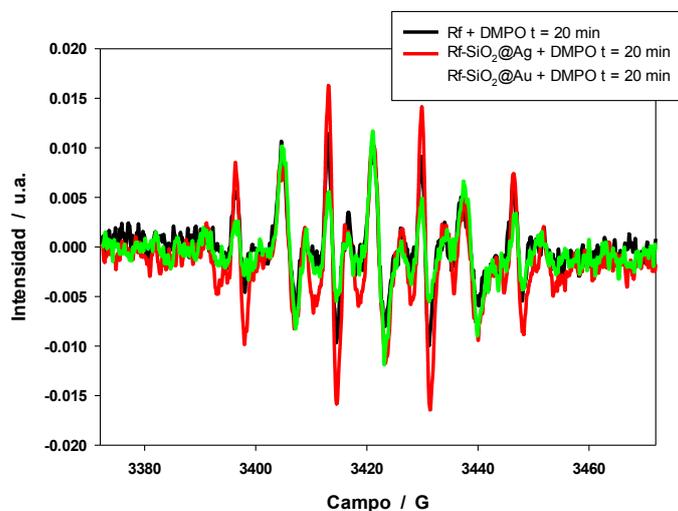
En estos espectros diferencia se puede ver claramente la forma del cuarteto 1:2:2:1 correspondiente al aducto DMPO-OH y la separación de sus picos característicos. Además, podemos ver la presencia correspondiente a un triplete que también se ha observado en otros estudios (marcados con flechas).<sup>100</sup> Estas señales podrían surgir a partir de diferentes procesos tales como: la descomposición del aducto DMPO-OH vía apertura del anillo de pirrolina en el enlace C-N, la descomposición de un dímero de DMPO que con el radical OH $\cdot$  daría un compuesto paramagnético, entre otros.



**Figura 77.** Espectros EPR de la diferencia entre el DMPO irradiado en presencia de Rf + NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low (a) y Rf + SiO<sub>2</sub>@Au (b) y el DMPO sin irradiar afectado por la relación de picos entre ambos espectros a 3391 G.

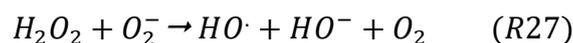
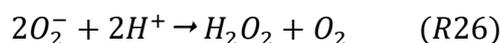
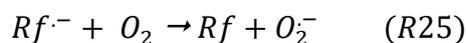
Cuando comparamos el efecto producido por las nanopartículas SiO<sub>2</sub>@Ag-low y SiO<sub>2</sub>@Au sobre la generación del radical OH $\cdot$  por parte de la Rf, a partir de las

intensidades de los picos del cuarteto 1:2:2:1 en el gráfico de la figura 78, vemos que se cumple la relación  $Rf + SiO_2@Ag-low > Rf\ sola > Rf + SiO_2@Au$ .

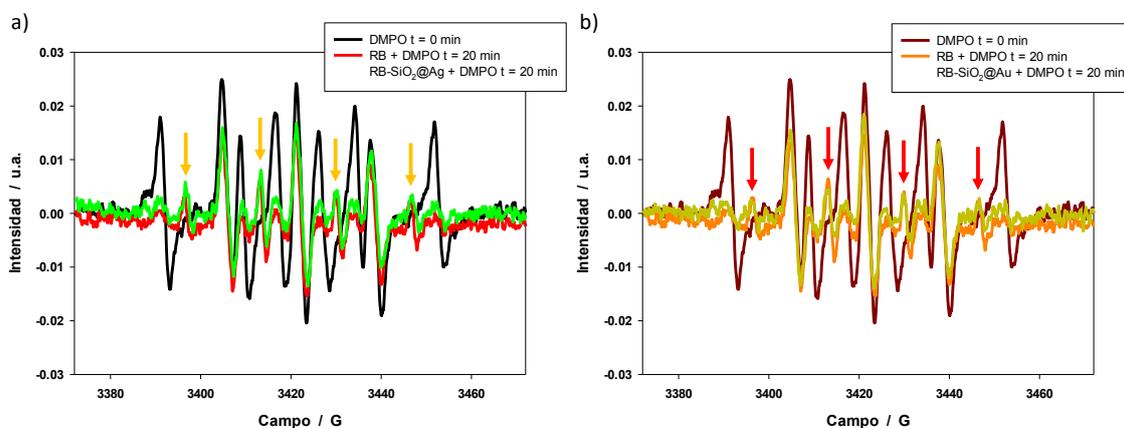


**Figura 78.** Espectros EPR del aducto DMPO-OH para la Rf sola, Rf + SiO<sub>2</sub>@Ag-low y Rf + SiO<sub>2</sub>@Au.

La formación del radical anión de Rf a partir de la transferencia de carga desde el triplete de Rf a las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag-low (ver resultados de LFP) resulta en un aumento en la concentración de Rf<sup>•-</sup>. Este radical por reacción con el oxígeno molecular puede generar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, precursor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>101,102</sup>



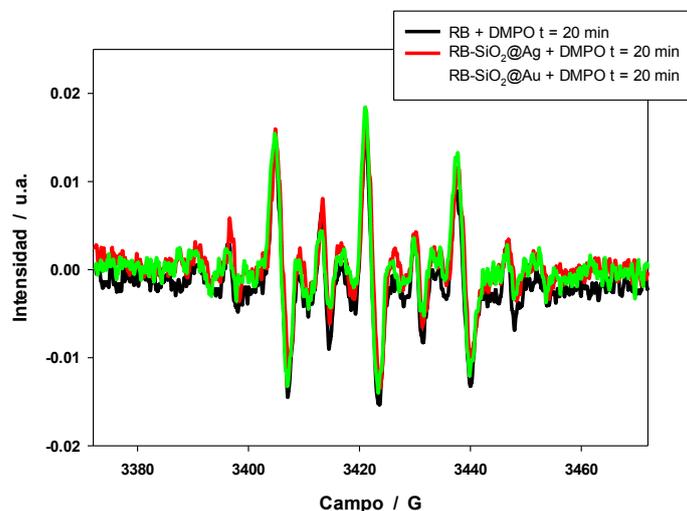
Estos mismos ensayos de EPR se realizaron para el colorante RB<sup>2-</sup> en ausencia y en presencia de NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au arrojando resultados similares.



**Figura 79.** Espectros EPR de Rosa de Bengala irradiada con lámpara de luz blanca ( $\lambda_{\text{máx}} = 575\text{ nm}$ ) en presencia de a) NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y b) NPs SiO<sub>2</sub>@Au.

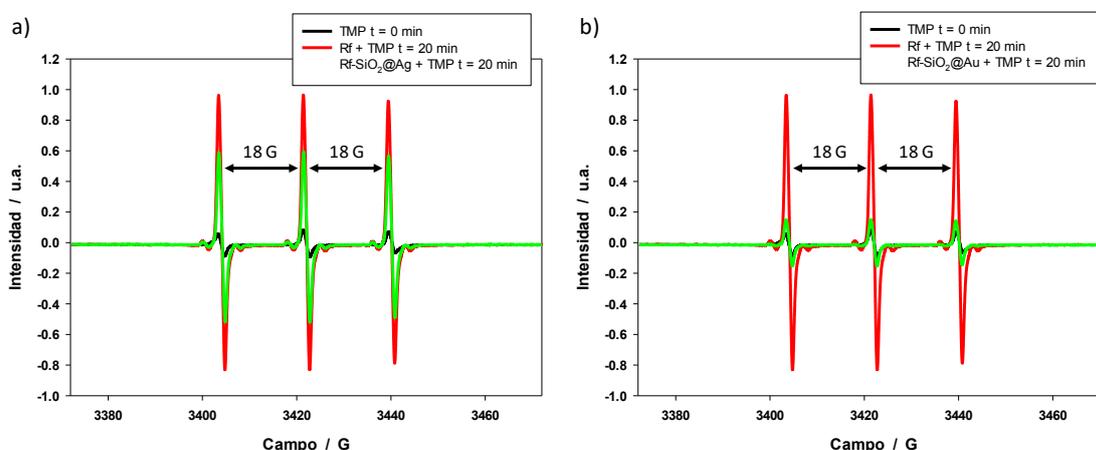


Si ahora comparamos las intensidades de los picos correspondientes al aducto DMPO-OH para el  $\text{RB}^{2-}$  en ausencia y en presencia de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , obtenemos el gráfico de la Figura 82, donde no se observan diferencias entre el colorante solo y las mezclas con nanopartículas.



**Figura 82.** Espectros EPR del aducto DMPO-OH para la  $\text{RB}^{2-}$  solo,  $\text{RB}^{2-} + \text{SiO}_2@\text{Ag}$  y  $\text{RB}^{2-} + \text{SiO}_2@\text{Au}$ .

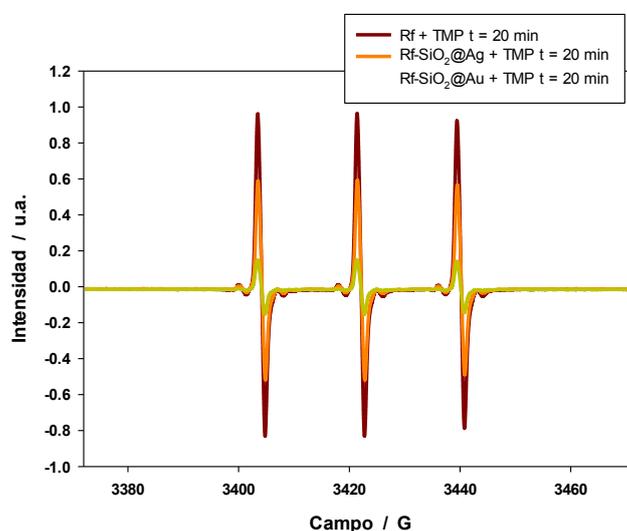
Cuando analizamos la producción de oxígeno singlete mediante EPR spin-trapping, con el TMP como trampa para este radical, para la Rf irradiada en ausencia y en presencia de NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ -low y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  obtenemos los espectros de la Figura 83. En estos gráficos vemos la señal característica del aducto  $\text{TMP}^{\cdot}\text{O}_2$ , la cual consta de un triplete cuya constante de acoplamiento hiperfino  $a_N$  es de 15,04 G (separación entre los picos). En nuestro caso, la distancia entre los picos del triplete es de 18 G, muy similar a la reportada en bibliografía. La aparición de estas señales indica la formación de oxígeno singlete por parte del fotosensibilizador luego de la irradiación a 350 nm, tanto en ausencia como en presencia de las nanopartículas.



**Figura 83.** Espectros EPR de TMP con Riboflavina irradiada con lámpara de luz negra ( $\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$ ) en presencia de a) NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ -low y b) NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .

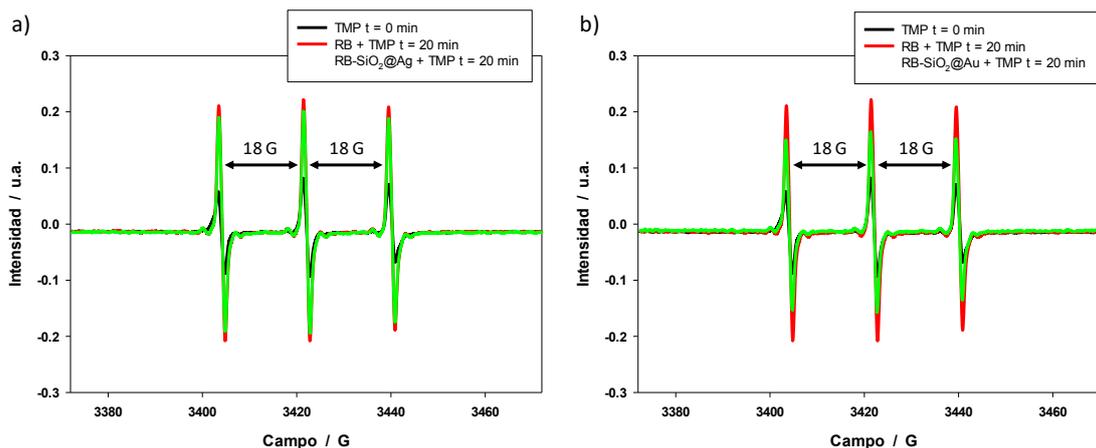
Cuando comparamos las intensidades de los espectros del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$  generados para la Rf sola y en presencia de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ -low y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  en un mismo gráfico (Figura 84), podemos observar la Riboflavina sola es la que mayor cantidad de oxígeno singlete produce, luego le sigue la mezcla de Rf con  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y por último la mezcla de Rf con NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ . Es probable que la existencia de la vía de decaimiento del triplete del sensibilizador mediante la transferencia de carga ocurra en detrimento de la transferencia de energía al oxígeno molecular y por esa razón la producción de  $^1\text{O}_2$  se vea disminuida. Aunque no podría descartarse un fenómeno de quenching de  $^1\text{O}_2$  por las NPs.

En el caso de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  se registró un leve aumento de la absorción del triplete en presencia de las NPs, la única explicación posible sería mediante quenching de  $^1\text{O}_2$  por parte del nanomaterial.



**Figura 84.** Espectros EPR del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$  para la Rf sola, Rf +  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$ -low y Rf +  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ .

El mismo ensayo fue realizado para las mezclas de  $\text{RB}^{2-}$  en presencia de nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ . En este caso, para los dos sistemas estudiados, volvimos a observar la señal del triplete del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$ , con una separación de los picos de 18 G, confirmando la generación de oxígeno singlete por parte del colorante al ser irradiado en ausencia y en presencia de las partículas (Figura 85).

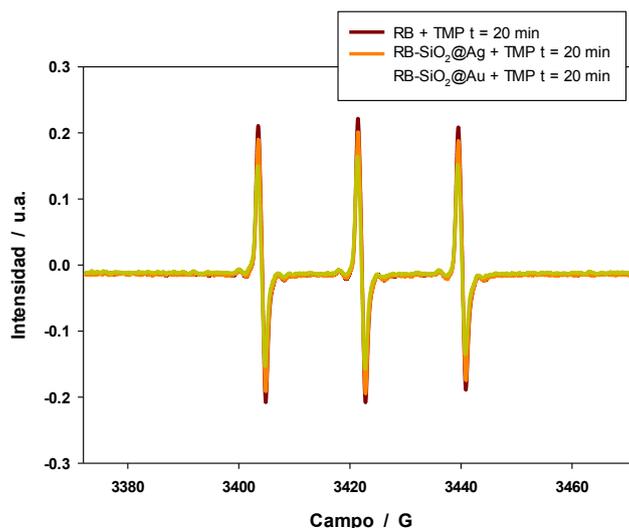


**Figura 85.** Espectros EPR de TMP con Rosa de Bengala irradiado con lámpara de luz blanca ( $\lambda_{\text{máx}} = 575$  nm) en presencia de a) NPs  $\text{SiO}_2@Ag$  y b) NPs  $\text{SiO}_2@Au$ .

Cuando comparamos las intensidades de los espectros del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$  formados para  $\text{RB}^{-2}$  solo,  $\text{RB}^{-2} + \text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{RB}^{-2} + \text{SiO}_2@Au$  en el mismo gráfico (Figura 86), vemos que prácticamente no hay diferencias entre el  $\text{RB}^{-2}$  solo y la mezcla con nanopartículas recubiertas con plata.

Si bien en la mezcla de  $\text{RB}^{-2}$  con  $\text{SiO}_2@Au$  vemos una diferencia mayor respecto de los otros dos espectros, sigue siendo una diferencia pequeña.

Por lo tanto, podemos decir que no hay un efecto notorio en la producción de oxígeno singlete por parte del Rosa de Bengala en presencia de las partículas. Estos resultados están de acuerdo con los de LFP ya que para ninguno de las dos nanopartículas ( $\text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{SiO}_2@Au$ ) vimos cambios en los espectros DADS ni en la cantidad del triplete  $^3\text{RB}^{2-*}$ .



**Figura 86.** Espectros EPR del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$  para la  $\text{RB}^{-2}$  solo,  $\text{RB}^{-2} + \text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{RB}^{-2} + \text{SiO}_2@Au$ .

La leve disminución en la señal del aducto  $\text{TMP-}^1\text{O}_2$  para el caso de la mezcla de  $\text{RB}^{2-}$  con NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  podría deberse, del mismo modo que para la Rf, en un quenchig del  $^1\text{O}_2$  por parte de las nanopartículas metálicas.

### 3.5 Conclusiones parciales

Hemos logrado sintetizar nanopartículas core-shell  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  y  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  por un método de dos etapas, las cuales involucran la formación de núcleos homogéneos de plata u oro sobre esferas de sílice coloidales, seguida de un proceso fotoquímico empleado para el crecimiento de nanopartículas de Ag y Au a partir de las semillas metálicas.

Las nanopartículas fueron caracterizadas por varios métodos y se investigó su interacción con los estados fundamental y excitado triplete del Rosa de Bengala, la Riboflavina y el Azul de Metileno, tres fotosensibilizadores típicos con actividad fotodinámica. Se observó que todos los colorantes se adsorben sobre las nanopartículas, preferentemente sobre las NPs  $\text{SiO}_2$ , indicando una mayor afinidad por los grupos silanoles que por las regiones metálicas.

Los experimentos de espectroscopía de absorción de transientes mostraron que en muestras que contienen Rf y NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag-low}$ , la absorción del estado excitado triplete de la Riboflavina no se observa debido a un proceso de transferencia de electrones desde la Ag al estado excitado del complejo formado entre la Rf y las nanopartículas  $\text{SiO}_2@\text{Ag-low}$ . Este resultado significa que bajo estas condiciones luego de la fotoirradiación se liberan iones  $\text{Ag}^+$  al medio acuoso. Cuando analizamos los espectros de EPR para esta muestra observamos una disminución en la generación de  $^1\text{O}_2$  respecto a la Rf, en total acuerdo con la desaparición de la señal del triplete en las medidas de LFP; y vimos también un aumento en la generación de radical  $\text{OH}\cdot$  posiblemente debido al incremento en la producción de radical  $\text{Rf}\cdot^-$  durante la reacción de transferencia electrónica mencionada anteriormente. Las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  no mostraron efectos sobre los estados transientes de la Rf probablemente por la menor interacción de las partículas con el colorante debido al mayor recubrimiento metálico de la superficie de la sílice.

Por el contrario, en las muestras con Rf y NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$ , los resultados de LFP mostraron un incremento (leve) en la generación del triplete ( $^3\text{Rf}^*$ ). Sin embargo, los espectros de EPR evidenciaron una disminución en la formación de radical  $\text{OH}\cdot$  y  $^1\text{O}_2$ , posiblemente como consecuencia de un posible quenching por parte de las partículas metálicas.

No se observó efecto de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Ag}$  ni de las NPs  $\text{SiO}_2@\text{Au}$  en el estado excitado triplete del Rosa de Bengala, siendo la transferencia electrónica mucho menos favorable en este caso. Esto mismo quedó reflejado en los ensayos de EPR donde no hubo diferencias en la generación de radicales entre el  $\text{RB}^{2-}$  solo y las mezclas de colorante con las nanopartículas.

Por último, en el caso del Azul de Metileno el efecto de las NPs SiO<sub>2</sub>@Ag y SiO<sub>2</sub>@Au fue el opuesto. Los resultados de LFP mostraron un incremento en la producción de triplete (<sup>3</sup>MB<sup>+</sup>) para las mezclas con nanopartículas de SiO<sub>2</sub> recubiertas con Ag, mientras que para las recubiertas con Au los espectros DADS mostraron una disminución de la cantidad de <sup>3</sup>MB<sup>+</sup>. Quedaron pendientes los estudios de especies reactivas para entender mejor el comportamiento del MB<sup>+</sup> en presencia de estas nanopartículas.

Es sabido que la liberación controlada de iones Ag<sup>+</sup> en las cercanías de las paredes celulares de microorganismos contribuye a la actividad bactericida de los nanomateriales de plata.<sup>104,105</sup> Por esta razón, las NP core-shell SiO<sub>2</sub>@Ag-low son candidatos prometedores para la inactivación fotodinámica (PDI) de microorganismos. La fotoirradiación de la Riboflavina en suspensiones de nanopartículas debería liberar iones Ag<sup>+</sup>, incrementando el efecto bactericida intrínseco de los materiales no irradiados.

### 3.6 Referencias

1. Aslan, K. *et al.* Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 55–62 (2005).
2. Pacioni, N. L. *et al.* Surface plasmons control the dynamics of excited triplet states in the presence of gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6298–9 (2010).
3. Morton, S. M., Silverstein, D. W. & Jensen, L. Theoretical Studies of Plasmonics using Electronic Structure Methods. 3962–3994 (2011). doi:10.1021/cr100265f
4. Yang, W. *et al.* Aggregation-Induced Enhancement Effect of Gold Nanoparticles on Triplet Excited State. (2013). doi:10.1021/jp410369w
5. Planas, O., Macia, N., Agut, M., Nonell, S. & Heyne, B. Distance-dependent plasmon-enhanced singlet oxygen production and emission for bacterial inactivation. *J. Am. Chem. Soc.* (2016). doi:10.1021/jacs.5b12704
6. Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications. *Analytical Biochemistry* (2001). doi:10.1006/abio.2001.5377
7. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
8. Amos, R. & Barnes, W. Modification of the spontaneous emission rate of ions close to a thin metal mirror. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* (1997). doi:10.1103/PhysRevB.55.7249
9. Barnes, W. L. Fluorescence near interfaces: The role of photonic mode density. *J. Mod. Opt.* (1998). doi:10.1080/09500349808230614
10. Amos, R. M. & Barnes, W. L. Modification of spontaneous emission lifetimes in the presence of corrugated metallic surfaces. *Phys. Rev. B - Condens. Matter*

- Mater. Phys.* (1999). doi:10.1103/PhysRevB.59.7708
11. Drexhage, K. H. IV Interaction of Light with Monomolecular Dye Layers. *Prog. Opt.* (1974). doi:10.1016/S0079-6638(08)70266-X
  12. Das, P. & Metiu, H. Enhancement of molecular fluorescence and photochemistry by small metal particles. *J. Phys. Chem.* (1985). doi:10.1021/j100268a007
  13. Gersten, J. & Nitzan, A. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *J. Chem. Phys.* (1981). doi:10.1063/1.442161
  14. Weitz, D. A., Garoff, S., Gersten, J. I. & Nitzan, A. The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface. *J. Chem. Phys.* (1983). doi:10.1063/1.445486
  15. Kummerlen, J., Leitner, A., Brunner, H., Aussenegg, F. R. & Wokaun, A. Enhanced dye fluorescence over silver island films: Analysis of the distance dependence. *Mol. Phys.* (1993). doi:10.1080/00268979300102851
  16. Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering 5: Metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Anal. Biochem.* (2005). doi:10.1016/j.ab.2004.11.026
  17. Rivas Aiello, M. B., Romero, J. J., Bertolotti, S. G., Gonzalez, M. C. & Mártire, D. O. Effect of silver nanoparticles on the photophysics of riboflavin: Consequences on the ROS generation. *J. Phys. Chem. C* **120**, (2016).
  18. Nanoparticles, P. S. *et al.* Photodynamic Therapy in HeLa Cells Incubated with Riboflavin and. 1–8 doi:10.1111/php.12974
  19. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. Introduction. in *Sol-Gel Science* (1990). doi:10.1016/b978-0-08-057103-4.50006-4
  20. Hench, L. L. & West, J. K. The Sol-Gel Process. *Chem. Rev.* (1990). doi:10.1021/cr00099a003
  21. Glezer, V. & Lev, O. Sol-Gel Vanadium Pentoxide Glucose Biosensor. *Journal of the American Chemical Society* (1993). doi:10.1021/ja00059a072
  22. Vaia, R. A., Ishii, H. & Giannelis, E. P. Synthesis and Properties of Two-Dimensional Nanostructures by Direct Intercalation of Polymer Melts in Layered Silicates. *Chem. Mater.* (1993). doi:10.1021/cm00036a004
  23. Graham, T. On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances. *J. Chem. Soc.* (1864). doi:10.1039/JS8641700318
  24. Diego Bracho García. Estudio del efecto del tamaño y Funcionalidad superficial de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> sobre las propiedades de nanocompuestos de polipropileno. (Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2013).
  25. Kobayashi, Y., Salgueiriño-Maceira, V. & Liz-Marzán, L. M. Deposition of silver nanoparticles on silica spheres by pretreatment steps in electroless plating. *Chem. Mater.* **13**, 1630–1633 (2001).
  26. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation

- of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, (1950).
27. Turro, N. J., Ramamurthy, V. & Scaiano, J. C. Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules. *Angew. Chemie Int. Ed.* (2010). doi:10.1002/anie.201003826
  28. McGilvray, K. L., Fasciani, C., Bueno-Alejo, C. J., Schwartz-Narbonne, R. & Scaiano, J. C. Photochemical strategies for the seed-mediated growth of gold and gold-silver nanoparticles. *Langmuir* **28**, 16148–16155 (2012).
  29. Jockusch, S., Landis, M. S., Freiermuth, B. & Turro, N. J. Photochemistry and photophysics of  $\alpha$ -hydroxy ketones. *Macromolecules* (2001). doi:10.1021/ma001836p
  30. Pardoe, A. *et al.* Tuning plasmon transitions and their applications in organic photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **83**, 913–930 (2011).
  31. Griller, D., Howard, J. A., Marriott, P. R. & Scaiano, J. C. Absolute Rate Constants for the Reactions of tert-Butoxyl, tert-Butylperoxyl, and Benzophenone Triplet with Amines: The Importance of a Stereoelectronic Effect. *J. Am. Chem. Soc.* (1981). doi:10.1021/ja00393a020
  32. Scaiano, J. C. Photochemical and free-radical processes in benzil-amine systems. Electron-donor properties of  $\alpha$ -aminoalkyl radicals. *J. Phys. Chem.* (2005). doi:10.1021/j150619a031
  33. Marin, M. L., McGilvray, K. L. & Scaiano, J. C. Photochemical strategies for the synthesis of gold nanoparticles from Au(III) and Au(I) using photoinduced free radical generation. *J. Am. Chem. Soc.* (2008). doi:10.1021/ja803490n
  34. Scaiano, J. C. *et al.* Photochemical routes to silver and gold nanoparticles. *Pure Appl. Chem.* (2009). doi:10.1351/PAC-CON-08-09-11
  35. Scaiano, J. C., Aliaga, C., Maguire, S. & Wang, D. Magnetic field control of photoinduced silver nanoparticle formation. *J. Phys. Chem. B* (2006). doi:10.1021/jp061723t
  36. McGilvray, K. L., Decan, M. R., Wang, D. & Scaiano, J. C. Facile photochemical synthesis of unprotected aqueous gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* (2006). doi:10.1021/ja066522h
  37. Maretti, L., Billone, P. S., Liu, Y. & Scaiano, J. C. Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* (2009). doi:10.1021/ja900201k
  38. Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 4212–4217 (1999).
  39. Westcott, S. L., Oldenburg, S. J., Lee, T. R. & Halas, N. J. Formation and Adsorption of Clusters of Gold Nanoparticles onto Functionalized Silica Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* **14**, 5396–5401 (1998).
  40. Snellenburg, J. J., Laptanok, S. P., Seger, R., Mullen, K. M. & van Stokkum, I. H.

