

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Óptica
con orientación en Óptica Física**

**Caracterización de nanogeles termosensibles cargados con
fármacos y nanopartículas con resonancias plasmónicas en la
primera ventana biológica**

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

Presenta:

Leidy Paola Quiroga Sánchez

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Leidy Paola Quiroga Sánchez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Codirector de tesis

Dr. Angel Licea Claverí
Codirector de tesis

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Dra. Johanna Bernaldez Sarabia



Dra. Karina Garay Palmett
Coordinadora del Posgrado en Óptica

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Leidy Paola Quiroga Sánchez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Óptica con orientación en Óptica Física.

Caracterización de nanogeles termosensibles cargados con fármacos y nanopartículas con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica

Resumen aprobado por:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Co - Director de tesis

Dr. Angel Licea Claverie
Co-Director de tesis

Los efectos térmicos asociados a resonancias plasmónicas en nanopartículas metálicas han demostrado tener aplicaciones en diversas disciplinas, entre las que destaca la medicina y el desarrollo de técnicas para el tratamiento del cáncer. Este proyecto de tesis busca aportar al desarrollo de métodos para la administración dirigida de fármacos usando las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas como agente activador en la liberación de fármacos cargados en nanogeles termosensibles. Para seleccionar el tipo de nanopartícula adecuada a esta aplicación, se realizó una revisión bibliográfica y se evaluaron las propiedades ópticas, térmicas y morfológicas de nanopartículas de oro con geometría de barras y tetrápodos. La respuesta térmica se midió utilizando termopares comerciales, la caracterización óptica mediante espectroscopía óptica y la morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS). Aunque los nanotetrápodos de oro mostraron una alta eficiencia de conversión fototérmica no fue posible conservar su morfología, y por ende propiedades ópticas, tras un par de semanas. Por el contrario, las nanobarras de oro demostraron tener una alta eficiencia de conversión fototérmica y estabilidad morfológica a temperatura ambiente hasta tres meses después del proceso de síntesis. Por esta razón se decidió continuar el proyecto usando las nanobarras de oro como agente activador fototérmico. Para evaluar la cinética de liberación de fármaco con y sin irradiación, se llevaron a cabo estudios de carga y liberación controlada del fármaco en experimentos *in-vitro*. En los que se comprobó una aceleración en la liberación del fármaco debido a efectos plasmónicos. Finalmente, se evaluó la aplicación de estos sistemas en la línea celular NCI-H1437 (correspondiente a células de cáncer de pulmón). Estos últimos resultados permitieron concluir acerca de la biocompatibilidad del nanogel, la conveniencia de la irradiación, la citotoxicidad de los sistemas usados y su efecto directo sobre las células.

Palabras clave: plasmónica, nanopartículas de oro, terapia fototérmica, sistemas de liberación de fármacos.

Abstract of the thesis presented by **Leidy Paola Quiroga Sánchez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics with orientation in Physical Optics.

Characterization of thermosensitive nanogels loaded with drugs and nanoparticles with plasmonic resonances in the first biological window

Abstract approved by:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Thesis Co-Director

Dr. Angel Licea Claverie
Thesis Co-Director

The thermal effects associated with plasmonic resonances in metallic nanoparticles have demonstrated to have applications in various disciplines, including medicine and the development of techniques for cancer treatment. This thesis project aims to contribute to the development of methods for the targeted administration of drugs using the optical properties of metallic nanoparticles as an activating agent in the release of drugs loaded in thermosensitive nanogels. To select the type of nanoparticle suitable for this application, a bibliographic review was carried out, and the optical, thermal and morphological properties of gold nanoparticles with rod and tetrapod geometry were evaluated. The thermal response was measured using commercial thermocouples, the optical characterization was performed by optical spectroscopy, and the morphological characterization by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). Although the gold nanotetrapods showed a high photothermal conversion efficiency, it was impossible to preserve their morphology and optical properties after a couple of weeks. In contrast, the gold nanorods showed to have high photothermal conversion efficiency and morphological stability at room temperature up to three months after their synthesis process. For this reason, it was decided to continue the project using the gold nanorods as a photothermal activating agent. Controlled drug release and loading experiments were performed in *in-vitro* to assess drug release kinetics with and without irradiation. In which an acceleration in the release of the drug was obtained due to plasmonic effects. Finally, the application of these systems was evaluated using the NCI-H1437 cell line (corresponding to lung cancer cells). These last results allowed us to conclude about the biocompatibility of the nanogel, the convenience of irradiation, the cytotoxicity of the used systems and their direct effect on the cells.

Keywords: Plasmonics, gold nanoparticles, photothermal therapy, drug delivery systems.

Dedicatoria

A mis padres Carlos Hugo y Nelba Amparo por brindarme
todo el amor y apoyo que he necesitado.

Agradecimientos

A Dios por acompañarme y ser el soporte en cada paso que doy.

A mis padres, hermanos y sobrinos; por darme fuerza para querer progresar todos los días. A mi tía Flor por apoyarme y ayudarme justo cuando lo necesité.

A Saúl por escucharme, alentarme y ser mi compañero en todo este proceso. Gracias por hacerme porras desde el primer momento en que imaginé cursar una maestría.

A mis directores de tesis, el Dr. Jacob y el Dr. Angel por su respaldo, disposición y paciencia a lo largo del desarrollo de mi proyecto de tesis.

A mis sinodales; el Dr. Eugenio, la Dra. Johanna, el Dr. Israel y el Dr. Víctor, por sus valiosos consejos, sugerencias, comentarios y correcciones. Gracias por sus discusiones que han alimentado esta tesis.

A los integrantes del grupo LAMAVA por escuchar mis ensayos para los avances. Gracias por sus preguntas, sugerencias y comentarios.

Al laboratorio de polímeros del Instituto Tecnológico de Tijuana, al departamento de innovación biomédica y al departamento de óptica del CICESE por enseñarme y permitirme usar sus equipos e instalaciones. Gracias especialmente a Eduardo y a Mirian por aclarar mis dudas y ayudarme en la síntesis de nanopartículas y nanogeles.

A Dannareli y Anna por acompañarme en mis estancias en el ITT y ayudar en la realización de algunos experimentos. Gracias por su entrega y dedicación para que las cosas salieran bien.

A mis amigos, en especial a Jenny, Jorge, Juan David y Ferney, por los buenos momentos y por hacer que la pandemia se volviera llevable. A Denisse y a Pao por las conversaciones que me animaron en la vida fuera de la maestría. Y a América y Violeta por animarme justo en el momento indicado.

A todos los mexicanos que me acogieron y me enseñaron un poco de su bella cultura.

Al departamento de Óptica y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por abrirme las puertas y permitirme vivir esta experiencia de crecimiento profesional y personal.

Al proyecto CONACyT de Ciencia Básica 2016-CB-285419, titulado “Nanopartículas para la absorción de luz en la primera ventana biológica y la liberación de fármacos en nanogeles termosensibles” por el financiamiento para el desarrollo de este proyecto de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría. No de beca 783942.

.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
1.3 Estructura de la tesis	5
Capítulo 2. Antecedentes	6
2.1 Esparcimiento y absorción de luz por nanopartículas metálicas	6
2.2 Uso de nanopartículas metálicas para el tratamiento del cáncer	10
2.3 Nanogeles como sistemas de administración dirigida de fármacos	11
2.4 Trabajo hecho previamente en el grupo de investigación.....	13
Capítulo 3. Metodología.....	15
3.1 Método de síntesis de nanopartículas	15
3.1.1 Síntesis de nanobarras de oro (AuNRs).....	15
3.1.2 Síntesis de nanotetrápodos de oro (AuNTPs)	16

3.2	Síntesis de nanogeles	18
3.3	Caracterización óptica.....	19
3.3.1	Caracterización óptica mediante esfera integradora.....	19
3.3.2	Espectrómetro UV-VIS.....	21
3.4	Caracterización térmica.....	22
3.5	Caracterización morfológica.....	23
3.5.1	Caracterización morfológica vía TEM.....	23
3.5.2	Caracterización vía DLS	24
3.6	Cargado de doxorubicina (DOX) en nanogeles termosensibles.....	25
3.7	Cargado simultáneo de doxorubicina y nanopartículas en nanogeles termosensibles	26
3.8	Pruebas de cinética de liberación de doxorubicina	27
3.9	Estudios de citotoxicidad en células.....	28
3.9.1	Cultivo celular.....	28
3.9.2	Pruebas de irradiación en células.....	29
3.9.3	Ensayo de citotoxicidad (MTS)	30
Capítulo 4.	Resultados	31
4.1	Caracterización de nanobarras y nanotetrápodos de oro (AuNRs y AuNTPs)	31
4.1.1	Caracterización óptica	31
4.1.2	Caracterización térmica.....	35
4.1.3	Caracterización morfológica.....	38
4.2	Nanogeles termosensibles y proceso de cargado.....	40
4.2.1	Caracterización óptica mediante espectroscopía UV-VIS	40
4.2.2	Caracterización térmica de nanogeles antes y después del proceso de cargado	42
4.2.3	Caracterización morfológica de nanogeles antes y después del proceso de cargado	44
4.2.4	Porcentaje y eficiencia de cargado de doxorubicina en nanogeles.....	47
4.2.5	Análisis termogravimétrico para nanogeles que contienen nanobarras de oro.....	48

4.3	Liberación controlada de doxorubicina	50
4.4	Experimentos de viabilidad celular	52
4.4.1	Pruebas de control	52
4.4.1.1	Prueba de control 1: Transferencia de calor en una caja de cultivo celular	52
4.4.1.2	Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437 53	
4.4.1.3	Prueba de control 3: Estimación de DL50 para doxorubicina en células NCI-H1437 ..	56
4.4.2	Experimentos de viabilidad celular en la línea celular NCI-H1437.....	57
Capítulo 5.	Conclusiones	62
5.1	Trabajo a futuro	63
	Literatura citada	65

Lista de figuras

Figura	Página
1. Esquema representativo de la interacción del campo eléctrico con nanopartículas metálicas y excitación de plasmones superficiales localizados.	7
2. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y LSPR de nanopartículas de oro de diferentes geometrías con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica: nanohexápodos (a), nanobarras (b), nanocajas (c), nano-octápodos (d), nanotetrápodos (e) y nanocascáras (f); (imágenes obtenidas de (Chang <i>et al.</i> , 2018, 2019; Fay <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2008).....	8
3. Simulación de espectros de absorción de nanobarras de oro con diferentes razones de aspecto (a), dependencia del máximo de absorbanza longitudinal del plasmón en función de la razón de aspecto de la nanobarra de oro. (Gráficas tomadas de Nanodots <i>et al.</i> , 1999) (b) y esquema representativo en el que se indica la longitud y diámetro de la nanobarra de oro (c).....	9
4. Simulación FDTD de nanotetrápodos de oro (AuNTPs) con diferentes relaciones de aspecto (longitud del brazo/diámetro del brazo). Imagen tomada de (Chang <i>et al.</i> , 2019).....	10
5. Esquema representativo del mecanismo de liberación controlada de fármacos propuesto en este proyecto.....	13
6. Esquema representativo del proceso de síntesis de nanobarras de oro. Solución de semillas (a), solución de crecimiento (b) y crecimiento de semillas (c).....	17
7. Esquema representativo del proceso de síntesis de nanotetrápodos de oro. Solución de semillas (a), solución A y solución de crecimiento (b).....	18
8. Esquema del arreglo para caracterización óptica mediante esfera integradora. Configuración de atenuancia (a) y configuración de absorbanza (b).....	20
9. Esquema representativo del arreglo experimental usado para la caracterización térmica. ...	22
10. Esquema representativo del proceso de cargado de nanopartículas y doxorubicina en nanogel (b) y doxorubicina en nanogel (a).....	25
11. Diagrama representativo de las pruebas de cinética de liberación de fármaco.....	28
12. Esquema representativo del montaje usado para procesos de irradiación de células en pruebas de viabilidad celular.	29
13. Proceso para pruebas de viabilidad celular.	30
14. Espectro de absorción de las nanobarras de oro (AuNRs). La longitud de onda del láser está representada por la línea vertical punteada.....	32
15. Absorbanza espectral de la primera síntesis de nanotetrápodos de oro (AuNTPs A) justo después del proceso de síntesis (a) y después del proceso de estabilización (b).....	33

16. Absorbancia espectral de la segunda síntesis de nanotetrápodos de oro obtenida usando el espectrofotómetro comercial (a). Seguimiento en el tiempo de la absorbancia espectral de la segunda síntesis de nanotetrápodos de oro (AuNTPs B) usando el montaje óptico con la esfera integradora (b).	34
17. Comparación de absorbancia espectral de nanobarras de oro (AuNRs), nanotetrápodos de oro estabilizados primera síntesis (AuNTPs-PEG A) y segunda síntesis (AuNTPs-PEG B).....	34
18. Caracterización térmica de nanobarras de oro (a) y relación entre el aumento de temperatura y la potencia de irradiación para diferentes tiempos de irradiación (b).....	36
19. Caracterización térmica de los nanotetrápodos estabilizados AuNTPs A-PEG (a) y AuNTPs B-PEG (b).....	36
20. Seguimiento en el tiempo de la caracterización térmica de la segunda síntesis de nanotetrápodos estabilizados (AuNTPs B-PEG).	37
21. Comparación de la caracterización térmica de nanobarras (AuNRs), primera síntesis de nanotetrápodos (AuNTPs-PEG- A) y segunda síntesis de nanotetrápodos (AuNTPs-PEG B)...	37
22. a) Caracterización morfológica mediante TEM de las nanobarras de oro. b) Relación de distribución de tamaños.....	38
23. a) Caracterización morfológica vía TEM de los nanotetrápodos AuNTPs A-PEG. b) Gráfico de distribución de tamaños.....	39
24. a) Caracterización morfológica vía TEM de los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG. b) Gráfico de distribución de tamaños.....	40
25. Espectro de absorción de las nanobarras (AuNRs) y de los nanogeles cargados con nanobarras (AuNRs+NG).....	41
26. Caracterización óptica de nanobarras en solución (AuNRs), nanogeles cargados con doxorubicina (NG+DOX) y nanogeles cargados con nanobarras y doxorubicina (NG+DOX+AuNRs); Lote 1 de sistemas usados (a) y Lote 2 (b).	42
27. Caracterización térmica de nanobarras en solución (AuNRs), nanobarras cargadas en nanogel antes de pasar por el proceso de liofilización (AuNRs+NG), nanogel (NG), nanogel cargado con DOX (NG+DOX) y agua. Estos datos se obtienen usando la máxima irradiancia permitida (2.63 W/cm²).....	43
28. Caracterización térmica de nanobarras de oro en solución (AuNRs), nanogeles cargados con doxorubicina (NG+DOX) y nanogeles cargados con nanobarras y doxorubicina (NG+DOX+AuNRs).	43
29. a) Caracterización vía DLS de la solución de nanogeles usados en el proyecto antes del proceso de cargado. b) Caracterización vía DLS de la solución de nanogeles en función del aumento de temperatura (T).....	44
30. Caracterización morfológica vía TEM de los nanogeles antes de su cargado con nanobarras de oro.	45

31. Caracterización morfológica vía DLS para nanobarras y nanogeles antes del proceso de cargado (a). Caracterización morfológica vía DLS de nanogeles cargados con DOX (NG+DOX), nanogeles cargados con nanobarras y DOX (NG+AuNRs+DOX) y nanogeles sin cargar (NG) (b).....	46
32. Caracterización morfológica vía TEM de nanogeles cargados con nanobarras de oro correspondientes al Lote 1.....	46
33. Caracterización morfológica vía TEM del Lote 2 de nanogeles cargados con nanobarras de oro y doxorubicina.....	47
34. a) Gráfica de calibración de DOX. b) Esquema de las diluciones a partir de la solución madre.	48
35. Termograma de TGA para el nanogel NVCL:VP:PEG (55:12:40).	49
36. Termograma de TGA para el Lote 1 a) y Lote 2 de nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina b).	50
37. Porcentaje de liberación acumulada de doxorubicina a) para el sistema de nanogel cargado con DOX (NG+DOX) y b) sistema compuesto de nanogel cargado con nanobarras y DOX (NG+AuNRs+DOX). La línea azul representa los sistemas que fueron irradiados y la gris los sistemas que no se irradiaron.	50
38. Prueba de control 1: transferencia de calor en una placa de cultivo celular.....	53
39. Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437. Descripción de la ubicación de los sistemas en la caja de cultivo celular (a), pruebas de viabilidad celular tras 1 , 2, 3, 4, 5 y 6 irradiaciones (b), (c) , (d), (e), (f) y (g) respectivamente.	55
40. Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437. Porcentaje de viabilidad celular en función del número de irradiaciones y de la potencia del láser.	56
41. Prueba de dosis letal media para la doxorubicina en esta línea celular. Descripción de los sistemas usados y su distribución en la caja de cultivo celular (a) y porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas usados (b).	57
42. Prueba de citotoxicidad 1. a), b), c) descripción y distribución de los sistemas tratados en la caja de cultivo celular. d) Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas analizados.....	59
43. Pruebas de citotoxicidad. a) descripción y distribución de los sistemas tratados en la caja de cultivo celular. Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas realizando una única irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min y después de b) 24 h de incubación y 2 h de incubación.	60
44. Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas realizando una única irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min y después de a) 6 h de incubación, b) 12 h de incubación y c) 24 h de incubación.	61

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Valores de irradiancia correspondientes a las potencias usadas a una distancia de 1 cm.....	35
2. Valores de porcentaje de cargado y eficiencia de cargado de doxorubicina en nanogeles... 47	47
3. Cálculos para pruebas de LD50.	57

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, según los reportes de la organización para las Naciones Unidas (ONU) en 2020 se diagnosticaron cuatro millones de casos nuevos y aproximadamente 1.4 millones de personas murieron por esta enfermedad, lo que representa una problemática social sobre la que es importante trabajar desde el ámbito científico (Naciones Unidas, 2021). Esta enfermedad se caracteriza por generar un aumento descontrolado en la proliferación celular, infiltración de células afectadas a tejidos vecinos y reducción de la muerte celular, lo que genera tumores y disfunción en los órganos afectados. El tratamiento por seguir depende tanto del tipo de cáncer como de la etapa de la enfermedad en la que se detecte, los tratamientos más usados son la cirugía para extracción de tumores, la radioterapia y la quimioterapia. Estos tratamientos poseen como desventaja ser altamente invasivos y, por lo general, ocasionar importantes efectos secundarios en órganos sanos (Manchun *et al.*, 2012). Por esta razón, en las últimas décadas grupos de investigación de diferentes disciplinas han sumado esfuerzos para desarrollar métodos más eficientes y menos invasivos en la denominada “lucha contra el cáncer”. Particularmente, en este proyecto se propone el uso de la bioquímica y la nano fotónica para, mediante sistemas de transporte altamente biocompatible y resonancias plasmónicas como agente activador en la liberación del fármaco, realizar un ataque químico justo en la zona tumoral.

Existen diversos tipos de nanoacarreadores para el transporte y administración de fármacos en zonas microscópicas, los nanogeles son uno de ellos. Estos son hidrogeles formados de polímeros reticulados de geometría esférica y poseen la habilidad de hincharse y comprimirse ante estímulos externos como variaciones de temperatura, ultrasonido, campos magnéticos o cambios de pH. Justamente la elasticidad que presentan ante un estímulo determinado es la que les brinda la capacidad de encapsular, transportar y liberar fármacos de manera controlada. Para los fines de este proyecto se propone usar nanogeles con diámetros entre 30 – 300 nm formados por polímeros termosensibles y biocompatibles; la termosensibilidad les brinda la propiedad de comprimirse y liberar fármaco ante un aumento de temperatura, mientras que la biocompatibilidad les permite transportarse por el torrente sanguíneo sin ser detectados por el sistema inmune. Debido a sus tamaños, estos pueden alojarse en tumores cancerígenos mediante el llamado efecto de permeabilidad y retención incrementada (efecto EPR, por sus siglas en inglés) y, adicionalmente, pueden ser funcionalizados para adherirse a un tipo específico de célula cancerígena (Chacko *et al.*, 2012; Raemdonck *et al.*, 2009; Soni *et al.*, 2016; Suhail *et al.*, 2019).

Como agente activador en la liberación del fármaco se propone usar el aumento de temperatura que se puede inducir de forma controlada mediante la interacción de luz con nanopartículas metálicas. Estas nanopartículas son cargadas, junto con el fármaco, en el nanogel. De forma que al inducir un aumento de temperatura en la nanopartícula (debido a la absorción de la luz) también aumente la temperatura del nanogel y éste se comprima liberando el fármaco en la zona de interés. El mecanismo por el cual una nanopartícula puede aumentar su temperatura usando radiación se basa en la interacción del campo eléctrico de la luz con los electrones de conducción de la nanopartícula. Cuando se irradia una nanopartícula (o un conjunto de estas), los electrones libres del metal que las conforman oscilan de manera colectiva y coherente. Si la frecuencia de estas oscilaciones resonantes coincide con la frecuencia de la onda electromagnética incidente (condición de resonancia), entonces se generará lo que se conoce como resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés). Las LSPRs se manifiestan ópticamente como picos de absorción en la luz transmitida y son fuertemente dependientes de la forma, tamaño, orientación y medio en el que se encuentren inmersas las nanopartículas. Para algunos metales como el oro y la plata inmersos en vidrio o en agua la resonancia cae en el rango visible del espectro electromagnético y, como consecuencia, el sistema exhibe colores brillantes tanto en condiciones de luz transmitida como reflejada (Maier, 2007; Raether, 1988). En este proceso, la energía adquirida por la nanopartícula puede decaer mediante dos procesos: de manera radiativa emitiendo fotones con la misma longitud de onda de la luz incidente (esparcimiento), o bien, de manera no radiativa generando fonones (absorción). En este último proceso se da una transferencia de energía hacia la red atómica de la nanopartícula a través de colisiones tipo electrón-fonón la cual induce un calentamiento en la superficie de la nanopartícula. El aumento de temperatura puede transferirse al entorno de la nanopartícula de forma casi instantánea en un intento de llegar al equilibrio térmico. Estos efectos térmicos han demostrado tener importantes aplicaciones tanto biológicas como médicas, algunas particularmente enfocadas al tratamiento de cáncer (Baffou and Quidant, 2013; Dahlin *et al.*, 2013; Ferry *et al.*, 2010; Maya *et al.*, 2013). Entre las aplicaciones más importantes destaca la terapia fototérmica, que se basa en el uso de nanopartículas con resonancias plasmónicas para aumentar la temperatura de las células tumorales e inducir en ellas un proceso de apoptosis o muerte celular (Govorov and Richardson, 2007). A diferencia de este tipo de terapia, en este proyecto se propone usar la conversión fototérmica para inducir un leve aumento de temperatura que active la liberación de un fármaco anticancerígeno de forma controlada.

Teniendo en cuenta que lo que se desea es minimizar el daño a tejidos sanos es necesario, además de usar sistemas de transporte y liberación de fármacos biocompatibles, trabajar con fuentes de radiación y nanopartículas con baja o nula citotoxicidad. En este sentido, suelen usarse ciertos intervalos de longitudes

de onda llamadas ventanas biológicas en las que la luz presenta una menor absorción en agua y una mayor penetración en el tejido vivo. En específico, en el desarrollo de este proyecto se trabajó en la primera ventana biológica que comprende el intervalo espectral de 650 a 900 nm. Existen diversas geometrías de nanopartículas metálicas, principalmente las compuestas de oro y plata, cuya LSPR cae dentro de este intervalo de longitudes de onda, asimismo, debido a sus tamaños nanométricos son muy atractivas para su cargado en sistemas de transporte nanométrico y en particular el oro es el material idóneo para aplicaciones biológicas debido a su alta estabilidad química y biocompatibilidad. La geometría de la nanopartícula también es un factor de importancia a considerar, entre las geometrías más estudiadas para conversión fototérmica en aplicaciones biológicas destacan las nanobarras de oro (AuNRs, por sus siglas en inglés). Las AuNRs se caracterizan por su bien establecido proceso de síntesis y alta eficiencia de conversión térmica; presentan dos intervalos espectrales de absorción, el primero asociado a la resonancia de la dirección transversal de la nanopartícula (~530 nm) y el segundo asociado a la dirección longitudinal de la nanopartícula y sintonizable en el intervalo de longitudes de onda de la primera ventana biológica (530 – 900 nm) (Choi *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009; MacKey *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Recientemente se han reportado nanopartículas de oro con geometría de tetrápodos y tamaños de alrededor de 30 nm que presentan dos bandas de absorción similares a las de las nanobarras de oro. La primera banda de absorción corresponde al centro de la nanopartícula y la segunda se relaciona con los “brazos” y también puede ser sintonizable en el intervalo de la primera ventana biológica. Debido a su simetría de cuatro “brazos” estas nanopartículas presentan una mayor probabilidad de iluminación eficiente de su sección transversal geométrica y, por ende, una mayor eficiencia de conversión fototérmica con respecto a las nanobarras.

En el desarrollo de este proyecto se usaron nanopartículas de oro con geometría de barras y de tetrápodos, se usaron nanogeles de tipo hidrogel compuestos por poly(N-vinylcaprolactama) (PNVCL) y Polietilenglicol (PEG) que presentaron una alta respuesta térmica y biocompatibilidad. El fármaco encapsulado fue la doxorubicina (DOX) que es un tipo de fármaco anticancerígeno y la línea celular estudiada fue la NCI-H1437 que corresponde a células de cáncer de pulmón. Para la síntesis de nanopartículas metálicas se han reportado distintos métodos físicos y químicos. El método comúnmente usado, y que se usó en este proyecto, fue el llamado crecimiento químico mediado por semillas. Este método se basa en dos etapas; la primera consiste en la síntesis de nanopartículas de alrededor de 2 nm llamadas semillas y la segunda se trata del crecimiento de las semillas en determinados ejes cristalinos preferenciales para producir una geometría determinada (Nikoobakht y El-Sayed, 2003). Para la síntesis de los nanogeles se usó el proceso de polimerización reportado por el grupo de polímeros del Instituto Tecnológico de Tijuana (González-Ayón *et al.*, 2015) y para el cargado de las nanopartículas y fármaco en los nanogeles se usó el método de

nanoprecipitación. Tanto la solución de nanopartículas como los sistemas cargados fueron caracterizados ópticamente midiendo su absorbancia en función de la longitud de onda incidente, térmicamente cuantificando los cambios de temperatura de la solución en el tiempo y morfológicamente mediante las micrografías obtenidas por el microscopio de transmisión de electrones (TEM) cuya información se complementó con estudios de dispersión de luz dinámica (DLS). Para conocer la cinética de liberación del fármaco se realizaron experimentos *in-vitro* a condiciones de temperatura estable (37°C) y un valor de pH determinado (7.4). También se realizan pruebas de citotoxicidad y liberación de fármaco en la línea celular NCI-H1437 de células de cáncer de pulmón. Este proyecto se realizó con el apoyo del departamento de óptica del CICESE, el laboratorio de polímeros del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT) y el departamento de innovación biomédica del CICESE quienes contribuyeron desde su experiencia en los temas relacionados a óptica, química y biomedicina, respectivamente.

1.1 Hipótesis

- Que es posible aumentar la eficiencia de conversión fototérmica usando nanopartículas de oro con forma de tetrápodos y pueden ser usadas para inducir el proceso de liberación de fármaco en nanogeles termosensibles.
- Que es posible usar nanogeles termosensibles y biocompatibles (PEG-NVCL) para cargar nanopartículas de oro y liberar el fármaco anticancerígeno Doxorubicina mediante el aumento de temperatura inducido por la absorción debida a las resonancias plasmónicas de las nanopartículas metálicas.
- Que la viabilidad celular de la línea NCI-H1437, correspondiente a células de cáncer de pulmón, no se reducirá debido a la irradiación de 785 nm y al uso de nanogeles sin cargar, pero sí ante la liberación de fármaco de nanogeles cargados.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

El objetivo general del proyecto es realizar estudios enfocados al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos en el tratamiento de cáncer.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar térmica, óptica y morfológicamente nanopartículas de oro con geometría de tetrápodos para optimizar efectos térmicos inducidos por absorción de luz.
- Cargar el fármaco doxorubicina (DOX) en nanogeles termosensibles cargados con nanobarras o nanotetrápodos de oro previamente sintetizados.
- Caracterizar la eficiencia de liberación y viabilidad de los nanogeles cargados en experimentos *in vitro* empleando la línea celular NCI-H1437.

