

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Diseño de un nanocentellador acoplado a protoporfirina IX
para su potencial aplicación en la terapia fotodinámica**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Karelid García Tapia

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Karelid García Tapia

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. Hugo Alejandro Borbón Núñez

Dra. Patricia Juárez Camacho



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Karelid García Tapia © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Karelid García Tapia** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Diseño de un nanocentellador acoplado a protoporfirina IX para su potencial aplicación en la terapia fotodinámica

Resumen aprobado por:

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento prometedor contra el cáncer, sin embargo, una de sus principales limitaciones es la baja eficiencia en el tratamiento de tumores profundos debido a que la fuente de luz que se utiliza no puede alcanzarlos. Por esta razón, el desarrollo de nuevos materiales luminiscentes aplicados a la TFD es un área de reciente interés en la biomedicina. Los rayos-X son considerados como una fuente potencial de energía para activar un fotosensibilizador localizado en el tejido profundo con ayuda de nanopartículas centelleantes. Es por ello que en este trabajo se sintetizó y caracterizó el nanomaterial YAG:Pr@ZnO@PpIX, el cual presenta propiedades centellantes, y que debido a la presencia del óxido de zinc y las moléculas de protoporfirina IX (PpIX) en su superficie, el sistema puede generar especies reactivas de oxígeno, las cuales causan toxicidad celular. Las nanopartículas de YAG:Pr fueron sintetizadas por tres métodos de síntesis diferentes: sol-gel, combustión y precipitación, de los cuales el método que se seleccionó fue sol-gel debido a las propiedades fisicoquímicas favorables que presentaron las nanopartículas. Además, se evaluaron diferentes porcentajes de dopante para optimizar la luminiscencia del material. El material sintetizado fue caracterizado por microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos-X (XRD), espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de fotoelectrones de rayos-X (XPS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y catodoluminiscencia. La luminiscencia de YAG:Pr mostró un amplio espectro principalmente en la región UV-Vis (300 nm–450 nm). Las imágenes TEM de YAG:Pr@ZnO mostraron morfología esférica y una pequeña capa de ZnO entre 7 nm y 10 nm. Por otro lado, en el espectro FTIR se presentaron bandas que corresponden con las vibraciones de la PpIX. Después de un análisis sistemático del nanocentellador YAG:Pr@ZnO@PpIX se concluyó que el sistema presenta una transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) debido al traslape en la región UV-Vis de los espectros de emisión de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO y el espectro de absorción de la PpIX. Se observó el mismo efecto cuando el nanocentellador fue evaluado por catodoluminiscencia. Por otra parte, el nanocentellador YAG:Pr@ZnO@PpIX generó ROS tras su exposición bajo irradiación UV (365 nm). El efecto citotóxico del nanocentellador fue evaluado en la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 mediante un ensayo colorimétrico por la reducción del compuesto tetrazol. Los estudios de viabilidad celular mostraron que después de la incubación del material en la oscuridad, no hubo toxicidad celular significativa. Sin embargo, cuando las células de melanoma fueron expuestas bajo radiación UV por 30 min, la viabilidad celular promedio fue de 30% a una concentración de 70 µg/ml de YAG:Pr@ZnO@PpIX. Se calculó la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de las nanopartículas siendo esta de 58.8 µg/ml. En conclusión, ya que el nanocentellador mostró una efectiva toxicidad celular al ser irradiado con luz UV y debido a los resultados de catodoluminiscencia, se puede establecer que el sistema YAG:Pr@ZnO@PpIX muestra gran potencial para aplicarse en la terapia fotodinámica activada por rayos-X para tumores de tejido profundo.

Palabras clave: nanocentellador, protoporfirina IX, citotoxicidad

Abstract of the thesis presented by **Karelid Garcia Tapia** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Design of a nanoscintillator coupled with protoporphyrin IX for its potential application in photodynamic therapy

Abstract approved by:

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Director de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Photodynamic therapy (PDT) is a promising cancer treatment method. However, a mayor limitation is its low efficiency in treating deep tumors because photons cannot reach into these tissues. Therefore, the development of novel luminescent nanomaterials applied to PDT has recently being a major area in biomedicine. X-rays are considered as a potential energy source to activate photosensitizers located deeply in the body with the assistance of scintillating nanoparticles. Thus, in this work we report the synthesis and characterization of YAG:Pr@ZnO@PpIX a novel nanomaterial which possesses scintillating properties. Due to the presence of zinc oxide and the protoporphyrin (PpIX) molecules in its surface the system can generate reactive oxygen species (ROS), which cause cellular toxicity. The nanoparticles were synthesized by three different methods, sol-gel, combustion and precipitation and different percentage of dopant were tested to optimize the luminescence intensity of the phosphor. The sol-gel method was selected due to its good physicochemical properties. This nanoscintillator was fully characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), fluorescence spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and cathodoluminescence. The luminescence of YAG:Pr showed a broad espectrum in UV-Vis region (300–450 nm) mainly. The TEM images for YAG:Pr@ZnO revealed spherical morphology and a thin ZnO layer of about 7-10 nm. On the other hand, the FTIR spectra showed bands that can be assigned to characteristics vibrations of PpIX. After a systematical investigation of YAG:Pr@ZnO@PpIX we can stablish that this system has an efficient fluorescence resonance energy transfer (FRET) due to its well spectrum match between YAG:Pr@ZnO (emission spectra) and PpIX (absortion spectra). The same effect was observed when the nanoscintillator was evaluated by cathodoluminescence. Furthermore, under UV irradiation (365 nm), the generation of ROS is enhanced by the YAG:Pr@ZnO@PpIX nanoscintillator. The cytotoxic effect of nanoscintillator was tested in mouse melanoma cell line B16-F10, by a colorimetric assay using the tetrazolium salt. The cell viability showed that after incubating the nanomaterial in darkness, there was not significative toxicity. However, when melanoma cells were exposed under UV radiation for 30 minutes the average of cell viability was 30% at 70 µg/ml of YAG:Pr@ZnO@PpIX. The calculation of the median inhibitory concentration (IC₅₀) of the nanomaterial was 58.8 µg/ml. Since the nanoscintillator showed cellular toxicity under UV radiation and owing to the cathodoluminescence results we can conclude that this YAG:Pr@ZnO@PpIX system exhibits an excellent potential to be applied in X-ray stimulated PDT for deep-seated tumor.

Keywords: nanoscintillator, protoporphyrin IX, cytotoxicity

Dedicatoria

A mi familia y mi novio Antonio Juárez porque me apoyaron de forma incondicional durante todo este trayecto

Agradecimientos

Al Dr. Gustavo Hirata F. y la Dra. Karla Oyuky Juárez M. por su dirección, apoyo y dedicación durante el desarrollo de mi tesis

Al comité de tesis conformado por la Dra. Patricia Juárez y el Dr. Hugo Borbón por su ayuda y observaciones durante los avances y escritura de tesis.

A Carlos Muñoz, Omar Silva y Gloria Carvajal que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, dándome ánimo.

A todo el personal administrativo de CNyN y CICESE por sus atenciones y amabilidad en todos los trámites y dudas.

A la M. C. Eloisa Aparicio por su apoyo en difracción de rayos X.

Al M. C. Francisco Ruiz por su apoyo en microscopía electrónica de transmisión.

Al Ing. Israel Gradilla por su apoyo en catodoluminiscencia.

Al Dr. Mario Humberto Guzmán por su ayuda en espectroscopía por infrarrojo.

Al M. C. David Domínguez por su ayuda en espectroscopía de fotoelectrones de rayos X.

Un especial agradecimiento a la Dra. Ana Bertha Castro Ceceña y a la Dra. Kara Oyuky Juárez Moreno por brindarme su asesoría, su tiempo y por darme ánimo para seguir adelante con mis sueños.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Luminiscencia	1
1.1.2 Materiales luminiscentes	1
1.1.3 Centelladores	4
1.1.4 Terapia fotodinámica (TFD).....	7
1.1.5 Fotosensibilizadores.....	8
1.1.6 Retos y limitaciones en la TFD.....	13
1.1.7 Soluciones a los retos y limitaciones de la TFD	14
1.1.8 Estrategias para mejorar la terapia fotodinámica.....	18
1.2 Hipótesis	19
1.3 Objetivos.....	20
1.3.1 Objetivo general.....	20
1.3.2 Objetivos particulares	20
Capítulo 2 Metodología.....	21
2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio e itrio dopadas con praseodimio (YAG:Pr).....	21
2.1.1 Síntesis por el método de combustión en solución	21
2.1.2 Síntesis por el método de sol-gel	22
2.1.3 Síntesis por el método de precipitación.....	23
2.2 Recubrimiento de YAG:Pr con óxido de zinc (ZnO)	24
2.3 Funcionalización de YAG:Pr@ZnO con grupos amina	26
2.4 Funcionalización de YAG:Pr@ZnO-NH₂ con protoporfirina IX	26
2.5 Detección de los radicales hidroxilo empleando el colorante azul de metileno.....	26

2.6 Detección del singulete de oxígeno empleando 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF)	27
2.7 Ensayos de viabilidad celular	27
2.7.1 Medio de cultivo.....	27
2.7.2 Tratamiento con tripsina.....	28
2.7.3 Conteo de células mediante el método de exclusión por azul tripano.....	28
2.7.4 Ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT.....	29
2.7.5 Fototoxicidad.....	30
2.8 Técnicas de caracterización de las nanopartículas YAG:Pr@ZnO@PpIX	30
Capítulo 3. Resultados	31
3.1 Caracterización del nanocentellador óxido de aluminio e itrio dopado con praseodimio (YAG:Pr)	31
3.1.1 Microscopía electrónica de transmisión de YAG:Pr	31
3.1.2 Difracción de rayos X de YAG:Pr.....	32
3.1.3 Fotoluminiscencia de YAG:Pr	32
3.2 Caracterización del nanocentellador SSG YAG:Pr recubierto con óxido de zinc (ZnO)	34
3.2.1 Microscopía electrónica de transmisión de YAG:Pr@ZnO	35
3.2.2 Difracción de rayos X de YAG:Pr@ZnO	35
3.2.3 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) de YAG:Pr@ZnO.....	36
3.3 Caracterización del nanocentellador YAG:Pr@ZnO recubierto con protoporfirina IX (PpIX)	38
3.3.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	38
3.3.2 Caracterización superficial por fotoluminiscencia y UV-Vis.....	38
3.3.3 Evaluación del efecto de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET)	40
3.4 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	41
3.4.1 Radicales hidroxilo (\bullet OH)	41
3.4.2 Singulete de oxígeno	42
3.5 Ensayos de viabilidad celular	43
Capítulo 4 Discusión de resultados	45
Capítulo 5 Conclusiones	49
Literatura citada	51
Anexos	55
Determinación del tamaño de cristal en el nanocentellador YAG:Pr.....	55

Lista de figuras

Figura 1. Representación del fenómeno de luminiscencia en un material	2
Figura 2. Estructura de YAG.....	3
Figura 3. Esquema de los niveles de energía y procesos de relajación de YAG:Pr	4
Figura 4. Mecanismo general de un centellador.....	5
Figura 5. Mecanismos de centelleo en cristales	6
Figura 6. Los principios de la TFD.....	8
Figura 7. Diagrama de Jablonsky	9
Figura 8. Ejemplos de reacciones del singulete de oxígeno con componentes celulares	10
Figura 9. Estructura química de una porfirina.....	10
Figura 10. Afinidad de la porfirina y varias proteínas séricas	12
Figura 11. Curva de acumulación de la porfirina en tejido de ratón	13
Figura 12. Espectro de emisión del nanocentellador $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$	15
Figura 13. El espectro de absorción de la PpIX y el espectro de emisión las microesferas de fluoruro de lantano dopado con Ce^{3+}	16
Figura 14. Espectros de absorción y emisión medidos para las nanopartículas centelleantes y para la porfirina dispersada en etanol.....	17
Figura 15. Los pares electrón–hueco ($e^- - h^+$) se forman después de la exposición a la radiación ionizante.	18
Figura 16. Esquema del proceso de sol-gel.....	23
Figura 17. Proceso de deposición por capa atómica.....	25
Figura 18. Micrografías electrónicas de las nanopartículas de YAG:Pr.....	32
Figura 19. Patrón de difracción de rayos X de los materiales YAG:Pr.....	33
Figura 20. Espectros de fotoluminiscencia de YAG:Pr	34
Figura 21. Imágenes obtenidas por TEM de YAG:Pr@ZnO	35
Figura 22. Patrón de difracción de rayos X de YAG:Pr@ZnO.....	36

Figura 23. Espectro de XPS de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO.....	37
Figura 24. Espectros de infrarrojo de YAG:Pr, YAG:Pr@ZnO, YAG:Pr@ZnO@PpIX y PpIX	39
Figura 25. Espectros de emisión y absorción del nanocentellador.....	39
Figura 26. Espectros de emisión de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO y espectro de absorción de PpIX ...	40
Figura 27. Espectros de catodoluminiscencia y absorción del nanocentellador	41
Figura 28. Medición de los radicales hidroxilo mediante azul de metileno	42
Figura 29. Medición del singulete de oxígeno	43

Lista de tablas

Tabla 1. Tipos de luminiscencia de acuerdo con la fuente de excitación. (Lucas et al., 2015).....	1
Tabla 2. Análisis XPS de los materiales YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO.	37

Capítulo 1 Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Luminiscencia

La luminiscencia es un fenómeno en donde una sustancia emite luz visible cuando es sometida a una fuente externa de energía. Los materiales que presentan este fenómeno son llamados materiales luminiscentes. Existen diferentes tipos de luminiscencia de acuerdo con la fuente externa de energía aplicada (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de luminiscencia de acuerdo con la fuente de excitación (Lucas et al., 2015).

Fuente de excitación	Luminiscencia
Fotones	Fotoluminiscencia
Electrones	Catodoluminiscencia
Campo eléctrico	Electroluminiscencia
Reacción química	Quimioluminiscencia
Fuerza mecánica	Triboluminiscencia
Calor, radiación ionizante	Termoluminiscencia

1.1.2 Materiales luminiscentes

Los materiales luminiscentes constan de una red anfitriona la cual generalmente se compone de un óxido, un sulfuro o un nitruro y pequeñas cantidades de iones activadores. Para mejorar la luminiscencia en los materiales se puede incorporar un co-dopante (sensibilizador) a la red, el cual tiene la función de transferir indirectamente la energía de excitación al ion activador (Figura 1).

Cuando un material luminiscente es excitado, los electrones pasan del estado base a un nivel energético superior. El regreso de estos electrones puede ser tanto por un proceso radiativo en el cual un fotón es emitido o por un proceso no radiativo en donde se producen fonones, esto se refiere a la emisión de calor debido a las vibraciones de red (Figura 1).

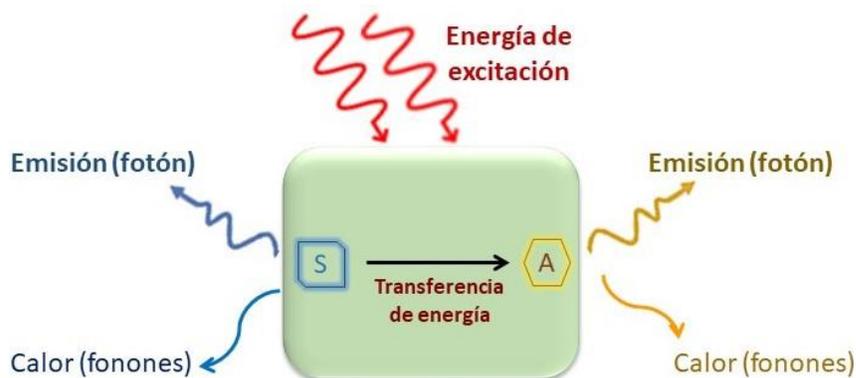


Figura 1. Representación del fenómeno de luminiscencia en un material. Región verde: red anfitriona, S: sensibilizador, A: activador.

1.1.2.1 Red anfitriona

El óxido de aluminio e itrio ($Y_3Al_5O_{12}$) o YAG (Figura 2) es un cristal con baja expansión térmica, alta transparencia óptica y baja pérdida acústica. Debido a su estructura y sus propiedades ópticas y luminiscentes es considerado como un material apto para ser empleado en láseres y lámparas de estado sólido. Además, debido a su dureza y su alta estabilidad química y térmica lo hace buen candidato para ser usado en materiales cerámicos (Hosseini et al., 2017).

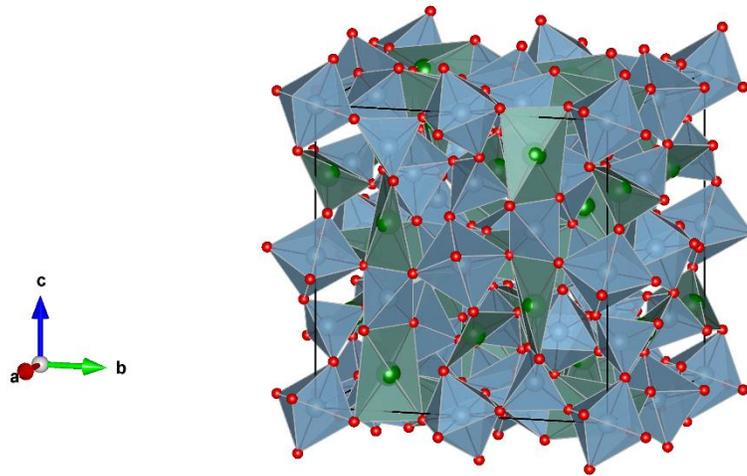


Figura 2. Estructura de YAG, los átomos de aluminio, itrio y oxígeno están representados por los colores verde, azul y rojo respectivamente. Figura hecha en VESTA.