- M. Glotaran : A Java -Based Graphical User Interface for the R Package TIMP. *J. Stat. Softw.* **49**, (2012).
41. Tzounis, L. *et al.* Controlled growth of Ag nanoparticles decorated onto the surface of SiO<sub>2</sub> spheres: a nanohybrid system with combined SERS and catalytic properties. *RSC Adv.* **4**, 17846–17855 (2014).
  42. Merga, G., Wilson, R., Lynn, G., Milosavljevic, B. H. & Meisel, D. Redox catalysis on ‘naked’ silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 12220–12226 (2007).
  43. Einstein, A. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Ann. Phys.* (1905). doi:10.1002/andp.19053220607
  44. Himpsel, F. J., McFeely, F. R., Taleb-Ibrahimi, A., Yarmoff, J. A. & Hollinger, G. Microscopic structure of the SiO<sub>2</sub>/Si interface. *Phys. Rev. B* **38**, 6084–6096 (1988).
  45. Öneby, C. & Pantano, C. G. Silicon oxycarbide formation on SiC surfaces and at the SiC/SiO<sub>2</sub> interface. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **15**, 1597–1602 (1997).
  46. Aminuzzaman, M., Watanabe, A. & Miyashita, T. Photochemical surface modification and characterization of double-decker-shaped polysilsesquioxane hybrid thin films. *J. Mater. Chem.* **18**, 5092 (2008).
  47. Shen, T. D. *et al.* Photoluminescence from mechanically milled Si and SiO<sub>2</sub> powders. *Phys. Rev. B* **55**, 7615–7623 (1997).
  48. Zatsopin, D. A., Zatsopin, A. F., Boukhvalov, D. W., Kurmaev, E. Z. & Gavrilov, N. V. Sn-loss effect in a Sn-implanted a-SiO<sub>2</sub> host-matrix after thermal annealing: A combined XPS, PL, and DFT study. *Appl. Surf. Sci.* **367**, 320–326 (2016).
  49. Kwoka, M. *et al.* XPS study of the surface chemistry of L-CVD SnO<sub>2</sub> thin films after oxidation. *Thin Solid Films* **490**, 36–42 (2005).
  50. Zhang, B., Liu, H., Huang, X., Dong, C. & Ren, J. Size Distribution of Nanoparticles in Solution Characterized by Combining Resonance Light Scattering Correlation Spectroscopy with the Maximum Entropy Method. *Anal. Chem.* **89**, 12609–12616 (2017).
  51. Gun’ko, V. M. *et al.* Interfacial phenomena at a surface of individual and complex fumed nanooxides. *Adv. Colloid Interface Sci.* **235**, 108–189 (2016).
  52. Gao, S. *et al.* Near-infrared fluorescence imaging of cancer cells and tumors through specific biosynthesis of silver nanoclusters. *Sci. Rep.* **4**, 1–6 (2014).
  53. Islam, M. S., Choi, W. S. & Lee, H. J. Controlled etching of internal and external structures of SiO<sub>2</sub> nanoparticles using hydrogen bond of polyelectrolytes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2014). doi:10.1021/am501941c
  54. Armelao, L. *et al.* Introduction to XPS Studies of Metal and Metal-oxide Nanosystems. *Surf. Sci. Spectra* (2003). doi:10.1116/11.20050199

55. Greczynski, G. & Hultman, L. C 1s Peak of Adventitious Carbon Aligns to the Vacuum Level: Dire Consequences for Material's Bonding Assignment by Photoelectron Spectroscopy. *ChemPhysChem* (2017). doi:10.1002/cphc.201700126
56. Zhang, C. *et al.* The removal of heavy metal ions from aqueous solutions by amine functionalized cellulose pretreated with microwave-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *RSC Adv.* (2017). doi:10.1039/c7ra03056h
57. Kim, Y. H. *et al.* Polyethylene imine as an ideal interlayer for highly efficient inverted polymer light-emitting diodes. *Adv. Funct. Mater.* (2014). doi:10.1002/adfm.201304163
58. He, H. *et al.* The oxidation of viscose fiber optimized by response surface methodology and its further amination with PEI for CO<sub>2</sub> adsorption. *Cellulose* (2016). doi:10.1007/s10570-016-0955-5
59. Thermo Scientific. XPS Simplified. Available at: <https://xpssimplified.com/elements/gold.php>. (Accessed: 7th March 2020)
60. Arrii, S., Morfin, F., Renouprez, A. J. & Rousset, J. L. Oxidation of CO on Gold Supported Catalysts Prepared by Laser Vaporization: Direct Evidence of Support Contribution. *J. Am. Chem. Soc.* (2004). doi:10.1021/ja036352y
61. Smolentseva, E. *et al.* Influence of Fe introduction method on gold state in NaY zeolite. in *International Journal of Modern Physics B* (2005). doi:10.1142/S0217979205031213
62. Gogurla, N. *et al.* Transparent and flexible resistive switching memory devices with a very high ON/OFF ratio using gold nanoparticles embedded in a silk protein matrix. *Nanotechnology* (2013). doi:10.1088/0957-4484/24/34/345202
63. von Smoluchowski, M. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Ann. Phys.* (1906). doi:10.1002/andp.19063261405
64. Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* (1972). doi:10.1103/PhysRevLett.29.705
65. Elson, E. L. & Magde, D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* (1974). doi:10.1002/bip.1974.360130102
66. Aragón, S. R. & Pecora, R. Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion. *Biopolymers* (1975). doi:10.1002/bip.1975.360140110
67. Rigler, R., Mets, U., Widengren, J. & Kask, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.* (1993). doi:10.1007/BF00185777
68. Estrada, L. C., Aramendía, P. F. & Martínez, O. E. 10000 times volume reduction for fluorescence correlation spectroscopy using nano-antennas. *Opt. Express* (2008). doi:10.1364/oe.16.020597

69. Ly, N. H. *et al.* Spectroscopic measurements of interactions between hydrophobic 1-pyrenebutyric acid and silver colloidal nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **518**, 295–303 (2017).
70. Chen, X., Hu, Y., Gao, J., Zhang, Y. & Li, S. Interaction of melamine molecules with silver nanoparticles explored by surface-enhanced raman scattering and density functional theory calculations. *Appl. Spectrosc.* **67**, 491–497 (2013).
71. Nardo, V. M. *et al.* SERS and DFT study of indigo adsorbed on silver nanostructured surface. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **205**, 465–469 (2018).
72. Ricci, M., Platania, E., Lofrumento, C., Castellucci, E. M. & Becucci, M. Resonance Raman Spectra of o-Safranin Dye, Free and Adsorbed on Silver Nanoparticles: Experiment and Density Functional Theory Calculation. *J. Phys. Chem. A* **120**, 5307–5314 (2016).
73. Cañamares, M. V. & Lombardi, J. R. Raman, SERS, and DFT of Mauve Dye: Adsorption on Ag Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14297–14303 (2015).
74. Yao, Y. *et al.* Highly reproducible and sensitive silver nanorod array for the rapid detection of Allura Red in candy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **195**, 165–171 (2018).
75. Laban, B. *et al.* Mechanism of 3,3'-Disulfopropyl-5,5'-Dichlorothiacyanine Anion Interaction with Citrate-Capped Silver Nanoparticles: Adsorption and J-Aggregation. *J. Phys. Chem. C* **120**, 18066–18074 (2016).
76. Kubheka, G., Uddin, I., Amuhaya, E., Mack, J. & Nyokong, T. Synthesis and photophysicochemical properties of BODIPY dye functionalized gold nanorods for use in antimicrobial photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **20**, 1016–1024 (2016).
77. Hauptmann, N., Hamann, C., Tang, H. & Berndt, R. Soft-landing electrospray deposition of the ruthenium dye N3 on Au(111). *J. Phys. Chem. C* **117**, 9734–9738 (2013).
78. Mantel, A. *et al.* Perylene Derivative Dyes Luminescence in Polysiloxane Matrix in Presence of Gold Nanoparticles. *J. Fluoresc.* **26**, 2213–2223 (2016).
79. Benesi, H. A. & Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* (1949). doi:10.1021/ja01176a030
80. Qureshi, P. M., Varshney, R. K. & Singh, S. B. Evaluation of  $\epsilon$  for p-dinitrobenzene-aniline complexes by the Scott equation. Failure of the Benesi-Hildebrand equation. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* (1994). doi:10.1016/0584-8539(94)80184-3
81. Alarcón, E., Aspée, A., Abuin, E. B. & Lissi, E. A. Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2012). doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.11.002

82. Davis, K. M. C. & Farmer, M. F. Charge-transfer complexes. Part II. Complex formation between halogenomethanes and aromatic amines. *J. Chem. Soc. B Phys. Org.* (1967). doi:10.1039/J29670000028
83. Doktorovova, S. *et al.* Modified Rose Bengal assay for surface hydrophobicity evaluation of cationic solid lipid nanoparticles (cSLN). *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 606–612 (2012).
84. Rauf, M. A., Graham, J. P., Bukallah, S. B. & Al-Saedi, M. A. S. Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **72**, 133–137 (2009).
85. Norrish, R. G. W. & Porter, G. Chemical reactions produced by very high light intensities [1]. *Nature* (1949). doi:10.1038/164658a0
86. Snellenburg, J. J., Laptенок, S., Seger, R., Mullen, K. M. & van Stokkum, I. H. M. Glotaran: A Java-based graphical user interface for the R package TIMP. *J. Stat. Softw.* (2012). doi:10.18637/jss.v049.i03
87. Li, H., Melø, T. B. & Razi Naqvi, K. Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **106**, 34–39 (2012).
88. Rauf, M. A., Graham, J. P., Bukallah, S. B. & Al-Saedi, M. A. S. Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* (2009). doi:10.1016/j.saa.2008.08.018
89. Ludvíková, L. *et al.* Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: A comprehensive kinetic analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016). doi:10.1039/c6cp01710j
90. Ludvíková, L. *et al.* Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: a comprehensive kinetic analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 16266–16273 (2016).
91. Lambert, C., Sarna, T. & Truscott, T. G. Rose bengal radicals and their reactivity. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86**, 3879–3882 (1990).
92. Edition, T. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.*
93. Lee, P. C. C. & Rodgers, M. A. J. Laser Flash Photokinetic Studies of Rose Bengal Sensitized Photodynamic Interactions of Nucleotides and Dna. *Photochem. Photobiol.* **45**, 79–86 (1987).
94. Tan, S. L. J. & Webster, R. D. Electrochemically Induced Chemically Reversible Proton-Coupled Electron Transfer Reactions of Riboflavin ( Vitamin B 2 ). (2012). doi:10.1021/ja300191u
95. Mao, G. D., Thomas, P. D. & Poznansky, M. J. Oxidation of spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide in an electron paramagnetic resonance study of

- the reaction of methemoglobin with hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* (1994). doi:10.1016/0891-5849(94)90127-9
96. Bilski, P., Reszka, K., Bilska, M. & Chignell, C. F. Oxidation of the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide by singlet oxygen in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* (1996). doi:10.1021/ja952140s
  97. Partha Pratim Chowdhury. Diagnostics and selective nano-therapeutics to combat multidrug-resistant bacteria. (University of Colorado Boulder, 2014).
  98. Mojović, M., Spasojević, I., Vuletić, M., Vučinić, Ž. & Bačić, G. An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *J. Serbian Chem. Soc.* (2005). doi:10.2298/JSC0502177M
  99. Spin Trap Database, National Institute of Environmental Health Science. Available at: <https://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm/spintrap/>. (Accessed: 7th March 2020)
  100. Fontmorin, J. M., Burgos Castillo, R. C., Tang, W. Z. & Sillanpää, M. Stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide as a spin-trap for quantification of hydroxyl radicals in processes based on Fenton reaction. *Water Res.* (2016). doi:10.1016/j.watres.2016.04.053
  101. Rivas Aiello, M. B., Romero, J. J., Bertolotti, S. G., Gonzalez, M. C. & Mártire, D. O. Effect of silver nanoparticles on the photophysics of riboflavin: Consequences on the ROS generation. *J. Phys. Chem. C* (2016). doi:10.1021/acs.jpcc.6b06385
  102. Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S. & Shibata, T. Formation of a hydroxyl radical from riboflavin sodium phosphate by photo-illumination. *Chem. Pharm. Bull.* (1997). doi:10.1248/cpb.45.2107
  103. Feix, J. B. & Kalyanaraman, B. Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: Analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection. *Arch. Biochem. Biophys.* (1991). doi:10.1016/0003-9861(91)90103-P
  104. Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H. L., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. J. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. 10–14 (2012). doi:10.1021/nl301934w
  105. Richter, A. P. *et al.* nanoparticle based on a silver-infused lignin core. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 817–823 (2015).



---

## Capítulo 4

# ***NANOPARTÍCULAS DE SÍLICE CON REVESTIMIENTO DE METALES NOBLES: SÍNTESIS CAPA POR CAPA***



## 4.1 Introducción

### 4.1.1 Desventajas de la utilización de las Terapias Fotodinámicas y Fototérmicas convencionales.

Como hemos mencionado anteriormente, se han desarrollado numerosas estrategias para matar células cancerígenas, entre las cuales nos hemos centrado, en esta tesis, en la terapia fotodinámica (PDT) y la terapia fototérmica (PTT).

Sin embargo, vale aclarar que, como todas las terapias, estas también presentan ciertas desventajas. La principal debilidad de las fototerapias es que la luz debe penetrar a través del tejido para excitar a los sensibilizadores. En el mejor de los casos, la luz solo atraviesa cerca de 1 cm del tejido, por lo tanto, la PDT y PTT solo son viables para la destrucción de células dentro o cerca de tejidos accesibles a una iluminación superficial, o vía dispositivos de fibra óptica transportados a través de agujas dentro de tejidos profundos. El rango óptimo de longitudes de onda para la excitación de los fotosensibilizadores en PDT es de aproximadamente 750 hasta alrededor de 850 nm. El tejido es relativamente opaco a la luz de  $\lambda < 750$  nm, mientras que a longitudes de onda mayores es más transparente (la penetración de la luz de 800 nm de longitud de onda es el doble que el de la luz de 630 nm). Las mayores limitaciones de los sensibilizadores hidrofílicos utilizados en PDT son: (i) la baja absorbancia en el rango de 750 - 850 nm combinada con (ii) la baja eficiencia de generación de oxígeno singlete por excitación en este rango de longitudes de onda. Esta afirmación se basa en la publicación de los sensibilizadores para PDT que están aprobados por la FDA (cinco en total, porfímero de sodio, ALA, MAL, HAL, y BPD-MA) todos los cuales tienen el máximo de absorción en longitudes de onda por debajo del rango de 750-850 nm.

Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos sistemas transportadores de drogas (PS) que aumenten la selectividad del tratamiento y reduzcan los efectos secundarios de la PDT.

La terapia fototérmica (PTT) es otro tratamiento utilizado contra el cáncer cuyos efectos secundarios son prácticamente despreciables. Sin embargo, solo se puede atacar al tumor en la zona irradiada por el láser y no es posible eliminar el tumor de todo el cuerpo.<sup>1,2,3</sup>

Debido a los inconvenientes recientemente mencionados que presentan ambas terapias, entendemos que, tanto la PDT como la PTT no son, generalmente, suficientes para lograr una terapia altamente eficiente contra el cáncer cuando se aplican individualmente. Por lo tanto, es necesario integrar la PDT y la PTT dentro de una misma plataforma para obtener una terapia combinada, la cual se espera que mejore significativamente la eficiencia terapéutica contra el cáncer.<sup>4</sup>

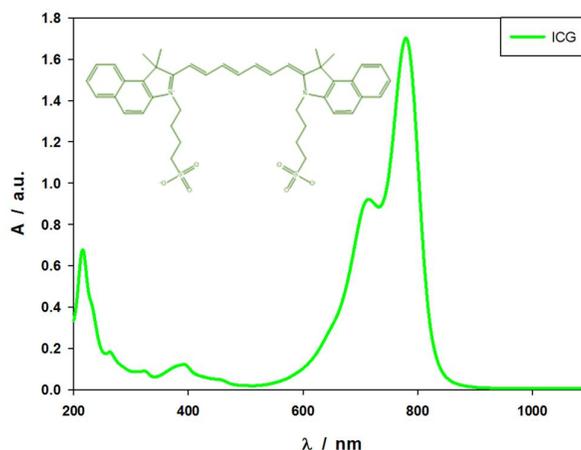
Las nanopartículas híbridas inorgánicas han emergido en los últimos años para diferentes aplicaciones biomédicas, tales como tratamiento de enfermedades<sup>5,6,7</sup>, delivery de drogas<sup>8,9,10</sup>, diagnóstico por imágenes<sup>11,12,13</sup>, y transfección génica.<sup>14,15</sup> En particular, el desarrollo de nanoplataformas de alta eficiencia para terapias contra el cáncer es de gran interés.

#### 4.1.2 Indocianina Verde (ICG)

La indocianina verde (ICG, del inglés: Indocyanine green), es ampliamente utilizada como colorante y fotosensibilizador del infrarrojo cercano (NIR, del inglés: Near-Infrared), el cual está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés: Food and Drug Administration) de los Estados Unidos para aplicaciones clínicas.<sup>16,17</sup> Este colorante es también utilizado como agente de contraste para la determinación del gasto cardíaco, función del hígado, volumen de plasma, y aplicaciones clínicas como angiografías oftálmicas.<sup>18,19</sup> Dado que la ICG se excita al ser irradiada con luz NIR que posee una mayor penetración en el tejido y una menor interferencia de fondo de fluorescencia<sup>20</sup> puede, por absorción de radiación en esta zona del espectro, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) para terapia PDT o calor para PTT.<sup>21,17</sup>

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es la acumulación tumoral de la Indocianina verde, la cual ha sido discutida en numerosos artículos.<sup>22,23,24,25</sup> Onda y colaboradores reportaron que la retención intracelular de la ICG en células tumorales persistió por al menos 24 h, mientras que fue rápidamente eliminada en el tejido normal.<sup>26</sup> Este mismo estudio mostró que la distribución de la Indocianina Verde fue citoplasmática. De manera similar, Abels y colaboradores detectaron la localización citoplasmática de este colorante en células de la piel utilizando microscopía de fluorescencia.<sup>27</sup> También se observaron algunos cambios tales como, condensación de la cromatina en el núcleo, dilatación del retículo endoplasmático rugoso, en el complejo de Golgi, y otros, luego de la activación de la ICG con un diodo láser. Estos descubrimientos estructurales fueron interpretados por los autores como una prueba de los efectos fotoquímicos de la terapia basada en la Indocianina Verde.

La ICG ha ganado un gran atractivo en el último tiempo por sus excelentes propiedades. Varios nanotransportadores cargados con ICG han sido diseñados para imágenes y terapias de tumores.<sup>21,28,17</sup> Sin embargo, la inestabilidad en solución acuosa y el fotoblanqueamiento de la ICG limitan sus aplicaciones.<sup>29</sup> Es por esta razón que deben proponerse nuevas estrategias para aumentar la estabilidad y permitir una distribución más efectiva de la ICG.



**Figura 1.** Espectro absorción UV-visible del ICG. En la parte superior izquierda del gráfico se observa la estructura molecular del colorante.

### 4.1.3 Nanomateriales de oro

En los últimos años, los nanomateriales de oro, principalmente las nanopartículas de oro (NPs Au), han sido empleadas activamente en aplicaciones biomédicas. Es de común acuerdo que las NPs Au son las nanopartículas metálicas más estables y pueden ser fácilmente sintetizadas con diferentes formas.<sup>30</sup> Además, las NPs Au tiene propiedades ópticas sintonizables, una química superficial flexible, y un amplio rango de posibilidades de funcionalización con anticuerpos, péptidos, y polímeros para aplicaciones en diferentes campos. Por otra parte, una de las principales ventajas de las NPs Au es la habilidad de convertir la luz o la radiofrecuencia en calor, debido al fenómeno de resonancia superficial del plasmón del oro, el cual habilita el uso de estas nanopartículas en terapias de ablación laser.<sup>31,32,33</sup>

Las NPs Au son utilizadas principalmente en el tratamiento térmico del cáncer, empleando ablación por radiofrecuencia o ablación fototérmica con láser. La diferencia entre la hipertermia convencional y la terapia fototérmica es que, durante el proceso de calentamiento fototérmico, el incremento de calor ocurre alrededor de las NPs de oro, provocando un aumento local de la temperatura de decenas o cientos de grados por encima de la temperatura fisiológica.<sup>34</sup>

El tamaño de las nanopartículas de oro utilizadas en ablación térmica varía entre 5–40 nm, dependiendo del tipo de ablación y de la línea celular. Para la terapia térmica del cáncer son preferibles NPs Au pequeñas ya que absorben más luz, y además, tienen mayor relación área/volumen, lo cual ofrece más oportunidades a los elementos biológicos o proteínas de pegarse a la superficie de las partículas.<sup>31</sup> Finalmente, las nanopartículas pequeñas pueden ser fácilmente removidas del sistema circulatorio

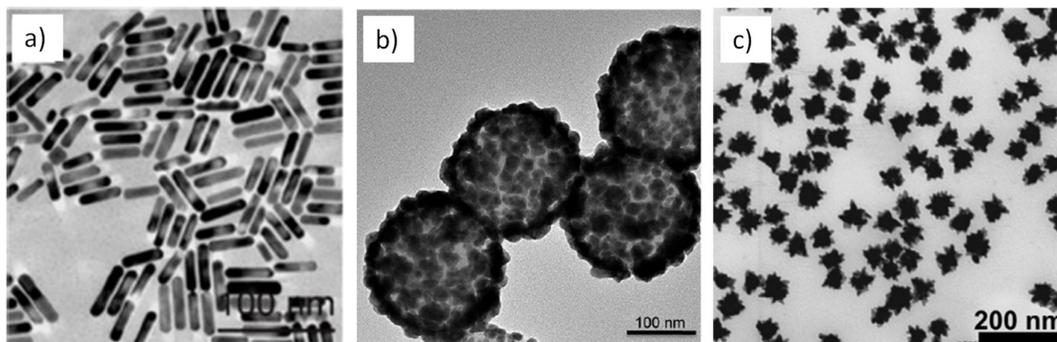
humano. La forma, el tipo celular, y la cobertura superficial, junto con el tamaño, son parámetros vitales para la destrucción de células cancerígenas cuando se emplean nanopartículas de Au.

La posibilidad de funcionalizar la superficie del oro permite diferenciar entre células cancerígenas y sanas para poder dirigir específicamente las NPs Au a la región del tumor deseada. Es decir, el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas de oro es importante para hacer a las partículas selectivas a un cáncer específico, y efectivas en el tratamiento térmico.

Existen diferentes diseños de nanomateriales de oro, las cuales presentan diferentes propiedades dependiendo de la forma y el tamaño:

#### 4.1.3.1 Nanovarillas de Au

Las nanovarillas de oro (ver Figura 2) son la única clase de nanoestructura metálica con dos bandas de absorción superficial del plasmón, una de longitud de onda corta y otra de longitud de onda larga. La fuerte banda de longitud de onda larga cae en la región NIR debido a la oscilación longitudinal de los electrones de conducción, y la banda de longitud de onda corta esta alrededor de los 520 nm debida a la oscilación transversal de los electrones. El campo eléctrico superficial resulta aumentado debido a la excitación superficial del plasmón, la cual facilita la fuerte absorción y dispersión de la radiación electromagnética por parte de las nanovarillas de oro. Estas nanoestructuras pueden ser utilizadas en biomedicina ya que, sus propiedades ópticas de absorción y dispersión pueden ser selectivamente ajustadas.<sup>35,36</sup> Las nanovarillas de oro han ganado una gran atención en la terapia fototérmica debido a la posibilidad de sintetizarlas con varias relaciones de aspecto, lo cual permite una absorción selectiva en la región NIR.<sup>37,38</sup>



**Figura 2.** Imágenes obtenidas a través de un microscopio electrónico de transmisión de diferentes tipos de nanomateriales de oro utilizadas en PTT: nanovarillas a), nanoshells b), y nanoestrellas c).