1.3 Estructura de la tesis

Esta tesis comprende cinco capítulos y está organizada de la siguiente manera: En el Capítulo 1. se presenta la introducción, hipótesis, objetivos y estructura de la tesis. En el Capítulo 2. se describen los antecedentes y estado del arte del proyecto; se presenta la información relacionada al esparcimiento y absorción de luz por nanopartículas metálicas, el uso de nanopartículas para el tratamiento del cáncer, los nanogeles termosensibles como sistemas de administración de fármacos y el trabajo hecho previamente en el grupo de investigación. En el Capítulo 3. se muestra la metodología experimental utilizada; de forma detallada se explica el proceso de síntesis de nanopartículas, el proceso de síntesis de nanogeles, el proceso de cargado de nanopartículas y fármaco en nanogeles termosensibles, las metodologías de caracterización óptica, térmica y morfológica, los experimentos para estudiar la cinética de liberación del fármaco y las pruebas de viabilidad celular en la línea celular NCI H1437, entre otros. Los resultados obtenidos en este trabajo y su discusión se describen en el Capítulo 4. Y finalmente, en el Capítulo 5. se presentan las conclusiones de esta tesis y el trabajo propuesto a futuro.

Capítulo 2. Antecedentes

En este capítulo se describe la información y trabajos realizados que anteceden al presente proyecto de tesis. En específico, se describe el fenómeno de esparcimiento y absorción de luz por nanopartículas metálicas, sus efectos térmicos y sus aplicaciones biomédicas. También se mencionan los trabajos relacionados al uso de nanogeles termosensibles para el transporte y administración dirigida de fármacos, los desarrollos relacionados con procesos de liberación, caracterización y cargado de nanobarras de oro en nanogeles. Finalmente, se describe de manera breve el trabajo hecho por nuestro grupo de investigación al respecto.

2.1 Esparcimiento y absorción de luz por nanopartículas metálicas

Cuando una onda electromagnética (luz) incide en una nanopartícula metálica, de dimensiones menores a la longitud de onda de la onda incidente (1 – 100 nm), los electrones de conducción del metal perciben un campo eléctrico oscilante que los desplaza de su posición original haciéndolos oscilar de forma coherente (Ver Figura 1). Esta oscilación coherente y colectiva de los electrones de la banda de conducción en la nanopartícula que se genera en la interfaz metal/dieléctrico es lo que se conoce como plasmones de superficie localizados (LSP, por sus siglas en inglés). Si la frecuencia de la onda incidente coincide con la frecuencia de resonancia de la nube electrónica, se producen las llamadas resonancias de plasmones superficiales localizados (LSPR). En la LSPR, los plasmones tienen dos mecanismos de decaimiento; el esparcimiento (o decaimiento radiativo) y la absorción (o decaimiento no radiativo) de luz. El esparcimiento se produce debido a que los electrones desplazados forman un dipolo oscilante con la carga positiva, este dipolo emite radiación con la misma frecuencia de la luz incidente y que generalmente suele usarse como mecanismo de contraste para aplicaciones de microscopía. En la absorción, parte de la energía del movimiento de los electrones se transforma en calor debido a interacciones con la red metálica, en este proceso los fotones incidentes se convierten en fonones. El aumento de temperatura y la disipación térmica inducida por la absorción de la luz se produce de forma casi instantánea (100 ps a 10 ns), localizada y controlada, lo que permite inducir efectos térmicos localizados que se han usado en aplicaciones como la terapia fototérmica para tratamiento del cáncer y la liberación controlada de fármacos en regiones microscópicas, que es justo la aplicación a la que se enfocan los objetivos de este trabajo.

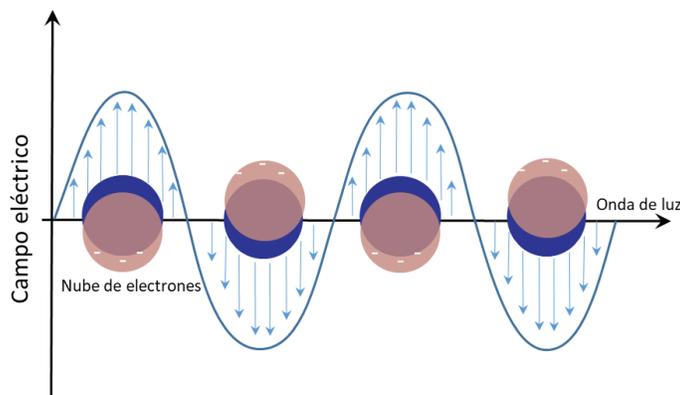


Figura 1: Esquema representativo de la interacción del campo eléctrico con nanopartículas metálicas y excitación de plasmones superficiales localizados.

Debido a que los LSPs se originan a partir del movimiento de los electrones de conducción en las nanopartículas metálicas, la LSPR depende de características intrínsecas de la nanopartícula como la densidad de electrones, la masa efectiva de los electrones, las propiedades dieléctricas del medio circundante, el tamaño y la geometría de la nanopartícula (Kim *et al.*, 2019b). Existen varios metales que presentan LSPRs intensas en distintos rangos del espectro electromagnético; sin embargo, para aplicaciones biológicas es importante usar radiación de longitudes de onda cuya absorción en tejidos sea baja y así disminuir los daños que se puedan causar a estos. Existen algunas regiones del espectro electromagnético, denominadas ventanas biológicas, en las que la penetración en tejidos blandos es máxima debido a la baja absorción/dispersión de la luz por la hemoglobina y el agua (Frangioni, 2003). En este proyecto se propone trabajar con luz cuyas longitudes de onda estén dentro del rango espectral de la primera ventana biológica (650 a 900 nm).

También es importante que el material del que se compone la nanopartícula no genere daños innecesarios al medio en el que se encuentra, es decir, que sea biocompatible. Aunque metales como el cobre, la plata o el níquel presentan LSPRs en la primera ventana biológica, las nanopartículas de oro han sido las más usadas en aplicaciones de terapia fototérmica debido a su alta eficiencia de conversión fototérmica, alta estabilidad química y su reducida toxicidad en tejidos biológicos. Adicionalmente, las nanopartículas de oro han sido óptimamente funcionalizadas con diversos ligandos biológicos como el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y anticuerpos para diversas aplicaciones biológicas (Venkatesan *et al.*, 2013). Existen diferentes geometrías de nanopartículas de oro que presentan resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica, entre estas se destacan las nanoesferas, nanoplacas, nanocajas, y nanobarras, entre otras. En la Figura 2 se presentan algunas de las geometrías típicas de nanopartículas

de oro con resonancias en la primera ventana biológica. La elección para el uso de una u otra de estas geometrías depende de la aplicación específica que se desee, pero en general para aplicaciones biológicas se busca que tengan grandes secciones transversales de absorción en la región del infrarrojo cercano (NIR), facilidad de sintonizar su LSPR en la longitud de onda de interés, fácil funcionalización, eficiencia y reproducibilidad de su proceso de síntesis, estabilidad de conservación de morfología en el tiempo, rango de tamaño apropiado y alta biocompatibilidad (Azzazy *et al.*, 2012). En nuestro caso, además de las características mencionadas anteriormente, es necesario que la nanopartícula tenga un tamaño adecuado para su cargado en nanogeles termosensibles con diámetros en el rango de 30 a 300 nm.

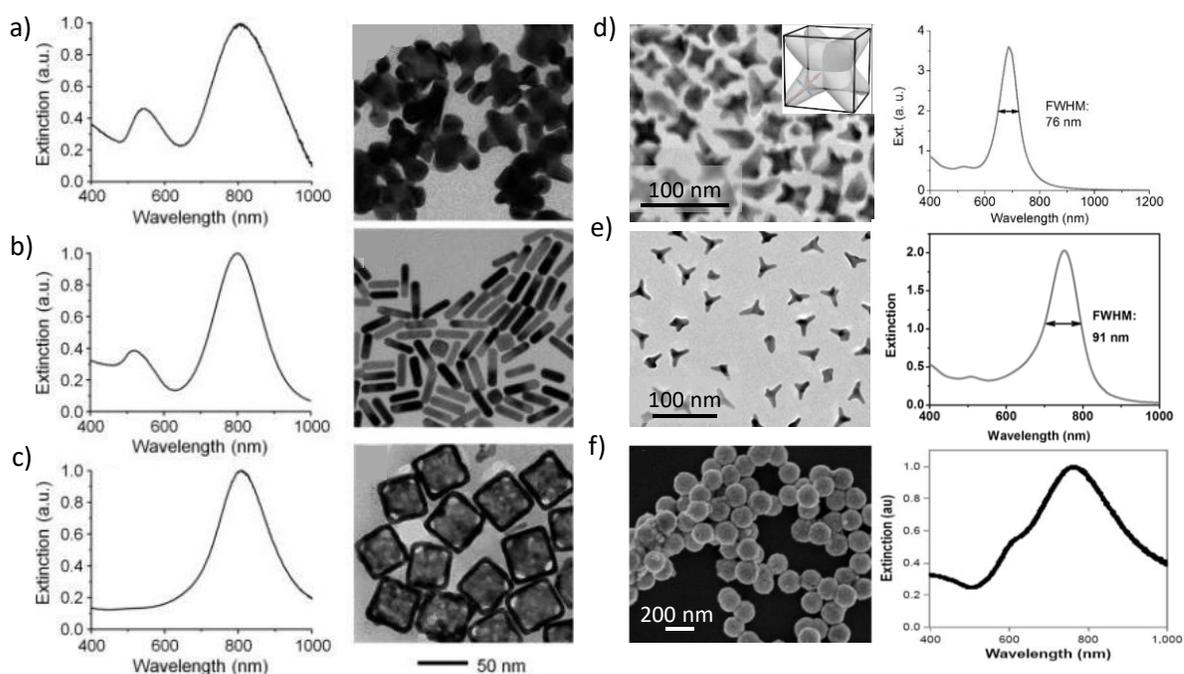


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y LSPR de nanopartículas de oro de diferentes geometrías con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica: nanohexápodos (a), nanobarras (b), nanocajas (c), nano-octápodos (d), nanotetrápodos (e) y nanocascáras (f); (imágenes obtenidas de (Chang *et al.*, 2018, 2019; Fay *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2008).

Particularmente, para la aplicación en este proyecto se consideran nanopartículas de oro con geometrías de nanobarras (AuNRs) y nanotetrápodos (AuNTPs). Las nanobarras (o “nanorods”) han sido ampliamente estudiadas, por lo que su método de síntesis y propiedades ópticas son bien conocidas. Las nanobarras de oro se destacan por presentar dos resonancias plasmónicas; una corresponde a su dirección transversal y la otra a la dirección longitudinal. La resonancia correspondiente a la dirección transversal cae aproximadamente en 530 nm y es debida a la sección circular de la nanopartícula. La resonancia longitudinal corresponde a la dirección longitudinal de la nanopartícula y puede sintonizarse en el rango

espectral de 650 – 1000 nm variando simplemente su razón de aspecto (longitud/diámetro), como se ve en la Figura 3. Las nanobarras también se han destacado sobre otras geometrías de nanopartículas porque su naturaleza permite una fácil funcionalización química superficial, por su tamaño, morfología y monodispersidad, además estas pueden ser monitoreadas con exactitud durante el proceso de síntesis mejorando sus propiedades ópticas (Wang *et al.*, 2008). Cabe mencionar que en el proceso de síntesis de las nanobarras de oro se usa como surfactante el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que ha sido reportado como un componente altamente tóxico (Grabinski *et al.*, 2011). Es por eso que, para aplicaciones biológicas, tras el proceso de síntesis, es necesario realizar un riguroso proceso de purificación a las nanobarras o incluso funcionalizarlas con algún polímero biocompatible. En nuestro proyecto, además de ser purificadas, las nanobarras serán cargadas dentro de nanogeles altamente biocompatibles.

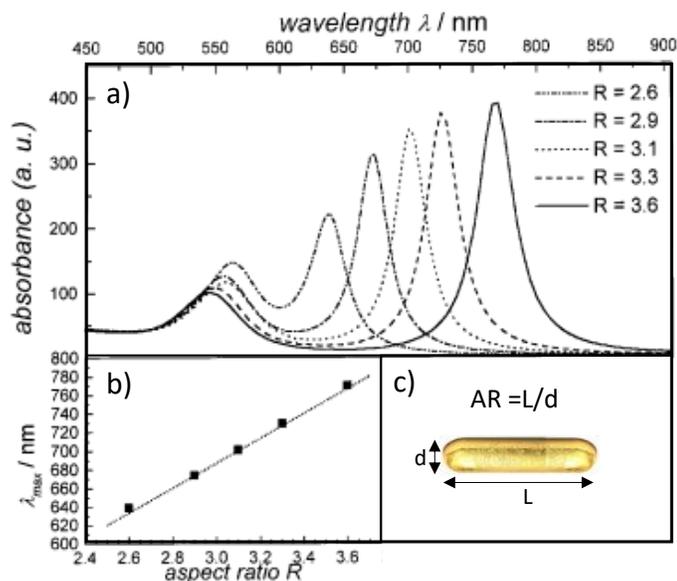


Figura 3. Simulación de espectros de absorción de nanobarras de oro con diferentes razones de aspecto (a), dependencia del máximo de absorbanza longitudinal del plasmón en función de la razón de aspecto de la nanobarra de oro. (Gráficas tomadas de Nanodots *et al.*, 1999) (b) y esquema representativo en el que se indica la longitud y diámetro de la nanobarra de oro (c).

Por otro lado, a diferencia de las nanobarras, los nanotetrápodos de oro son una geometría de nanopartícula relativamente poco estudiada. Estos se caracterizan por tener resonancias plásmonicas intensas y estrechas en la primera ventana biológica, alta eficiencia de conversión fototérmica, baja citotoxicidad y facilidad para circular por a través del torrente sanguíneo (Guerrero-Martínez *et al.*, 2011; Sultana *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, la síntesis controlada de “los brazos” del tetrápodo ha sido difícil ya que el proceso de crecimiento rompe la simetría de los cristales cúbicos del centro de la

cara (Wu *et al.*, 2009). Por esta razón es complicado sintetizar los brazos (y por ende los nanotetrápodos con repetitividad) de manera controlada en términos de número, tamaño y disposición espacial. La dificultad en la síntesis de nanotetrápodos es un factor importante ya que, al igual que con las nanobarras, su resonancia plasmónica depende de su razón de aspecto (ver Figura 4). Como salida a esta dificultad, recientemente se presentó un método de crecimiento mediado por semillas que se basa en un delicado control cinético de las tasas de deposición y difusión de los átomos, para así sintetizar AuNTPs monodispersos con cuatro brazos alargados en cuatro direcciones $\langle 110 \rangle$ (Chang *et al.*, 2019). Otra dificultad que ha restringido el uso de este tipo de nanopartículas en aplicaciones prácticas es la inestabilidad de los brazos del nanotetrápodo. Se ha demostrado que tras pocas horas de su síntesis, los brazos tienden a colapsar dando como resultado cambios rápidos en la morfología de la nanopartícula y por consecuencia en la LSPR (Chandra *et al.*, 2017). Como solución a dicho problema, Chang *et al.*, 2019, propone un método de estabilización usando monometoxi- poli(etilenglicol)-tiol (mPEG-H) que se logra formando enlaces de Au-S. Tras este proceso de estabilización se reporta que los nanotetrápodos mejoran significativamente su estabilidad, mostrando pocos cambios en su resonancia plasmónica durante aproximadamente un mes.

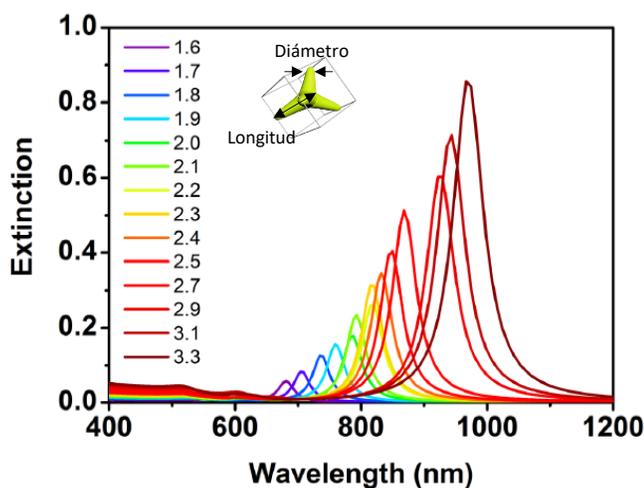


Figura 4. Simulación FDTD de nanotetrápodos de oro (AuNTPs) con diferentes relaciones de aspecto (longitud del brazo/diámetro del brazo). Imagen tomada de (Chang *et al.*, 2019).

2.2 Uso de nanopartículas metálicas para el tratamiento del cáncer

En las últimas décadas se ha logrado un progreso notable en la aplicación de nanopartículas metálicas para el tratamiento del cáncer. Esto ha despertado un interés cada vez mayor que radica en la posibilidad de aplicarlas para resolver problemas asociados a la aplicación directa de fármacos o la cirugía de extracción

tumoral que se usan tradicionalmente para tratar esta enfermedad. La aplicación directa de fármacos o quimioterapia tiene como desventajas que algunos cuerpos pueden generar resistencia a los medicamentos, además de la falta de capacidad de focalización del tratamiento, así como la distribución inespecífica de fármacos y la toxicidad sistémica. Por su parte, la cirugía de extracción solo se puede aplicar en tumores sólidos de pacientes en etapas tempranas y las cirugías suelen ser dolorosas y de lenta recuperación.

Entre los avances más importantes del uso de nanopartículas para tratar el cáncer, se destaca la terapia fototérmica y la funcionalización de la superficie de nanopartículas para usarlas como vehículos de administración controlada de fármacos. En la terapia fototérmica se aprovecha la absorción y disipación de calor que se produce debido a las LSPR de nanopartículas para aumentar la temperatura de la zona tumoral hasta llegar a la muerte de las células cancerígenas por hipertermia; lo que promete una mínima invasividad y baja toxicidad. En cuanto a la funcionalización de nanopartículas, se ha logrado agregar ligandos (péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos) a la superficie de la nanopartícula para atacar específicamente determinadas células cancerosas; también se han logrado adherir fármacos a la superficie de la nanoestructura aumentando su tiempo de circulación en sangre y mejorando su administración (Venkatesan *et al.*, 2013). Los actuales estudios están enfocados en combinar la terapia fototérmica con la quimioterapia, así como el uso de vehículos adecuados que permitan la administración y liberación controlada de fármacos en tiempo manejable y dosis precisas.

2.3 Nanogeles como sistemas de administración dirigida de fármacos

Uno de los fármacos más usados para el tratamiento del cáncer es la doxorubicina, un fármaco altamente eficiente para tratar sarcomas de tejidos suaves, cáncer de vejiga, de seno, testicular, de ovario, gástrico y de pulmón. Sin embargo, si es suministrada vía intravenosa, esta suele acumularse en tejidos y órganos como intestinos, hígado, riñón, vaso, pulmón y corazón, ocasionando importantes efectos secundarios entre los que destacan la mielosupresión y la cardiotoxicidad (Cai *et al.*, 2019; Unverferth *et al.*, 1982). Por esta razón, suele suministrarse encapsulada en liposomas pegilados (lo que se conoce comercialmente como Doxil), que le brindan un mayor tiempo de circulación en el torrente sanguíneo hasta acumularse en tumores cancerígenos por el efecto EPR. Aunque el uso del Doxil disminuye los efectos secundarios que se presentarían al usar DOX libre, la Doxil ha mostrado signos de resistencia farmacológica y tiene alto costo con respecto a la DOX libre. Con el fin de suministrar de forma eficiente fármacos como éste, es importante

encontrar alternativas de vehículos o nanoportadores capaces de mejorar el transporte, distribución y liberación controlada y localizada en la zona tumoral.

En esta búsqueda, se ha considerado la posibilidad de usar el efecto térmico inducido por la absorción de las resonancias plasmónicas de nanopartículas metálicas como una llave que active y desactive la liberación de fármacos mediante nanoportadores basados en polímeros termosensibles. Entre las opciones de nanoportadores se destacan las micelas poliméricas, liposomas e hidrogeles (Lee and Nguyen, 2013; Priya James *et al.*, 2014). Los parámetros más importantes a tener en cuenta para elegir un nanoportador son: su composición, tamaño y forma. Variando su composición es posible cambiar sus propiedades físicas y químicas ante estímulos externos tales como campos magnéticos, cambios de temperatura o cambios de pH. El tamaño y la forma influyen en los procesos de cargado, liberación y estabilidad en experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Los nanogeles se destacan, entre estas opciones, por tener una buena estabilidad química en un amplio intervalo de temperaturas y un alto volumen para cargado de fármacos y/o nanopartículas. Particularmente, los nanogeles usados en este proyecto se componen por un núcleo formado por el polímero termosensible poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL) y por el copolímero con *N*-vinilpirrolidona (VP) y una coraza altamente biocompatible compuesta de cadenas de metacrilato de poli (etilenglicol) metiléter (PEGMA) que sobresalen del núcleo. La alta biocompatibilidad del PEGMA les permitiría transitar por el torrente sanguíneo sin ser detectados por el sistema inmune de tal forma que puedan llegar al tumor cancerígeno mediante una funcionalización adecuada o aprovechando el efecto EPR. La termosensibilidad de los polímeros que componen el nanogel hace que a temperaturas mayores a una determinada “temperatura de transición (T_{Tr})”, los polímeros rompan los enlaces que tienen con el hidrógeno del agua y se dé una interacción únicamente de polímero – polímero, haciendo que el nanogel se contraiga y libere toda el agua líquida que tenga en su interior. A temperaturas inferiores a su temperatura de transición el nanogel favorece los enlaces de hidrógeno y la interacción predominante en el núcleo es de tipo polímero – hidrógeno, esto quiere decir que el nanogel se hincha absorbiendo agua y tiene la propiedad de almacenar agua o fármaco en su interior. Debido a que los polímeros se unen entre sí mediante enlaces covalentes el proceso es completamente reversible, por lo que el proceso de hincharse y contraerse se puede repetir cuantas veces se desee (González-Ayón *et al.*, 2015). La forma de activar el proceso de liberación de forma controlada es mediante el aumento de temperatura, lo cual se puede conseguir al irradiar las nanopartículas que estén al interior del nanogel con una longitud de onda que coincida con su resonancia plasmónica. Un esquema representativo del mecanismo de acción propuesto se muestra en la Figura 5.

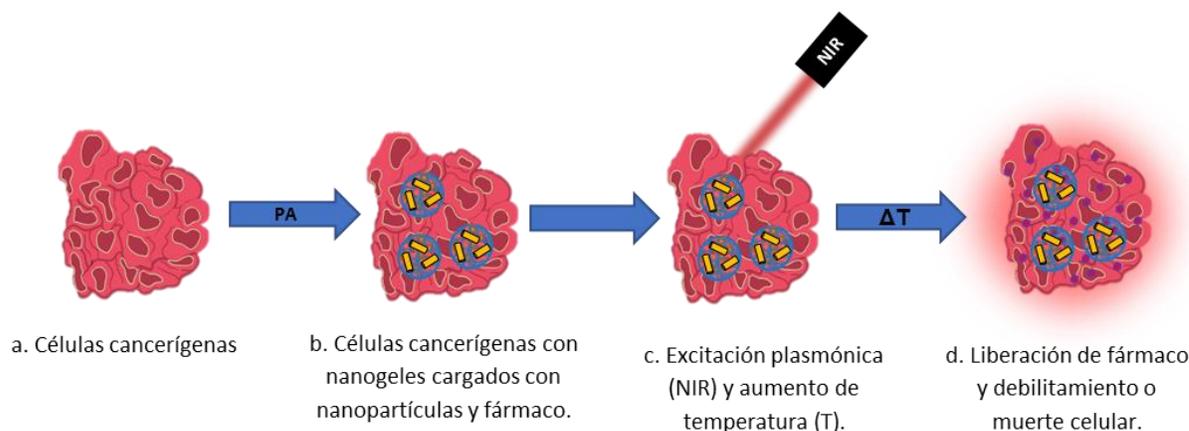


Figura 5. Esquema representativo del mecanismo de liberación controlada de fármacos propuesto en este proyecto.

2.4 Trabajo hecho previamente en el grupo de investigación

El desarrollo de este proyecto de investigación se enmarca en una colaboración interinstitucional (CICESE e Instituto Tecnológico de Tijuana) que tiene como objetivo principal la realización de experimentos que contribuyan al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos en el tratamiento de cáncer. En el marco de esta colaboración, se han sintetizado nanobarras de oro con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica y se realizaron estudios de cargado y liberación *in-vitro* de fármaco en polimerosomas termosensibles (DíazDuarte-Rodríguez *et al.*, 2019). Los resultados de estas pruebas arrojaron que los polimerosomas usados fueron tóxicos y que la concentración de nanopartículas cargadas fue insuficiente para obtener la respuesta térmica necesaria para generar la muerte celular. Como solución a este problema, se propuso usar nanogeles biocompatibles en lugar de polimerosomas y aumentar la concentración de nanobarras en los nanogeles. Posteriormente, se realizó la síntesis y caracterización de la eficiencia térmica inducida por la absorción de luz de nanobarras de oro con LSPR alrededor de 805 nm a diferentes concentraciones. Además, se realizaron pruebas de encapsulado de estas nanopartículas en nanogeles termosensibles y se caracterizó el efecto térmico de estos sistemas cargados inducido también por la absorción de luz (González-Ayón *et al.*, 2015; Ortega Salazar, 2021). Como continuación del trabajo previamente realizado y siguiendo la misma directriz, en este proyecto de tesis se propone realizar el cargado del fármaco DOX en los nanogeles que han sido previamente cargados con las nanopartículas de oro y evaluar, tanto su eficiencia de liberación debido al efecto térmico inducido por absorción de luz, como su viabilidad en una línea celular. Adicionalmente, se propone la caracterización termo-óptica de nanopartículas de oro en forma de tetrápodos (previamente sintetizadas) con LSPR alrededor de 800 nm en vías de optimizar los efectos térmicos que hasta ahora se han logrado con las nanobarras. Debido a la

simetría de los cuatro “brazos” de los nanotetrápodos, se espera que su eficiencia térmica sea mayor con respecto a la obtenida con las nanobarras, esto debido a que en las primeras es más probable que se ilumine de manera más eficiente la misma sección transversal, no así en las nanobarras en donde su orientación (principalmente en solución coloidal) es aleatoria y que difícilmente coincide con la dirección de la polarización.

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se presentan los métodos experimentales usados para el desarrollo del presente proyecto. En específico, se describe la síntesis y caracterización de muestras, se da una descripción detallada de los procesos de cargado de nanogeles, estudios de cinética de liberación de fármaco y pruebas de citotoxicidad en células.

3.1 Método de síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de nanobarras y nanotetrápodos de oro se usó el método químico denominado crecimiento mediado por semillas (Chang *et al.*, 2019; Nikoobakht and El-Sayed, 2003). Este método consta de dos etapas: en la primera se realiza la reducción química del agente precursor de semillas de oro que es el ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) usando borohidruro de sodio ($NaBH_4$) como agente reductor y bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($CTAB$) como estabilizante, esta reducción química permite la formación de nanopartículas de oro de aproximadamente 2 nm denominadas “semillas”. La segunda etapa consiste en el uso de una solución de crecimiento que promueve la atracción de semillas en ciertas direcciones cristalográficas, favoreciendo así el crecimiento en una dirección preferencial de las mismas. A continuación, se describe a detalle el procedimiento para la síntesis de nanobarras y nanotetrápodos de oro. Es importante mencionar que el proceso de síntesis de nanopartículas fue realizado por Jesús Eduardo Márquez Castro y Mirian Angelene González Ayón en el marco de la colaboración científica que se tiene con el grupo de polímeros del Instituto Tecnológico de Tijuana (ITT).

3.1.1 Síntesis de nanobarras de oro (AuNRs)

Para preparar la solución de semillas de nanobarras se mezcló $CTAB$ (7.5 mL, 0.1 M) con $HAuCl_4$ (5 mL, 5 mM) en un vaso de precipitado y se dejó en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó el agente reductor $NaBH_4$ (0.6 mL, 600 μ M) y se dejó en agitación 30 min a una temperatura constante de 25°C (Figura 6a).