1.1.2.2 Dopantes o activadores

Los lantánidos o tierras raras son elementos del bloque *f* y son ampliamente utilizados para el diseño de materiales luminiscentes. Estos iones son los responsables del tipo de emisión (color o longitud de onda) del material luminiscente.

Entre los iones de tierras raras, el ion trivalente praseodimio (Pr^{3+}) presenta un complejo esquema de niveles de energía, el cual puede emitir en diferentes longitudes de onda (Figura 3). Debido a ese variado esquema de niveles de energía hace que el Pr^{3+} sea un buen candidato para diversas aplicaciones. Por un lado, los iones de Pr^{3+} muestran una emisión en rojo (transiciones f-f) mientras que cuando este ion se encuentra presente en redes anfitrionas como YAG puede presentar transiciones rápidas (5d1-4f) que favorecen emisiones en la región ultravioleta-visible (UV-Vis). Por lo tanto, el ion Pr^{3+} es considerado como un activador con excelentes propiedades para ser aplicado en láseres de estado sólido con emisión ultravioleta (UV) sintonizables y detectores de centelleo (Cavalli et al., 2015; S. Zhang et al., 2011)(S. Zhang et al., 2011).

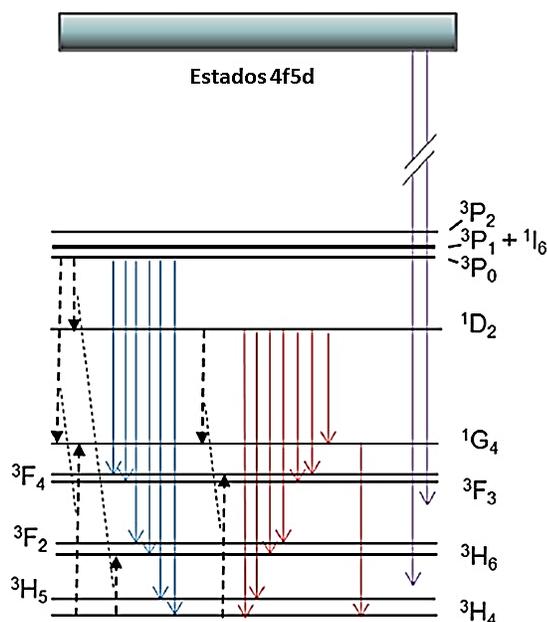


Figura 3. Esquema de los niveles de energía y procesos de relajación de YAG:Pr (Cavalli et al., 2015).

1.1.3 Centelladores

Existen diferentes actividades que requieren de la detección de la radiación como lo es el monitoreo de ambientes peligrosos, controles de seguridad en los puertos, aeropuertos, incluso en el campo de la medicina. Para ello es necesario emplear algún tipo de conversor de esa energía radioactiva a una forma perceptible. Los centelladores son los detectores de radiación más antiguos, y se definen como un material que convierte la energía ionizante (rayos-X o rayos- γ) a luz visible, la cual puede ser detectada fácilmente por medio de fotomultiplicadores o fotodiodos (Figura 4) (Paul et al., 2006).

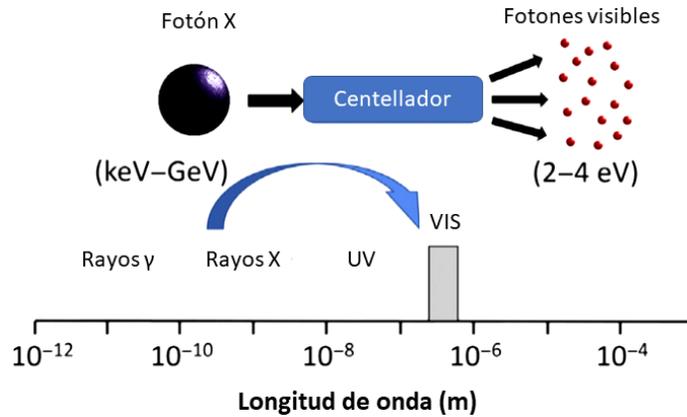


Figura 4. Mecanismo general de un centellador. Un centellador convierte fotones de rayos-X o rayos- γ a fotones en el rango visible (Bünzli, 2016).

1.1.3.1 Mecanismo de centelleo

El mecanismo de centelleo depende de la estructura de la red del cristal. En un cristal puro como YAG, los electrones ocupan bandas de energía específicas (banda de valencia y banda de conducción). Es decir, estos electrones nunca se encontrarán en la banda prohibida. Los cristales puros normalmente tienen una banda prohibida muy amplia lo que implica que el regreso del electrón a la banda de valencia resultará en un proceso ineficiente.

Por otro lado, la introducción de un dopante o activador al cristal puro cambia los niveles energéticos haciéndolos estrechos. Por lo tanto, cuando el cristal que contiene la impureza es irradiado se genera una gran cantidad de pares electrón-hueco. El hueco positivo se desplaza rápidamente a algún sitio del activador y provoca su ionización debido a que la energía de ionización es menor que la de cualquier otro sitio en la red. Mientras que el electrón que se encuentra en la banda conducción migrará por toda la red hasta encontrar el hueco positivo en el activador, cuando esto sucede el activador emite un fotón (Hyun, 1999). La Figura 5 se representa el mecanismo de centelleo tanto del cristal puro como del cristal con impurezas.

La estrategia de introducir tierras raras a un cristal puro y además fabricarlo a escala nanométrica mejora las propiedades físicas y químicas haciendo que el número de aplicaciones y el interés en estos materiales incremente.

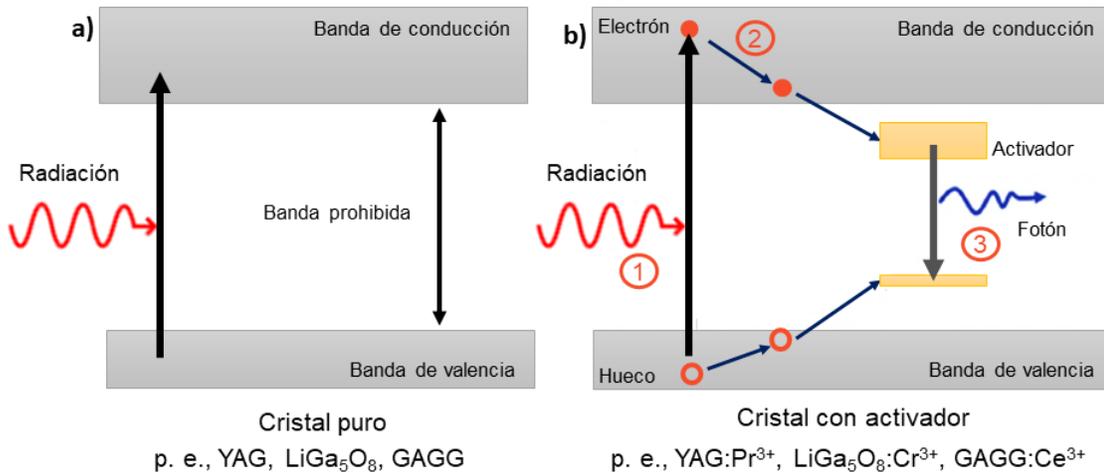


Figura 5. Mecanismos de centelleo para a) un cristal puro y b) un cristal con impurezas (Lucas et al., 2015).

1.1.3.2 Nanocentelladores y sus aplicaciones

Los nanocentelladores o nanopartículas centellantes son materiales fabricados a escala nanométrica que se rigen por el mismo principio de los centelladores, es decir, estas nanopartículas al igual que los centelladores absorben energía ionizante y la transforman en luz visible.

El diseño de los nanocentelladores en la actualidad se enfoca a resolver limitaciones que anteriormente se creían imposibles como, por ejemplo, la rigidez y alto costo. Recientemente Olivera y colaboradores (2018) desarrollaron un innovador nanocentellador flexible y estirable para ser aplicado en áreas como seguridad (detección de la radiación) y cuidado de la salud (diagnóstico).

Por otro lado, en 2006 Chen y Zang reportaron que las nanopartículas centellantes tendrían potencial aplicación en el área médica, enfocándose en el tratamiento contra células cancerosas,

específicamente en la terapia fotodinámica en donde existían limitaciones como la penetración de la luz en tejido profundo.

1.1.4 Terapia fotodinámica (TFD)

La terapia fotodinámica es un método que aún está en evolución y se encarga del tratamiento no invasivo de tumores, además tiene un riesgo mínimo de toxicidad. Este método combina la selectividad de un fotosensibilizador (FS) hacia las células tumorales, el oxígeno presente en el tejido y la radiación dirigida, para generar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) dentro del tumor. Además de actuar en las células cancerosas de forma directa, la TFD daña y restringe la microvasculatura del tumor, y causa una respuesta local inflamatoria que estimula la respuesta inmune contra el tumor. A diferencia de la cirugía o la radioterapia, los alrededores de la matriz extracelular no son afectados por la TFD. Otra de las ventajas de la TFD, es la facilidad para aplicar luz en una zona específica lo que hace sea un tratamiento con gran potencial para el cáncer y condiciones precancerosas (Dobson et al., 2017).

1.1.4.1 Mecanismo de acción de la TFD

La TFD tiene tres componentes esenciales: 1) un fotosensibilizador, el cual se define como una entidad química que tras la absorción de la luz induce una alteración física o química a otra entidad química, 2) oxígeno y 3) una fuente de luz. El tratamiento funciona de la siguiente manera: el fotosensibilizador se inyecta en el torrente sanguíneo. Este agente es absorbido por las células de todo el cuerpo, pero debido al redireccionamiento e internalización específica del fotosensibilizador, permanece por más tiempo en las células cancerígenas que en las células normales. De uno a tres días después de la inyección, cuando la mayor parte del fotosensibilizador ha dejado las células normales, pero persiste en las células cancerosas, el tumor se expone a la luz. El fotosensibilizador absorbe la luz y produce una forma activa del oxígeno, llamada singulete de oxígeno (1O_2) que daña las células cancerosas cercanas (Figura 6).

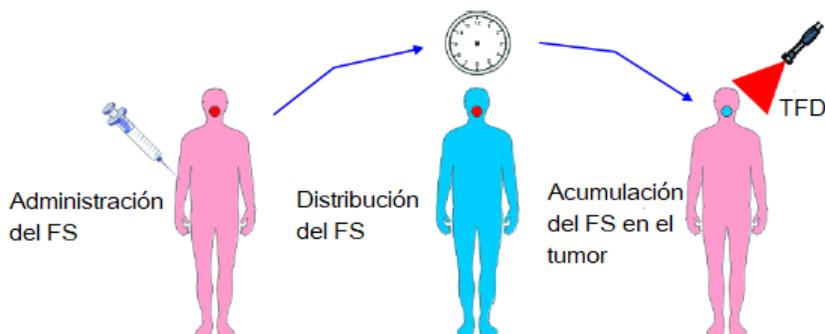


Figura 6. Los principios de la TFD. El fotosensibilizador se administra sistémicamente o tópicamente. Después de un periodo de distribución sistémica del FS éste se acumula selectivamente en el tumor. La irradiación activa al FS en presencia de oxígeno molecular y desencadena una reacción fotoquímica que culmina en la producción del singlete de oxígeno (Agostinis et al., 2011).

1.1.5 Fotosensibilizadores

1.1.5.1 Fotoquímica

Cuando un cromóforo, como por ejemplo una porfirina, absorbe un fotón de radiación electromagnética, se promueve un electrón a un orbital molecular de mayor energía, pasando así del estado basal (1FS_0) a un nivel electrónicamente excitado (1FS_1) el cual está compuesto por varios subniveles (S_n). En la Figura 7 se muestra el diagrama de Jablonsky con las transiciones de un cromóforo. El cromóforo excitado puede perder energía rápidamente cayendo a través de estos subniveles vía conversión interna para que finalmente este electrón llegue al estado basal perdiendo la energía absorbida vía fluorescencia. Existe otra alternativa para que el electrón que se encuentra en el estado excitado pierda energía y es a través de un cruce entre sistemas (ICS, por sus siglas en inglés) (Josefsen y Boyle, 2012). El cruce entre sistemas es normalmente prohibido, pero las moléculas macrocíclicas con sistemas de doble enlace conjugado (sistemas de electrones π) son excepciones y permiten que el ICS tenga estados triplete de larga duración (de microsegundos a milisegundos). El estado triplete puede reaccionar de dos formas, puede ser por un mecanismo tipo I que involucra la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de una molécula a otra o por un mecanismo tipo II el cual involucra una transferencia de energía al oxígeno molecular generando el singlete de oxígeno. Ambos mecanismos pueden ocurrir

simultáneamente y su importancia relativa depende de sus alrededores y la naturaleza de las moléculas de sustrato (Berg et al., 2005).

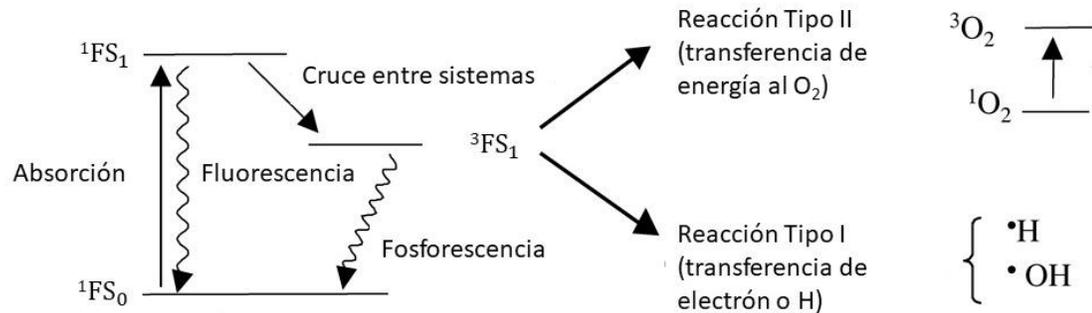


Figura 7. Diagrama de Jablonsky que muestra los estados electrónicos después de la absorción de la luz por un cromóforo. FS: fotosensibilizador (Josefsen & Boyle, 2012).

Las ROS como el 1O_2 , radical hidroxilo ($\cdot OH$), y aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$) son ampliamente aceptadas como el agente citotóxico activo en la TFD. Estas especies son capaces de interactuar con componentes celulares como lípidos insaturados, residuos de aminoácidos y ácidos nucleicos (Figura 8); su interacción con estos componentes provoca daño oxidativo y resulta en la muerte celular, principalmente por apoptosis. Sin embargo, debido al corto tiempo de vida de las ROS, este daño oxidativo está limitado al área inmediata que rodea al fotosensibilizador excitado. La especie que predomina mayormente en la TFD es el 1O_2 y puede interactuar con diferentes biomoléculas, incluyendo residuos de aminoácidos en proteínas, como triptófano, lípidos insaturados como colesterol y bases de ácidos nucleicos, particularmente guanosina y derivados de guanina (Josefsen y Boyle, 2012; Krufft y Greer, 2011; Berg et al., 2005).

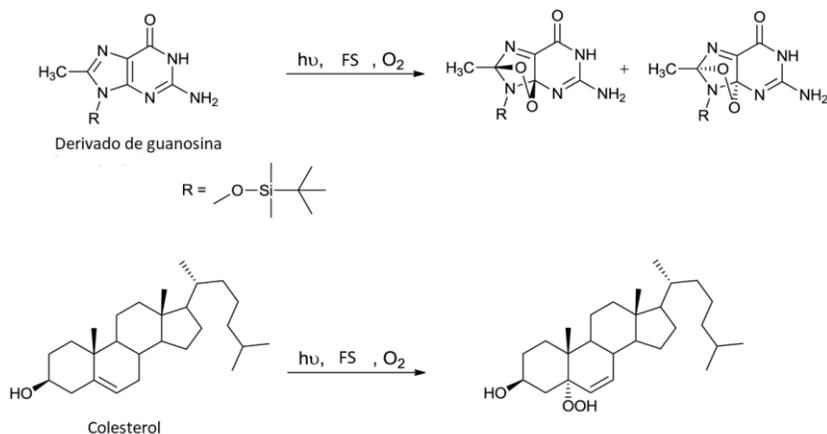


Figura 8. Ejemplos de reacciones del singlete de oxígeno con componentes celulares como bases nitrogenadas (guanosina) y lípidos (colesterol) (Josefsen y Boyle, 2012).

1.1.5.2 Porfirinas

Uno de los fotosensibilizadores más estudiados son las porfirinas, las cuales fueron identificadas a mediados del siglo XIX. Estos compuestos contienen un sistema de 22 electrones π lo cual le confiere las propiedades fotónicas. La porfirina se compone de cuatro subunidades pirrol unidas por cuatro puentes metino (Figura 9).