#### 4.1.3.2 Nanoshells

Los nanoshells (nanocoberturas o nanocáscaras) son una clase de nanopartícula con una fina cobertura que va de 1–20 nm sobre un núcleo que puede ser fabricado de un

material diferente. Las propiedades de los nanoshells pueden ser ajustadas variando la relación núcleo/cobertura<sup>39,40</sup>. Cambiando el espesor del núcleo y la cobertura, los nanoshells pueden ser producidos para tener propiedades de absorción y dispersión en la longitud de onda deseada a lo largo de la región visible y NIR del espectro electromagnético.<sup>41</sup> Dado que absorben en el NIR, los nanoshells son muy robustos ópticamente; su estructura rígida y su superficie de metal noble les confiere una estabilidad frente a la desnaturalización química y térmica, y al efecto de fotoblanqueo que los colorantes NIR convencionales no tienen.<sup>39</sup> Los nanoshells pueden acumularse en el área del tumor, absorber luz NIR, y producir calor localizado para destruir células cancerígenas.<sup>34</sup>

La composición del tipo de nanoshell más común es sílice-oro. El tamaño frecuentemente utilizado para estas nanopartículas es 100–150 nm para el núcleo y 8–10 nm para el recubrimiento. El tamaño de los nanoshells se basa en la habilidad de absorber luz en la primera y segunda ventana NIR. En estas zonas, la luz puede penetrar el tejido normal y alcanzar a los nanoshells unidos al tumor.<sup>42</sup> Estudios demuestran que la longitud de onda utilizada principalmente es 800 nm, porque en esta ventana NIR, la luz puede penetrar el tejido de manera segura.<sup>39,41,42,43</sup>

#### 4.1.3.3 Au Nanoestrellas

Las nanoestrellas de oro (AuNS, del inglés: Au NanoStar) son particularmente interesantes debido a que sus propiedades intrínsecas resultan de la hibridación del plasmón localizado del núcleo con los de las puntas de las nanopartículas. El núcleo actúa como una antena, produciendo incrementos en el campo electromagnético de los plasmones de las puntas.<sup>44,45,46</sup> La morfología de los picos (longitud y ángulo de apertura) y el número de estos tienen también un fuerte efecto sobre la frecuencia e intensidad del plasmón. Recientemente se han reportado numerosos métodos de síntesis de nanopartículas de oro ramificadas con diferentes tamaños y número de puntas.<sup>44,46,47</sup> Adicionalmente, se ha demostrado que este tipo de nanoestructuras exhibe una fuerte actividad de la dispersión Raman incrementada por superficie (SERS).<sup>47,48</sup>

#### 4.1.4 Eficiencia de conversión fototérmica ( $\eta$ )

La eficiencia de conversión (o transducción) fototérmica ( $\eta$ ) es la relación entre la absorción y la extinción y suele utilizarse para describir la eficiencia de conversión de luz en calor. Wang y colaboradores<sup>49</sup> reportaron un estudio sistemático para investigar la eficiencia de conversión fototérmica en nanovarillas de oro. La temperatura fue monitoreada insertando una termocupla en una dispersión acuosa de nanovarillas. Luego de ser irradiadas con un láser continuo (809 nm, 30 min) se observó un aumento de temperatura de 55–76 °C cuando la LSPR estaba localizada en 810 nm y por lo tanto

resonante con la longitud de onda del láser. La temperatura aumentó 5 °C menos cuando el LSPR de las nanovarillas estaba 50 nm corrido hacia el azul o el rojo respecto a la longitud de onda del láser y esto puede ser atribuido a la disminución en la extinción y la absorción en el NIR.<sup>49</sup>

Referencia	Forma de las NPs Au	Tamaño de las NPs (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ del LSPR (nm)	Láser	Eficiencia de conversión Fototérmica ( $\eta$ )
Richardson <sup>81</sup>	Nanoesferas	20		0,28 W, CW, 532 nm	97 – 103 %
Chen <sup>80</sup>	Nanovarillas	10 x 38	810	CW, 809 nm	95 %
Huang <sup>84</sup>	Nanocampanillas	145 x 123 x 10	800	1 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	74 %
Zeng <sup>85</sup>	Nanocajas	45 lado, 5 espesor pared	805 – 810	0,4 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	64 %
Ayala-Orozco <sup>90</sup>	Nanomatrioskas	88	783	CW, 2 W/cm <sup>2</sup> , 810 nm	63 %
Cole <sup>88</sup>	Nanoshells Au/Au <sub>2</sub> S	50	810	815 nm	59 %
Santos <sup>87</sup>	Nanodiscos porosos	400	1100	CW, 0,1 W/mm <sup>2</sup> , 700-900 nm	56 %
Cole <sup>88</sup>	Nanovarillas	13 x 44	780	815 nm	55 %
Chen <sup>80</sup>	Nanobipirámides	77 x 173	809	CW, 809 nm	51 %
Pattani <sup>89</sup>	Nanovarillas	7 x 26	770	2 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	50 %
Ayala-Orozco <sup>90</sup>	Nanoshells	152	796	CW, 2 W/cm <sup>2</sup> , 810 nm	39 %
Huang <sup>86</sup>	Vesículas de Au biodegradables	207	800	1 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	37 %
Cole <sup>88</sup>	Nanoshells SiO <sub>2</sub> /Au	154	815	815 nm	30 %
Zeng <sup>85</sup>	Hexapods	60	810	0,4 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	30 %
Pattani <sup>89</sup>	Nanoshells	145	780	2 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	25 %
Zeng <sup>85</sup>	Nanovarillas	17 x 56	810	0,4 W/cm <sup>2</sup> , 808 nm	25 %

**Tabla 1.** Eficiencias de Conversión Fototérmicas ( $\eta$ ) determinadas experimentalmente, encolumnadas de mayor a menor, para nanopartículas de diferentes formas y tamaños, excitadas en la zona cercana a la  $\lambda_{\text{máx}}$  del LSPR. Tabla tomada de la referencia <sup>50</sup>.

Los valores de  $\eta$  en la Tabla 1 no fueron calculados *in vitro* o *in vivo* (es decir, que no se midieron en cultivo celular ni en animales vivos), por lo cual es posible que la exposición a condiciones fisiológicas podría cambiar el estado de agregación y potencialmente el LSPR de las nanopartículas. Potencialmente, alguna de estas variaciones en los valores reportados, podrían deberse a diferentes condiciones de irradiación con el láser y de la dosis de nanopartículas. Sin embargo, salvo en el caso del volumen de las nanopartículas, no se observa una tendencia con la forma de las partículas. Es difícil comparar eficiencias entre diferentes estudios debido a las diferencias en las condiciones experimentales; por ende, no podemos sacar una conclusión definitiva sobre la forma óptima para el calentamiento. Debido a esta variación, se sugiere que sería más apropiado calcular/estimar la eficiencia de conversión fototérmica para una forma dada de nanopartícula en un ambiente fisiológico antes de considerar su aplicación en terapia fototérmica.

Es razonable pensar que un incremento en la concentración de nanomateriales de oro, por ejemplo, nanovarillas, debería resultar en una absorción de luz más fuerte y un calentamiento fototérmico mayor, pero hay un límite para este efecto en suspensión. Algunos investigadores han demostrado que el aumento en la densidad óptica de nanovarillas de oro puede disminuir la penetración de la luz, resultando en una profundidad más restringida para el calentamiento fototérmico.<sup>51</sup>

Las nanoestrellas de oro (AuNS) con una fuerte absorción en la región NIR del espectro<sup>52,53</sup> tienen una eficiencia de conversión fototérmica más alta que otras NPs de Au con formas particulares (por ej. nanovarillas de Au<sup>54</sup> y nanoshells de Au<sup>55</sup>). Por este motivo, las AuNS han sido ampliamente usadas en PTT para cáncer.<sup>53,56,57</sup>

Debido a la gran variedad en los métodos de distribución de nanopartículas, dosaje, y condiciones de irradiación en el tratamiento fototérmico, la respuesta celular a esta terapia también parece ser muy variada. Láseres de alta potencia y láseres pulsados parecieran desencadenar necrosis, mientras que láseres de baja potencia y láseres continuos provocan apoptosis.<sup>58,59</sup> El calentamiento con láser continuo resulta en apoptosis, el mismo mecanismo observado en la hipertermia tradicional. Esto es debido, potencialmente, a cambios similares en la temperatura cercana a las células cancerígenas, la cual puede ser influenciada por las condiciones de calentamiento. Sin embargo, la localización de las nanopartículas de oro en la superficie, en el citoplasma, o en el núcleo celular también influye en la terapia fototérmica.<sup>60,58</sup>

Por otra parte, se sabe que el tejido tumoral es más hipóxico, más ácido, y deficiente de nutrientes comparado con el tejido normal.<sup>61</sup> Estos rasgos pueden hacer que algunas células cancerígenas sean más sensibles al calor. Sin embargo, se ha observado en algunos tipos de cáncer la sobreexpresión de proteínas de choque térmico (HSP, del inglés: Heat Shock Proteins).<sup>62</sup> Estas proteínas podrían entonces hacer a las células más resistentes a las terapias basadas en calor, por lo que los efectos de la terapia térmica no son universales en todos los tipos de cáncer.<sup>63</sup>

Por todo lo expuesto hasta aquí, es difícil hacer predicciones sobre cuál será el efecto del tratamiento fototérmico sobre las células cancerígenas. Dependerá exclusivamente del tipo de nanopartícula utilizada, del método de incorporación y su localización intracelular, del sistema de irradiación, del tipo de tumor, entre otras variables.

#### **4.1.5 Últimos avances en PTT con nanopartícula de oro.**

Algunos investigadores también han explorado, *in vitro*, nanocompositos multifuncionales que contienen oro para impartir funcionalidad de imagen celular o diagnóstico además del tratamiento fototérmico. La terapia fototérmica *in vitro* ha progresado en muchas direcciones en los últimos años. Se han desarrollado

innovadores ligandos para las nanopartículas de oro para una direccionalidad celular más eficiente, y la terapia fototérmica ha sido combinada con imagen/diagnóstico celular,<sup>64,65,66,67</sup> quimioterapia,<sup>68,69,70</sup> y terapia fotodinámica<sup>71,72,73</sup> para lograr un tratamiento más efectivo contra el cáncer.

La terapia fototérmica contra el cáncer con nanopartículas de oro es deseable por varias razones. Primero, con los desarrollos en la síntesis, los científicos han sido capaces de escalar las preparaciones de nanopartículas de oro de varios tamaños y formas. La mayoría de estos procedimientos son en solución acuosa, por lo que la transferencia desde solventes orgánicos ya no es un problema.<sup>74,75</sup> Esto permite un rango de aplicaciones más amplio para las nanopartículas de oro. Segundo, comparado con otros metales, el oro es químicamente más inerte, haciendo que el núcleo de la nanopartícula sea biocompatible. Estudios de corto plazo de exposición de nanopartículas de oro a diferentes tipos celulares sugieren que no son citotóxicas ni inmunogénicas a concentraciones clínicamente relevantes.<sup>76,77</sup> Sin embargo, se han reportado cambios en la función celular dependientes de la química superficial, tales como la expresión génica<sup>78</sup> y la migración.<sup>79</sup> También se ha observado que ciertas moléculas utilizadas en la síntesis de las nanopartículas (ej: surfactantes) pueden ser citotóxicas.<sup>80</sup> Por lo tanto, el efecto del ligando superficial elegido sobre la viabilidad y el comportamiento celular es una consideración importante antes de la exposición biológica. Tercero, dado que es posible ajustar el tamaño, la forma y la química superficial de las nanopartículas de oro, es posible optimizarlas para obtener una máxima acumulación en el tumor *in vivo*.<sup>81</sup> Las nanopartículas con diámetros de 60–400 nm pueden extravasarse en los tumores sólidos debido a la permeabilidad de la vasculatura del tumor, provocando una forma pasiva de direccionamiento al tumor. Este es el efecto EPR mencionado anteriormente. Finalmente, como ya se mencionó, las nanopartículas de oro pueden ser diseñadas para ser direccionadas más activamente hacia el sitio del tumor a través de modificaciones en su química superficial. Una amplia colección de moléculas pequeñas, proteínas, y péptidos han sido desarrollados para unirse específicamente a receptores en las células tumorales con variación en el grado de acumulación en el tumor.<sup>82</sup> Los ligandos de direccionamiento pueden incluir anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas,<sup>83</sup> aptámeros de RNA/DNA que se pliegan en conformaciones 3D únicas a través de interacciones intermoleculares y se unen a moléculas específicas en la superficie celular,<sup>84,85</sup> o moléculas tales como folato para facilitar la traslocación dentro de las células cancerígenas que sobreexpresan receptores de folato vía endocitosis mediada por receptores.<sup>86</sup> Entonces, una vez que las nanopartículas de oro se unen o se acumulan en las células/tumor, la radiación NIR puede provocar el calentamiento fototérmico.<sup>87</sup> La LSPR de las nanopartículas y las condiciones de irradiación pueden ser diseñadas para maximizar la eficiencia de calentamiento.<sup>88</sup> Sin embargo, la terapia fototérmica también puede ser utilizada en conjunto con otros

tratamientos contra el cáncer, tales como la quimioterapia, para aumentar la destrucción del tumor.<sup>61</sup>

#### 4.1.6 Ensamblado por el método Capa por Capa (LbL, del inglés: Layer by Layer).

En los últimos años, la deposición de nanopartículas metálicas sobre superficies se ha incrementado debido al desarrollo de diferentes estrategias de ensamblado tales como la modificación de la superficie por la pre-adsorción de polielectrolitos,<sup>89</sup> comúnmente llamada técnica de deposición capa por capa, donde las interacciones electrostáticas son las fuerzas que gobiernan este proceso de ensamblado.

La fabricación por LbL es una herramienta poderosa que permite la construcción de materiales compuestos basados en polielectrolitos a través de ciclos iterativos de adsorción.<sup>90,91,92</sup> Esta naturaleza secuencial permite la incorporación de múltiples bloques de construcción funcionales cargados a lo largo de las capas, formando arreglos estructurales de manera muy controlada.<sup>91,93,94,95</sup>

La polialilamina (PAH) y el poliestireno sulfonato (PSS) son polielectrolitos ampliamente utilizados para la construcción de diferentes tipos de recubrimientos por ensamblado LbL.<sup>96,89</sup> En esta tesis, utilizaremos al PAH y PSS como nuestros bloques positivos y negativos, respectivamente, en el proceso de fabricación de nuestro material. El PAH también se utilizará para intercalar al ICG y permitir que se deposite sobre la superficie de la sílice. El hecho de que el ICG en solución tenga carga negativa, y que las AuNS tengan un potencial- $\zeta$  negativo (dependiendo del recubrimiento), hace posible utilizar este método de ensamblado para incorporar estos componentes en nuestra nanopartícula. El ensamblado con AuNs por el método LbL crea una deposición uniforme en la capa de interés sin la formación de agregados polidispersos, permitiendo, en conjunto, la fabricación controlada de nanoestructuras de AuNS reproducibles. La Figura 3 muestra un esquema representativo del proceso de autoensamblado LbL para la obtención de las nanopartículas SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS.

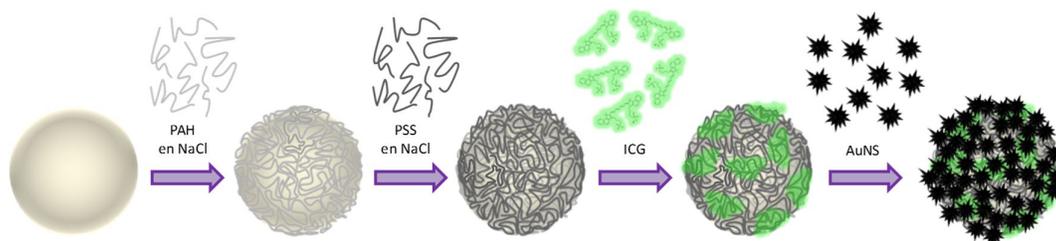


Figura 3. Esquema del ensamblado LbL de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS.

## 4.2 Objetivos

- (1) Sintetizar y caracterizar nanopartículas híbridas de sílice y nanoestrellas de oro, cargadas con el colorante Indocianina Verde, por el método de ensamblado capa por capa.
- (2) Obtener información cinética sobre la generación de especies reactivas de oxígeno y la producción de aumento de temperatura de suspensiones de las nanopartículas cargadas con la droga.
- (3) Investigar mediante microscopía confocal y espectroscopía de fluorescencia la localización celular de los nanomateriales.
- (4) Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas mediante ensayos de viabilidad celular MTT y Rojo Neutro.
- (4) Estudiar el efecto fotodinámico y fototérmico de los nanomateriales incubados en células tumorales, bajo irradiación con luz NIR durante diferentes tiempos.

## 4.3 Materiales y métodos

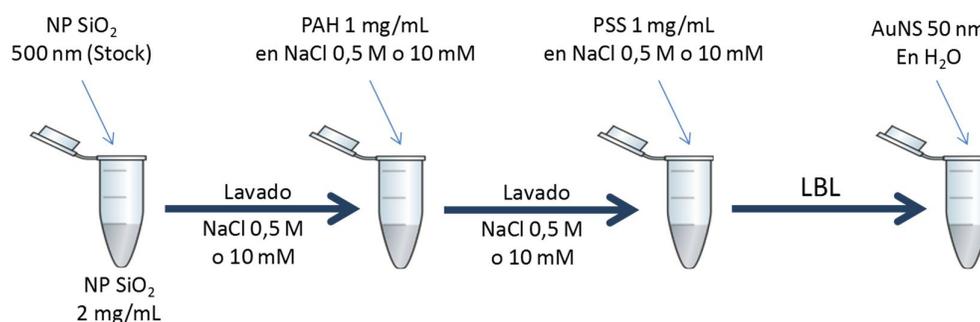
### 4.3.1 Reactivos

Nanopartículas de sílice de 500 nm de diámetro, hidrocloreto de polialilamina (PAH), poliestireno sulfonato (PSS), cloruro de sodio, indocianina verde (ICG), Rosa de Bengala, metanol, azida de sodio, alcohol furfurílico, sulfato de cobre, 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO, del inglés: 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) y 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP, del inglés: 2,2,6,6-tetramethylpiperidine) fueron comprados en Sigma Aldrich. Las nanoestrellas de oro (AuNS) recubiertas de PVP fueron aportadas por el grupo Bionanoplasmonics del CICbiomaGUNE (San Sebastián, España). La sonda de  $^1\text{O}_2$  Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) fue adquirida en ThermoFisher Scientific. El kit enzimático Colestat AA se compró a Wiener lab. Para todas las soluciones se utilizó agua ultrapura.

### 4.3.2 Síntesis de nanopartículas $\text{SiO}_2@AuNS$

Inicialmente, para obtener una suspensión de NPs  $\text{SiO}_2$  en una solución de NaCl 0,5 M, se colocó una alícuota de stock de sílice (40  $\mu\text{L}$ , 50 mg/mL) en un Eppendorf que contenía la solución de la sal (960  $\mu\text{L}$ ), luego se centrifugó a 13.400 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las NPs (mediante sonicación y agitación con vórtex) en la solución de sal. Este procedimiento se repitió tres veces. La incorporación de capas

de polímeros se realizó resuspendiendo estas nanopartículas de sílice dentro de un Eppendorf que contenía en primer lugar solución del polielectrolito PAH (1 mL, 1 mg/mL en 0,5 M NaCl), seguido de agitación en shaker durante 15 minutos. Luego las partículas se lavaron tres veces con solución de NaCl 0,5 M por centrifugación como se mencionó anteriormente. Posteriormente las nanopartículas se resuspendieron en solución del segundo polielectrolito cargado negativamente, el PSS (1 mL, 1 mg/mL en 0,5 M), se agitó y luego se lavó de la misma manera que para el polielectrolito anterior. Esta secuencia se repitió siguiendo el orden: PAH/PSS/PAH, y así sucesivamente hasta alcanzar 11 capas de polielectrolitos, terminando con una capa de PAH para que interaccione con las AuNS ya que estas presentan carga negativa. 250  $\mu$ L de la suspensión de estas NPs se mezclaron con 300  $\mu$ L de suspensión acuosa de AuNS y se llevó a un volumen final de 2 mL con agua ultrapura. Se dejó a la suspensión bajo agitación magnética durante 1 h y luego se realizaron 3 lavados de la misma manera que en los casos anteriores, pero esta vez utilizando agua ultrapura, dado que las nanopartículas metálicas tienden a aglomerarse dependiendo la fuerza iónica del medio.

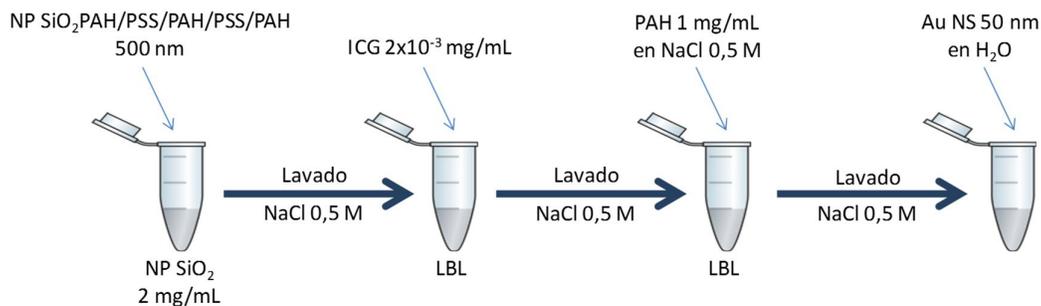


**Figura 4.** Esquema de los pasos realizados durante el ensamblado de las nanopartículas

### 4.3.3 Síntesis de nanopartículas SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS

Para obtener las nanopartículas cargadas con ICG se procedió de la misma manera que en el caso anterior hasta la quinta capa de polímero, quedando de esta manera el PAH como último polielectrolito sobre la superficie. A partir de esta instancia, el polielectrolito negativo (PSS) fue reemplazado por la ICG que también tiene carga negativa. Es decir, luego de agregar la tercera capa de PAH, las NPs se resuspendieron en 1 mL de solución de ICG 6,67  $\mu$ M y se agitaron durante 15 minutos. Luego las NPs se lavaron por centrifugación a 13.400 rpm durante 2 min, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo las partículas en solución de NaCl 0,5 M. Este procedimiento se repitió tres veces. A continuación, se procedió a colocar la siguiente capa de PAH, de la misma manera que se indicó en la sección 3.2.2. hasta obtener 11 capas finales, nuevamente terminando con el polielectrolito positivo para que pueda interactuar con las nanopartículas de oro.

Por último, 250  $\mu\text{L}$  de las nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  cargadas con la ICG se mezclaron con 300  $\mu\text{L}$  de suspensión acuosa de AuNS y se llevaron a un volumen final de 2 mL con agua ultrapura. Se dejaron en agitación magnética durante 1 h y se lavaron siguiendo el procedimiento explicado anteriormente, pero esta vez utilizando agua ultrapura.



**Figura 5.** Esquema de los pasos realizados durante el ensamblado LbL de las nanopartículas.

#### 4.3.4 Equipos y técnicas utilizadas

**4.3.4.1 Espectroscopía de absorción UV-visible.** Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz T90 + UV/Vis (PG Instruments Ltd.), con ancho de banda entre 0,2 y 4,0 nm según el ancho de rendija seleccionado y velocidad de barrido de 300 nm/min. Las muestras, de concentración 2 mg/mL, se colocaron en celdas de cuarzo Helma de 1,0 cm de camino óptico y 1 mL de volumen total.

**4.3.4.2 Espectroscopía de Fluorescencia.** Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con un fluorímetro HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11. Para las medidas en estado estacionario la longitud de onda de excitación fue 700 nm.

**4.3.4.3 Potencial  $\zeta$ .** Las medidas de potencial  $\zeta$  se llevaron a cabo con un equipo  $\zeta$ -Sizer Malvern Instrument. Todas las corridas se realizaron en modo automático con temperatura controlada a 25  $^\circ\text{C}$ . Se realizaron 3 medidas para cada muestra en cubetas de poliestireno con electrodos de oro, que contenían 1 mL de suspensión de concentración 2 mg/mL aproximadamente.

**4.3.4.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).** Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión fueron adquiridas utilizando un microscopio JEOL JEM 1010 operado con un voltaje de aceleración de 100 kV. Se usaron grillas con una malla de cobre de 400 huecos, recubierta por una capa de carbón. Se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de suspensión sin diluir de NPs  $\text{SiO}_2 @ \text{AuNS}$  y  $\text{SiO}_2 \text{-ICG} @ \text{AuNS}$  a la grilla y se incubaron por 1 min. El exceso de muestra se removió utilizando papel de filtro.

**4.3.4.5 Consumo de oxígeno.** Las medidas de O<sub>2</sub> disuelto se realizaron con un electrodo selectivo de O<sub>2</sub> multicanal, modelo Consort C932. 5 mL de muestra se colocaron en un tubo de ensayos de vidrio y se colocó el electrodo de manera que no quede aire por encima de la muestra, de manera de evitar la entrada de O<sub>2</sub> a la solución y alterar las medidas. Las muestras se irradiaron durante 45 min con un láser Ti: sapphire Chirped Pulse Amplification (CPA) de Spectral Physics (Mai-Tai Spitfire) de 800 nm.

**4.3.4.6 Generación de especies reactivas.** Para la determinación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se utilizó la sonda comercial SOSG<sup>®</sup>. Para ello, se resuspendió un vial del reactivo comercial (100 µg SOSG<sup>®</sup>) en 33 µL de metanol y se añadieron luego 297 µL de agua mQ. De esta solución madre se toman 3 µL por cada 1447 µL de muestra a determinar, de forma tal de tener una concentración 50 µM de la sonda. Luego se prepararon las siguientes mezclas: Blanco (3 µL de solución SOSG<sup>®</sup> + 1477 µL de agua), Muestra (3 µL de solución SOSG<sup>®</sup> + 1477 µL de suspensión de nanopartículas de absorbancia conocida y cercana a 0,5 a 800 nm), Referencia (3 µL de solución SOSG<sup>®</sup> + 1477 µL de una solución de un fotosensibilizador de absorción conocida a 800 nm, en nuestro caso se utilizó el mismo ICG). Cada mezcla se irradió con un láser Ti: sapphire Chirped Pulse Amplification (CPA) de Spectral Physics (Mai-Tai Spitfire) a 800 nm a diferentes tiempos (0, 15, 30 y 45 min). Se tomó luego el espectro de emisión con excitación a 505 nm.