Para la solución de crecimiento se mezcló $CTAB$ (100 mL, 0.1 M) con $HAuCl_4$ (5 mL, 10 mM). Posteriormente, se agregó nitrato de plata ($AgNO_3$, 1 mL, 10 mM) y ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 1 mL, 1 M)

y se dejó en agitación constante (125 RPM) en baño de aceite a 30°C durante 30 min. Después de esto, se agregó ácido ascórbico (AA, 0.8 mL, 100 mM) y justo en ese instante la mezcla pasó de una coloración ámbar a un tono incoloro (Figura 6b).

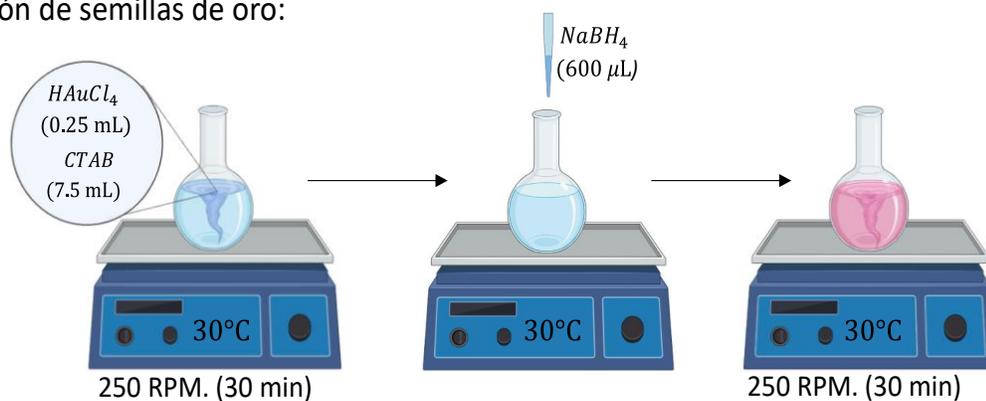
Finalmente se añadieron 250 μ L de la solución de semillas a la solución de crecimiento y la mezcla final se mantuvo en agitación constante a 200 RPM durante 6 horas (Figura 6c). Este proceso ha sido reportado por Liu *et al.*, 2014, es una variación del reportado por Nikoobakht and El-Sayed, 2003 y también fue usado por DiazDuarte-Rodriguez *et al.* 2019 y Ortega Salazar, 2021.

Con el fin de retirar la mayor cantidad posible de surfactante (CTAB) de la solución final de nanobarras fue necesario realizar un proceso de purificación. Este proceso consiste en llevar a cabo dos ciclos de centrifugado: el primero se realizó a 10000 RPM durante 30 minutos y el segundo a 6000 RPM durante 15 minutos. Al terminar cada ciclo de centrifugado se extrajo el sobrenadante con una micropipeta y se redispersó el sedimento en agua destilada. Después del proceso de purificación la solución tomó una coloración rojiza y se almacenó a temperatura ambiente para su caracterización posterior.

3.1.2 Síntesis de nanotetrápodos de oro (AuNTPs)

La síntesis de nanotetrápodos se realizó mediante un método de crecimiento mediado por semillas, similar al método usado para la síntesis de nanobarras descrito previamente en la sección (3.1.1). La solución de semillas se preparó mezclando CTAB (3.5 mL, 0.14 M) con $HAuCl_4$ (0.125 mL, 15 mM) y $NaBH_4$ (0.5 mL, 10 mM). Esta mezcla se agitó durante 20 min manteniéndose a una temperatura constante de 25°C. Posteriormente, la solución de semillas se agregó en un vial de vidrio de 20 mL con hidróxido de sodio ($NaOH$, 60 μ L) y agua desionizada (H_2O , 6.0 mL); conformando la solución A. Seguido a esto, se preparó la solución B que actuó como solución de crecimiento. Esta consta de CTAB (3.0 mL, 0.10 M), $HAuCl_4$ (0.38 mL, 15 mM), hexametilentetramina (HMT, 3.0 mL, 0.10 mM), ácido ascórbico (AA, 1.0 mL, 10 mM) y agua desionizada (0.62 mL). Se mezcló la solución A con la solución B, agitándose constantemente y manteniéndose a una temperatura de 25 °C durante 5 min. Pasado este tiempo, la solución tomó una coloración azulada oscura, lo que sugiere la formación completa de nanotetrápodos. Este proceso que se esquematiza en la Figura 7 fue reportado en (Nikoobakht and El-Sayed, 2003) y realizado por Jesús Eduardo Márquez en el ITT (Márquez-Castro, 2022).

a. Solución de semillas de oro:



b. Solución de crecimiento:



c. Crecimiento de semillas:

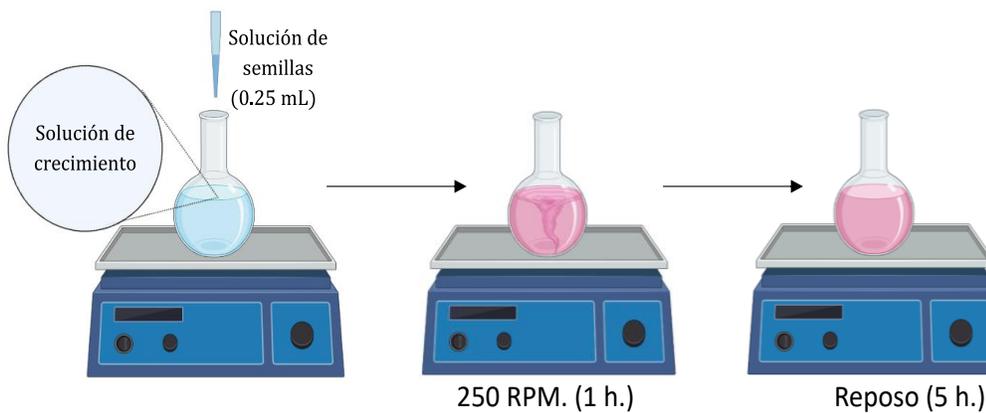
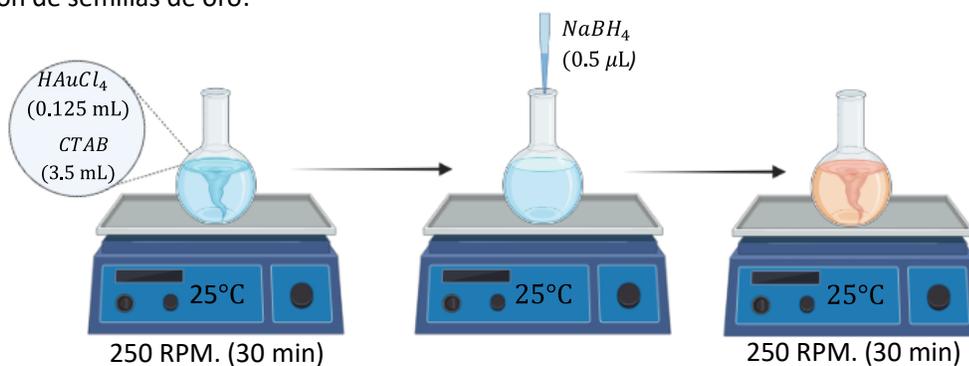
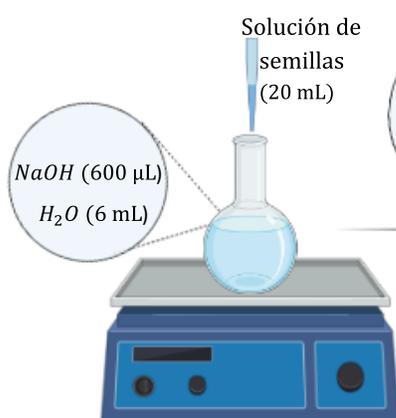


Figura 6. Esquema representativo del proceso de síntesis de nanobarras de oro. Solución de semillas (a), solución de crecimiento (b) y crecimiento de semillas (c).

a. Solución de semillas de oro:



b. Solución A:



c. Solución B (solución de crecimiento):

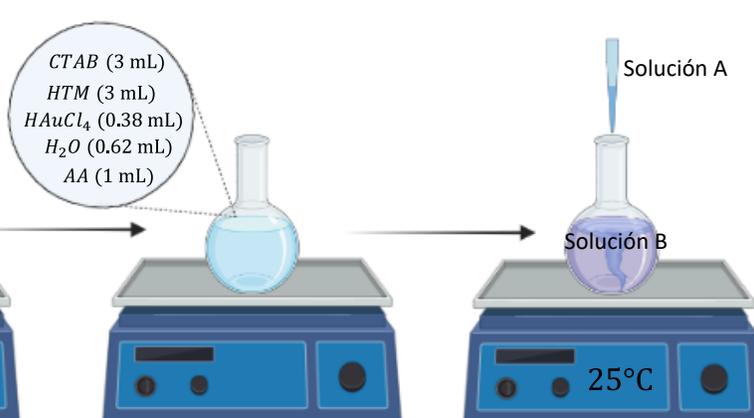


Figura 7. Esquema representativo del proceso de síntesis de nanotetrápodos de oro. Solución de semillas (a), solución A y solución de crecimiento (b).

3.2 Síntesis de nanogeles

Los nanogeles usados en este proyecto son nanogeles termosensibles del tipo núcleo-coraza, sintetizados mediante el método de copolimerización en emulsión sin tensoactivos. El núcleo entrecruzado está formado por el polímero termosensible PNVCL y por el copolímero con VP. La coraza se compone por cadenas altamente biocompatibles de PEGMA que emanan del núcleo. Estos polímeros se unen entre sí mediante enlaces covalentes que le brindan al nanogel una alta estabilidad para hincharse (cargando fármaco y nanopartículas) y comprimirse (liberando fármaco) al variar su temperatura. La temperatura a la que se da la máxima compresión del nanogel es llamada temperatura de transición (T_{tr}) y es dependiente del contenido de VP en el copolímero. En específico, el nanogel usado en este proyecto tiene una temperatura de transición de 38.5°C, una relación másica de 55:12:40 de PNVCL:VP:PEGMA y un diámetro hidrodinámico de entre 30 y 200 nm.

El proceso de síntesis ha sido reportado en (González-Ayón *et al.*, 2015). De manera breve, consiste en un proceso químico que favorece el entrecruzamiento de los monómeros NVCL, VP y PEGMA mediante la acción del iniciador térmico APS (persulfato de amonio) y el entrecruzante EGDMA (dimetacrilato de etilenglicol). Para sintetizar este tipo de nanogeles se mezcla NVCL, VP, PEGMA y EGDMA en un matraz con agua destilada. Esta mezcla de reacción se burbujea con nitrógeno durante 30 minutos, se sella el matraz y se deja en burbujeo lento durante 30 minutos más. Posteriormente, se deja en un baño de aceite mineral a 85°C hasta que el matraz alcanza el equilibrio térmico con el baño. A esta temperatura se adiciona el iniciador APS disuelto en agua desionizada y se deja reposar durante 30 minutos más. El proceso debe realizarse a una temperatura controlada de 85°C, pues a esta temperatura el monómero de NVCL es hidrófobo y forma pequeñas gotas en solución de agua que son estabilizadas por el polímero de PEGMA. En este punto el entrecruzante viaja al interior de la parte hidrófoba y reacciona con la NVCL formando la red de polímeros. Al finalizar el tiempo de reacción, el matraz se retira del baño de aceite y se coloca en agua fría ($T \sim 5^\circ\text{C}$) para detener la reacción química.

Normalmente, al finalizar la reacción química quedan restos del iniciador inactivo o monómeros que no alcanzan a reaccionar. Para separar estos restos del material de interés, el sistema pasa por un proceso de purificación mediante el método de diálisis. Finalmente, los nanogeles son congelados y liofilizados para trabajar con ellos en polvo.

3.3 Caracterización óptica

Para caracterizar ópticamente nanopartículas en solución coloidal es necesario conocer la potencia de luz incidente y las pérdidas asociadas a absorción y/o esparcimiento en el intervalo espectral de interés. Esta información se adquiere a partir de un breve tratamiento matemático a los datos experimentales de transmitancia y reflectancia (difusa y direccional) que pueden obtenerse mediante el arreglo experimental que usa una esfera integradora (Figura 8), o mediante el espectrómetro ultravioleta-visible (UV-VIS) que se describe en la sección 3.3.2. En el desarrollo de esta tesis se usó un arreglo u otro por facilidad en el traslado de las muestras.

3.3.1 Caracterización óptica mediante esfera integradora

Como se ve en la Figura 8 este arreglo consiste en un haz de luz emitido por una lámpara halógena de xenón (USHIO FDS 24V 150W) colimado (lente 1, $L1$, $f_1 = 5 \text{ cm}$) y enfocado (lente 2, $L2$, $f_2 = 15 \text{ cm}$) justo

a la entrada de un espectrómetro (Ocean Optics 4000, UV-VIS). En el camino del haz entre las lentes y el detector se ubica la cubeta de cuarzo que contiene la solución de nanopartículas y, seguida a esta, una esfera integradora (ISP-50-8-R-GT de 50mm de diámetro). La esfera integradora es un dispositivo óptico, esférico y hueco cuyo interior se compone de un material altamente reflectante que permite coleccionar la luz esparcida y homogeneizar el campo dentro de ella. Contiene un orificio en la parte frontal en el que se ubica la muestra, un orificio en la parte trasera y un puerto conector a fibra óptica que se pueden habilitar o deshabilitar según se desee obtener información de absorbancia o atenuancia.

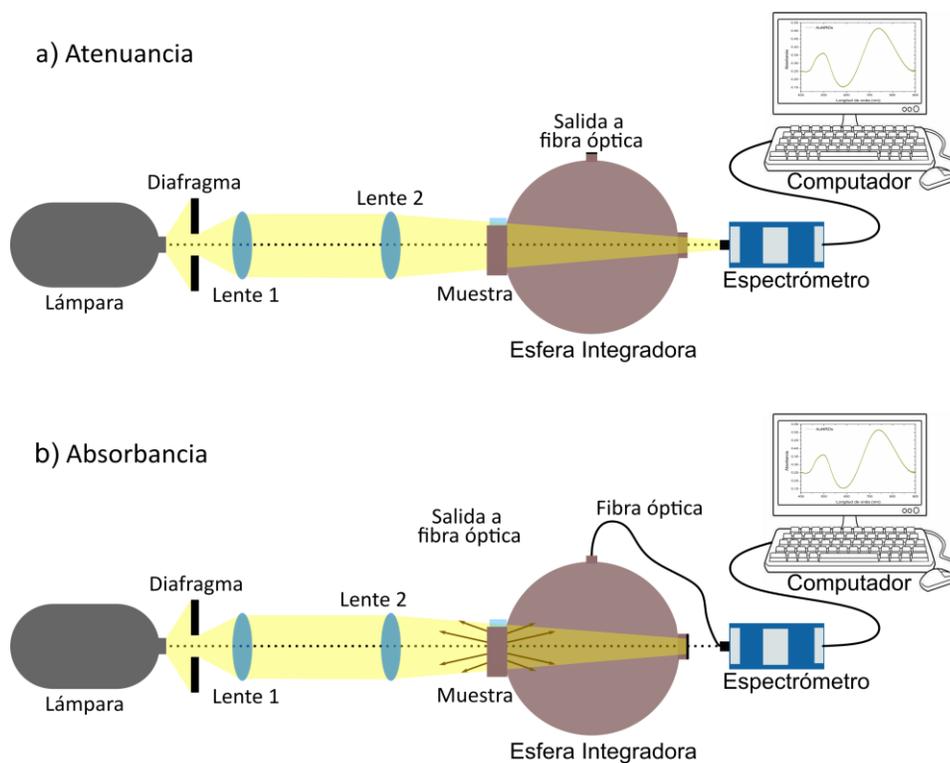


Figura 8. Esquema del arreglo para caracterización óptica mediante esfera integradora. Configuración de atenuancia (a) y configuración de absorbancia (b).

En configuración de atenuancia (Figura 8a), la esfera integradora permite el paso directo de la luz que se transmite de la muestra al espectrómetro y no interfiere en la medición. Para esto se abre el orificio de la parte frontal y el orificio de la parte trasera, justo antes del primer orificio se ubica la cubeta con nanopartículas y justo después del segundo orificio se ubica el espectrómetro. Se mide la potencia en ausencia de la muestra (P_0) y la potencia que se transmite en presencia de la muestra (P_m). La resta de la potencia transmitida y el incidente nos brinda una medida de las pérdidas por extinción (ocasionadas por la absorción y el esparcimiento). La transmitancia asociada a la extinción se obtiene normalizando la

potencia transmitida sobre la incidente ($T_e = P_m/P_0$) y la atenuancia queda definida como (Verhoeven, 1996):

$$D = -\log(T_e) \quad (1)$$

Para la configuración de absorbancia (Figura 8b) es necesario cerrar el orificio de la parte trasera de la esfera integradora y dejar habilitados únicamente el orificio de la parte frontal y el puerto conector a fibra óptica. De esta forma toda la luz que atraviesa la muestra (tanto la luz esparcida hacia adelante como la luz que pasa sin perturbarse) es colectada por la fibra que va al espectrómetro y podemos conocer la cantidad de luz absorbida por la muestra. Para el caso de nanopartículas cuyos tamaños sean inferiores a la longitud de onda, el esparcimiento es mínimo y la absorbancia se puede aproximar como:

$$A \approx -\log(T_A), \quad (2)$$

donde T_A es el cociente de la potencia medida en presencia de la muestra y la potencia incidente sin muestra o potencia de referencia.

3.3.2 Espectrómetro UV-VIS

El espectrofotómetro usado en este proyecto es un modelo UV-VIS Cary 100. Este tipo de espectrofotómetro usa una fuente que emite luz desde la región del ultravioleta hasta el visible (190 – 900 nm) del espectro electromagnético. El haz emitido es separado por un monocromador que permite seleccionar una longitud de onda determinada que pasa por un divisor de haz para obtener un haz de referencia y un haz que irá directamente a la muestra. De esta forma se mide la referencia/blanco y muestra al mismo tiempo, lo que permite corregir cualquier fluctuación del instrumento en tiempo real. Posteriormente, mide la luz atenuada por la muestra y el blanco de referencia en cada longitud de onda mediante un detector óptico. Este equipo, al igual que el arreglo óptico con esfera integradora, se basa en la ley de Beer-Lambert que relaciona directamente la absorbancia con la concentración de determinada sustancia, la longitud del medio y una constante de proporcionalidad (coeficiente de absorción molar).

Mediante esta técnica fueron obtenidos los espectros de absorbancia de las nanopartículas antes y después de los procesos de estabilización y purificación, con el fin de determinar la longitud de onda a la que presentan resonancia de plasmón localizado. También se analizó la absorbancia de diferentes concentraciones de doxorubicina disuelta en solución de fosfatos (pH 7.4) con el fin de obtener una

relación directa entre estos dos parámetros. La anterior relación fue útil para conocer la concentración de fármaco liberado en las pruebas *in vitro* (descripción detallada en la Sección 4.2.4) a partir de los cambios del espectro de absorción.

3.4 Caracterización térmica

La caracterización térmica consiste en cuantificar el aumento de temperatura de la solución de nanopartículas en función del tiempo de irradiación, el diagrama de este arreglo experimental se muestra en la Figura 9. El arreglo consta de un diodo láser (CNI, MDL-III-785 – 500 mW) con salida a fibra óptica de 785 nm y potencia variable de 0 a 500 mW. A la salida de la fibra se acopla un sistema óptico que consiste en una lente de colimación (Thorlabs, F240SMA-780) y una lente de enfoque esférica (Thorlabs, A397TM-B); a su vez, este sistema óptico se coloca sobre un sistema de traslación micrométrica *xyz* que permite mover la posición del haz de salida. La muestra a caracterizar se deposita dentro de una cubeta de cuarzo (CV10Q35F) de 3500 μL la cual se ubica justo a la salida del haz láser. Para medir el aumento de temperatura se usa un termómetro comercial (RDXL4SD 4-Channel Datalogger Thermometer) cuyos termopares se sumergen en la muestra a caracterizar y se posicionan aproximadamente a 5 mm del haz láser.

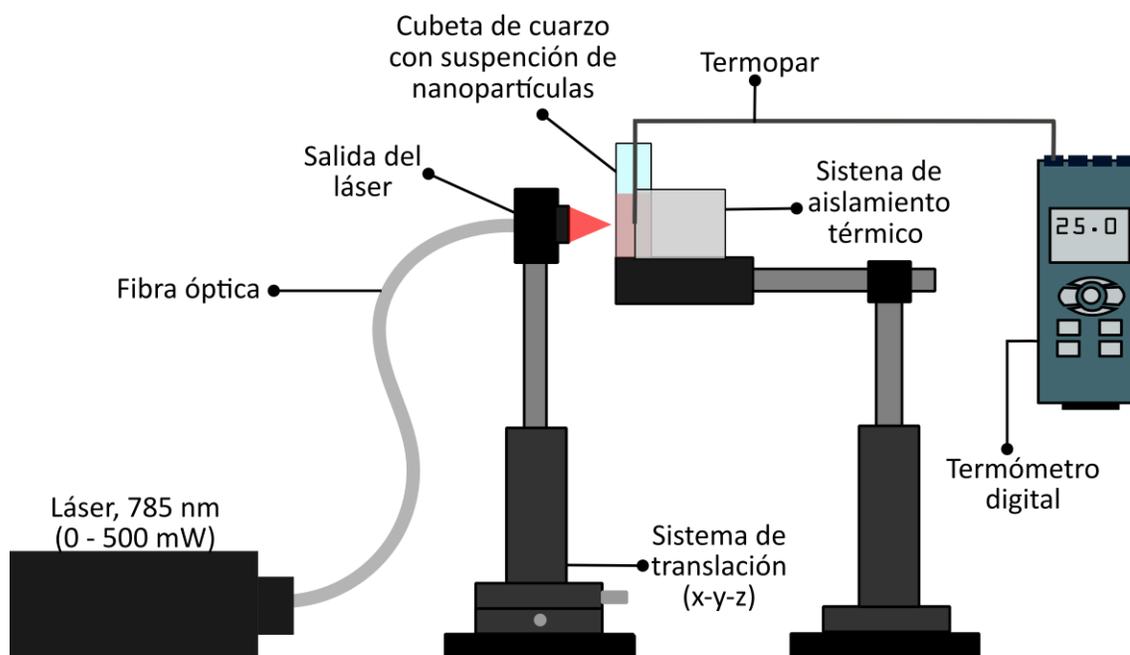


Figura 9. Esquema representativo del arreglo experimental usado para la caracterización térmica.

El proceso de adquisición de datos consistió en encender el diodo láser y aumentar la potencia del mismo gradualmente hasta obtener la potencia deseada. Mientras se estabilizaba el láser, el haz fue bloqueado con una tarjeta con el fin de que no incidiera en la solución de nanopartículas. Pasado el tiempo de estabilización, se desbloqueó el haz permitiendo que incidiera en la solución con nanopartículas mientras se tomaba el tiempo de medición con el cronómetro y, el termopar ubicado dentro de la solución cuantificaba los cambios de temperatura promedio. Al terminar el tiempo de medición se bloqueó el haz para disminuir gradualmente la potencia del láser y finalmente se apagó. Se tomaron datos 30 s después de la medición con el fin de evidenciar directamente que el aumento de temperatura se relacionara únicamente con la irradiación láser. Finalmente, se extrajeron los datos de temperatura en función del tiempo mediante una tarjeta SD y se depuraron quitando la información de temperatura relacionada al tiempo en que el haz estuvo bloqueado.

3.5 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). A continuación, se describen con detalle cada uno de estos métodos de caracterización.

3.5.1 Caracterización morfológica vía TEM

La caracterización morfológica de las nanopartículas y de los nanogeles termosensibles cargados se realizó mediante microscopía TEM. Se usó un microscopio TEM H7500 (Hitachi Co. Ltd., Tokyo Japan) operando en un voltaje de aceleración de alrededor de 80kV. Este microscopio permite obtener imágenes nítidas de objetos con dimensiones menores a la longitud de onda de la luz visible, para esto usa un haz de electrones con un voltaje lo suficientemente alto que permite atravesar la muestra a analizar. La emisión se produce mediante un filamento de tungsteno que es calentado hasta que los electrones de los orbitales más lejanos al núcleo adquieren la energía suficiente para liberarse de sus átomos. Posteriormente, el haz es focalizado mediante un arreglo de lentes electromagnéticas, que también redirigen su trayectoria y ángulo de incidencia sobre la muestra. Dependiendo del grosor y tipo de átomos que conformen la muestra, algunos electrones son desviados y otros logran atravesarla. Los electrones capaces de atravesar e interactuar con la muestra son colectados en una pantalla fluorescente en la que se observa los puntos de incidencia del haz. Finalmente, se usó un computador para complementar la visualización y almacenamiento de

información. El microscopio TEM cuenta con sistemas de refrigeración debido a las altas temperaturas que se generan en algunos procesos y para facilitar el flujo de electrones y evitar contaminación de las muestras la cámara principal del TEM debe estar sellada al vacío.

El haz de electrones solo puede interactuar de manera efectiva con muestras delgadas y compuestas de algún material conductor. Por esta razón todas las muestras deben ser debidamente preparadas antes de su análisis. Las nanopartículas metálicas que se caracterizaron en este proyecto, se manejaron en solución. Se tomó $0.1 \mu\text{L}$ de la muestra, se ubicó sobre una “rejilla de cobre del 75” recubierta con una capa delgada de carbón y se retiró el exceso de material. El proceso para las muestras de nanogeles es similar al de las nanopartículas metálicas, con la diferencia de que a las muestras compuestas de polímeros (nanogeles, en nuestro caso) es necesario recubrirlas con una gota de acetato de uranilo al 4% para que los electrones incidentes tengan un material con electrones libres con el que interactuar. A este proceso se le llama “tinción”, cabe mencionar que a las muestras compuestas de materiales conductores no lo requieren.

3.5.2 Caracterización vía DLS

La dispersión de luz dinámica es un método estadístico no invasivo que sirve para medir la distribución de tamaños de moléculas y partículas con dimensiones de hasta 1 nm. El método consiste en hacer incidir luz en la solución o muestra, medir fluctuaciones en intensidad causadas por la interferencia de la luz dispersada por cada partícula y a partir de esto determinar su diámetro hidrodinámico. Si las partículas estuvieran inmóviles se obtendría un valor de intensidad de luz dispersada constante, pero lo que se obtiene es que la intensidad de luz dispersada varía en el tiempo. Esta fluctuación en la intensidad de luz está relacionada con el movimiento aleatorio que tienen las partículas al interactuar entre ellas mismas o con moléculas de agua (movimiento Browniano). Y a su vez, la rapidez de este movimiento depende directamente del tamaño de la partícula, entre más pequeñas más rápidamente se mueven. A los datos de dispersión de luz en el tiempo se les hace una autocorrelación; una correlación rápida está relacionada con partículas pequeñas y, una correlación larga con partículas más grandes. A partir de esto es posible calcular el coeficiente de difusión traslacional y mediante la ecuación de Stokes – Einstein calcular el valor del diámetro hidrodinámico, que en realidad es el valor del diámetro de una partícula esférica que se difunde al mismo ritmo que la partícula que se está caracterizando.

Mediante esta técnica se estimaron los diámetros de las nanopartículas y los nanogeles termosensibles antes y después del proceso de cargado. El equipo que se usó fue el Zetasizer Nano-ZS ZEN3690 (Malvern

Instruments) con un láser de longitud de onda de 633 nm y un ángulo de 90°. Este mismo equipo se usó para determinar la temperatura de transición de los nanogeles con un barrido de calentamiento de 2°C/5 min en un intervalo de 25 a 50 °C.

3.6 Cargado de doxorubicina (DOX) en nanogeles termosensibles

Usando una relación fármaco - nanogel de 1:2 se disolvieron 38 mg de DOX y 76 mg de nanogel (NVCL:VP:PEG) en 19 mL de agua destilada, el sistema se dejó en agitación constante durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el fármaco residual mediante el proceso de diálisis. Para esto se depositó la solución en una membrana con peso molecular límite (MWCO, por sus siglas en inglés) de 12 a 14 Kilodaltons (KDa), que a su vez fue puesta dentro de un vaso de precipitado con 300 mL de agua destilada y se dejó en agitación durante 3 horas. Después de 1.5 h. de agitación se realizó un cambio de agua y se dejó nuevamente en agitación para cumplir el tiempo deseado. La solución que quedó tras el proceso de diálisis fue congelada para su posterior liofilización. En el proceso de liofilización se extrajo el agua del material congelado mediante la sublimación del hielo a presión reducida, dejando únicamente el nanogel cargado con fármaco. El proceso de cargado de DOX en nanogeles (así como el de DOX+nanopartículas, que se describe en la siguiente sección) se esquematiza en la Figura 10.