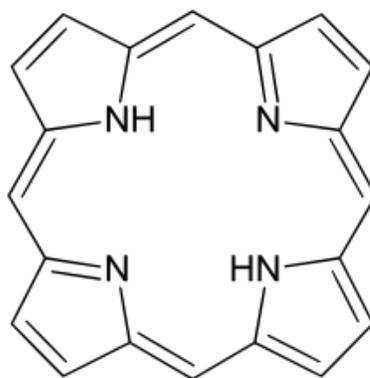


Figura 9. Estructura química de una porfirina

En 1967 se evaluó clínicamente el derivado de hematoporfirina en pacientes con diferentes tipos de cáncer y se reportó que además de ayudar al tratamiento de tejido maligno, el derivado de hematoporfirina también funcionaba como método de detección por sus propiedades fluorescentes (Lipson, et al.). A partir de entonces se comenzaron a investigar las razones por las cuales la porfirina y sus derivados funcionaban en el tratamiento de cáncer.

Los mecanismos involucrados en la acumulación preferencial de las porfirinas aún no se entienden completamente. Se ha propuesto que se debe a su afinidad por las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y por la endocitosis de estas proteínas mediada por la gran cantidad de receptores LDL. Las lipoproteínas tienen dos funciones principales: solubilizar lípidos altamente hidrofóbicos y regular el paso de lípidos específicos dentro y fuera de las células, y tejidos particulares.

Los receptores LDL (receptores apo B/E) están sobreexpresados en células malignas (Castano et al., 2004; Josefsen y Boyle, 2012; Konan et al., 2002). El colesterol, un componente clave de todas las membranas plasmáticas eucariotas, es esencial para el crecimiento y la viabilidad de las células en los organismos superiores, por lo tanto, en las células vasculares y tumorales los receptores LDL también están sobreexpresados (Dozzo et al., 2005; Konan et al., 2002).

Kessel (1986), evaluó la administración sistemática de hematoporfirina en un ratón con cáncer de pulmón. Descubrió que los componentes hidrofóbicos de la hematoporfirina se unían de forma preferencial a las LDL y a las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), además de que el patrón de distribución de la hematoporfirina coincidía con el número relativo de receptores LDL en los diferentes tejidos. Después de 48 h, la mayor parte de la porfirina se localizaba en los adrenales y otros sitios de unión incluyendo varios órganos viscerales. En otro estudio Nakajima y colaboradores (1995) reportaron la afinidad que presentan las porfirinas hacia las LDL dependiendo del grado de hidrofobicidad de la porfirina. En la Figura 10 se observan las constantes de equilibrio (K) entre las porfirinas y varias proteínas de transferrina (TRF), LDL, HDL y albumina de suero (HSA), se puede observar que la afinidad de la porfirina hacia las LDL incrementa con el número de carbonos.

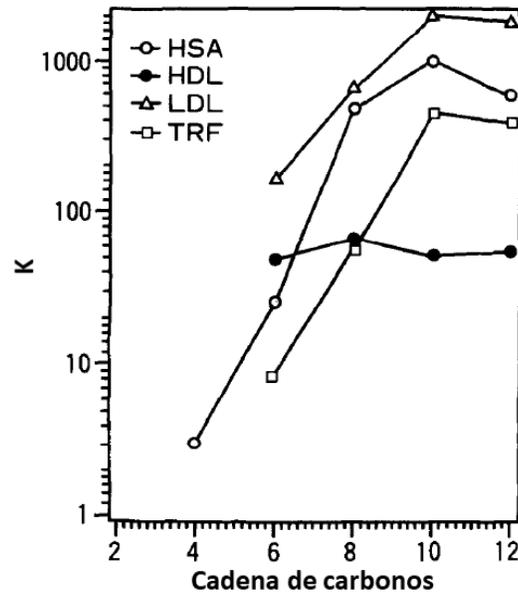


Figura 10. Afinidad de la porfirina y varias proteínas séricas. Eje vertical, constante de equilibrio aparente (K). HSA: albumina de suero, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, TRF: transferrina. Eje horizontal, número de carbonos (Nakajima et al., 1995).

Tras inyectar con protoporfirina a un ratón con cáncer de colón, no se observó acumulación en el tumor hasta después de 30 minutos. El tumor fue visualizado completamente hasta después de 120 minutos. En la Figura 11 muestran las regiones de interés en donde la porfirina se acumuló. Ellos mencionan que la razón por la cual se acumula la porfirina no es clara. Un estudio sugiere que la porfirina junto con proteínas de unión se filtra al intersticio debido a la mayor permeabilidad de los vasos del tumor y permanece en el tejido canceroso debido a un tejido linfático mal desarrollado (Nakajima et al., 1995).

Además de los factores mencionados, también se piensa que la acumulación de las porfirinas en tejido maligno puede deberse al bajo pH intersticial (Barret et al., 1990). Sin embargo, la selectividad puede ser influenciada y mejorada por la incorporación del FS a vehículos de entrega como liposomas, anticuerpos y polímeros sintetizados químicamente.

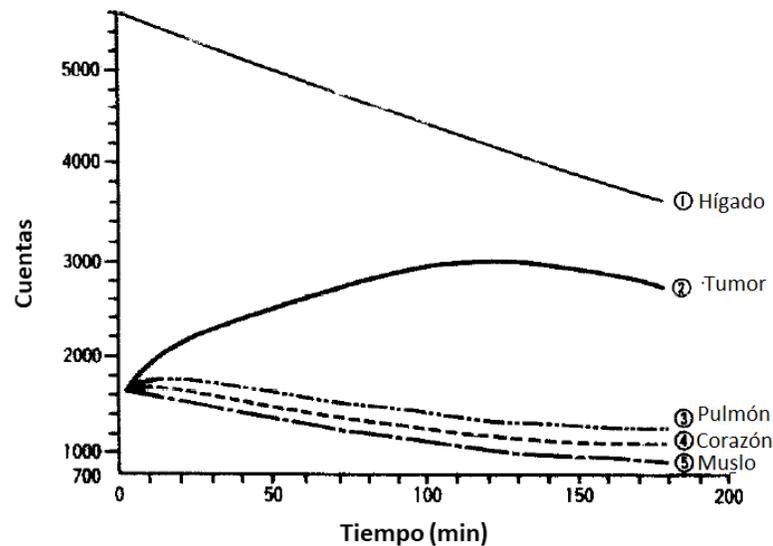


Figura 11. Curva de acumulación de la porfirina en tejido de ratón. Eje vertical, número de cuentas por cuadro. Eje horizontal, tiempo (min) (1) hígado, (2) tumor, (3) pulmón, (4) corazón, (5) muslo (Nakajima et al., 1995).

1.1.6 Retos y limitaciones en la TFD

Uno de los retos más importantes en la TFD consiste en el transporte del FS hacia el tumor. El FS debe pasar por diferentes barreras fisiológicas en las cuales se puede propiciar su internalización no específica, lo que afectaría su llegada a la zona del tumor (Jain, 2001). Por ejemplo, a diferencia de la mayoría de los tejidos normales, las propiedades fisiológicas del tumor pueden afectar en el acceso del fotosensibilizador. Por lo tanto, la baja selectividad y la distribución no selectiva de los fotosensibilizadores hacia las células cancerígenas es el mayor reto en la TFD (Phillips, 2011).

Por otro lado, la fuente de luz es uno de los componentes esenciales en la TFD, por mucho tiempo se utilizó luz UV para el tratamiento de lesiones superficiales, sin embargo, la luz comenzó a ser un limitante cuando se pensó en tratar tumores de tejido profundo. La absorción y poca penetración de la luz en los tejidos ha sido siempre un problema por superar es por ellos que eventualmente se emplearon FS que absorbieran en el infrarrojo (IR) ya que este tipo de luz puede penetrar con mayor profundidad en el tejido que la luz UV.

Otro reto de estos FS es sobre la velocidad de transición no radiativa, debido a que sus transiciones son f-f tienden a ser más rápidas que aquellos FS que tienen transiciones d-f (transiciones lentas), por lo que se reduce la eficiencia de producción del $^1\text{O}_2$. Una limitación con el uso de luz IR es que solo puede penetrar 5 mm de tejido porque la mayor parte de la energía se utiliza para activar el FS.

1.1.7 Soluciones a los retos y limitaciones de la TFD

1.1.7.1 La TFD mediada por rayos-X

Una estrategia para solucionar la limitante de penetración de tejidos en la fuente de luz fue el uso de rayos-X. La propuesta fue planteada por Chen y Zhang (2006) y consiste en emplear nanopartículas que se activan con rayos-X, los que se denomina nanocentelladores. En el diseño de su sistema, los autores proponen unir el FS al nanocentellador, así cuando éste se excite mediante rayos-X su energía será transferida al FS el que absorberá la energía y posteriormente se excitará para dar lugar a la generación del singulete de oxígeno. La reacción en cadena que se inicia al excitar al nanocentellador se conoce como efecto de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés).

Para que la TFD se lleve a cabo de forma eficiente con el sistema nanocentellador-FS el efecto FRET es de suma importancia, por ello es necesario que el espectro de emisión tenga alta coincidencia con el espectro de absorción del FS de esta manera la transferencia de energía del nanocentellador al PS será mayor.

Frecuentemente, se utilizan nanocentelladores dopados con tierras raras y/o a base de óxidos que sirven como receptores de la energía de los rayos-X. Además, estos nanocentelladores basados en tierras raras suelen ser multifuncionales, es decir pueden ser útiles para más de una aplicación en el área biomédica.

Liu y colaboradores (2008) utilizaron nanocentelladores de fluoruro de lantano (III) dopados con terbio ($\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$) conjugados con *meso*-tetra(4-carboxifenil)-porfirina (MTCP, por sus siglas en inglés) y ácido fólico. En la Figura 12 se observa que los picos de emisión del nanocentellador $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ se traslapan con los picos de excitación del MTCP. Por lo tanto, la transferencia de energía es eficiente. Además, detectaron la generación del $^1\text{O}_2$ empleando la molécula fluorescente ácido antracenedipropionico (ADPA, por sus siglas en inglés). La intensidad de luminiscencia del ADPA se abate tras una irradiación con rayos-X tanto para el MTCP como para el $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ conjugado con MTCP, siendo el cambio más pronunciado con el nanocentellador. Además, mostraron que la adición del ácido fólico al sistema no interfiere con la generación del $^1\text{O}_2$, sugiriendo que este nanocentellador pueda ser usado en la TFD.

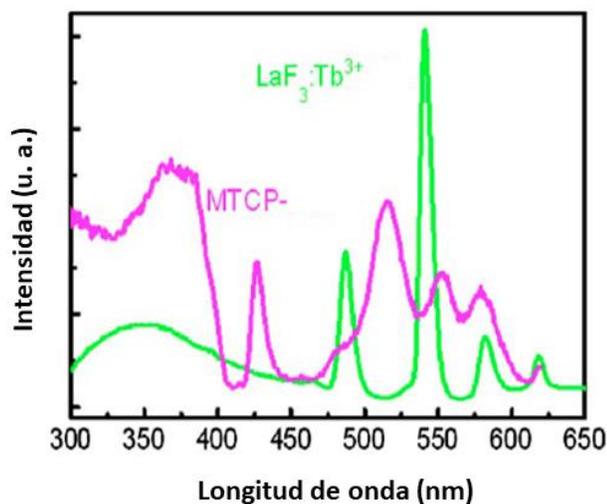


Figura 12. Espectro de emisión del nanocentellador $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ con excitación a 260 nm y el espectro de excitación del MTCP con emisión a 655 nm (Liu et al., 2008).

En otro estudio Zou y colaboradores (2014), encapsularon el nanocentellador de fluoruro de lantano (III) dopado con cerio ($\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}$) en microesferas de ácido poliláctico-*co*-glicólico junto con protoporfirina IX (PpIX). Bajo irradiación con rayos-X, la energía del nanocentellador se transfirió hacia la PpIX, lo que produjo la formación de $^1\text{O}_2$ presentando daño a las células de cáncer de próstata. El nanocentellador muestra un pico intenso de emisión a aproximadamente

520 nm que se sobrepone con uno de los picos de absorción menos intensos de la PpIX (Figura 13). A pesar de la baja coincidencia de espectros este sistema es buen candidato para ser empleado en la TFD.

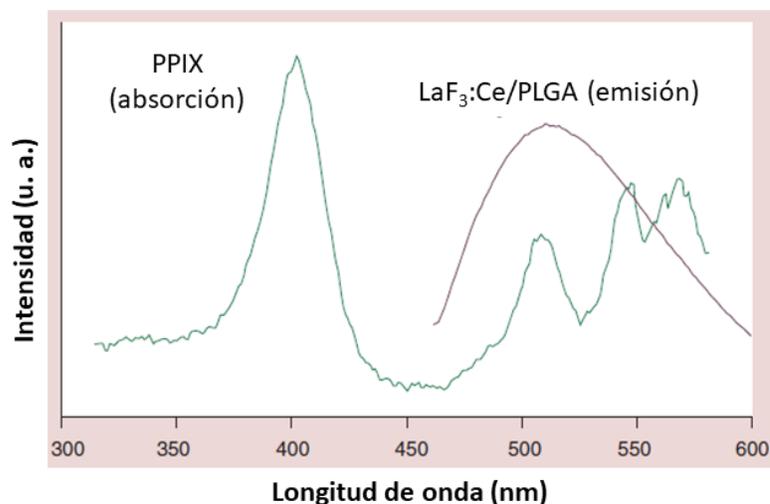


Figura 13. El espectro de absorción de la PpIX y el espectro de emisión las microesferas de fluoruro de lantano dopado con Ce^{3+} (Zou et al., 2014).

Otro nanocentellador empleado con derivados de porfirina es el reportado por Amans y colaboradores (2013). En su estudio utilizaron Tb_2O_3 cubierto con una capa de polisiloxano ($\text{Tb}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$) y lo combinaron con moléculas de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenil porfirina (TTP, por sus siglas en inglés). En la Figura 14 se observa que la radioluminiscencia de nanocentellador recubierto con polisiloxano se traslapa con las bandas de absorción de la TTP (500 nm–700 nm). Para demostrar la eficiencia de su sistema, ellos midieron la generación del $^1\text{O}_2$ mediante dos pruebas comerciales, el sensor verde del singulete de oxígeno (SOSG, por sus siglas en inglés). En los resultados mostraron que el sistema conjugado con porfirina muestra mayor generación del $^1\text{O}_2$ tras excitar al sistema con rayos-X. En conclusión, Amans y colaboradores diseñaron un nanocentellador biocompatible y con propiedades favorables para ser aplicado a la TFD.

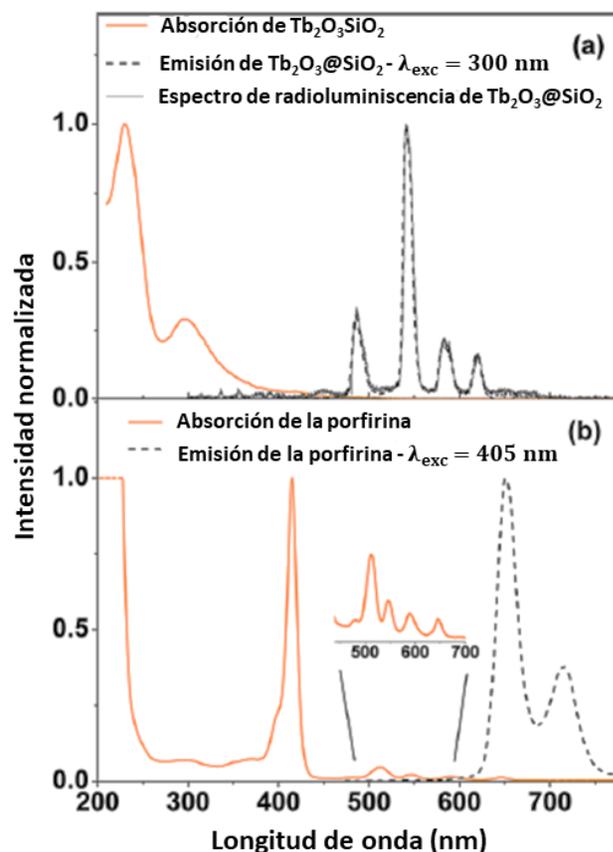


Figura 14. Espectros de absorción y emisión medidos para las nanopartículas centelleantes y para la porfirina dispersada en etanol. Las nanopartículas de $Tb_2O_3@SiO_2$ fueron excitadas con un láser a 300 nm. El espectro de radioluminiscencia fue medido bajo irradiación continua de rayos-X. La emisión de la porfirina fue medida bajo una excitación de 405 nm (Amans et al., 2013).

Por otro lado, el Fotofrin es un derivado de porfirinas y fue el primer fotosensibilizador aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos y hoy en día sigue siendo empleado en la TFD para el tratamiento de lesiones superficiales. Abliz y colaboradores (2011) utilizaron el centellador Gd_2O_2S , que es ampliamente usado en sistemas de imagen médica porque tiene una alta absorción de los rayos-X y una alta eficiencia de conversión en luz visible y lo incubaron con Fotofrin II. Ellos observaron que había una reducción mayor en la viabilidad celular de las células de glioblastoma en presencia del $Gd_2O_2S: Tb$ con Fotofrin II cuando se exponía a rayos-X debido a la generación constante del 1O_2 .

Este trabajo muestra una estrategia para el uso del sistema nanocentellador-porfirina con un fotosensibilizador que ya se emplea en la TFD.