La determinación de radical anión superóxido se realizó en forma indirecta midiendo la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras de reacción mediante un método enzimático colorimétrico empleando un kit comercial de Wiener para determinación de colesterol.<sup>97</sup> Se prepararon diluciones a partir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial dentro del rango de 100 y 600 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un volumen de 400 µL de las diferentes diluciones y de un blanco de agua destilada se mezclaron con 1,8 ml del reactivo comercial. Las diferentes diluciones y el blanco se incubaron durante 5 minutos a 37°C (o durante 30 minutos a temperatura ambiente). Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 505 nm. Se armó la curva de calibración y se procedió luego a la determinación de las muestras. Se determinaron muestras de ICG, NPs SiO<sub>2</sub>-ICG, NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS y NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS todas ajustadas a igual valor de absorbancia (0,5 a 800 nm). Las muestras se irradiaron saturadas en oxígeno durante 30 min con un láser de 800 nm. Luego se agregó un volumen de 400 µL de cada muestra sobre 1,8 ml del reactivo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de absorbancia a 505 nm y de la curva de calibración se obtuvieron los valores de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**4.3.4.7 Resonancia Paramagnética de electrones (EPR, del inglés: Electron Paramagnetic Resonance).** Las medidas fueron realizadas en un Espectrómetro de Resonancia Paramagnética Electrónica EPR Bruker Elexsys E500 banda X, operado en modo onda continua (CW, del inglés: continuous wave), y con muestras alojadas en tubos cilíndricos de cuarzo en cavidad estándar. Las concentraciones de DMPO y TMP utilizadas en los ensayos fueron 50 mM. Se colocaron 5 µL del colorante en 1mL de

volumen final ([ICG] = 6,67  $\mu$ M) y 1,995 mL de NPs en 1mL volumen final ([NP] = 0,125 mg/ml de SiO<sub>2</sub>) se irradiaron durante 40 min con un LED LIU780A (THORLABS) de 780 nm y 0,3 W de potencia.

**4.3.4.8 Eficiencia fototérmica.** Las suspensiones de las nanopartículas en agua pura (2 mL) se colocaron en vasos de precipitado de vidrio y se mantuvieron con agitación magnética mientras se irradiaron con pulsos de 170 fs de láser a una tasa de repetición de 1 kHz (800 nm, 600 mW) producida por un sistema Ti: sapphire Chirped Pulse Amplification (CPA) de Spectral Physics (Mai-Tai Spitfire). El rayo láser (tamaño del haz: 7 mm) se dirigió a la parte superior de los vasos colocados dentro de un recipiente de poliestireno para evitar la fuga de calor. La temperatura se midió utilizando un termómetro digital Lutron PH-206.

**4.3.4.9 Ensayo de internalización celular.** Para la determinación de la incorporación de los nanomateriales a las células utilizamos un Microscopio Confocal y la línea celular HepG2 de hígado. La concentración de NPs utilizadas en el medio de cultivo fue 0,2 mg/mL (todas respecto a la sílice) y se incubaron durante 1 h en oscuridad a 37°C en estufa. Se realizó una segunda medida de internalización celular utilizando un microscopio de epifluorescencia con módulo APTOME y la línea celular HepG2 de hígado.

**4.3.4.10 Ensayos de viabilidad celular.** Para determinar la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTT en células HEK293T. Se incubaron  $2,5 \times 10^4$  células por fosa en una placa de 96 fosas en un volumen final de 100  $\mu$ L. Solo se utilizaron las 8 calles centrales de la placa (64 fosas) ya que era la zona irradiada por el LED. Luego de 24 h de incubación a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> y humedad controlada, las células fueron incubadas durante 1 h con las nanopartículas a dos concentraciones diferentes: 0,025 mg/mL y 0,050 mg/mL (respecto a la concentración de SiO<sub>2</sub>). Luego cambiamos las células a medio fresco, utilizando suero DMEM F12 (sin rojo neutro y sin suero) de manera que no haya interferencias en la irradiación a 780 nm. La placa con las células y las nanopartículas incorporadas fue irradiada (destapada) durante 2 h con un LED de 780 nm y una potencia de 0,3 W ubicado a 20 cm de la placa. Pasado este tiempo se eliminó el medio y se agregó una dilución 1 en 10 del reactivo MTT y se dejó en estufa durante 3 h. Por último, se realizó la medida de absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placa.

## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Caracterización

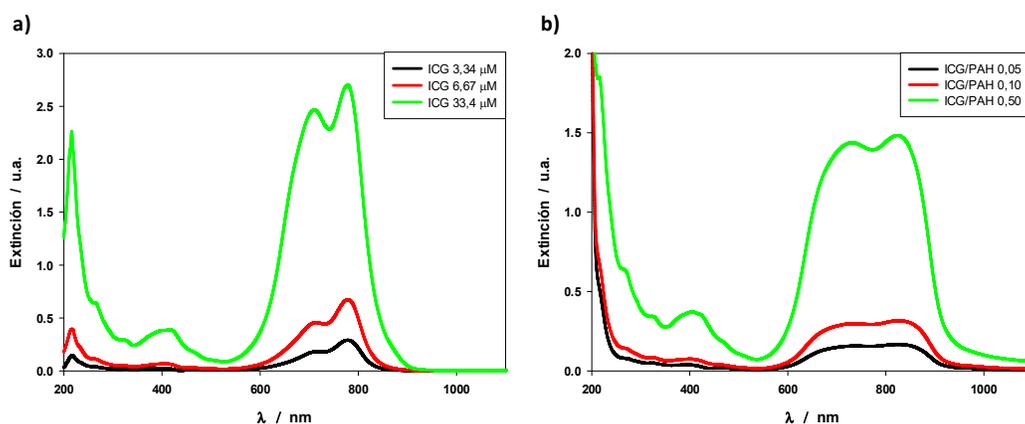
Al momento de planificar el diseño experimental del ensamblado, surgieron algunas cuestiones a resolver como, por ejemplo, la cantidad de droga a cargar, o de qué manera sería más conveniente introducir la ICG en las nanopartículas; es decir, si como solución

del colorante libre, o formando un complejo con el polielectrolito positivo (PAH) previamente formado. Para contestar estos interrogantes decidimos probar ambas posibilidades, utilizando distintas cantidades de ICG a una concentración fija de PAH.

En primer lugar, mezclamos la ICG con el PAH en diferentes relaciones molares (ICG/PAH 0,05; 0,10; y 0,50) y agitamos durante 15 minutos en un shaker para favorecer la formación del complejo ICG-PAH. Teniendo en cuenta que la concentración de la solución stock de PAH es 1 mg/mL (66,7  $\mu\text{M}$ ), la concentración resultante para la ICG en las distintas relaciones molares fueron 3,34  $\mu\text{M}$ , 6,67  $\mu\text{M}$  y 33,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estas mismas concentraciones se utilizaron para las soluciones de colorante libre.

#### 4.4.1.1 Determinación de la estrategia de ensamblado mediante Espectroscopía UV-visible y de Fluorescencia.

En primer lugar, para definir cuál de las opciones era más conveniente medimos los espectros UV-vis de los 2 juegos de soluciones: un juego conteniendo ICG libre en solución (Figura 6a) y otro con los complejos ICG-PAH (Figura 6b).

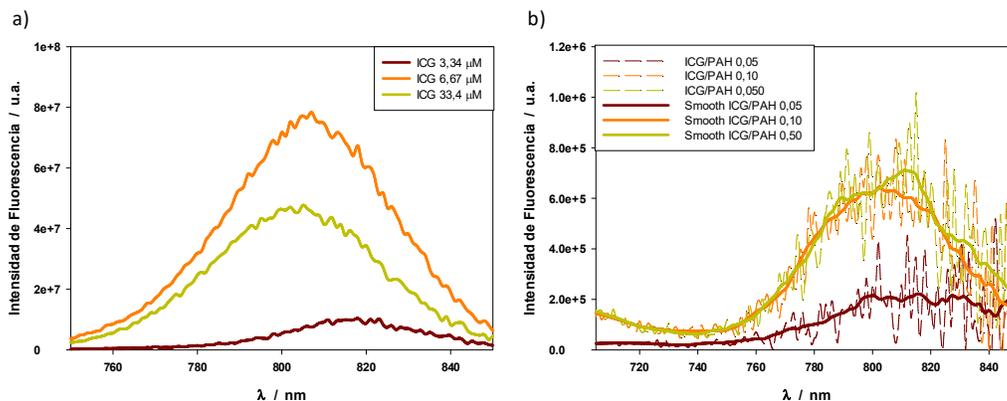


**Figura 6.** a) Espectros UV-visible de soluciones con diferentes concentraciones de ICG libre. b) Espectros UV-visible de soluciones de complejos ICG-PAH a diferentes relaciones molares.

Como podemos ver en la Figura 6a, las bandas de absorción del ICG son mucho más nítidas y angostas, además de ser más intensas, cuando el colorante se encuentra libre en solución en comparación con lo que se observa para el complejo ICG-PAH (Figura 6b). Esto nos estaría indicando una interacción entre el fotosensibilizador y el polielectrolito en el complejo, lo cual modifica su absorción de luz.

Para verificar si esta interacción tiene consecuencias en la fluorescencia del ICG, realizamos medidas de los espectros de emisión de los dos grupos de soluciones (Figura 7). En la Figura 7b podemos ver que la señal de emisión de los complejos ICG-PAH es muy ruidosa (es por eso que debimos suavizar los espectros para poder compararlos) y

de menor intensidad comparada con la fluorescencia de las soluciones de ICG libre (Figura 7a).



**Figura 7.** a) Espectros de fluorescencia de soluciones con diferentes concentraciones de ICG libre. b) Espectros de fluorescencia de soluciones de complejos ICG-PAH a diferentes relaciones molares.

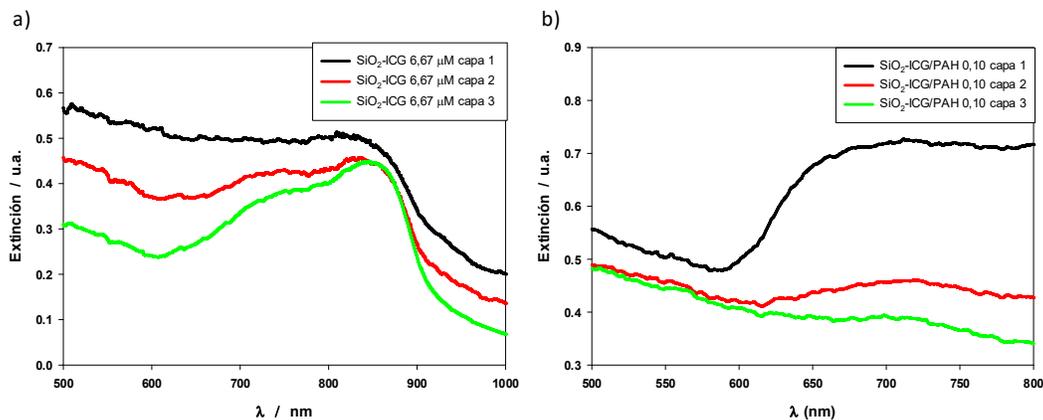
Esto puede deberse, posiblemente, a que el entorno polimérico de las moléculas de colorante ejerce cierto efecto de quenching sobre la fluorescencia de la ICG, lo cual es consistente con lo obtenido en los espectros de absorción. Además, observamos en la Figura 6a que la intensidad de emisión de la solución de ICG 6,67  $\mu\text{M}$  es mayor que la de la solución 33,4  $\mu\text{M}$ . Esto podría explicarse si consideramos que a 33,4  $\mu\text{M}$  habría moléculas de ICG interaccionando entre sí formando dímeros o trímeros no fluorescentes y que por ende disminuye la intensidad de emisión, cosa que no ocurre (o por lo menos no en la misma proporción) en las soluciones de menor concentración.

Con los resultados de la espectroscopía UV-visible y de Fluorescencia hemos establecido que la manera más conveniente de incorporar el colorante a las nanopartículas durante el ensamblado LbL es a partir de la solución de ICG libre, en lugar de hacerlo a través del complejo ICG-PAH, y que la cantidad de droga más adecuada para cargar al nanodispositivo es la solución de ICG 6,67  $\mu\text{M}$ , ya que es la que presenta una mayor intensidad de emisión.

Una vez definida la estrategia de incorporación del colorante a la nanopartícula, se procedió a realizar el ensamblado de los componentes para obtener nuestro dispositivo.

Posteriormente, corroboramos si la ICG se había incorporado al sistema. Para esto medimos el espectro UV-visible de las NPs durante las diferentes etapas de adsorción del colorante, y de los diferentes controles utilizados en los ensayos.

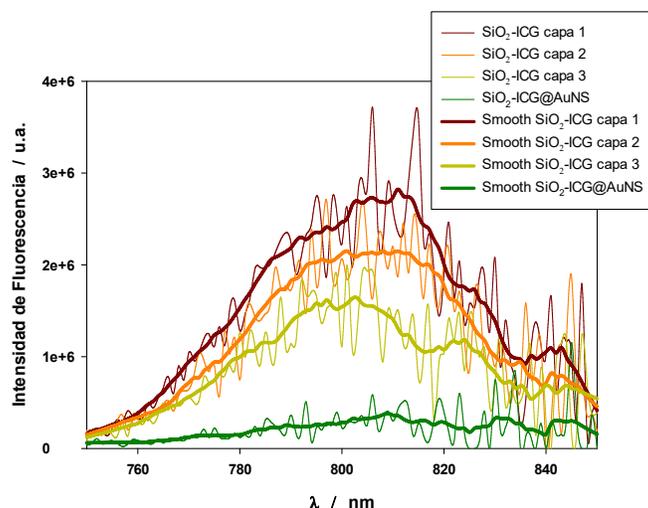
Como podemos observar en la Figura 8a, a medida que incorporamos capas de ICG a las NPs de  $\text{SiO}_2$  vemos cómo aumenta la intensidad y la forma del pico de absorción correspondiente al ICG, respecto a la señal de dispersión propia de las partículas de sílice.



**Figura 8.** a) Espectros de extinción de NPs SiO<sub>2</sub> con diferentes capas de ICG en solución 6,67 μM. b) Espectros de extinción de NPs SiO<sub>2</sub> con diferentes capas de los complejos ICG-PAH con la relación molar ICG/PAH 0,10.

Si bien vale destacar que la intensidad total (extinción) de las muestras disminuye a medida que aumenta el número de capas de colorante, esto se debe a que en cada paso de deposición del polielectrolito y/o la ICG, y posteriormente con cada lavado, se pierde material como consecuencia de la centrifugación y resuspensión de las nanopartículas. Es decir, la diferencia entre los espectros de las tres muestras es la cantidad de partículas que tiene cada suspensión, siendo la que tiene una capa de ICG la de mayor cantidad de NPs, la que tiene dos capas de ICG la que posee una cantidad intermedia, y la de tres capas de ICG la que tiene la menor cantidad de partículas. Sin embargo, la forma del pico a aproximadamente 800 nm (con su hombro característico a longitudes de onda menores que el máximo) y la intensidad del mismo nos está indicando que a medida que aumentamos el número de capas de ICG aumenta la cantidad del colorante dentro de las nanopartículas. Los espectros de la Figura 8b nos confirman que la mejor manera de incorporar el ICG a las esferas de sílice sin perder sus propiedades originales es mediante soluciones de fotosensibilizador libre, en lugar de hacerlo bajo la forma del complejo ICG-PAH.

Otra manera de comprobar si el ICG se cargó correctamente en nuestro nanodispositivo es midiendo los espectros de fluorescencia de las partículas para cada una de las etapas de ensamblado. Dado que cuando incorporamos la ICG a las nanopartículas lo hacemos mediante el método LbL, las moléculas del colorante quedan adsorbidas por interacción electrostática entre las capas del polielectrolito positivo (PAH), lo cual representa una situación similar a la que teníamos con el complejo ICG-PAH en solución. Por lo tanto, es de esperar que los espectros de emisión de las nanopartículas con las diferentes capas de ICG presenten señales ruidosas, tal y como lo vimos para el complejo en solución, y como podemos observar en la Figura 9.



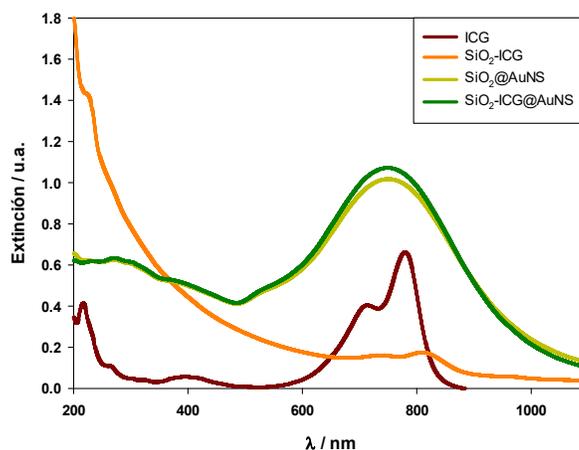
**Figura 9.** Espectros de emisión de las NPs durante el ensamblado de las capas de ICG y de las AuNS. Las líneas gruesas corresponden a los espectros suavizados de las NPs para poder apreciar la forma de las bandas de emisión.

Una vez que los espectros fueron suavizados, podemos ver que la intensidad de emisión también disminuye a medida que aumenta el número de capas del colorante. Esto se debe, de la misma manera que para el caso de los espectros de extinción, a que en las muestras tenemos una cantidad de partículas menor a medida que aumentan las capas de ICG debido a la pérdida de material que se produce durante el ensamblado y los sucesivos lavados.

Cuando agregamos las AuNS al sistema, vemos que la intensidad de fluorescencia de las partículas disminuye, ya que, posiblemente, las nanopartículas de oro estén desactivando la emisión del ICG. Sin embargo, la intensidad de emisión es considerada adecuada para mantener sus propiedades fotofísicas, lo cual veremos más adelante con otros ensayos (ver secciones 3.4.2, 3.4.3 y 3.4.4).

La Figura 10 muestra los espectros de extinción para nuestras partículas de interés ( $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$ ), y para los diferentes sistemas utilizados como controles para el estudio de sus propiedades ópticas.

Como podemos observar, las NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG}$  conservan la banda característica a 780 nm correspondiente al colorante (naranja). Las NPs  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$  muestran una banda de LSPR, perteneciente a las AuNS, muy ancha y que coincide con la posición de los picos de absorción del ICG (verde claro). Las NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  presentan un espectro muy similar al de las NPs  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$  (verde oscuro). Esto se debe a que la intensidad de extinción es tan alta para las nanopartículas de oro que apantalla totalmente la absorción del colorante, y por ese motivo no vemos la forma del pico a 780 nm.



**Figura 10.** Espectros de extinción de los diferentes tipos de NPs ensamblados para el estudio de sus propiedades ópticas.

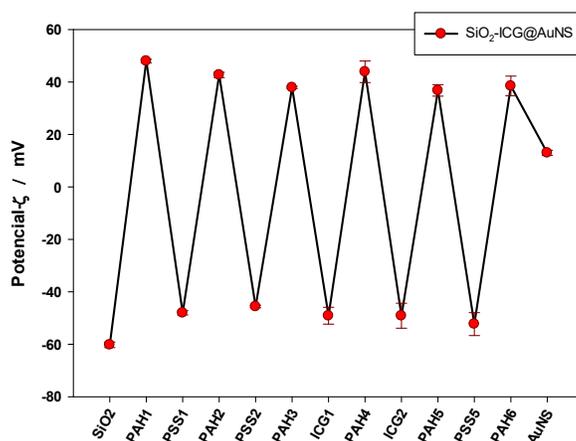
#### 4.4.1.2 Potencial- $\zeta$

Otra técnica de caracterización que utilizamos para hacer un seguimiento de nuestra estrategia de ensamblado y poder corroborar la correcta deposición de los diferentes componentes del sistema fue la medida del potencial  $\zeta$ .

Para la síntesis de nuestra nanopartícula partimos, en primera instancia, de  $\text{SiO}_2$  desnuda (sin ningún recubrimiento), la cual es de esperar que tenga potencial  $\zeta$  negativo debido a los grupos silanoles superficiales. En nuestro caso, el valor de potencial  $\zeta$  para la sílice fue  $-60,2$  mV (Tabla 2).

Como se mencionó anteriormente (secciones 3.2.2 y 3.2.3), en el ensamblado LbL se depositan polielectrolitos de carga opuesta, de manera alternada, hasta alcanzar un espesor determinado. A medida que incorporamos las capas del polielectrolito PAH vemos como el potencial  $\zeta$  pasa a valores positivos. Del mismo modo, al colocar las capas del polielectrolito PSS los valores de potencial  $\zeta$  se vuelven negativos. Este comportamiento se sigue manteniendo cuando, a partir de la sexta capa, reemplazamos al PSS por la droga ICG (ver Figura 11 y Tabla 2).

En la última capa, colocamos las nanoestrellas de oro (cuyo potencial  $\zeta$  es  $-22,7 \pm 0,4$  mV), esperando obtener un valor de potencial  $\zeta$  final negativo. Sin embargo, vemos que, si bien el valor del potencial  $\zeta$  disminuye, sigue siendo positivo.



**Figura 11.** Potencial  $\zeta$  de las NPs durante el ensamblado de cada una de las capas poliméricas. A partir de la sexta capa se reemplaza al PSS por ICG. La última capa corresponde al agregado de AuNS.

Esto podría deberse a que las AuNS no recubren completamente la superficie de las NPs de sílice, dejando zonas expuestas que contienen PAH, el cual tiene carga positiva. Dado que, el potencial zeta no es una medida directa de la carga superficial, sino que brinda un valor promedio de la distribución de cargas alrededor de una partícula, el valor +13,00 mV podría indicar un recubrimiento no homogéneo de la superficie de las nanopartículas.

Capa	Potencial $\zeta$ (mV)	Desviación Estándar (mV)
SiO <sub>2</sub>	-60,20	1,04
PAH-1	48,00	0,66
PSS-1	-48,00	0,80
PAH-2	42,70	1,01
PSS-2	-45,60	0,49
PAH-3	37,90	0,42
ICG-1	-49,10	3,21
PAH-4	43,90	4,10
ICG-2	-49,10	4,75
PAH-5	36,80	2,19
ICG-3	-52,30	4,36
PAH-5	38,50	3,75
AuNS	13,00	0,99

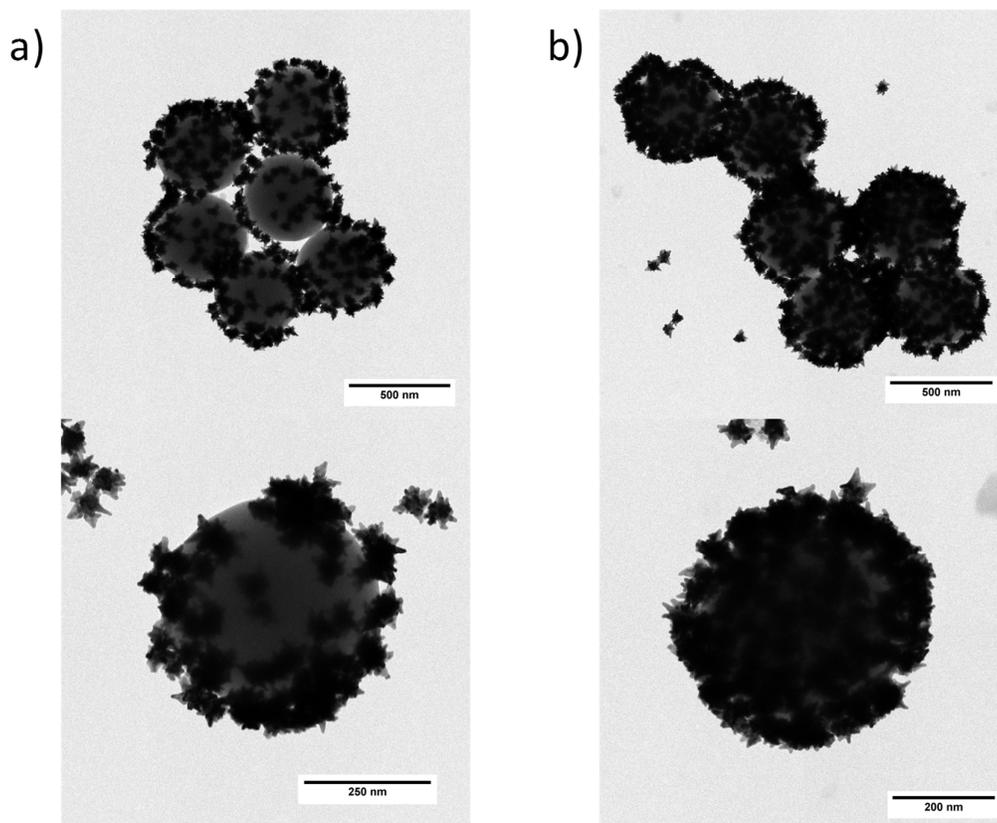
**Tabla 1.** Valores de potencial  $\zeta$  y desviaciones estándar de las NPs con el agregado de las diferentes capas de polielectrolito. A partir de la sexta capa, se reemplaza al polielectrolito PSS por el colorante ICG. La última capa corresponde al agregado de las AuNS.

#### 4.4.1.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

Por último, lo que nos quedaba por definir era la manera en la que íbamos a colocar las AuNS en el sistema. Del mismo modo que nos pasó con el colorante, debimos evaluar qué cantidad colocar con el objetivo de lograr un recubrimiento homogéneo de la superficie de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG. La otra cuestión por determinar era el tiempo de agitación de las nanopartículas para lograr una buena interacción entre las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG y las AuNS, permitiendo así, el recubrimiento metálico deseado.

Para resolver estas cuestiones utilizamos como herramienta de trabajo la microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar, utilizamos dos volúmenes distintos de stock de suspensiones de nanopartículas de oro con una cantidad fija de NPs SiO<sub>2</sub>-ICG, de manera de tener distinta relación  $N_{AuNS}/N_{SiO_2}$  (relación entre el número de nanopartículas de oro y de sílice).

