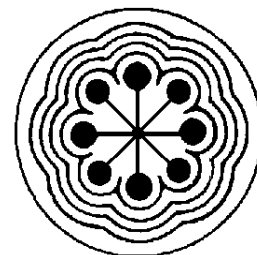




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES NUCLEARES



ININ

FACULTAD DE MEDICINA

*Irradiación de un sistema basado en
Nanopartículas de Oro y Rodamina 6G con
Láser Nd:YAG Continuo y Pulsado*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FÍSICA MÉDICA

P R E S E N T A

Geraldinne Vallejo

Comité de Tutores: Dra. en C.S. Liliana Aranda Lara
Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López
Dr. en C. Eugenio Torres García



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

2024

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Teranóstica y el Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopía Láser de Pulsos Ultracortos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme las instalaciones y los equipos para desarrollar a cabalidad el presente proyecto de tesis.

Al CONAHCYT por el apoyo brindado mediante el programa “Becas Nacional (Tradicional) 2022 – 4”

Contenido

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	8
Abreviaturas.....	11
Índice de figuras.....	12
Índice de tablas.....	15
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	16
Capítulo 2. ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1. Antecedentes.....	19
2.2. Planteamiento del problema.....	23
2.3. Pregunta de investigación.....	24
2.4. Hipótesis.....	24
2.5. Objetivos.....	25
2.5.1. Objetivo general.....	25
2.5.2. Objetivos específicos.....	25
Capítulo 3. MARCO TEÓRICO.....	26
3.1. Láser.....	26
3.2. Terapia Fototérmica (PTT).....	27
3.3. Terapia Fotodinámica (PDT).....	29
3.4. Identificación de Reacciones de Transferencia Tipo I y II.....	30
3.5. AuNP.....	31
3.6. R6G.....	34
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1. Reactivos y Equipo.....	35
4.1.1. Reactivos.....	35
4.1.2. Equipamiento.....	36
4.2. Metodología.....	36
4.2.1. Irradiaciones.....	37
4.2.2. Evaluación de la Producción de ROS de R6G, AuNP y AuNP/R6G.....	38
4.2.3. Evaluación se las propiedades fototérmicas de las AuNP y AuNP/R6G.....	39
Capítulo 5. RESULTADOS.....	40
5.1 Principio físico-químico en el que se basan los indicadores empleados.....	40
5.2 Irradiaciones individuales de los indicadores utilizando los tres láseres.....	41
DCPIP.....	41
ABMA.....	43

FA	45
5.3 Irradiaciones individuales de los componentes fotosensibles de la mezcla (AuNP y R6G), y de la mezcla (AuNP/R6G) utilizando los tres láseres	47
AuNP.....	47
R6G.....	49
AuNP/R6G	51
5.4 Irradiaciones de las AuNP en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres	53
AuNP + DCPIP.....	53
AuNP + ABMA.....	56
AuNP + FA analizados por UV-Vis	59
5.5 Irradiaciones de la R6G en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres	62
R6G + DCPIP	62
R6G + ABMA	65
R6G + FA analizado por UV-Vis	68
5.6 Irradiaciones de la mezcla AuNP/R6G en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres.....	71
AuNP/R6G + DCPIP	71
AuNP/R6G + ABMA.....	74
AuNP/R6G + FA analizado por UV-Vis	77
5.7 Incremento de la temperatura.....	81
Capítulo 6. DISCUSIÓN.....	84
Capítulo 7. CONCLUSIONES	90
Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMEN

Introducción y objetivos: La R6G tiene potencial aplicación en terapia fotodinámica (PDT) cuando se irradia con luz visible cercana a 525 nm, longitud de onda donde tiene un máximo de absorción. Tiene la ventaja de producir reacciones de transferencia de carga (reacción tipo I) con biomoléculas como el ácido fólico, lo que la vuelve útil en ambientes hipóxicos. Las nanopartículas plasmónicas de oro de 20 nm (AuNP 20 nm) han mostrado ser prometedoras para terapia fototérmica (PTT) ya que absorben eficientemente luz cercana a los 520 nm, debido a su resonancia localizada del plasmón de superficie (LSPR). La irradiación de AuNP de 5 nm con luz pulsada de 532 nm y 1064 nm ha demostrado decolorar al indicador ABMA indicando producción de oxígeno singlete. La misma irradiación ha producido también la decoloración del indicador DCPIP, indicando la producción de especies reactivas. Lo anterior sugiere que las AuNP de 5 nm pudieran ser útil en PDT, sin embargo, no se conoce el potencial para PDT de las de 20 nm. Es interesante evaluar las propiedades de la mezcla AuNP(20 nm)/R6G como agente de terapia dual PDT/PTT cuando se irradia con luz de 532 nm. Tal estudio no se ha llevado a cabo. Las propiedades requeridas en la mezcla para su aplicación en PDT y PTT pueden evaluarse utilizando luz láser continua de 532 nm, pulsada de 532 nm y pulsada de 1064 nm. Dado que la interacción de la luz con la mezcla cambia en dependencia del modo de irradiación, se espera que haya diferencias en la producción de oxígeno singlete, especies reactivas reductoras y la ocurrencia de reacciones de transferencia con el ácido fólico entre la mezcla AuNP(20 nm)/R6G y sus componentes individuales bajo los tres tipos de irradiación. La producción de oxígeno singlete, especies reactivas reductoras y la ocurrencia de reacciones de transferencia con el ácido fólico se evalúan a partir de la decoloración de los indicadores ABMA y DCPIP y el aumento en la intensidad de fluorescencia de la muestra con ácido fólico, respectivamente, que produce la irradiación de la muestra analizada. A partir de los resultados se puede conocer las mejores condiciones para inducir una terapia híbrida basada en PDT/PTT.

Metodología: Se prepararon muestras conteniendo a la R6G, AuNP (20 nm) y la mezcla AuNP/R6G y se les añadió a todas de manera individual el ABMA, DCPIP y ácido fólico. Las muestras fueron irradiadas con luz láser continua a 532 nm a 3.98 W/cm^2 , con luz pulsada a 532 nm a 0.48 J/cm^2 y con luz pulsada a 1064 nm a 1.91 J/cm^2 . El tiempo de irradiación con la luz continua fue de 30 min con intervalos de 5 min y con la luz pulsada de 10 min con intervalos de 2 min. Después de cada intervalo de irradiación a la muestra que contenían DCPIP o ABMA se le registró el espectro UV-Vis, y a las que contenían ácido fólico se les registró el de fluorescencia. En una segunda irradiación a las muestras, además, se les midió la temperatura durante la irradiación a intervalos de 1 min utilizando un termopar.

Resultados: Los resultados indicaron que las AuNP (20 nm) no modificaron ni la intensidad ni la posición del LSPR durante la irradiación continua, y tampoco reaccionaron con los indicadores evaluados, por tanto, no hubo producción de reacciones de transferencia, ni de carga ni de energía. En presencia de irradiación pulsada de 532 nm y 1064 nm, la irradiación de las AuNP (20 nm) modificó la intensidad y posición del LSPR y decoloró al DCPIP, indicando fragmentación de las AuNP con la posible liberación de electrones que pudieron reaccionar y formar ROS o directamente decolorar al DCPIP. Este resultado había sido previamente obtenido también con AuNP de 5 nm. La irradiación pulsada de las AuNP de 20 nm no produjo la decoloración del ABMA, por tanto, no hay evidencia de la producción de oxígeno singlete, resultado que sí está reportado que ocurre con AuNP de 5 nm. Solo bajo irradiación con luz pulsada a 1064 nm hubo incremento de la fluorescencia en las muestras que contenían ácido fólico, lo que pudiera ser un fenómeno asociado a la ruptura del ácido fólico debido a la alta intensidad de fotones presentes. Todas las muestras irradiadas con los tres láseres incrementaron la temperatura.

La irradiación de la R6G produjo oxígeno singlete bajo irradiación continua, sin embargo, esto no ocurrió bajo irradiación pulsada. Este resultado concuerda con lo reportado que plantea que la R6G produce oxígeno singlete en un bajo rendimiento. La decoloración del DCPIP solo ocurrió bajo irradiación pulsada a 1064 nm, efecto que también atribuimos a la alta intensidad de energía, y las reacciones de transferencia con el ácido fólico ocurrieron con los tres tipos de irradiaciones.

La irradiación de la mezcla AuNP (20 nm)/R6G produjo oxígeno singlete y reacciones de transferencia con el ácido fólico bajo irradiación continua. No produjo especies reactivas reductoras del DCPIP bajo esta irradiación, lo que indica que la absorción de luz por la R6G y las AuNP no induce este tipo de reacciones, ya que en este modo de irradiación no hay cavitación ni fragmentación de las AuNP. La irradiación de la mezcla con luz pulsada solo produjo la decoloración del DCPIP probablemente debido a la fragmentación que sufren las AuNP (20 nm). Los resultados indican que la mezcla bajo luz pulsada a 532 nm se comporta más como lo hacen las AuNP (20 nm) a como lo hace la R6G. El incremento de temperatura además de la mezcla fue similar a la irradiación de las AuNP solas con los tres tipos de láseres, este resultado refuerza la evidencia que la luz interactúa preferentemente con las AuNP, al menos en la irradiación pulsada. Bajo irradiación continua hubo más evidencias que en la mezcla la luz continua interactuó con los dos componentes presentes.

Conclusiones: Se demostró que: (i) la excitación de la R6G, cuando interactúa con el láser continuo se excita hasta llegar al cruce intersistema y genera oxígeno singlete. Sin embargo,

este fenómeno no se observa con el láser pulsado. (ii) la excitación de la R6G no produce especies reactivas de oxígeno como el ion radical superóxido o hidroxilo, ya que el DCPIP no se decoloró ni bajo irradiación continua ni bajo pulsada de 532 nm. (iii) La excitación de la R6G produce reacciones de transferencia con el ácido fólico con los tres láseres. (iv) La irradiación de las AuNP no produce oxígeno singlete ni especies reactivas, ni reacciones de transferencia por excitación de la AuNP, no hay reacción bajo luz continua. Bajo luz pulsada hay producción de especies reactivas reductoras probablemente debido a la fragmentación de las AuNP. (v) La luz pulsada interactúa preferentemente con la AuNP y menos con la R6G. (vi) Irradiar la mezcla AuNP (20 nm) /R6G con luz continua de 532 nm produciría oxígeno singlete, reacciones de transferencia con el ácido fólico (útiles en medios hipóxicos) e incrementaría la temperatura. Su desventaja es que se requiere introducir una sonda que lleve la luz al tejido de interés. (vii) Irradiar la mezcla con luz pulsada produciría especies reactivas reductoras (probablemente electrones debido a la fragmentación de las AuNP), e incrementaría la temperatura. Tiene la ventaja que la irradiación a 1064 nm puede realizarse, en teoría, de manera externa. (viii) La mezcla tiene propiedades que permiten utilizarla como agente terapéutico en terapias híbridas PDT/PTT.

ABSTRACT

Introduction and objectives: R6G has potential application in photodynamic therapy (PDT) when irradiated with visible light near 525 nm, a wavelength where it has an absorption maximum. It has the advantage of producing charge transfer reactions (type I reaction) with biomolecules such as folic acid, which makes it useful in hypoxic environments. Gold plasmonic nanoparticles (20 nm AuNPs) have shown promise for photothermal therapy (PTT) as they efficiently absorb light near 520 nm, due to their localized surface plasmon resonance (LSPR). Irradiation of 5 nm AuNPs with 532 nm and 1064 nm pulsed light has been shown to decolorize the ABMA indicator indicating singlet oxygen production. The same irradiation has also produced discoloration of the DCPIP indicator, indicating the production of reactive species. The above suggests that 5 nm AuNPs could be useful in PDT, however, the PDT potential of 20 nm AuNPs is not known. It is interesting to evaluate the properties of the AuNP (20 nm)/R6G mixture as a dual PDT/PTT therapy agent when irradiated with 532 nm light. Such a study has not been carried out. The properties required in the mixture for PDT and PTT application can be evaluated using continuous 532 nm, pulsed 532 nm and pulsed 1064 nm laser light. Since the interaction of light with the mixture changes in dependence on the irradiation mode, differences in singlet oxygen production, reactive reducing species and the occurrence of transfer reactions with folic acid are expected between the AuNP (20 nm)/R6G blend and its individual components under the three types of irradiation. The production of singlet oxygen, reactive reducing species and the occurrence of transfer reactions with folic acid are evaluated from the discoloration of ABMA and DCPIP indicators and the increase in fluorescence intensity of the sample with folic acid, respectively, produced by irradiation of the analyzed sample. From the results it is possible to know the best conditions to induce a hybrid therapy based on PDT/PTT.

Methodology: Samples containing R6G, AuNP (20 nm) and the AuNP/R6G mixture were prepared and ABMA, DCPIP and folic acid were added individually to all of them. The samples were irradiated with continuous laser light at 532 nm at 3.98 W/cm^2 , with pulsed light at 532 nm at 0.48 J/cm^2 and with pulsed light at 1064 nm at 1.91 J/cm^2 . The irradiation time with continuous light was 30 min with 5 min intervals and with pulsed light 10 min with 2 min intervals. After each irradiation interval, the UV-Vis spectrum was recorded for the sample containing DCPIP or ABMA, and the fluorescence spectrum was recorded for those

containing folic acid. In a second irradiation, the temperature of the samples was also measured during irradiation at 1 min intervals using a thermocouple.

Results: The results indicated that AuNPs (20 nm) did not modify either the intensity or the position of the LSPR during continuous irradiation, nor did they react with the indicators evaluated, therefore, there was no production of charge or energy transfer reactions. In the presence of pulsed irradiation of 532 nm and 1064 nm, the irradiation of AuNPs (20 nm) modified the intensity and position of the LSPR and decolorized the DCPIP, indicating fragmentation of the AuNPs with the possible release of electrons that could react and form ROS or directly decolorize the DCPIP. This result had been previously obtained also with 5 nm AuNPs. Pulsed irradiation of 20 nm AuNPs did not produce decolorization of ABMA, therefore, there is no evidence of singlet oxygen production, a result that is reported to occur with 5 nm AuNPs. Only under irradiation with pulsed light at 1064 nm was there an increase in fluorescence in the samples containing folic acid, which could be a phenomenon associated with the breakdown of folic acid due to the high intensity of photons present. All samples irradiated with the three lasers increased in temperature.

Irradiation of R6G produced singlet oxygen under continuous irradiation, however, this did not occur under pulsed irradiation. This result is in agreement with reports that R6G produces singlet oxygen in a low yield. Decolorization of DCPIP only occurred under pulsed irradiation at 1064 nm, an effect we also attribute to the high energy intensity, and transfer reactions with folic acid occurred with all three types of irradiations.

Irradiation of the AuNP (20 nm)/R6G mixture produced singlet oxygen and transfer reactions with folic acid under continuous irradiation. It did not produce DCPIP-reducing reactive species under this irradiation, indicating that light absorption by R6G and AuNP does not induce these types of reactions, since there is no cavitation or fragmentation of AuNPs in this mode of irradiation. Irradiation of the mixture with pulsed light only produced discoloration of the DCPIP probably due to the fragmentation undergone by the AuNPs (20 nm). The results indicate that the mixture under pulsed light at 532 nm behaves more like AuNPs (20 nm) than R6G. The temperature increase in addition to the blend was similar to irradiation of AuNPs alone with all three types of lasers, this result reinforces the evidence that light interacts preferentially with AuNPs, at least under pulsed irradiation. Under continuous

irradiation there was more evidence that in the mixture continuous light interacted with the two components present.

Conclusions: It was shown that (i) R6G excitation produces singlet oxygen, although either in low yield or the process is de-excited during the duration period between two pulses, as this reaction did not occur under pulsed irradiation. (ii) R6G excitation does not produce reactive oxygen species such as superoxide or hydroxyl radical ion, as DCPIP did not decolorize under either continuous or pulsed 532 nm irradiation. (iii) Excitation of R6G produces transfer reactions with folic acid with all three lasers. (iv) Irradiation of AuNPs produces neither singlet oxygen nor reactive species, nor transfer reactions by AuNP excitation, there is no reaction under continuous light. Under pulsed light there is production of reductive reactive species probably due to AuNP fragmentation. (v) Pulsed light interacts preferentially with AuNP and less with R6G. (vi) Irradiating the AuNP (20 nm)/R6G mixture with 532 nm continuous light would produce singlet oxygen, transfer reactions with folic acid (useful in hypoxic media) and increase the temperature. (vii) Irradiating the mixture with pulsed light would produce reactive reducing species (probably electrons due to fragmentation of AuNPs), and increase the temperature. It has the advantage that irradiation at 1064 nm can theoretically be performed externally. (viii) The mixture has properties that allow it to be used as a therapeutic agent in hybrid PDT/PTT therapies.

Abreviaturas

AuNP	Nanopartículas de oro
R6G	Rodamina 6G
ABMA	Acido 9,10-antracendiil-bis(metileno)dimalónico
DCPIP	2,6-diclorofenoolindofenol
FA	Ácido Fólico
ISC	Cruce entre sistemas
LSPR	Resonancia de plasmón de superficie localizada
NIR	Infrarrojo cercano
NP	Nanopartículas
PDT	Terapia fotodinámica
PTT	Terapia fototérmica
PS	Agente fotosensible
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Estado singlete excitado
T	Temperatura
Nd:YAG	Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet
CR	Radiación de Cherenkov

Índice de figuras

Figura 1. Profundidad de penetración de luz láser como función de la longitud de onda (nm). La región comprendida entre 700 nm - 1300 nm tiene la mayor profundidad de penetración, y es conocida como ventana óptica biológica (3).....	16
Figura 2. Absorción multifotónica. Figura tomada de la referencia (12).	17
Figura 3. Esquema de la generación de la energía del láser.....	26
Figura 4. Base de la terapia fototérmica: el tumor que contiene los agentes fototérmicos se irradia con un láser (25).	28
Figura 5. Efectos biológicos de la terapia fotodinámica (PDT) inducida por luz NIR (30).	29
Figura 6. Diagrama de Jablonski que muestra vías fotoquímicas en PDT.(31).....	29
Figura 7. Espectro de absorción de las AuNP dependiendo de su tamaño (40).	32
Figura 8. Esquemática de una resonancia de plasmón superficial localizada (42).	32
Figura 9. Detección de ROS mediante reacciones químicas RedOx utilizando ABMA, DCPIP y FA.	40
Figura 10. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 532$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 600$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.	55
Figura 11. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + ABMA, pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 520$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.	58
Figura 12. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + FA y pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 520$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.	60

Figura 13. Espectro de intensidad de fluorescencia de la suspensión de AuNP + FA y pendiente de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 455 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 61

Figura 14. Espectro de absorción de la solución de R6G + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 528 \text{ nm}$) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 605 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 64

Figura 15. Espectro de absorción de la solución de R6G + ABMA, pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 526 \text{ nm}$) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 67

Figura 16. Espectro de absorción de la solución de R6G +FA y pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 528 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 69

Figura 17. Espectro de intensidad de fluorescencia de la solución de R6G +FA y pendiente de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 455 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 71

Figura 18. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/R6G + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de AuNP+R6G ($\lambda = 525 \text{ nm}$) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 594 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 73

Figura 19. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/R6G +ABMA, pendiente de pico de absorbancia de AuNP+R6G ($\lambda = 526 \text{ nm}$) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 76

Figura 20. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/ R6G + FA y pendiente de pico de absorbancia de AuNP/R6G ($\lambda = 526 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 78

Figura 21. Espectro de intensidad de fluorescencia de la suspensión de AuNP/R6G + FA y pendiente de intensidad de fluorescencia FA ($\lambda_{emi} = 452 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 80

Figura 22. Incremento de temperatura registrado al irradiar AuNP con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 81

Figura 23. Incremento de temperatura registrado al irradiar la mezcla AuNP/ R6G con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm. 83

Figura 24. Deposición de energía entre un láser continuo y uno pulsado. 86

Índice de tablas

Tabla 1. Tabla de antecedentes.....	19
Tabla 2. Aplicaciones de las nanopartículas de oro	33
Tabla 3. Ocurrencia de las reacciones estudiadas en la mezcla, rapidez de la ocurrencia (pendiente m) y % de variación de la señal de intensidad evaluada durante el tiempo de irradiación estudiado.	85

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

Diferentes estrategias terapéuticas se aplican para el tratamiento de cáncer, entre ellas está la terapia fotodinámica con luz láser cercana al infrarrojo (PDT-NIR), la cual ofrece una mayor eficiencia y penetración en tejidos de manera localizada debido a su baja refracción y atenuación por cromóforos y biomoléculas endógenas (p. ej., agua, sangre y melanina) (1). La luz NIR (750 nm – 2500 nm) en combinación con un fotosensibilizador (PS) provoca un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete, especie de oxígeno altamente citotóxica (2). Existen dos rangos de longitudes de onda, en los cuales la luz puede penetrar de manera más efectiva en los tejidos biológicos. El primero se encuentra en el intervalo de 650 a 950 nm (NIR-I), y el segundo abarca desde 1000 nm hasta 1350 nm (NIR-II), como se evidencia en la figura 1 (3).

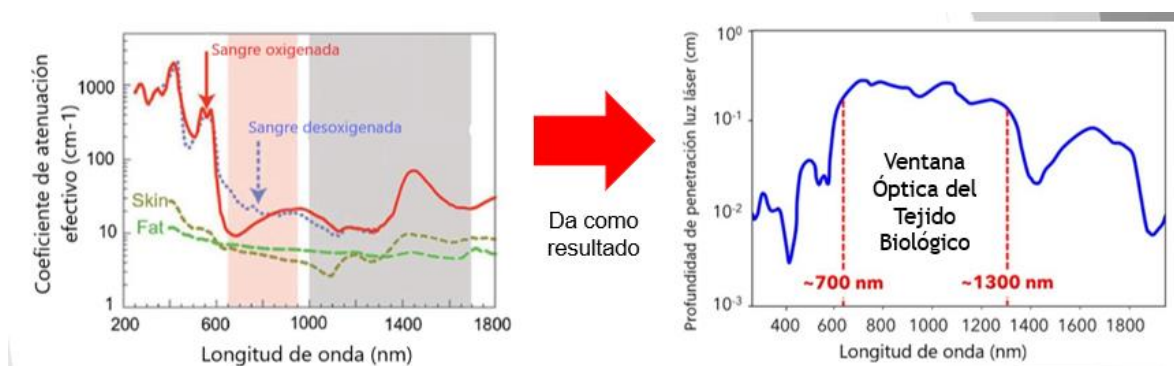


Figura 1. Profundidad de penetración de luz láser como función de la longitud de onda (nm). La región comprendida entre 700 nm - 1300 nm tiene la mayor profundidad de penetración, y es conocida como ventana óptica biológica (3).

Las nanopartículas de oro (AuNP) han sido ampliamente estudiadas por sus diferentes propiedades: 1) alta estabilidad química y física, lo que ofrece biocompatibilidad, 2) facilidad de funcionalización y 3) generación de resonancia de plasmón de superficie. Las AuNP, en dependencia de su tamaño y forma, tienen un máximo de frecuencia de resonancia de plasmón de superficie en longitudes de onda (500-550 nm) (4) (5). Esto permite que interactúen con una longitud de onda de 532 nm. Uno de los efectos de esta interacción es el incremento de temperatura, el cual es cercano a 2500 K, permitiendo el uso de AuNP en PTT (6). La resonancia localizada del plasmón de superficie producida, debido a la interacción de la luz con las AuNP, y que causa el incremento de temperatura, se origina con láseres pulsados y continuos (7). Por tanto, la PTT utilizando AuNP puede impartirse utilizando ambos tipos de láseres (8).

La PDT se basa en la producción de reacciones de transferencia. Ocurren cuando un PS se excita con una longitud de onda adecuada, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS); ya sean radicales

libres u oxígeno singlete (9). Recientemente, se ha demostrado que la rodamina 6G (R6G), PS que tiene un máximo de absorción en 525 nm, es un buen agente para PDT debido a que produce reacciones de transferencia cuando se irradia con luz láser pulsada de 532 nm (10). Estas reacciones ocurrieron con oxígeno y con la biomolécula ácido fólico (10). Tales reacciones en presencia de un láser continuo han sido igual poco estudiadas.

Sin embargo, la irradiación con 532 nm (para PDT o PTT) se ve limitada en aplicaciones *in vivo* dado que la energía se absorbe en la superficie del tejido (11). Una estrategia para contrarrestar lo anterior, es irradiar con 1064 nm (doble de 532 nm), longitud de onda que se encuentra en la ventana óptica del tejido. Dos fotones simultáneos de 1064 nm producirán absorción multifotónica (Figura 2), por lo que la frecuencia “suma” será suficiente para producir la absorción correspondiente a 532 nm. El efecto multifotónico solo es posible lograrlo con láseres pulsados.

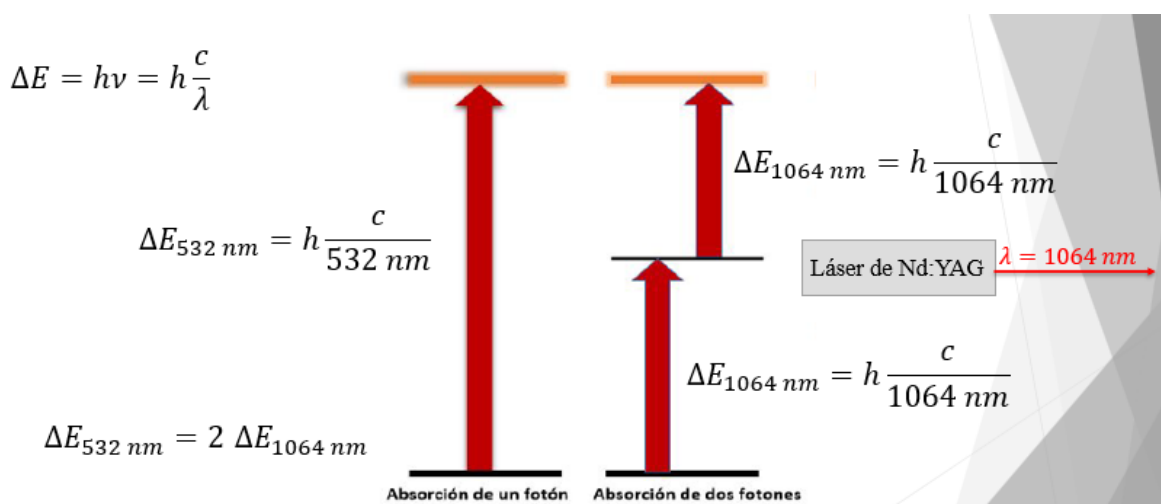


Figura 2. Absorción multifotónica. Figura tomada de la referencia (12).