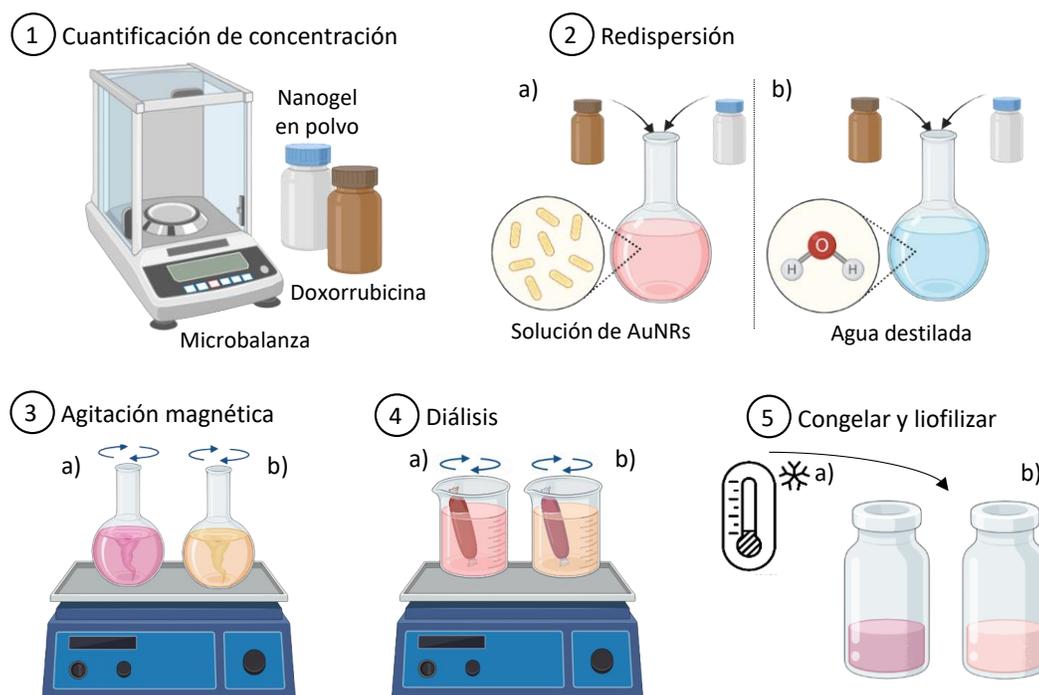


Figura 10. Esquema representativo del proceso de cargado de nanopartículas y doxorubicina en nanogel (b) y doxorubicina en nanogel (a).

Para cuantificar el contenido de doxorubicina en los nanogeles se disolvió 1 mg del material en 3 mL de solución de fosfatos PBS (pH 7.4), se obtuvo el espectro de absorbancia mediante espectroscopía UV-VIS y se tradujo el valor de máxima absorbancia en un valor de concentración de fármaco. Para esto se realizó una gráfica de calibración que relaciona la concentración del fármaco con su máximo valor en el espectro absorbancia, que resultó ser en 481 nm como se muestra en la sección de resultados (sección 4.2.4).

El porcentaje de DOX cargado en el nanogel se obtuvo a partir de la ecuación:

$$\% DOX_{cargada} = \frac{C_{DOX} * V_{PBS}}{m_{nanogel+DOX+AuNRDs}} * 100. \quad (3)$$

Mientras que la eficiencia del proceso de cargado se estimó mediante:

$$\%Eficiencia = \frac{C_{DOX} * V_{PBS}}{m_{DOX}} * 100 \quad (4)$$

donde C_{DOX} es la concentración de doxorubicina determinada a partir del espectro de absorción, V_{PBS} es el volumen de líquido (PBS) utilizado en la medición por UV visible, $m_{nanogel+DOX+AuNRs}$ es la masa del nanogel puesto en la solución de PBS y m_{DOX} es la masa de doxorubicina en la solución de PBS si se hubiera cargado la totalidad del material.

3.7 Cargado simultáneo de doxorubicina y nanopartículas en nanogeles termosensibles

En un trabajo de maestría previo (Ortega Salazar 2021), se exploraron dos métodos de cargado de nanopartículas en este tipo de nanogeles; el primer método (M1) consistió en utilizar los nanogeles en sólido y las nanobarras en solución, en el segundo método (M2) se utilizaron los nanogeles en solución y las nanobarras en sólido. La conclusión de este proceso es que el método de cargado M1 es más eficiente que el método M2 ya que el usar nanopartículas en sólido implica pasarlas por un proceso de liofilización que hace que se produzcan cúmulos, evitando un cargado de nanopartículas monodisperso que sí se obtiene con el método M1. Por esta razón el proceso de cargado simultáneo de doxorubicina y nanopartículas en nanogeles fue similar al proceso de cargado de doxorubicina en nanogeles, la única diferencia en el proceso es que, en lugar de usar agua destilada, se usó una solución de nanopartículas con una concentración aproximada de 0.25 mg/mL (ver Figura 10b).

La estimación del porcentaje de cargado y eficiencia de fármaco en nanogeles se hizo de la misma forma que se describió en la sección anterior. Para conocer el porcentaje de cargado de nanobarras se realizaron análisis termogravimétricos, comparando el porcentaje de residuo del TGA de los nanogeles antes y después del proceso de cargado con nanobarras.

3.8 Pruebas de cinética de liberación de doxorubicina

Las pruebas de liberación de fármaco *in vitro* de nanogeles con y sin nanopartículas de oro se realizaron en un baño térmico a 37°C y diluyendo los nanogeles cargados en una solución “Buffer” de fosfatos con un pH 7.4 (solución amortiguadora) para simular las condiciones biológicas de la aplicación deseada. El estudio se centró en observar la aceleración en el proceso de liberación del fármaco debido al aumento de temperatura producido por la absorción de las resonancias plasmónicas. Para esto se trabajó con seis sistemas que se describen a detalle en la sección de resultados (sección 4.3).

Para empezar el proceso de liberación controlada, se dispersaron 4 mg del sistema a usar en 5 mL de solución amortiguadora (PBS 7.4) y se colocó la dispersión dentro de una bolsa de diálisis Spectra/Por7 con MWCO de 15 kDa y un diámetro de 29 mm. Esta bolsa se ubicó dentro de un frasco de vidrio color ámbar (para que la luz no degrade el fármaco) con 200 mL de solución amortiguadora y se puso en agitación oscilatoria a 70 oscilaciones por minuto durante 1 hora a una temperatura constante de 37°C. Este proceso se realizó para cada uno de los sistemas por lo que dentro del baño térmico se tenían cuatro frascos. Pasado este tiempo de estabilización, se destapó cada uno de los frascos y se irradió directamente sobre la bolsa de diálisis con el láser con una longitud de onda de 785 nm a una potencia de 500 mW (irradiancia de 13.15 W/cm^2) de durante el tiempo determinado para cada sistema. Se dejó estabilizando dentro del baño térmico a 37°C y 70 RPM durante 1 hora para que el fármaco liberado se dispersara en la solución amortiguadora. Pasado el tiempo de dispersión se tomó una alícuota de 3 mL de la solución de PBS dentro del frasco (ahora también tendría fármaco liberado por los nanogeles a través de la bolsa de diálisis) y se sustituyó por 3 mL de solución amortiguadora (condiciones de sumidero). Este proceso se repitió cada hora, realizándose un total de seis veces (6 h) y una última alícuota se tomó transcurridas 24 horas después del momento en el que se sumerge por primera vez el frasco ámbar cargado en el baño térmico, para esto también se irradió una hora antes de tomar la alícuota.

La concentración del fármaco en cada una de las alícuotas tomadas se cuantificó a partir de los valores de absorbancia medidos mediante espectroscopía UV-VIS en la longitud de onda de máxima absorción para la doxorubicina y se tradujeron en concentración de fármaco mediante la curva de calibración para la

DOX en PBS (pH 7.4). El diagrama del proceso de la cinética de liberación del fármaco se muestra en la Figura 11.

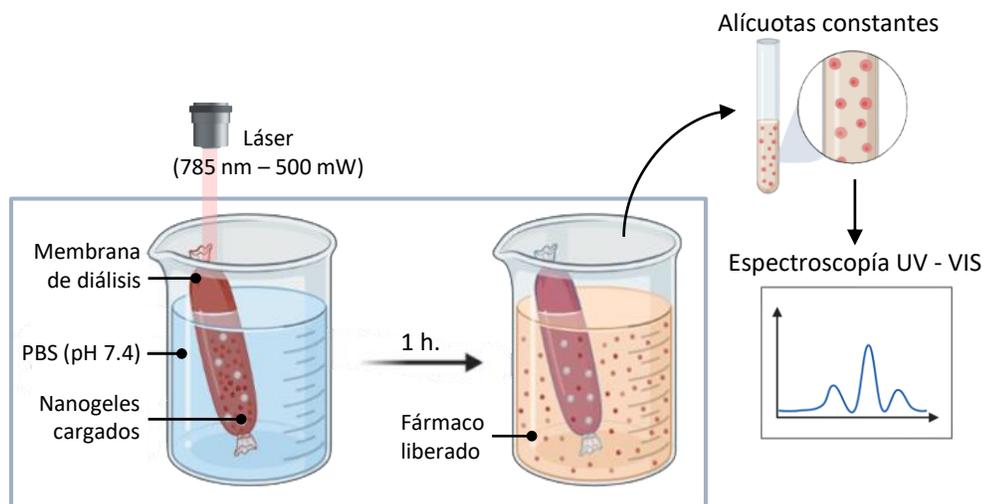


Figura 11. Diagrama representativo de las pruebas de cinética de liberación de fármaco.

3.9 Estudios de citotoxicidad en células

3.9.1 Cultivo celular

La línea celular con la que se trabajó fue la NCI-H1437 que corresponde a células de cáncer de pulmón. Estas se manejaron todo el tiempo en condiciones asépticas, usando material estéril y se manipularon dentro de una campana de flujo laminar.

El proceso de preparación de la línea celular inició descongelando una alícuota de células NCI-H1437 y colocándola en una caja de cultivo celular con medio RPMI-1640. La caja de cultivo celular se agitó ligeramente para homogeneizar la dispersión y se colocó en incubación por 24 horas a 37°C en una atmosfera con 5% de dióxido de carbono, en esta etapa las células se fijan al sustrato e inicia el ciclo celular. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las células en un microscopio óptico invertido para corroborar la correcta adherencia a la placa.

Una vez que las células fueron estabilizadas y presentaron una confluencia celular adecuada, fueron desprendidas mediante un proceso llamado tripsinización. En este proceso se extrae el medio de cultivo y se agrega la enzima tripsina a las células con el fin de inhibir la interacción de las proteínas de la matriz

extracelular que las anclan a la caja. Después, la caja se llevó a incubación por cinco minutos y se agregó nuevo medio de cultivo celular. Con el fin de cuantificar la cantidad de células con las que se trabajará se tomó una alícuota de las células desprendidas, se tiñó con azul tripano y se llevó a una cámara de Neubauer que permitió cuantificar la cantidad de células por cuadrante. Con estos valores se obtuvo un promedio de número de células por mL que nos permitió conocer la concentración necesaria para tener las 10 000 células por 100 μL de medio de cultivo con las que se trabajaría en los ensayos de citotoxicidad.

3.9.2 Pruebas de irradiación en células

Con el fin de evaluar el efecto de la irradiación en los diferentes sistemas a trabajar se realizaron algunas pruebas (ver sección 4.4.1) y se diseñó un montaje que permite irradiar cada pozo de la caja de cultivo celular sin afectar los sistemas adyacentes. Como se ve en la Figura 12, este montaje consiste en un soporte hueco (con movilidad en los ejes x-y) sobre el que se coloca la caja de cultivo celular. El láser se ubica de forma transversal a la caja y justo debajo del pozo irradiado se ubica un "black hole" para absorber la irradiación transmitida. Para cambiar de pozo a irradiar simplemente se mueve el soporte que contiene la caja de cultivo celular mientras el láser y el "black hole" quedan estáticos. Cabe resaltar que el proceso de irradiación se realizó en condiciones asépticas, ubicando el montaje en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente y que se diseñó el experimento tratando de minimizar el tiempo de exposición de las células fuera de la incubadora.

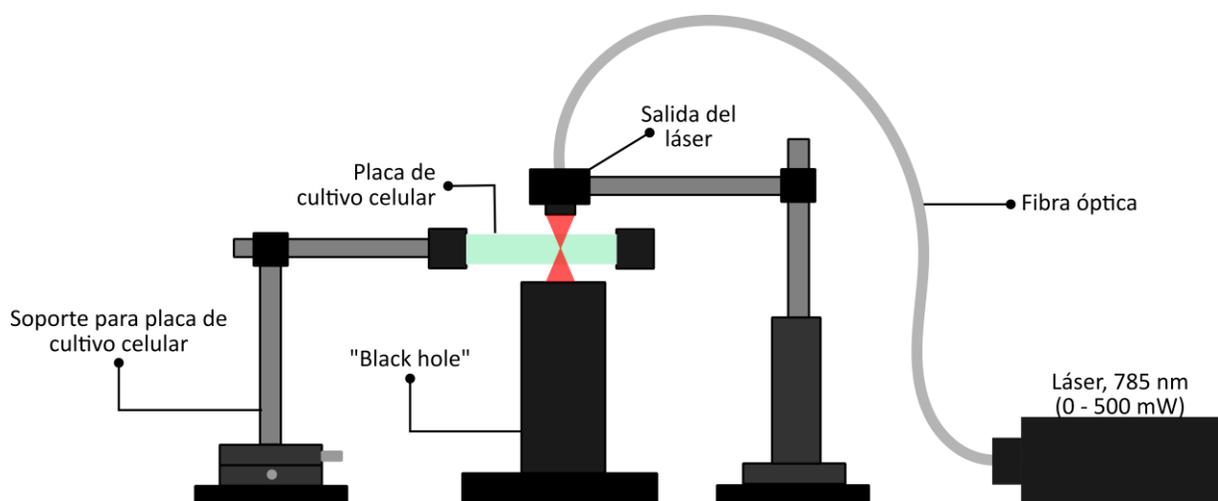


Figura 12. Esquema representativo del montaje usado para procesos de irradiación de células en pruebas de viabilidad celular.

3.9.3 Ensayo de citotoxicidad (MTS)

Se adicionaron 100 μL de medio de cultivo (RPMI-1640) en cada pozo (10000 células por pozo) y se mantuvieron en incubación durante 24 h. a 37°C con 5% de CO_2 para permitir la correcta adherencia de las células a la placa. Pasado el tiempo de incubación se aplicó el tratamiento correspondiente e inmediatamente se inició el proceso de irradiación para los sistemas que lo requerían. Posteriormente la placa fue puesta en incubación durante 24 h (este tiempo varió según la prueba realizada como se explica en la sección 4.4.2), se retiró el medio de cultivo, se adicionaron 20 μL del reactivo MTS en cada pozo más 80 μL de medio fresco y se dejó en incubación por 2 horas más. Finalmente se midió la densidad óptica de la placa de cultivo usando un micro lector Epoch a una longitud de onda de 490 nm. Un diagrama representativo de este proceso se muestra en la Figura 13. El porcentaje de viabilidad celular fue determinado mediante la ecuación (5).

$$\%Viabilidad = \frac{D.O. \text{ células tratadas}}{D.O. \text{ Células control}} \times 100 \quad (5)$$

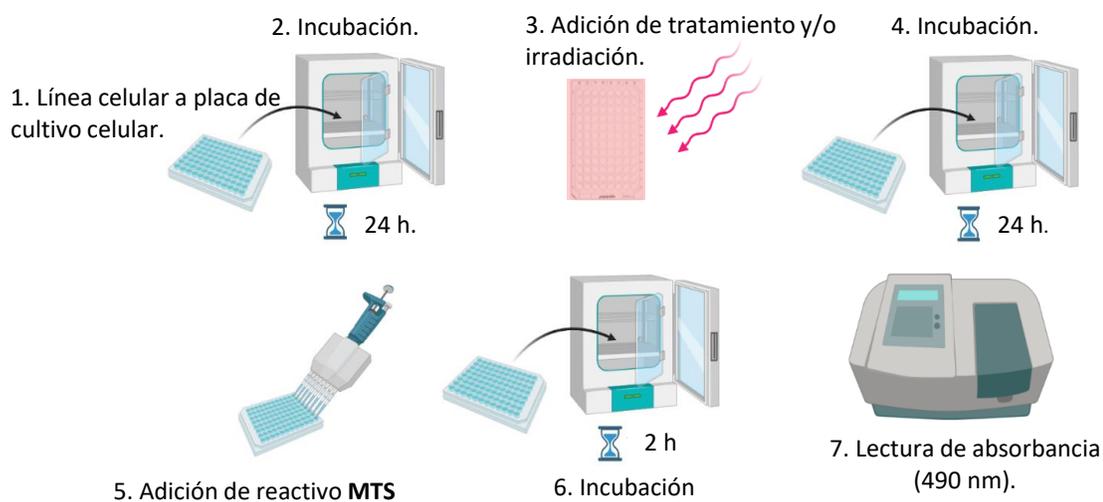


Figura 13. Proceso para pruebas de viabilidad celular.

Capítulo 4. Resultados

En este capítulo se describen y discuten los resultados del presente proyecto de tesis. Estos resultados incluyen la caracterización óptica, térmica y morfológica de nanogeles, nanobarras y nanotetrápodos de oro, así como el proceso de cargado de nanopartículas y fármaco en nanogeles, las pruebas de liberación de fármaco *in vitro* y las pruebas de viabilidad celular en la línea celular NCI-H1437.

4.1 Caracterización de nanobarras y nanotetrápodos de oro (AuNRs y AuNTPs)

Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de oro con geometrías de barras y nanotetrápodos con el fin de identificar la geometría óptima para su encapsulado en nanogeles y el posterior uso como agente fototérmico. Aunque otras geometrías de nanopartículas tienen resonancias plasmónicas en el intervalo de longitud de onda de interés (650 – 900 nm), en trabajos previos se demostró que hasta el momento las nanobarras son la geometría más adecuada para la aplicación deseada (Ortega Salazar, 2021). Estas nanobarras poseen una resonancia plasmónica sintonizable al variar su razón de aspecto (longitud/diámetro), alta eficiencia de conversión fototérmica y dimensiones adecuadas para un proceso de cargado en nanogeles, además su proceso de síntesis está bastante bien estandarizado por el grupo de investigación. Por su parte, los nanotetrápodos se presentan como una geometría novedosa y prometedora, pues debido a su geometría simétrica de los cuatro brazos, estos deberían presentar la misma sección transversal geométrica sin importar el ángulo desde el que se irradian y su orientación, lo que conduce a tener, en promedio, una mayor sección transversal de absorción con respecto a las nanobarras. A continuación, se presenta una comparación de la caracterización óptica, térmica y morfológica de estos dos tipos de nanopartículas.

4.1.1 Caracterización óptica

La caracterización óptica de las nanobarras de oro se realizó usando el espectrofotómetro comercial (UV-Vis Varian Cary 100) justo después del proceso de síntesis y purificación. La gráfica de absorbancia espectral muestra dos picos de absorción o resonancias plasmónicas (ver Figura 14); la primera asociada a su dirección transversal cerca de 500 nm y la segunda correspondiente a su dirección longitudinal alrededor de 760 nm. Esta última resonancia es la más intensa e importante para la aplicación deseada y

es muy cercana a la longitud de onda del láser usado como fuente de irradiación (785 nm) representada con la línea punteada.

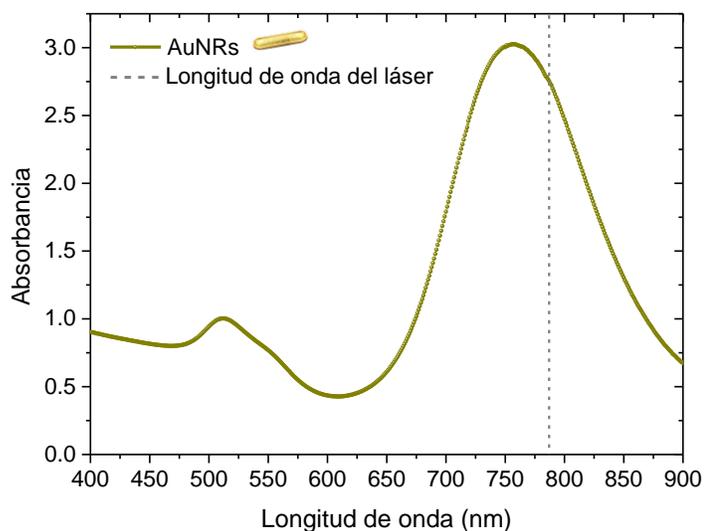


Figura 14. Espectro de absorción de las nanobarras de oro (AuNRs). La longitud de onda del láser está representada por la línea vertical punteada.

Los nanotetrápodos (que denominamos AuNTPs A) también se caracterizaron mediante el espectrofotómetro comercial justo después del proceso de síntesis, el espectro de absorción se muestra en la Figura 15a. Al igual que las nanobarras, estos presentan una resonancia máxima cerca de 770 nm la cual está asociada a la longitud y ancho de sus brazos. Cabe mencionar que previamente ya ha sido reportado que este tipo de nanopartículas pierden su morfología a pocas horas de su síntesis, por lo que es necesario estabilizarlos con un polímero adecuado (Chang *et al.*, 2019). En nuestro caso, estos se estabilizaron usando monometoxi-poli(etilenglicol)-tiol (mPEG-SH) siguiendo la metodología anteriormente reportada. El espectro de absorción de los nanotetrápodos de oro estabilizados (AuNTPs A-PEG) se muestra en la Figura 15b, el tiempo entre la síntesis y la estabilización fue de aproximadamente tres horas. En este tiempo se realizó la purificación, la agitación necesaria en el proceso de estabilización y la caracterización óptica correspondiente. Del espectro de absorción se deduce que este tiempo y procesos fueron suficientes para que los nanotetrápodos cambiaran su morfología, lo cual se manifiesta en la disminución en la intensidad de la resonancia plasmónica y el ligero corrimiento hacia longitudes de onda más cortas. Una vez estabilizados, se volvió a tomar su espectro de absorción a los 70 días, en donde se puede observar que, si bien la forma del espectro se mantiene, aún existe una ligera disminución y

corrimiento de la resonancia principal. Esto nos indica que el proceso de estabilización efectivamente ayuda a preservar la geometría de los nanotetrápodos, sin embargo, este no está siendo del todo eficiente.

Con la finalidad de corroborar el resultado anterior, se sintetizó y caracterizó un segundo lote de nanotetrápodos a los que denominamos AuNTPs B. Este nuevo lote de nanopartículas resultó tener la resonancia principal más ensanchada y cercana a los 700 nm (Figura 16a). El ensanchamiento de la resonancia se relaciona con un menor control de la simetría espacial y una amplia distribución de tamaño de los brazos de la nanopartícula. Para seguir el comportamiento de la absorción de esta solución de nanopartículas, se tomaron los espectros de absorción a los 13 y 23 días después del proceso de estabilización, los cuales se muestran en la Figura 16b. En este caso, al igual que en el caso anterior (AuNTPs A), se tiene que la forma del espectro de absorción se mantiene, sin embargo, también hay una disminución en la intensidad de la resonancia principal y un ligero corrimiento de la misma hacia longitudes de onda menor. Esto, nuevamente nos indica que el proceso de estabilización requiere ser aún más optimizado. Cabe mencionar que los espectros de absorción de la Figura 16b se tomaron con el arreglo experimental de caracterización óptica usando la esfera integradora descrito en el Capítulo 3. (Sección 3.3.1). Si bien, no se puede hacer una comparación directa entre las absorbancias obtenidas con el espectrómetro comercial y el arreglo experimental que usa la esfera integradora, la caracterización con este último sirve para tener una idea general de cómo cambia la intensidad de la absorción en el tiempo y su relación con la caracterización térmica.

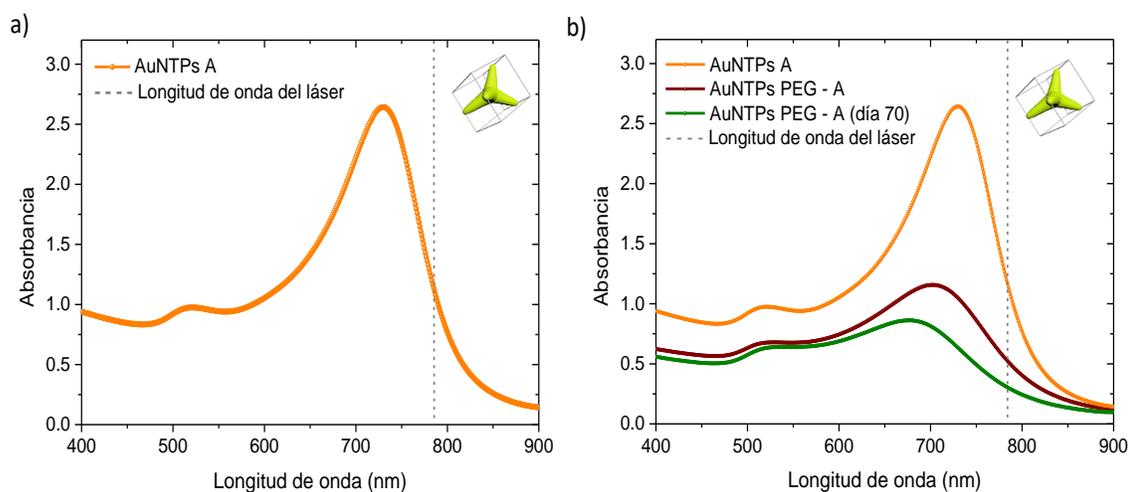


Figura 15. Absorbancia espectral de la primera síntesis de nanotetrápodos de oro (AuNTPs A) justo después del proceso de síntesis (a) y después del proceso de estabilización (b).

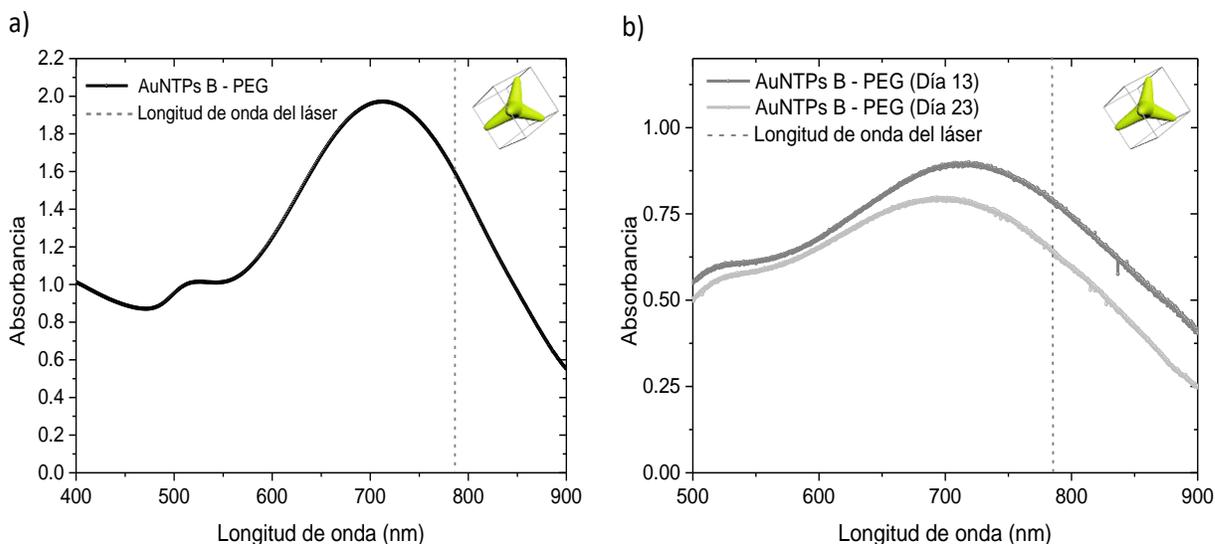


Figura 16. Absorbancia espectral de la segunda síntesis de nanotetrapodos de oro obtenida usando el espectrofotómetro comercial (a). Seguimiento en el tiempo de la absorbancia espectral de la segunda síntesis de nanotetrapodos de oro (AuNTPs B) usando el montaje óptico con la esfera integradora (b).