1.1.8 Estrategias para mejorar la terapia fotodinámica

A través de los años se pretende mejorar los métodos y materiales existentes, en el campo de la TFD se requiere encontrar nuevas estrategias, como por ejemplo, hacer más eficiente la generación del singulete de oxígeno introduciendo dos fotosensibilizadores al sistema (Chang et al., 2017; Lau et al., 2014). Sin embargo, en el desarrollo de nuevas estrategias se debe tener en consideración los problemas actuales que presenta la TFD, uno de ellos está relacionado con la dependencia de oxígeno ya que se sabe que los tumores que se encuentran en condiciones hipóxicas o de baja cantidad de oxígeno tienden a ser resistentes a la TFD. Para dar solución a este problema Zhang y colaboradores (2015) plantearon la introducción de un semiconductor al sistema, ellos reportaron el nanocentellador $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$ recubierto con nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) unidas con enlaces metal-sulfuro (Figura 15). Cuando irradiaron el nanocentellador con rayos-X provocó que el núcleo emitiera una energía, la cual coincidía con la banda prohibida del semiconductor, y se derivó en la producción del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$).

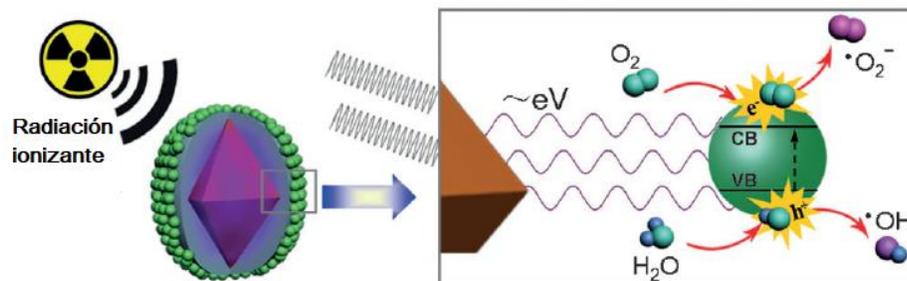


Figura 15. Los pares electrón–hueco ($e^- - h^+$) se forman después de la exposición a la radiación ionizante.

La generación del $\bullet\text{OH}$ en semiconductores es posible de acuerdo con el estudio de Li y colaboradores (2012), quienes reportan que algunas nanopartículas como el ZnO, TiO₂ o CuO pueden generar ROS en la superficie del metal. El principio general es que cuando se irradia la superficie con luz que tenga una fotoenergía más grande que la banda prohibida del semiconductor, los electrones (e^-) de las nanopartículas se promueven a través de la banda prohibida a la banda de conducción, lo cual crea un hueco (h^+) en la banda de valencia. Los electrones en la banda de conducción y los huecos en la banda de valencia exhiben altos potenciales de oxidación y reducción, respectivamente. El electrón puede reaccionar con el oxígeno molecular para producir el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a través de un proceso reductivo. El hueco puede abstraer electrones del agua y/o iones hidroxilo para generar el radical hidroxilo a través de un proceso oxidativo. El singulete del oxígeno es producido indirectamente en su mayoría por reacciones acuosas del $\text{O}_2^{\bullet-}$. El $\bullet\text{OH}$ es un oxidante fuerte y no selectivo que puede dañar todo tipo de biomoléculas orgánicas, incluyendo carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), y aminoácidos. El $^1\text{O}_2$ es el principal mediador de la fototoxicidad y puede dañar irreversiblemente los tejidos tratados, causando oxidación y degradación de biomembranas. Aunque el $\text{O}_2^{\bullet-}$ no es un oxidante fuerte, como precursor de $\bullet\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$ tiene implicaciones biológicas significativas como, por ejemplo, el lisamiento de la membrana celular. En consecuencia, la generación de estos tres tipos de ROS contribuye a un gran estrés oxidativo en sistemas biológicos (Lin et al., 2005).

1.2 Hipótesis

Al activar el nanocentellador YAG:Pr@ZnO@PpIX generará el singulete de oxígeno provocando la muerte de células de cáncer.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar el nanomaterial YAG:Pr@ZnO@PpIX y demostrar que el sistema genera el singulete de oxígeno.

1.3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar el nanocentellador $Y_3Al_5O_{12}:Pr$ (YAG:Pr).
- Recubrir el nanocentellador YAG:Pr con óxido de zinc (ZnO) y caracterizar su nanoestructura.
- Funcionalizar el nanomaterial YAG:Pr@ZnO con protoporfirina IX (PpIX) y caracterizarlo.
- Detectar el singulete de oxígeno.
- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* del nanocentellador.

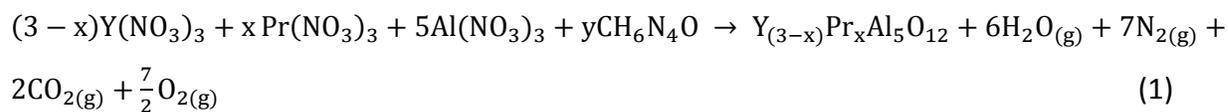
Capítulo 2 Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio e itrio dopadas con praseodimio (YAG:Pr)

Los métodos de síntesis de combustión, sol-gel y precipitación muestran grandes ventajas sobre otros métodos como la reacción en estado sólido (método común para la síntesis de materiales luminiscentes) ya que con estos métodos es posible obtener partículas esféricas y en escala nanométrica. Además, estos procesos tienden a ser rápidos y de bajo costo lo que los hace atractivos para ser empleados en la industria. Debido a ello, en este proyecto se sintetizó el material YAG:Pr por estos tres métodos, con ello será posible definir cuál de las tres técnicas de síntesis resulta mejor de acuerdo las propiedades ópticas y morfológicas de las nanopartículas obtenidas.

2.1.1 Síntesis por el método de combustión en solución

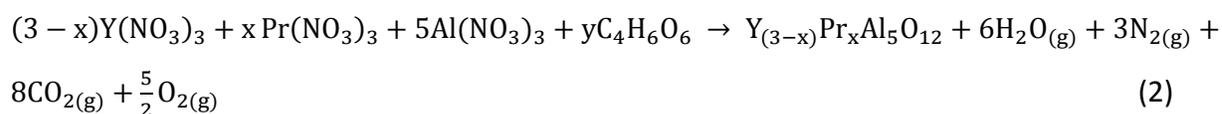
La síntesis por combustión es un método que involucra una reacción exotérmica, por lo tanto, una vez que comienza el proceso de calentamiento, la reacción ocurrirá por si sola en cuestión de tiempo y resultará en un polvo como producto final. La reacción exotérmica comienza con la temperatura de ignición y genera una cierta cantidad de calor que se manifiesta en la temperatura máxima o temperatura de combustión. En la reacción por combustión en solución, se lleva a cabo una reacción de óxido-reducción entre una mezcla de oxidantes (p. ej., nitratos metálicos) y un reductor o combustible (p. e., ácido cítrico, urea o glicina) en agua. Los reactivos que se usaron en esta síntesis son nitrato de itrio ($Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Alfa Aesar 99.99%), nitrato de praseodimio ($Pr(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Alfa Aesar 99.99%), nitrato de aluminio ($Al(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Sigma-Aldrich 98%), carbohidrazida (CH_6N_4O , Alfa Aesar 97). Las cantidades de cada reactivo fueron agregadas de acuerdo con la siguiente reacción:



En donde, la variable “x” corresponde a los diferentes porcentajes de praseodimio (0.01, 0.015 y 0.02) y la variable “y” corresponde a la cantidad de combustible empleado en la reacción que es en relación 2:1 con los iones metálicos. Los reactivos se dispersaron en agua desionizada y se mantuvieron en agitación por 25 minutos hasta obtener una solución transparente. Después, la solución se introdujo a un horno (Felisa FE-290) precalentado a 500 °C y se dejó reaccionar por 25 minutos, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. Una vez obtenido el producto de la combustión, se trituró en un mortero de ágata y se le dio un tratamiento térmico de 1200 °C por 2 horas.

2.1.2 Síntesis por el método de sol-gel

La síntesis por sol-gel permite obtener una gran variedad de materiales y formas, ya que con este método es posible controlar las superficies e interfaces de los materiales durante las etapas tempranas de producción. La síntesis con esta técnica involucra el uso de precursores (p. ej., nitratos) y de un agente quelante (p. ej., ácido tartárico) cuya función es unir los iones de los precursores para formar un compuesto. Los precursores que se usaron en esta síntesis fueron $Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (Alfa Aesar, 99.99%), $Pr(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (Alfa Aesar, 99.99%), $Al(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich, 98%) y ácido tartárico ($C_4H_6O_6$, Sigma-Aldrich 99%). A continuación, se muestra la estequiometría que se siguió en esta síntesis:



En donde, la variable “x” corresponde a los diferentes porcentajes de praseodimio (0.01, 0.015 y 0.02) y la variable “y” corresponde a la cantidad de agente quelante empleado en la reacción que es en una proporción 2:1 con los iones metálicos. La reacción por sol-gel se puede dividir en cuatro

etapas (Figura 16). En la primera etapa se mezclaron todos los precursores y el agente quelante en 30 ml de agua desionizada, esta solución agitó por 24 horas (formación del coloide llamado sol). En la segunda etapa la solución se calentó a 80 °C por 2 horas. En esta etapa se comienza el proceso de gelificación, en el cual la red crece en función del tiempo y la temperatura, en este punto la solución es muy viscosa y se conoce como gel. Finalmente, la tercera etapa consiste en secar el material, después de las 2 horas de reacción se incrementó la temperatura a 120 °C con el objetivo de eliminar el agua del gel. Sin embargo, al finalizar la reacción además de que el gel contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo en la superficie no tiene estructura cristalina. Por lo que es necesario realizar un tratamiento térmico a 1200 °C por 2 horas.

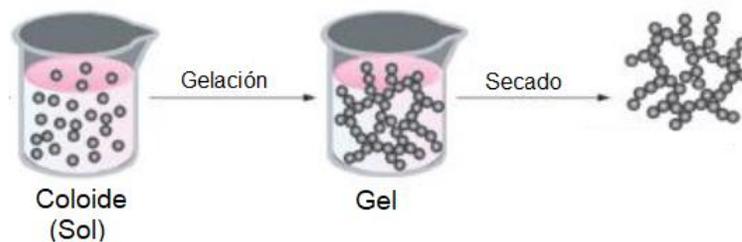
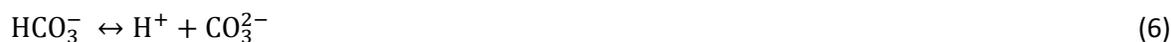


Figura 16. Esquema del proceso de sol-gel.

2.1.3 Síntesis por el método de precipitación

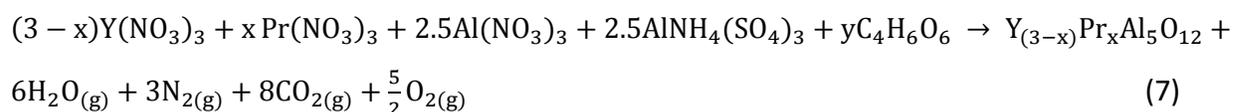
La técnica de coprecipitación es un proceso de precipitación de cationes a través de la descomposición térmica de la urea (NH_2CONH_2), la cual provee al sistema una producción lenta y uniforme de especies aniónicas, p. ej., OH^- y CO_3^{2-} . En la síntesis por coprecipitación basada en urea, su descomposición se puede expresar con las siguientes reacciones (Xu et al., 2012):





La reacción (3) muestra la descomposición de la urea. Las ecuaciones (4)–(6) representan las subsecuentes disociaciones de los productos de reacción para producir los iones OH^- y CO_3^{2-} .

Los precursores que se usaron en esta síntesis fueron $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar, 99.99%), $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar, 99.99%), $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, 98%), sulfato de aluminio y amonio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_3$, Sigma-Aldrich 99.995%) y urea (NH_2CONH_2 , Fisher-Chemical 99%). A continuación, se muestra la estequiometría que se siguió en esta síntesis.



En donde, la variable “x” corresponde a los valores de praseodimio empleados en la reacción y la variable “y” corresponde a la cantidad de urea que en este caso se utilizaron 320 mg/ml. Se preparó una solución mezclando los reactivos en un matraz bola con 50 ml de agua desionizada y agitó por 30 minutos. Posteriormente, la solución se calentó en un baño de aceite a 90 °C por 20 minutos. Después el material se lavó por centrifugación y se secó a 80 °C toda una noche. Finalmente, al producto se le realizó un tratamiento térmico a 1200 °C por 2 horas.

2.2 Recubrimiento de YAG:Pr con óxido de zinc (ZnO)

Después de obtener el material YAG:Pr deseado con las propiedades adecuadas se procedió a recubrirlo con el semiconductor ZnO (YAG:Pr@ZnO) por medio de la técnica de depósito por capa atómica (ALD, por sus siglas en inglés). ALD es una técnica de depósito de capas delgadas que se basa en el uso secuencial de un proceso químico en fase gas. La mayoría de las reacciones por ALD usan dos químicos, normalmente llamados precursores. Estos precursores reaccionan con la superficie y dan lugar al recubrimiento. Los precursores que se utilizaron en esta síntesis fueron dietilzinc ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Zn}$, Strem 95%) y agua desionizada (agente oxidante). El recubrimiento con ZnO se llevó a cabo en un sistema ALD fabricado en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología,

el cual cuenta con un reactor de paredes calientes y dos líneas que suministran los precursores, las cuales se conectan directamente al reactor. Durante el proceso ALD, el reactor y las líneas se mantuvieron a 120 °C, con el fin de mantener los precursores en fase gas. El proceso de ALD comienza con un pulso de dietilzinc al reactor, dejándolo que se impregne por 150 ms sobre la superficie de YAG:Pr. Después utilizando N₂ como gas de arrastre se expulsan los subproductos de reacción y el exceso de precursor que no reaccionó. En seguida, se hace un pulso del agente oxidante, dejándolo 100 ms dentro del reactor para asegurar la formación de la primera capa de ZnO. El proceso ALD finaliza con la purga de los subproductos de reacción y agua que no reaccionó utilizando N₂ como gas de arrastre. El procedimiento ALD se repite las veces necesarias para obtener el espesor deseado. El espesor se analiza con un testigo de silicio por medio de espectroscopía UV-Visible. En este caso el crecimiento de ZnO tuvo una tasa de crecimiento de 1.8 Å/ciclo. El espesor que se obtuvo fue de aproximadamente 18 nm. En la Figura 17 se presenta un esquema del depósito de ZnO y el mecanismo de reacción propuesto.

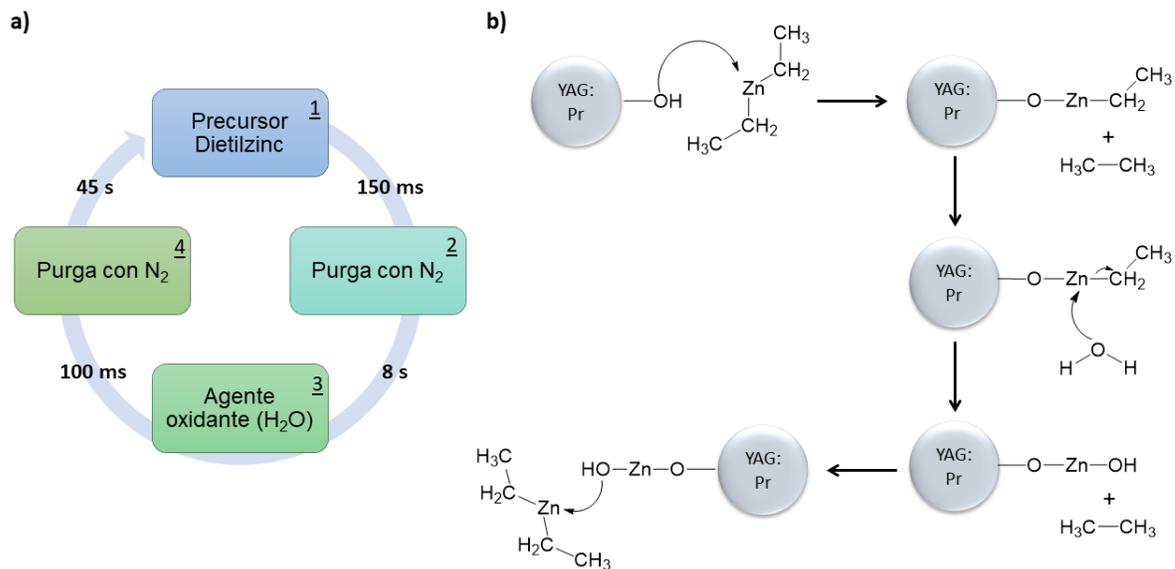


Figura 17. Proceso de deposición por capa atómica. Etapas de la a) técnica de deposición por capa atómica y b) mecanismo planteado para el recubrimiento de YAG:Pr con ZnO.

2.3 Funcionalización de YAG:Pr@ZnO con grupos amina

La funcionalización superficial de los materiales con grupos amina facilita la posterior adición de moléculas orgánicas. Una vez que se obtuvo el material YAG:Pr@ZnO se dispersó en una solución de agua y etanol (3:7) y se sonicó por 10 minutos. Después, se colocó la solución en agitación vigorosa, se agregó 70 μl de 3-aminopropil(trimetoxisilano) (APTMS, Sigma-Aldrich 97%) y se dejó en agitación por 24 horas. Finalmente, el material se lavó por centrifugación con etanol y se dejó secar a 90 °C.