Recientemente se ha reportado que las AuNP de 5 nm irradiadas con láser pulsado de 532 nm y 1064 nm producen ROS, y por tanto son potencialmente agentes útiles para PDT (13). El comportamiento de la producción de ROS utilizando luz continua, sin embargo, no es ampliamente conocido. La interacción de la luz láser continua y la pulsada con la materia es diferente, lo ocurre es que al irradiar con un láser pulsado no es totalmente extrapolable a lo que ocurrirá bajo irradiación con un láser continuo.

Las terapias combinadas juegan un papel importante en el efecto antitumoral. La citotoxicidad generada por la PDT se fundamenta principalmente en la acción de las ROS de vida corta. El mecanismo central de la citotoxicidad en la PTT es la desnaturalización de proteínas inducida por el calor; a mayor temperatura, la destrucción celular es más rápida y eficaz (14). La PTT es útil en áreas

tumorales con bajos niveles de oxígeno, atribuible al efecto Warburg, donde las células cancerosas metabolizan la glucosa de manera diferente a las células normales (15). En zonas hipóxicas la PDT convencional es menos efectiva, debido a que la limitación de oxígeno impide la alta producción de ROS.

Dados los siguientes hechos: (1) la utilidad de la R6G (longitud de onda de absorción en 525 nm) para producir ROS y reacciones de transferencia con el ácido fólico (biomolécula presente en la célula) bajo irradiación con luz láser pulsada de 532 nm (láser Nd:YAG); (2) la utilidad de las AuNP de 5 nm para producir ROS e incrementar la temperatura bajo irradiación con luz láser pulsada de 532 nm y 1064 nm (láser Nd:YAG); (3) la diferencia en los efectos producidos en los materiales debido a la irradiación con luz láser continua y pulsada (ejemplo 532 nm continua y pulsada); (3) la diferencia en la irradiación de materiales con luz pulsada basada en efectos lineales (532 nm) y no lineales (1064 nm) entonces, es de esperar que la irradiación con luz láser de una mezcla R6G/AuNP sea potencialmente útil para impartir una terapia combinada basada en PDT y PTT. Sin embargo, también se espera que la magnitud en la producción de ROS, la producción de reacciones de transferencia con el ácido fólico, y el incremento de temperatura varíen en dependencia de si la irradiación se realiza con luz de 532 nm continua o pulsada, y si se realiza dentro de la luz pulsada con 532 nm o 1064 nm. La irradiación de la R6G y las AuNP con luz continua no está ampliamente estudiada. Por tanto, el objetivo de este proyecto es evaluar diferencias en la producción de ROS y en la variación de la temperatura al irradiar una mezcla de (AuNP/R6G) utilizando un láser continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm). Lo anterior radica en obtener una estrategia terapéutica combinada basada en PDT y PTT que aprovechen las características de AuNP y R6G.

Capítulo 2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Antecedentes

La siguiente tabla (Tabla 1) muestra algunas de las referencias que anteceden al presente trabajo, y que forman la base y sustento de este.

Tabla 1. Tabla de antecedentes.

TÍTULO	REFERENCIA	ANTECEDENTES
Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine	(16): Marta Overchuk, Robert A. Weersink, Brian C. Wilson, and Gang Zheng, ACS Nano, 2023, Volumen, 17 número 9; 7979–8003.	La PDT y la PTT emplean luz y sustancias absorbentes, ya sea de origen interno o externo, para lograr sus efectos. En el caso de la PDT, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que son tóxicas para las células, mientras que la PTT genera un incremento localizado en la temperatura. La combinación de PDT y PTT aumenta la eficacia terapéutica al aprovechar tanto el calor (PTT) como las especies reactivas de oxígeno (PDT) para destruir las células cancerosas. Las nanopartículas permiten la administración precisa y la activación controlada de ambas terapias, mejorando la selectividad y reduciendo los efectos secundarios.
Comparative study of photothermolysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers	(7): Huang X, Kang B, Qian W, Mackey MA, Chen PC, Oyelere AK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. J Biomed Opt. 2010; Volumen 15 número 5;058002.	Con un láser continuo, las nanoesferas de oro en el citoplasma son más efectivas para destruir células debido a su capacidad de generar calor. Sin embargo, con un láser pulsado, las nanoesferas ubicadas en el núcleo son más eficaces, lo que se atribuye a los procesos de absorción no lineal que mejoran en esta localización. Un solo pulso de láser pulsado de nanosegundos resultó más eficiente para inducir muerte celular, especialmente cuando las nanoesferas estaban en el núcleo. Los láseres continuos

		tienden a inducir apoptosis, mientras que los pulsados causan necrosis. Esta diferencia entre apoptosis (muerte celular programada) y necrosis (muerte celular violenta) es relevante para determinar el tipo de daño celular necesario según el objetivo terapéutico.
Characterization of the absorption properties of 5 nm spherical gold nanoparticles functionalized with dodecanethiol and without functionalization with potential therapeutic applications.	(13): Cruz-Rodríguez, J. C., Camacho-López, M. A., Torres-García, E., Aranda-Lara, L., Morales-Avila, E., Díaz-Sánchez, L. E., Jiménez-Mancilla, N. P., & Isaac-Olivé, K. <i>Physica Scripta</i>, 2023, Volume 98, Number 5	Producción de ROS (oxígeno singlete y especies de radicales) e incremento de temperatura originado al irradiar AuNP de 5 nm con luz láser pulsada de 532 nm y 1064 nm. Uso de ABMA y DCPIP como indicadores para detectar los ROS. Tanto las nanopartículas de oro desnudas como las funcionalizadas mostraron una fuerte absorción en el rango visible, pero la funcionalización con dodecanotiol provocó ligeros cambios en los picos de resonancia plasmónica superficial (SPR). Esta alteración sugiere un cambio en el índice de refracción local alrededor de las nanopartículas. Estas características de absorción son cruciales para aplicaciones en terapia fototérmica (PTT) y terapia fotodinámica (PDT). Las nanopartículas de oro funcionalizadas demostraron una estabilidad mejorada, lo que las hace más adecuadas para aplicaciones biológicas, donde pueden servir como agentes efectivos para tratamientos contra el cáncer inducidos por luz. El estudio también exploró los efectos de la irradiación láser sobre las nanopartículas. Ambos tipos de nanopartículas de oro se irradiaron utilizando un láser de neodimio (Nd) láser pulsado a 532 nm y 1064 nm, y los resultados mostraron potencial

		para generar calor y especies reactivas de oxígeno (ROS), que son esenciales para aplicaciones terapéuticas como la ablación de tumores.
Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays.	(17): Jahn, B., Jonasson, N. S. W., Hu, H., Singer, H., Pol, A., Good, N. M., den Camp, H. J. M. O., Martinez-Gomez, N. C., & Daumann, L. J. JBIC de química biológica e inorgánica. 2020; Volumen 25, páginas 199–212	El DCPIP es un colorante redox que actúa como un aceptor de dos electrones. Se utiliza a una longitud de onda de 600 nm para detectar reacciones bioquímicas acopladas a este compuesto. Su uso rutinario como aceptor de electrones ha sido ampliado para incluir estudios con el citocromo, un aceptor de electrones natural. La efectividad del DCPIP en estas reacciones depende de su coeficiente de extinción, lo que afecta su reactividad y estabilidad. La estructura química del DCPIP juega un papel crucial en su desempeño como aceptor de electrones en diversas aplicaciones.
Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology	(10): Jiménez-Mancilla, N. P., Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Camacho-López, M. A., Ocampo-García, B. E., Torres-García, E., Estrada-Guadarrama, J. A., Santos-Cuevas, C. L., & Isaac-Olivé, K. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2021, Volumen 409, 113131	Producción de ROS (oxígeno singlete y especies de radicales) al irradiar R6G con luz láser pulsada de 532 nm. Uso de DCPIP como indicadores para detectar los ROS. Explicación química y descripción del método de determinación de reacciones de transferencia con ácido fólico como sustrato. El estudio muestra que el R6G, cuando se combina con ácido fólico (AF), experimenta reacciones de transferencia de electrones, lo que mejora sus propiedades fotosensibilizantes. Esta transferencia de electrones convierte al R6G en un fotosensibilizador potencial para la PDT, un área en la que los compuestos de rodamina se subutilizaban anteriormente debido a su baja producción de oxígeno singlete. La investigación destaca la posibilidad de utilizar compuestos basados en rodamina

		en PDT optimizando su interacción con biomoléculas como el ácido fólico. Esto podría conducir al desarrollo de fotosensibilizadores más eficaces para el tratamiento del cáncer, aprovechando la capacidad de la rodamina para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la activación de la luz. Las interacciones de transferencia de electrones estudiadas sugieren que R6G y compuestos similares podrían usarse para tratamientos más específicos contra el cáncer, en particular para tumores que sobreexpresan receptores de folato.
In vitro irradiation of doxorubicin with ^{18}F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system. Journal of Photochemistry and Photobiology	(18): Quintos-Meneses, H. A., Aranda-Lara, L., Morales-Ávila, E., Torres-García, E., Camacho-López, M. Á., Sánchez-Holguín, M., Luna-Gutiérrez, M. A., Ramírez-Durán, N., & Isaac-Olivé, K. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2020, Volumen 210, 111961	Explicación química y descripción de los métodos de detección de oxígeno singlete utilizando ABMA como indicador y de especies de radicales utilizando DCPIP. El estudio demostró que la Radiación de Cherenkov (CR) de ^{18}F-FDG puede activar la DOX, mejorando su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que es crucial para su acción citotóxica. Este mecanismo imita la terapia fotodinámica (PDT), pero utiliza CR como fuente de luz interna, lo que puede mejorar los resultados del tratamiento del cáncer. La combinación de DOX, y ^{18}F-FDG CR mostró un efecto citotóxico más fuerte en las células de cáncer de mama T47D en comparación con DOX solo o ^{18}F-FDG solo. Específicamente, la viabilidad celular disminuyó a alrededor del 64%, lo que indica un efecto sinérgico entre las acciones quimioterapéuticas y fotodinámicas.

		Dado que la 18F-FDG ya se utiliza en la obtención de imágenes para el diagnóstico del cáncer (por ejemplo, tomografías por emisión de positrones), el sistema DOX/18F-FDG presenta un potencial terapéutico y de diagnóstico dual (teragnóstico). Esto podría conducir a terapias contra el cáncer mejor dirigidas con imágenes integradas para el seguimiento del tratamiento.
--	--	---

A partir de ellas conocemos que:

La irradiación de un material fotosensible puede producir ROS mediante reacciones de transferencia tipo I y tipo II, o el incremento de la temperatura del medio (16). La irradiación de la R6G con luz pulsada de 532 nm produce ROS mediante reacciones tipo I y II y reacciones de transferencia con el ácido fólico (reacción tipo I) (10). La irradiación de AuNP 5 nm con luz pulsada de 532 nm y 1064 nm induce tanto la producción de ROS (especies de radicales y oxígeno singlete) como incremento de la temperatura (13). Los efectos de irradiar AuNP localizadas intracelularmente son diferentes si la irradiación se realiza con luz continua a con luz pulsada (19). La ocurrencia de las reacciones de transferencia productoras de ROS puede monitorearse utilizando los indicadores ABMA (13,18) y DCPIP (10,13,17). El comportamiento en la producción de ROS e incremento de temperatura bajo la irradiación con luz continua y pulsada de la misma longitud de onda (532 nm) de una mezcla AuNP/R6G es desconocido, en comparación a la irradiación de los componentes individuales de la mezcla. Desconocido es también el comportamiento de la mezcla con respecto a los componentes individuales bajo irradiación manera lineal (532 nm) y no lineal (1064 nm - absorción multifotónica).

2.2. Planteamiento del problema

Actualmente, se utilizan tratamientos combinados para incrementar la muerte de células tumorales y/o metastásicas. La PDT produce ROS al irradiar agentes PS. Sin embargo, la irradiación con 532 nm presenta limitaciones en cuanto a la capacidad de penetración de la luz en tejidos. Por otro lado, la PTT induce la muerte celular al incrementar la temperatura en regiones de interés. Sin embargo, al igual que la PDT, la PTT está limitada por la penetración de la luz. Una alternativa para superar lo anterior, es el uso de luz cercana al infrarrojo (p. ej. 1064 nm).

La irradiación de porfirina (longitud de onda de absorción de 600 a 700 nm) con un láser continuo o pulsado se aplica actualmente en la clínica. A pesar de que este tratamiento es bastante exitoso, tiene algunas desventajas relacionadas con la disminución de la oxigenación de los tejidos y el fotoblanqueo de la porfirina. La R6G es un fluoróforo con un máximo de absorción, en dependencia del medio, entre 500 – 550 nm. Jiménez-Mancilla et al. (10) menciona que la R6G tiene potencial en la aplicación de la PDT en ambientes hipóxicos, debido a la ocurrencia de la reacción tipo I con biomoléculas (ácido fólico), ofreciendo ventaja frente la porfirina. Recientemente, las AuNP han mostrado ser prometedoras para PTT. El fundamento básico es que absorben luz eficientemente, debido a su resonancia de plasmón de superficie. La luz fuertemente absorbida se convierte en calor de forma rápida (en una escala de tiempo de picosegundos) mediante procesos no radiativos.

A la fecha, existen limitados estudios donde se evalúen las diferencias entre la irradiación con un láser continuo y pulsado. Entonces, con la finalidad de evaluar diferencias en la producción de ROS y en la variación de la temperatura al irradiar la mezcla AuNP/R6G con respecto a sus componentes individuales, se utilizará un láser continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm). Lo anterior radica en obtener una estrategia terapéutica combinada basada en PDT y PTT que aprovechen las características de AuNP y R6G.

2.3. Pregunta de investigación

¿Qué diferencias existen en la producción de ROS y en la variación de la temperatura producidos por la mezcla AuNP/R6G con respecto a sus componentes individuales (AuNP y R6G) bajo irradiación con láser pulsado y con un láser continuo?

2.4. Hipótesis

La irradiación de la mezcla AuNP/R6G con el láser pulsado producirá mayor ROS en comparación con el continuo y la irradiación con un láser continuo producirá un mayor incremento de la temperatura en comparación con el pulsado.

La producción de ROS e incremento de temperatura, con ambos tipos láseres, será igual entre la mezcla y los componentes individuales.

2.5. Objetivos

2.5.1. Objetivo general

Irradiar la mezcla (AuNP/R6G) formada por nanopartículas de oro (AuNP) y rodamina 6G (R6G) con un láser Nd:YAG continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm) y determinar la producción de ROS e incremento de temperatura inducido en cada caso, tanto en la mezcla como en los componentes individuales.

2.5.2. Objetivos específicos

O1. Evaluar la producción de reacciones de transferencia tipo I de R6G, AuNP 20 nm y AuNP/R6G al ser irradiados con un láser Nd:YAG continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm)

O2. Evaluar la producción de reacciones de transferencia tipo II de R6G, AuNP 20 nm y AuNP/R6G al ser irradiados con un láser Nd:YAG continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm)

O3. Evaluar las propiedades fototérmicas de R6G, AuNP y AuNP/R6G al ser irradiados con un láser Nd:YAG continuo (532 nm) y pulsado (532 nm y 1064 nm).

Capítulo 3. MARCO TEÓRICO

3.1. Láser

Los láseres (acrónimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" en inglés, que significa "Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación") son dispositivos que generan un haz de luz coherente y altamente enfocada a través del proceso de emisión estimulada. Estas fuentes de luz tienen una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas, desde la medicina y la comunicación hasta la fabricación y la investigación científica.

Cuando confinamos átomos entre espejos, los fotones se reflejan entre ellos, colisionando con los átomos presentes. Este impacto provoca que los electrones de los átomos afectados transiten de su estado fundamental a uno excitado. Como resultado, la mayoría de los átomos se encuentran en un estado de excitación debido a la interacción continua entre los fotones y los electrones de los átomos confinados. Esto se conoce como inversión poblacional. A su vez, estos electrones excitados tenderán a volver a su estado natural, liberando más fotones. Este es el principio que explica la formación del haz de energía del láser (Figura 3) (20).

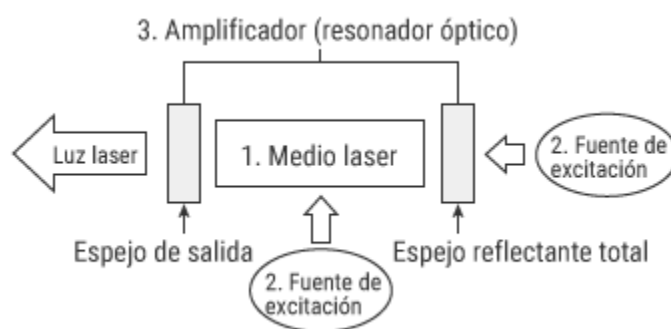


Figura 3. Esquema de la generación de la energía del láser.

Las características que identifican a los láseres son 1) El haz no se dispersa a medida que se aleja de la fuente, 2) El haz es monocromático, es decir; si hacemos pasar el haz a través de un prisma, el haz entrante será igual al saliente, y 3) tiene una frecuencia del haz coherente, es decir; produce una cantidad de energía equivalente con el "salto" del electrón hacia su estado original.

Los láseres pueden clasificarse de diversas maneras, y una de ellas se basa en el tipo de medio activo que utilizan. En este contexto, el láser de Nd:YAG pertenece al grupo de los láseres de estado sólido. En su mayoría, estos láseres tienen como medio activo un material cristalino o un vidrio dopado con compuestos capaces de emitir luz, o bien, utilizan un semiconductor. El láser de Nd:YAG, en

particular, incorpora iones de neodimio insertados en impurezas de itrio-aluminio. Este láser tiene la particularidad de poder operar de manera continua o pulsada. Se clasifica como un láser de alta potencia que emite en el infrarrojo. Debido al conversor de frecuencia formado por cristales no lineales puede emitir también radiación verde y ultravioleta (21).

- Láser Continuo

El láser continuo es un dispositivo que emite luz de manera continua y uniforme a lo largo del tiempo. Su funcionamiento se basa en la emisión estimulada de radiación en un medio activo, donde los átomos o moléculas son estimulados continuamente para liberar fotones coherentes. Este tipo de láseres es esencial en aplicaciones donde se requiere una salida de luz continua y estable (20,21).

- Láser Pulsado

Un láser pulsado es un láser que emite luz en forma de pulsos (flashes) cortos e intermitentes de luz intensa. Se basan en la acumulación y liberación, al contrario que los láseres que emiten luz de manera continua. Los láseres pulsados pueden emitir pulsos de muy corta duración, hasta unos pocos femtosegundos, a un ritmo de miles de pulsos por segundo. La capacidad de generar pulsos controlados permite explorar fenómenos en escalas temporales específicas y donde es necesario una alta intensidad luminosa en períodos breves (20,21).

3.2. Terapia Fototérmica (PTT)

La PTT debido a su simplicidad en la operación, tiempo de tratamiento corto y recuperación rápida es una terapia altamente efectiva y no invasiva para tratar varios tipos de cáncer (22). La PTT se basa en el aprovechamiento de la luz para generar calor localizado en el tejido con el fin de eliminar células específicas. Mediante el uso de nanopartículas (NP) localizadas en la región de interés, la PTT puede destruir selectivamente las células patológicas sin afectar el tejido sano circundante, aprovechando un foto-absorbente específico en la región del infrarrojo cercano (NIR). Antes de aplicar la PTT utilizando un absorbente NIR, se determinan dos parámetros esenciales para garantizar la efectividad del tratamiento y reducir el daño en los tejidos sanos cercanos: la tasa de combustión y el tiempo de irradiación (23). Esta estrategia mejora la absorción de energía y permite la utilización de láser en longitudes de onda del infrarrojo cercano para lograr una mayor profundidad, como se ilustra en la figura 6 (24).

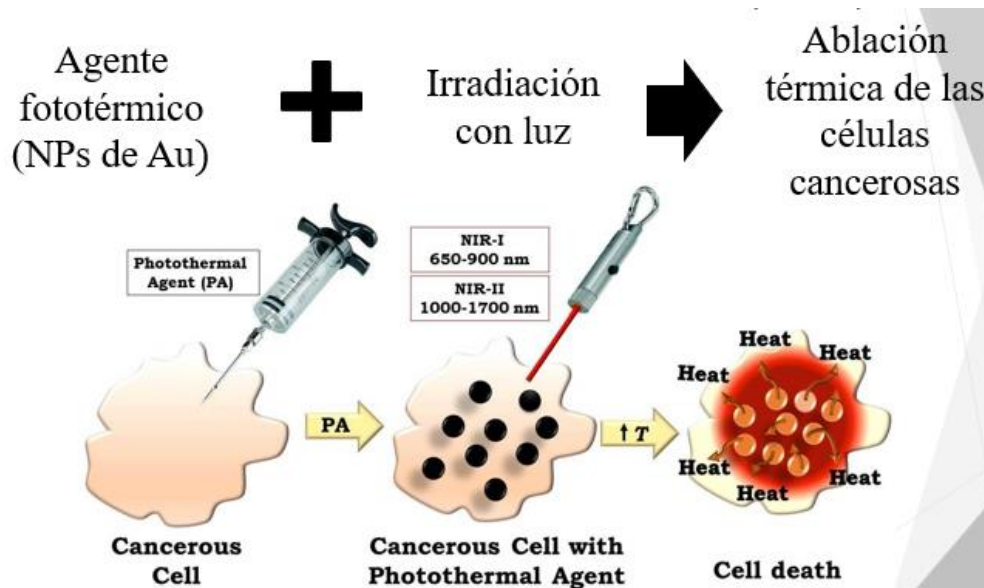


Figura 4. Base de la terapia fototérmica: el tumor que contiene los agentes fototérmicos se irradia con un láser (25).

La estrategia más efectiva consiste en aumentar la concentración del agente PS en el área afectada por el tumor, creando una diferencia de concentración que eleva la temperatura solo en esa zona. Para lograr esto, la técnica más común es la inyección intratumoral, que permite una mayor cantidad de PS en el tejido tumoral, aumentando así la temperatura selectivamente en el sitio del tumor. En el caso de la administración intravenosa, se han creado diversas tecnologías de administración, desde NP hasta sistemas biomiméticos y programados, con el objetivo de dirigir una cantidad significativa de agentes fototérmicos a los sitios tumorales (26).

Dos técnicas son el basamento físico en esta terapia (PTT), la hipertermia y la ablación térmica; en las cuales la diferencia radica en el umbral de temperatura. En la hipertermia, se eleva la temperatura hasta 42 °C y se mantiene durante un tiempo determinado, mientras que, en la ablación térmica, la temperatura supera los 42 °C durante unos minutos. Las células cancerosas pueden ser destruidas a una temperatura de 42 °C durante un período de 15 a 60 minutos, y esta duración puede reducirse a 4-6 minutos si la temperatura supera los 50 °C (16).

Para ser considerado un buen PS debe tener: 1) Toxicidad mínima y ser altamente compatible con el organismo, 2) Tamaño de entre 30 y 200 nm para asegurar una circulación prolongada y una mayor acumulación en los tumores, 3) Capacidad de absorber radiación NIR y 4) Sección transversal de absorción debe ser alta para maximizar la conversión de luz en calor (27).

Lo menos invasivo es poder realizar PTT irradiando con luz NIR, para garantizar que la misma penetre a profundidad en el tejido. Pero, si un material se calienta a una longitud de onda diferente al

rango NIR, la PTT puede realizarse, solo que esta sería invasiva. Se requiere introducir hasta el sitio de interés una sonda con la que se pueda realizar la irradiación del agente fototérmico.

3.3. Terapia Fotodinámica (PDT)

La PDT es un tipo de terapia que utiliza moléculas sensibles a la luz llamados PS para crear radicales libres citotóxicos o especies reactivas de oxígeno (ROS), como el oxígeno en estado singlete, al ser irradiado con una longitud de onda apropiada para activar el PS a través de una reacción fotoquímica como se muestra en la figura 7 (28,29).

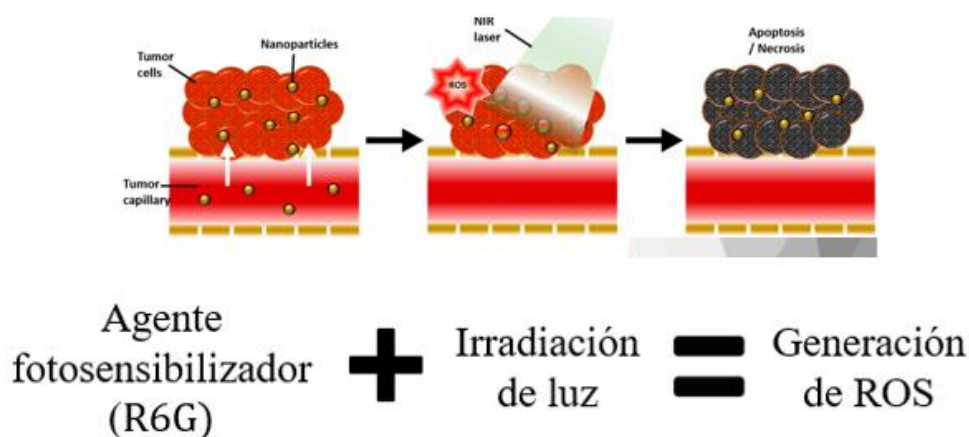


Figura 5. Efectos biológicos de la terapia fotodinámica (PDT) inducida por luz NIR (30).