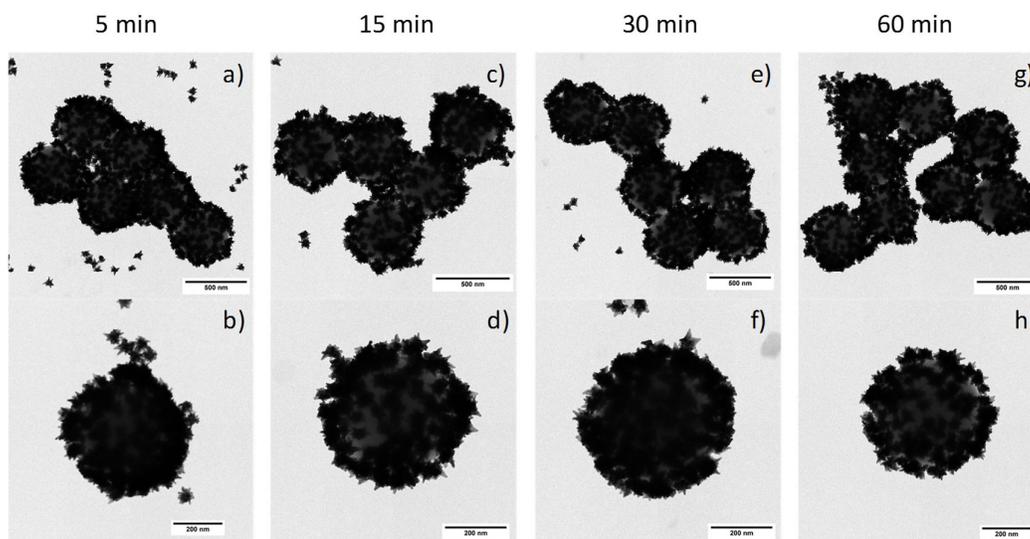


**Figura 12.** Micrografías de TEM para NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS con: a) 75 µL de stock AuNS ( $N_{AuNS}/N_{SiO_2} = 7,8$ ) y b) 150 µL de stock AuNS ( $N_{AuNS}/N_{SiO_2} = 15,6$ )

Los valores de  $NP_{AuNS}$  y  $NP_{SiO_2}$  se calcularon suponiendo que ambas nanopartículas son de forma esférica, y sabiendo la concentración de las soluciones stock y la densidad del SiO<sub>2</sub> y Au, respectivamente. Lo que podemos ver en la Figura 12 es que, a medida que

aumentamos la relación  $NP_{AuNS}/NP_{SiO_2}$ , aumenta el grado de cobertura de las NPs  $SiO_2$ , como era de esperar. Según las imágenes obtenidas, el volumen de stock con el cual obtenemos un recubrimiento completo y homogéneo de AuNS es 150  $\mu L$ .

De esta manera, definimos la cantidad de nanopartículas de oro que debíamos colocar para recubrir completamente a las esferas de sílice. Sin embargo, nos quedaba definir el tiempo de agitación necesario para que se produzca la adsorción de las AuNS sobre la superficie de las NPs  $SiO_2$ . Algunos trabajos publicados sobre el ensamblado de sistemas similares al nuestro<sup>98</sup> dejan interaccionando 1 h las nanopartículas de oro para que formen un depósito uniforme sobre microesferas de poliestireno. Para saber si en nuestro dispositivo es necesario utilizar el mismo protocolo o necesitamos un tiempo diferente, tomamos alícuotas de la suspensión de nanopartículas durante el depósito de la capa metálica a diferentes tiempos con la intención de evaluar el avance de la deposición de las AuNS. La idea era determinar el tiempo en el cual las nanopartículas de sílice estaban completamente recubiertas de oro, para lo cual decidimos tomar imágenes de TEM a los 5, 15, 30 y 60 min de agitación (Figura 13).



**Figura 13.** Micrografías de TEM para las NPs  $SiO_2@AuNS$  a diferentes tiempos de agitación: a) 5 min, escala 500 nm; b) 5 min, escala 250 nm; c) 15 min, escala 500 nm; d) 15 min, escala 250 nm; e) 30 min, escala 500 nm; f) 30 min, escala 250 nm; g) 60 min, escala 500 nm; y h) 60 min, escala 250 nm.

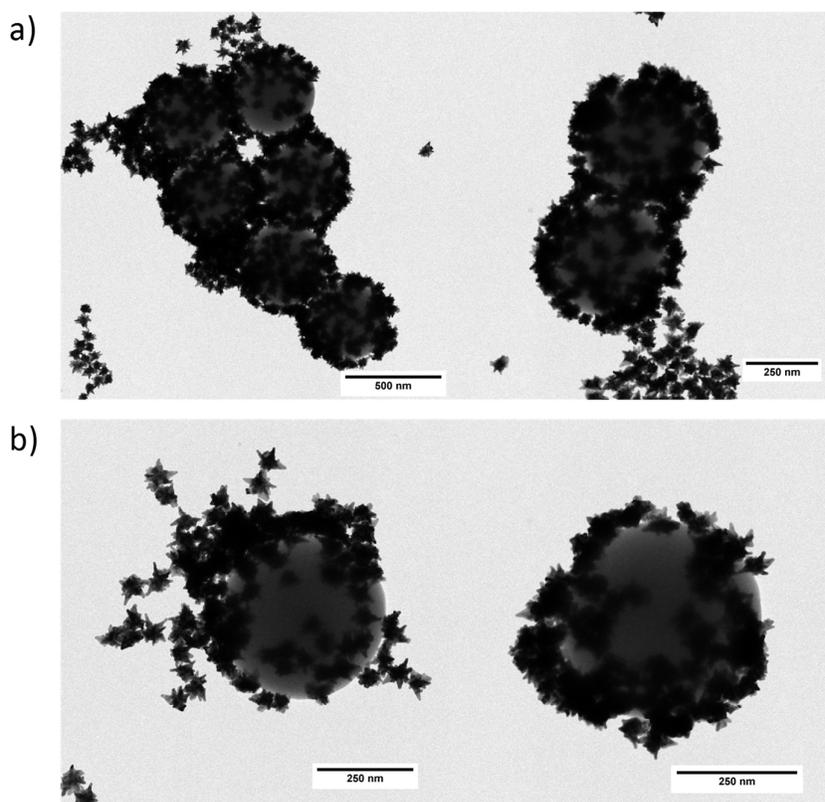
Si bien a partir de los 5 min ya se observa un buen recubrimiento de la superficie, dejar agitando más tiempo nos asegura que prácticamente todas las NPs de oro se depositan sobre la superficie de las esferas de  $SiO_2$ , evitando que queden estrellas sin interaccionar y que luego sean difíciles de remover de la suspensión.

Es por este motivo que decidimos mantener el tiempo de agitación reportado para poliestireno (1 h) para obtener el mejor recubrimiento posible.

Teniendo todo el protocolo de ensamblado puesto a punto, observamos las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS al TEM para terminar el proceso de caracterización (Figura 14).

Cuando analizamos estas imágenes, vemos que las AuNS no se depositan homogéneamente sobre la superficie de la sílice. Esto nos llamó la atención teniendo en cuenta que, para el caso de las NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS, la deposición de las nanopartículas de oro fue uniforme en toda la superficie de las NPs SiO<sub>2</sub>. Pero, cuando nos pusimos a revisar los resultados que obtuvimos en las medidas de potencial  $\zeta$ , encontramos una posible explicación.

En el momento en que comienzan a depositarse las capas de ICG sobre la sílice, la desviación estándar de las medidas de potencial  $\zeta$  aumentan, indicando que hay una mayor incertidumbre en el valor de la carga asociada a la partícula (ver tabla 1). Este comportamiento no lo observamos durante el ensamblado de las capas de polielectrolitos positivo y negativo.



**Figura 14.** Micrografías de TEM para SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS: a) barra de escala 500 nm y b) barra de escala 250 nm.

En base a estos resultados de potencial  $\zeta$  y de las imágenes de TEM proponemos que el depósito de la ICG durante el ensamblado no es homogéneo en toda la superficie de la

nanopartícula, por lo cual, a medida que se agregan nuevas capas de polímero positivo, se forman agregados poliméricos en zonas preferenciales de la superficie (aquellas donde el ICG se haya adsorbido en mayor cantidad). Al repetir este procedimiento un par de veces se obtiene como resultado espesores poliméricos heterogéneos (irregulares) en una misma partícula, lo cual hace que las AuNS se adsorban mayoritariamente en las zonas de mayor cantidad de polímero, dejando expuestas zonas con menor recubrimiento polimérico.

Esto también explicaría por qué al medir el potencial  $\zeta$  de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS obtenemos un valor menor al de la última capa de PAH, pero que sigue siendo positivo, en lugar de ser negativo como era de esperar debido al recubrimiento por las AuNS.

## 4.4.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

### 4.4.2.1 Consumo de oxígeno

Una vez terminada la caracterización, y habiendo determinado el correcto ensamblado de las nanopartículas, pasamos a verificar si el dispositivo obtenido cumplía con las propiedades deseadas para poder ser utilizarlas en PDT y PTT.

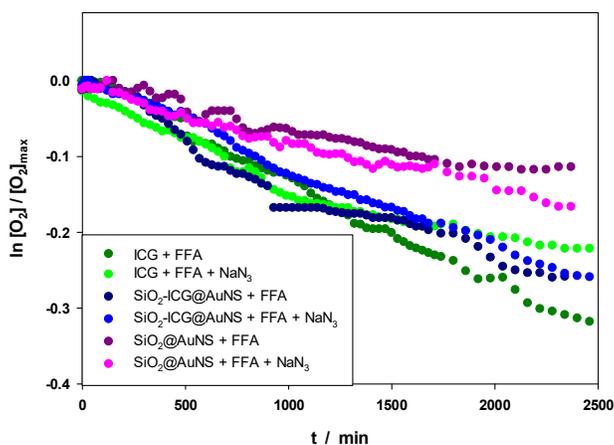
En primer lugar nos centramos en el análisis de la capacidad de estas partículas de generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Pero antes de enfocarnos en la medición de las propias ROS, medimos el consumo de oxígeno disuelto para determinar si realmente nuestro sistema estaba interactuando con el O<sub>2</sub> molecular generando alguna especie de oxígeno (Figura 15).

Para ello, irradiamos la suspensión de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS con un láser de 800 nm a 0,6 W de potencia y medimos la concentración de O<sub>2</sub> molecular disuelto con un electrodo de oxígeno durante 45 min. Estas medidas también se realizaron para los controles positivos y negativos. Para estos controles utilizamos una solución de ICG que se espera que genere ROS, y una suspensión de NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS que se espera no genere ROS, respectivamente.

Entre las principales especies reactivas que se producen a partir del O<sub>2</sub> molecular encontramos el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Dado que el tiempo de vida del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es muy corto (aprox 4 μs) y decae, rápida y espontáneamente, regenerando el O<sub>2</sub> triplete, debemos colocar, en las soluciones a medir, un agente que pueda reaccionar con el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generado con la irradiación de manera de consumirlo irreversiblemente y poder observar una disminución en la concentración de O<sub>2</sub>. El compuesto utilizado con este fin fue el alcohol furfurílico (FFA). Ahora bien, para comprobar que realmente el consumo medido corresponde a la producción de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, agregamos otro agente que compite con el FFA por el oxígeno singlete, pero, a diferencia del anterior, este compuesto no reacciona con la especie reactiva, sino que lo desactiva

físicamente, volviendolo al estado fundamental triplete. Este segundo agente es la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ). Por lo tanto, es de esperar que con el agregado de este segundo compuesto, se reestablezca la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto, si es que solo se esta produciendo  $^1\text{O}_2$  como especie reactiva.

En la Figura 15 podemos observar, como era de esperar, que la muestra de ICG con FFA y las de NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  con FFA fueron en las que se observó mayor consumo de oxígeno. Luego, cuando analizamos las mismas muestras, pero con el agregado de  $\text{NaN}_3$ , vemos que disminuye el consumo de oxígeno, lo que nos está indicando que la disminución en la concentración de oxígeno en las primeras dos muestras se debe a la formación de oxígeno singlete. Sin embargo, de acuerdo a lo que explicamos anteriormente, al agregar  $\text{NaN}_3$  a la solución esperamos que se recupere la concentración de oxígeno disuelto y el consumo se haga cero, pero vemos que esto no fue así. Esto se analizará más adelante en la sección 4.4.2.4.



**Figura 15.** Gráfico del cambio en la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto en función del tiempo.

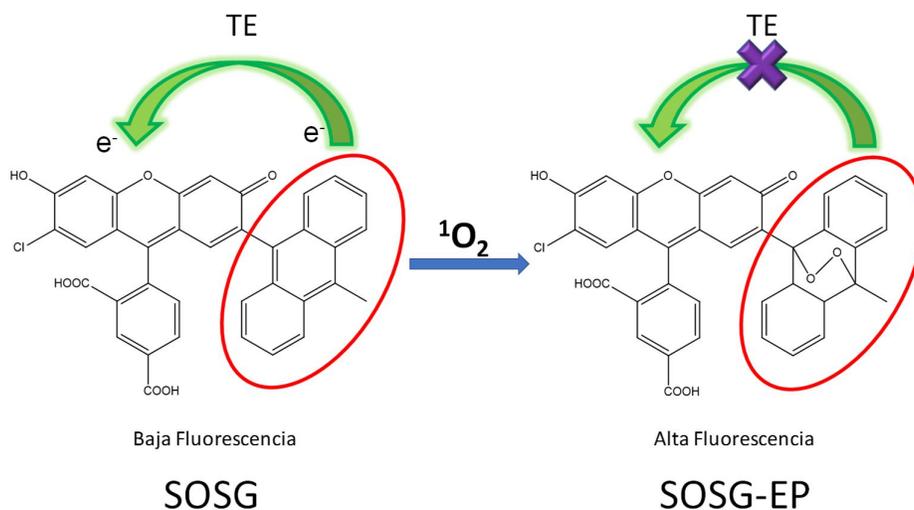
En el caso de las NPs  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$ , si bien se esperaba que no hubiese cambios en la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto, se observa que, tanto para las muestras con FFA y con FFA junto con  $\text{NaN}_3$ , hay un pequeño consumo de oxígeno, similares entre sí, pero en mucha menor proporción que para las otras muestras.

#### 4.4.2.2 Determinación de oxígeno singlete.

Ahora que ya hemos visto que las NPs están generando especies reactivas, según lo indicaron las medidas con el electrodo de  $\text{O}_2$ , pasamos a determinar la naturaleza y la cantidad de las especies reactivas de oxígeno.

La producción de oxígeno singlete puede determinarse de manera directa, midiendo la fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  a 1275 nm, o de manera indirecta, siguiendo el cambio de alguna propiedad de un compuesto que reacciona con el oxígeno singlete. Sin embargo, el método de detección directa de la luz emitida por el oxígeno singlete está limitado por el bajo rendimiento cuántico ( $10^{-6}$  en sistemas acuosos)<sup>99</sup> y por la baja eficiencia de emisión intrínseca del  $^1\text{O}_2$ .<sup>100</sup> Por estas razones las trampas químicas del oxígeno singlete se usan en gran medida, y los métodos de detección incluyen fluorescencia, absorción y resonancia electrónica de spin (ESR). Una de las sondas más utilizada para la detección de  $^1\text{O}_2$  es el sensor verde de oxígeno singlete (SOSG<sup>®</sup>, del inglés: Singlet Oxygen Sensor Green).

Esta sonda está formada por un sistema de dos componentes compuesto por una mitad que actúa como agente atrapante acoplado a un cromóforo emisor de luz. Previo a la reacción con el oxígeno singlete, la emisión del cromóforo está desactivada por la transferencia electrónica desde la mitad “atrapante” adyacente. Luego de la reacción con el oxígeno singlete, el aducto de oxígeno resultante ya no es un donante de electrones intramolecular eficiente, y entonces reaparece la emisión de luz.



**Figura 16.** Formación del endoperóxido de SOSG<sup>®</sup> (SOSG-EP) debido a la reacción con oxígeno singlete. Hay que aclarar que el SOSG<sup>®</sup> comercial es una mezcla de los ácidos 2,4 y 2,5 dicarboxílicos, no solo del isómero 2,4 como se muestra en la figura.<sup>101</sup>

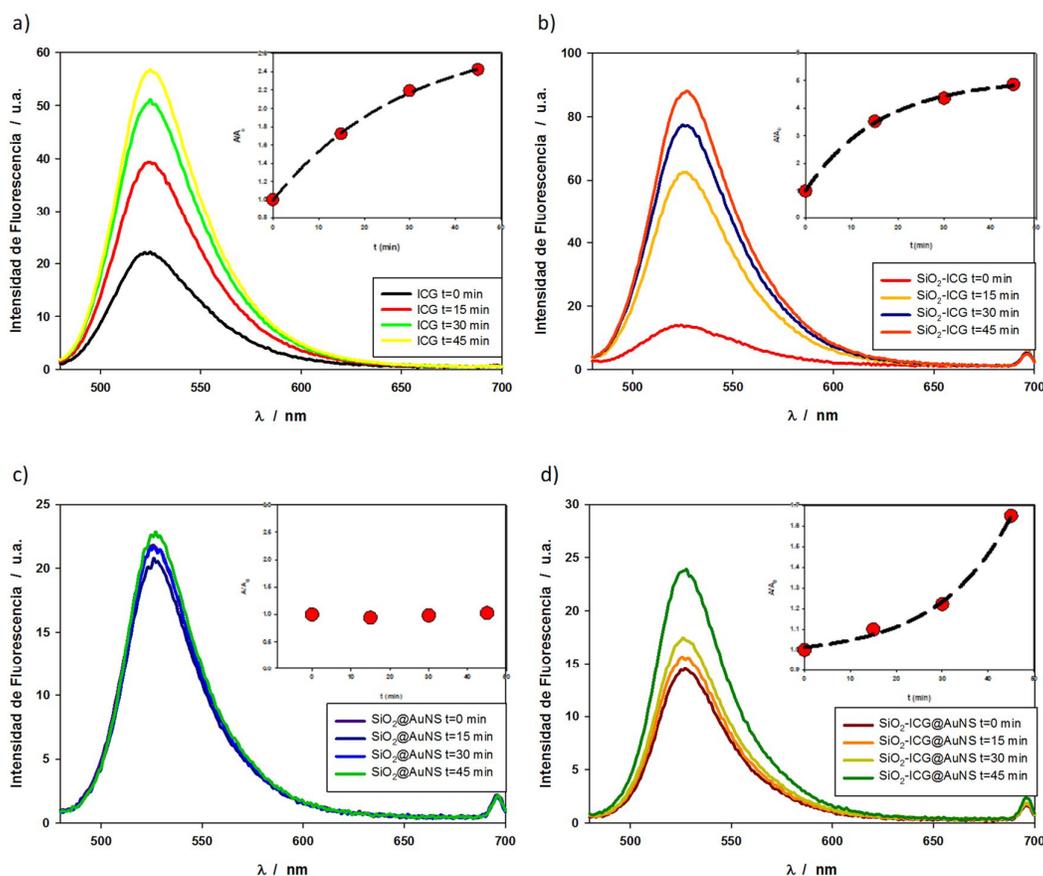
La sonda SOSG<sup>®</sup> se compone de un donante de electrones (derivado de antraceno) y un aceptor (derivado de fluoresceína) unidos covalentemente. El SOSG<sup>®</sup> exhibe débiles picos de fluorescencia azul a 395 y 416 nm bajo excitación a 372 y 393 nm. En presencia de  $^1\text{O}_2$ , SOSG<sup>®</sup> emite fluorescencia verde con máximos de excitación y emisión a 504 y 525 nm, respectivamente. La emisión de esta fluorescencia verde corresponde a la formación de un endoperóxido generado por la interacción del  $^1\text{O}_2$  con el residuo de

antraceno del SOSG<sup>®</sup>, como se observa para otras sondas fluoresceína-antraceno similares, tales como DMAX o DPAX.

Evaluamos la producción de  $^1\text{O}_2$  para la NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  y la comparamos con los controles ICG,  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$  y  $\text{SiO}_2\text{-ICG}$ .

Como podemos ver en la Figura 17a, la solución de ICG produjo oxígeno singlete como era de esperar, al igual que lo hicieron las NPs que contienen ICG, estas son  $\text{SiO}_2\text{-ICG}$  (Figura 17b) y  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  (Figura 17d). En el caso de las NPs  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$  (Figura 17c) no vimos producción de  $^1\text{O}_2$ , lo cual también esperábamos que ocurriese ya que estas partículas no están cargadas con el colorante.

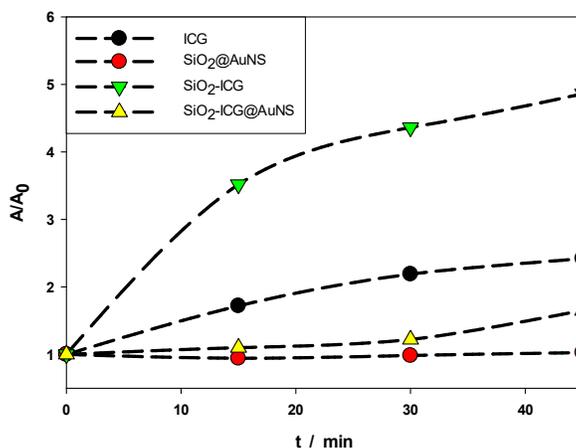
Estos resultados están en línea con los obtenidos en las medidas de consumo de oxígeno.



**Figura 17.** Espectros de emisión del SOSG-EP generado a distintos tiempos para las muestras: a) ICG, b)  $\text{SiO}_2\text{-ICG}$ , c)  $\text{SiO}_2\text{@AuNS}$  y d)  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$ .

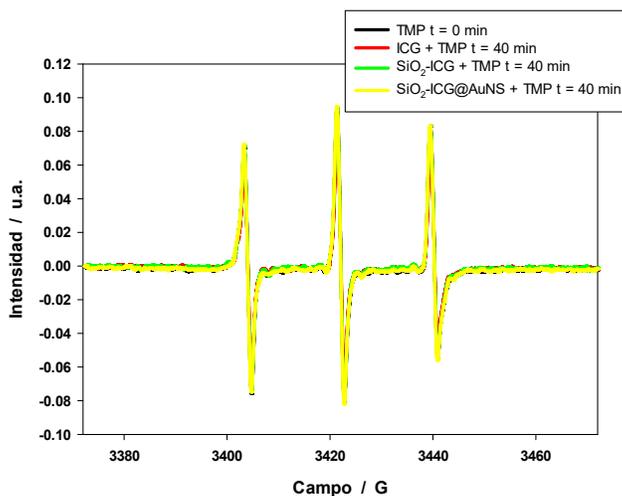
Si bien no es fácil cuantificar la cantidad de oxígeno singlete generado en cada muestra ya que los gráficos de A/A<sub>0</sub> vs tiempo (Figura 18) no son lineales, los datos parecen

indicar que las muestras que contienen ICG producen  $^1\text{O}_2$  siguiendo la tendencia  $\text{SiO}_2\text{-ICG} > \text{ICG} > \text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$ .



**Figura 18.** Relación entre el área bajo la curva de los espectros de emisión del SOSG a distintos tiempos y el área a tiempo 0 vs. tiempo, para cada una de las muestras de la Figura 17.

Como mencionamos al comienzo de esta sección, otro de los métodos indirectos de detección de oxígeno singlete es la resonancia electrónica de spin. Al igual que hicimos en el capítulo 3, utilizamos la técnica de EPR para estudiar la generación de  $^1\text{O}_2$  utilizando el TMP como trampa de spin para este radical.



**Figura 19.** Espectros EPR de TMP con ICG, NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG}$  y NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$ , irradiadas con LED de luz NIR ( $\lambda_{\text{máx}} = 780 \text{ nm}$ ) durante 40 min.

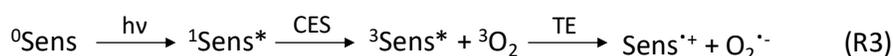
La Figura 19 muestra los espectros EPR de las mezclas de NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  con TMP  $50 \mu\text{M}$ , y de los diferentes controles utilizados. Una de las muestras corresponde al TMP

sin irradiar que presenta una muy pequeña señal. Nótese que en los casos de Riboflavina y Rosa de Bengala (Figuras 83 y 85 del capítulo 3), esta señal es despreciable respecto de las señales de las muestras. Podemos observar que prácticamente no hay diferencia entre los espectros de las muestras analizadas, entre las que se incluye la del TMP sin irradiar, por lo cual no somos capaces de evidenciar la presencia de oxígeno singlete, posiblemente debido al bajo rendimiento cuántico del fotosensibilizador. Se ha reportado que este rendimiento depende de la concentración de ICG y varía entre 0,004 para 100  $\mu\text{M}$  y 0,009 para 25  $\mu\text{M}$ .<sup>102</sup>

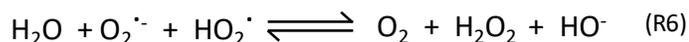
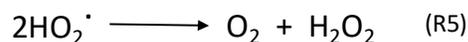
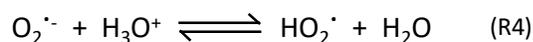
#### 4.4.2.3 Determinación de radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ).

Como dijimos en la sección 3.3.2, no podemos determinar directamente la generación de  $^1\text{O}_2$  midiendo consumo de oxígeno, ya que este radical vive muy poco tiempo. Por esta razón agregamos el FFA, que reacciona con el oxígeno singlete consumiéndolo de manera irreversible y podemos seguir la disminución en la concentración de oxígeno disuelto. Cuando agregamos  $\text{NaN}_3$  a las muestras con FFA, observamos que aumenta el nivel de oxígeno en la solución. Por lo tanto, podemos concluir que se está generando oxígeno singlete.