2.4 Funcionalización de YAG:Pr@ZnO-NH₂ con protoporfirina IX

Para funcionalizar YAG:Pr@ZnO-NH₂ con protoporfirina IX (YAG:Pr@ZnO@PpIX) inicialmente se colocó en agitación el material YAG:Pr@ZnO-NH₂. Después se preparó una solución, en la cual se mezclaron 0.006 mmoles de protoporfirina IX (Sigma-Aldrich, >95%), 0.0145 mmoles de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich 98%) y 0.0145 mmoles de *N*-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich 98%) en 3 ml de dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich >99.9%) y se dejó en agitación por 1.5 h. Después del tiempo transcurrido la solución se agregó al material YAG:Pr@ZnO-NH₂ y se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Finalmente, el material se lavó con agua destilada y etanol por centrifugación a 5500 rpm y se dejó secar a 90 °C.

2.5 Detección de los radicales hidroxilo empleando el colorante azul de metileno

La foto-activación del ZnO genera radicales hidroxilo, estos radicales pueden ser detectados por medio de un método colorimétrico empleando el azul de metileno (Sigma-Aldrich, 85%). En este experimento se mezcló azul de metileno (10 mM) con YAG:Pr (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o YAG:Pr@ZnO (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una solución acuosa, y se expuso a una radiación de 365 nm a diferentes tiempos.

2.6 Detección del singulete de oxígeno empleando 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF)

Para medir la generación del singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$) se utilizó la molécula fluorescente DPBF (Sigma-Aldrich, 99%), la cual en presencia del $^1\text{O}_2$ tiende a oxidarse y disminuye su fluorescencia. La disminución en intensidad de fluorescencia del DPBF puede medirse a 490 nm cuando ésta se excita a 410 nm. En este experimento se mezcló DPBF (60 μM) con YAG:Pr (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), YAG:Pr@ZnO (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o YAG:Pr@ZnO@PpIX (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una solución de DMSO, y se irradiaron a diferentes tiempos con una lámpara UV de 365 nm.

2.7 Ensayos de viabilidad celular

Una de las maneras de determinar la citotoxicidad de un nanomaterial es realizando el ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La razón por la que este compuesto se reduce es debido a la actividad metabólica realizada por diferentes enzimas incluyendo la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y diferentes reductasas citosólicas. La forma reducida del MTT resulta en un compuesto llamado (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano que pertenece a la familia formazanos, éste es de color violeta e insoluble en agua.

2.7.1 Medio de cultivo

Para la evaluación de la citotoxicidad de los nanomateriales se empleó la línea celular de melanoma de ratón (B16F10). La línea celular se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC). El medio de cultivo empleado para esta línea celular está compuesto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 gramos de bicarbonato de sodio, 1% v/v de antibiótico y antimicótico más 1% v/v del

aminoácido L-glutamina. Las células se mantienen en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

2.7.2 Tratamiento con tripsina

Debido a que las células por naturaleza crecen adheridas a la caja Petri, para despegarlas se utiliza la enzima peptidasa tripsina cuya función es romper los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrolisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos, y facilitar así la disociación de las células y la superficie de adhesión. Una vez que se lavaron las células con PBS se agrega 1 ml de tripsina y se incuba por 4 min a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Enseguida se agrega 1 ml de PBS a la caja Petri, se despegan las células mediante fuerza mecánica y pipeteo, se depositan en un tubo falcón que contiene 5 ml de medio de cultivo. Después, las células se centrifugan a 1200 rpm por 5 minutos. Una vez que las células fueron centrifugadas, el medio de cultivo se decanta y las células se suspenden en 2 ml de medio de cultivo para ser contadas por el método de exclusión con azul tripano.

2.7.3 Conteo de células mediante el método de exclusión por azul tripano

El colorante azul tripano se utiliza para hacer un conteo de las células al cual se le conoce como método de exclusión, ya que las células vivas son impermeables al colorante, por lo que son translúcidas al observarlas en el microscopio óptico, mientras que las células muertas debido al rompimiento de su membrana el colorante podrá teñirlas de color azul.

En un tubo se agregaron 10 µl de las células y 40 µl del colorante azul tripano (0.4%) para obtener una dilución 1 en 5. Finalmente se realizó el conteo de células vivas en una cámara de Neubauer. Para conocer el número de células por mililitro que se tiene en la caja Petri se sigue la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} = (\text{Promedio de células contadas en los cuatro cuadrantes})(\text{dilución de AT} + \text{C})(V_{\text{total}} \text{ de células})(1000) \quad (8)$$

En donde:

AT = Azul Tripiano

C = Células

2.7.4 Ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT

El ensayo de viabilidad celular se realizó en una placa de 96 pozos, a cada pozo se le agregaron 10, 000 células de melanoma B16-F10 en 100 µl de medio de cultivo DMEM suplementado y se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se descartó el medio de cultivo y se agregaron a cada pozo por triplicado diferentes concentraciones de nanopartículas entre 10 µg/ml y 70 µg/ml y se incubaron por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Se utilizó el medio de cultivo sin añadir nanopartículas como control positivo y DMSO como control negativo ya que es un compuesto que induce muerte celular. Una vez transcurridas las 24 horas, se lavaron las células con PBS y se adicionó 10 µl de MTT y 90 µl de medio sin suplementar (medio de cultivo que no contiene proteínas, suero fetal, antibiótico o algún otro nutriente). Las células fueron incubadas por 4 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación, a cada pozo se le agregó 100 µl de isopropanol puro, se mezcló varias veces mediante pipeteo para disolver los cristales y la placa se incubó por 30 minutos en la oscuridad. Finalmente se evaluó la absorbancia del formazan a 570 nm y 690 nm en un lector de placas ELISA. La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la absorbancia del control, el cual no contiene nanopartículas.

2.7.5 Fototoxicidad

La fototoxicidad de las nanopartículas YAG:Pr@ZnO@PpIX se evaluó por medio del ensayo MTT. Las células de melanoma (10,000) fueron incubadas por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ con diferentes concentraciones de nanopartículas (10 µg/ml – 70 µg/ml). Después del tiempo de incubación las células se lavaron con PBS y se agregaron 100 µl de nuevo medio de cultivo DMEM suplementado. Las células se expusieron bajo una lámpara a 365 nm (8 mW/cm²) por 30 minutos y se incubaron por 24 h. Después de la incubación, se evaluó la fototoxicidad por medio del ensayo MTT. La absorbancia se midió a 570 nm y 690 nm. La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la absorbancia del control, el cual no contiene nanopartículas.

2.8 Técnicas de caracterización de las nanopartículas YAG:Pr@ZnO@PpIX

Con ayuda del microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo JEOL JEM-2010 se evaluó la morfología de los materiales YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO, además se obtuvieron los histogramas de distribución de tamaño. Para conocer la cristalinidad y los parámetros de red el material se evaluó con el equipo X'pert Philips MPD (Cu-K α λ =1.5406 Å), el análisis se realizó con un barrido de 20°-80° con tamaño de paso de 0.02°. Las propiedades fotoluminiscentes se obtuvieron con el espectrofluorómetro Hitachi F-7000 a temperatura ambiente. El estudio del análisis químico para YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO se realizó por XPS con el equipo SPECS equipado con un analizador PHOIBOS WAL que contiene un ánodo de Aluminio. La funcionalización con protoporfirina se corroboró por la técnica de espectroscopía de infrarrojo con el equipo Nicolet 5700. Los espectros de UV-Vis se obtuvieron con el equipo Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies en un intervalo de 250 a 800 nm. Los espectros de emisión de catodoluminiscencia se realizaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JIB-4500 el cual tiene acoplado un analizador Gata mono-CL que permite medir el espectro de emisión generado por rayos-X. Para los estudios *in vitro* se utilizó una lámpara de 365 nm UVP para irradiar los pozos. Los resultados de los ensayos de MTT se midieron en el equipo Multiskan 60 Thermo Scientific a 560 nm y 690 nm.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización del nanocentellador óxido de aluminio e itrio dopado con praseodimio (YAG:Pr)

En el desarrollo de este proyecto se sintetizó el nanocentellador YAG:Pr por tres métodos diferentes: sol-gel (SSG), combustión (SCB) y precipitación (SMP). Sin embargo, el nanocentellador sintetizado por sol-gel fue el elegido para trabajar en el desarrollo del proyecto debido a las favorables características fisicoquímicas que presentó, las cuales fueron estudiadas por diferentes técnicas descritas a continuación.

3.1.1 Microscopía electrónica de transmisión de YAG:Pr

La Figura 18 muestra la morfología de YAG:Pr obtenida por los tres métodos de síntesis: sol-gel, combustión y precipitación. En la Figura 18a se observa que las nanopartículas de YAG:Pr sintetizadas por el método de combustión son de morfología variada debido a la naturaleza del método. En la Figura 18b se observa que la morfología de las nanopartículas de YAG:Pr sintetizadas por el método de sol-gel es más regular y uniforme. En la Figura 18c se observa que la morfología las nanopartículas obtenidas por el método de precipitación no es definida y se observa la presencia de aglomerados. En la Figura 18d y 18e se muestran los histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas sintetizadas por combustión y sol-gel, respectivamente. En ellas se observa que por el método de combustión se obtiene una distribución muy amplia de tamaños, mientras que por sol-gel se observa que el tamaño de partícula se encuentra entre 90 nm y 100 nm.

3.1.2 Difracción de rayos X de YAG:Pr

En la Figura 19 se muestran los difractogramas del nanocentellador sintetizado por los tres métodos y la referencia cristalográfica JCPDS #033-0040 que corresponde a la red cristalina de YAG. Se puede observar que debido al tratamiento térmico al que fue sometido el material, el cual con base a la referencia cristalográfica presenta una estructura cúbica cuyos parámetros cristalinos aparecen del lado derecho de la Figura 19. Sin embargo, en el nanocentellador sintetizado por el método de precipitación se presentaron impurezas (marcadas con asteriscos) las cuales se relacionan con la fase alterna de YAG: $Y_4Al_2O_9$ (YAM).

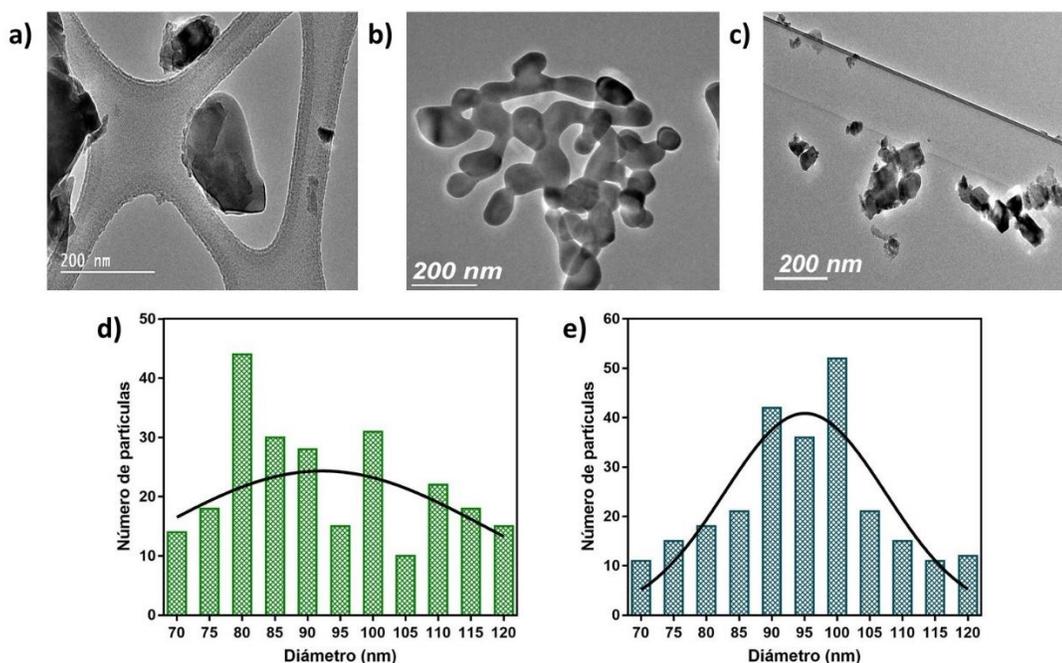


Figura 18. Micrografías electrónicas de las nanopartículas de YAG:Pr sintetizadas por el método de a) combustión, b) sol-gel y c) precipitación. Histogramas de la distribución del tamaño de las nanopartículas obtenidas por d) combustión y e) sol-gel.

3.1.3 Fotoluminiscencia de YAG:Pr

En este proyecto la red YAG se dopó con diferentes porcentajes de Pr (1%, 1.5% y 2%) con el fin de obtener un material que presentara una intensidad de luminiscencia mayor. Para el material YAG:Pr con diferentes porcentajes de dopaje se abrevió como YAG:Pr 1%, 1.5% o 2%. La Figura

20 presenta en todos los casos los espectros de emisión y excitación obtenidos a una longitud de onda de excitación de 290 nm y una longitud de onda de emisión de 320 nm, respectivamente.

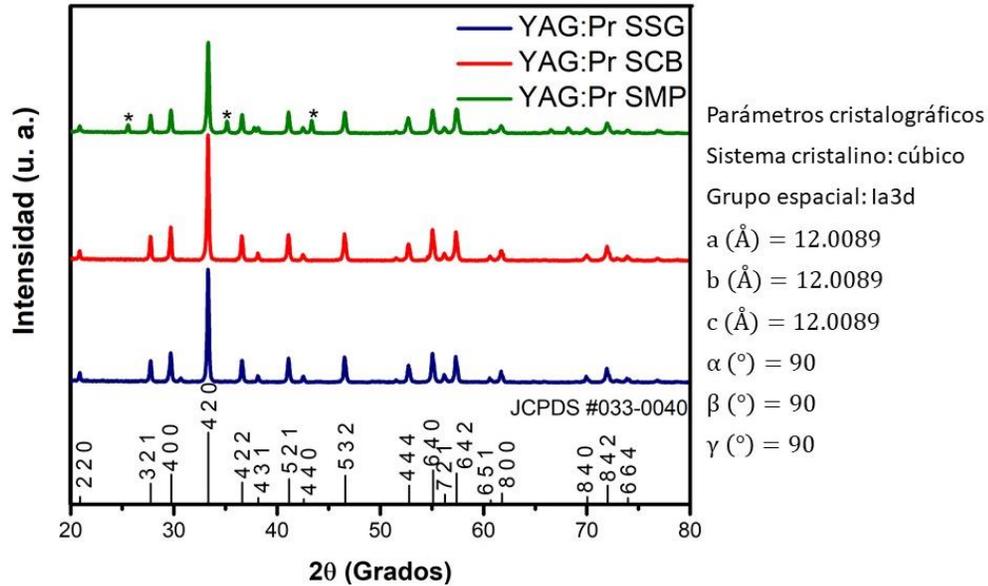


Figura 19. Patrón de difracción de rayos X de los materiales YAG:Pr sintetizados por el método de sol-gel (azul), combustión (rojo) y precipitación (verde) y los parámetros correspondientes a la red cristalina (derecha). Los asteriscos representan impurezas relacionadas con fase YAM.

En la Figura 20a se muestran los espectros de fotoluminiscencia del nanocentellador SCB YAG:Pr, en este caso, se observa que el material que presenta mayor intensidad de luminiscencia es el que contiene 1.5% de Pr, mientras que el que presenta la intensidad más baja es el dopado al 2%. La Figura 20b muestra los espectros del nanocentellador SSG YAG:Pr, en ellos se observa que el material dopado con el 1% de Pr muestra una mayor intensidad de luminiscencia con respecto a los demás materiales, mientras que el dopado con el 2% de Pr, muestra la menor intensidad de luminiscencia, al igual que con el material sintetizado por combustión. Finalmente, en la Figura 20c se grafica la comparación de los espectros de fotoluminiscencia de los materiales sintetizados por combustión y sol-gel que mostraron la mayor intensidad en sus respectivos casos, observando que el nanocentellador dopado con 1% de Pr, obtenido por el método de sol-gel, supera al nanocentellador obtenido por combustión. Sabiendo lo anterior se sintetizó el mismo material

por el método de precipitación con el fin de buscar un resultado mejor en la intensidad de luminiscencia, sin embargo, como se observa en la Figura 20c, la intensidad de luminiscencia del material SMP YAG:Pr 1% fue menor que en los demás materiales, por lo que se decidió que los estudios posteriores se realizaran con el nanocentellador SSG YAG:Pr 1%.