La figura 6 muestra el diagrama de Jablonski, a partir del cual se explica el fundamento fisicoquímico de dicha terapia.

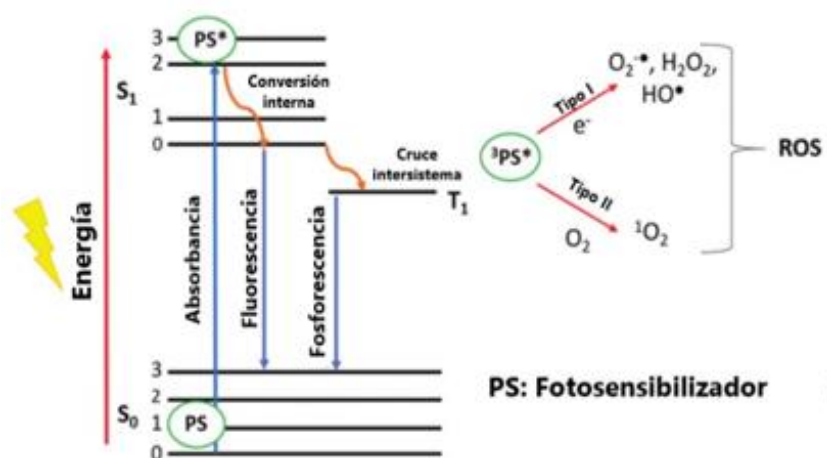


Figura 6. Diagrama de Jablonski que muestra vías fotoquímicas en PDT.(31).

Cuando un PS se irradia con luz, este absorbe la misma y se promueve desde su estado basal (S_0) al primer estado excitado singlete (S_1), convirtiéndose en PS^* (fotosensibilizador excitado) (32). Una vez en S_1 se desencadenan diferentes transiciones electrónicas. PS^* puede, mediante conversión interna, llegar al estado base de S_1 (tiempo de vida media del orden de ns o menos) y de ahí emitir el exceso de energía en forma de luz, proceso llamado fluorescencia; o puede sufrir un cruce de sistema y llegar al nivel energético conocido como triplete (T_1), el cual tiene un mayor tiempo de vida media (del orden de microsegundos) (33). Si el exceso de energía se emite desde el estado T_1 en forma de luz, el fenómeno se llama fosforescencia. Una vez en el estado triplete (T_1), si no ocurre la fosforescencia, pueden ocurrir entonces transiciones no radiativas en las que el PS^* toma o cede energía de otro sistema o partícula (sustrato). Un ejemplo de estas transiciones no radiativas son las reacciones de transferencia tipo I y II productoras de ROS.

En presencia de oxígeno, la molécula PS^* puede reaccionar directamente con un sustrato, mediante transferencia de protones o electrones, para formar radicales o iones radicales, los cuales pueden interactuar a su vez con oxígeno para producir productos oxigenados. Este tipo de reacción donde hay transferencia de partículas cargadas (electrones o protones) se conoce como reacción de transferencia tipo I (transferencia de carga). Este tipo de reacciones produce el peróxido de hidrógeno y las ROS radicálicas como el ion radical superóxido y el ion radical hidroxilo si la transferencia de carga ocurre con la molécula de oxígeno. Estas reacciones no solo se llevan a cabo con oxígeno, también pueden ocurrir con el ácido fólico, lo cual es conveniente en medios hipóxicos (10). De manera alternativa, el PS^* puede transferir directamente su exceso de energía a un sustrato. Este tipo de reacciones, donde se transfiere energía se conoce como reacción tipo II. Si el sustrato es la molécula de oxígeno, entonces la especie formada es el oxígeno singlete, estado electrónico excitado más bajo del oxígeno (34,35). Esta especie es la más dañina generada durante la PDT (36).

3.4. Identificación de Reacciones de Transferencia Tipo I y II

Para identificar la producción de reacciones de transferencia se utilizan indicadores como ácido 9,10-antracendiil-bis(metileno) dimalónico (ABMA), diclorofenolindofenol (DCPIP) y ácido fólico (FA). El indicador ABMA es específico para detectar la producción de oxígeno singlete, mediante el monitoreo del comportamiento de sus bandas de absorción características a 360 nm, 380 nm y 410 nm en el espectro UV-Vis. Si en el medio en el cual se encuentra el ABMA hay producción de oxígeno

singlete, este reaccionará con el ABMA dando como producto un compuesto diferente, de manera que las moléculas de ABMA irán desapareciendo y así sus bandas características (13,18).

Por su parte, el DCPIP es un indicador inespecífico de la producción de especies radicálicas como el ion superóxido o el hidroxilo. En este caso el monitoreo se realiza por medio del comportamiento de su banda de absorción característica a 608 nm observada en el espectro UV-Vis. Si en el medio en el cual se encuentra el DCPIP hay producción de especies radicálicas como el ion superóxido o hidroxilo, estos reaccionarán con el DCPIP dando como producto un compuesto diferente, de manera que las moléculas de DCPIP irán desapareciendo y así su banda característica (10,18,37).

El ácido fólico (FA) es un compuesto fluorescente, el cual se excita a 365 nm y emite a 450 nm. Si un PS induce la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I, donde el ácido fólico es el sustrato, la transferencia de un electrón desde el PS* hacia el FA provocará la ruptura del ácido fólico liberando el grupo pteridina. La pteridina tiene una mayor señal de fluorescencia que el ácido fólico. Por tanto, la evidencia de que está ocurriendo la reacción tipo I con el ácido fólico como sustrato es el incremento de la fluorescencia a 450 nm cuando se excita la muestra a 365 nm (10,38).

3.5. AuNP

Las AuNP son utilizadas para el transporte de agentes terapéuticos debido a su biocompatibilidad y capacidad de modificación superficial. Su alta eficiencia en la conversión de luz en calor las hace muy útiles en PTT. Su capacidad para agregarse y autoensamblarse le confiere a las AuNP habilidades de conversión fototérmica que no poseen los átomos en forma individual, lo que las convierte en candidatos ideales para regular la conversión de luz en calor. En su forma desagregada (átomos libres), la absorción de luz cercana al infrarrojo (NIR) de las AuNP es limitada, lo que resulta en una capacidad de conversión fototérmica insuficiente (39). La absorción de luz de las AuNP varía en función de su tamaño (Figura 8).

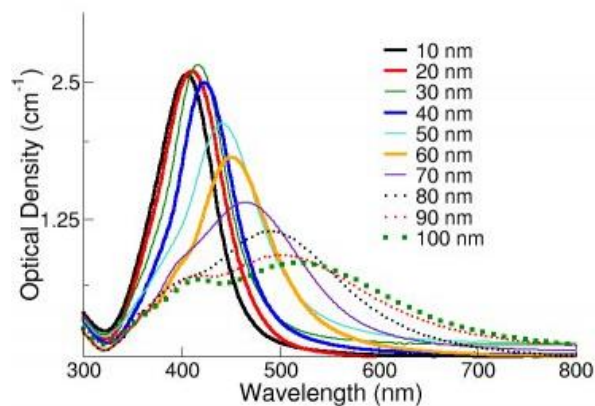


Figura 7. Espectro de absorción de las AuNP dependiendo de su tamaño (40).

Las AuNP son objeto de gran interés debido a sus singulares propiedades ópticas. La excitación por láser a una longitud de onda específica genera una oscilación colectiva y coherente de los electrones de conducción cerca de la superficie de la AuNP. Esta oscilación está en resonancia con la frecuencia de la luz incidente, lo que produce bandas de dispersión y absorción espectral. Esta propiedad óptica importante de las AuNP se conoce como resonancia localizada de plasmón de superficie (LSPR), la cual define la oscilación colectiva de la nube electrónica de las AuNP (Figura 9). Numerosos estudios han confirmado que la LSPR de las AuNP es extremadamente sensible al tamaño, la geometría del material la dimensión y las propiedades dieléctricas del medio circundante (41).

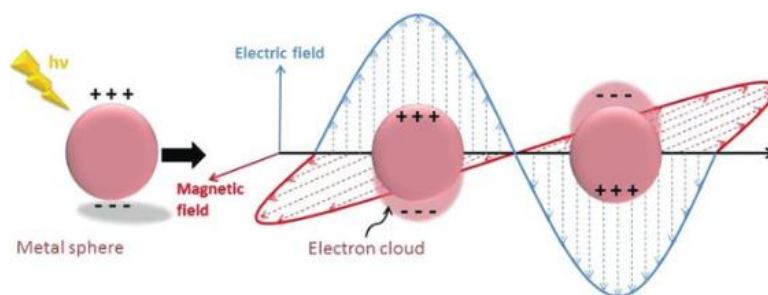


Figura 8. Esquemática de una resonancia de plasmón superficial localizada (42).

A nivel molecular, el tratamiento de PTT con AuNP induce la hipertermia, lo que provoca la contracción de las células, la desnaturalización de proteínas y la ruptura de la membrana celular (30).

Existen varias formas de síntesis de diferentes AuNP (Tabla 2). Las AuNP producidas mediante reducción en fase acuosa adoptan una forma casi esférica debido a que esta forma tiene el área de

superficie más pequeña en comparación con otras formas. Las NP esféricas de oro en suspensión suelen tener un color rojo rubí, ya que la luz se dispersa en el nanomaterial. Sin embargo, el cambio en el tamaño o el entorno de las NP puede alterar las propiedades ópticas del coloide. Las AuNP se pueden sintetizar en varias formas, como esferas, barras, cáscaras y prismas, para una variedad de aplicaciones (43). La tabla 2 resume el modo de producción y la aplicación de diferentes AuNP sintetizadas para aplicaciones médicas.

Tabla 2. Aplicaciones de las nanopartículas de oro

MÉTODO DE SÍNTESIS	PROPIEDADES DE LAS NP	APLICACIÓN
Reducción con citrato de ácido cloroáurico (44)	Tamaño de 35 nm (TEM) y pico SPR a 529 nm	Técnicas de biosensores moleculares para el diagnóstico del cáncer
AuNP estabilizadas con citrato seguido de injerto de polímeros en el NP (45)	Tamaño de 14 nm y estable durante al menos 3 meses (25°C)	Terapia fototérmica y quimioterapia
Oro radiactivo (^{198}Au) NP producido usando epigallocatequina (46)	Tamaño de 80 nm, SPR a 535 nm	Agente nanoterapéutico en oncología
Nanobarras de oro preparadas por el método mediado por semillas y encapsulado por sílice y otros compuestos (47)	Tamaños desde 5 nm hasta más de 25 nm	Detección multimodal simultánea de tumores y terapia fotodinámica
AuNP atrapada en dendrímero multifuncional conjugado con succinato de alfa-tocoferilo utilizando una solución de NaBH_4 helada (48)	AuNP dispersable en agua de 3.3 nm (tamaño del núcleo), pico SPR a 570 nm	Plataforma para diagnóstico por imágenes y tratamiento del cáncer
Nanocáscaras de oro ramificadas producidas por un método de crecimiento sembrado que carece de surfactante (49)	Tamaño alrededor de 135 ± 25 nm (DLS), pico SPR a 490 nm	Terapia simultánea contra el cáncer
AuNP cubiertas con citrato, cubiertas con cisteamina y desnudas (50)	Tamaño (DLS) de aproximadamente 17 a 100 nm	Agente antibacteriano
Micelas tras la conjugación de transferrina preparadas por el método de fundición de disolventes (51)	Tamaños desde 16.4 ± 0.39 nm hasta 20.3 ± 0.68 nm	Agente para diagnóstico por imágenes, terapia y teranóstica del cáncer
Nanocomposito híbrido sintetizado por deposición de Au en docetaxel	Tamaño alrededor de 180 nm, pico SPR a 520 nm	Terapia quimiofototérmica dirigida al tumor

cargado en ácido poliláctico co-glicólico (52)		
Au ³⁺ se reduce parcialmente a Au ⁺ mediante la posterior adición de un tiol con formación simultánea de oligómeros de tiolato de Au(I) en un disolvente orgánico (53)	Tamaño alrededor de 12 nm con emisión de azul a NIR	Imágenes ópticas y teranóstica

3.6. R6G

La R6G es un colorante fluorescente que tiene una absorción de luz intensa, en dependencia del medio, en el rango 500 – 550 nm. Además, es una molécula pequeña y soluble en agua. Los estudios han demostrado que el R6G puede ser utilizada en dosis más bajas que otros PS, lo que puede reducir los efectos secundarios (10). Se ha demostrado que la R6G puede experimentar reacciones de transferencia de tipo I con ácido fólico (FA), un componente esencial presente en todas las células vivas. Esta reacción de transferencia convierte al ácido fólico en un blanco molecular, lo que abre la posibilidad de utilizar la R6G como un PS y ampliar las aplicaciones de la PDT en entornos hipóxicos (54).

Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y Equipo

4.1.1. Reactivos

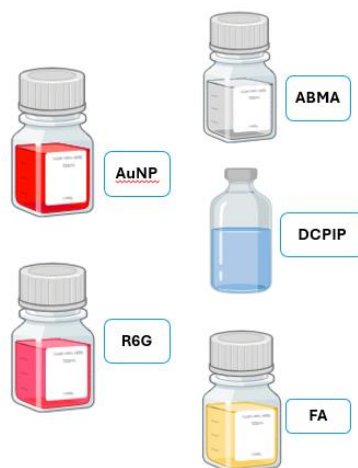


Figura 9. Soluciones utilizadas

Se utilizó:

Suspensión coloidal de AuNP de 5 nm estabilizadas en citrato de origen comercial (Sigma Aldrich) para utilizarse como agente fototérmico. La densidad óptica (O.D) de las suspensiones de trabajo estuvo entre 0.3 – 0.4.

Se preparó:

Solución de R6G (Sigma aldrich) 0.1 mM, preparada en H₂O doblemente destilada (dd) para utilizarse como agente PS.

Solución de Ácido Fólico (Sigma aldrich) a una concentración de 20 μ M (0.44 mg) en 50 ml de H₂O dd para evaluar la producción de reacciones de transferencia de carga.

Solución de 9,10-antracendiil-bis metileno dimalónico (ABMA) (Sigma aldrich) a una concentración 100 μ M (4.1 mg) en 100 ml de H₂O dd para identificar la producción de oxígeno singlete (reacción de transferencia de energía).

Solución de 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP) (Sigma Aldrich) a una concentración 100 μ M (2.9 mg) en 100 ml de H₂O dd para identificar la producción de especies oxidantes (transferencia de carga).

4.1.2. Equipamiento

Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz modelo Lambda 650 (Perkin Elmer). Espectrofotómetro Genesys 50 (Thermo Fisher Scientific).

Espectrofluorímetro Horiba Jobin (Fluoromax®-3). El voltaje de trabajo del detector de este espectrofluorímetro es de 950 V.

Láser pulsado ultrarrápido Nd:YAG de 30 ps y 10 Hz de frecuencia (Ekspla).

Láser continuo DPSS PSU-H-LED RN-532nm – 1W SN: DG71149, modo de operación modulación CW.

Multímetro autorango RMS con interfaz USB, modelo MUL-630 (Stereon).

4.2. Metodología

A continuación, se muestran los diagramas que representan la metodología general empleada.

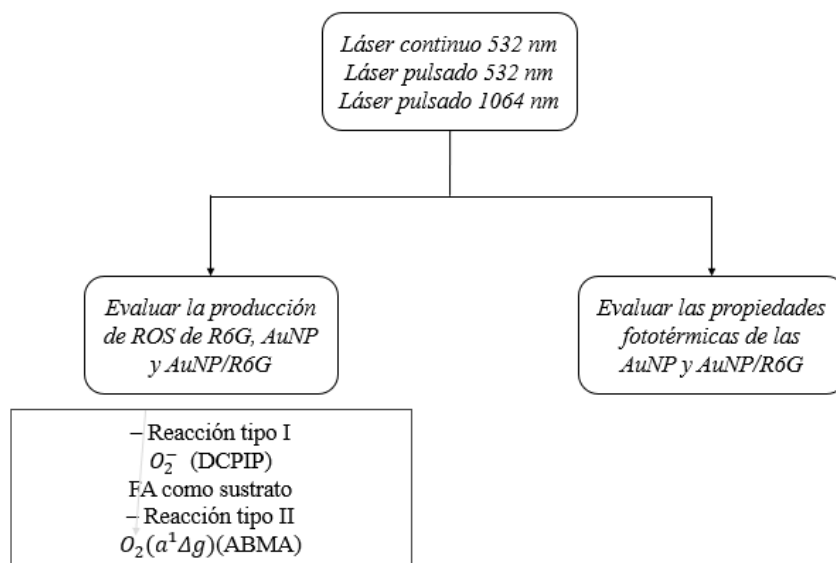


Figura 10. Diagrama metodología.

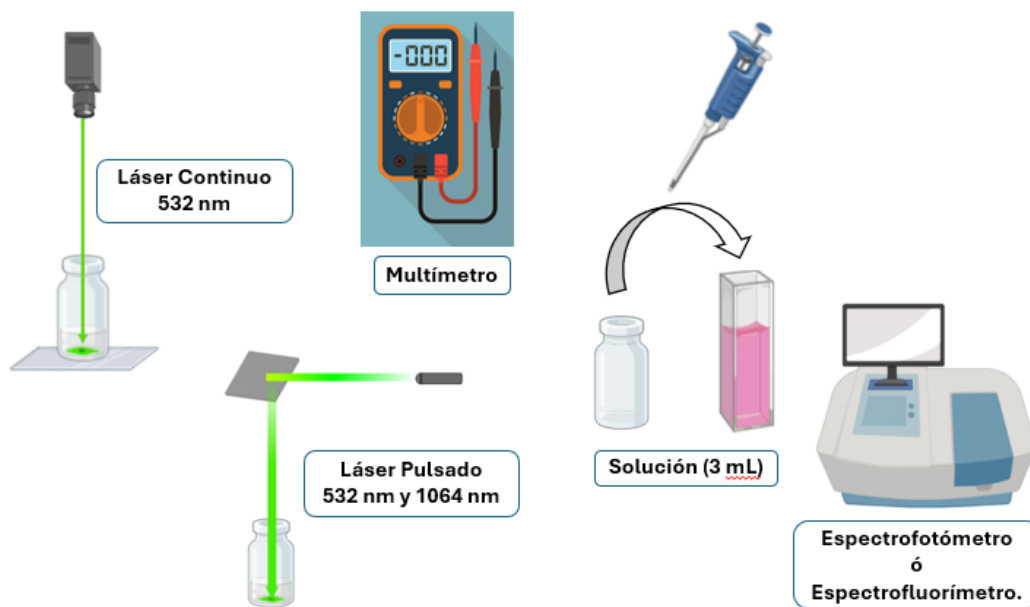


Figura 11. Diagrama de proceso realizado

A continuación, se describe la misma en detalle.

4.2.1. Irradiaciones

Se irradiaron de manera individual 3 ml de las soluciones/suspensiones durante 30 minutos con un láser Nd:YAG continuo (532 nm) a intervalos de 5 minutos, y durante 10 min con el pulsado (532 nm y 1064 nm) a intervalos de 2 min. La fluencia de energía utilizada en la irradiación con el láser continuo fue 3.98 W/cm^2 y la intensidad de la irradiación fue de 0.5 W. La fluencia de energía utilizada en la irradiación con el láser pulsado de 532 nm fue 0.48 J/cm^2 (energía del pulso de 15 mJ) y la utilizada con el pulsado de 1064 nm fue 1.91 J/cm^2 (energía del pulso de 15 mJ). Las geometrías de irradiación utilizadas en cada caso se muestran en la figura 11.

4.2.2. Evaluación de la Producción de ROS de R6G, AuNP y AuNP/R6G.

Irradiaciones individuales de todos los reactivos: En una cubeta de 3 mL y paso óptico de 1 cm, se prepararon por triplicado las siguientes muestras (soluciones/suspensiones): R6G, AuNP, ABMA, DCPIP y FA; añadiendo 1 mL de cada reactivo y 2 mL de H₂O dd.

Evaluación de reacciones de transferencia tipo I con el oxígeno como sustrato: En una cubeta de 3 mL y paso óptico de 1 cm se prepararon por triplicado las siguientes muestras (soluciones/suspensiones): 1 mL de R6G + 1 mL de DCPIP; 1 mL de AuNP + 1 mL de DCPIP; 1 mL de R6G + 1 mL de AuNP + 1 mL de DCPIP. Cuando fue necesario el volumen final se completó hasta 3 mL, añadiendo el volumen necesario de H₂O dd.

Evaluación de reacciones de transferencia tipo I con el ácido fólico como sustrato: En una cubeta de 3 mL y paso óptico de 1 cm se prepararon por triplicado las siguientes muestras (soluciones/suspensiones): 1 mL de R6G + 1 mL de FA; 1 mL de AuNP + 1 mL de FA; 1 mL de R6G + 1 mL de AuNP + 1 mL de FA. Cuando fue necesario el volumen final se completó hasta 3 mL, añadiendo el volumen necesario de H₂O dd.

Evaluación de reacciones de transferencia tipo II con el oxígeno como sustrato: En una cubeta de 3 mL y paso óptico de 1 cm se prepararon por triplicado las siguientes muestras (soluciones/suspensiones): 1 mL de R6G + 1 mL de ABMA; 1 mL de AuNP + 1 mL de ABMA; 1 mL de R6G + 1 mL de AuNP + 1 mL de ABMA. Cuando fue necesario el volumen final se completó hasta 3 mL, añadiendo el volumen necesario de H₂O dd.

Cada muestra se preparó por triplicado de manera que una se irradió con el láser continuo (532 nm), otra con el láser pulsado (532 nm) y la última con el láser pulsado (1064 nm), según las geometrías indicadas en la figura 11, y las condiciones de irradiación descritas en la sección 4.2.1. Al final de cada irradiación, a las muestras que contenían R6G, AuNP, ABMA y DCPIP se les registraron los espectros UV-Vis; y en el caso de las que tenían FA se les registró el espectro de fluorescencia de emisión (con excitación en 365 nm).

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron de 300 nm a 700 nm, con una resolución de 2 nm. Los de emisión (fluorescencia) se registraron de 350 nm a 600 nm, con una resolución de 2 nm, tiempo de integración de 0.5 s, rendijas de 2 nm, en cubetas de recorrido óptico de 1 cm y una capacidad de 3 mL. La excitación a 365 nm se realizó utilizando rendijas de 0.5 mm.

Las bandas características en los espectros UV-Vis y que se monitorearon en cada solución/suspensión fueron: R6G (525 nm), AuNP (~ 520 nm), ABMA (360 nm, 378 nm, 401 nm), DCPIP (600 nm). En el caso del espectro de emisión por fluorescencia se monitoreó la banda de 450 nm (excitación 365 nm).

Con el tiempo de irradiación y la intensidad obtenida en las bandas principales de cada compuesto (ya sean de UV-Vis o de fluorescencia) se construyeron gráficos (tiempo vs intensidad de la banda) a partir de los cuales, por ajuste lineal, se determinó la velocidad de cambio en la intensidad de la banda (pendiente de la recta de ajuste).

4.2.3. Evaluación se las propiedades fototérmicas de las AuNP y AuNP/R6G.

A las suspensiones de AuNP y AuNP/R6G descritas anteriormente (sección 4.2.2) se les sumergió un termopar tipo K. Mientras fueron irradiadas con los 3 láseres anteriormente mencionados, en las condiciones y geometrías anteriormente descritas, se les registró la temperatura cada minuto.

Capítulo 5. RESULTADOS

5.1 Principio físico-químico en el que se basan los indicadores empleados

La figura 12 muestra las reacciones químicas en la que se basa la detección de las reacciones de transferencia tipo I (indicadores ABMA y FA) y tipo II (indicador DCPIP).

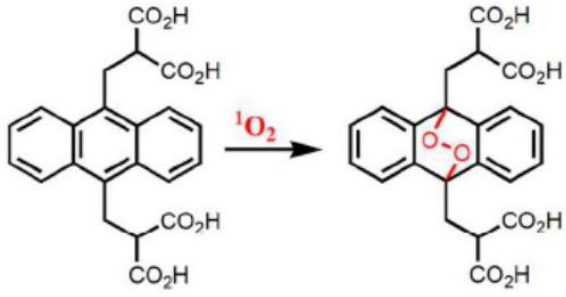
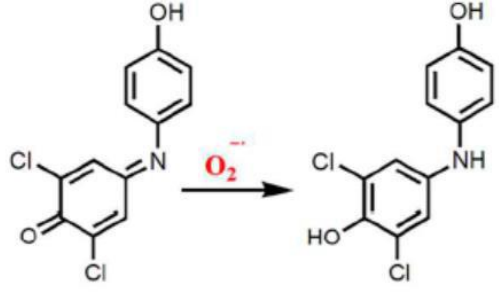
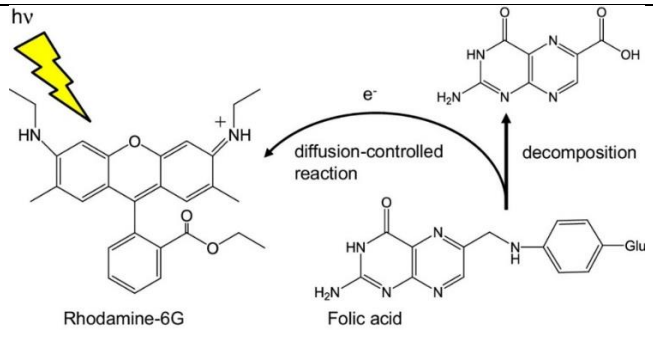
ABMA	DCPIP
	
a) ABMA ($\lambda_{\text{máx}}$: 360 nm, 378 nm, 401 nm) reacciona con oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$) y se oxida a un endoperoxido, disminuyendo las moléculas de ABMA en el medio.	b) DCPIP ($\lambda_{\text{máx}}$: 600 nm) reacciona con especies de electrones donantes como el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) o el ion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y se reduce a un compuesto incoloro, disminuyendo las moléculas de DCPIP en el medio.
FA	
	
c) La R6G excitada (PS^*) transfiere un protón al FA (o lo que es lo mismo, el FA transfiere un electrón a la R6G^*) produciendo la ruptura del FA y liberando el grupo pteridina que fluoresce a una intensidad mayor que el ácido fólico a 450 nm (exc a 365 nm) (tomada de (38))	

Figura 9. Detección de ROS mediante reacciones químicas RedOx utilizando ABMA, DCPIP y FA.