En la Figura 17 se muestra una comparación de la caracterización óptica de las nanobarras y las dos síntesis de nanotetrapodos estabilizados. Aunque la concentración y el volumen de las soluciones de nanopartículas es aproximadamente igual (~ 0.25 mg/mL y 3 mL), se observa una diferencia notoria en el ancho y la intensidad de la resonancia principal que es la de interés.

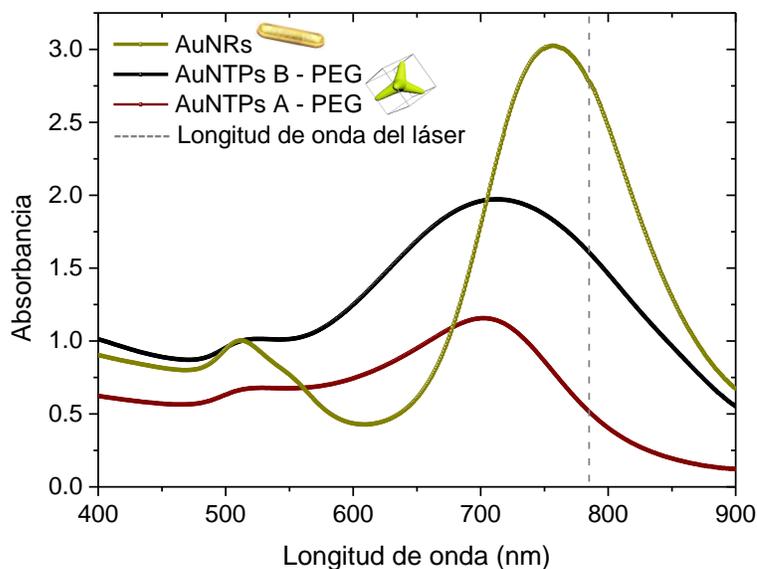


Figura 17. Comparación de absorbancia espectral de nanobarras de oro (AuNRs), nanotetrapodos de oro estabilizados primera síntesis (AuNTPs-PEG A) y segunda síntesis (AuNTPs-PEG B).

4.1.2 Caracterización térmica

La caracterización térmica se realizó depositando 1 mL de la solución de nanopartículas en una cubeta de cuarzo (1 cm de ancho) e irradiando con un láser de longitud de onda de 785 nm y potencia variable de 0 a 500 mW. La distancia entre la salida del láser y la cubeta es de aproximadamente 1 cm (ver Figura 9). A esta distancia, se midió el diámetro del haz al valor medio del máximo de intensidad (FWHM, por sus siglas en inglés) mediante el método de la navaja, el cual fue de 0.11 cm lo que resulta en un área de irradiación de 0.038 cm^2 . Una vez conocida el área de irradiación, se calcula la irradiancia correspondiente para cada una de las potencias usadas (100, 200, 300, 400 y 500 mW) y cuyo valor se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de irradiancia correspondientes a las potencias usadas a una distancia de 1 cm.

Potencia (mW)	Potencia (W)	Irradiancia (W/cm^2)
500	0.5	13.15
400	0.4	10.52
300	0.3	7.89
200	0.2	5.26
100	0.1	2.63

En la Figura 18a se muestra la caracterización térmica de las nanobarras de oro para diferentes potencias y durante un tiempo de irradiación de 10 minutos. Como es de esperarse, el incremento de temperatura es mayor conforme aumenta la irradiancia, alcanzándose un incremento máximo de temperatura de $\sim 26^\circ\text{C}$ para la irradiancia más alta ($0.5 \text{ W} - 13.15 \text{ W}/\text{cm}^2$). Como referencia se usó agua destilada irradiada con la máxima irradiancia. En este caso no se observa un incremento significativo de temperatura, como también es de esperarse, ya que estamos irradiando con una longitud de onda dentro del rango espectral que comprende la denominada primera ventana biológica, en donde la absorción del agua es mínima. En la Figura 18b se muestra el incremento de temperatura que se alcanza para cada una de las potencias usadas a un tiempo de irradiación de 2.5, 5 y 10 minutos. De estas gráficas se observa que el cambio de temperatura (ΔT) tiene una relación lineal con la potencia de irradiación y una mayor pendiente al incrementar el tiempo de irradiación.

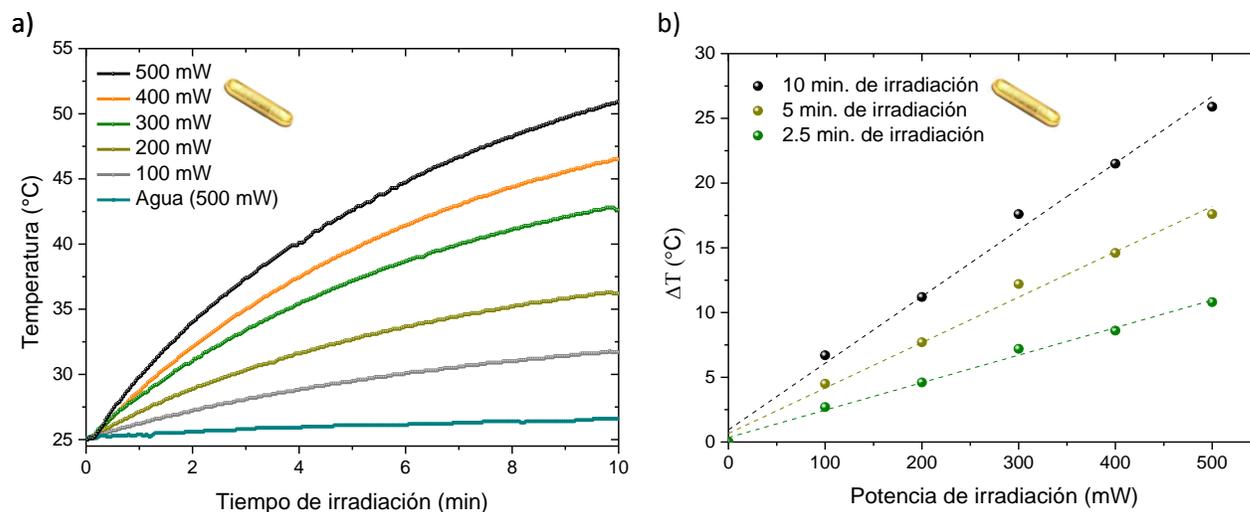


Figura 18. Caracterización térmica de nanobarras de oro (a) y relación entre el aumento de temperatura y la potencia de irradiación para diferentes tiempos de irradiación (b).

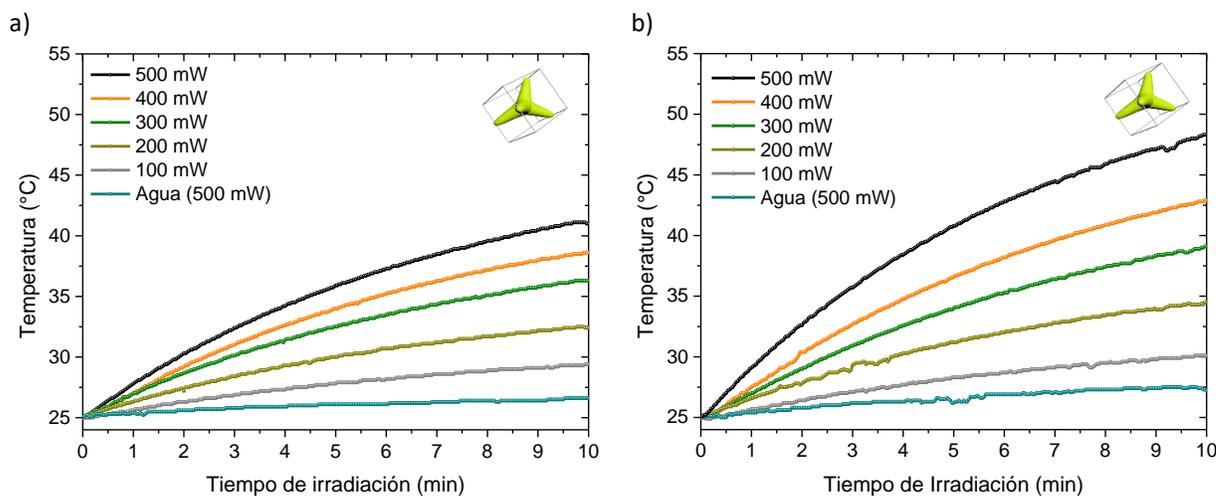


Figura 19. Caracterización térmica de los nanotetrápodos estabilizados AuNTPs A-PEG (a) y AuNTPs B-PEG (b).

Las caracterizaciones térmicas para las diferentes potencias de irradiación de los nanotetrápodos estabilizados AuNTPs A-PEG y AuNTPs B-PEG se muestran en las Figura 19a y Figura 19b, respectivamente. Los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG alcanzan un aumento de temperatura mayor (23°C) con respecto a los AuNTPs A-PEG (16°C) tras 10 minutos de irradiación. Este comportamiento en la caracterización térmica tiene congruencia con lo obtenido en la caracterización óptica, pues los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG presentan una mayor absorción que los AuNTPs A-PEG (ver Figura 17). En el caso de los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG, se realizó la caracterización térmica después de 13 y 23 días del proceso de estabilización.

En este caso, se observa que hay una disminución en la eficiencia térmica a medida que pasa el tiempo, lo cual se relaciona con la disminución en la intensidad de la resonancia que se muestra en la Figura 16.

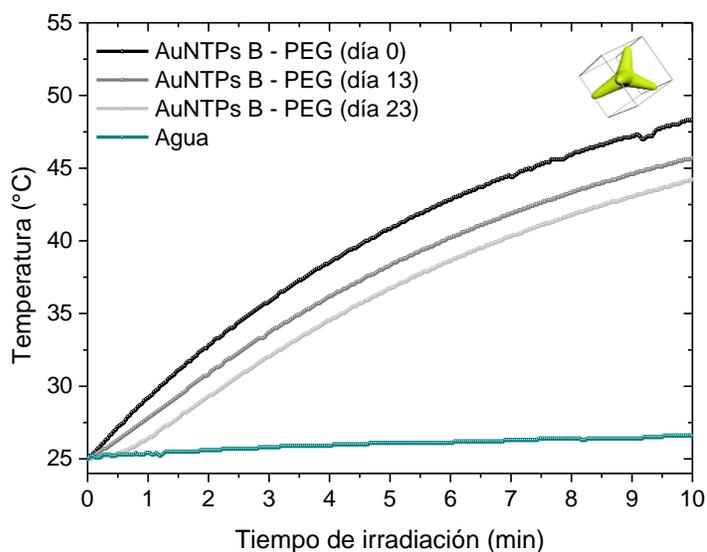


Figura 20. Seguimiento en el tiempo de la caracterización térmica de la segunda síntesis de nanotetrápodos estabilizados (AuNTPs B-PEG).

En la Figura 21 se muestran las gráficas de eficiencia térmica de las nanobarras AuNRs y los nanotetrápodos estabilizados AuNTPs A-PEG y AuNTPs B-PEG a la máxima potencia de irradiación (500 mW), en donde se observa que las nanobarras presentan la mayor eficiencia térmica, lo cual es de esperarse ya que la absorción de éstas a la longitud de onda de irradiación es mayor.

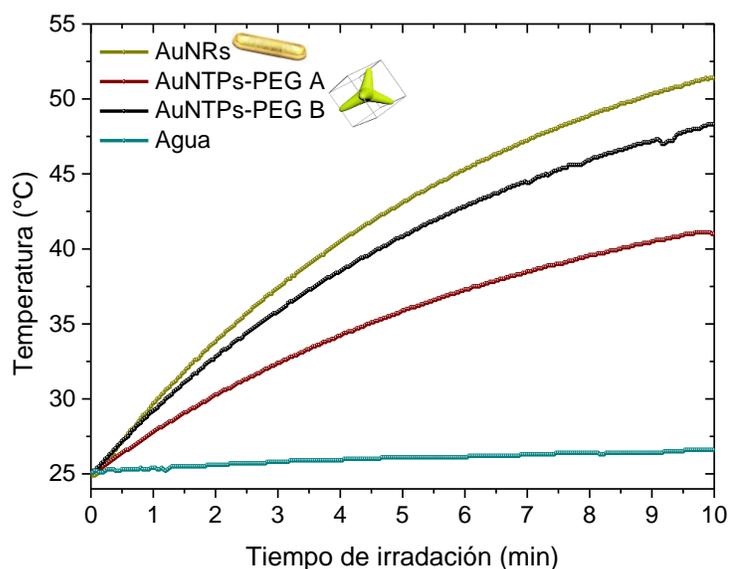


Figura 21. Comparación de la caracterización térmica de nanobarras (AuNRs), primera síntesis de nanotetrápodos (AuNTPs-PEG- A) y segunda síntesis de nanotetrápodos (AuNTPs-PEG B).

4.1.3 Caracterización morfológica

En la Figura 22a se muestran las imágenes TEM de las nanobarras de oro en dos zonas de la muestra a diferente magnificación, en las cuales se usó un voltaje de 80 kV y un tiempo de exposición de 2 s. En estas imágenes se observa la geometría muy bien definida de las nanobarras, algunas de ellas con diferentes tamaños, así como algunas nanopartículas con forma de paralelepípedos. En la Figura 22b se muestra la relación de distribución de tamaños de las nanobarras, de donde se tiene que la mayoría de las nanobarras tienen una longitud promedio de 60 ± 6.5 nm y diámetros de alrededor de 18 ± 6.9 nm, lo que da una razón de aspecto de alrededor de 3.3. De acuerdo a lo reportado en (Kim *et al.*, 2019a), esta razón de aspecto corresponde a una resonancia plasmónica de 740 nm, lo que coincide con lo obtenido en el espectro de absorción de la Figura 14. La distribución de tamaños fuera del rango promedio está asociado a las nanopartículas que están en forma de paralelepípedos, así como a la orientación vertical de alguna de ellas.

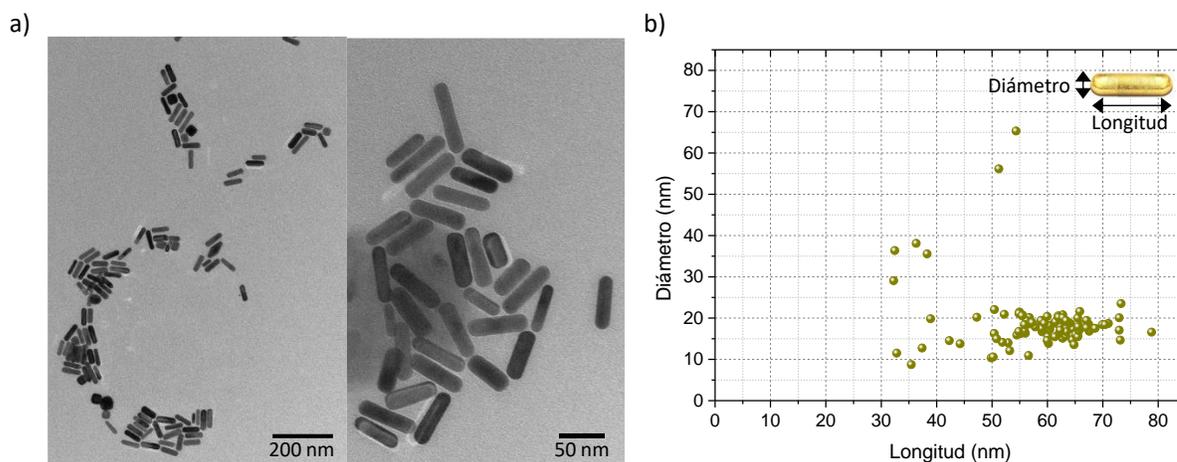


Figura 22. a) Caracterización morfológica mediante TEM de las nanobarras de oro. b) Relación de distribución de tamaños.

La caracterización morfológica de los nanotetrápodos AuNTPs A-PEG y AuNTPs B-PEG se muestra en la Figura 23 y Figura 24, respectivamente. En las micrografías TEM de la muestra AuNTPs A-PEG se observan algunas nanopartículas con los cuatro brazos característicos de los nanotetrápodos; sin embargo, también se tienen algunas con más y otras con menos de cuatro brazos, además se observan algunas con geometría esférica. De hecho, alrededor de la nanopartícula indicada con el círculo blanco se aprecian fragmentos alrededor de ella, lo que indica la descomposición de la geometría de los brazos de los nanotetrápodos. Con la información de las nanopartículas que aún tenían forma de tetrápodos se realizó la gráfica de

distribución de tamaños, la cual se presenta en la Figura 23b. La mayoría de estos tiene un diámetro de brazo de aproximadamente 8 nm y una longitud del brazo entre 20 y 30 nm. Esto corresponde a una razón de aspecto de aproximadamente 3.1, que según lo reportado en (Chang *et al.*, 2019) corresponde a una resonancia plasmónica de 872 nm. En la Figura 15, donde se muestra el espectro de absorción de dichas nanopartículas, la resonancia plasmónica está cerca a los 750 nm, esta diferencia se atribuye a que en nuestro caso la suspensión de nanopartículas contiene nanotetrápodos con brazos de diferente tamaño, además de las otras geometrías con mayor y menor número de brazos y las de geometría esférica. Cabe mencionar que en la distribución de tamaños de la Figura 23b se consideraron nanopartículas que no están en las imágenes de la Figura 23a.

Las imágenes TEM de los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG se muestran en la Figura 24, en donde se observan nanopartículas con una distribución de tamaños mayor que los nanotetrápodos AuNTPs A-PEG y diferentes geometrías, esto se relaciona con el ensanchamiento de la resonancia la caracterización óptica (ver Figura 16). En este caso, la razón de aspecto varía de 1.5 a 3.5, lo que de acuerdo a (Chang *et al.*, 2019), correspondería a resonancias entre 689 y 900 nm.

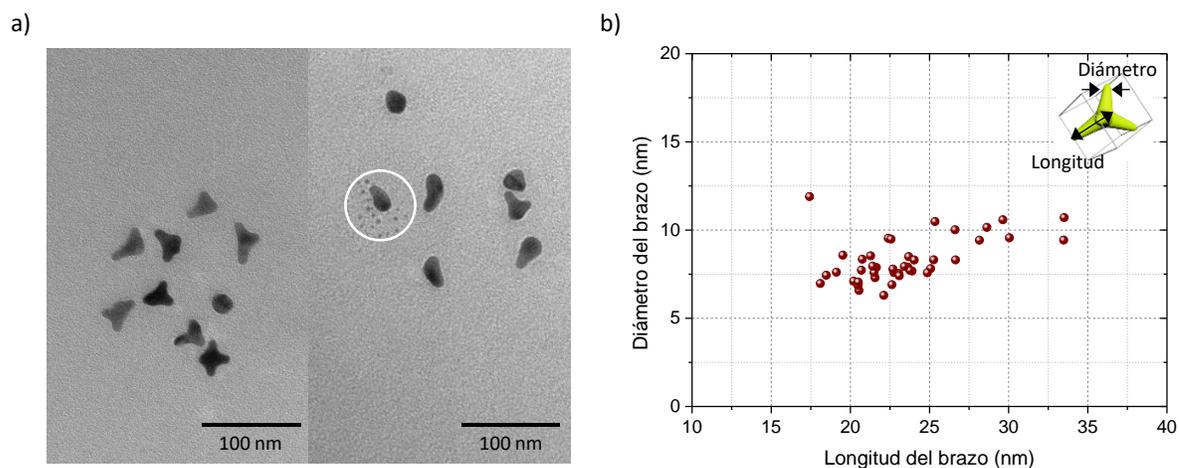


Figura 23. a) Caracterización morfológica vía TEM de los nanotetrápodos AuNTPs A-PEG. b) Gráfico de distribución de tamaños.

A partir de los resultados de las caracterizaciones ópticas, térmicas y morfológicas de las nanobarras y nanotetrápodos, se llega a la conclusión de que el uso generalizado de los nanotetrápodos para la aplicación deseada aún está limitado por la optimización en el proceso de síntesis que garanticen una adecuada estabilidad morfológica adecuada en el tiempo, precisión y reproducibilidad. Por lo tanto, se decidió continuar el proyecto usando nanobarras de oro.

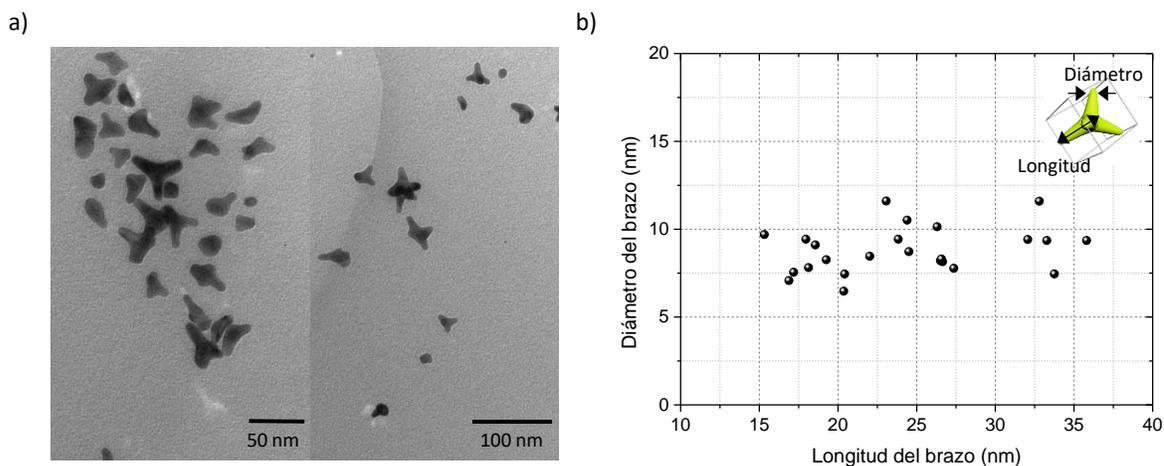


Figura 24. a) Caracterización morfológica vía TEM de los nanotetrápodos AuNTPs B-PEG. b) Gráfico de distribución de tamaños.

4.2 Nanogeles termosensibles y proceso de cargado

Siguiendo la metodología descrita en la sección 3.7, se cargaron nanobarras de oro y doxorubicina en nanogeles termosensibles compuestos de los copolímeros NVCL:VP:PEG (55:12:40). Este proceso de síntesis y cargado se realizó en dos ocasiones con el fin de completar el material necesario para realizar las pruebas de liberación controlada de fármaco y las pruebas de viabilidad celular. El primer lote de nanogeles cargados (Lote 1) se usó para las pruebas de liberación controlada de DOX (sección 4.3) y el experimento 1 de viabilidad celular mientras que el segundo lote (Lote 2) se usó para el experimento 2 de viabilidad celular. Los sistemas se caracterizaron óptica, térmica y morfológicamente antes y después del proceso de cargado; a través de espectroscopía UV-VIS se determinó el porcentaje y eficiencia del proceso de cargado de doxorubicina y, mediante análisis termogravimétrico se determinó el porcentaje de cargado de nanobarras en nanogeles. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

4.2.1 Caracterización óptica mediante espectroscopía UV-VIS

En la Figura 25 se muestra la absorbancia espectral de nanobarras de oro antes y después de ser cargadas en nanogeles. La disminución en la intensidad de la resonancia plasmónica está relacionada con la disminución en la concentración de nanopartículas que se cargan en los nanogeles. Por su parte, el corrimiento de la longitud de onda se relaciona con el cambio de índice de refracción que se presenta debido a los polímeros que conforman el nanogel y recubren las nanopartículas (este corrimiento de la

resonancia se ha reportado anteriormente (DiazDuarte-Rodriguez *et al.*, 2019)). Para estimar dicho cambio, se midió el índice de refracción de nanogeles disueltos en agua destilada y se comparó con el índice de refracción del agua mediante un refractómetro de Abbe. El índice de refracción para los nanogeles disueltos en agua destilada (3 mg/mL) fue de 1.3334, mientras que para el agua destilada de 1.3330. Aunque la variación del índice de refracción es en la cuarta cifra significativa, atribuimos este cambio como el causante del corrimiento en la resonancia plasmónica. Justamente la alta sensibilidad que presentan la LSPR de nanopartículas metálicas a cambios en el índice de refracción del medio, ha sido estudiada previamente y es el principio del funcionamiento de los sensores basados en resonancias plasmónicas (Rossi *et al.*, 2018).

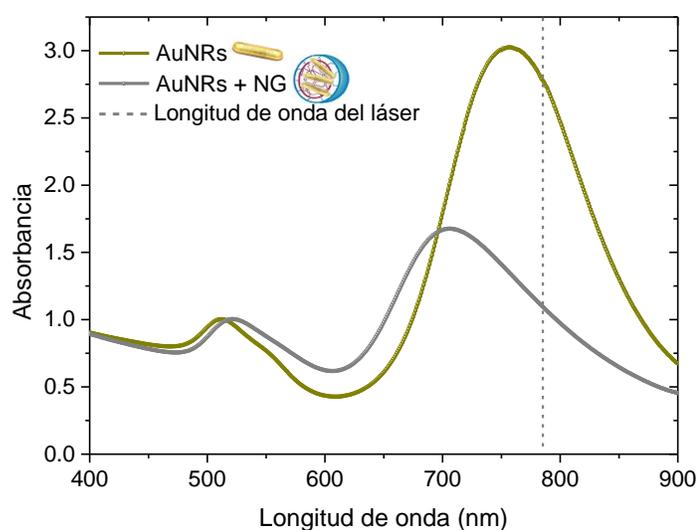


Figura 25. Espectro de absorción de las nanobarras (AuNRs) y de los nanogeles cargados con nanobarras (AuNRs+NG).

La caracterización óptica del Lote 1 y Lote 2 de nanogeles cargados se presenta en la Figura 26a y Figura 26b, respectivamente. En estas gráficas se muestra la absorbancia espectral de los nanogeles cargados simultáneamente con DOX y AuNRs, nanogeles cargados exclusivamente con DOX y las nanobarras de oro cargadas en cada lote de nanogeles. En ambos casos, el sistema de nanogel cargado con DOX (NG+DOX) presenta una única banda de absorción cercana a los 480 nm que se atribuye a la absorción de la doxorrubicina y, en ningún caso se observa absorción cercana a la longitud de onda del láser. El primer lote de nanogeles cargados con nanobarras y doxorrubicina (NG+DOX+AuNRs) presenta un máximo de absorción cercano a 480 nm que corresponde a la contribución de la absorción de la doxorrubicina y la resonancia transversal de las nanobarras. Este sistema también posee una segunda banda de absorción alrededor de los 840 nm que se relaciona con la resonancia de la sección longitudinal de las nanobarras.

Esta banda de absorción se recorre a longitudes de onda mayor debido al cambio del medio que recubre las nanobarras y/o a la posible formación de aglomeraciones de nanopartículas después del proceso de cargado. El segundo lote de nanogeles cargados con nanobarras y DOX también muestra la banda de absorción cercana a 480 nm que se relaciona con la absorbancia de la DOX y la absorbancia transversal de las nanobarras. En este sistema no se ve con claridad la absorción correspondiente a la resonancia longitudinal de las nanobarras. Esto puede atribuirse a que la solución contenga una gran cantidad de nanopartículas con forma esférica cuya resonancia plasmónica cae en longitudes de onda cercanas a los 500 nm, o bien, a una alta presencia de DOX en la muestra.