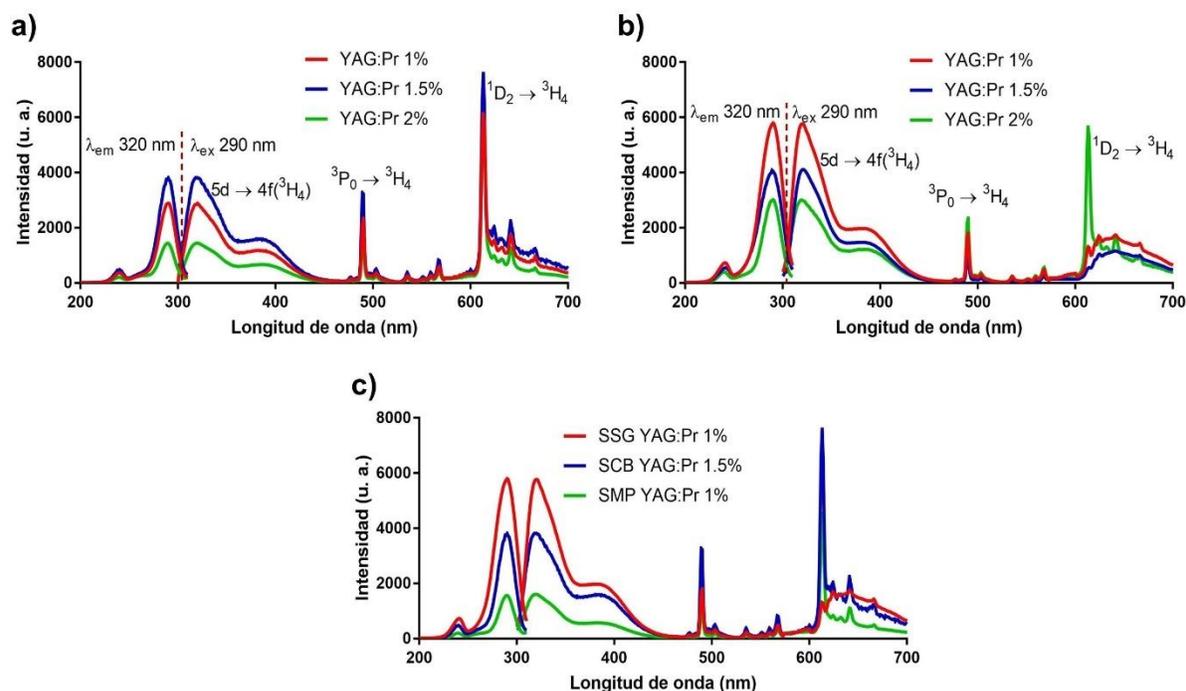


Figura 20. Espectros de fotoluminiscencia de YAG:Pr sintetizado por a) combustión, b) sol-gel con diferentes porcentajes de dopaje de Pr (1%, 1.5% y 2%) y c) comparación en la intensidad de luminiscencia de los espectros de YAG:Pr 1.5% sintetizado por combustión, YAG:Pr 1% sintetizado por sol-gel y YAG:Pr 1% sintetizado por precipitación.

3.2 Caracterización del nanocentellador SSG YAG:Pr recubierto con óxido de zinc (ZnO)

La introducción del semiconductor ZnO al nanocentellador es una estrategia para que el sistema propuesto pueda actuar sobre aquellos tumores que se encuentren en concentraciones de oxígeno significativamente bajas. Debido a que el nanocentellador YAG:Pr dopado al 1%, sintetizado por el método de sol-gel cumple con las características tanto fisicoquímicas como

morfológicas, se procedió a recubrirlo con ZnO (YAG:Pr@ZnO). A continuación, se describen las técnicas de caracterización por las cuales se corroboró la presencia del ZnO.

3.2.1 Microscopía electrónica de transmisión de YAG:Pr@ZnO

La Figura 21 muestra micrografías electrónicas a diferentes ampliaciones del recubrimiento de YAG:Pr con ZnO. En la Figura 21a, se observa que el recubrimiento no influyó en la morfología de las nanopartículas, también es posible distinguir el límite entre la nanopartícula de YAG:Pr y la capa de ZnO (Figura insertada). En la Figura 21b, se observa que el recubrimiento del material es irregular y que su espesor se encuentra entre 7 y 10 nm. Además, destacan algunos planos indicando que el ZnO es cristalino.

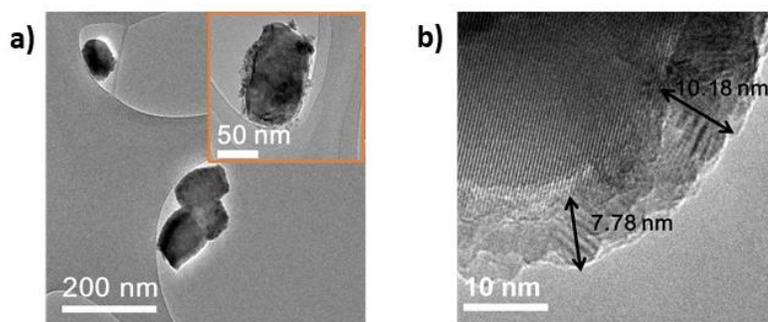


Figura 21. Imágenes obtenidas por TEM de YAG:Pr@ZnO a a) baja y b) alta ampliación.

3.2.2 Difracción de rayos X de YAG:Pr@ZnO

Para corroborar la cristalinidad de la capa ZnO sobre el material YAG:Pr, se realizó el estudio de difracción de rayos X. En la Figura 22 se muestra el difractograma de YAG:Pr@ZnO y la referencia cristalográfica JCPDS#36-1451 que corresponde a la fase hexagonal del ZnO, la cual presenta una

estructura tipo wurtzita. La estructura tipo wurtzita del cristal de ZnO pertenece al grupo espacial P63mc y presenta los parámetros de red $a = 3.210 \text{ \AA}$ y $c = 5.136 \text{ \AA}$.

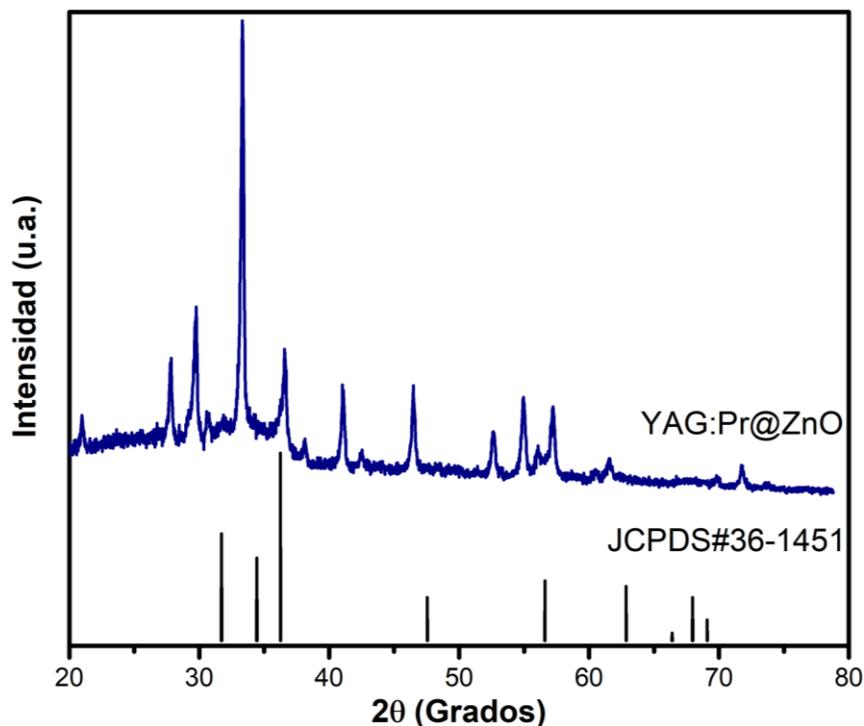


Figura 22. Patrón de difracción de rayos X de YAG:Pr@ZnO.

3.2.3 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) de YAG:Pr@ZnO

Para determinar la estructura electrónica de los elementos existentes en el material YAG:Pr@ZnO y corroborar su recubrimiento con óxido de zinc, se realizó un estudio mediante la técnica XPS. En la Figura 23, se observan las energías de enlace de los fotoelectrones desprendidos de las capas y subcapas de electrones tanto de YAG:Pr como YAG:Pr@ZnO. En los espectros se presentan picos en común como son los de carbono que es una especie que se absorbe en la superficie del material durante la exposición de la muestra al ambiente atmosférico. En la Tabla 2 se muestran todos los picos de energía de enlace con su correspondiente número de capa o subcapa.

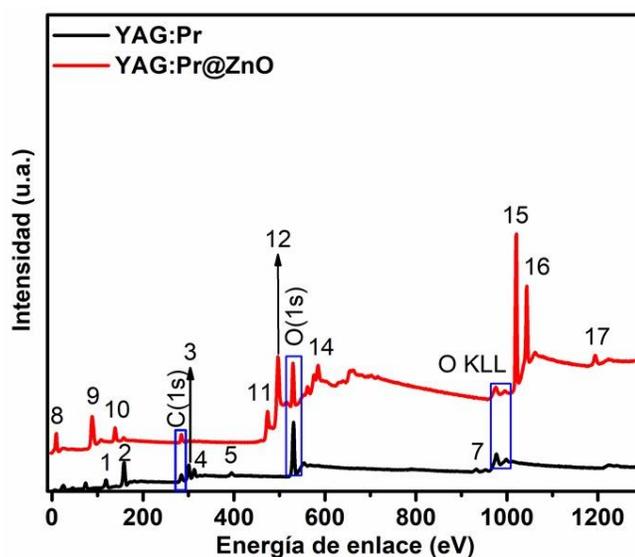


Figura 23. Espectro de XPS de YAG:Pr (línea negra) y YAG:Pr@ZnO (línea roja).

Tabla 2. Análisis por XPS de los materiales YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO.

Pico	Energía de enlace (eV)	Pico	Energía de enlace (eV)
YAG:Pr		YAG:Pr@ZnO	
1	Al 2s 118.06	8	Zn 3d 7.75
2	Y 3d 159.09	9	Zn 3p 87.50
3	Y 3p _{3/2} 297.63	10	Zn 3s 138.72
4	Y 3p _{1/2} 310.44	11	Zn L2MM 474.79
5	Y 3s 395.13	12	Zn L3MM 497.87
6	O 1s 528.43	13	O 1s 528.42
7	Pr 3d 931.24	14	Zn LMM 584.89
		15	Zn 2p _{3/2} 1020.88
		16	Zn 2p _{1/2} 1043.87
		17	Zn 2s 1195.22

3.3 Caracterización del nanocentellador YAG:Pr@ZnO recubierto con protoporfirina IX (PpIX)

La parte final de la síntesis del nanocentellador consiste en agregar a YAG:Pr@ZnO el fotosensibilizador protoporfirina (YAG:Pr@ZnO@PpIX). A continuación, se presentan las técnicas de caracterización realizadas a la última etapa de la síntesis con PpIX.

3.3.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Con la finalidad de corroborar las funcionalizaciones orgánicas de YAG:Pr@ZnO con la protoporfirina, se realizó un análisis por espectroscopía de infrarrojo, ya que por medio de las vibraciones de los enlaces es posible determinar el compuesto que se está analizando. En la Figura 24, se presentan los diferentes espectros de infrarrojo de las distintas etapas de síntesis del nanocentellador, cabe mencionar que la etapa de mayor interés en este punto es el material que contiene la PpIX. En el espectro de infrarrojo de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO se observan los picos correspondientes a las vibraciones de la red, así como la presencia del óxido de zinc (Y-O, Al-O y Zn-O). Por otro lado, en el espectro se presentan los picos de las vibraciones N-H, C=O y Si-O-X que indican la funcionalización del material con PpIX.

3.3.2 Caracterización superficial por fotoluminiscencia y UV-Vis

Para corroborar que el material YAG:Pr@ZnO está recubierto con PpIX, se realizó un análisis de caracterización superficial por fotoluminiscencia y UV-Vis. En la Figura 25, se presentan los espectros obtenidos de todas las etapas de síntesis del nanocentellador en una solución de DMSO. En la Figura 25a, se presentan los espectros de emisión de cada etapa de síntesis, en ellos se observa que la emisión del material varía dependiendo de la modificación superficial. Este fenómeno también se observa en la Figura 25b, sin embargo, en este caso se muestran los espectros de absorción de las diferentes etapas de síntesis del nanocentellador.

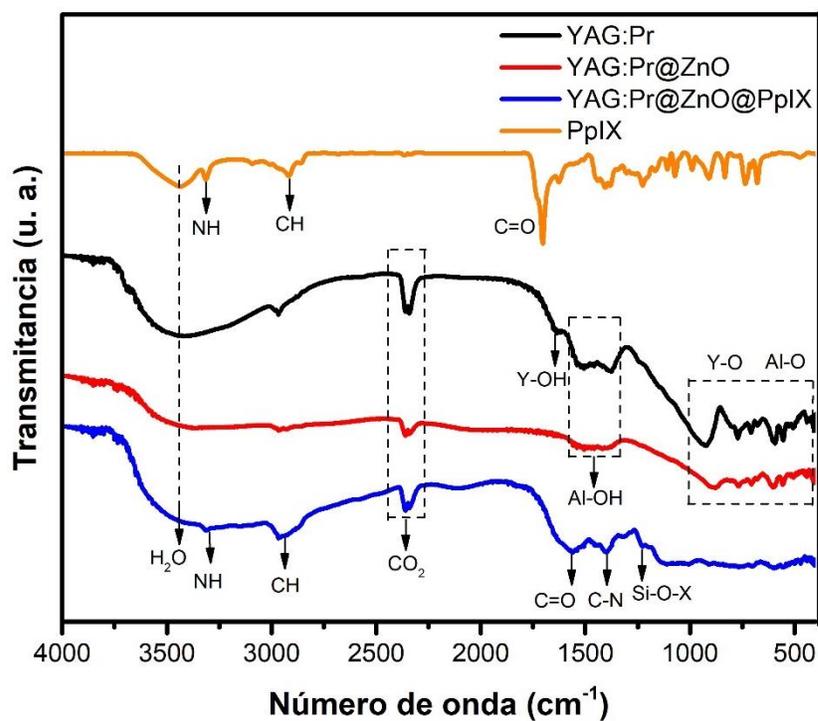


Figura 24. Espectros de infrarrojo de YAG:Pr (línea negra), YAG:Pr@ZnO (línea roja), YAG:Pr@ZnO@PpIX (línea azul) y PpIX (línea amarilla).

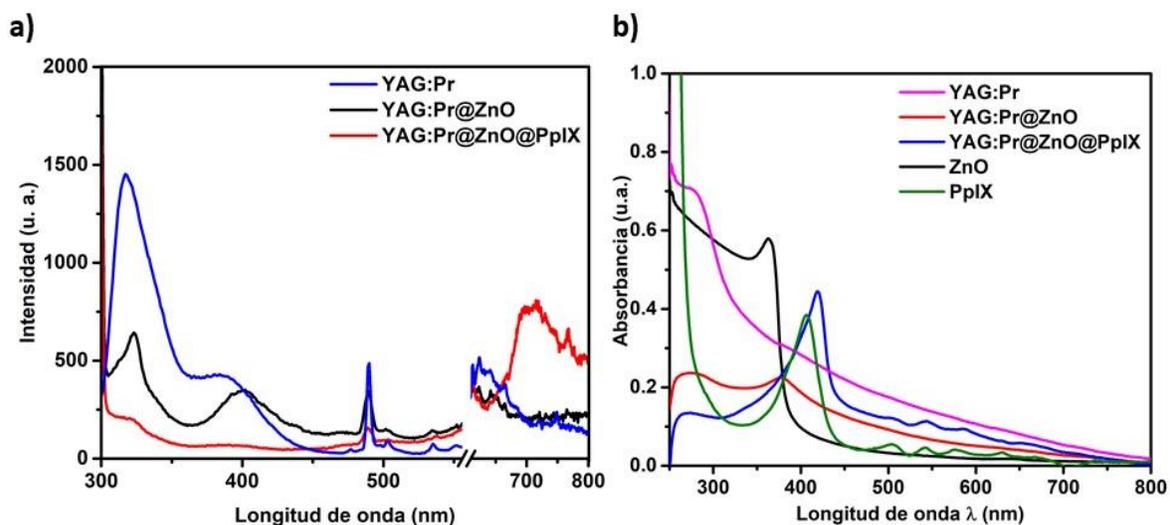


Figura 25. Espectros de emisión y absorción del nanocentellador. a) Espectros de emisión de las diferentes etapas de síntesis y funcionalización del nanocentellador bajo excitación de 290 nm. b) Espectros de absorción de las etapas del nanocentellador, ZnO (línea negra) y PpIX (línea verde).

3.3.3 Evaluación del efecto de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET)

La evaluación de la transferencia de energía del nanocentellador YAG:Pr@ZnO hacia la PpIX es muy importante, ya que de ello depende la generación del singulete de oxígeno. La Figura 26, muestra el espectro de emisión de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO (donadores) y el espectro de absorción de la protoporfirina IX (aceptador). En la gráfica se observa que la emisión de los donadores en la región UV-Vis y parte del infrarrojo cercano se traslapa con la absorción de la PpIX en la banda de Soret principalmente.