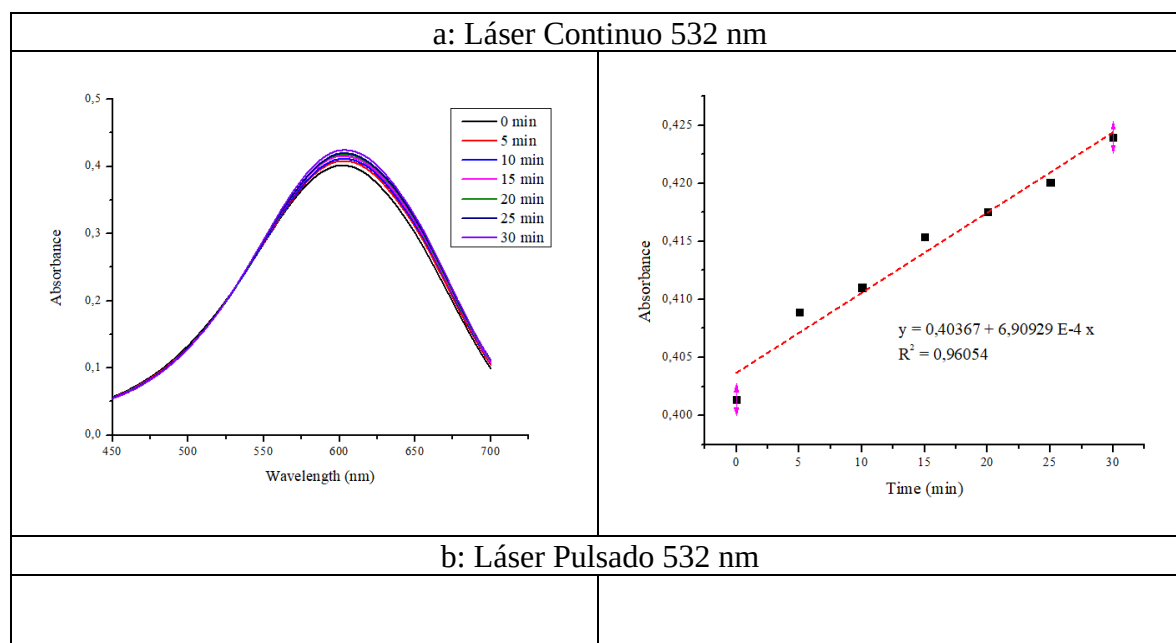
Si hay producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), este reacciona con el indicador ABMA formando una especie oxidada de ABMA (Figura 12-a). Si se producen especies radicales oxidantes o con electrones

desapareados (donantes de electrones) como el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) y el ion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) entonces habrá reacción con el DCPIP formando una especie reducida del DCPIP (compuesto DCPIP-incoloro) (Figura 12-b). La ocurrencia de reacciones de transferencia con el FA producirá la ruptura del ácido fólico con la consiguiente liberación del grupo pteridina que tiene mayor fluorescencia que el ácido fólico (Figura 12-c). La decoloración del ABMA y del DCPIP con el incremento del tiempo de irradiación, así como el aumento de la fluorescencia a 450 nm en presencia de ácido fólico son indicativos de que en la muestra irradiada hay un material fotosensible. Si no hay formación de ninguna ROS o la ruptura del FA, el espectro de estos indicadores no cambia con el incremento de tiempo de irradiación.

5.2 Irradiaciones individuales de los indicadores utilizando los tres láseres

DCPIP

El comportamiento del DCPIP frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 13.



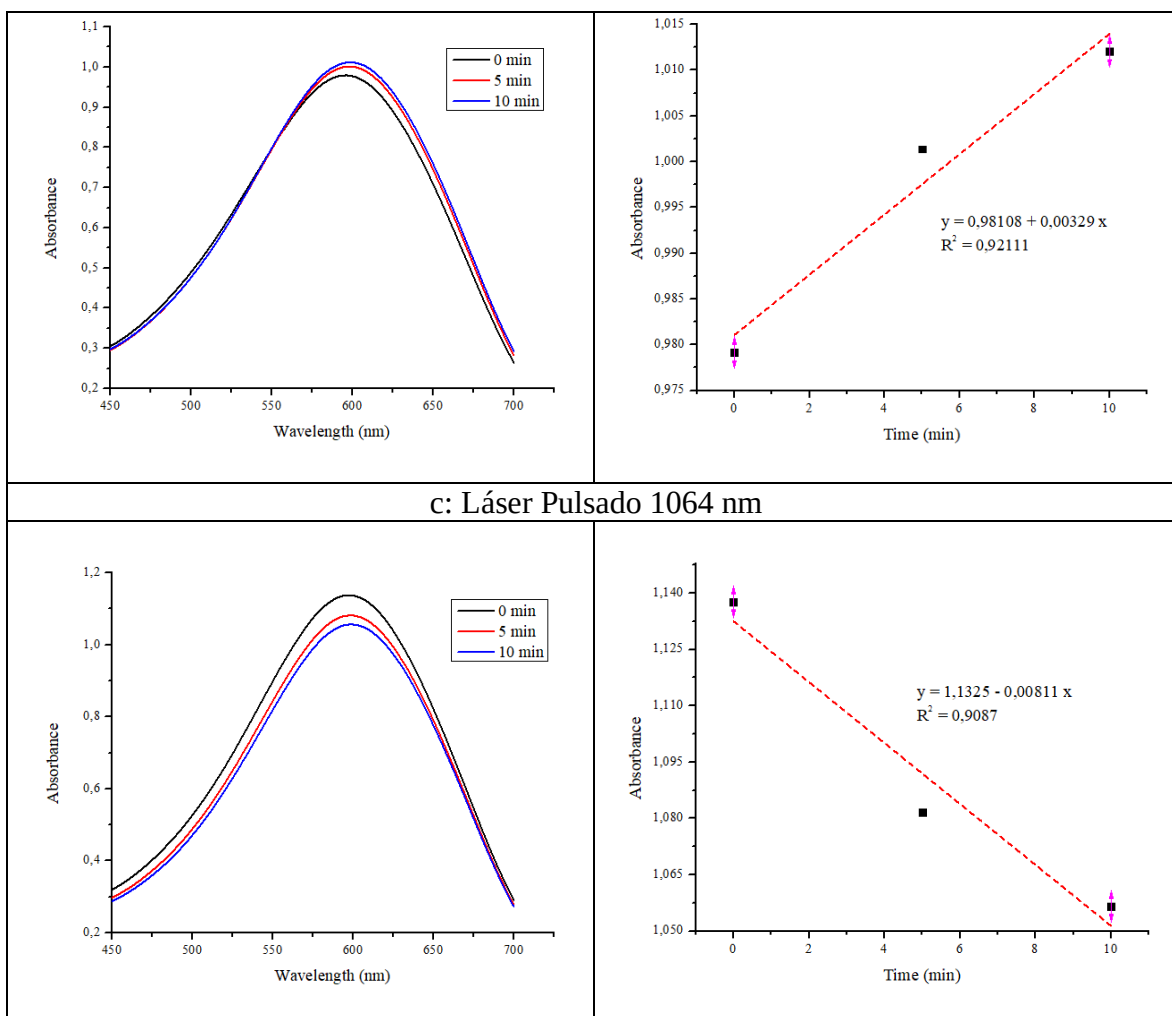


Figura 13. Espectro de absorción de la solución de DCPIP y pendiente de pico de absorbancia ($\lambda = 600$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

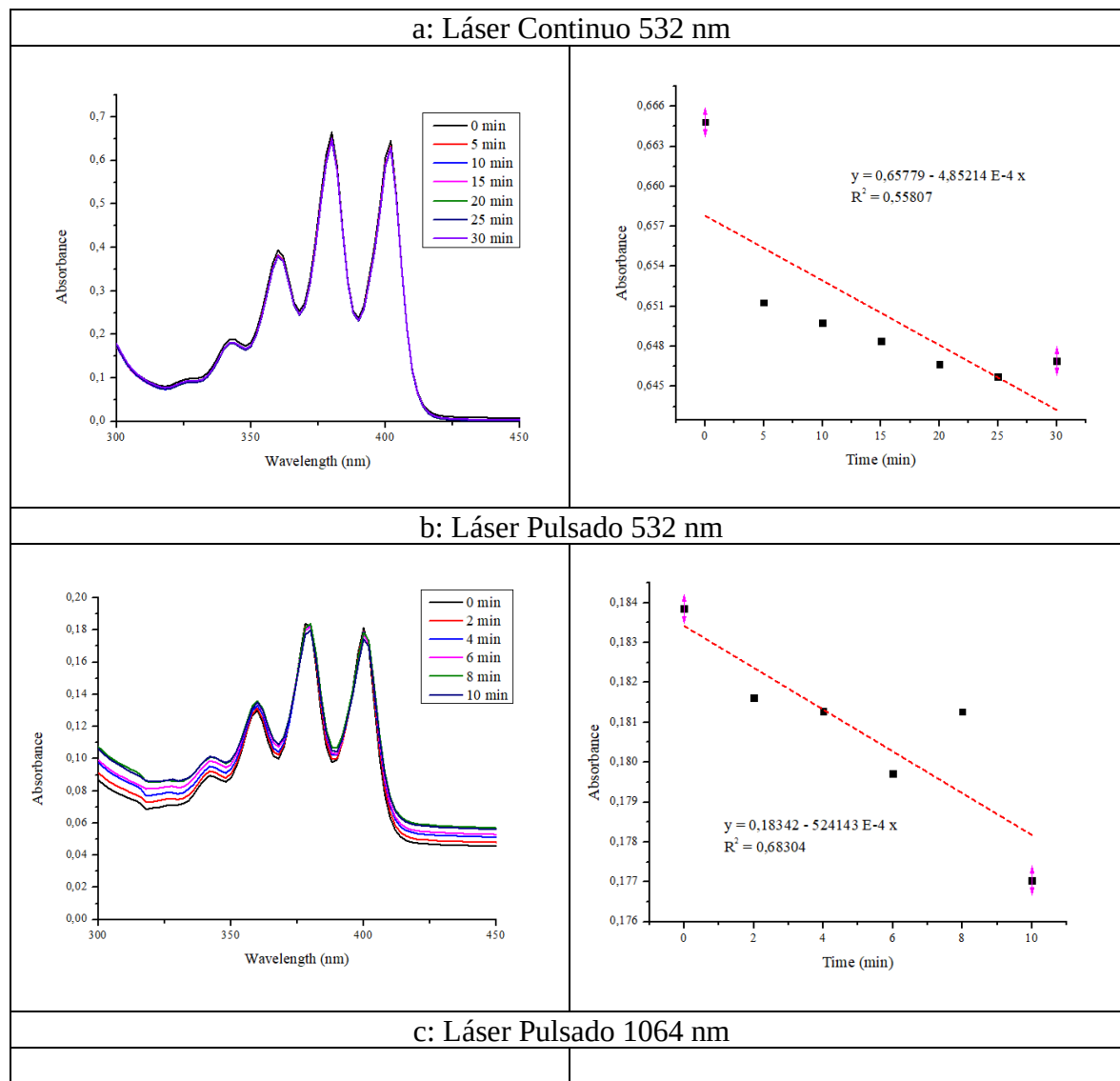
Las figuras muestran que no hay una variación significativa de la intensidad de la banda de 600 nm al irradiar al DCPIP con los tres láseres, a medida que aumentó el tiempo de irradiación. En la irradiación continua se observó una variación máxima (aumento) en la intensidad del 5%, en la pulsada a 532 nm (figura 13) una variación máxima (aumento) de 3.3 %, y en la pulsada a 1064 nm (figura 13) una variación máxima (disminución) de 7.1%. Estas pequeñas variaciones, sobre todo donde hay un aumento, han sido descritas previamente y se atribuye a las interacciones por puentes de hidrógeno establecidas entre el DCPIP y el disolvente (DWW), que pueden afectar al coeficiente de extinción molar del DCPIP (10).

Estos resultados eran esperados y coinciden con otros experimentos similares reportados anteriormente (10,13,18). Dado que en la muestra no hay un PS que pueda inducir la producción de radicales libres, no hay consumo o reacción con las moléculas de DCPIP y por tanto no disminuye la

intensidad de la banda. Este experimento demuestra que el DCPIP es adecuado como indicador, solo disminuirá su intensidad en presencia de ROS, cuando ocurre la reacción esquematizada en la figura 13.

ABMA

El comportamiento del ABMA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 14.



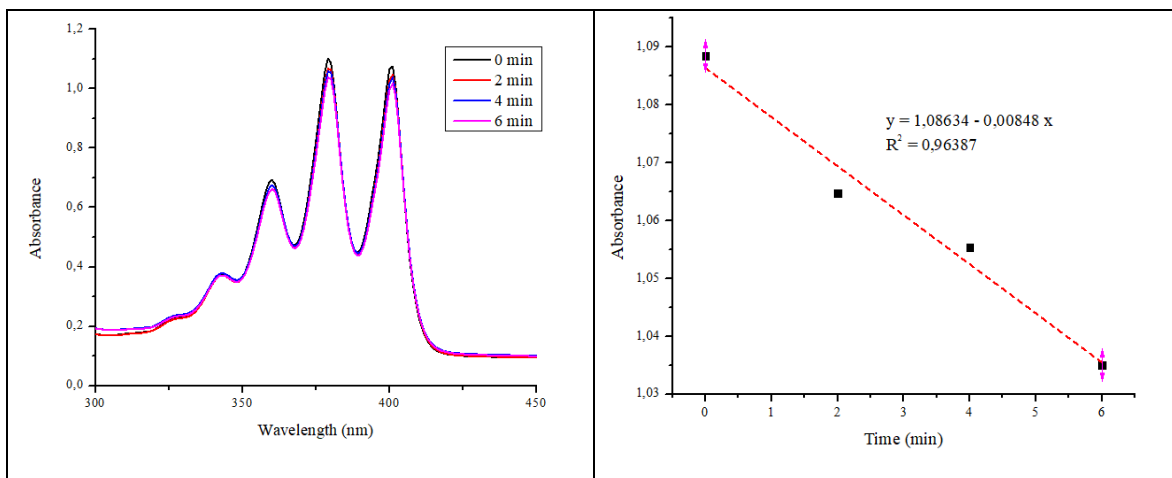


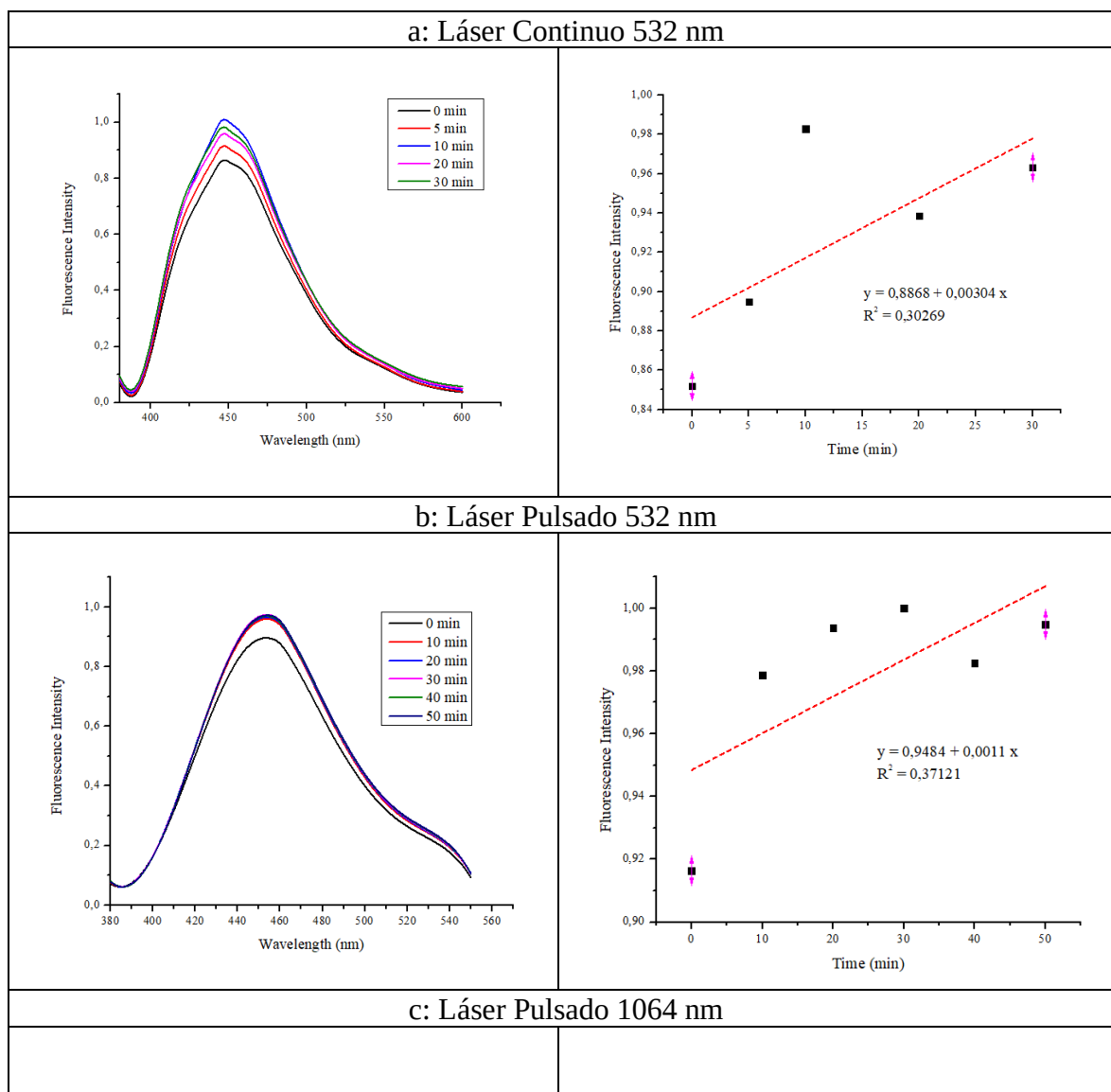
Figura 14. Espectro de absorción de la solución de ABMA y pendiente de pico de absorbancia ($\lambda = 378$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

En la figura 14 se pueden observar los espectros UV-Vis del ABMA a medida que aumentó el tiempo de irradiación. Cuando se irradia con el láser continuo a 532 nm (figura 14a) la máxima variación encontrada en la intensidad de la banda de 378 nm fue de 2.7%, con el láser pulsado a 532 nm (figura 14b) la máxima variación encontrada fue de 3.8%, y con el láser pulsado a 1064 nm (figura 14c) esta fue de 4.8%. Estas variaciones son todas menores al 5%, y por tanto consideradas no significativas.

Estos resultados eran previsibles y concuerdan con otros experimentos similares reportados previamente. (10,13,18). Dado que en la muestra no hay un PS que pueda inducir la producción de oxígeno singlete, no hay consumo o reacción con las moléculas de ABMA y por tanto no disminuye la intensidad de la banda. Este experimento demuestra que el ABMA es adecuado como indicador, solo disminuirá su intensidad en presencia de oxígeno singlete, cuando ocurre la reacción esquematizada en la figura 14.

FA

El comportamiento del FA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 15.



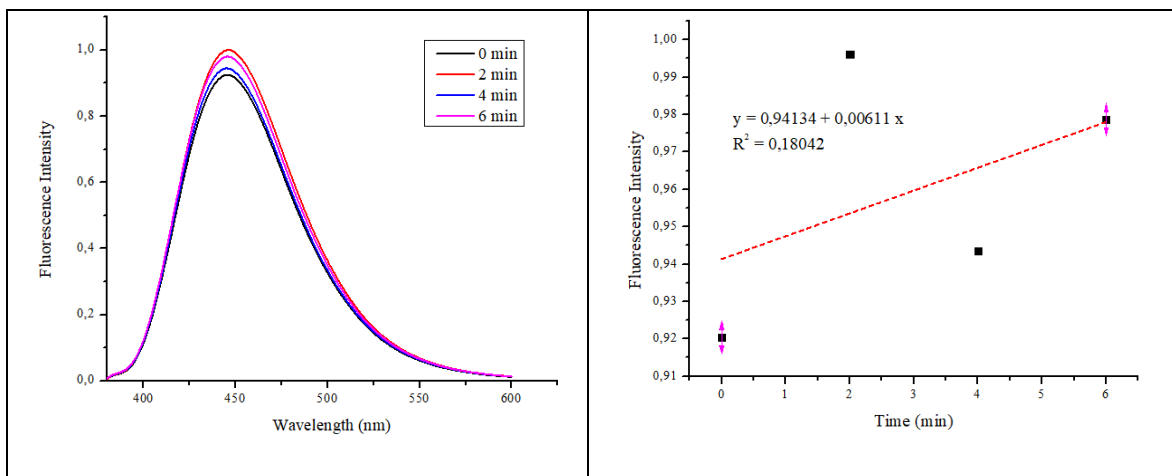


Figura 15. Espectro de intensidad de fluorescencia de la solución de FA y pendiente de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 450 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

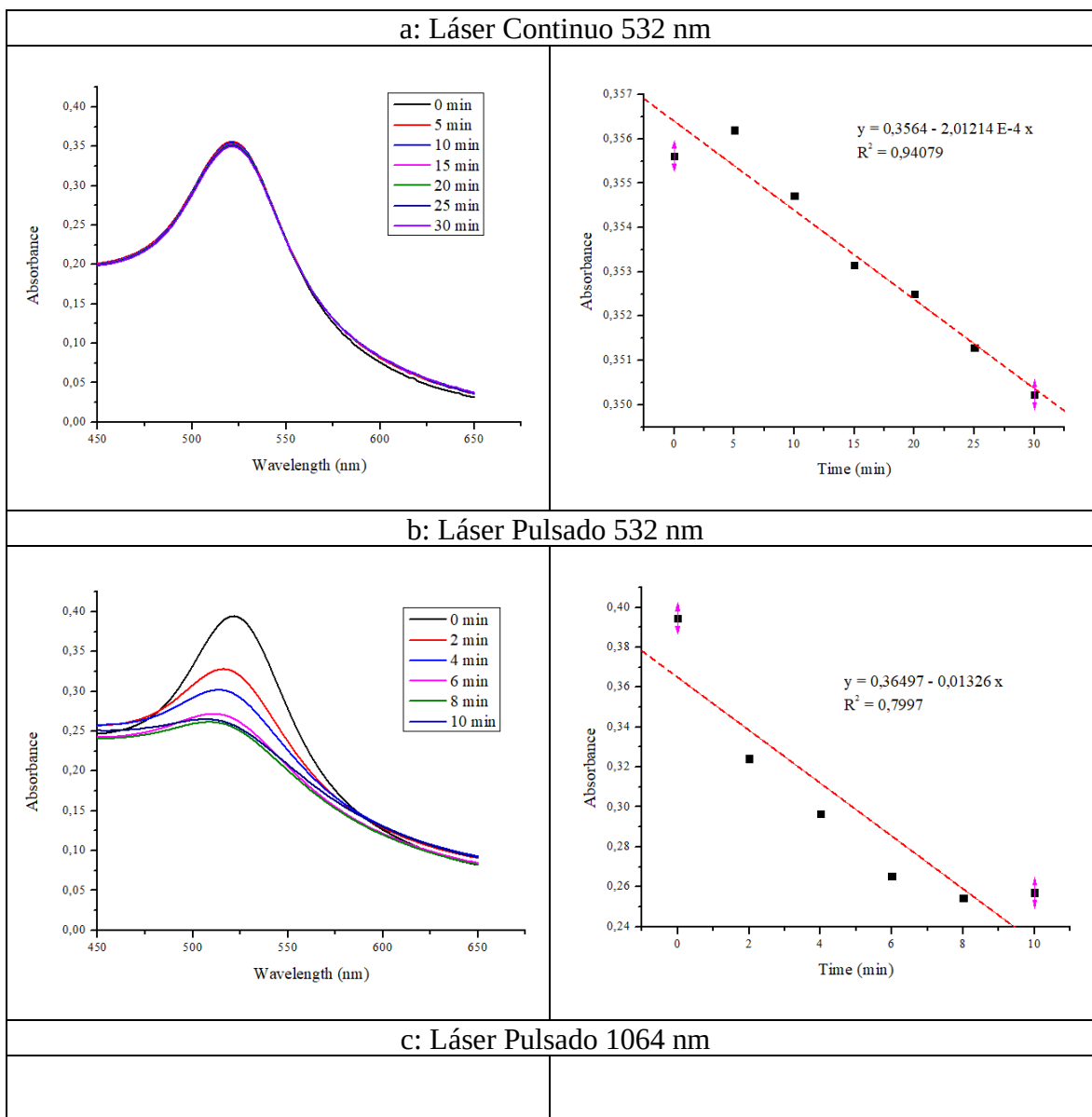
La irradiación del FA con los tres láseres provocó un pequeño aumento en la señal de fluorescencia, aunque la variación tiene una tendencia a la oscilación. Esta variación fue del 14% con el láser continuo, del 4% con el pulsado a 532 nm y del 7.5% con el pulsado de 1064 nm. En el caso de la irradiación del FA con los láseres pulsados, las variaciones obtenidas están dentro del rango de otros experimentos realizados anteriormente, aunque no reportados.