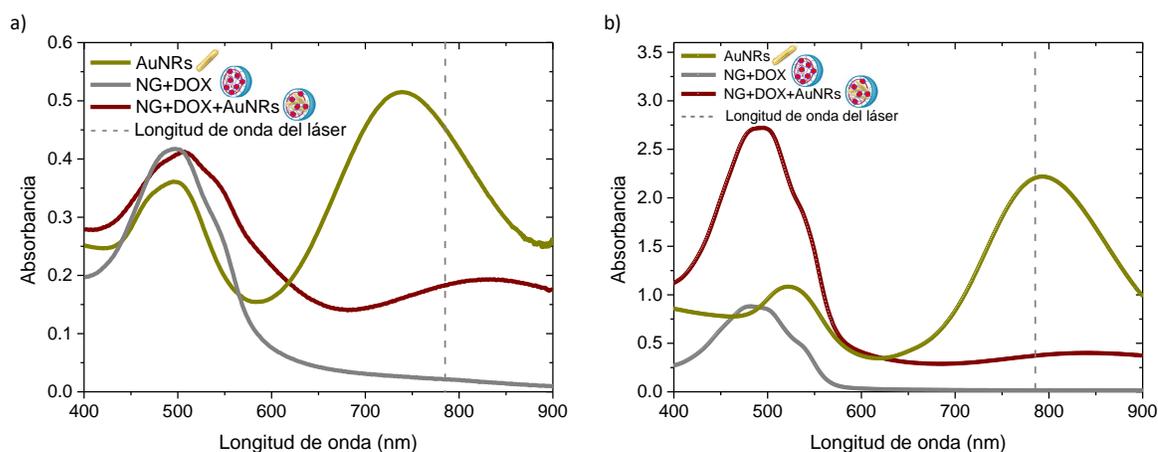


Figura 26. Caracterización óptica de nanobarras en solución (AuNRs), nanogeles cargados con doxorubicina (NG+DOX) y nanogeles cargados con nanobarras y doxorubicina (NG+DOX+AuNRs); Lote 1 de sistemas usados (a) y Lote 2 (b).

4.2.2 Caracterización térmica de nanogeles antes y después del proceso de cargado

En la Figura 27 se muestra la caracterización térmica de las nanobarras de oro (AuNRs), nanogeles cargados con nanobarras (AuNRs+NG), nanogeles cargados con DOX (NG+DOX), nanogeles (NG) y agua. Nótese que el agua, los nanogeles disueltos en agua (NG) y los nanogeles cargados con doxorubicina (NG+DOX) no presentan un incremento de temperatura apreciable tras 10 minutos de irradiación continua a la máxima potencia de irradiación (500 mW). Este comportamiento es de esperarse pues estos sistemas presentan una absorbancia mínima en la longitud de onda de irradiación (785 nm) como se ve en la Figura 26. Debido a que el sistema de nanogel cargado con nanobarras (AuNRs+NG) no contiene doxorubicina, no fue necesario realizar el proceso de liofilización. La solución de este sistema, sin liofilizar, (AuNRs+NG) presenta un incremento de temperatura de 22.5°C mientras que el de las nanobarras en solución (AuNRs)

es de 27.5°C. Esta diferencia está relacionada con el cambio en la absorbancia de dichas muestras mostrado en la Figura 25.

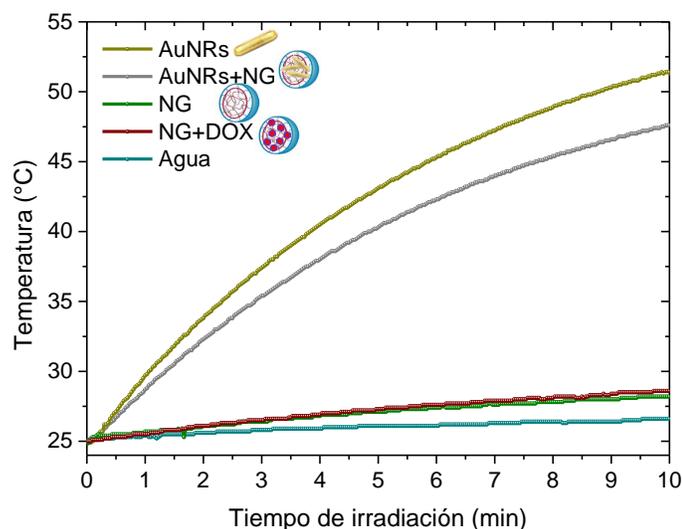


Figura 27. Caracterización térmica de nanobarras en solución (AuNRs), nanobarras cargadas en nanogel antes de pasar por el proceso de liofilización (AuNRs+NG), nanogel (NG), nanogel cargado con DOX (NG+DOX) y agua. Estos datos se obtienen usando la máxima irradiancia permitida (13.15 W/cm^2).

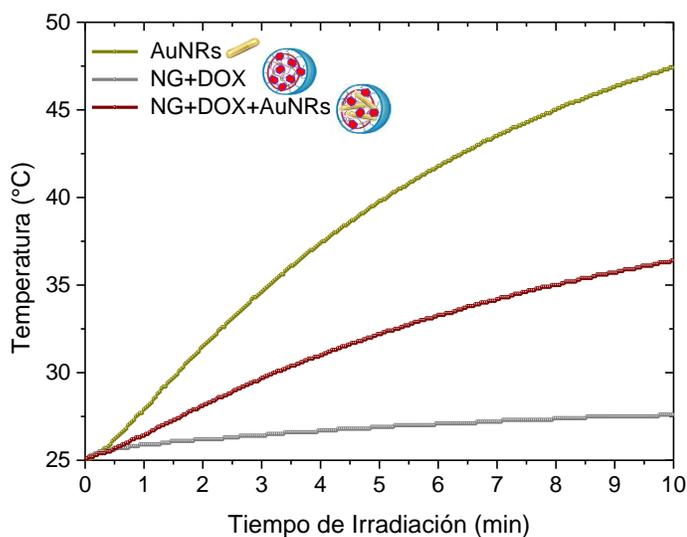


Figura 28. Caracterización térmica de nanobarras de oro en solución (AuNRs), nanogeles cargados con doxorubicina (NG+DOX) y nanogeles cargados con nanobarras y doxorubicina (NG+DOX+AuNRs).

La caracterización térmica de los sistemas usados en las pruebas de liberación controlada de doxorubicina y primeros experimentos de viabilidad celular se muestra en Figura 28. Como era de esperarse, el sistema

de nanogel cargado con doxorubicina (NG+DOX) no genera un incremento significativo de temperatura tras 10 minutos de irradiación. El sistema de nanogel cargado simultáneamente con fármaco y nanopartículas (NG+DOX+AuNRs) tiene un incremento de aproximadamente 12°C tras 10 minutos de irradiación. Aunque las nanobarras en solución (AuNRs) aumentan la temperatura casi el doble que el sistema de NG+DOX+AuNRs en el mismo tiempo de irradiación y usando la misma irradiancia, se debe tener en cuenta que la concentración de nanobarras cargadas es menor que la concentración de las nanobarras en solución.

4.2.3 Caracterización morfológica de nanogeles antes y después del proceso de cargado

La solución de nanogeles que se usó en este proyecto se caracterizó morfológicamente mediante TEM y DLS antes y después del proceso de cargado. Estas caracterizaciones nos permiten conocer de manera cualitativa que tan eficiente fue el proceso de cargado y el comportamiento de los nanogeles ante cambios en la temperatura. En la Figura 29a se muestra la gráfica de distribución de tamaños de los nanogeles antes del proceso de cargado. El diámetro hidrodinámico (D_h) predominante de estos se encuentra alrededor de 80 nm con una distribución de tamaños entre 30 y 300 nm.

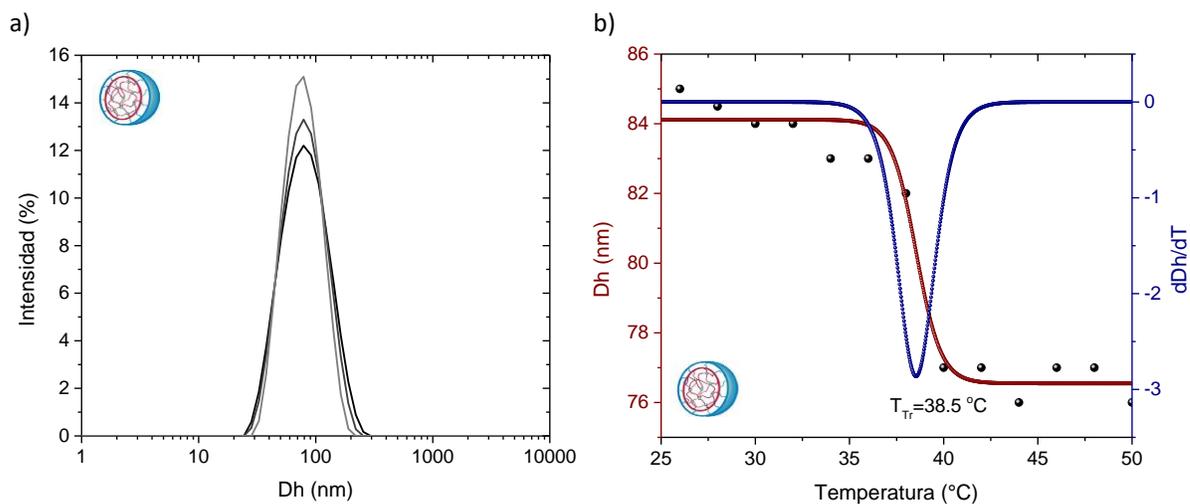


Figura 29. a) Caracterización vía DLS de la solución de nanogeles usados en el proyecto antes del proceso de cargado. b) Caracterización vía DLS de la solución de nanogeles en función del aumento de temperatura (T).

Esta información se confirma con las micrografías TEM de los nanogeles (ver Figura 30) que contienen nanogeles con diámetros entre 50 y 300 nm. Para obtener información sobre el comportamiento de los nanogeles ante cambios de temperatura, se midió el diámetro hidrodinámico con un barrido de calentamiento de 2 °C/5 min en un intervalo de 25 a 50°C (Figura 29b). Se observa una disminución en el D_h de 84 a 76 nm, es decir, el 9.5% con respecto a su valor inicial. La derivada del cambio de diámetro con respecto a la temperatura muestra que la temperatura de transición de fase es de 38.5 °C.

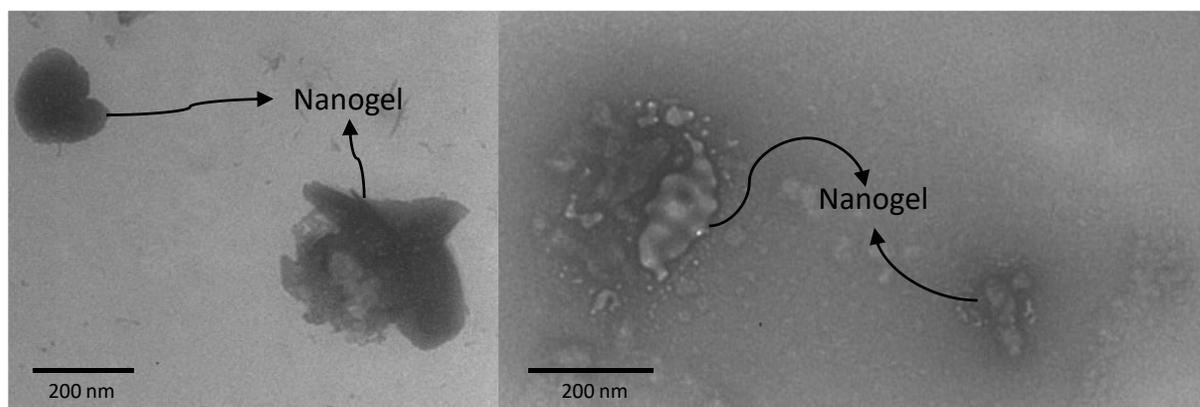


Figura 30. Caracterización morfológica vía TEM de los nanogeles antes de su cargado con nanobarras de oro.

En la Figura 31a se muestran las gráficas obtenidas por DLS tanto de los nanogeles (sin cargar) como de las nanobarras de oro en solución. En el caso de éstas últimas, se obtienen dos picos de intensidad que representan dos diámetros hidrodinámicos predominantes; uno de aproximadamente 2 nm, que puede estar relacionado con semillas que no lograron formar nanobarras, y otro de aproximadamente 60 nm que representaría la sección longitudinal de las nanobarras. El DLS de los nanogeles sin cargar muestra diámetros hidrodinámicos mayores a los presentado por las nanobarras.

En la Figura 31b se presentan las gráficas DLS de los nanogeles después del proceso de cargado; en gris el nanogel sin cargar (NG), en rojo el nanogel cargado con doxorubicina (NG+DOX) y en azul el nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina (NG+AuNRs+DOX). Como es de esperarse, la gráfica del nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina (NG+AuNRs+DOX) tiene una mayor distribución de tamaños de D_h . Esto se debe a que tras el proceso de cargado el nanogel debe hincharse, aumentando su tamaño para albergar en su interior tanto las nanopartículas como el fármaco. En la gráfica de nanogel con DOX la distribución de tamaño de D_h son similares a las del nanogel sin cargar y esto se debe a que el fármaco, por sí solo, tiene un peso molecular muy bajo.

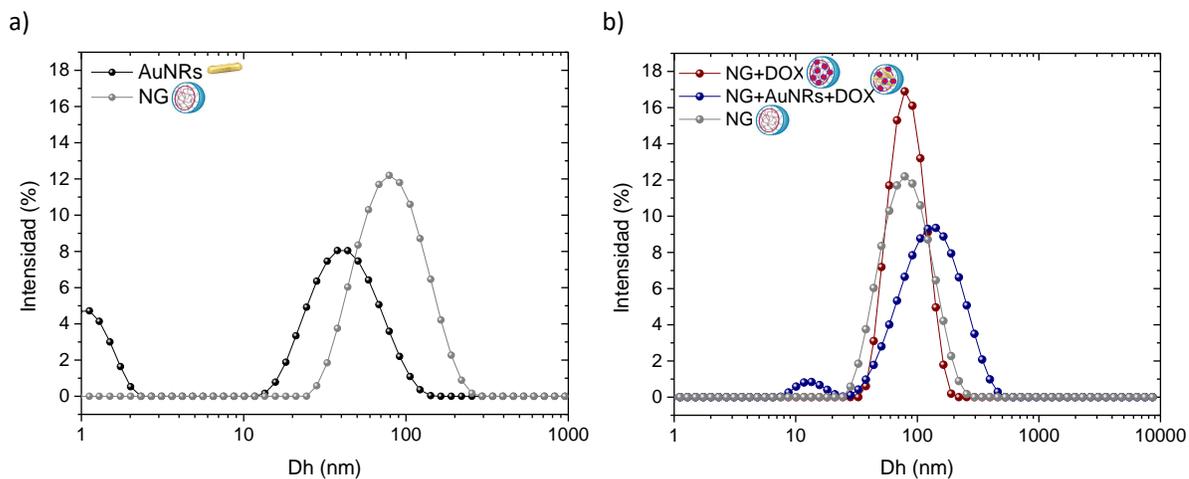


Figura 31. Caracterización morfológica vía DLS para nanobarras y nanogeles antes del proceso de cargado (a). Caracterización morfológica vía DLS de nanogeles cargados con DOX (NG+DOX), nanogeles cargados con nanobarras y DOX (NG+AuNRs+DOX) y nanogeles sin cargar (NG) (b)

En la Figura 32 se muestran las micrografías TEM del primer lote de nanogeles cargados. En estas se observan algunos nanogeles cargados con nanobarras, algunas nanobarras y paralelepípedos aislados similares a los observados en las micrografías TEM de la solución de nanobarras.

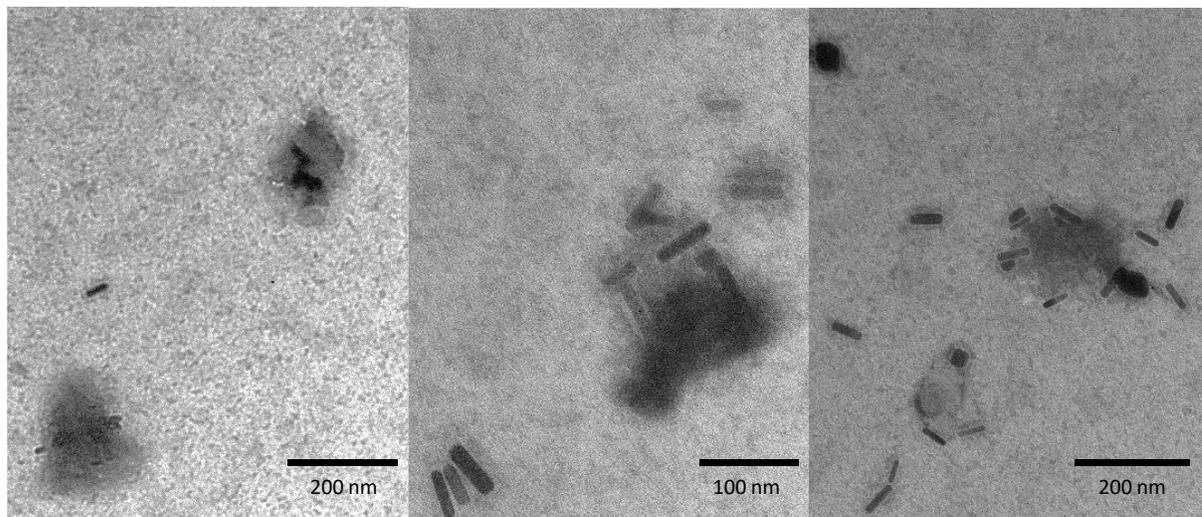


Figura 32. Caracterización morfológica vía TEM de nanogeles cargados con nanobarras de oro correspondientes al Lote 1.

Las micrografías del segundo lote de nanogeles (Figura 33) exhiben una gran cantidad de nanopartículas de forma esférica. Esto puede relacionarse con la ausencia de la resonancia alrededor de los 785 nm de

los nanogeles cargados con DOX y nanobarras (Figura 26) y con el aumento de la resonancia cercana a los 500 nm. En la mayoría de las micrografías TEM se logra apreciar la presencia de nanopartículas cargadas en un nanogel, pero también se observa una cantidad de nanopartículas dispersas o aglomeradas de diversas formas y tamaños.

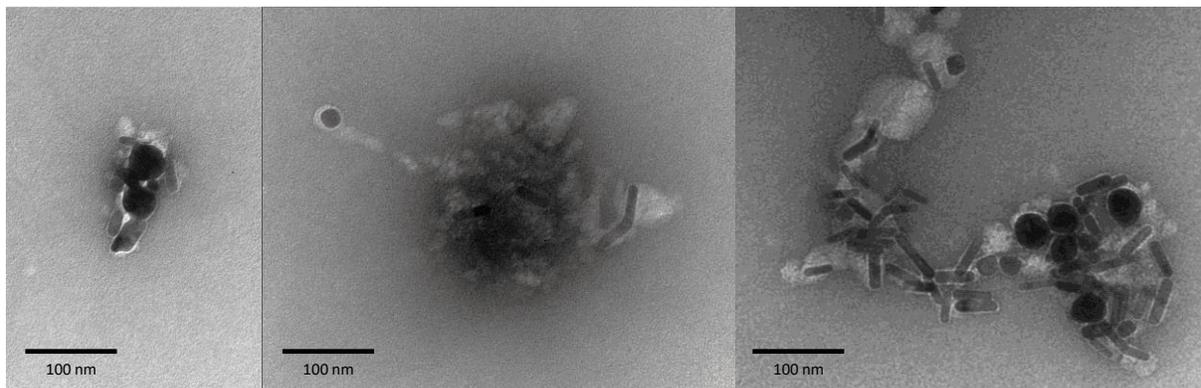


Figura 33 Caracterización morfológica vía TEM del Lote 2 de nanogeles cargados con nanobarras de oro y doxorubicina.

4.2.4 Porcentaje y eficiencia de cargado de doxorubicina en nanogeles

El proceso de cargado de la doxorubicina en los nanogeles se realizó usando el método de nanoprecipitación que se describió en la sección 3.7. Usando las ecuaciones (3) y (4) se obtuvo el valor de porcentaje y la eficiencia de cargado, los valores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de porcentaje de cargado y eficiencia de cargado de doxorubicina en nanogeles.

	Lote 1		Lote 2	
	NG+DOX 	NG+DOX+AuNRs 	NG+DOX 	NG+DOX+AuNRs 
% cargado de DOX	14.64 ± 4.07	14.48 ± 0.87	14.45 ± 1.9	56.73 ± 6.99
% eficiencia de cargado de DOX	29.41 ± 3.41	29.46 ± 1.77	28.8 ± 3.8	90 ± 13.9

Para conocer la cantidad de doxorubicina presente en la muestra de nanogeles fue necesario realizar una gráfica de calibración que nos permitiera conocer la concentración de DOX en función del valor de absorbancia medido en el espectrómetro UV-VIS. La gráfica de calibración se obtiene diluyendo una solución madre de DOX en PBS (pH 7.4), y a partir de esta, se obtienen determinadas concentraciones del fármaco en solución; después se obtiene el espectro de absorbancia de cada una de estas soluciones, se toma su valor a 482 nm (máximo valor de absorbancia para la DOX) y se grafica en función de la concentración de fármaco.

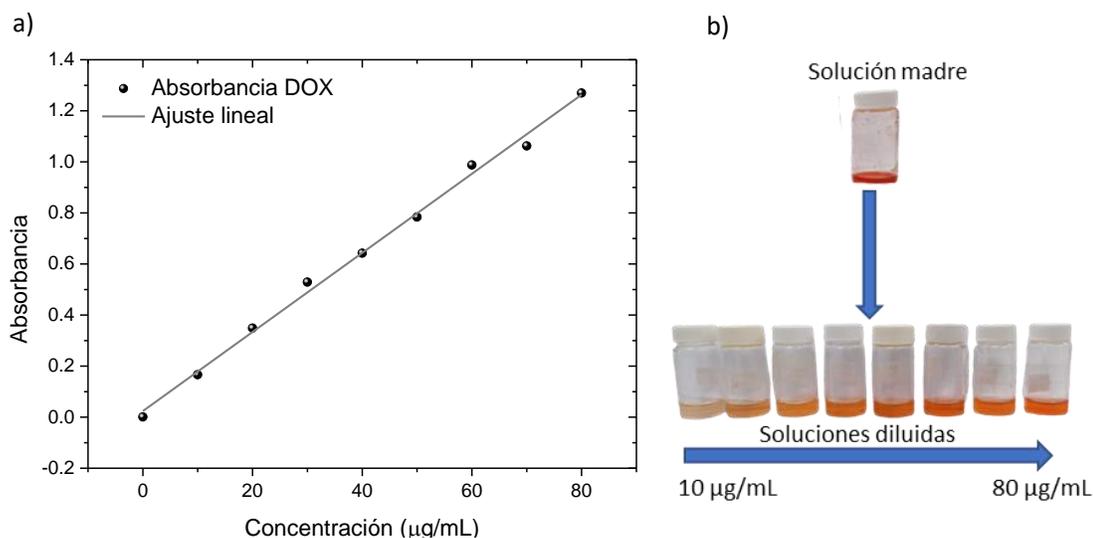


Figura 34. a) Gráfica de calibración de DOX. b) Esquema de las diluciones a partir de la solución madre.

En la Figura 34 se presenta la gráfica de calibración que relaciona la absorbancia (medida a 482 nm) en función de la concentración de fármaco. De esta gráfica se obtiene una relación lineal con un R^2 de 0.99 y se ajusta a la ecuación $y = 0.01549x + 0.02378$, siendo y la absorbancia a 482 nm y x la concentración de DOX en µg/mL. Esta relación también fue usada para calcular el porcentaje de liberación acumulada de DOX en los experimentos *in vitro* que se describen más adelante.

4.2.5 Análisis termogravimétrico para nanogeles que contienen nanobarras de oro

Comparando el porcentaje de residuo del análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de los nanogeles antes y después del proceso de cargado se determinó el porcentaje de cargado de nanobarras. En el TGA para el nanogel sin cargar (Figura 35) se muestran dos etapas de descomposición; la primera en

la que se descompone el 2.18% del nanogel en aproximadamente 68.38°C, y la segunda en alrededor de 378.82°C en la que se descompone el 91.94%. Después de estabilizarse aproximadamente a los 450 °C se obtiene un residuo de 4.539%.

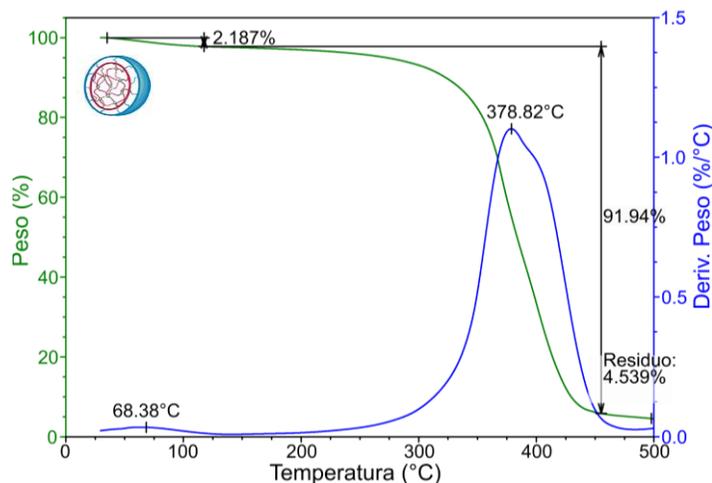


Figura 35. Termograma de TGA para el nanogel NVCL:VP:PEG (55:12:40).

En la Figura 36a y Figura 36b se presenta el análisis por TGA para el Lote 1 y Lote 2 de nanogeles cargados con nanopartículas y doxorubicina. Puede observarse que, a diferencia del nanogel sin cargar, estos nanogeles presentan principalmente tres etapas de descomposición. La primera etapa alrededor de los 46.73 °C en la que se descompone alrededor del 2.38%, este porcentaje es similar al que presentó el nanogel puro en la primera etapa. La segunda etapa es cerca de los 182.46°C en la que se descompone 3.29% más del sistema, esta etapa no se observó en la caracterización del nanogel sin cargar y puede estar relacionada a la presencia de doxorubicina. Y la tercera etapa, en la que se da la mayor descomposición, alrededor de 396.48°C se descompone otro 79.82% del nanogel. Después de los 450°C el sistema se estabiliza dejando un residuo de 13.09% para el Lote 1 y 16.4% para el Lote 2, este porcentaje de residuo es ligeramente mayor al obtenido en el TGA de los nanogeles sin cargar. Teniendo en cuenta que el oro tiene su punto de ebullición en 2856°C (una temperatura mucho más alta a la alcanzada en el TGA), la diferencia entre los porcentajes de residuo del nanogel sin cargar y el nanogel cargado corresponde al porcentaje de cargado de nanobarras en el nanogel. Finalmente, se concluye que el porcentaje de cargado de nanobarras en el nanogel es de aproximadamente el 8.55% para el Lote 1 y de 11.9% para el Lote 2 de nanogeles.

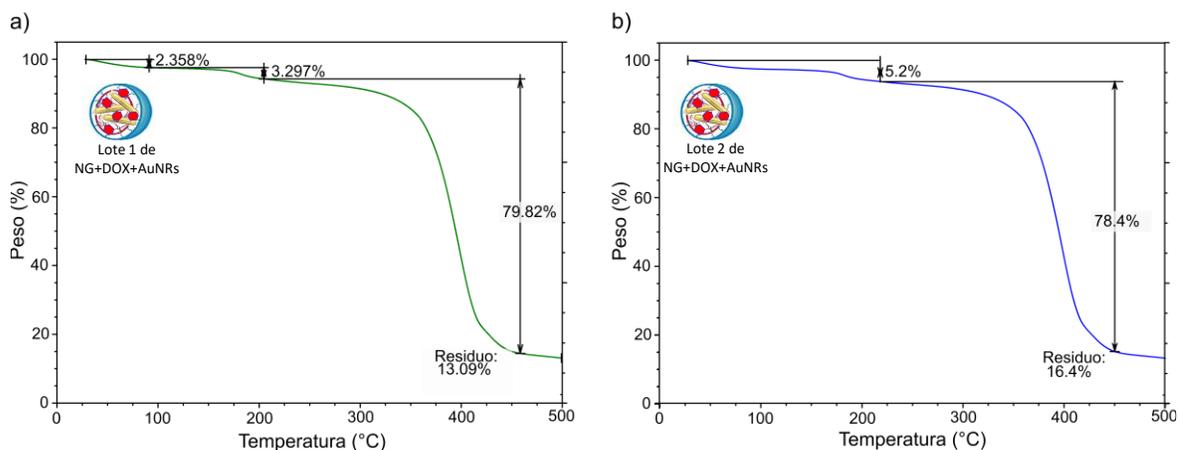


Figura 36. Termograma de TGA para el Lote 1 a) y Lote 2 de nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina b).

4.3 Liberación controlada de doxorubicina

Como se explicó en la sección 3.8, el proceso de liberación *in vitro* se realizó a 37°C, con un valor de pH de 7.4 y tomando alícuotas constantes una vez cada hora por seis horas y una final a las 24 horas. Se trabajó con el Lote 1 del sistema compuesto por nanogel cargado con doxorubicina (NG+DOX) y el sistema de nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina (NG+AuNRs+DOX).