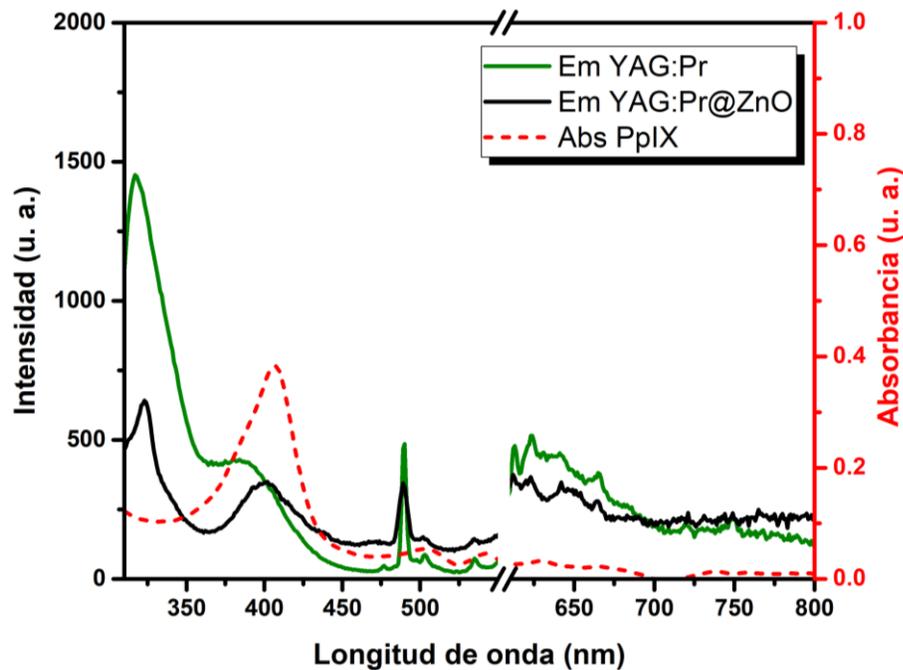


Figura 26. Espectros de emisión de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO y espectro de absorción de PpIX.

3.3.3.1 Catodoluminiscencia

En la Figura 27 se observa cómo se genera la transferencia de energía que inicia con la incidencia de rayos X al nanocentellador YAG:Pr. En la Figura 27a, se muestra el espectro de catodoluminiscencia de YAG:Pr y el espectro de absorción del ZnO, y en la Figura 27b se observa el espectro de emisión de YAG:Pr@ZnO y la absorción de la PpIX. Con este estudio se comprueba que el FRET también está presente cuando el material se expone a energía ionizante.

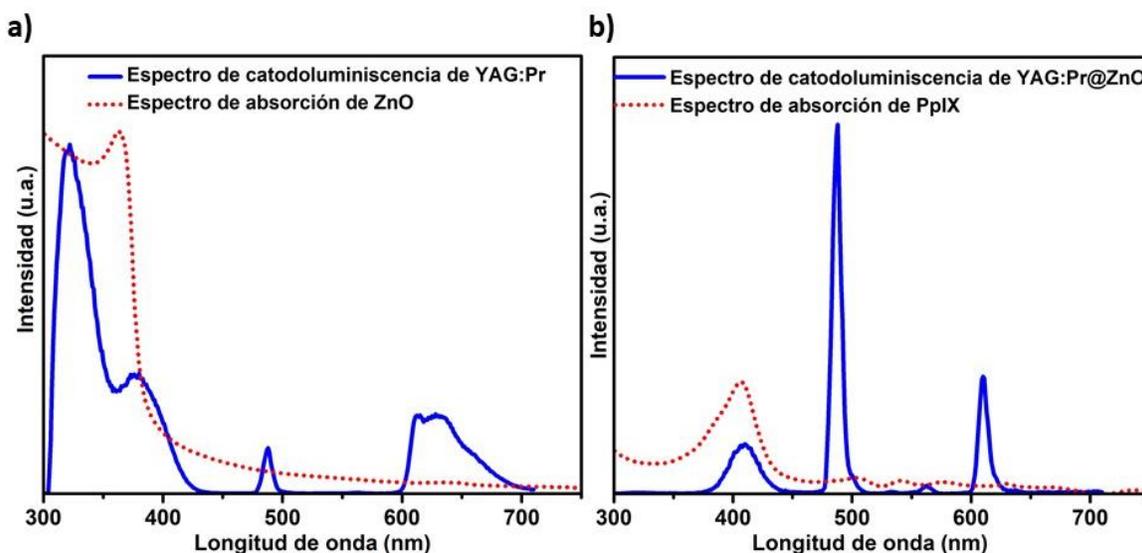


Figura 27. Espectros de catodoluminiscencia y absorción del nanocentellador. a) Espectro de catodoluminiscencia de YAG:Pr y espectro de absorción del ZnO. b) Espectro de catodoluminiscencia de YAG:Pr@ZnO y espectro de absorción de la PpIX.

3.4 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La evaluación de la generación de ROS en el sistema YAG:Pr@ZnO@PpIX es muy importante para la TFD, ya que con ello es posible causar toxicidad celular. Los estudios para determinar las ROS se llevaron a cabo de dos formas diferentes, una de ellas es evaluando la generación del singulete de oxígeno por medio de la PpIX y la otra es la evaluación de los radicales hidroxilo a través del ZnO. A continuación, se muestran los estudios para la detección de estas especies.

3.4.1 Radicales hidroxilo (\bullet OH)

Se conoce que el semiconductor ZnO puede generar \bullet OH en su superficie al ser activado con luz UV. A continuación se presenta la evaluación de los \bullet OH en el material YAG:Pr@ZnO por medio de un método colorimétrico utilizando el colorante azul de metileno (AM). El AM es un colorante que indica la presencia del \bullet OH a través de su degradación inmediata. La Figura 28a muestra la

evaluación del material YAG:Pr@ZnO, en la gráfica se observa disminución de absorción del AM con el tiempo de irradiación, bajo una irradiación de 365 nm. Por otro lado, en la Figura 28b se muestra la comparación de la disminución de absorción del AM como control y el AM en presencia de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO.

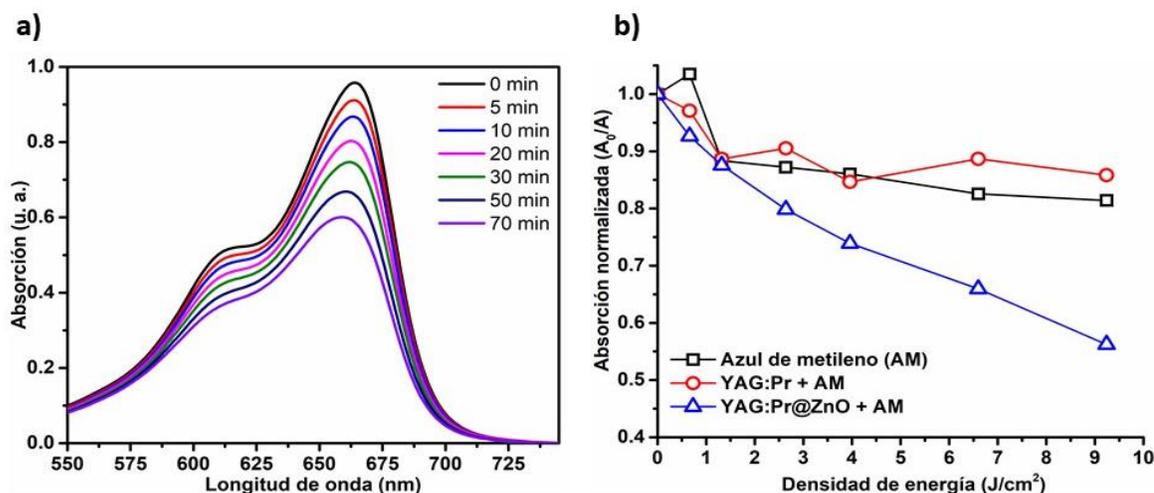


Figura 28. Medición de los radicales hidroxilo mediante azul de metileno (AM). a) Disminución de la absorción del AM con el tiempo de irradiación bajo una exposición con una lámpara de 365 nm. b) Comparación de la degradación del AM en presencia de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO.

3.4.2 Singlete de oxígeno

La detección del singlete de oxígeno (1O_2) en la TFD es muy importante. En este caso se empleó la molécula 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF) como prueba para detectar el 1O_2 . El DPBF es una molécula fluorescente que en presencia del 1O_2 se oxida de forma irreversible a la molécula *o*-dibenzoilbenceno provocando el abatimiento de su fluorescencia. En la Figura 29a se muestra la disminución de la intensidad de luminiscencia del DPBF con el tiempo de irradiación bajo una exposición continua de 365 nm en presencia de YAG:Pr@ZnO@PpIX y en la Figura 29b se muestra la comparación de la foto-degradación del DPBF en presencia de YAG:Pr, YAG:Pr@ZnO y YAG:Pr@ZnO@PpIX.

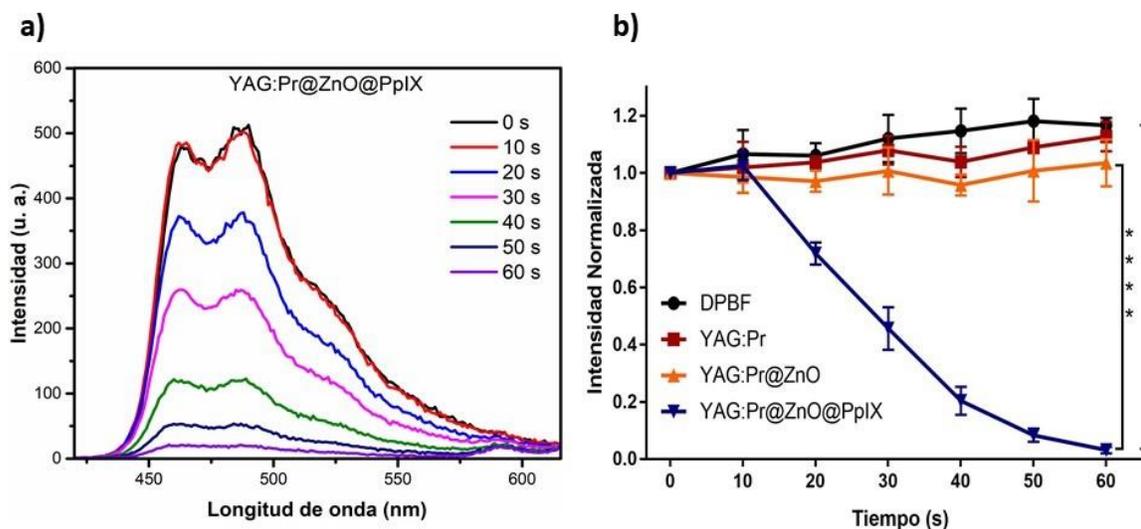


Figura 29. Medición del singlete de oxígeno. a) Disminución en la intensidad de fluorescencia del DPBF con el tiempo de irradiación bajo exposición continua con una lámpara UV de 365 nm. b) Comparación del abatimiento del DPBF en presencia de YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO y YAG:Pr@ZnO@PpIX. Los experimentos se realizaron por triplicado. **** $p < 0.0001$, valor calculado con un estudio ANOVA de dos vías.

3.5 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico empleando el compuesto MTT, el cual es reducido a formazan si las células están vivas. En este ensayo se analizaron diferentes concentraciones de nanopartículas de YAG:Pr@ZnO@PpIX (10 $\mu\text{g/ml}$ –70 $\mu\text{g/ml}$) y se llevaron a cabo dos experimentos en la línea celular B16-F10 (cáncer de piel: melanoma de ratón); uno en la oscuridad y otro bajo irradiación UV. En la Figura 30 se observa que la viabilidad de las células incubadas en oscuridad con nanopartículas no muestra cambios significativos incluso en altas concentraciones de nanopartículas. Por otro lado, cuando las células incubadas con las nanopartículas son expuestas a radiación UV_{365nm} por 30 minutos, la viabilidad celular se ve afectada conforme incrementa la concentración de nanopartículas, mostrando un comportamiento dosis dependiente. Tomando en cuenta los porcentajes de la viabilidad celular, se calculó la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de las nanopartículas YAG:Pr@ZnO@PpIX utilizando el modelo Probit como referencia, en donde la IC₅₀ fue 58.8 $\mu\text{g/ml}$ en las células B16-F10.

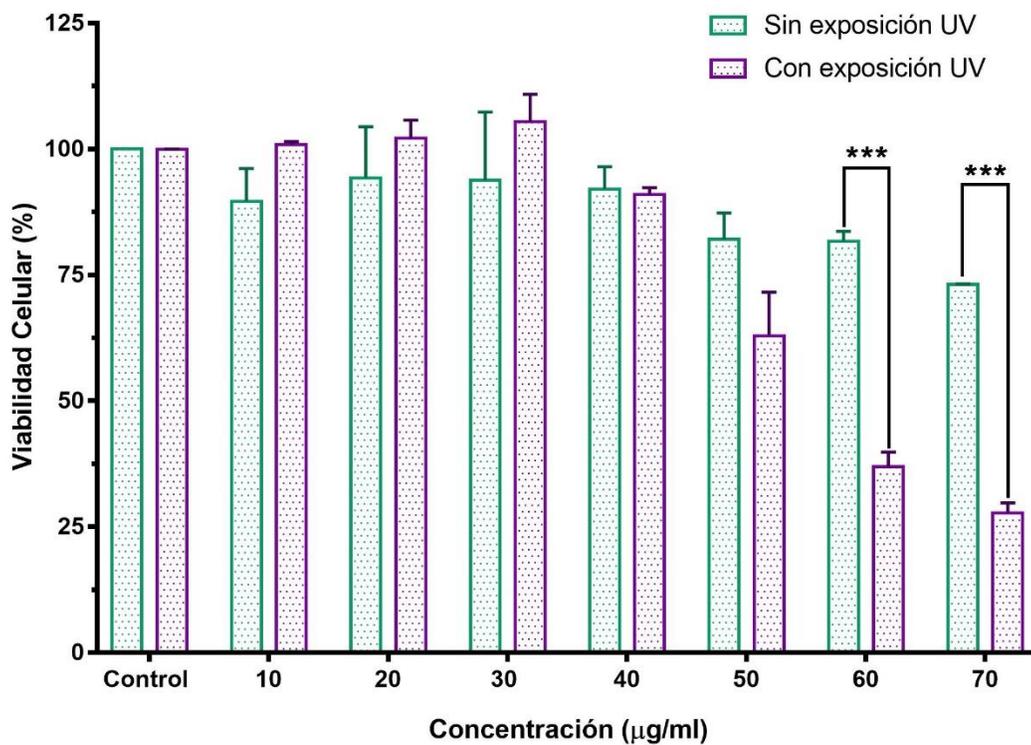


Figura 30. Porcentajes de viabilidad celular de las células de melanoma de ratón, B16-F10 incubadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de YAG:Pr@ZnO@PpIX. Las células se trataron con las nanopartículas por 24 horas sin exposición a la luz UV y con irradiación continua con una lámpara UV de 365 nm. *** $p = 0.0003$, valor calculado con un estudio ANOVA de dos vías.

Capítulo 4 Discusión de resultados

En este proyecto se desarrollaron tres métodos de síntesis para obtener el nanocentellador YAG:Pr, los cuales fueron: combustión, sol-gel y precipitación. El estudio de las propiedades fisicoquímicas de los nanocentelladores fue analizado por diferentes técnicas de caracterización. Las micrografías TEM y el histograma de distribución de tamaño, indican que el material YAG:Pr obtenido por combustión muestra una morfología irregular y una distribución de tamaño muy amplia que va de los 70 nm a los 110 nm, esto puede deberse a que el proceso de reacción es muy violento. Por otro lado, en el caso de la síntesis por sol-gel se observa que la morfología y el tamaño de las nanopartículas (90 nm–100 nm) es más regular y uniforme ya que con esta metodología es posible controlar el curso de la reacción. En el caso de la síntesis de YAG:Pr por el método de precipitación, no fue posible calcular el tamaño de partícula debido a que éstas presentaron una morfología poco consistente y aglomerada, una de las razones puede ser debido a que la urea no completó su descomposición y la formación de especies aniónicas fue insuficiente para la nucleación de las nanopartículas.

Los patrones de difracción de rayos X de los nanocentelladores YAG:Pr sintetizados por los tres métodos de síntesis mostraron concordancia con los picos de difracción de la referencia $Y_3Al_5O_{12}$ (JCPDS#033-0040), a excepción del nanocentellador sintetizado por precipitación, el cual mostró algunas impurezas (*) relacionadas a la fase alterna de YAG: $Y_4Al_2O_9$ (YAM).

El nanocentellador YAG:Pr fue evaluado por fotoluminiscencia con el fin de observar su comportamiento con diferentes concentraciones de dopaje de Pr. En los resultados del nanocentellador sintetizado por combustión y sol-gel se observó que cuando la concentración de dopaje es muy alta (2%) se presenta el fenómeno llamado abatimiento por concentración (Yang et al., 2009), el cual consiste en una disminución en la intensidad de luminiscencia debido a que ésta se encuentra directamente relacionada a la distancia promedio entre los centros luminiscentes, y al haber una mayor cantidad de éstos en la red anfitriona la distancia entre ellos disminuye, por lo tanto, ocurrirá una interacción entre los centros activos causando el abatimiento de la intensidad. Debido a lo anterior, es necesario tener una distribución homogénea de los centros activos en la red anfitriona para conseguir un alto dopaje sin tener

presente el fenómeno de abatimiento por concentración. De acuerdo con los resultados, la cantidad optima de dopaje para el nanocentellador sintetizado por combustión fue el de 1.5% de Pr mientras que para sol-gel fue el 1%. Comparando la intensidad de luminiscencia de estos dos nanocentelladores se observó que la del material sintetizado por sol-gel es superior, por lo que se procedió a sintetizar el nanocentellador por precipitación con el 1% de Pr con el fin de obtener una intensidad de luminiscencia superior, sin embargo, esto no ocurrió. Debido a que el nanocentellador sintetizado por sol-gel presentaba una morfología más uniforme y definida y que sus propiedades fisicoquímicas eran más acordes para ser utilizado como un nanocentellador, es que este material se seleccionó el nanocentellador sintetizado para los estudios posteriores.