La oscilación en la intensidad de la fluorescencia sugiere la ocurrencia de procesos de fotodisociación. De hecho, está reportada la fotodisociación del ácido fólico, aunque en presencia de luz ultravioleta (55,56). Sin embargo, la energía del láser, intensidad, tiempo de irradiación, etc, pudiera romper enlaces químicos en el FA, produciendo la disociación de sus componentes, lo que explicaría la tendencia al incremento de la fluorescencia con el aumento del tiempo de irradiación. En cualquier caso, el incremento de la señal es menor al 15%. Por tanto, cualquier incremento mayor a ese valor que se registre en una muestra que contenga un PS y se irradie en las mismas condiciones a las utilizadas en la figura 15, se puede asociar a la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I, donde el FA es el sustrato. La reacción ocurriría debido a la excitación del PS presente en la muestra, como se representa en la Figura 15.

5.3 Irradiaciones individuales de los componentes fotosensibles de la mezcla (AuNP y R6G), y de la mezcla (AuNP/R6G) utilizando los tres láseres

AuNP

El comportamiento de las AuNP frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 16.



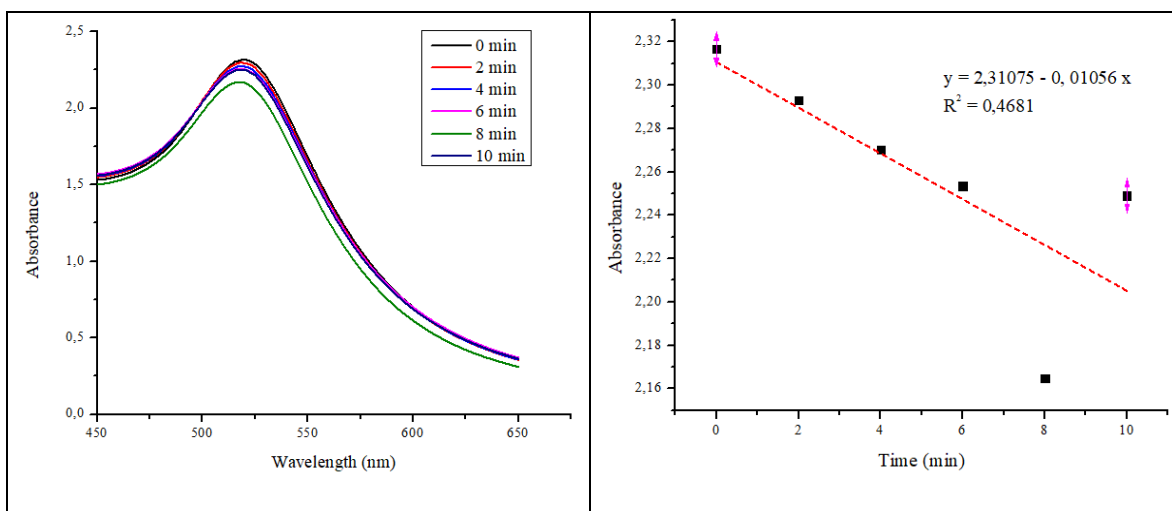


Figura 16. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP y pendiente de pico de absorbancia ($\lambda = 524 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Las pendientes de las tres curvas indican que hay una degradación en la intensidad del plasmón, pero esta es insignificante (10^{-4}) en el caso del láser continuo. La rapidez de degradación de la intensidad del LSPR con el láser pulsado a 532 nm es ligeramente mayor (0.01326) que con el pulsado a 1064 nm (0.01056), lo cual es esperado ya que el primero tiene la longitud de onda muy cercana a la LSPR y el segundo depende de que haya una absorción multifotónica, la cual ocurre con menor probabilidad.

Con el láser continuo de 532 nm (figura 16a), la posición y la intensidad del LSPR no se vieron afectadas por la irradiación, por lo tanto, su estructura tampoco fue modificada a diferencia de lo reportado cuando las AuNP se irradiaron a 532 nm, pero con un láser pulsado (13).

Esto es debido a que las AuNP cuando interactúan con el láser continuo solo aumenta la temperatura de estas. Los resultados anteriores concuerdan con Carasco et al., 2020 (57), quienes informaron que las AuNP son más fotoestables y tienen resistencia a la oxidación que los PS.

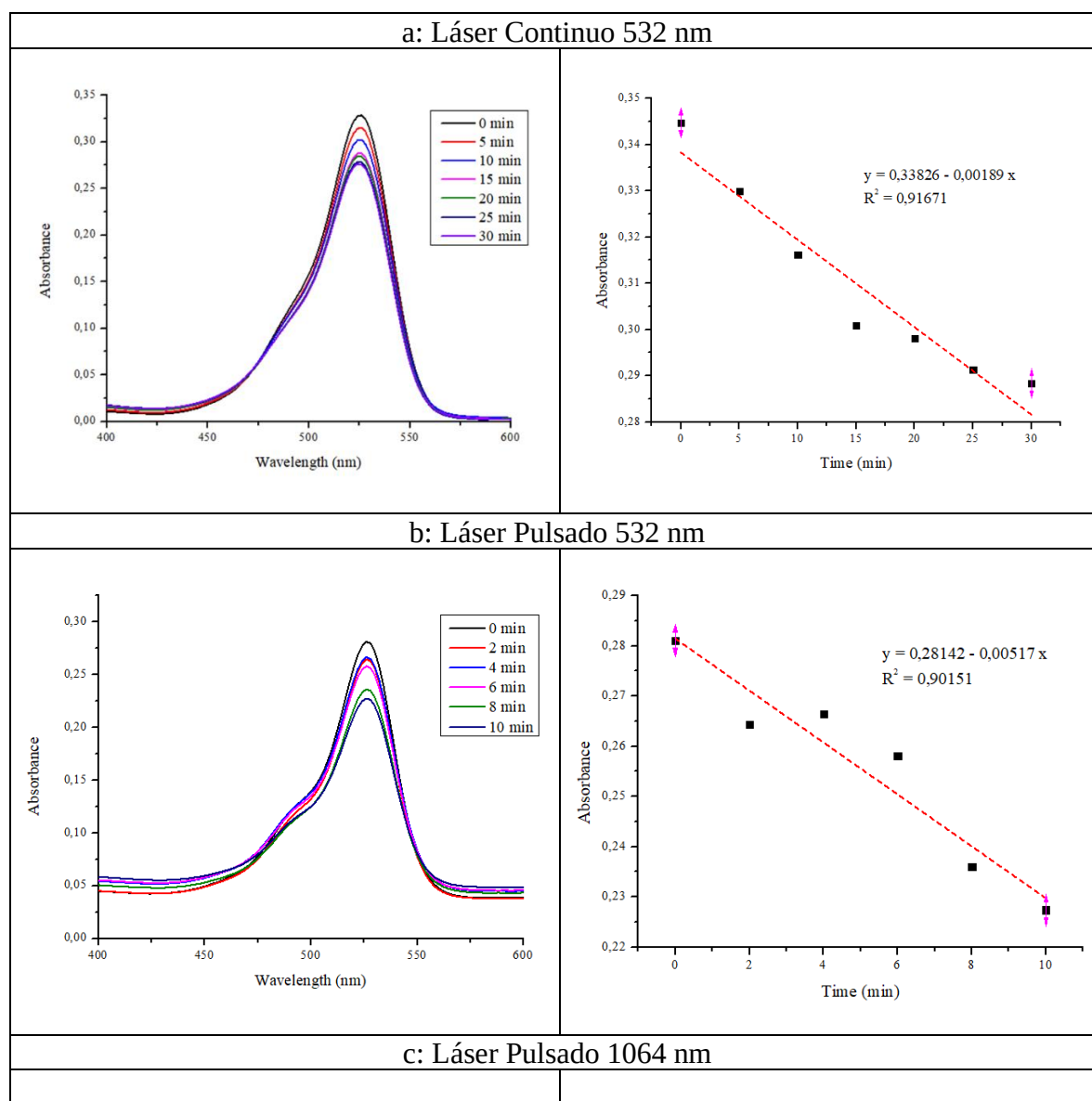
Con el láser pulsado de 532 nm, la $\lambda_{\text{máx}}$ de las AuNP experimentó corrimiento hipocrómico y una disminución de intensidad del 33% durante los 10 min de irradiación (figura 16b). Esto indica una disminución del tamaño inicial, cambio de forma y fragmentación producidos por la cavitación y la ablación que produce un láser pulsado. El cambio de tamaño y forma de las AuNP altera sus propiedades ópticas y electrónicas. Este resultado concuerda con lo anteriormente reportado por Cruz-Rodríguez et al para AuNP de 5 nm (13).

Con el láser pulsado de 1064 nm (figura 16c) se observó una disminución en la $\lambda_{\text{máx}}$ de 18.7% en los primeros 6 minutos, seguido de una disminución del 38% en los siguientes 2 minutos y un aumento

del 38% en los últimos minutos, sugiriendo que llegó a la saturación y en vez de seguir fragmentándose se empezaron a aglomerar. La fragmentación de las AuNP bajo estas condiciones de irradiación coincide una vez más con lo anteriormente reportado por Cruz-Rodríguez et al para AuNP de 5 nm (13).

R6G

El comportamiento de la R6G frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 17.



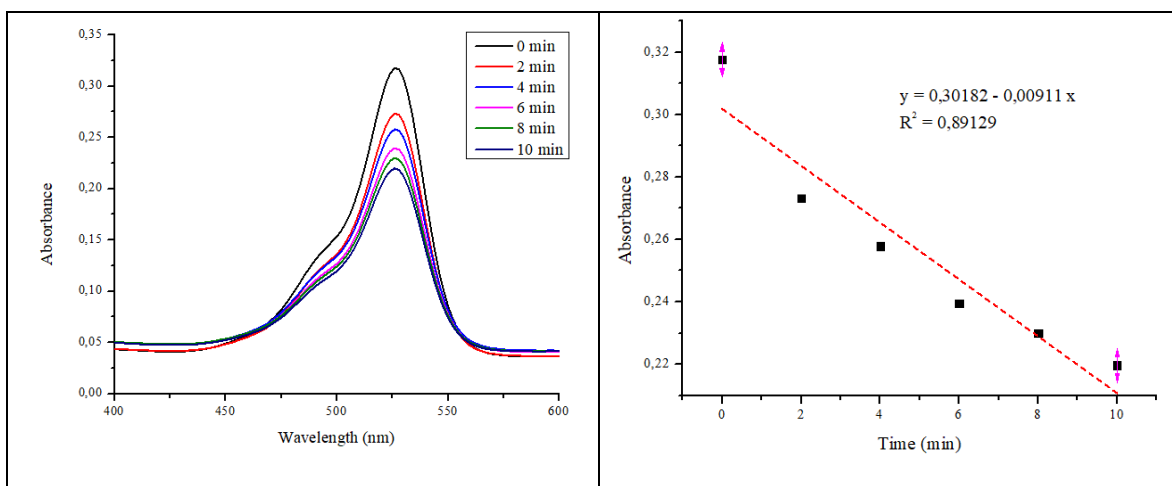


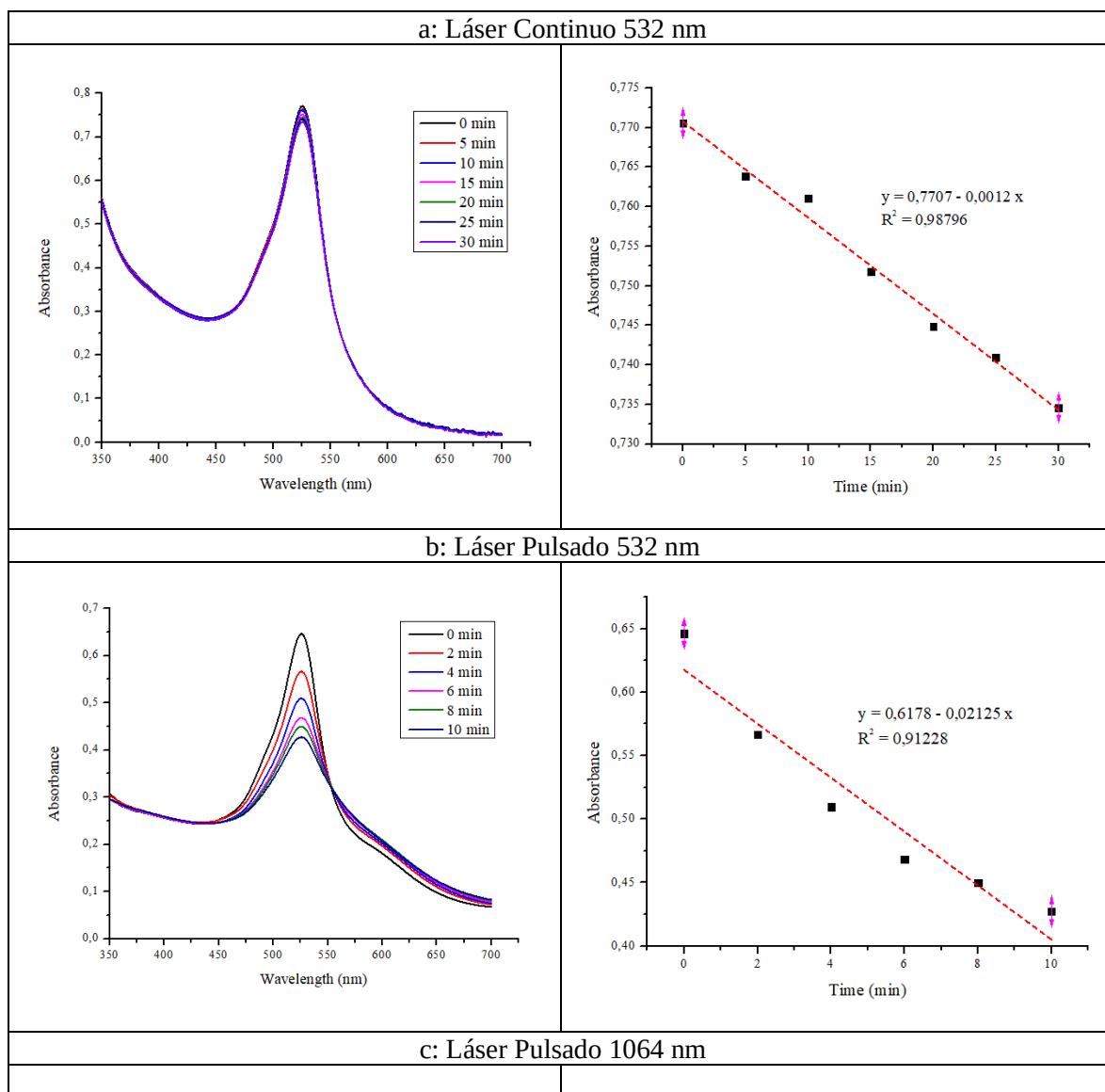
Figura 17. Espectro de absorción de la solución de R6G y pendiente de pico de absorbancia ($\lambda = 525 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

La disminución del máximo de absorción de R6G (525 nm) a medida que aumenta el tiempo de irradiación se evidenció con los tres láseres. Esto indica que en los tres casos hubo un proceso de fotodegradación, probablemente asociado a la producción de oxígeno singlete (10). O sea, la R6G al excitarse produce reacción de transferencia de energía (tipo II), produce el oxígeno singlete que a su vez reacciona con la propia R6G oxidándola a un nuevo compuesto y “consumiendo” las moléculas presentes, lo que provoca la disminución en la intensidad de su máximo de absorción. Este comportamiento también se encuentra cuando la doxorrubicina se irradia con luz láser continua de 450 nm (18).

La rapidez de fotodegradación de la R6G se indica en las pendientes de las curvas de la Figura 17. Bajo las condiciones de irradiación utilizadas, el láser continuo produjo una fotodegradación del 17.4% (figura 17a), el pulsado de 532 nm produjo un 19.6% (figura 17b), y el pulsado de 1064 nm un 30% (figura 17c). Los resultados obtenidos con el láser pulsado de 532 nm son consistentes a los previamente reportados (10), y los obtenidos con el pulsado a 1064 nm consistentes con otros resultados obtenidos previamente en el laboratorio, aunque no publicados. La interacción de la R6G con el láser continuo y pulsado de 532 nm se debe a la cercanía de la longitud de onda del láser con la longitud de absorción del PS (525 nm). En el caso del láser de 1064 nm, esta interacción fue multifotónica.

AuNP/R6G

El comportamiento de la R6G frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 18.



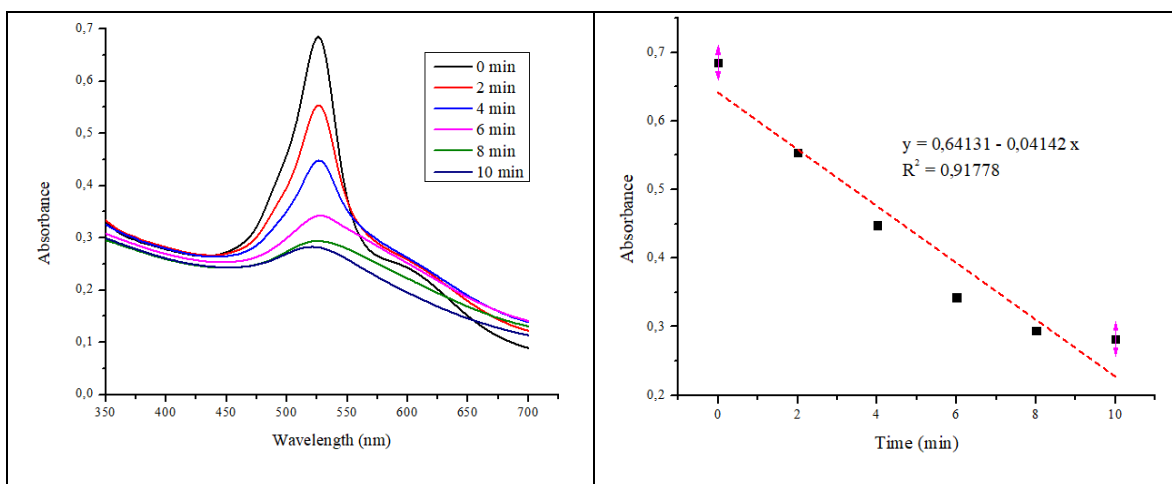


Figura 18. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/R6G y pendiente de pico de absorbancia ($\lambda = 525 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Dado que el máximo de absorción de R6G es de 525 nm y el LSPR de AuNP de 524 nm, los espectros muestran una sola banda. En los tres casos, la suspensión AuNP/R6G tienen el mismo comportamiento que el visto en la figura 17, la cual muestra decoloración de la R6G, sugiriendo la producción de oxígeno singlete en la irradiación con los tres láseres. Sin embargo, la decoloración de la mezcla con el láser continuo (16.4%) (figura 18a) es menor que la decoloración de R6G sola (17.4%), lo que indica una menor producción de reacciones de transferencia en la mezcla. Esto puede explicarse debido a que en la mezcla los fotones de luz se “reparten” para interactuar con la R6G y con las AuNP, cosa que no ocurre con la irradiación de la R6G individual.

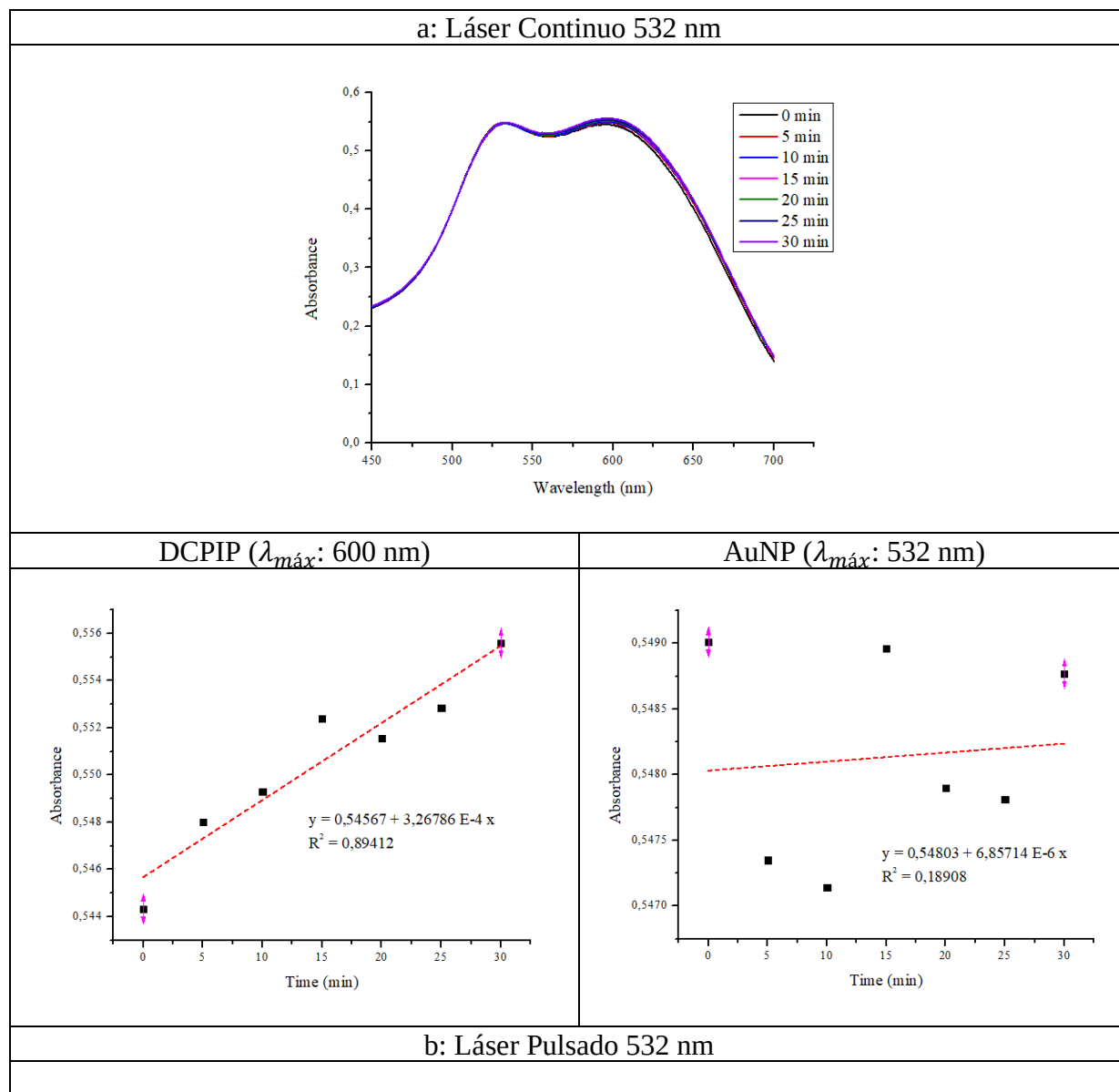
La irradiación de la mezcla AuNP/R6G con los láseres pulsados, por el contrario, mostraron una disminución de la $\lambda_{m\acute{a}x}$ del 35.4% (figura 18b) con el de 532 nm, y del 58.8% (figura 18c) con el de 1064 nm. Estos valores de degradación son mayores a los registrados cuando se irradió la R6G sola (Figura 17), que fueron 19.6% para 532 nm y 30% para 1064 nm. Ese comportamiento se explica teniendo en cuenta que en la mezcla AuNP/R6G hay AuNP que se fragmentan durante la irradiación pulsada, como ya se mostró en la figura 18 y reportó Cruz-Rodríguez y col (13). Por tanto, la disminución de la intensidad del máximo de absorción de la mezcla no se debe solo a la fotodegradación de la R6G, sino también a la fragmentación que sufren las AuNP.

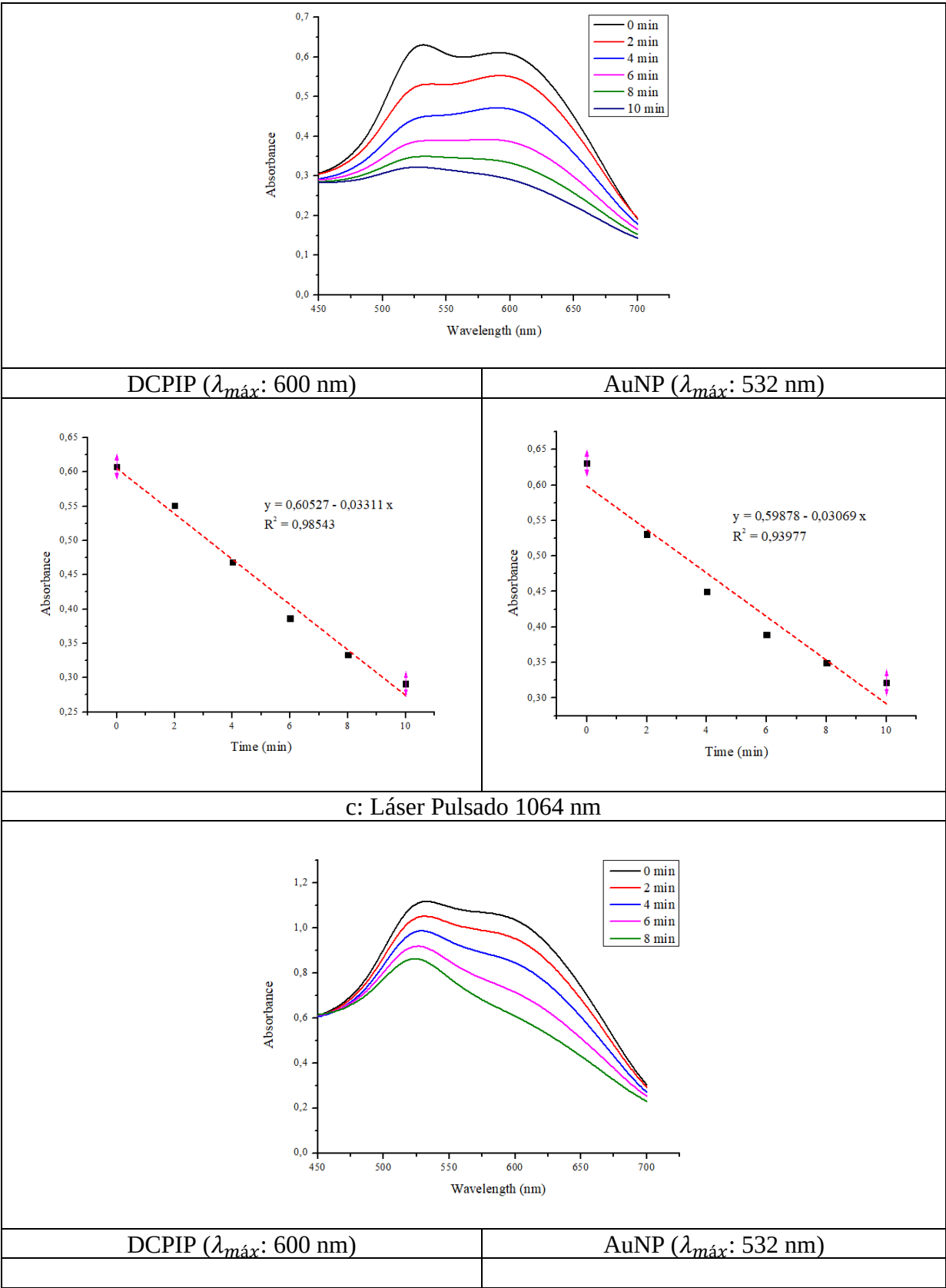
No es posible tampoco considerar que la fotodegradación de la mezcla es la suma algebraica de la fotodegradación de sus componentes; pues tal como se explicó anteriormente, en la mezcla los fotones deben compartirse o “dividirse” entre los que interactúan con las AuNP y las que interactúan con la R6G. La intensidad de la luz que incide sobre cada componente de la mezcla es menor que la que incide en la irradiación individual de cada componente de esta.