Otra especie reactiva de oxígeno, capaz de producirse por fotosensibilización (reacción 3), es el radical anión superóxido.

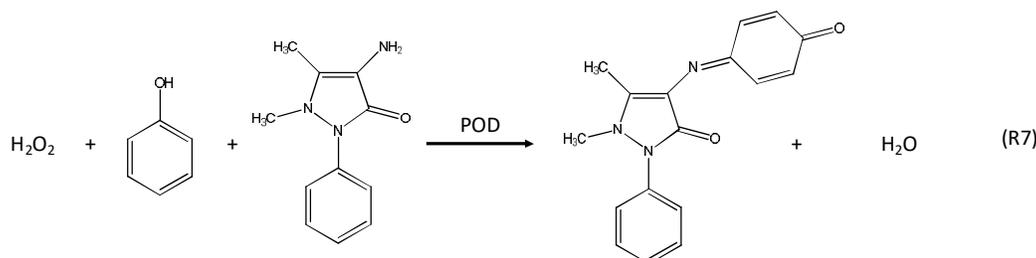


Por esta razón, la generación de radical anión superóxido se determinó de forma indirecta mediante la detección de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) producido a partir de las siguientes reacciones:



La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las diferentes muestras se determinó por un método enzimático colorimétrico utilizando el kit comercial de Wiener para la determinación de colesterol.<sup>97</sup> Este kit comercial consiste en una solución que contiene las enzimas colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD), además de 4-aminofenazona (4-AF), buffer Good, fenol y colato de sodio. El método se basa en la reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con una mezcla de 4-AF y fenol, para dar como producto la quinonaimina (4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm ( $\epsilon_{505} = 5035 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

La reacción catalizada por la POD se muestra a continuación en la Figura 19.



**Figura 19.** Reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con fenol y 4-aminofenazona, para dar 4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona y agua. Esta reacción es catalizada por la enzima POD.

Es importante aclarar que las enzimas colesterol esterasa (CHE) y la colesterol oxidasa (CHOD) solo intervienen en la secuencia de reacciones que involucra la determinación de colesterol, por lo tanto no interfieren en la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para llevar a cabo las medidas, es necesario realizar en primera instancia una curva de calibración. Para ello, se prepararon soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentración conocida como se indica en las siguientes tablas.

Solución	Volumen $\text{H}_2\text{O}_2$ stock ( $\mu\text{L}$ )	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mM)
Sc A	10	9,8
Sc B	20	19,6
Sc C	40	32,9
Sc D	80	78,4

**Tabla 3.** Soluciones stock de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los volúmenes finales de las soluciones fueron 10 mL.

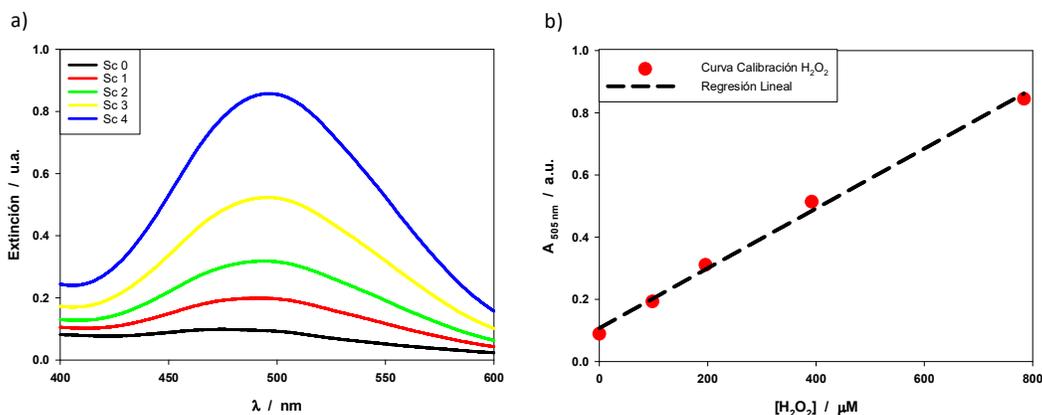
Solución	Vol soluciones anteriores	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ ( $\mu\text{M}$ )
Sc 1	100 $\mu\text{L}$ Sc A	98
Sc 2	100 $\mu\text{L}$ Sc B	196
Sc 3	100 $\mu\text{L}$ Sc C	392
Sc 4	100 $\mu\text{L}$ Sc D	784

**Tabla 4.** Diluciones finales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizadas para armar la curva de calibración colorimétrica. Los volúmenes finales de cada solución fueron 10 mL. Las concentraciones se escogieron en base a protocolos realizados en trabajos anteriores del grupo.

De cada una de las diluciones indicadas en la Tabla 4 y de un blanco de agua se toman 400  $\mu\text{L}$  y se mezclan con 1,8 mL del reactivo comercial. Estas soluciones se incuban durante 5 min a 37 °C (o durante 30 min a temperatura ambiente). Transcurrido el

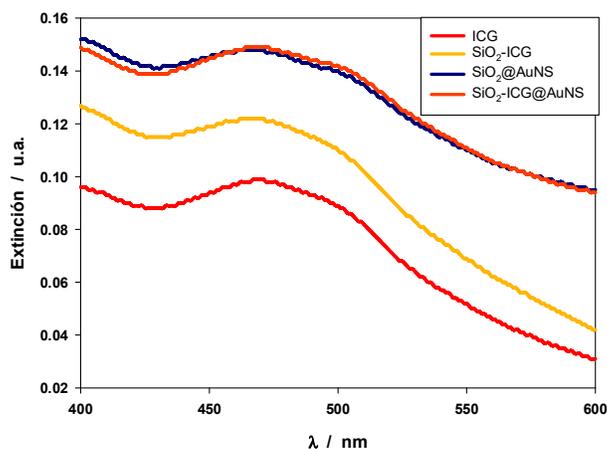
tiempo de incubación se mide la  $A_{505}$ . Se arma la curva de calibración y luego se miden las muestras.

Cada una de estas muestras se irradió durante 30 min con un láser de 800 nm. Luego, 400  $\mu\text{L}$  de cada muestra se mezclan con 1,8 mL de reactivo y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente. Se realiza la lectura de absorbancia a 505 nm y de la curva de calibración (Figura 20b) se obtienen los valores de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 20.** a) Espectros de absorción de las muestras patrón mezcladas con el kit comercial de Wiener para determinar la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado. b) Curva de calibración obtenida a partir de las soluciones patrón de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Como podemos ver en la Figura 21, los valores de absorbancia para las muestras ICG,  $\text{SiO}_2$ -ICG,  $\text{SiO}_2$ @AuNS y  $\text{SiO}_2$ -ICG@AuNS son menores al obtenido para la solución patrón más diluída (Sc 1) y similares al observado para el blanco de agua.



**Figura 21.** Espectros de absorción de las muestras mezcladas con el kit comercial de Wiener para determinar la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado.

Este resultado nos demuestra que nuestro nanodispositivo no está generando radical anión superóxido como especie reactiva, al ser irradiado con un láser a 800 nm.

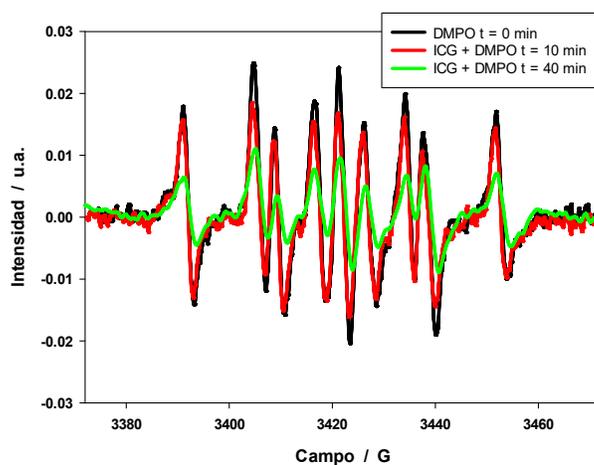
#### 4.4.2.4 Determinación de radical hidroxilo (OH $\cdot$ ).

Otro de los posibles radicales que podría formarse en solución es el hidroxilo (OH $\cdot$ ), que tiene una gran participación en reacciones de autooxidación de biomoléculas para ser utilizado en un potencial tratamiento de PDT.

Por este motivo, estudiamos la generación de radical OH $\cdot$  mediante la técnica de Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR), utilizando al DMPO como trampa para este radical, del mismo modo que se explicó en el capítulo 3.

La Figura 22 muestra los espectros EPR para el DMPO sin irradiar y para una mezcla de DMPO e ICG 6,67  $\mu$ M, irradiadas con un LED de 780 nm a dos tiempos distintos: 10 y 40 min. Como puede observarse, para ninguna de las muestras irradiadas se observa el espectro característico del aducto DMPO-OH, lo cual indica que no se está produciendo el radical OH $\cdot$  durante la irradiación.

Teniendo en cuenta que el fotosensibilizador en solución no dio señales de generación de radical OH $\cdot$  no fue necesario realizar las medidas para las muestras de NPs SiO $_2$ -ICG@AuNS.



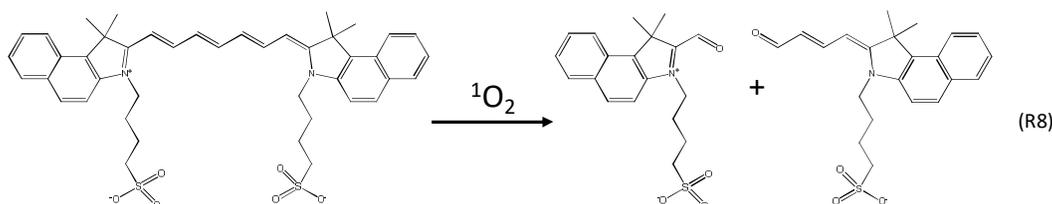
**Figura 22.** Espectros EPR de DMPO sin irradiar e irradiado con LED de 750 nm en presencia de ICG 6,67  $\mu$ M, durante 10 y 40 min.

#### 4.4.3 Constante de reacción de ICG con $^1\text{O}_2$ .

Volvamos al gráfico de consumo de oxígeno de la Figura 23. Como explicamos en la sección 3.3.2, cuando colocamos NaN $_3$  (competidor del FFA por el  $^1\text{O}_2$ , que desactiva al

estado excitado volviéndolo al estado fundamental triplete) a la solución de ICG y a la suspensión de NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS, vemos que la cantidad de O<sub>2</sub> disuelto aumenta, sin embargo, no vuelve al valor inicial. Una explicación posible a este comportamiento sería la producción de radical anión superóxido que pudiese generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de esta manera se estaría consumiendo oxígeno disuelto. Sin embargo, utilizando el kit comercial de Wiener determinamos que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> no se está generando. Por lo tanto, hay otro fenómeno que está ocurriendo durante el proceso de irradiación.

Tang y colaboradores<sup>103</sup> propusieron al ICG como una sonda para determinar la generación de oxígeno singlete ya que observaron que la absorción a 780 nm de este colorante disminuye cuando se irradia con un láser a 660 nm en una solución conteniendo clorina e6 (Ce6). Una vez irradiado con un láser a 660 nm, el Ce6 puede producir <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, el cual descompone al ICG. Ellos proponen que la reacción ocurre mediante una ruptura de un doble enlace en la cadena central (Figura 23), aunque no determinaron los productos de reacción.



**Figura 23.** Esquema tentativo de la descomposición del ICG en presencia de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.<sup>103</sup>

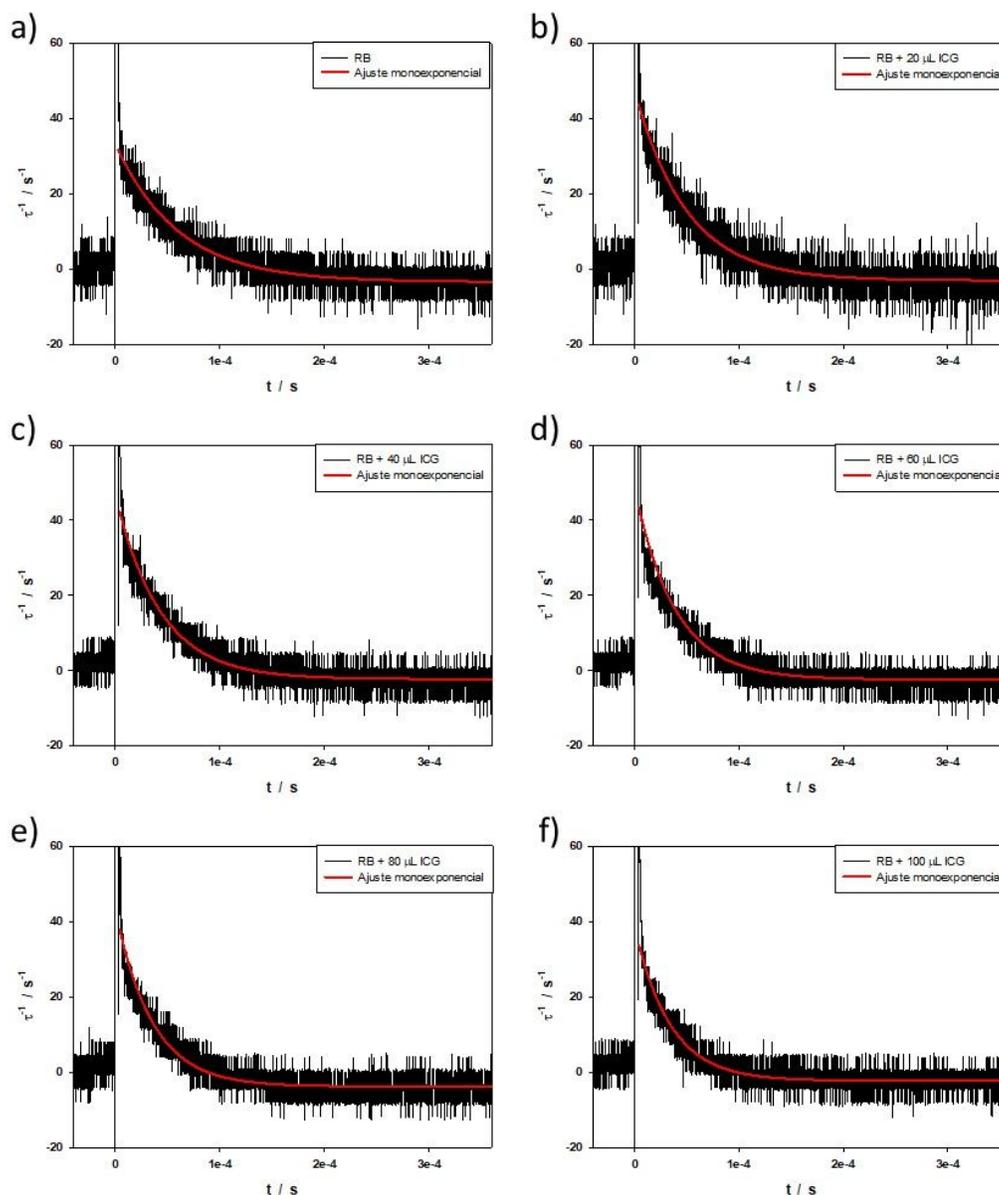
Los resultados expuestos en este trabajo nos llevaron a pensar que esta sería la razón de la disminución en la concentración de oxígeno disuelto en las muestras irradiadas que contienen FFA y NaN<sub>3</sub>.

Por este motivo decidimos determinar la constante de velocidad para la reacción entre el ICG y el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Para esto, irradiamos soluciones de distinta concentración de ICG a una cantidad fija de Rosa de Bengala, el cual genera oxígeno singlete al ser irradiado con una laser a 532 nm. La constante se determinó midiendo los cambios en el tiempo de vida del oxígeno singlete producto de la reacción con el ICG.

A partir de los tiempos de vida del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> obtenidos del ajuste de los decaimientos de la Figura 24 (Tabla 5), y sabiendo la concentración de ICG (desactivador) utilizada en cada solución, podemos calcular la constante de quenching de la ecuación de Stern-Volmer

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 \cdot [ICG] = 1 + k_D \cdot [ICG] \quad (E1)$$

donde  $\tau_0$  y  $\tau$  son los tiempos de vida de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en ausencia y en presencia de ICG, respectivamente.



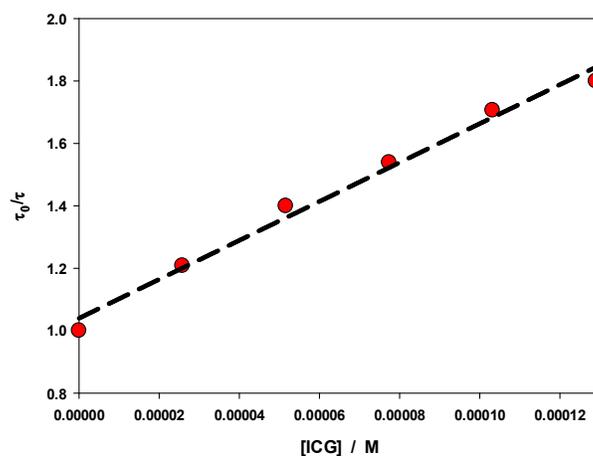
**Figura 24.** Decaimiento de la señal de fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  a 1275 nm obtenido a partir de soluciones de Rosa de Bengala en  $\text{D}_2\text{O}$  ( $A^{532} = 1$ ) en presencia de diferentes cantidades de ICG: a) 0  $\mu\text{M}$ ; b) 25,8  $\mu\text{M}$ ; c) 51,6  $\mu\text{M}$ ; d) 77,4  $\mu\text{M}$ ; e) 103,2  $\mu\text{M}$ ; y f) 129,0  $\mu\text{M}$ . Las líneas rojas representan ajustes monoexponenciales.

La Figura 25 muestra el gráfico del cociente  $\tau_0/\tau$  vs  $[\text{ICG}]$ , de la ecuación mencionada anteriormente. El tiempo de vida del  $^1\text{O}_2$  en  $\text{D}_2\text{O}$  fue  $6,0 \times 10^{-5}$  s en ausencia de ICG, en completo acuerdo con valores reportados en este solvente,<sup>104</sup> y la pendiente de la recta  $6.2 \text{ M}^{-1}$ . Con esto valores obtuvimos una  $k_q$  de  $1,04 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Estos resultados indican que el ICG no solo actúa como fotosensibilizador generando  $^1\text{O}_2$  al ser irradiado a 780 nm, sino que también es un desactivador de este radical.

Vol ICG ( $\mu\text{L}$ )	[ICG] (M)	$\tau$ (s)
0	0,0	$6,0 \times 10^{-5}$
20	$2,58 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
40	$5,16 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-5}$
60	$7,74 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5}$
80	$1,032 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-5}$
100	$1,290 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-5}$

**Tabla 5.** Valores de concentración de ICG utilizado para la determinación de la constante de quenching y los respectivos tiempos de vida del  $^1\text{O}_2$  obtenidos a partir de las curvas de la Figura 24.



**Figura 25.** Gráfico de la ecuación de Stern-Volmer, a partir de la cual, con la pendiente de la recta y el  $\tau_0$  podemos obtener el valor de la constante de quenching ( $k_q$ ) de  $^1\text{O}_2$  por ICG.

El proceso por el cual un quencher ejerce su efecto sobre el oxígeno singlete puede ser tanto físico como químico. En el primer caso, el quencher desactiva físicamente al  $^1\text{O}_2$  a través de proceso de transferencia de energía, mientras que, en el segundo caso, el quencher reacciona químicamente con el oxígeno singlete generando un producto determinado. Esta constante que obtuvimos es la constante de quenching total, es decir, del proceso global tanto físico como químico. Por lo tanto, para poder determinar las constantes de quenching físico ( $k_q^f$ ) y químico ( $k_q^q$ ), debemos obtener alguna de estas dos constantes y luego despejar la otra a partir de la ecuación

$$k_q^T = k_q^f + k_q^q \quad (E2)$$

Cabe mencionar que para que la desactivación de  $^1\text{O}_2$  dé lugar a consumo de oxígeno, el proceso de desactivación debería tener una componente química, es decir  $k_q^q$  debería ser distinta de cero.

Se intentó medir el valor de  $k_q^r$  irradiando soluciones de Rosa de Bengala en presencia de FFA o ICG. En estos ensayos (no mostrados) se realizaron medidas de consumo de oxígeno usando FFA como referencia. Los resultados dieron una constante  $k_q^q$  mayor a  $k_q^T$ , lo que no tiene sentido. Esto podría deberse a la suposición de la estequiometría 1:1 entre  $^1\text{O}_2$  e ICG que puede no ser válida. Para determinar  $k_q^r$  debería medirse entonces el consumo de ICG.

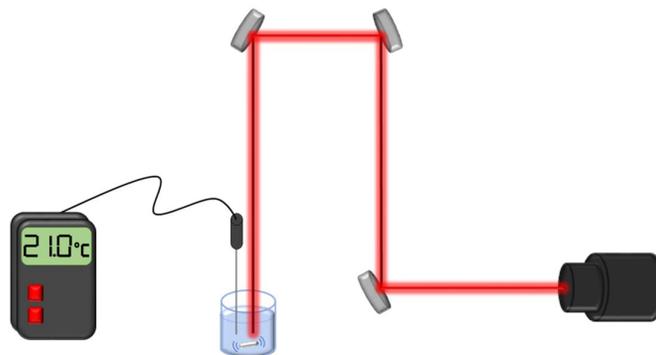
#### 4.4.4 Eficiencia fototérmica

Ya hemos determinado que nuestro sistema es un potencial candidato para PDT, por lo tanto, nos queda por saber si también puede serlo para PTT.

El calor generado por nanopartículas semiconductoras y metálicas no solo involucra la absorción de los fotones incidentes, sino también la conversión de la energía del fotón en energía en forma de calor, así como la transferencia de calor desde la NP hacia el medio circundante.

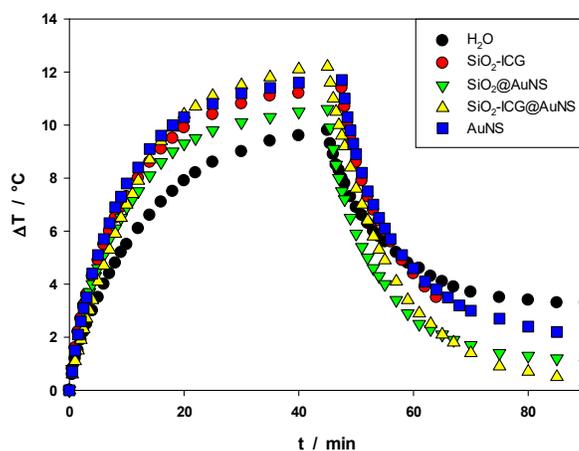
Este efecto de calentamiento es especialmente fuerte en el caso de las nanopartículas metálicas dado que tienen una gran cantidad de electrones móviles, y se vuelve aún mayor cuando la frecuencia del láser incidente coincide con la resonancia colectiva del plasmón de las NPs. Debido a que las nanopartículas metálicas tienen rendimientos cuánticos ópticos muy bajos (son emisores de luz muy pobres), la cantidad total de calor generado se espera que esté relacionada con la tasa de absorción óptica total de una manera relativamente simple. Estos argumentos de balance de energía sugieren que si el rendimiento cuántico óptico de las NPs es muy bajo ( $10^{-6}$ ) entonces debería haber una conversión de energía del fotón a energía calórica cercana a la unidad.<sup>105</sup>

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, dado los diferentes factores que determinan el proceso de conversión de energía fotónica en energía calórica, tales como forma y tamaño de las nanopartículas, el medio de la suspensión, la potencia del láser, etc., es conveniente determinar para cada sistema el valor de eficiencia de conversión fototérmica ( $\eta$ ). En la Figura 26 vemos un esquema representativo del sistema utilizado.



**Figura 26.** Esquema de la configuración experimental utilizada para medir los cambios de temperatura en suspensiones de NPs irradiadas a 800 nm.

La Figura 27 muestra los típicos perfiles de temperatura de las diferentes soluciones y suspensiones de nanopartículas.



**Figura 27.** Gráficos de los distintos perfiles de calentamiento y enfriamiento obtenido para los distintos sistemas. En todos los casos, excepto para  $H_2O A^{800} = 0,2$ .