El recubrimiento de YAG:Pr con ZnO se realizó por medio de la técnica de ALD la cual está diseñada para el recubrimiento de sustratos planos. En las micrografías del nanocentellador muestran que el recubrimiento con ZnO se llevó acabo de manera exitosa. En las micrografías también se observa que el recubrimiento de las nanopartículas no es uniforme, esto puede deberse a que las nanopartículas al presentar una morfología esférica no tienen la misma área de contacto que un sustrato plano haciendo que tanto el espesor como el recubrimiento no sean uniformes, otra de las razones puede ser que la superficie de las nanopartículas no tenga suficientes grupos hidroxilo, lo que causa un bajo depósito de ZnO. Además de observar el recubrimiento por TEM, se realizaron otras caracterizaciones fisicoquímicas para asegurar la presencia del ZnO en las nanopartículas. El patrón de difracción de YAG:Pr@ZnO concuerda con la referencia de ZnO JCPDS#36-1451 que corresponde a la fase hexagonal con una estructura tipo wurtzita. Por otro lado, mediante XPS se analizó la estructura electrónica del ZnO, y como se pudo observar, en el espectro se presentaron picos de energía de enlace relacionados a las diferentes capas de donde los electrones son desprendidos. Los datos obtenidos concuerdan con la bibliografía reportada (Al-gaashani et al., 2013; Ying et al., 2015).

Se realizaron estudios de espectroscopía de infrarrojo para corroborar el recubrimiento con ZnO y la funcionalización con PpIX. La presencia de la vibración Zn-O (Hosseinfard et al., 2017; Martinez et al., 2011) confirma la presencia del ZnO en la superficie de YAG:Pr. Las vibraciones del grupo carboxilo y la amina primaria indican la unión de la PpIX a la superficie de YAG:Pr@ZnO (Ashjari et al., 2015; Temizel et al., 2014).

Los espectros de emisión y absorción del nanocentellador presentan cambios significativos relacionados a las emisiones y absorciones del nanocentellador en las diferentes etapas de síntesis. En los espectros de emisión (excitación a 290 nm) se comprueba la funcionalización del material con PpIX debido a que la emisión en la región visible del Pr y ZnO desaparecen y se presenta la emisión característica de la PpIX entre 650 nm y 800 nm.

Por otro lado, se analizó el nanocentellador de forma cualitativa mediante espectroscopia de UV-Vis. En los espectros se observa una absorción a 275 nm de YAG:Pr relacionada a la transición $4f(^3H_4) \rightarrow 5d$, el espectro cambia cuando el material se recubre y ahora se presenta la absorción del ZnO a 380 nm que puede ser asignada a la absorción intrínseca la banda prohibida $O2p \rightarrow Zn3d$ (Patel et al., 2017). Finalmente, se presentan las absorbancias correspondientes a la protoporfirina IX a 425 nm son debido a las transiciones electrónicas $\pi - \pi^*$. Cabe mencionar que para los materiales YAG:Pr@ZnO y YAG:Pr@ZnO@PpIX las absorbancias de sus respectivas funcionalizaciones se desplazan del intervalo esperado debido a que el ambiente químico de los materiales es diferente.

El estudio de la emisión y absorción de los componentes del nanocentellador es muy importante ya que con ello se puede determinar si el sistema presenta transferencia de energía para generar el singulete de oxígeno. La transferencia de energía normalmente se genera entre dos agentes (donador y aceptor) sensibles a la luz. El agente donador en su estado excitado puede transferir su energía a un aceptor a través de un proceso no radioactivo (Sahoo, 2011). En el sistema YAG:Pr@ZnO@PpIX, las emisiones en la región UV-Vis de los donadores YAG:Pr y YAG:Pr@ZnO coinciden con la banda de Soret y parte de las bandas Q del espectro de absorción de la protoporfirina IX (aceptor) lo cual confirma la presencia del efecto FRET en el sistema. Por otro lado, se observó que el efecto FRET también se presenta cuando el nanocentellador es expuesto a rayos-X, ya que muestra que existe una transferencia de energía de YAG:Pr a ZnO y de YAG:Pr@ZnO a la PpIX.

Finalmente, al evaluar el efecto citotóxico del nanomaterial YAG:Pr@ZnO@PpIX en las células de cáncer B16-F10, se observó una muerte celular de casi el 80% cuando las células fueron tratadas con 70 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas y se irradiaron con una lámpara UV de 365 nm. La muerte celular

podría atribuirse al estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno que son generadas por parte el fotosensibilizador cuando éste ha sido excitado con la luz UV. Es importante destacar que se hicieron evaluaciones para determinar que la radiación con luz UV no afectara la viabilidad de las células B16-F10, de forma que se tuviera certeza de que la citotoxicidad medida fuera atribuida exclusivamente a la activación del nanocentellador, como se observó en los resultados.

Capítulo 5 Conclusiones

En este trabajo se logró sintetizar el nanocentellador YAG:Pr por tres métodos de síntesis, combustión, sol-gel y precipitación. De los cuales se determinó que la vía de síntesis por sol-gel proporcionó las propiedades luminiscentes y morfológicas deseadas. Además, se evaluaron diferentes porcentajes de praseodimio y se determinó que el óptimo fue el 1.5%. El espectro de luminiscencia de las nanopartículas de YAG:Pr presentan una amplia banda de emisión principalmente en el UV-Vis y diferentes bandas en el infrarrojo cercano.

Por otro lado, por medio de las técnicas de caracterización XPS y XRD se comprobó que el nanocentellador YAG:Pr se recubrió con óxido de zinc. Además, se observó mediante TEM que el espesor del recubrimiento es de aproximadamente 10 nm.

Se logró funcionalizar el nanocentellador YAG:Pr@ZnO con protoporfirina IX. La funcionalización se corroboró por medio de espectroscopía de infrarrojo, espectrofotometría de UV-Vis y luminiscencia.

En el estudio de la transferencia de energía del nanocentellador YAG:Pr@ZnO hacia la protoporfirina se determinó, que este sistema puede trabajar tanto bajo exposición de luz UV y rayos X. En los espectros de emisión se observó que la transferencia de energía se genera principalmente entre la región UV-Vis del nanocentellador YAG:Pr@ZnO y la banda Q de la protoporfirina IX.

Se logró determinar por medio del colorante azul de metileno y la molécula DPBF que el nanocentellador YAG:Pr@ZnO@PpIX genera especies reactivas de oxígeno al ser expuesto a una luz UV de 365 nm.

Los estudios de viabilidad celular demostraron que el nanomaterial no presentó toxicidad celular significativa después del tiempo de incubación en la oscuridad, mientras que cuando las células se exponen a una lámpara UV de 365 nm por 30 minutos la viabilidad celular disminuyó hasta el 30% a una concentración de 70 $\mu\text{g/ml}$ de YAG:Pr@ZnO@PpIX. La concentración media inhibitoria

calculada fue de 58.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por lo tanto, este sistema tiene potencial aplicación para ser utilizado como un nanocentellador en la TFD de tumores de tejidos no profundos.

Literatura citada

- Abliz, E., Collins, J. E., Bell, H., & Tata, D. B. (2011). Novel applications of diagnostic X-rays in activating a clinical photodynamic drug: Photofrin II through X-ray induced visible luminescence from "rare-earth" formulated particles. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 19(4), 521–530. <https://doi.org/10.3233/XST-2011-0311>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. ., Foster, T. ., Girotti, A. ., Gollnick, S., Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114.PHOTODYNAMIC>
- Al-gaashani, R., Radiman, S., Daud, A. R., Tabet, N., & Al-douri, Y. (2013). XPS and optical studies of different morphologies of ZnO nanostructures prepared by microwave methods. *Ceramics International*, 39(3), 2283–2292. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.08.075>
- Amans, D., Ledoux, G., Tillement, O., Perriat, P., Barberi-heyob, M., & Dujardin, C. (2013). X - ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator- Coupled Porphyrins. *J. Phys. Chem. C*, 117, 21583–21589.
- Ashjari, M., Dehfuly, S., Fatehi, D., Shabani, R., & Koruji, M. (2015). Efficient functionalization of gold nanoparticles using cysteine conjugated protoporphyrin IX for singlet oxygen production in vitro. *RSC Adv.*, 5(127), 104621–104628. <https://doi.org/10.1039/C5RA15862A>
- Barret, A. J., Kennedy, J. C., Jones, R. A., Nadeau, P., Pottier, R. H. (1990). The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 6, 309–323.
- Berg, K., Selbo, P. K., Weyergang, A., Dietze, A., Prasmickaite, L., Bonsted, A., ... Høgset, A. (2005). Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of Microscopy*, 218(2), 133–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x>
- Bünzli, J. C. G. (2016). Lanthanide Luminescence: From a Mystery to Rationalization, Understanding, and Applications. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, 50, 141–176. <https://doi.org/10.1016/bs.hpcpre.2016.08.003>
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 1(4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4.Mechanisms](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4.Mechanisms)
- Cavalli, E., Esposito, L., Bettinelli, M., Speghini, A., Ivanovskikh, K. V., Hughes-Currie, R. B., & De Jong, M. (2015). YAG:Pr³⁺transparent ceramics for applications in photonics: Synthesis and characterization. *Materials Research Express*, 1(4), 0–11. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/4/045903>

- Chang, Y., Li, X., Zhang, L., Xia, L., Liu, X., Li, C., ... Kong, X. (2017). Precise Photodynamic Therapy of Cancer via Subcellular Dynamic Tracing of Dual-loaded Upconversion Nanophotosensitizers. *Scientific Reports*, 7(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45633>
- Chen, W., y Zhang, J. (2006). Using Nanoparticles to Enable Simultaneous Radiation and Photodynamic Therapies for Cancer Treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4), 1159–1166. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.327>
- Dobson, J., Fernandes De Queiroz, G., & Golding, J. P. (2017). Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal*, (17). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.012>
- Dozzo, P., Koo, M. S., Berger, S., Forte, T. M., & Kahl, S. B. (2005). Synthesis, characterization, and plasma lipoprotein association of a nucleus-targeted boronated porphyrin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(2), 357–359. <https://doi.org/10.1021/jm049277q>
- Hosseinfard, M., Badiei, A., & Ahmadi, K. (2017). Synthesis and characterization of yttrium aluminum garnet nanostructures by cathodic electrodeposition method. *Advanced Powder Technology*, 28(2), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2016.10.012>
- Hyun, S. (1999). *Chapter 4 Scintillation Detectors*. Ontario.
- Jain, R. K. (2001). Delivery of Molecular and Cellular Medicine to Tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(Lecture II), 149–168.
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2012). Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, 2(9), 916–966. <https://doi.org/10.7150/thno.4571>
- Kessel, D. (1986). Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Letters*, 33(2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(86\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0304-3835(86)90023-6)
- Konan, Y. N., Gurny, R., & Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(2), 89–106. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00267-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00267-6)
- Kruft, B. I., & Greer, A. (2011). Photosensitization reactions in vitro and in vivo. *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1204–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00993.x>
- Lau, J. T. F., Lo, P. C., Jiang, X. J., Wang, Q., & Ng, D. K. P. (2014). A dual activatable photosensitizer toward targeted photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(10), 4088–4097. <https://doi.org/10.1021/jm500456e>
- Li, Y., Zhang, W., Niu, J., & Chen, Y. (2012). Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*, 6(6), 1–22.

- Lin, H.-F., Liao, S.-C., & Hung, S.-W. (2005). The dc thermal plasma synthesis of ZnO nanoparticles for visible-light photocatalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *174*(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.02.015>
- Lipson, L. R.; Baldes, E. J.; Gray, M. J. (1967). Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, *20*, 2255–2257.
- Liu, Y., Chen, W., Wang, S., & Joly, A. G. (2008). Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Applied Physics Letters*, *92*(4), 1–4. <https://doi.org/10.1063/1.2835701>
- Lucas, J., Lucas, P., Le Mercier, T., Rollat, A., Davenport, W., Lucas, J., ... Davenport, W. (2015). Chapter 6 – Production of Rare Earth Metals and Alloys—Electrowinning. In *Rare Earths* (pp. 93–108). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62735-3.00006-1>
- Martinez, C. R., Joshi, P., Vera, J. L., Ramirez-Vick, J. E., Perales, O., & Singh, S. P. (2011). Cytotoxic studies of PEG functionalized ZnO Nanoparticles on MCF-7 cancer cells. *NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech*, *3*(February 2016), 420–423.
- Nakajima, S., Takemura, T., & Sakata, I. (1995). Tumor-localizing activity of porphyrin and its affinity to LDL, transferrin. *Cancer Letters*, *92*(1), 113–118. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03762-L](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03762-L)
- Oliveira, J., Correia, V., Costa, P., Francesko, A., Rocha, G., & Lanceros-Mendez, S. (2018). Stretchable scintillator composites for indirect X-ray detectors. *Composites Part B: Engineering*, *133*, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.09.031>
- Patel, K., Raj, B. S., Chen, Y., & Lou, X. (2017). Novel folic acid conjugated Fe₃O₄-ZnO hybrid nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *150*, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.045>
- Paul, L., Alexander, A., Alexander, G., Mikhali, K., Christian, P. (2006). *Inorganic Scintillators for Detector Systems* (first edit). New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Phillips, D. (2011). Toward targeted photodynamic therapy. *Pure and Applied Chemistry*, *83*(4), 733–748. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-01-05>
- Sahoo, H. (2011). Förster resonance energy transfer - A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *12*(1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001>
- Temizel, E., Sagir, T., Ayan, E., Isik, S., & Ozturk, R. (2014). Delivery of lipophilic porphyrin by liposome vehicles: Preparation and photodynamic therapy activity against cancer cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *11*(4), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.07.006>

- Xu, X., Sun, X., Liu, H., Li, J. G., Li, X., Huo, D., & Liu, S. (2012). Synthesis of monodispersed spherical yttrium aluminum garnet (YAG) powders by a homogeneous precipitation method. *Journal of the American Ceramic Society*, *95*(12), 3821–3826. <https://doi.org/10.1111/jace.12046>
- Yang, H., Yuan, L., Zhu, G., Yu, A., & Xu, H. (2009). Luminescent properties of YAG:Ce³⁺ phosphor powders prepared by hydrothermal-homogeneous precipitation method. *Materials Letters*, *63*(27), 2271–2273. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.07.012>
- Ying, N., Yang, L., Yequan, Z., & Mingfu, Z. (2015). Influence of air annealing temperature and time on the optical properties of Yb : YAG single crystal grown by HDS method. *Optical Materials*, *46*, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2015.04.019>
- Zhang, C., Zhao, K., Bu, W., Ni, D., Liu, Y., Feng, J., & Shi, J. (2015). Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence. *Angewandte Chemie - International Edition*, *54*(6), 1770–1774. <https://doi.org/10.1002/anie.201408472>
- Zhang, S., Li, C., Pang, R., Jiang, L., Shi, L., & Su, Q. (2011). Energy transfer and excitation wavelength dependent long-lasting phosphorescence in Pr³⁺ activated Y₃Al₅O₁₂. *Journal of Luminescence*, *131*(12), 2730–2734. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.07.001>
- Zou, X., Yao, M., Ma, L., Hossu, M., Han, X., Juzenas, P., & Chen, W. (2014). X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine*, *9*(15), 2339–2351. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.198>

Anexos

Determinación del tamaño de cristal en el nanocentellador YAG:Pr

Además de conocer la red cristalina de YAG:Pr, se pueden determinar otros parámetros como lo es el tamaño de cristal. El tamaño de cristal se puede calcular a partir de la fórmula de Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta_{hkl}\theta_{hkl}} \quad (9)$$

En donde D es el tamaño promedio del cristal (nm); k es el factor de forma ($k = 0.9$); λ es la longitud de onda de los rayos X ($\lambda = 0.154056 \text{ nm}$ para el ánodo de $\text{Cu-}k_{\alpha}$); θ_{hkl} es el ángulo de difracción de Bragg ($^{\circ}$) y β_{hkl} es el ancho del pico de difracción hkl medido a la mitad de su intensidad máxima (en radianes). A continuación, se muestran los tamaños de cristal calculados para YAG:Pr sintetizado por combustión, sol-gel y precipitación.

Tamaños de cristal calculados para YAG:Pr sintetizado por combustión.

hkl	θ_{hkl}	β_{hkl}	Tamaño de cristal (nm)
400	29.71	0.20	42.94
420	33.33	0.21	41.26
422	36.60	0.21	41.63

Tamaños de cristal calculados para YAG:Pr sintetizado por sol-gel.

<i>hkl</i>	θ_{hkl}	β_{hkl}	Tamaño de cristal (nm)
400	29.71	0.22	39.04
420	33.33	0.22	39.39
422	36.60	0.24	39.73

Tamaños de cristal calculados para YAG:Pr sintetizado por precipitación.

<i>hkl</i>	θ_{hkl}	β_{hkl}	Tamaño de cristal (nm)
400	29.71	0.20	42.94
420	33.33	0.22	39.39
422	36.60	0.22	39.73