5.4 Irradiaciones de las AuNP en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres

AuNP + DCPIP

El comportamiento de las AuNP en presencia del indicador DCPIP frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 19.





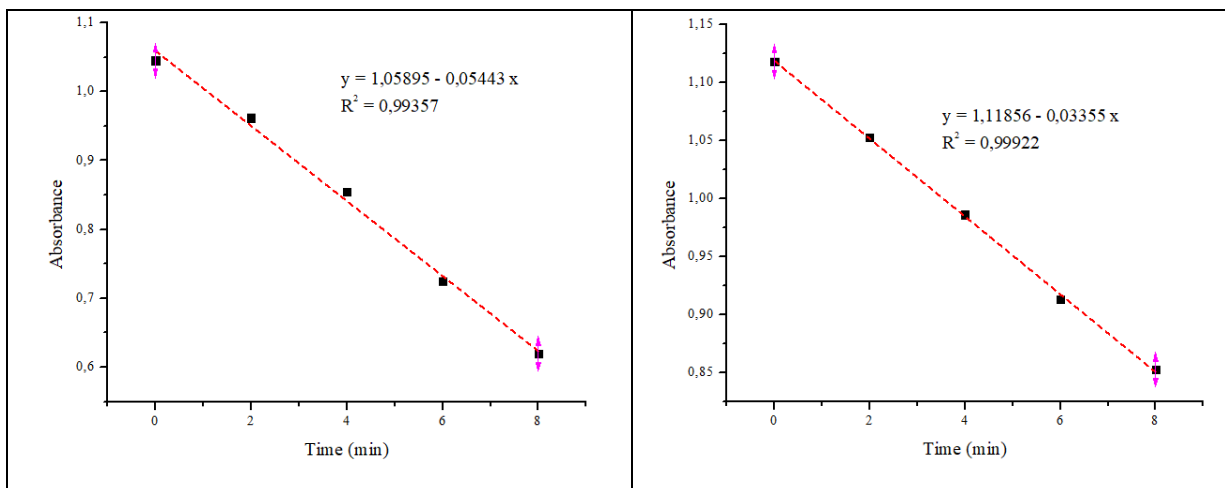


Figura 10. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 532 \text{ nm}$) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 600 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Con la irradiación con el láser continuo 532 nm (figura 19a) no se observó producción de especies radicales con un electrón desapareado, como el radical hidroxilo o el ion radical superóxido, ya que no hubo decoloración de DCPIP durante toda la irradiación. La variación máxima en las intensidades del DCPIP fue del 2%, pero no fue una disminución, sino un aumento. Este comportamiento se había registrado en la irradiación individual del DCPIP. La AuNP tuvo una variación máxima del 1% y está fue oscilante. No hay evidencia ni de la producción de ROS ni de fragmentación de la AuNP bajo esta irradiación.

Cuando se irradió, sin embargo, con los láseres pulsado de 532 nm (figura 19b) y 1064 nm (figura 19c) hubo evidencia de producción de ROS o especies reductoras. En ambos casos hubo disminución significativa de la intensidad del DCPIP (a 600 nm) del 50% (con 532 nm) y del 43% (con 1064 nm) de manera proporcional al tiempo de irradiación. Las AuNP fueron modificadas igualmente durante todo el tiempo de irradiación mostrando una disminución en su $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 51% (con 532 nm) y 24% (con 1064 nm), indicando fragmentación. Estos resultados indican que durante la irradiación de las AuNP con los láseres pulsados hay producción de ROS o especies reductoras, efecto que no se observa en la irradiación con luz continua.

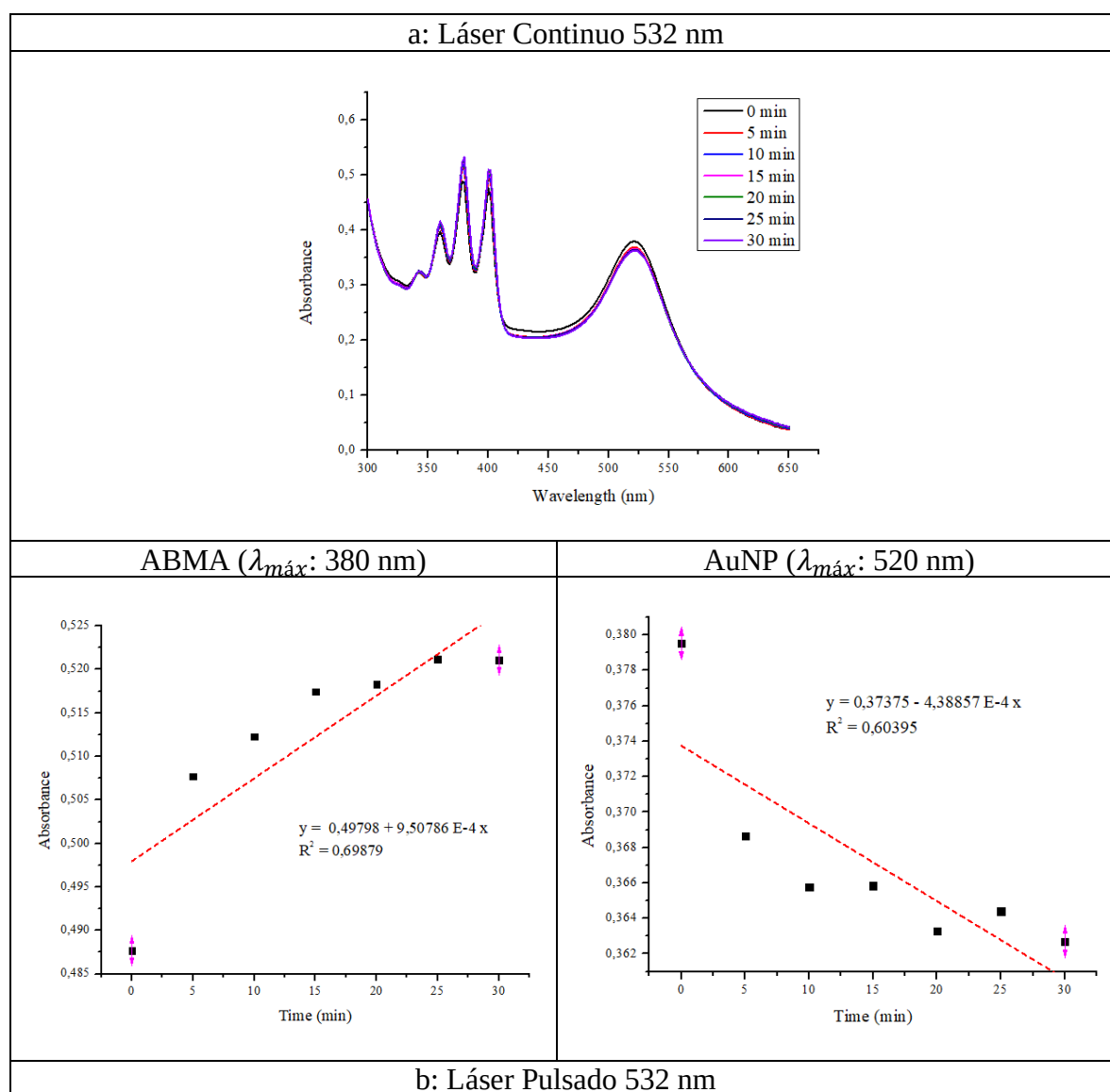
Esta formación de ROS bajo irradiación pulsada había sido previamente reportada (13), y se confirma en este trabajo. Las AuNP no son fluoróforos (no tienen rendimiento cuántico), y su interacción con la luz pulsada produce fragmentación. Lo más probable es que en el proceso de fragmentación se liberen electrones que pueden ser aceptado por moléculas de oxígeno produciendo el ion radical

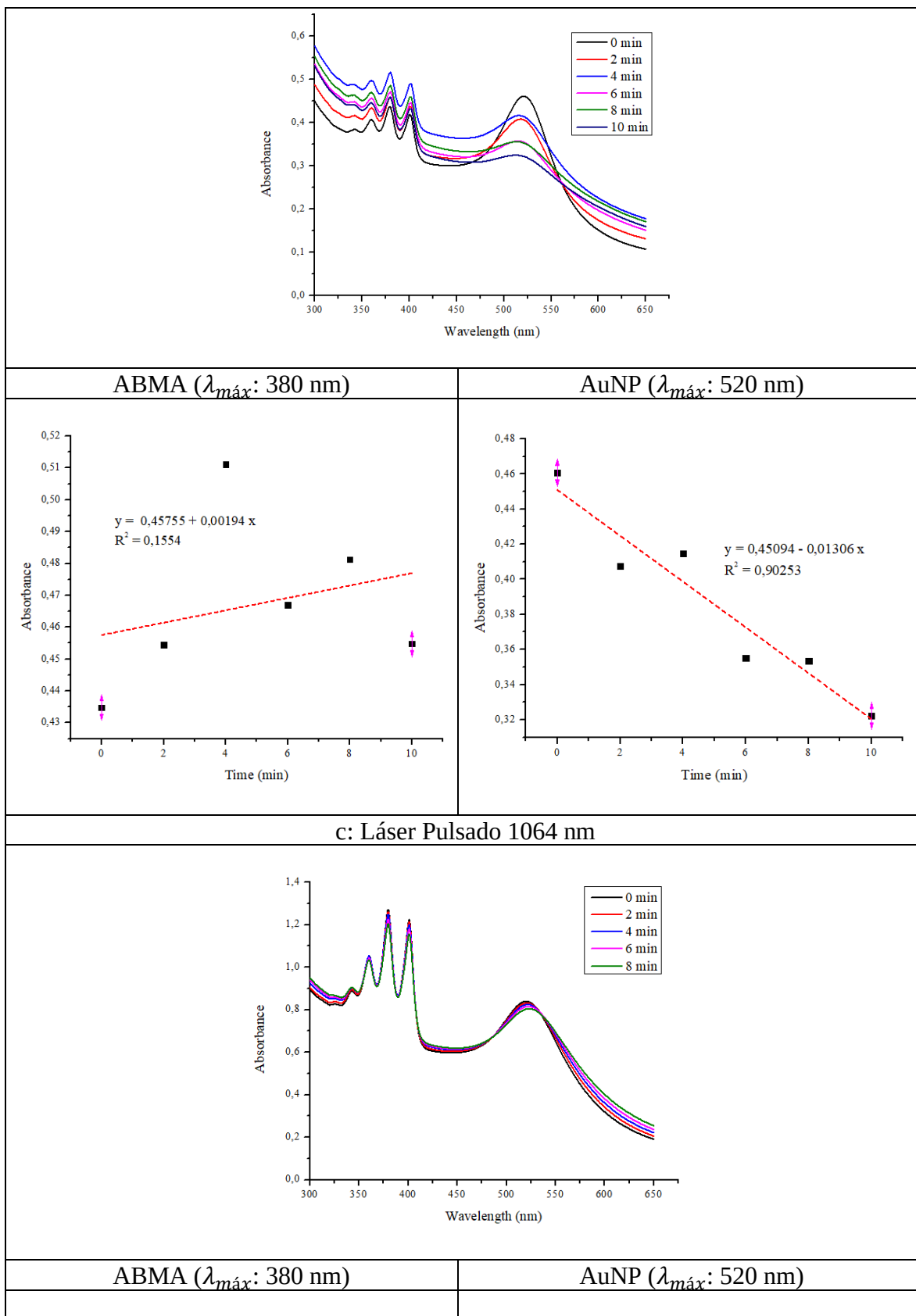
superóxido o hidroxilo (ROS), o directamente estos electrones son los responsables de reducir al DCPIP.

Los resultados indican que la irradiación de las AuNP de 5 nm produce especies reactivas de oxígeno (radicales) o especies reductoras cuando se irradian con luz pulsada.

AuNP + ABMA

El comportamiento de las AuNP en presencia del indicador ABMA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 20.





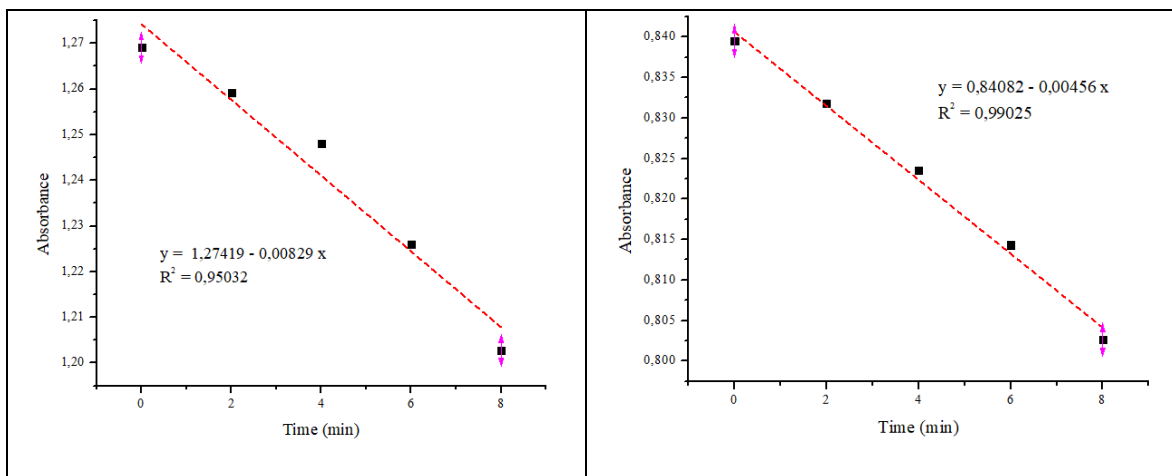


Figura 11. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + ABMA, pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 520$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

La irradiación con el láser continuo 532 nm (figura 20a) no indicó producción de oxígeno singlete, ya que no hubo decoloración del ABMA durante toda la irradiación. La variación máxima en las intensidades del ABMA (a 380 nm) fue del 6.4%, pero el efecto fue hipercrómico, contrario a lo que ocurre si hubiera habido producción del oxígeno singlete. Las AuNP mostraron una disminución en su LSPR de un 4.4% el cual se consideró no significativo.

La irradiación con el láser pulsado de 532 nm (figura 20b) no indicó producción de oxígeno singlete durante la irradiación de las AuNP. El comportamiento del ABMA fue errático, oscilante, no hubo una disminución proporcional en la señal de este proporcional con el tiempo de irradiación. Este resultado difiere del reportado por Cruz-Rodríguez y col (13) quienes sí registraron una disminución en la intensidad del ABMA. Es importante puntualizar que Cruz-Rodríguez utilizó AuNP de 5 nm y no de 20 nm, que son las utilizadas en este caso. Es posible que el tamaño de la AuNP sea la explicación en la diferencia entre estos resultados. Las AuNP, por su parte, mostraron una disminución significativa del 28% en el LSPR durante el tiempo de irradiación, congruente con el proceso de fragmentación anteriormente mencionado, más no involucrado en la formación de oxígeno singlete.

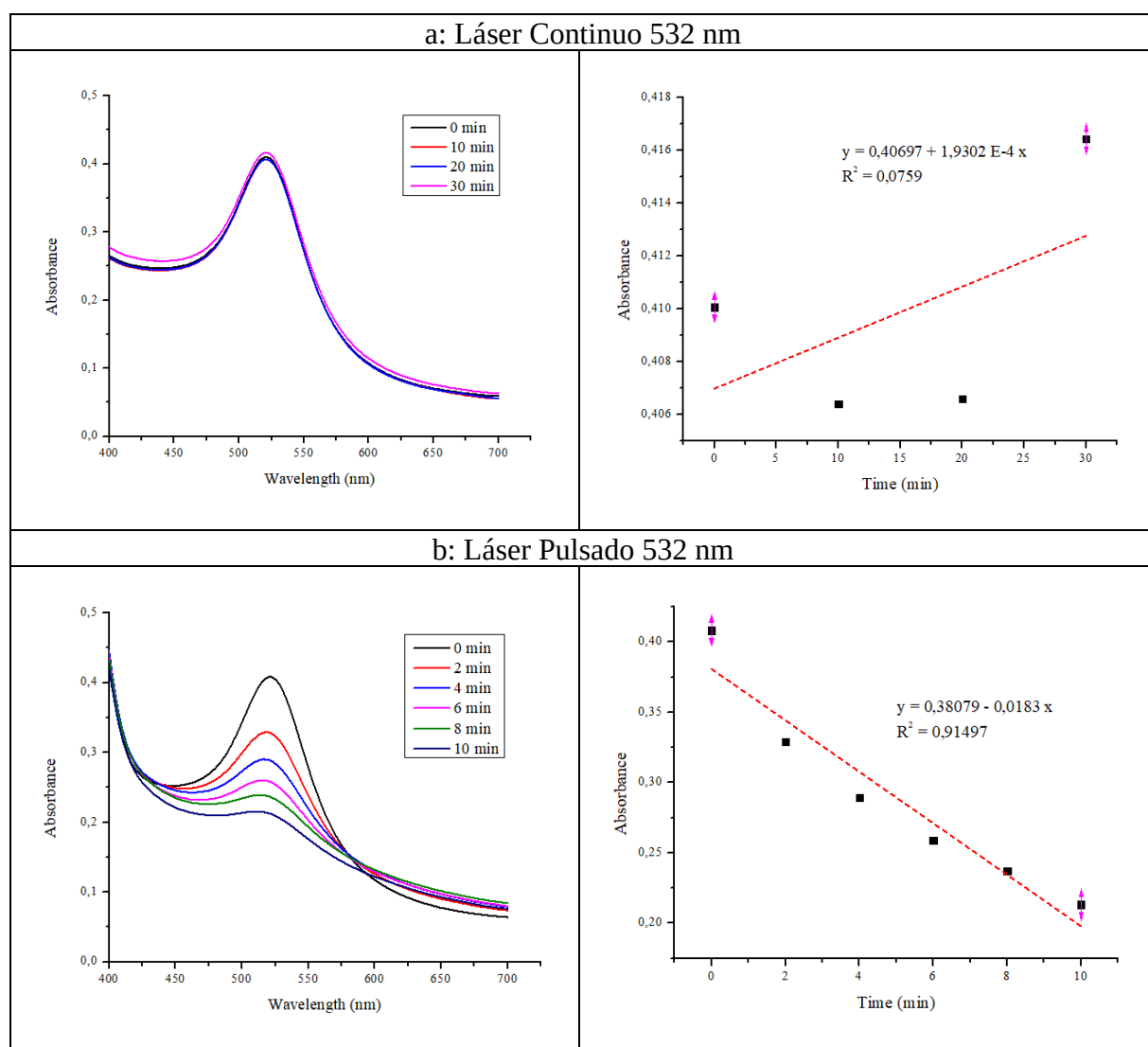
Al irradiar con el láser pulsado de 1064 nm (figura 20c), se registró una disminución poco significativa pero proporcional al tiempo de irradiación en la intensidad del ABMA (a 380 nm). Esta disminución fue solo del 5%, pero fue siempre disminuyendo la señal, no fue un comportamiento errático ni oscilante como en el caso del láser continuo o pulsado, lo que sugiere producción de oxígeno singlete. Este resultado pareciera estar en concordancia con Chadwick y col. (58), quienes reportaron una mayor producción de oxígeno singlete al irradiar AuNP con luz pulsada en

comparación con luz continua. Sin embargo, dado que la variación registrada no difiere de la observada al irradiar el ABMA solo, no es posible concluir en este trabajo que hay producción de esta ROS. Las AuNP por otra parte, registraron una disminución del LSPR del 4.7% y un corrimiento batocrómico, consistente con un proceso de agregación en lugar de fragmentación.

Los resultados indican que la irradiación de las AuNP de 20 nm no produce la especie oxígeno singlete con ninguno de los tres láseres utilizados.

AuNP + FA analizados por UV-Vis

El comportamiento de las AuNP en presencia del sustrato FA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados y analizado por UV-Vis se muestra en la figura 21.



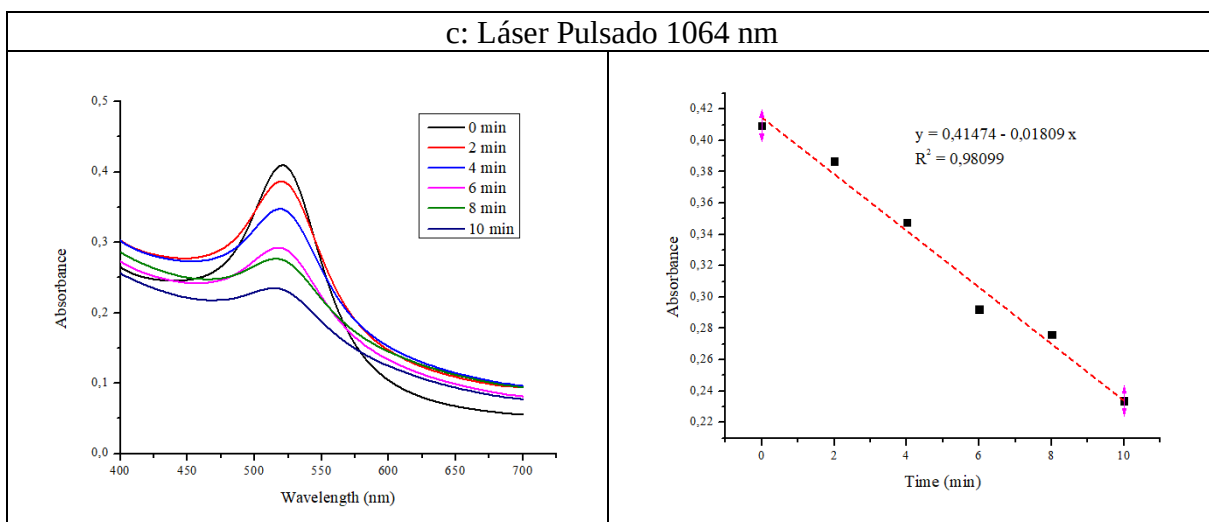


Figura 12. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP + FA y pendiente de pico de absorbancia de AuNP ($\lambda = 520$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

El comportamiento del LSPR de las AuNP del sistema AuNP/FA, mostró que bajo irradiación con el láser continuo la intensidad de esta banda osciló y esta oscilación que no fue significativa; la misma se puede atribuir a cambios en la temperatura alrededor de la AuNP. Este resultado es consistente con los mostrados anteriormente donde la irradiación continua a 532 nm de las AuNP no induce cambios en sus propiedades ópticas.

La irradiación con el láser pulsado de 532 nm (figura 21b) mostró una disminución del 47.5% en el LSPR y un corrimiento a menores longitudes de onda proporcional al tiempo de irradiación. Lo anterior indica una disminución en el tamaño de las AuNP. Además, muestra un aplanamiento en la banda LSPR durante todo el tiempo de irradiación que puede atribuirse efectos térmicos y a una reestructuración de la estructura de la AuNP. El aplanamiento puede reflejar un cambio en la distribución de tamaños y formas de las AuNP, así como una mayor heterogeneidad en la muestra. La irradiación con el láser pulsado de 1064 nm (figura 21c) mostró una disminución en la intensidad del LSPR del 42.5%, sin embargo, a diferencia del pulsado con 532 nm (figura 21b) la LSPR no se aplanó a la misma velocidad.

AuNP + FA analizados por Fluorescencia

El comportamiento de las AuNP en presencia del sustrato FA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados y analizado por fluorescencia se muestra en la figura 22.