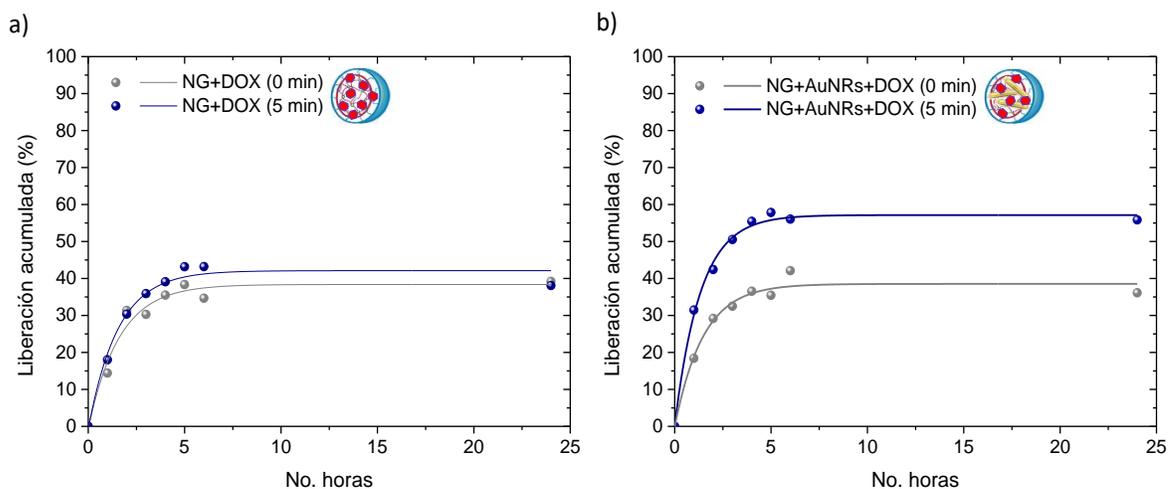


Figura 37. Porcentaje de liberación acumulada de doxorubicina a) para el sistema de nanogel cargado con DOX (NG+DOX) y b) sistema compuesto de nanogel cargado con nanobarras y DOX (NG+AuNRs+DOX). La línea azul representa los sistemas que fueron irradiados y la gris los sistemas que no se irradiaron.

Cada uno de estos sistemas se evaluó sin irradiación e irradiando durante 5 minutos a una hora antes de tomar la alícuota. Tal y como se observó en las gráficas de DLS (Figura 29), a temperaturas mayores a 37°C

el diámetro hidrodinámico del nanogel disminuye, de esta forma se libera la solución en su interior y, por consiguiente, aumenta el porcentaje de liberación. Por esta razón, es de esperarse que al irradiar los nanogeles cargados con nanobarras de oro, aumente el porcentaje de liberación de fármaco como efecto secundario al aumento de temperatura debido a la resonancia plasmónica.

En la Figura 37a se presenta la gráfica de liberación de doxorubicina para el sistema de nanogel cargado con doxorubicina (NG+DOX) y en la Figura 37b la misma gráfica para el sistema cargado con doxorubicina y nanopartículas (NG+AuNRs+DOX); los puntos grises representan los datos de los sistemas que no fueron irradiados y los puntos azules los datos del sistema que se irradiaron durante cinco minutos cada hora. Estos datos se ajustan a una curva tipo asintótica con un $R^2 = 0.99$. En el caso del sistema de NG+DOX (Figura 37a) puede observarse un comportamiento similar sin importar si el sistema fue irradiado o no, este comportamiento es de esperarse ya que el nanogel se encuentra exactamente en las mismas condiciones de temperatura y pH, y no hay ningún factor externo que pueda variar alguno de estos dos parámetros. También es importante destacar que en las primeras 3 horas se da una etapa de liberación rápida, en la cual es liberado cerca del 30% del fármaco cargado; esta etapa es seguida por una liberación lenta y finalmente una estabilización en la que se libera cerca del 40% del fármaco cargado.

La curva de liberación del sistema de nanogel cargado con nanobarras y doxorubicina (NG+AuNRs+DOX) de la Figura 37b muestra que, aunque este sistema tiene las mismas condiciones de temperatura y pH que el sistema sin nanobarras, las nanobarras actúan como agente fototérmico incrementando la temperatura del nanogel y acelerando el proceso de liberación. Para el sistema NG+AuNRs+DOX que no fue irradiado se ve un comportamiento similar al sistema de NG+DOX con y sin irradiación que se presenta en la Figura 37a, alcanzando un porcentaje de liberación acumulada cercana al 40% del fármaco cargado. La gráfica que más destaca es la de NG+AuNRs+DOX (5 min) que fue irradiada por cinco minutos cada hora, aunque la tendencia de comportamiento es similar, pues también presenta una etapa de liberación rápida en las tres primeras horas, una de liberación lenta y una de estabilización, se ve que el porcentaje de liberación es mayor con respecto a las que no tenían nanobarras. El sistema que fue irradiado presenta una liberación acumulada del 42.5% de DOX cargada tras las primeras 3 horas, en la etapa de liberación lenta llega al 54 % y finalmente se estabiliza en el 57%. Estos valores de liberación evidencian un efecto directo de la irradiación infrarroja y la absorción de esta debida a la resonancia plasmónica de las nanobarras en la aceleración de la liberación de DOX.

4.4 Experimentos de viabilidad celular

En esta sección se presentan algunas pruebas de control previas a los experimentos de citotoxicidad y los experimentos de citotoxicidad que permitirán evaluar la efectividad de la aplicación de nanogeles cargados para liberar DOX de forma controlada y acelerar el proceso de muerte celular en células cancerígenas.

4.4.1 Pruebas de control

Las pruebas de control son pruebas previas a los experimentos en la línea celular y se realizaron con el fin de evaluar variables que podrían afectar la correcta realización del experimento. La primera prueba de control busca evaluar la transferencia de calor en la caja de cultivo celular después del proceso de irradiación de AuNRs, esto se hace con el fin de asegurar que pozos adyacentes al pozo irradiado no sean afectados por aumentos de temperatura externos. La segunda prueba consiste en identificar el daño que le podría causar la irradiación por sí sola a las células con las que se está trabajando, para esto se realizan pruebas de viabilidad celular después de irradiar directamente las células con distintos tiempos de irradiación y distintas irradiancias. La tercera busca cuantificar la dosis letal media (LD50) de la doxorubicina en la línea celular con la que se está trabajando, este valor es necesario para calcular la cantidad de material que se debe usar en las pruebas de citotoxicidad finales.

4.4.1.1 Prueba de control 1: Transferencia de calor en una caja de cultivo celular

Para identificar si la irradiación de un pozo con nanopartículas afectaría la temperatura de los pozos adyacentes en una placa de cultivo celular, se realizaron dos pruebas. La primera consistió en irradiar durante 10 minutos un pozo con 0.4 mL de solución de nanobarras y cuantificar la temperatura en los pozos adyacentes, uno con agua y el otro vacío tal y como se esquematiza en la Figura 38a. Los resultados de esta prueba se presentan en la Figura 38b, el pozo que contiene nanopartículas muestra un incremento de temperatura de aproximadamente 22.5°C tras 9.5 minutos de irradiación, en este mismo tiempo los dos pozos adyacentes incrementan su temperatura en aproximadamente 10°C. El punto en el que la temperatura empieza a descender es justo cuando se apaga el láser y las nanopartículas no son excitadas ópticamente (línea negra vertical). El incremento de temperatura de los pozos adyacentes no es un fenómeno conveniente, pues implica que existe una transferencia de calor por medio del material de la

placa de cultivo celular y esto puede afectar los resultados de la viabilidad celular en otros sistemas. Con el fin de conocer hasta qué pozo es posible colocar otro sistema sin que se presente una transferencia de calor apreciable que afecte los resultados, se repitió la prueba anterior, pero esta vez dejando un pozo intermedio vacío sin evaluar como se muestra en la Figura 38c. Al cuantificar el aumento de temperatura en los pozos de interés (1 y 3) se encuentra que no hay cambio en la temperatura, esto quiere decir que existe una disipación de energía térmica en el medio antes de llegar a estos pozos. Por lo tanto, se concluye que para las pruebas de viabilidad celular es conveniente ubicar los sistemas a irradiar dejando un pozo intermedio vacío entre cada sistema irradiado.

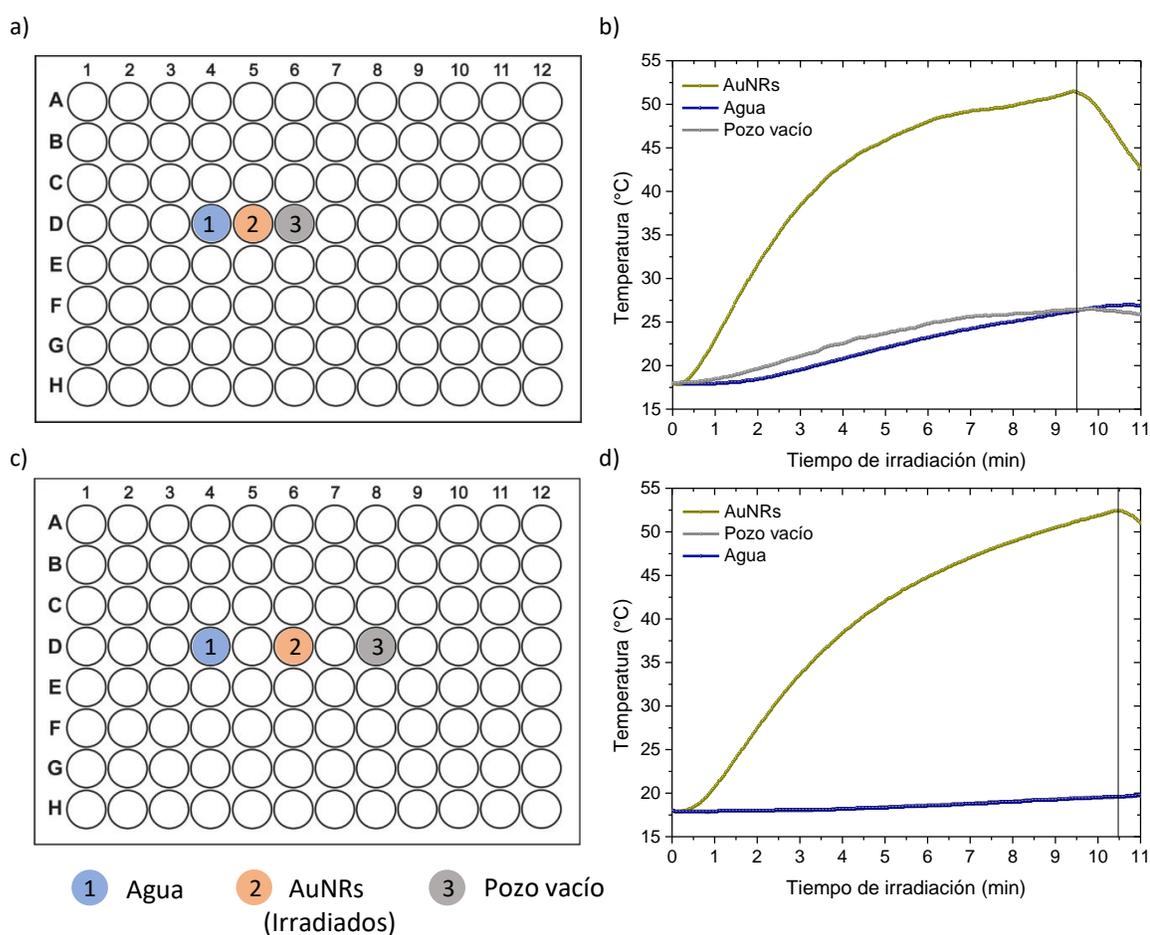


Figura 38. Prueba de control 1: transferencia de calor en una placa de cultivo celular.

4.4.1.2 Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437

Aunque la luz de longitud de onda de 785 nm entra en la llamada “primera ventana biológica” en la que el fotodaño en tejidos vivos es mínimo, se realizaron pruebas de viabilidad celular en la línea celular NCI-

H1437 tras someterse a irradiación directa. La distribución de las células en la caja de cultivo celular se realizó teniendo en cuenta los resultados de la prueba de control 1 (Sección 4.4.1). El proceso de cultivo de la línea celular y su depósito en la caja se describe en la sección 3.9.1, mientras que el procedimiento de las pruebas de citotoxicidad realizadas se describe en la sección 3.9.3. Para esta prueba se usaron 6 cajas de cultivo celular, todas siguiendo la distribución que se presenta en la Figura 39a. Las células de la primera caja fueron irradiadas de forma continua por dos minutos dosis única y se continuó el proceso para evaluar la viabilidad celular como se describe en la sección 3.9.3. La segunda, tercera, cuarta quinta y sexta caja fueron irradiadas dos, tres, cuatro, cinco y seis veces, respectivamente. Cada irradiación con una duración de dos minutos y un intervalo entre irradiación de una hora. Las primeras cuatro cajas se irradiaron sin usar el “black hole” que se describe en la sección 3.9.2, en estos resultados se observó un efecto importante de la reflexión de la luz principalmente en los bordes de la caja; es decir, la columna 1 y la fila A. Este efecto de borde disminuyó notoriamente el porcentaje de viabilidad celular de las células ubicadas en el borde de la caja, lo que produjo desviaciones estándar elevadas y un porcentaje de viabilidad celular bajo para las células de la primera columna que fueron irradiadas a 500 mW (Figura 39b-e).

Tras observar este efecto de borde, se rediseñó el montaje experimental y se incorporó el uso del “black hole”, tal y como se describe en la sección 3.9.2. Con este arreglo experimental se realizaron las irradiaciones de la caja 5 y 6. En los resultados de estas mediciones (Figura 39f y Figura 39g) se observa una disminución en la desviación estándar y un porcentaje de viabilidad celular cercano al 100% para potencias de 100, 300 y 500 mW (las irradiancias correspondientes a estas potencias se encuentran en la Tabla 1). Estos resultados indican que la irradiación a potencias menores o iguales que 500 mW a una longitud de onda de 785 nm, no genera un efecto significativo en la viabilidad celular de esta línea celular durante dos minutos de irradiación.

En la Figura 40 se presenta el porcentaje de viabilidad celular según la potencia de irradiación y el número de veces que fue irradiado cada pozo. En estos datos se eliminó la información brindada por la primera fila en las cajas que presentaban efecto de borde (cajas de la 1 a la 4) con el fin de disminuir la desviación estándar y obtener un resultado más cercano al comportamiento real del sistema tras ser irradiado.

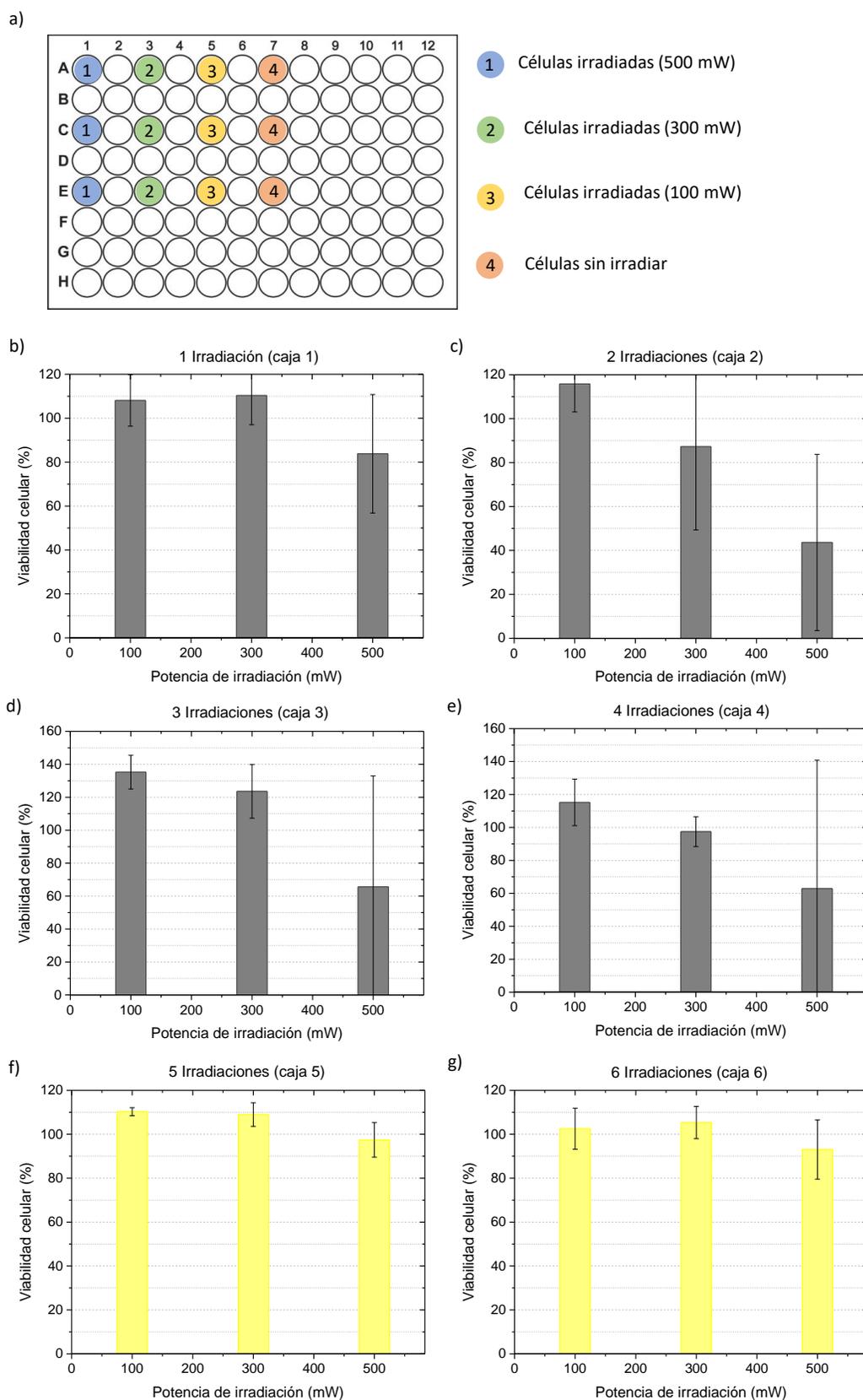


Figura 39. Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437. Descripción de la ubicación de los sistemas en la caja de cultivo celular (a), pruebas de viabilidad celular tras 1 , 2 , 3 , 4 , 5 y 6 irradiaciones (b), (c) , (d), (e), (f) y (g) respectivamente.

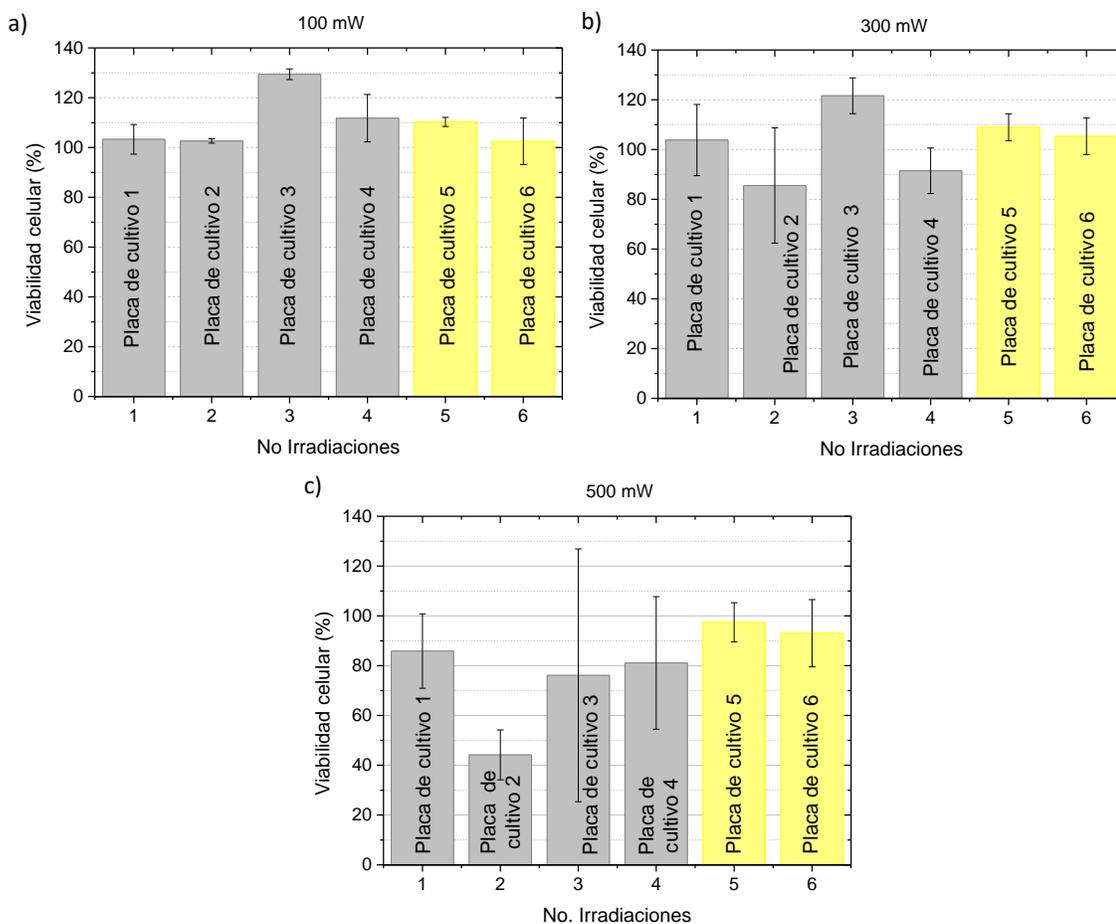


Figura 40. Prueba de control 2: Efecto de la irradiación sobre células de la línea celular NCI-H1437. Porcentaje de viabilidad celular en función del número de irradiaciones y de la potencia del láser.

4.4.1.3 Prueba de control 3: Estimación de DL50 para doxorrubicina en células NCI-H1437

Se conoce como dosis letal media o LD50 a la cantidad de la dosis de una sustancia que es capaz de matar la mitad de un conjunto células (o animales) de prueba después de un tiempo determinado. Con el fin de conocer la LD50 de la doxorrubicina en la línea celular NCI-H1437 tras 24 h de contacto, se realizó una prueba de viabilidad celular. Para esto, se preparó una solución madre de DOX disuelta en PBS 1x (pH 7.4) con una concentración de 2300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Teniendo en cuenta que los pozos de la placa de cultivo celular tienen una capacidad de 100 μL que será ocupada por el medio de cultivo celular, los tratamientos y las células; se realizaron los cálculos para obtener 5 μg , 10 μg y 20 μg de DOX en cada pozo y cuyos valores se muestran en (Tabla 3.).

Tabla 3. Cálculos para pruebas de LD50.

Cantidad de DOX en cada pozo (μg)	Volumen de solución madre (μL)	Volumen de solución medio de cultivo celular y células (μL)
5	2.17	97.83
10	4.34	95.66
20	8.69	91.31

Como control positivo se tomaron las células sin tratamiento y como control de muerte celular se usó DMSO al 6%. Ya que los sistemas no requerían un proceso de irradiación, se ubicaron en la placa de cultivo celular como se muestra en la Figura 41a. Después de aplicar el tratamiento y dejar en incubación por 24 h., se realizó la prueba de viabilidad celular (ver sección 3.9.3) arrojando los resultados que se presentan en la Figura 41b. A partir de estos resultados se concluye que la DL50 de la doxorubicina tras 24 h de contacto en la línea celular NCI-H1437 es de 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.

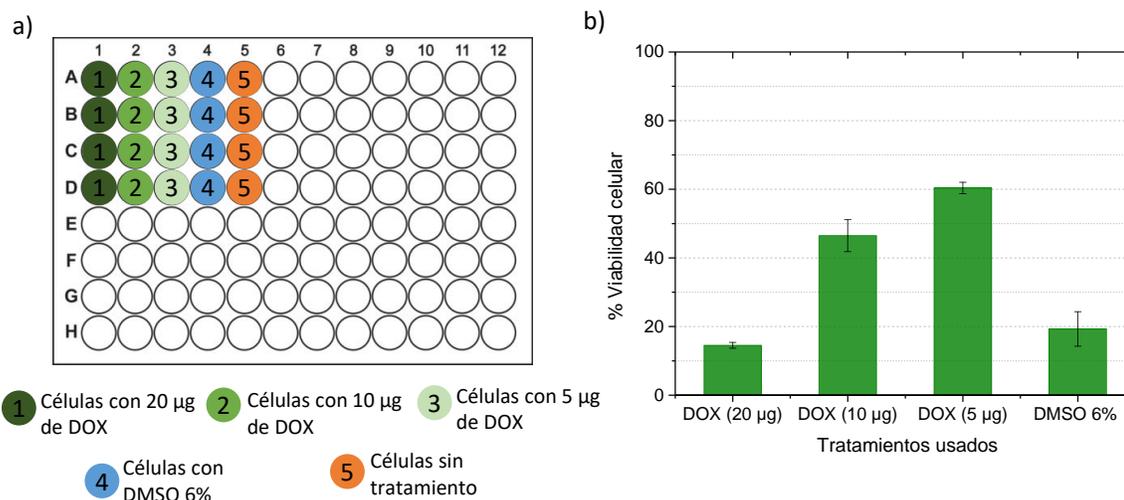


Figura 41. Prueba de dosis letal media para la doxorubicina en esta línea celular. Descripción de los sistemas usados y su distribución en la caja de cultivo celular (a) y porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas usados (b).

4.4.2 Experimentos de viabilidad celular en la línea celular NCI-H1437

Para evaluar la aplicación de los sistemas propuestos se realizaron estudios de citotoxicidad en la línea celular NCI-H1437. Los sistemas para evaluar fueron nanobarras solas (AuNRs), nanogeles solas (NG),

nanogeles cargados con DOX (NG+DOX) y nanogeles con DOX y nanobarras (NG+DOX+AuNRs); como control negativo se usaron las células sin tratamiento y como control positivo o de muerte celular se usaron las células tratadas con la LD50 del DOX. La viabilidad de todos los sistemas fue evaluada con y sin irradiación (785 nm – 500 mW). Partiendo de la dosis letal media de la DOX para la línea celular utilizada y conociendo el porcentaje de cargado de cada sistema, se realizaron los cálculos necesarios para lograr la concentración final de fármaco en los pozos que fueran a ser tratados con DOX. En todos los casos los sistemas aplicados sobre las células, no fueron más de 5µL (5% del volumen total).

La primera prueba se realizó usando el lote 1 de los nanogeles cargados y, acorde a las pruebas de cinética de liberación del fármaco (Sección 4.3), se les aplicaron seis sesiones de irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min cada una con intervalo de 1 hora entre irradiación. La distribución de los sistemas en la placa de cultivo celular y los resultados de dicha prueba se presentan en la Figura 42. En estos resultados se puede observar que los nanogeles por sí solos no presentan efecto citotóxico alguno, lo que comprueba su alta biocompatibilidad. Con la aplicación de nanobarras en solución se obtiene el menor porcentaje de viabilidad celular (~ 30%) con o sin irradiación; por la indiferencia que muestra este resultado ante el proceso de irradiación se descarta un efecto meramente fototérmico y el bajo porcentaje de viabilidad celular se relaciona con posibles restos de CTAB (altamente tóxico) que pueden quedar después de la síntesis de AuNRs, aún después del proceso de purificación. En el caso de los sistemas de nanogeles cargados con DOX, no se aprecia una diferencia significativa entre los sistemas que fueron irradiados y los no irradiados, adicionalmente puede observarse que el porcentaje de viabilidad celular es similar al de células a las que se les trato directamente con DOX. Esto indica que los sistemas NG+DOX y NG+DOX+AuNRs liberaron todo el fármaco cargado por difusión en el medio acuoso, posiblemente, debido al tiempo que estuvieron en incubación a 37°C.