Haciendo un balance de energía en el sistema, podemos calcular la eficiencia de transducción fototérmica. El balance total de energía para este sistema es:

$$\sum_i m_i C_{p,i} \frac{dT}{dt} = Q_{in,np} + Q_{in,surr} - Q_{out} \quad (E3)$$

Donde  $m$  y  $C_p$  son la masa y la capacidad calorífica del solvente (agua) y  $T$  es la temperatura de la solución.  $Q_{in,np}$  es la entrada de energía fototérmica de las nanopartículas

$$Q_{in,np} = I(1 - 10^{-A\lambda})\eta \quad (E4)$$

Donde  $I$  es la potencia del láser (en mW),  $A_\lambda$  es la absorbancia a la longitud de onda de excitación (800 nm), y  $\eta$  es la eficiencia de transducción fototérmica, o la fracción de energía absorbida de la luz que es convertida en calor.  $Q_{in,surr}$  es la entrada de calor (en mW) debida a la absorción de la luz por parte del solvente, la cual se mide de manera independiente.  $Q_{out}$  es el calor perdido, o cedido, hacia los alrededores.<sup>106</sup>

$$Q_{out} = hA(T - T_{surr}) \quad (E5)$$

donde  $h$  es el coeficiente de transferencia de calor,  $A$  es el área superficial del contenedor, y  $T_{surr}$  es la temperatura ambiente del entorno. La cantidad agrupada  $hA$  fue determinada midiendo la velocidad del descenso de temperatura luego de remover la fuente de iluminación. En ausencia de excitación laser, la ecuación E3 se vuelve:

$$\sum_i m_i C_{p,i} \frac{dT}{dt} = -Q_{out} = -hA(T - T_{surr}) \quad (E6)$$

Reacomodando la ecuación E6 tenemos:

$$dt = -\frac{m_{H2O} C_{p,H2O}}{hA} \frac{dT}{(T - T_{surr})} \quad (E7)$$

e integrando, obtenemos la expresión:

$$t = -\left(\frac{m_{H2O} C_{p,H2O}}{hA}\right) \ln(T - T_{surr}) \quad (E8)$$

La constante de velocidad característica puede definirse como  $\tau_{out} = (m_{H2O} \cdot C_{p,H2O})/hA$ , tal que:

$$T - T_{surr} = \exp\left(\frac{hA}{m_{H2O} C_{p,H2O}} t\right) = \exp\left(\frac{t}{\tau_{out}}\right) \quad (E9)$$

En el valor máximo de temperatura del estado estacionario, la velocidad del calentamiento fototérmico es igual a la velocidad de transferencia de calor hacia afuera del sistema:

$$Q_{in,np} + Q_{in,surr} = Q_{out} \quad (E10)$$

$$I(1 - 10^{(-A_\lambda)})\eta + Q_{in,surr} = hA(T_{max} - T_{surr}) \quad (E11)$$

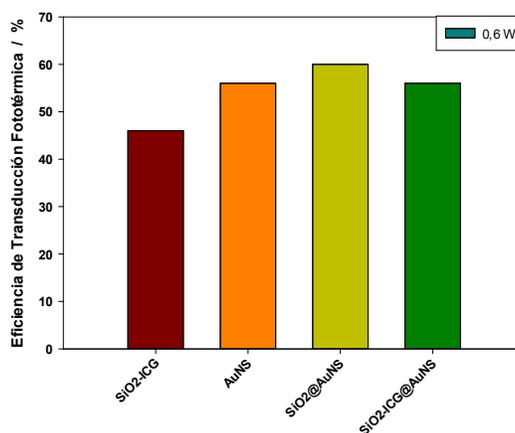
donde  $T_{max}$  es la máxima temperatura en el estado estacionario. Por lo tanto, la eficiencia de transducción fototérmica puede ser calculada directamente del incremento de temperatura en el estado estacionario, como:

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{surr}) - Q_{in,surr}}{I(1 - 10^{-A_\lambda})} \quad (E12)$$

A partir de los datos de la Figura 27, obtuvimos los valores de  $\tau_{out}$  y el coeficiente de transferencia de calor ( $hA$ ) para cada muestra durante el enfriamiento de la solución. Estos resultados se muestran en la Tabla 6.

Muestra	$\tau_{out}$ (min)	$hA$ /(W/°C)	$\eta$ (%)
SiO <sub>2</sub> -ICG	10,06	1,386x10 <sup>-2</sup>	46
AuNS	8,339	1,672x10 <sup>-2</sup>	56
SiO <sub>2</sub> @AuNS	8,039	1,750x10 <sup>-2</sup>	60
SiO <sub>2</sub> -ICG@AuNS	10,69	1,340x10 <sup>-2</sup>	56

**Tabla 6.** Valores de la constante de velocidad y del coeficiente de transferencia de calor calculados a partir de los perfiles de enfriamiento de las soluciones de la figura 27b.



**Figura 28.** Eficiencia de transducción fototérmica calculada para NPs SiO<sub>2</sub>-ICG, AuNS, NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS y NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS.

Como puede verse en la Figura 28, los valores más altos de eficiencia fototérmica (entre 56 y 60%) se obtuvieron para las NPs que contienen las nanoestrellas de Au, tal como era de esperar.

Por último, es necesario hacer un comentario respecto a los valores de  $\Delta T$  obtenidos en esta experiencia. Si bien se puede ver en la Figura 27 que los cambios de temperatura para las suspensiones NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS no son significativamente mayores que los observados para H<sub>2</sub>O, estas temperaturas corresponden a las del volumen total de

solución, sin embargo, el aumento de temperatura alrededor de las NPs debería ser mucho más grande.

La temperatura de las NPs ( $T_{np}$ ) aumenta durante la irradiación con el diámetro de las NPs desde 5 a 50 nm en proporción al flujo del láser  $I_0$ , a la fracción de energía absorbida ( $1 - 10^{-A\lambda}$ ), y es inversamente proporcional a la capacidad calorífica de la muestra  $C_p$ , a la concentración de Au y a la longitud del camino óptico  $\sigma$ :

$$\Delta T \propto \frac{I_0(1 - 10^{-A\lambda})}{\sigma[Au]C_p\sigma} \quad (E13)$$

Irradiación con un láser de Ti/zafiro de muy alta potencia produjo un  $\Delta T$  de 120 °C en una suspensión de NPs Au de 15 nm de diámetro con un solo pulso de 120 fs,<sup>107</sup> mientras que la irradiación continua de baja intensidad a NPs Au produjeron un  $\Delta T$  de 15 °C en un rango de tiempo de 5 s<sup>108</sup> a 6 min.<sup>39</sup>

#### 4.4.5 Internalización celular

Hasta aquí hemos demostrado que nuestro nanodispositivo es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (oxígeno singlete) y además generar aumento de temperatura, luego de ser irradiado por un láser a 800 nm. Por lo tanto, consideramos que estas nanopartículas son potenciales candidatos para ser utilizadas como un único sistema capaz de realizar PDT y PTT al mismo momento.

Con la intención de seguir estudiando las potenciales aplicaciones terapéuticas de estas partículas, nos propusimos evaluar la internalización celular de las mismas. Para lograr una adecuada eficacia de las fototerapias, es importante que las nanopartículas ingresen a las células tumorales, de manera que las especies reactivas generadas por el fotosensibilizador y el calor producido por las partículas tenga su efecto sobre los componentes celulares, ubicados en el citoplasma y en los principales compartimentos celulares tales como, mitocondria, lisosomas, núcleo, etc.

Experimentos de microscopía de epifluorescencia con módulo APOTOME se realizaron con el fin de determinar si las células incorporaban las nanopartículas en su interior.

El módulo APOTOME adaptado al microscopio de fluorescencia permite que este actúe como si fuese un microscopio confocal, obteniendo imágenes de la misma calidad y resolución.

Para estos ensayos se utilizó la línea celular HepG2 de carcinoma hepático.

Un primer cultivo de células se puso en contacto con 9  $\mu$ L de solución stock de ICG 10 mM de manera de obtener una concentración final de ICG 30  $\mu$ M en el medio de cultivo. Luego las células se incubaron en oscuridad a 37 °C en estufa durante 20 min, y

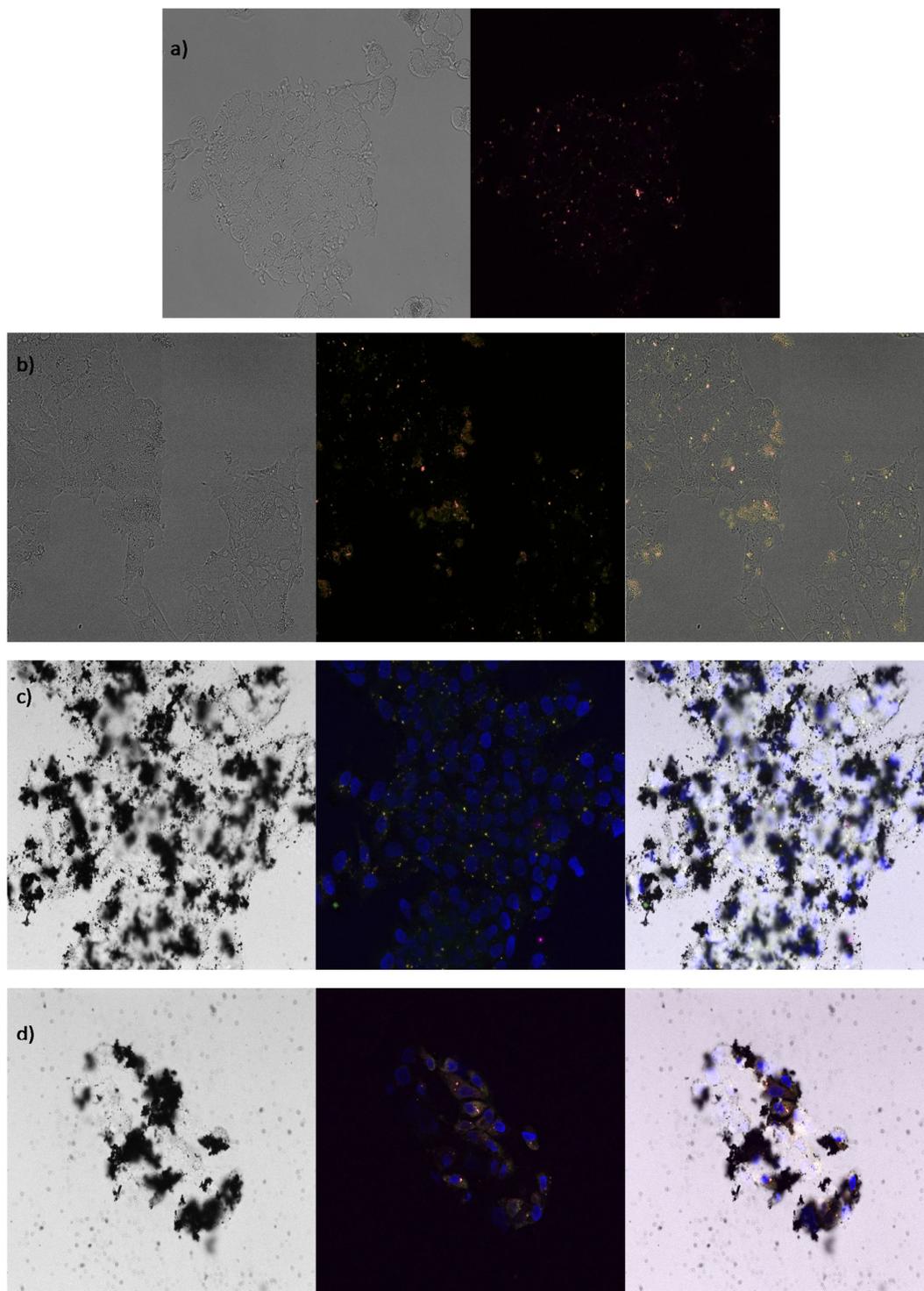
posteriormente se observaron al microscopio. Por otra parte, se colocaron las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG en un segundo cultivo celular, con una concentración final de 0,2 mg/mL. Las células se incubaron en oscuridad a 37 °C en estufa durante 1 h. Por último, a un tercer cultivo celular se le agregó la suspensión de NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS con una concentración final de 0,2 mg/mL (respecto a las NPs SiO<sub>2</sub>) y se incubó de la misma manera que en el caso anterior. Para esta muestra, antes de observar al microscopio, se colocó el colorante DAPI. Este fluoróforo es un marcador de núcleo celular y se utilizó para mejorar la visualización de las células y la localización de las nanopartículas.

Como podemos observar en la Figura 29a, el color verde en las imágenes corresponde a la autofluorescencia de las células que se observa cuando utilizamos un filtro de emisión de paso de banda (BP, del inglés: Band Pass) de longitud de onda 690/50 nm. El color rojo (o rosa) corresponde a la emisión del ICG. Dado que, cuando observamos la superposición de la imagen de campo claro con la de fluorescencia, vemos que la emisión del ICG se encuentra dentro de los límites celulares (imagen no mostrada), concluimos que el colorante ha sido interiorizado por las células.

En la Figura 29b, vemos nuevamente que la fluorescencia del ICG, presente en las NPs, junto con la autofluorescencia celular se encuentran dentro de la célula. A su vez, cuando analizamos la imagen de fluorescencia, compuesta por la superposición de las imágenes tomadas con diferentes canales (cada uno para una emisión determinada), vemos zonas amarillas-anaranjadas las cuales resultan de la mezcla (superposición) de la emisión roja y verde, indicando de esta manera una colocalización de ambas emisiones. De esta manera observamos que las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG ingresan a las células HepG2 al igual que el colorante en solución.

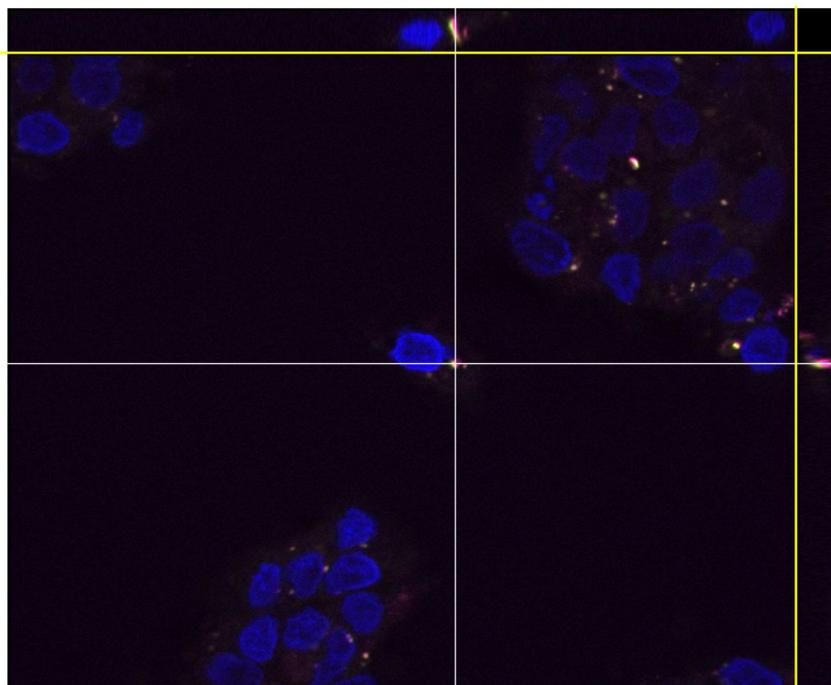
Cuando analizamos la Figura 29c, vemos como primera diferencia, respecto a las imágenes anteriores, la emisión azul correspondiente al DAPI, el cual nos está evidenciando la presencia de los núcleos celulares. Sin embargo, observamos nuevamente zonas verdes, rojas y amarillas, correspondientes a la fluorescencia propia de las células, del ICG en las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS, y de la mezcla de ambas emisiones respectivamente. Este resultado nos estaría indicando la internalización de las NPs por parte de las células.

No obstante, si nos enfocamos en las imágenes de campo claro, vemos que, debido al gran contraste producido por las AuNS, no se logró enfocar bien a las células y por ende no podemos definir los límites celulares. Esto hace que no podamos asegurar, en primera instancia, que las NPs se encuentren dentro de las células o sobre su superficie. Otra cosa interesante que observamos en esta imagen es que la fluorescencia roja no se superpone en ningún momento con el azul del DAPI, lo que nos estaría indicando que las NPs no ingresan al núcleo.



**Figura 29.** Imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia con módulo APOTOME de células HEPG2 incubadas con: a) ICG 30  $\mu\text{M}$  durante 20 min, b) NPs  $\text{SiO}_2$ -ICG 0,2 mg/mL durante 1 h, c) NPs  $\text{SiO}_2$ -ICG@AuNS 0,2 ng/mL durante 1 h, y d) NPs  $\text{SiO}_2$ -ICG@AuNS 0,075 mg/mL durante 24 h.

Para confirmar si las NPs  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  se encuentran dentro de las células o no, escogimos con el microscopio un campo visual donde estuviese una célula sola y realizamos un análisis en el eje z. Con la función Z-stack del microscopio, tomamos imágenes de la célula seleccionada en el plano XY en diferentes posiciones a lo largo del eje Z, de manera de poder obtener una representación tridimensional de la célula. Luego, uno puede elegir diferentes planos (XY, XZ e YZ) para analizar la fluorescencia intracelular.



**Figura 30.** Micrografía de epifluorescencia con módulo APOTOME de células HepG2 incubadas con  $\text{SiO}_2\text{-ICG@AuNS}$  durante 1h. Los márgenes que se encuentran a la derecha y en la parte superior de la imagen, delimitados por las líneas amarillas, son las proyecciones de las imágenes tomadas en el plano XZ e YZ respectivamente que están marcados con líneas blancas. La intersección entre los planos ocurre en una zona donde se encuentran las NPs, y como puede verse en las proyecciones del eje Z, estas partículas se encuentran en el interior de la célula seleccionada para el análisis.

En la Figura 30, el margen derecho y el margen superior de la imagen corresponden a las proyecciones en el plano YZ y XZ seleccionados, respectivamente. La línea blanca horizontal representa la posición en el eje Y del plano XZ seleccionado, mientras que la línea blanca vertical representa la posición en el eje X del plano YZ seleccionado. Como podemos ver en la imagen 2D, la intersección entre ambos planos corresponde a una zona dentro de la célula donde se observa fluorescencia roja y amarilla, las cuales están asociadas, ambas, a la presencia de NPs. Dado que la emisión roja y amarilla se distribuyen a lo largo del eje Z en ambas proyecciones, esto nos pone de manifiesto que

la fluorescencia se encuentra (y por ende las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS también) en el interior de la célula.

Es sabido que algunos colorantes de la familia de las cianinas se localizan en los tejidos de tumores sólidos (próstata,<sup>109</sup> gástrico,<sup>110</sup> riñón,<sup>111</sup> pulmón,<sup>112</sup> glioblastoma,<sup>113,114</sup> e hígado<sup>115</sup>) pero no en tejidos y células normales.<sup>116,117,118,119</sup> La evidencia de varios estudios realizados al respecto sugiere que esto se debe a que estos fluoróforos son incorporados por proteínas transportadoras de aniones orgánicos (OATPs, del inglés: organic anion transporter proteins).<sup>120</sup> Estos receptores OATPs de la superficie de las células son sobreexpresados en tumores sólidos; su función natural es introducir aniones orgánicos (y algunos materiales neutros), los cuales son de importancia para la célula, y balancear este flujo de ingreso. Los receptores OATPs expulsan bicarbonato intracelular, glutatión, y aductos de glutatión.

Usama y colaboradores<sup>121</sup> proponen que la internalización de cianinas iodadas mediada por OATPs determina el potencial para el aumento de la incorporación en los tumores por sobre el tejido sano que no expresa estos receptores. En su trabajo, realizaron una serie de estudios de fluorescencia para establecer el mecanismo de internalización de una cianina iodada en células HepG2. Los resultados obtenidos muestran que hay una menor incorporación de la cianina cuando las OATPs son inhibidas, y una mayor internalización cuando se aumenta la sobreexpresión de los receptores.<sup>121</sup>

#### 4.4.6 Ensayos de PDT y PTT

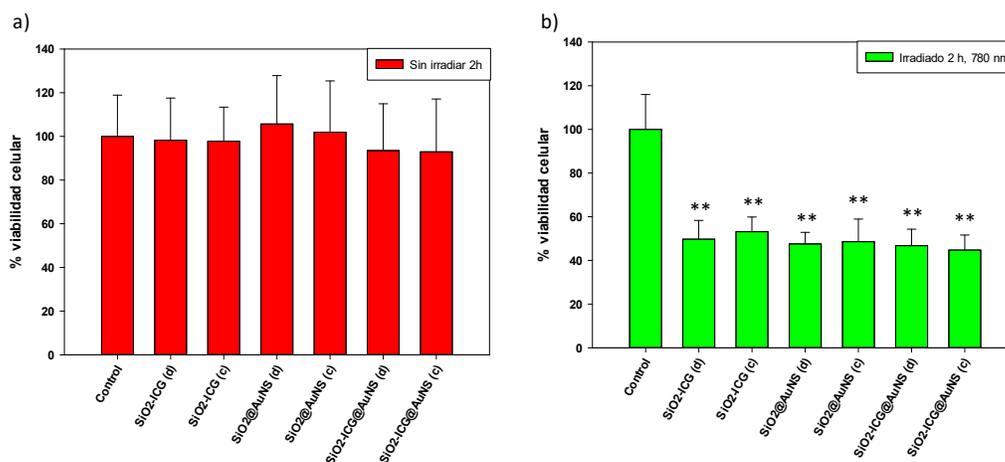
Dependiendo del tipo de ensayo celular que se quiera realizar, puede ser importante conocer la cantidad de células viables remanentes al final del experimento. Hay una gran variedad de métodos de ensayo que pueden ser utilizados para estimar el número de células eucariotas viables. Muchos de estos utilizan compuestos de tetrazolio, entre los cuales se incluye: MTT, MTS, XTT y WST-1. El ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) fue el primer ensayo homogéneo de viabilidad celular desarrollado para un formato de placa de 96 fosas que resultó adecuado para el análisis de alto rendimiento (HTS, del inglés: high throughput screening).<sup>122</sup> La tecnología del ensayo de tetrazolio ha sido ampliamente adoptada y sigue siendo popular en los laboratorios académicos, evidenciado por los miles de artículos publicados con esta técnica. El sustrato MTT es preparado en una solución fisiológicamente balanceada, agregado al cultivo celular, generalmente en una concentración final de 0,2 – 0,5mg/mL, e incubado durante 1 a 4 h (usualmente 3 h). La cantidad de formazan (directamente proporcional al número de células viables) se mide recolectando los cambios en la absorbancia a 570 nm utilizando un espectrofotómetro de lectura de placa. Algunas veces suele utilizarse una referencia de longitud de onda 640 nm, aunque no es necesario en la mayoría de las condiciones del ensayo. Las células



cuando se quiere optimizar las condiciones del ensayo para generar una cantidad suficiente de producto que pueda ser detectado por sobre la señal de fondo.

Tiempos de incubación muy prolongados resultan en acumulación de color e incremento de la sensibilidad hasta un cierto punto, sin embargo, el tiempo de incubación está limitado debido a la naturaleza citotóxica de los agentes de detección que utilizan energía (agentes reductores tal como el NADH) de la célula para generar una señal. Para una población celular en fase de crecimiento logarítmica, la cantidad de formazan producido es generalmente proporcional al número de células viables metabólicamente activas.

Para estudiar el efecto en la PDT y PTT de nuestras nanopartículas, realizamos ensayos MTT de viabilidad celular. La Figura 32 muestra los resultados obtenidos para las muestras incubadas en oscuridad (Figura 32a) y para las muestras irradiadas durante 2 h a 780 nm (Figura 32b).



**Figura 32.** Ensayos de MTT con células HEK293T incubadas con dos concentraciones de NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS y los controles pertinentes (0,025 mg/mL y 0,050 mg/mL) sin irradiar (a) e irradiados durante 2 h con LED de 780 nm (b).

En nuestra metodología de estudio, las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS son las candidatas más adecuadas para ser utilizadas en una terapia combinada de PDT y PTT debido a la presencia de la ICG y las AuNS en el mismo sistema, que permiten tanto la generación de especies reactivas de oxígeno como un aumento de temperatura del medio, respectivamente.

Se ha reportado que la fotoirradiación del ICG produce efecto fototérmico además del efecto fotodinámico.<sup>130,131,132</sup> Este efecto sería el responsable del valor de 42% de eficiencia fototérmica medido en esta tesis para las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG (ver Tabla 6 de este capítulo). Con fines comparativos además de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS, se realizaron

medidas de la viabilidad celular en células incubadas con NPs SiO<sub>2</sub>-ICG, que al no tener las nanoestrellas de oro se esperaba que la citotoxicidad generada por PTT sea menor. Recordemos que los valores más altos de eficiencia fototérmica fueron registrados para los nanomateriales que incluyen a las nanoestrellas de Au en su formulación (Tabla 6). Por otro lado, las células también fueron incubadas con NPs SiO<sub>2</sub>@Au, para poder estudiar, de manera exclusiva, el efecto fototérmico del sistema ya que, al no tener el colorante, se esperaba que la citotoxicidad provenga solamente del aumento de temperatura. Como podemos ver en la Figura 32a, ninguna de las muestras tiene efecto sobre la viabilidad celular cuando las muestras son incubadas en oscuridad. Esto nos estaría indicando que las partículas no son citotóxicas per se, lo cual es una característica deseable a la hora de pensar en un material para uso en tratamientos terapéuticos.

En la Figura 32b podemos observar, a diferencia de lo que ocurre en oscuridad, que todas las muestras generan citotoxicidad luego de ser irradiadas por 2 h a 780 nm. Cuando comparamos con las células control (sin NPs) vemos que los porcentajes de viabilidad celular caen al 45 % aproximadamente (menos de la mitad), indicando el efecto debido a los nanomateriales irradiados. Sin embargo, no podemos establecer diferencias entre los distintos tipos de nanopartículas, ni tampoco entre las diferentes concentraciones de cada muestra. Por lo tanto, no somos capaces de comprobar un efecto sinérgico de las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS, ya que los efectos de la PDT y PTT combinadas no muestran diferencias significativas con respecto a los efectos de PDT y PTT por separado. Probablemente, es posible que en nuestras condiciones experimentales no seamos capaces de obtener el efecto sinérgico esperado, pero esto no significa que no ocurra. Nos queda como desafío probar nuevos arreglos experimentales con el fin de estudiar más a fondo las propiedades del sistema.

## 4.5 Conclusiones parciales

A lo largo de este capítulo hemos desarrollado un sistema capaz de generar por fotoirradiación especies reactivas de oxígeno y aumento de temperatura, lo cual lo coloca como un posible candidato para el desarrollo de un tratamiento combinado de PDT y PTT. Establecimos las estrategias utilizadas para llevar a cabo el ensamblado de este dispositivo, y estudiamos las propiedades ópticas resultantes de las nanopartículas.

En base a todo lo expuesto podemos concluir que:

Hemos logrado ensamblar un nanodispositivo que contiene un fotosensibilizador (ICG) y un agente fototérmico (AuNS) mediante el método LbL, utilizando NPs de sílice como soporte, y los polielectrolitos PAH y PSS como bloques de ensamblado para permitir la incorporación de los agentes terapéuticos.

Hemos caracterizado estas nanopartículas para asegurarnos el correcto ensamblado e incorporación de los componentes de interés, así como también, para comprobar que este nuevo sistema conserva las propiedades ópticas de los componentes individuales. Respecto a este último punto, hemos observado la generación de oxígeno singlete por parte de las NPs así como también un aumento de temperatura de la solución de 12 °C a 0,6 W de potencia del láser.