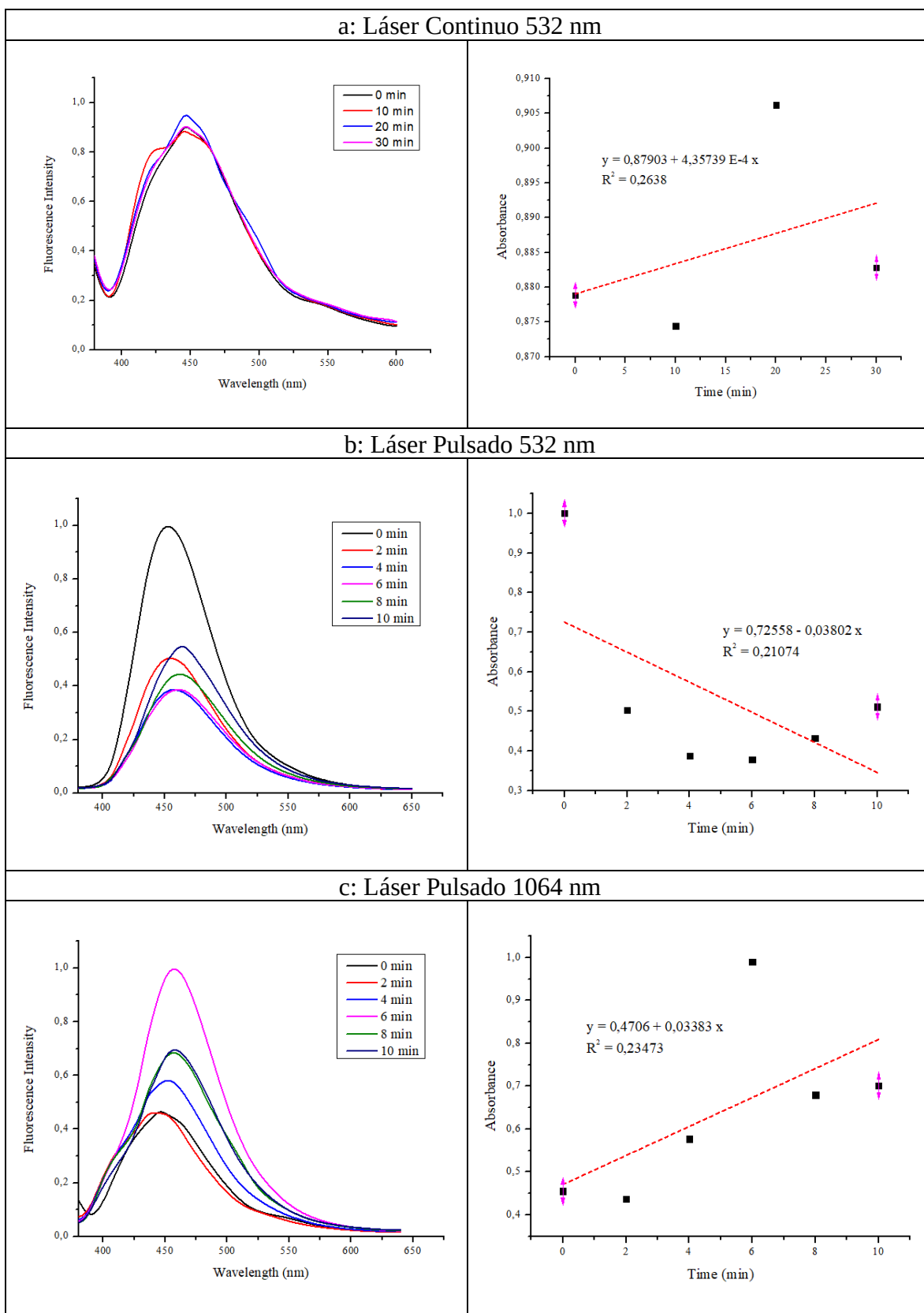


Figura 13. Espectro de intensidad de fluorescencia de la suspensión de AuNP + FA y pendiente de intensidad de

fluorescencia ($\lambda_{emi} = 455\text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

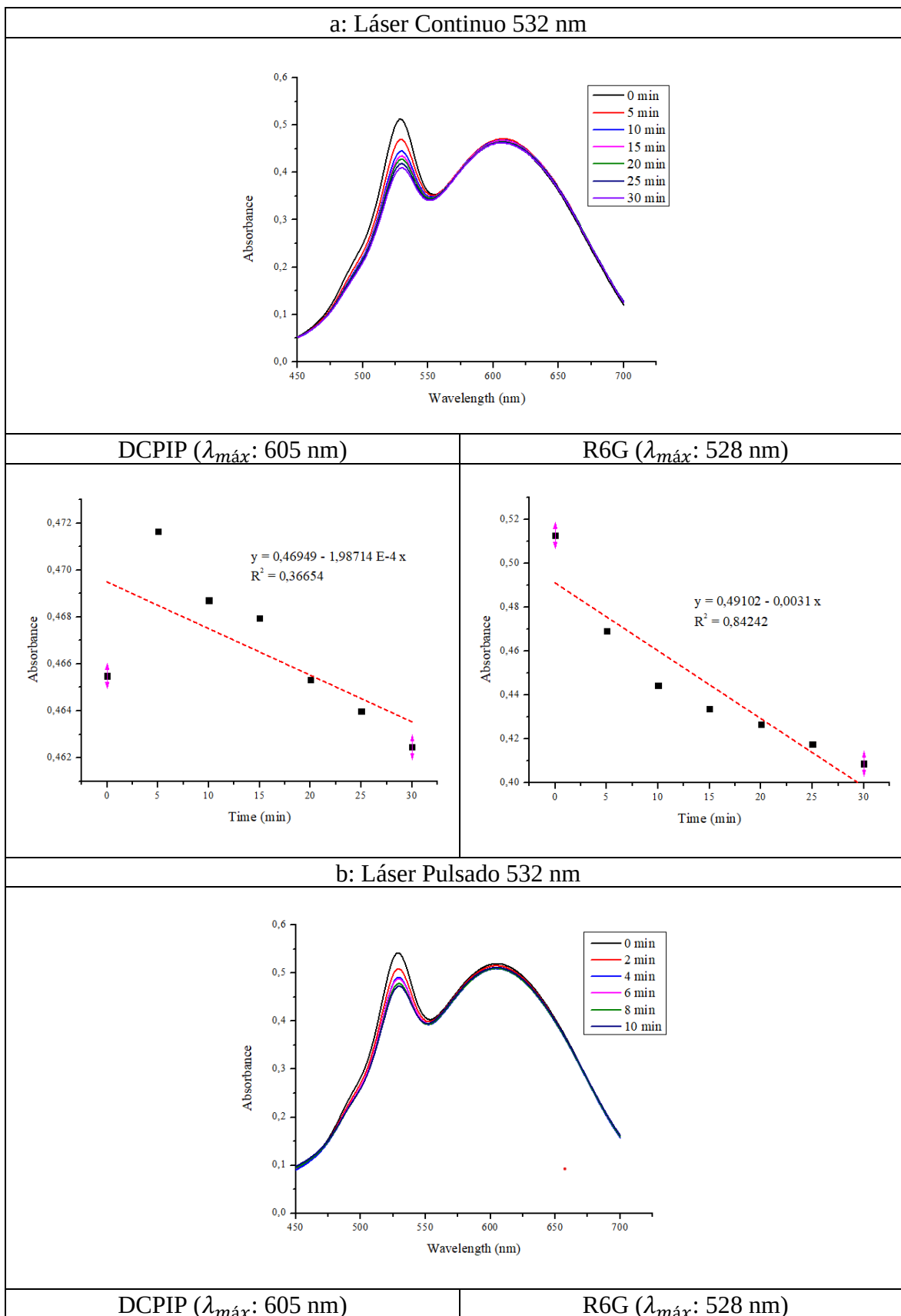
En la figura 22a se observa que no hay un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia del FA durante la irradiación con el láser continuo de 532 nm. La irradiación con el láser pulsado de 532 nm (figura 22b) mostró una disminución en la fluorescencia del FA del 63% en los primeros 6 min de irradiación, y en los 4 minutos posteriores se observó que la fluorescencia aumentó un 13%. Teniendo en cuenta que en la Figura 21b (AuNP/FA pulsado a 532 nm) se observa la disminución y aplanamiento del pico de absorción de la AuNP esto se le puede atribuir al cambio en la estructura de la AuNP. Estos resultados indican que no existen reacciones de transferencia electrónica entre la AuNP y el FA bajo irradiación continua y no son para nada concluyentes en el caso de la irradiación pulsada a 532 nm. Definitivamente durante los primeros 6 min de irradiación no hay ruptura del FA pues su fluorescencia no se incrementa, y después de ese tiempo pareciera que la fluorescencia comienza a incrementarse. De ser esto así pudiera ser debido a la fragmentación que sufre la AuNP y que se evidencia en la figura 21b. Dicha fragmentación pudiera liberar electrones que son los que pudieran escindir al FA y liberar al grupo pteridina, causante del incremento de la fluorescencia.

Cuando se irradió con el láser pulsado de 1064 nm (figura 22c) hubo un aumento en la fluorescencia del FA del 17.78% durante los primeros 6 minutos de irradiación, seguido de una oscilación. Esto sugiere el mismo comportamiento que con el láser pulsado de 532 nm pasados los primeros 6 minutos de irradiación. La irradiación produce cavitación, está a su vez produce fragmentación (evidenciada en la figura 21c) que produce a su vez transferencia de electrones al FA, y su posterior ruptura.

5.5 Irradiaciones de la R6G en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres

R6G + DCPIP

El comportamiento de la R6G en presencia del DCPIP frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 23.



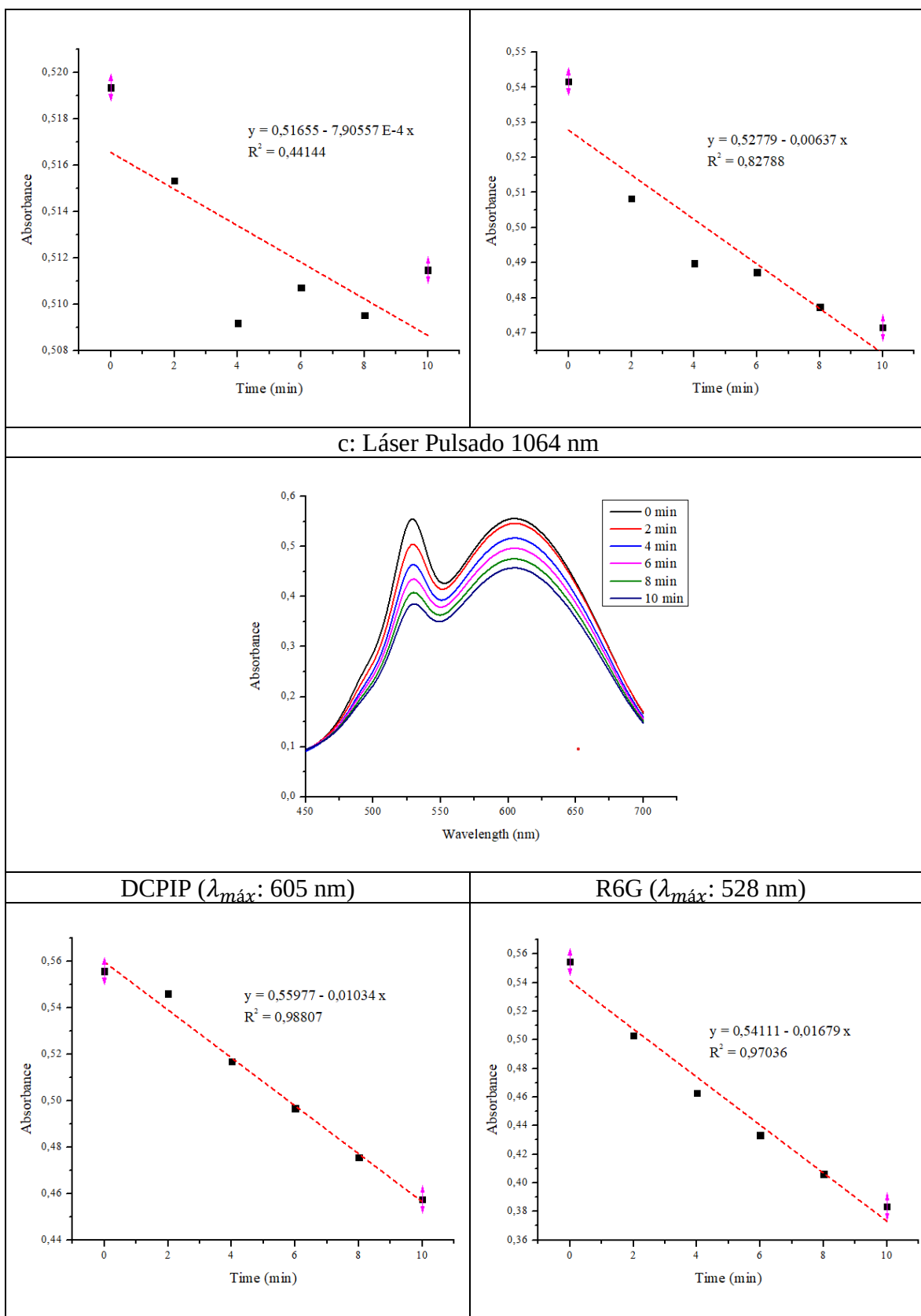


Figura 14. Espectro de absorción de la solución de R6G + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 528$

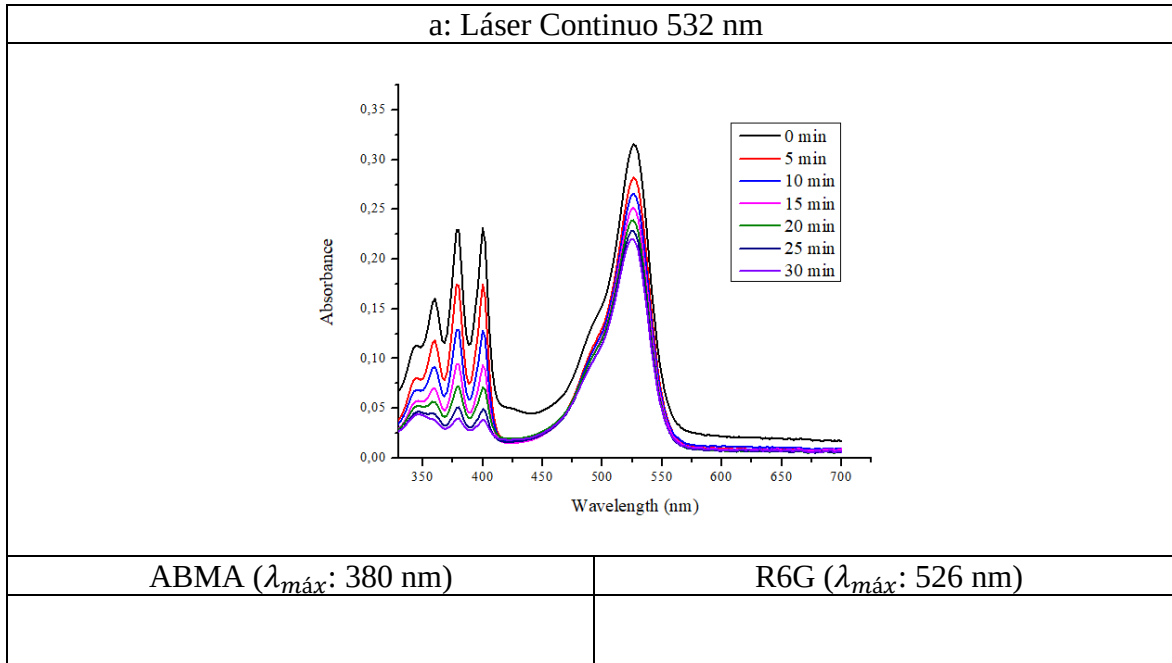
nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 605$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

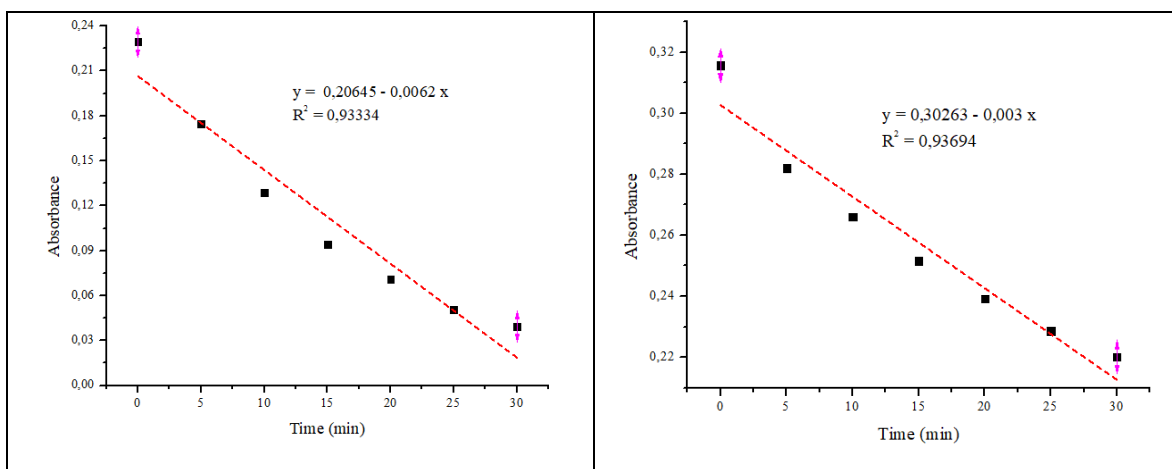
Tanto la irradiación con el láser continuo y con el pulsado de 532 nm muestran una tendencia a disminuir la banda de 600 nm del DCPIP, pero esta disminución es solo del 2%. Por tanto, no hay indicación de que se produzcan ROS ya que no hubo decoloración significativa del DCPIP. Este resultado con luz pulsada de 532 nm es consistente con estudios previos (10). Sin embargo, la decoloración del 21% de R6G (figura 23a) con el láser continuo de 532 nm y del 13% (figura 23b) con el láser pulsado de 532 nm sugiere la formación de oxígeno singlete.

Cuando la solución R6G/DCPIP se irradió con el láser pulsado de 1064 nm el DCPIP se decoloró un 18% indicando la ocurrencia de reacciones de transferencia con el oxígeno (figura 23c). También hubo fotodegradación de la R6G de 30% lo que indica producción de oxígeno singlete (10).

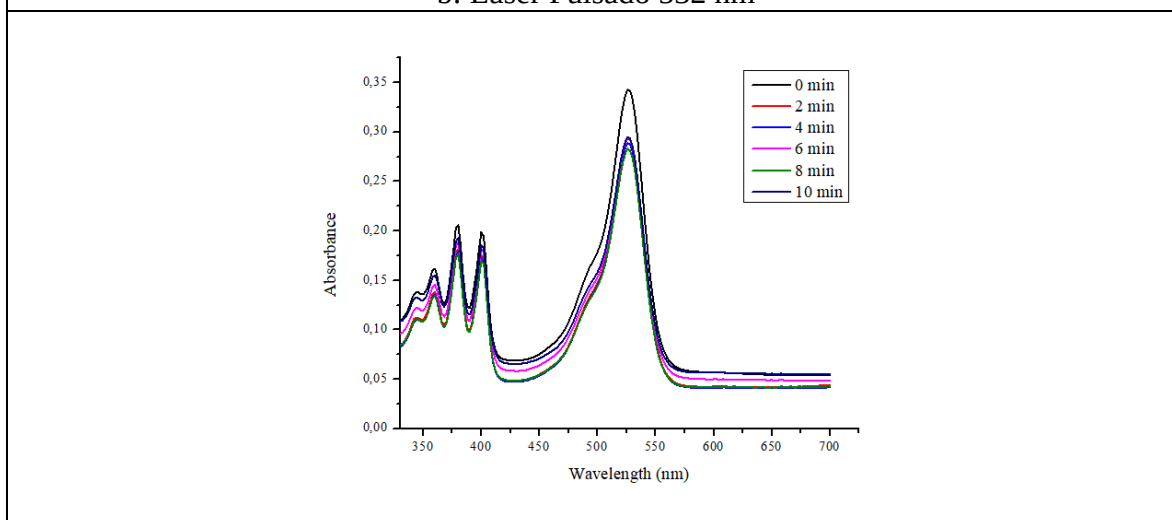
R6G + ABMA

El comportamiento de la R6G en presencia del ABMA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados se muestra en la figura 24.



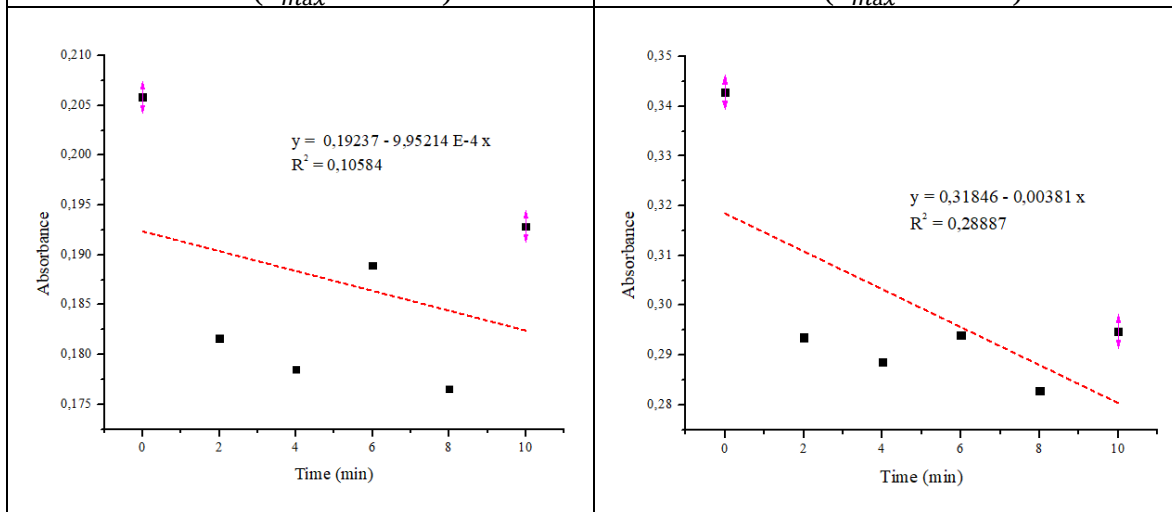


b: Láser Pulsado 532 nm



ABMA ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 380 nm)

R6G ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 526 nm)



c: Láser Pulsado 1064 nm

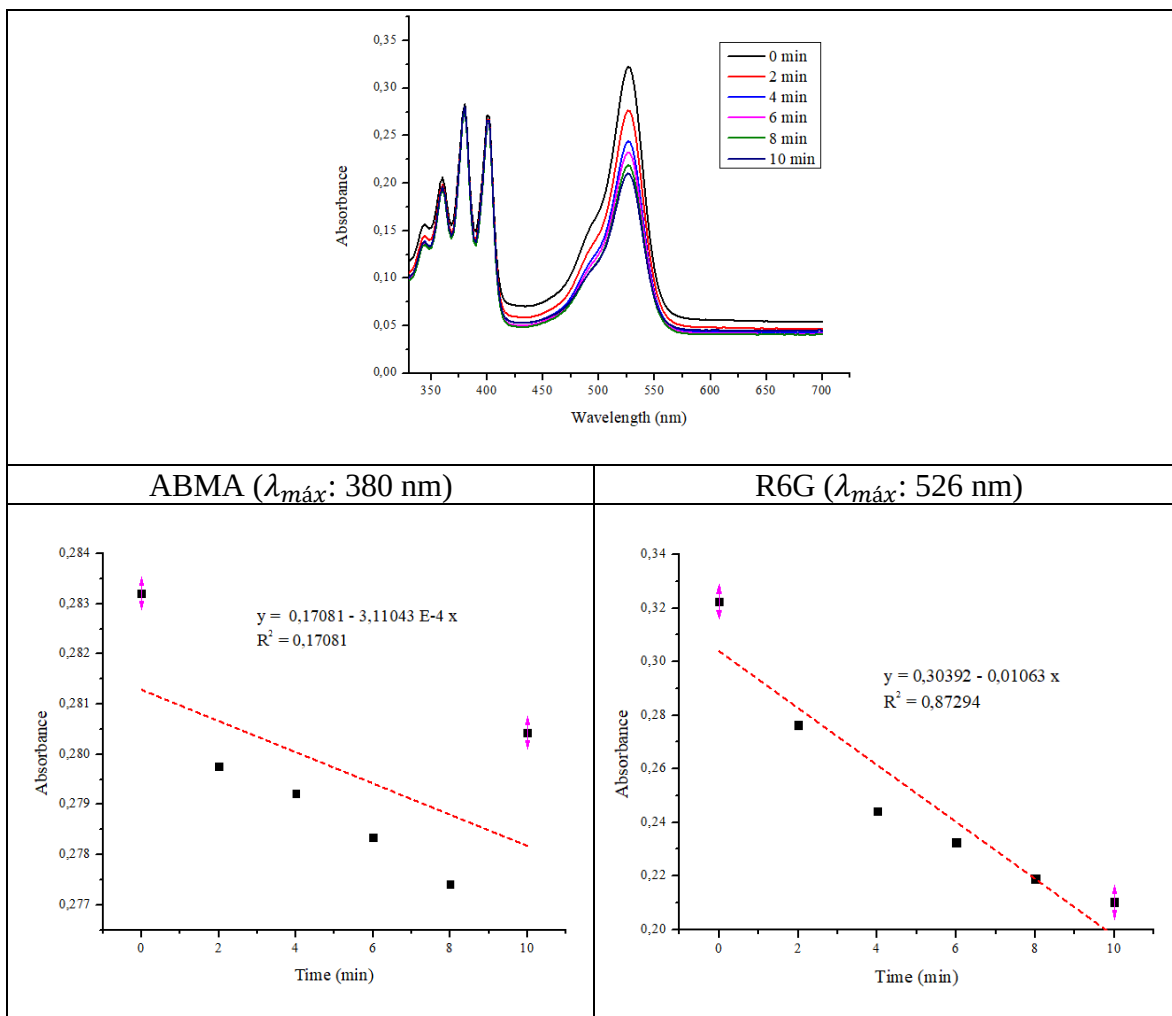


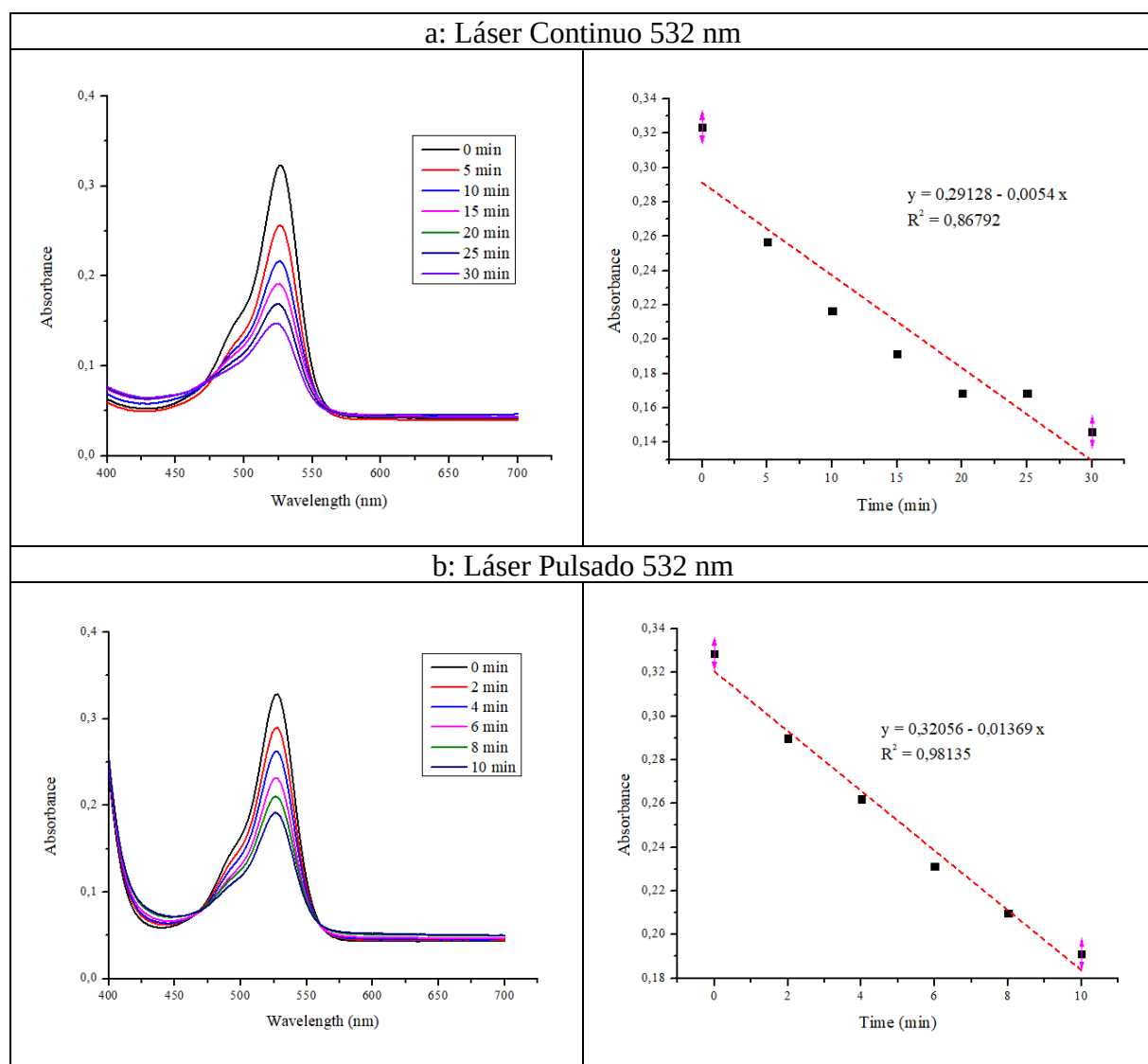
Figura 15. Espectro de absorción de la solución de R6G + ABMA, pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 526$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