Para minimizar el efecto de liberación de fármaco por difusión se repitió el experimento realizando una única irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min. Después de la irradiación los sistemas fueron puestos en incubación y, posteriormente, se evaluó el porcentaje de viabilidad celular. En este caso no se trabajó ni con los sistemas de nanogeles (NG) ni con los AuNRs en solución. La distribución de los sistemas usados se puede ver en la Figura 43a y los resultados de esta prueba en la Figura 43b. Tras un tiempo de contacto de 24h. se puede observar que los sistemas de nanogeles cargados con DOX presentan un porcentaje de viabilidad celular similar al de la LD50 de la DOX puesta directamente sobre las células. Esto indica que el fármaco se sigue liberando por difusión en medio acuoso a 37°C. Sin embargo, se alcanza a apreciar una ligera disminución en el porcentaje de viabilidad celular para el sistema de NG+DOX+AuNRs que fue irradiado con respecto al mismo sistema sin irradiación. Esto se puede atribuir a que la conversión

fototérmica en las nanopartículas aceleró el proceso de liberación del fármaco, haciendo que este pasara un mayor tiempo de contacto con las células y, por ende, se presente un menor porcentaje de viabilidad celular después de 24h. Buscando observar con claridad el efecto de aceleración en la liberación, se repitió la prueba dejando los sistemas en incubación únicamente 2 h después del proceso de irradiación (Figura 43b). Lo que se obtuvo es que tras este tiempo ninguno de los sistemas afectó las células. Esto no quiere decir que no se haya liberado DOX, lo que indica es que el fármaco en las células no es suficiente para tener un efecto citotóxico después 2h de contacto.

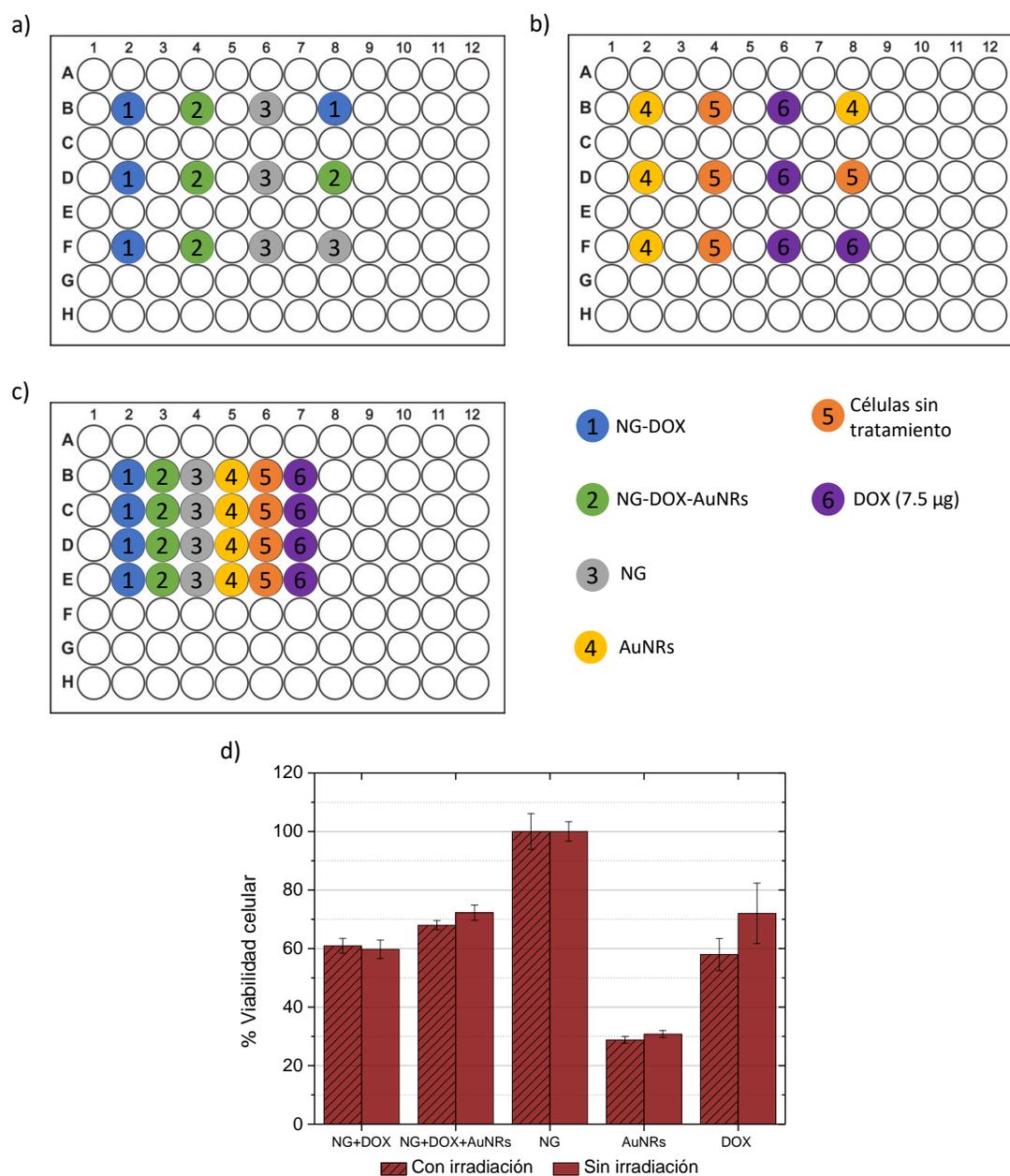


Figura 42. Prueba de citotoxicidad 1. a), b), c) descripción y distribución de los sistemas tratados en la caja de cultivo celular. d) Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas analizados.

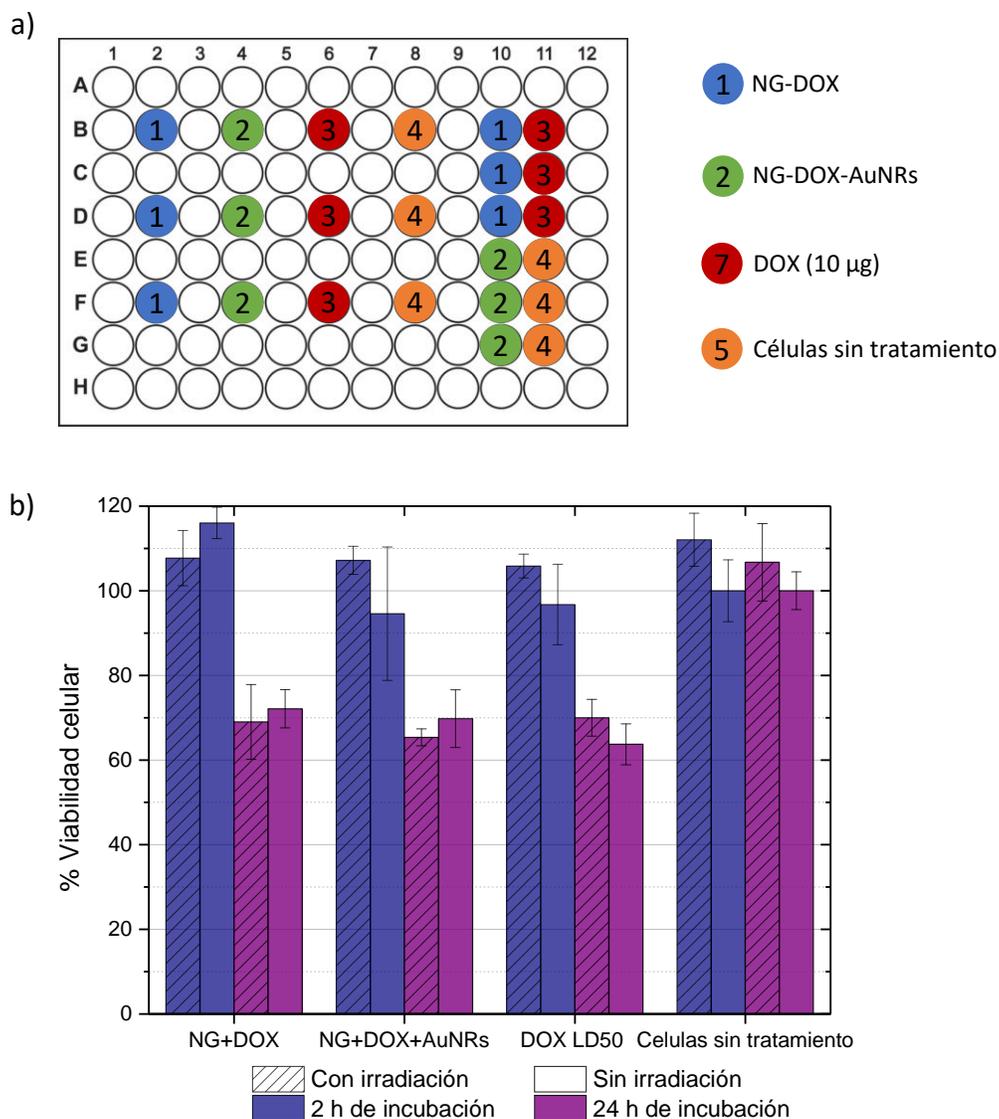


Figura 43. Pruebas de citotoxicidad. a) descripción y distribución de los sistemas tratados en la caja de cultivo celular. Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas realizando una única irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min y después de b) 24 h de incubación y 2 h de incubación.

Con el mismo objetivo se realizó una tercera prueba que consistió en evaluar la viabilidad celular de las células tras 6, 12 y 24 horas de contacto, después de aplicar los tratamientos con y sin irradiación. Para esta prueba se usaron los sistemas del lote 2 ya que el material de los sistemas que se usaron en la primera síntesis (lote 1) no fue suficiente. Por lo tanto, para esta prueba se repitió el proceso de síntesis de nanobarras, cargado de nanobarras y fármaco en nanogel y cálculo de porcentajes de cargado como se describe en la sección 4.2. Los sistemas a evaluar y su ubicación en la placa de cultivo celular fueron los mismos que el de la prueba 2 (ver Figura 43a). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 44.

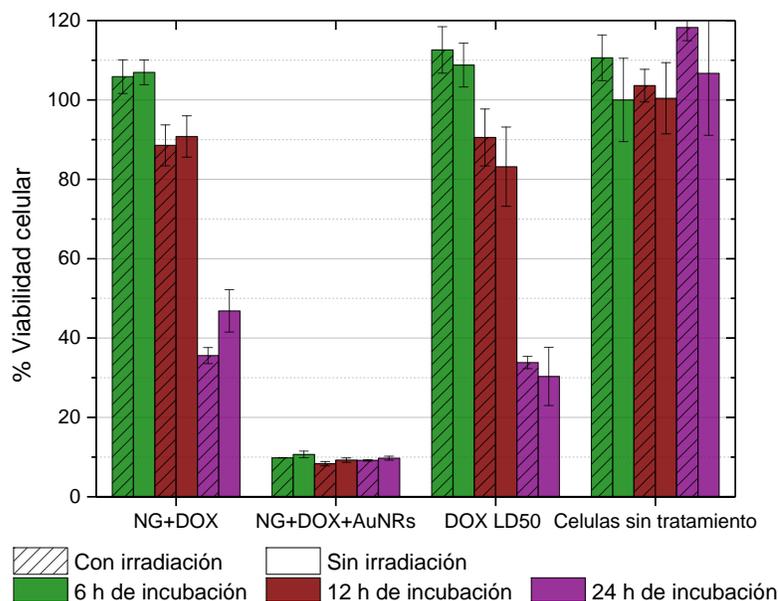


Figura 44. Porcentaje de viabilidad celular para los diferentes sistemas realizando una única irradiación (785 nm – 500 mW) de 2 min y después de a) 6 h de incubación, b) 12 h de incubación y c) 24 h de incubación.

Estos resultados muestran que el sistema de nanogel cargado con doxorubicina (NG+DOX) sigue presentando un efecto citotóxico similar que la LD50 de la doxorubicina puesta directamente sobre las células. Este efecto puede atribuirse a que el nanogel liberó, por difusión, la totalidad del fármaco tan pronto fue puesto en incubación a 37°C y, después de 12h de contacto se empieza a evidenciar un efecto citotóxico que se completa después de 24h. Por su parte, el sistema de nanogel cargado con fármaco y nanopartículas (NG+DOX+AuNRs) muestra un bajo porcentaje de viabilidad celular sin importar el tiempo de incubación y si el sistema es irradiado o no. La alta citotoxicidad de este sistema, que no fue observada en el lote de sistemas usado en pruebas anteriores, puede atribuirse a un alto número de nanobarras de oro fuera del nanogel y posibles restos de surfactante CTAB. En estas condiciones es difícil observar un efecto fototérmico ya que la mayor parte del efecto citotóxico la está causando un agente externo a la irradiación.

La razón por la que en estos experimentos no se evidenció con claridad la aceleración en la liberación del fármaco se relaciona con que la temperatura de respuesta del nanogel (38.5°C) no fue lo suficientemente alta para contener el fármaco en su interior cuando se ponía el sistema en el medio de cultivo con células a 37°C, independientemente de si el sistema contenía nanopartículas. Para observar este comportamiento será necesario usar nanogeles con una temperatura de transición mayor (aprox 42°C) y evaluar el proceso de cargado y liberación del fármaco en el nanogel.

Capítulo 5. Conclusiones

Este proyecto de tesis tuvo como objetivo principal aportar al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos para el tratamiento del cáncer. Para alcanzar este objetivo se propuso realizar experimentos de liberación controlada del fármaco doxorrubicina (DOX) usando nanogeles termosensibles como nanoportadores y nanopartículas de oro con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica como agente activador fototérmico. Se seleccionó la geometría de nanopartícula adecuada tras una revisión bibliográfica y la caracterización óptica, térmica y morfológica de nanopartículas de oro con forma de barras y tetrápodos. Se realizó el cargado de nanopartículas y DOX en nanogeles y posteriormente, se hicieron pruebas de liberación controlada (en condiciones estables de temperatura y pH), para estudiar la cinética de liberación de los sistemas propuestos. Finalmente, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular en la línea celular NCI-H1437 (correspondiente a células de cáncer de pulmón) utilizando los nanogeles cargados a diferentes condiciones de irradiación.

Se encontró que los nanotetrápodos de oro poseen excelentes propiedades de conversión fototérmica que dependen fuertemente de su morfología y, por ende, también de su estabilidad morfológica en el tiempo. Estos deben ser sintetizados de forma cuidadosa y pasar por un estricto proceso de estabilización en el menor tiempo posible después de su síntesis. Pese a las precauciones tenidas, gran parte de los nanotetrápodos perdieron su morfología al poco tiempo de síntesis. Por lo que se concluye que el uso generalizado de los nanotetrápodos para la aplicación deseada aún está limitado y que se requiere una optimización en el método de síntesis que garantice estabilidad morfológica en el tiempo, precisión y reproducibilidad. Por su parte, las nanobarras de oro resultaron ser altamente estables a temperatura ambiente, durante aproximadamente tres meses, y presentaron una alta eficiencia de conversión fototérmica. Por estas razones se decidió continuar el proyecto usando éstas últimas.

Se logró cargar nanogeles termosensibles con nanobarras de oro y el fármaco DOX. Los experimentos *in vitro* de liberación de DOX muestran un porcentaje de liberación acumulada de aproximadamente un 60% para los nanogeles cargados con nanopartículas e irradiados durante 5 minutos cada hora por seis horas, estos mismos sistemas sin irradiar tuvieron un porcentaje de liberación acumulada de aproximadamente 40%. Los nanogeles cargados únicamente con doxorrubicina (sin nanopartículas) muestran un porcentaje de liberación acumulada de aproximadamente 40% con y sin irradiación. Estos resultados muestran un efecto directo en la aceleración de la liberación de fármaco debido a la irradiación de los sistemas que contienen nanopartículas de oro. Este efecto de aceleración se debe a la termosensibilidad del nanogel y

la conversión fototérmica inducida por la absorción debida a la resonancia plasmónica en las nanopartículas.

Los estudios de citotoxicidad en la línea celular NCI-H1437 mostraron que la irradiación por sí sola a 785 nm a irradiancias por debajo de 13.15 W/cm^2 y tras seis irradiaciones (2 minutos cada una y con intervalos de 1 hora entre irradiación) no afecta la viabilidad de células. Con esto se comprueba que la luz con esta longitud de onda (dentro del rango de la primera ventana biológica) no induce daños significativos en las células. Estos estudios también demostraron que no hay una disminución significativa en la viabilidad celular debido a los nanogeles sin cargar, siendo estos altamente biocompatibles. Por el contrario, las nanobarras de oro suministradas directamente sobre las células presentan una alta citotoxicidad que se relaciona con restos del surfactante CTAB presentes aún después del proceso de purificación. Por esta razón, al usar nanobarras de oro en aplicaciones biológicas es necesario realizar un proceso de purificación eficiente y, preferiblemente, una correcta funcionalización o cargado en un material altamente biocompatible. Los resultados de las pruebas de viabilidad celular en los sistemas de nanogeles cargados muestran que la doxorubicina se libera por difusión tan pronto el nanogel es puesto en medio acuoso a 37°C , sin importar si el sistema contiene nanopartículas o si es irradiado. Esto indica que la temperatura de respuesta del nanogel (38.5°C) no es suficientemente alta para contener el fármaco en su interior al ser puesto en contacto con células (normalmente a 37°C) lo que impide ver un efecto de aceleración en la liberación debido al efecto fototérmico. En la última prueba de viabilidad celular se observó que los sistemas cargados con nanopartículas tenían un efecto citotóxico mayor que la LD50 de la doxorubicina tras 24h de contacto. Esto se atribuye a la presencia de cierta cantidad de nanopartículas fuera del nanogel y restos del surfactante altamente tóxico CTAB. Sin embargo, este efecto no se observó en todas las pruebas realizadas. Lo que sugiere que hubo diferencias en el proceso de cargado.

5.1 Trabajo a futuro

Como trabajo a futuro se plantea lo siguiente:

- Optimizar el proceso de síntesis y estabilización de nanotetrápodos de oro.
- Realizar estudios complementarios de cinética de liberación del fármaco y pruebas de viabilidad celular usando un nanogel con una temperatura de respuesta superior a 42°C , de tal forma que el fármaco no se libere por difusión en medio acuoso a 37°C .

- Optimizar el proceso de purificación de nanobarras evaluando el porcentaje de CTAB residual mediante análisis vía TGA y su efecto en estudios de viabilidad celular.
- Llevar a cabo pruebas de funcionalización de los nanogeles cargados con ligandos (anticuerpos de tiburón, por ejemplo) afines a tumores cancerígenos específicos y, finalmente, realizar pruebas de aplicación del tratamiento *in vivo* en dichos tumores.

Literatura citada

- Azzazy, H. M. E., Mansour, M. M. H., Samir, T. M., Franco, R. (2012). Gold nanoparticles in the clinical laboratory: Principles of preparation and applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(2), 193–209. doi: 10.1515/cclm.2011.732.
- Baffou, G. Quidant, R. (2013). Thermo-plasmonics: Using metallic nanostructures as nano-sources of heat. In *Laser and Photonics Reviews* (Vol. 7, Issue 2). doi: 10.1002/lpor.201200003.
- Cai, F., Luis, M. A. F., Lin, X., Wang, M., Cai, L., Cen, C., Biskup, E. (2019). Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment. *Molecular and Clinical Oncology*, 11(1), 15–23. doi: 10.3892/mco.2019.1854.
- Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuang, J., Thayumanavan, S. (2012). Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, 64(9), 836–851. doi: 10.1016/j.addr.2012.02.002.
- Chandra, K., Kumar, V., Werner, S. E., Odom, T. W. (2017). Separation of stabilized MOPS gold nanostars by density gradient centrifugation. *ACS Omega*, 2(8), 4878–4884. doi: 10.1021/acsomega.7b00871.
- Chang, Y. X., Gao, H. M., Zhang, N. N., Tao, X. F., Sun, T., Zhang, J., Lu, Z. Y., Liu, K., Yang, B. (2018). Synergistic reducing effect for synthesis of well-defined Au nanooctopods with ultra-narrow plasmon band width and high photothermal conversion efficiency. *Frontiers in Chemistry*, 6(AUG),1–8. doi: 10.3389/fchem.2018.00335.
- Chang, Y. X., Zhang, N. N., Xing, Y. C., Zhang, Q., Oh, A., Gao, H. M., Zhu, Y., Baik, H., Kim, B., Yang, Y., Chang, W. S., Sun, T., Zhang, J., Lu, Z. Y., Lee, K., Link, S., Liu, K. (2019). Gold Nanotetrapods with unique topological structure and ultranarrow plasmonic band as multifunctional therapeutic agents. *Rapid-communication. Journal of Physical Chemistry Letters*. American Chemical Society, 10(16), 4505–4510. doi: 10.1021/acs.jpcllett.9b01589.
- Choi, W. Il, Sahu, A., Kim, Y. H., Tae, G. (2012). Photothermal cancer therapy and imaging based on gold nanorods. *Annals of Biomedical Engineering*. Springer, 40(2), 534–546. doi: 10.1007/s10439-011-0388-0.
- Dahlin, A. B., Wittenberg, N. J., Höök, F., Oh, S. H. (2013). Promises and challenges of nanoplasmonic devices for refractometric biosensing. *Nanophotonics*. Walter de Gruyter GmbH, 2(2), 83–101. doi: 10.1515/nanoph-2012-0026.
- Diaz Duarte-Rodríguez, M., Cortez-Lemus, N. A., Licea-Claverie, A., Licea-Rodríguez, J., Méndez, E. R. (2019). Dual responsive polymersomes for gold nanorod and doxorubicin encapsulation: Nanomaterials with potential use as smart drug delivery systems. *Polymers*, 11(6). doi: 10.3390/polym11060939.
- Fay, B. L., Melamed, J. R., Day, E. S. (2015). Nanoshell-mediated photothermal therapy can enhance chemotherapy in inflammatory breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 6931–6941. doi: 10.2147/IJN.S93031.
- Ferry, V. E., Verschuuren, M. A., Li, H. B. T., Verhagen, E., Walters, R. J., Schropp, R. E. I., Atwater, H. A.,

- Polman, A. (2010). Light trapping in ultrathin plasmonic solar cells. *Optics Express*, 18 Suppl 2, A237-45. doi: 10.1364/OE.18.00A237.
- Frangioni, J. V. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), 626–634. doi: 10.1016/j.cbpa.2003.08.007.
- González-Ayón, M. A., Sañudo-Barajas, J. A., Picos-Corrales, L. A., Licea-Claverie, A. (2015). PNVCL-PEGMA nanohydrogels with tailored transition temperature for controlled delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 53(22), 6662–2672. doi: 10.1002/pola.27766.
- Govorov, A. O. Richardson, H. H. (2007). Generating heat with metal nanoparticles. *Nano Today*, 2(1), 30–38. doi: 10.1016/S1748-0132(07)70017-8.
- Grabinski, C., Schaeublin, N., Wijaya, A., Couto, H. D., Baxamusa, S. H., Hamad-schifferli, K., Hussain, S. M. (2011). Effect of gold nanorod surface chemistry on cellular response. *ACS Nano*, 5(4), 2870–2879. doi: 10.1021/nn103476x.
- Guerrero-Martínez, A., Barbosa, S., Pastoriza-Santos, I., and Liz-Marzán, L. M. (2011). Nanostars shine bright for you. *Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles. Current Opinion in Colloid and Interface Science. Elsevier Ltd*, 16(2), 118–127. doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.007.
- Huang, X., Neretina, S., El-Sayed, M. A. (2009). Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials. Wiley Online Library*, 21(48), 4880–4910. doi: 10.1002/adma.200802789.
- Kim, M., Lee, J. H., Nam, J. M. (2019). Plasmonic photothermal nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Science*, 6(17). doi: 10.1002/advs.201900471.
- Lee, S. M., Nguyen, S. T. (2013). Smart nanoscale drug delivery platforms from stimuli-responsive polymers and liposomes. *Macromolecules*, 46(23), 9169–9180. doi: 10.1021/ma401529w.
- Liu, J., Detrembleur, C., De Pauw-Gillet, M. C., Mornet, S., Duguet, E., Jérôme, C. (2014). Gold nanorods coated with a thermo-responsive poly(ethylene glycol)-b-poly(N-vinylcaprolactam) corona as drug delivery systems for remotely near infrared-triggered release. *Polymer Chemistry*, 5(3), 799–813. doi: 10.1039/c3py01057k.
- MacKey, M. A., Ali, M. R. K., Austin, L. A., Near, R. D., El-Sayed, M. A. (2014). The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: Theory and in vitro experiments. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(5), 1319–1326. doi: 10.1021/jp409298f.
- Maier, S. A. (2007). Plasmonics: Fundamentals and applications. In *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer US. doi: 10.1007/0-387-37825-1.
- Manchun, S., Dass, C. R., Sriamornsak, P. (2012). Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sciences. Elsevier Inc.*, 90(11–12), 381–387. doi: 10.1016/j.lfs.2012.01.008.
- Márquez-Castro, J. E. (2022). Estabilización de nanopartículas de oro con copolímeros en bloques a base de Poli (N- vinilcaprolactama). Tesis de Maestría en Ciencias en Química. Instituto Tecnológico de

Tijuana.

- Maya, S., Sarmiento, B., Nair, A., Rejinold, N., Nair, S., Jayakumar, R. (2013). Smart stimuli sensitive nanogels in cancer drug delivery and imaging: A review. *current pharmaceutical design*, 19(41), 7203–7218. doi: 10.2174/138161281941131219124142
- Naciones Unidas. 2021. El cáncer mató a diez millones de personas en 2020, la mayoría en países de renta baja y media. Noticias ONU. Consultado el 27 de Febrero de 2023 de <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492#:~:text=En 2020 alcanzó a 19,50%25 más altos en 2040.>
- Nanodots, S., Link, S., El-sayed, M. A. (1999). Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *1*, 8410–8426. doi: 10.1021/jp9917648.
- Nikoobakht, B. El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*. ACS Publications, 15(10), 1957–1962. doi: 10.1021/cm020732l.
- Ortega Salazar, J. M. (2021). Síntesis y caracterización de nanopartículas con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica. Tesis de maestría en Óptica Física - CICESE.
- Priya James, H., John, R., Alex, A., Anoop, K. R. (2014). Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 120–127. doi: 10.1016/j.apsb.2014.02.005.
- Raemdonck, K., Demeester, J., De Smedt, S. (2009). Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*, 5(4), 707–715. doi: 10.1039/b811923f.
- Raether, H. (1988). Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. In Springer, Heidelberg. doi: 10.1364/ao.16.002803.
- Rossi, S., Gazzola, E., Capaldo, P., Borile, G., Romanato, F. (2018). Grating-coupled surface plasmon resonance (GC-SPR) optimization for phase-interrogation biosensing in a microfluidic chamber. *Sensors (Switzerland)*. MDPI AG, 18(5). doi: 10.3390/s18051621.
- Soni, K. S., Desale, S. S., Bronich, T. K. (2016). Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 240, 109–126. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009.
- Suhail, M., Rosenholm, J. M., Minhas, M. U., Badshah, S. F., Naeem, A., Khan, K. U., Fahad, M. (2019). Nanogels as drug-delivery systems: A comprehensive overview. *Therapeutic Delivery*, 10(11), 697–717. doi: 10.4155/tde-2019-0010.
- Sultana, S., Djaker, N., Boca-Farcu, S., Salerno, M., Charnaux, N., Astilean, S., Hlawaty, H., De La Chapelle, M. L. (2015). Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. *Nanotechnology*, 26(5). doi: 10.1088/0957-4484/26/5/055101.
- Unverferth, D. V., Magorien, R. D., Leier, C. V., Balcerzak, S. P. (1982). Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treatment Reviews*, 9(2), 149–164. doi: 10.1016/S0305-7372(82)80014-5.
- Venkatesan, R., Pichaimani, A., Hari, K., Balasubramanian, P. K., Kulandaivel, J., Premkumar, K. (2013).

- Doxorubicin conjugated gold nanorods: A sustained drug delivery carrier for improved anticancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(7), 1010–1018. doi: 10.1039/c2tb00078d.
- Verhoeven, J. W. (1996). Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*, 68(12), 2223–2286. doi: 10.1351/pac199668122223.
- Wang, Y., Black, K., Luehmann, H., Li, W., Zhang, Y., Cai, X., Wan, D., Liu, S.-Y., Kim, P., Li, Z. Y., Wang, L., Liu, Y., and Xia, Y. (2013). Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS Nano*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1021/nn304332s.
- Wu, H. L., Chen, C. H., and Huang, M. H. (2009). Seed-mediated synthesis of branched gold nanocrystals derived from the side growth of pentagonal bipyramids and the formation of gold nanostars. *Chemistry of Materials*, 21(1), 110–114. doi: 10.1021/cm802257e