También hemos demostrado, por medio de microscopia confocal, que nuestro nanodispositivo es incorporado por células tumorales de la línea HepG2, lo cual es de vital importancia para poder llevar a cabo los procesos terapéuticos.

Por último, pudimos establecer en base a los resultados de viabilidad celular, que nuestras partículas no son citotóxicas en oscuridad, mientras que producen una disminución de la viabilidad celular mayor al 50 % al ser irradiadas durante 2 h con un LED de 780 nm. Si bien logramos obtener un efecto citotóxico de las muestras irradiadas, no fuimos capaces de observar diferencias entre las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG@AuNS (tratamiento combinado de PDT y PTT) respecto a las NPs SiO<sub>2</sub>-ICG (tratamiento PDT) y a las NPs SiO<sub>2</sub>@AuNS (tratamiento PTT), por lo cual no pudimos evidenciar un efecto sinérgico de nuestro nanodispositivo.

## 4.6 Referencias

1. Feng, W. *et al.* Flower-like PEGylated MoS<sub>2</sub> nanoflakes for near-infrared photothermal cancer therapy. *Sci. Rep.* (2015). doi:10.1038/srep17422
2. Lu, W. *et al.* Gold nano-popcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* (2010). doi:10.1021/ja104924b
3. Camposeo, A. *et al.* Metal-Enhanced Near-Infrared Fluorescence by Micropatterned Gold Nanocages. *ACS Nano* (2015). doi:10.1021/acsnano.5b03624
4. Huang, X. *et al.* Combined Cancer Chemo-Photodynamic and Photothermal Therapy Based on ICG/PDA/TPZ-Loaded Nanoparticles. *Mol. Pharm.* (2019). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00119
5. Li, L. *et al.* Multifunctional Carbon–Silica Nanocapsules with Gold Core for Synergistic Photothermal and Chemo-Cancer Therapy under the Guidance of Bimodal Imaging. *Adv. Funct. Mater.* (2016). doi:10.1002/adfm.201600985
6. Kim, H. C. *et al.* Magnetic nanoparticle-conjugated polymeric micelles for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale* (2015). doi:10.1039/c5nr04130a
7. Zhao, L. *et al.* Chlorotoxin-Conjugated Multifunctional Dendrimers Labeled with

- Radionuclide  $^{131}\text{I}$  for Single Photon Emission Computed Tomography Imaging and Radiotherapy of Gliomas. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2015). doi:10.1021/acsami.5b05836
8. Wang, Y., Guo, R., Cao, X., Shen, M. & Shi, X. Encapsulation of 2-methoxyestradiol within multifunctional poly(amidoamine) dendrimers for targeted cancer therapy. *Biomaterials* (2011). doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.060
  9. Liu, J. *et al.* Hollow mesoporous silica nanoparticles facilitated drug delivery via cascade pH stimuli in tumor microenvironment for tumor therapy. *Biomaterials* (2016). doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.008
  10. Wang, G. *et al.* Amphiphilic polymer-mediated formation of laponite-based nanohybrids with robust stability and pH sensitivity for anticancer drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2014). doi:10.1021/am5032874
  11. Ding, J. *et al.* CT/fluorescence dual-modal nanoemulsion platform for investigating atherosclerotic plaques. *Biomaterials* (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.025
  12. Cai, H. *et al.* Dendrimer-Assisted Formation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  Nanocomposite Particles for Targeted Dual Mode CT/MR Imaging of Tumors. *Small* (2015). doi:10.1002/smll.201500856
  13. Liu, Z. *et al.* Anti-biofouling polymer-decorated lutetium-based nanoparticulate contrast agents for in vivo high-resolution trimodal imaging. *Small* (2014). doi:10.1002/smll.201303909
  14. Shan, Y. *et al.* Gene delivery using dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nonviral vectors. *Biomaterials* (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.045
  15. Lin, F. X. *et al.* Chitosan-based core-shell structured particles for in vivo sustainable gene transfection. *J. Mater. Chem. B* (2016). doi:10.1039/c5tb02074c
  16. Jheng, P. R., Lu, K. Y., Yu, S. H. & Mi, F. L. Free DOX and chitosan-N-arginine conjugate stabilized indocyanine green nanoparticles for combined chemophotothermal therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2015). doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.032
  17. Yu, Y. *et al.* A new NIR-triggered doxorubicin and photosensitizer indocyanine green co-delivery system for enhanced multidrug resistant cancer treatment through simultaneous chemo/photothermal/photodynamic therapy. *Acta Biomater.* (2017). doi:10.1016/j.actbio.2017.06.026
  18. Giraudeau, C., Moussaron, A., Stallivieri, A., Mordon, S. & Frochot, C. Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a Debate. *Curr. Med. Chem.* (2014). doi:10.2174/0929867321666131218095802
  19. Saxena, V., Sadoqi, M. & Shao, J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* (2003). doi:10.1002/jps.10470

20. Ralph Weissleder. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* (2001). doi:10.1038/86684
21. Wang, Y. *et al.* Tumor-Penetrating Nanoparticles for Enhanced Anticancer Activity of Combined Photodynamic and Hypoxia-Activated Therapy. *ACS Nano* (2017). doi:10.1021/acsnano.6b08731
22. Kosaka, N., Mitsunaga, M., Longmire, M. R., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *Int. J. Cancer* (2011). doi:10.1002/ijc.26113
23. Martirosyan, N. L. *et al.* Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor: Laboratory investigation. *J. Neurosurg.* (2011). doi:10.3171/2011.8.JNS11559
24. Tummers, Q. R. J. G. *et al.* The value of intraoperative near-infrared fluorescence imaging based on enhanced permeability and retention of indocyanine green: Feasibility and false-positives in ovarian cancer. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0129766
25. Abels, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem. Photobiol. Sci.* (2004). doi:10.1039/b314241h
26. Onda, N., Kimura, M., Yoshida, T. & Shibutani, M. Preferential tumor cellular uptake and retention of indocyanine green for in vivo tumor imaging. *Int. J. Cancer* (2016). doi:10.1002/ijc.30102
27. Abels, C. *et al.* Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch. Dermatol. Res.* (2000). doi:10.1007/s004030000147
28. Yan, F. *et al.* Molecular imaging-guided photothermal/photodynamic therapy against tumor by iRGD-modified indocyanine green nanoparticles. *J. Control. Release* (2016). doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.050
29. Chen, W. *et al.* Black Phosphorus Nanosheet-Based Drug Delivery System for Synergistic Photodynamic/Photothermal/Chemotherapy of Cancer. *Adv. Mater.* (2017). doi:10.1002/adma.201603864
30. Versiani, A. F. *et al.* Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. (2016).
31. Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* (2010). doi:10.1016/j.jare.2010.02.002
32. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* (2007). doi:10.2217/17435889.2.5.681
33. Yang, W., Liang, H., Ma, S., Wang, D. & Huang, J. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer

- treatment. *Sustainable Materials and Technologies* (2019). doi:10.1016/j.susmat.2019.e00109
34. Day, E. S., Morton, J. G. & West, J. L. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *Journal of Biomechanical Engineering* (2009). doi:10.1115/1.3156800
  35. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: A potential cancer diagnostic marker. *Nano Lett.* (2007). doi:10.1021/nl070472c
  36. Wang, L. *et al.* Characterization of gold nanorods in vivo by integrated analytical techniques: Their uptake, retention, and chemical forms. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010). doi:10.1007/s00216-009-3302-y
  37. Huff, T. B. *et al.* Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine* (2007). doi:10.2217/17435889.2.1.125
  38. Qiu, Y. *et al.* Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* (2010). doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.051
  39. Hirsch, L. R. *et al.* Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003). doi:10.1073/pnas.2232479100
  40. Lal, S., Clare, S. E. & Halas, N. J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: Impending clinical impact. *Acc. Chem. Res.* (2008). doi:10.1021/ar800150g
  41. O'Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D. & West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* (2004). doi:10.1016/j.canlet.2004.02.004
  42. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2017). doi:10.1002/wnan.1449
  43. Bernardi, R. J., Lowery, A. R., Thompson, P. A., Blaney, S. M. & West, J. L. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation in medulloblastoma and glioma: An in vitro evaluation using human cell lines. *J. Neurooncol.* (2008). doi:10.1007/s11060-007-9467-3
  44. Senthil Kumar, P., Pastoriza-Santos, I., Rodríguez-González, B., Javier García De Abajo, F. & Liz-Marzán, L. M. High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* (2008). doi:10.1088/0957-4484/19/01/015606
  45. Hao, E., Bailey, R. C., Schatz, G. C., Hupp, J. T. & Li, S. Synthesis and Optical Properties of 'Branched' Gold Nanocrystals. *Nano Lett.* (2004). doi:10.1021/nl0351542
  46. Hao, F., Nehl, C. L., Hafner, J. H. & Nordlander, P. Plasmon resonances of a gold nanostar. *Nano Lett.* (2007). doi:10.1021/nl062969c

47. Khoury, C. G. & Vo-Dinh, T. Gold nanostars for surface-enhanced Raman scattering: synthesis, characterization and optimization. *J. Phys. Chem. C* (2008). doi:10.1021/jp8054747
48. Alvarez-Puebla, R., Liz-Marzán, L. M. & García De Abajo, F. J. Light concentration at the nanometer scale. *J. Phys. Chem. Lett.* (2010). doi:10.1021/jz100820m
49. Chen, H. *et al.* Understanding the photothermal conversion efficiency of gold nanocrystals. *Small* (2010). doi:10.1002/smll.201001109
50. Abadeer, N. S. & Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**, 4691–4716 (2016).
51. Jang, B., Kim, Y. S. & Choi, Y. Effects of gold Nanorod concentration on the depth-related temperature increase during hyperthermic ablation. *Small* (2011). doi:10.1002/smll.201001532
52. Chen, H. *et al.* Multifunctional gold nanostar conjugates for tumor imaging and combined photothermal and chemo-therapy. *Theranostics* (2013). doi:10.7150/thno.6630
53. Hu, Y. *et al.* Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au core/shell nanostars: A unique platform for multimode imaging and photothermal therapy of tumors. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep28325
54. MacKey, M. A., Ali, M. R. K., Austin, L. A., Near, R. D. & El-Sayed, M. A. The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: Theory and in vitro experiments. *J. Phys. Chem. B* (2014). doi:10.1021/jp409298f
55. Lin, A. Y., Young, J. K., Nixon, A. V. & Drezek, R. A. Synthesis of a quantum nanocrystal-gold nanoshell complex for near-infrared generated fluorescence and photothermal decay of luminescence. *Nanoscale* (2014). doi:10.1039/c4nr01721h
56. Li, D. *et al.* Construction of polydopamine-coated gold nanostars for CT imaging and enhanced photothermal therapy of tumors: An innovative theranostic strategy. *J. Mater. Chem. B* (2016). doi:10.1039/c6tb00773b
57. Li, J. *et al.* Hyaluronic acid-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au core/shell nanostars for multimodal imaging and photothermal therapy of tumors. *Biomaterials* (2015). doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.065
58. Huang, X. *et al.* Comparative study of photothermolysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers. *J. Biomed. Opt.* (2010). doi:10.1117/1.3486538
59. Li, J. L. & Gu, M. Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells. *Biomaterials* (2010). doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.068
60. Tong, L. *et al.* Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity. *Adv. Mater.* (2007). doi:10.1002/adma.200701974

61. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncology* (2002). doi:10.1016/S1470-2045(02)00818-5
62. Ciocca, D. R. & Calderwood, S. K. Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* (2005). doi:10.1379/CSC-99r.1
63. Calderwood, S. K. & Ciocca, D. R. Heat shock proteins: Stress proteins with Janus-like properties in cancer. *Int. J. Hyperth.* **24**, 31–39 (2008).
64. Qian, L. P., Zhou, L. H., Too, H. P. & Chow, G. M. Gold decorated NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er/NaYF<sub>4</sub>/silica (core/shell/shell) upconversion nanoparticles for photothermal destruction of BE(2)-C neuroblastoma cells. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 499–510 (2011).
65. Wu, P., Gao, Y., Zhang, H. & Cai, C. Aptamer-guided silver-gold bimetallic nanostructures with highly active surface-enhanced Raman scattering for specific detection and near-infrared photothermal therapy of human breast cancer cells. *Anal. Chem.* (2012). doi:10.1021/ac3015164
66. Ke, H. *et al.* Gold-nanoshelled microcapsules: A theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2011). doi:10.1002/anie.201008286
67. Khan, S. A. *et al.* A gold nanocage-CNT hybrid for targeted imaging and photothermal destruction of cancer cells. *Chem. Commun.* (2012). doi:10.1039/c2cc32313c
68. Yang, X. *et al.* Near-infrared light-triggered, targeted drug delivery to cancer cells by aptamer gated nanovehicles. *Adv. Mater.* (2012). doi:10.1002/adma.201104797
69. Shi, P. *et al.* PH-responsive NIR enhanced drug release from gold nanocages possesses high potency against cancer cells. *Chem. Commun.* (2012). doi:10.1039/c2cc33543c
70. Ma, Y. *et al.* Gold nanoshell nanomicelles for potential magnetic resonance imaging, light-triggered drug release, and photothermal therapy. *Adv. Funct. Mater.* (2013). doi:10.1002/adfm.201201663
71. Gao, L. *et al.* Hypocrellin-loaded gold nanocages with high two-photon efficiency for photothermal/photodynamic cancer therapy in vitro. *ACS Nano* (2012). doi:10.1021/nn302634m
72. Wang, J. *et al.* Assembly of aptamer switch probes and photosensitizer on gold nanorods for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy. *ACS Nano* (2012). doi:10.1021/nn300694v
73. Kuo, W. S. *et al.* Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials* **33**, 3270–3278 (2012).
74. Lohse, S. E., Eller, J. R., Sivapalan, S. T., Plews, M. R. & Murphy, C. J. A simple

- millifluidic benchtop reactor system for the high-throughput synthesis and functionalization of gold nanoparticles with different sizes and shapes. *ACS Nano* (2013). doi:10.1021/nn4005022
75. Sebastian Cabeza, V., Kuhn, S., Kulkarni, A. A. & Jensen, K. F. Size-controlled flow synthesis of gold nanoparticles using a segmented flow microfluidic platform. *Langmuir* (2012). doi:10.1021/la205131e
76. Shukla, R. *et al.* Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* (2005). doi:10.1021/la0513712
77. Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? *J. Nanoparticle Res.* (2010). doi:10.1007/s11051-010-9911-8
78. Grzincic, E. M., Yang, J. A., Drnevich, J., Falagan-Lotsch, P. & Murphy, C. J. Global transcriptomic analysis of model human cell lines exposed to surface-modified gold nanoparticles: The effect of surface chemistry. *Nanoscale* (2015). doi:10.1039/c4nr05166a
79. Yang, J. A., Phan, H. T., Vaidya, S. & Murphy, C. J. Nanovacuum: Nanoparticle uptake and differential cellular migration on a carpet of nanoparticles. *Nano Lett.* (2013). doi:10.1021/nl400972r
80. Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. & Wyatt, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* (2005). doi:10.1002/smll.200400093
81. Akiyama, Y., Mori, T., Katayama, Y. & Niidome, T. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *J. Control. Release* (2009). doi:10.1016/j.jconrel.2009.06.006
82. Khlebtsov, N. & Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews* (2011). doi:10.1039/c0cs00018c
83. Popovtzer, R. *et al.* Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer. *Nano Lett.* (2008). doi:10.1021/nl8029114
84. Kim, D., Jeong, Y. Y. & Jon, S. A drug-loaded aptamer - Gold nanoparticle bioconjugate for combined ct imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano* (2010). doi:10.1021/nn901877h
85. Huang, Y. F., Sefah, K., Bamrungsap, S., Chang, H. T. & Tan, W. Selective photothermal therapy for mixed cancer cells using aptamer-conjugated nanorods. *Langmuir* (2008). doi:10.1021/la801969c
86. Tong, L., Wei, Q., Wei, A. & Cheng, J. X. Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: Optical properties, surface conjugation and photothermal effects. *Photochemistry and Photobiology* (2009). doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00507.x

87. El-Sayed, I. H., Huang, X. & El-Sayed, M. A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* (2006). doi:10.1016/j.canlet.2005.07.035
88. Link, S., Burda, C., Mohamed, M. B., Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. A. Laser Photothermal Melting and Fragmentation of Gold Nanorods: Energy and Laser Pulse-Width Dependence. *Journal of Physical Chemistry A* (1999).
89. Gittins, D. I., Susha, A. S., Schoeler, B. & Caruso, F. Dense nanoparticulate thin films via gold nanoparticle self-assembly. *Adv. Mater.* (2002). doi:10.1002/1521-4095(20020404)14:7<508::AID-ADMA508>3.0.CO;2-T
90. Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* (80-. ). (1997). doi:10.1126/science.277.5330.1232
91. Richardson, J. J. *et al.* Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chemical Reviews* (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00627
92. Sukhorukov, G. B. *et al.* Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (1998). doi:10.1016/S0927-7757(98)00213-1
93. Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* (2006). doi:10.1002/adma.200600113
94. Ariga, K. *et al.* Layer-by-layer Nanoarchitectonics: Invention, Innovation, and Evolution. *Chem. Lett.* (2014). doi:10.1246/cl.130987
95. Kotov, N. A., Dékány, I. & Fendler, J. H. Ultrathin graphite oxide-polyelectrolyte composites prepared by self-assembly: Transition between conductive and non-conductive states. *Adv. Mater.* (1996). doi:10.1002/adma.19960080806
96. Zheng, Z., Li, X., Dai, Z., Liu, S. & Tang, Z. Detection of mixed organophosphorus pesticides in real samples using quantum dots/bi-enzyme assembly multilayers. *J. Mater. Chem.* (2011). doi:10.1039/c1jm11631b
97. Allain, C. C., Poon, L. S. & Chan, C. S. G. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* (1974). doi:10.1093/clinchem/20.4.470
98. Anderson, W. J., Nowinska, K., Hutter, T., Mahajan, S. & Fischlechner, M. Tuning plasmons layer-by-layer for quantitative colloidal sensing with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Nanoscale* (2018). doi:10.1039/c7nr06656b
99. Schweitzer, C. & Schmidt, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* (2007). doi:10.1021/cr010371d
100. Ogilby, P. R. Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews* (2010). doi:10.1039/b926014p
101. Gollmer, A. *et al.* Singlet oxygen sensor green<sup>®</sup>: Photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochem. Photobiol.* (2011). doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00900.x

102. Ruhi, M. K., Ak, A. & Gülsoy, M. Dose-dependent photochemical/photothermal toxicity of indocyanine green-based therapy on three different cancer cell lines. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2018). doi:10.1016/j.pdpdt.2018.01.008
103. Tang, C. Y. *et al.* A classic near-infrared probe indocyanine green for detecting singlet oxygen. *Int. J. Mol. Sci.* (2016). doi:10.3390/ijms17020219
104. Carlos, L., Pedersen, B. W., Ogilby, P. R. & Mártire, D. O. The role of humic acid aggregation on the kinetics of photosensitized singlet oxygen production and decay. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2011). doi:10.1039/c1pp00003a
105. Richardson, H. H., Carlson, M. T., Tandler, P. J., Hernandez, P. & Govorov, A. O. Experimental and theoretical studies of light-to-heat conversion and collective heating effects in metal nanoparticle solutions. *Nano Lett.* (2009). doi:10.1021/nl8036905
106. Hessel, C. M. *et al.* Copper selenide nanocrystals for photothermal therapy. *Nano Lett.* **11**, 2560–2566 (2011).
107. Hu, M. & Hartland, G. V. Heat dissipation for au particles in aqueous solution: Relaxation time versus size. *J. Phys. Chem. B* (2002). doi:10.1021/jp020581CCC:22.00
108. Chou, C. H., Chen, C. D. & Wang, C. R. C. Highly efficient, wavelength-tunable, gold nanoparticle based optothermal nanoconvertors. *J. Phys. Chem. B* (2005). doi:10.1021/jp0444520
109. Yuan, J. *et al.* Nearinfrared fluorescence imaging of prostate cancer using heptamethine carbocyanine dyes. *Mol. Med. Rep.* (2015). doi:10.3892/mmr.2014.2815
110. Zhao, N. *et al.* Optical imaging of gastric cancer with near-infrared heptamethine carbocyanine fluorescence dyes. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10031
111. Yang, X. *et al.* Optical imaging of kidney cancer with novel near infrared heptamethine carbocyanine fluorescent dyes. *J. Urol.* (2013). doi:10.1016/j.juro.2012.09.056
112. Luo, S. *et al.* A multifunctional heptamethine near-infrared dye for cancer theranosis. *Biomaterials* (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2012.11.057
113. Wu, J. B. *et al.* Near-infrared fluorescence heptamethine carbocyanine dyes mediate imaging and targeted drug delivery for human brain tumor. *Biomaterials* (2015). doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.028
114. Kushal, S. *et al.* Monoamine oxidase A (MAO A) inhibitors decrease glioma progression. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.7283
115. An, J. *et al.* Heptamethine carbocyanine DZ-1 dye for near-infrared fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.18131

116. Yang, X. *et al.* Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging. *Clin. Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0059
117. Zhang, C. *et al.* A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. *Biomaterials* (2010). doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.007
118. Luo, S., Yang, X. & Shi, C. Newly Emerging Theranostic Agents for Simultaneous Cancer-targeted Imaging and Therapy. *Curr. Med. Chem.* (2016). doi:10.2174/0929867323666151223095718
119. Gao, M., Yu, F., Lv, C., Choo, J. & Chen, L. Fluorescent chemical probes for accurate tumor diagnosis and targeting therapy. *Chemical Society Reviews* (2017). doi:10.1039/c6cs00908e
120. Thakkar, N., Lockhart, A. C. & Lee, W. Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) in Cancer Therapy. *AAPS J.* (2015). doi:10.1208/s12248-015-9740-x
121. Usama, S. M., Thavornpradit, S. & Burgess, K. Optimized Heptamethine Cyanines for Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* (2018). doi:10.1021/acsabm.8b00414
122. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (1983). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
123. Marshall, N. J., Goodwin, C. J. & Holt, S. J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* (1995).
124. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* (1993). doi:10.1006/abbi.1993.1311
125. Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. & Wang, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* (1996).
126. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K. ichi, Koyama, M. & Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* (1986). doi:10.1016/0022-1759(86)90183-3
127. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. & Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* (1989). doi:10.1016/0022-1759(89)90397-9
128. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* (1986). doi:10.1016/0022-1759(86)90368-6
129. Plumb, J. A., Milroy, R. & Kaye, S. B. Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-

- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Res.* **49**, 4435–4440 (1989).
130. Topaloglu, N., Guney, M., Aysan, N., Gulsoy, M. & Yuksel, S. The role of reactive oxygen species in the antibacterial photodynamic treatment: Photoinactivation vs proliferation. *Lett. Appl. Microbiol.* (2016). doi:10.1111/lam.12538
  131. Chen, W. R. *et al.* Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Res.* (2002).
  132. Shirata, C. *et al.* Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-14401-0

---

## Capítulo 5

# ***CONCLUSIONES GENERALES***



### Conclusiones del capítulo 3:

Se sintetizaron, mediante una nueva estrategia, nanopartículas core-shell  $\text{SiO}_2@Ag$  y  $\text{SiO}_2@Au$  por un método de dos etapas, las cuales involucran la formación de núcleos homogéneos de plata u oro sobre esferas de sílice coloidales, seguida de un proceso fotoquímico empleado para el crecimiento de nanopartículas a partir de las semillas.

Los experimentos de espectroscopía de absorción de transientes mostraron que en muestras con Rf y NPs  $\text{SiO}_2@Ag$ -low, la absorción de estado excitado triplete de la Riboflavina no se observa debido a un proceso de transferencia de electrones desde la Ag al estado excitado del complejo formado entre la Rf y las nanopartículas  $\text{SiO}_2@Ag$ -low. Este resultado significa que bajo estas condiciones luego de la fotoirradiación se liberan iones  $Ag^+$  al medio acuoso.

Es sabido que la liberación controlada de iones  $Ag^+$  en las cercanías de las paredes celulares de microorganismos contribuye a la actividad bactericida de los nanomateriales de plata.<sup>44,45</sup> Por esta razón, las NP core-shell  $\text{SiO}_2@Ag$ -low son candidatos prometedores para la inactivación fotodinámica (PDI) de microorganismos. La fotoirradiación de la Riboflavina en suspensiones de nanopartículas debería liberar iones  $Ag^+$ , incrementando el efecto bactericida intrínseco de los materiales no irradiados.

### Conclusiones del capítulo 4:

Se ensambló un nanodispositivo que contiene un fotosensibilizador (ICG) y un agente fototérmico (AuNS) mediante el método capa por capa, utilizando NPs de sílice como soporte, y los polielectrolitos PAH y PSS como bloques de ensamblado para permitir la incorporación de los agentes terapéuticos.

La caracterización de las nanopartículas demostró que este nuevo sistema conserva las propiedades ópticas de los componentes individuales. Se verificó la generación de oxígeno singlete por parte de las NPs así como también un aumento de temperatura de la solución de 12 °C al ser irradiada a 800 nm.

También hemos demostrado, por medio de microscopía confocal, que nuestro nanodispositivo es incorporado por células tumorales de la línea HepG2, lo cual es de vital importancia para poder llevar a cabo los procesos terapéuticos.

Ensayos de viabilidad celular demostraron que nuestras partículas no son citotóxicas en oscuridad, mientras que producen una disminución de la viabilidad celular mayor al 50 % al ser irradiadas durante 2 h con un LED de 780 nm.

En conclusión, hemos desarrollado un sistema capaz de realizar PDT y PTT simultáneamente, las estrategias utilizadas para llevar a cabo el ensamblado de este dispositivo, y las propiedades ópticas resultantes de las nanopartículas.