En la figura 24, se observa una decoloración de R6G del 33% y 34% a medida que aumenta el tiempo de irradiación con el láser continuo 532 nm (figura 24a) y pulsado 1064 nm (figura 24c) respectivamente. Esta decoloración, al menos en la irradiación con luz continua, está probablemente asociada con la producción de oxígeno singlete, lo que se confirma por la decoloración del ABMA, que en el caso de la figura 24a fue del 80%. La disminución de la intensidad de la banda de 380 nm del ABMA bajo irradiación con luz pulsada de 1064 nm (figura 24c), fue solo del 3%. Este resultado indica que la fotodegradación de la R6G está siendo inducida, además, por otras especies diferentes al oxígeno singlete, y que probablemente se producen durante el proceso de cavitación inducido por la luz pulsada.

La irradiación con luz pulsada de 532 nm (figura 24b) produjo oscilaciones en la intensidad de absorción del ABMA ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 380 nm) pero no una disminución significativa de esta. La intensidad de la R6G ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 525 nm) sin embargo, disminuyó un 35%. Este resultado, al igual que en el obtenido bajo irradiación pulsada a 1064 nm indica que la fotodegradación de la R6G está siendo inducida por otras especies diferentes al oxígeno singlete, probablemente producidas durante la cavitación.

R6G + FA analizado por UV-Vis

El comportamiento de la R6G en presencia del FA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados analizado por UV-Vis se muestra en la figura 25. Este análisis nos permite conocer el comportamiento de la R6G.



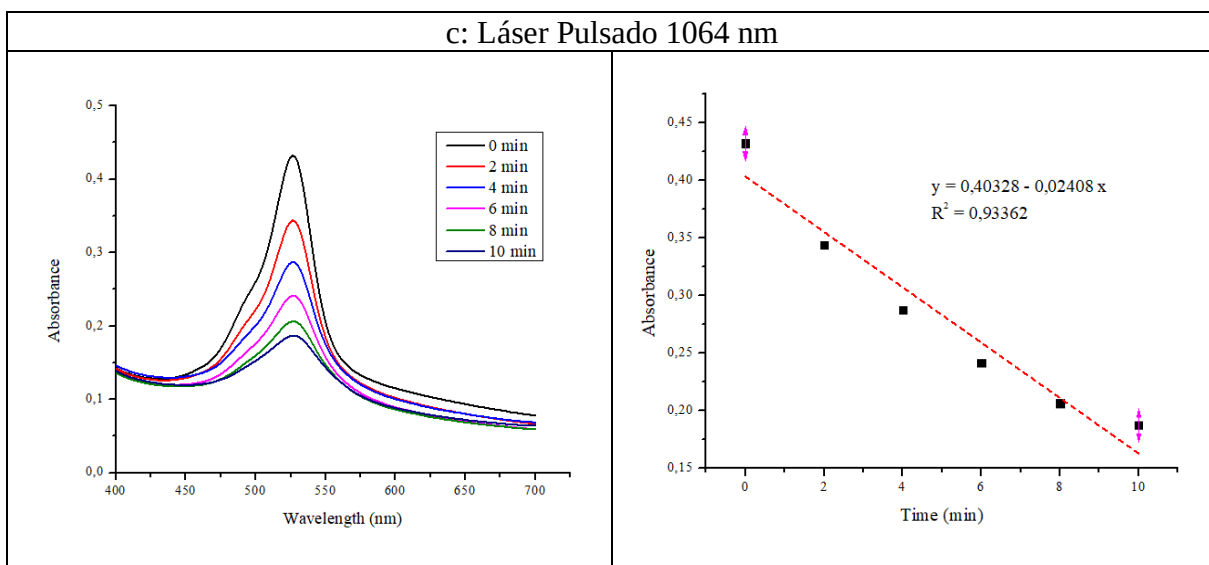


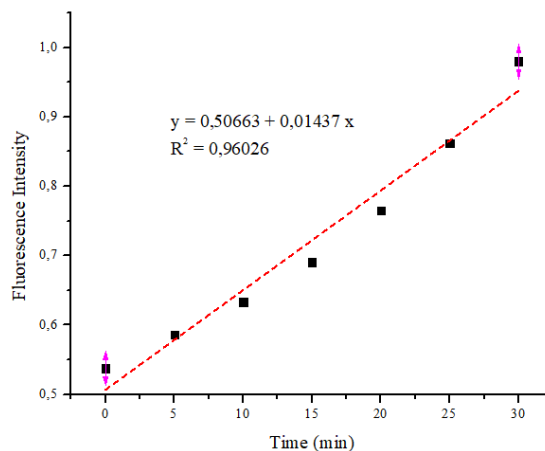
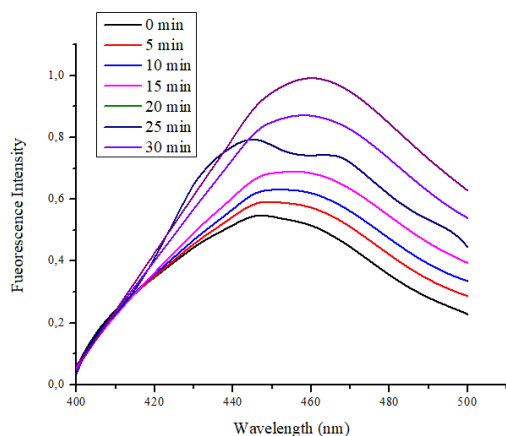
Figura 16. Espectro de absorción de la solución de R6G +FA y pendiente de pico de absorbancia de R6G ($\lambda = 528 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Los tres láseres inducen fotodegradación de la R6G. La intensidad de la R6G durante los tiempos de irradiación empleados disminuyó con el láser continuo de 532 nm un 56% (figura 25a), con el láser pulsado de 532 nm disminuyó un 40.6% (figura 25b), y con el pulsado de 1064 nm disminuyó un 58% (figura 25c). La fotodegradación de la R6G está asociada a la producción de oxígeno singlete (10), aunque pudiera además estar asociada a reacciones de transferencia con otros sustratos diferentes al oxígeno.

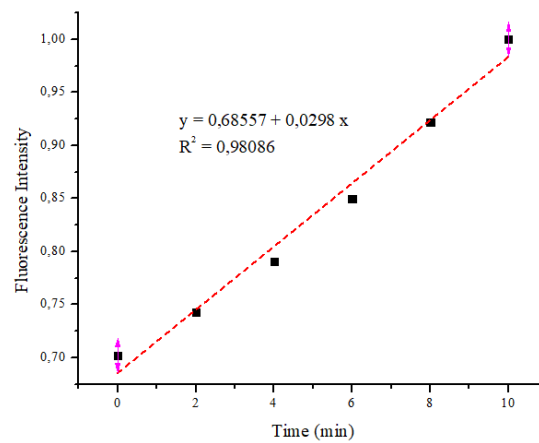
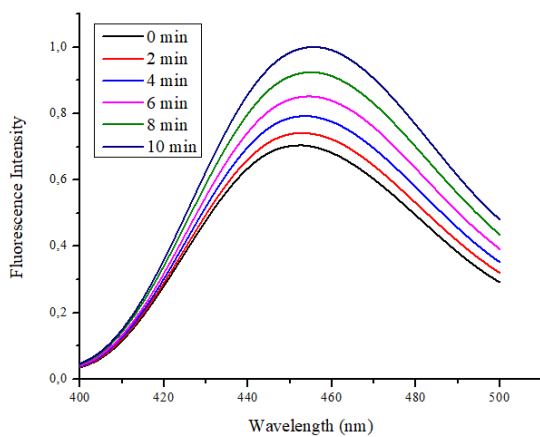
R6G + FA analizado por Fluorescencia

El comportamiento de la R6G en presencia del FA frente a la irradiación con los tres láseres utilizados analizado por fluorescencia se muestra en la figura 26. Este análisis nos permite conocer el comportamiento del FA.

a: Láser Continuo 532 nm



b: Láser Pulsado 532 nm



c: Láser Pulsado 1064 nm

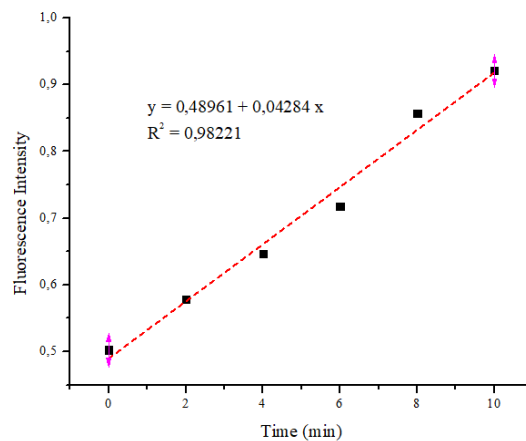
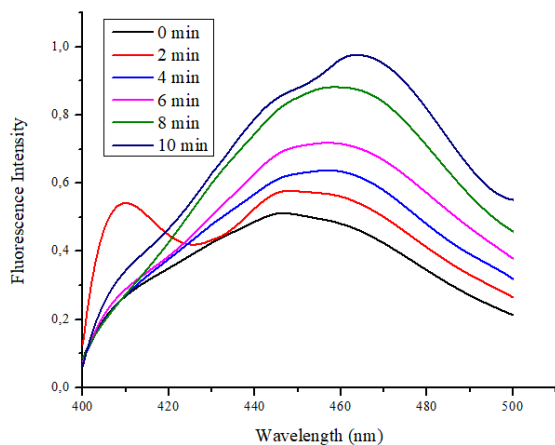


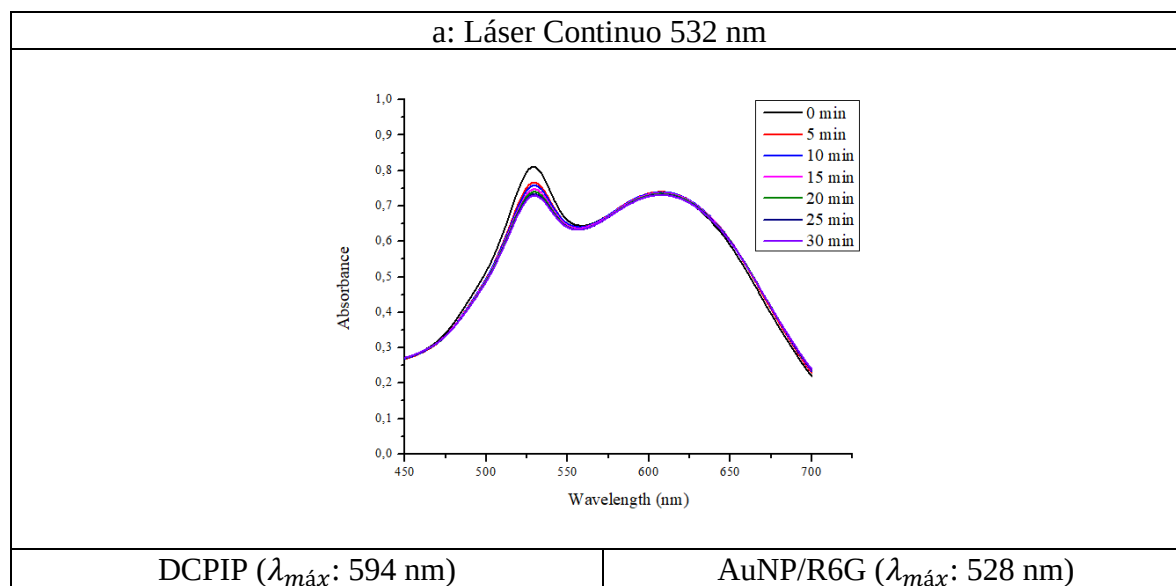
Figura 17. Espectro de intensidad de fluorescencia de la solución de R6G +FA y pendiente de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 455 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

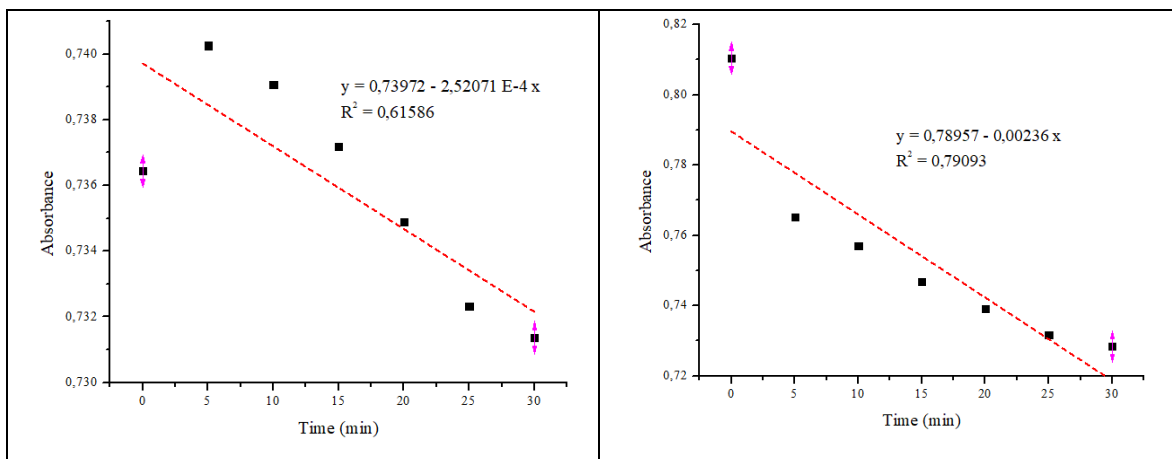
El aumento de la fluorescencia del FA en las tres irradiaciones indica que con los tres láseres hubo ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I entre la R6G y el ácido fólico. La ocurrencia de esta reacción con el láser pulsado de 532 nm había sido previamente reportada (10). Esta misma reacción con el láser pulsado de 1064 nm también se había registrado previamente en el laboratorio, aunque no ha sido aun reportada aún. En este trabajo se demuestra que bajo irradiación con luz continua de 532 nm también ocurre la transferencia de carga entre la R6G y el FA.

5.6 Irradiaciones de la mezcla AuNP/R6G en presencia de los indicadores DCPIP, ABMA y FA utilizando los tres láseres

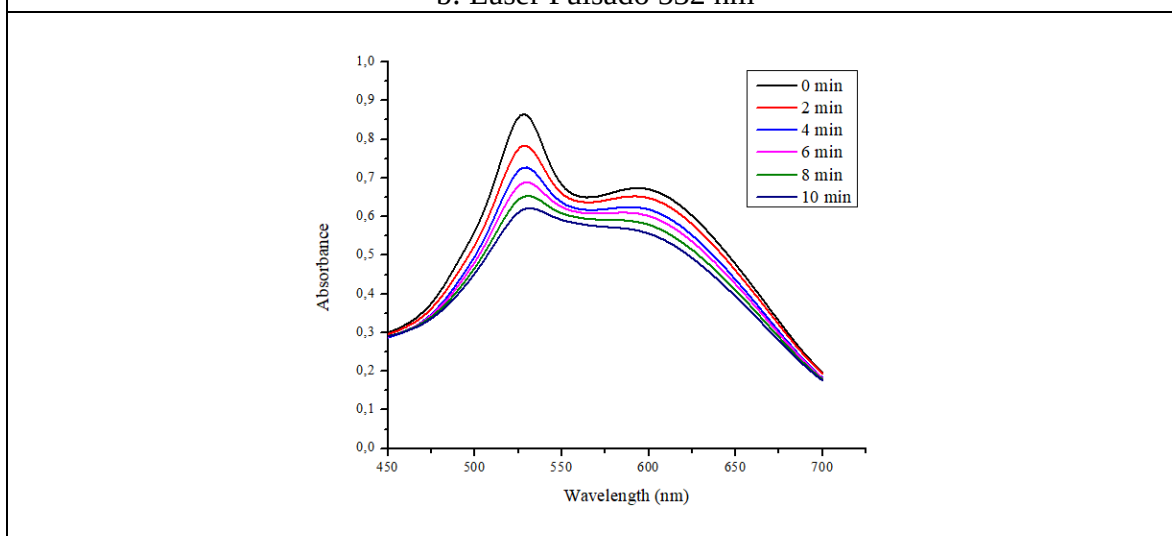
AuNP/R6G + DCPIP

El comportamiento de la mezcla AuNP/R6G en presencia del DCPIP frente a la irradiación con los tres láseres se muestra en la figura 27.

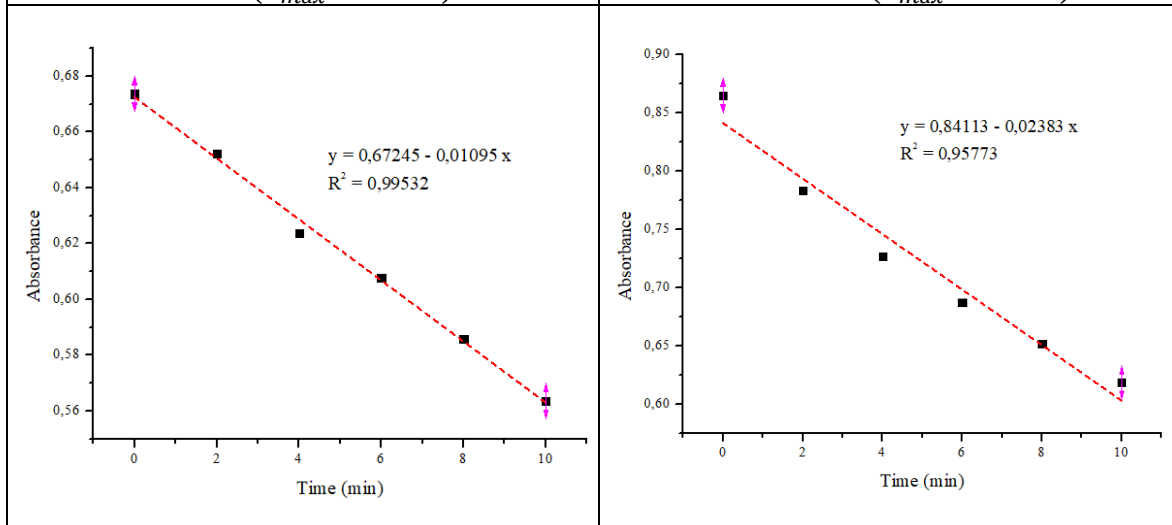




b: Láser Pulsado 532 nm



DCPIP ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 594 nm)



AuNP/R6G ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 528 nm)

c: Láser Pulsado 1064 nm

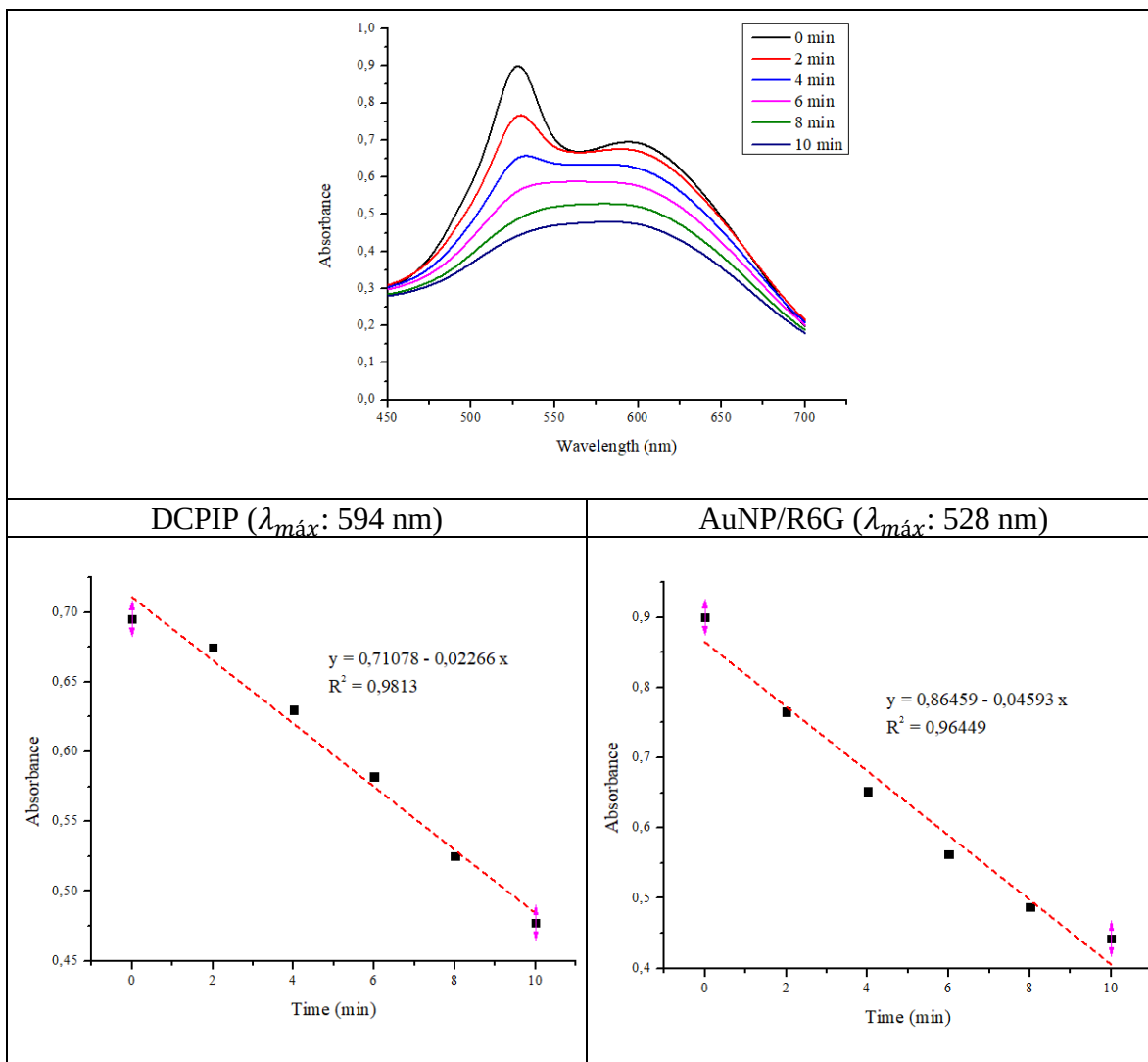


Figura 18. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/R6G + DCPIP, pendiente de pico de absorbancia de AuNP+R6G ($\lambda = 525$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de DCPIP ($\lambda = 594$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

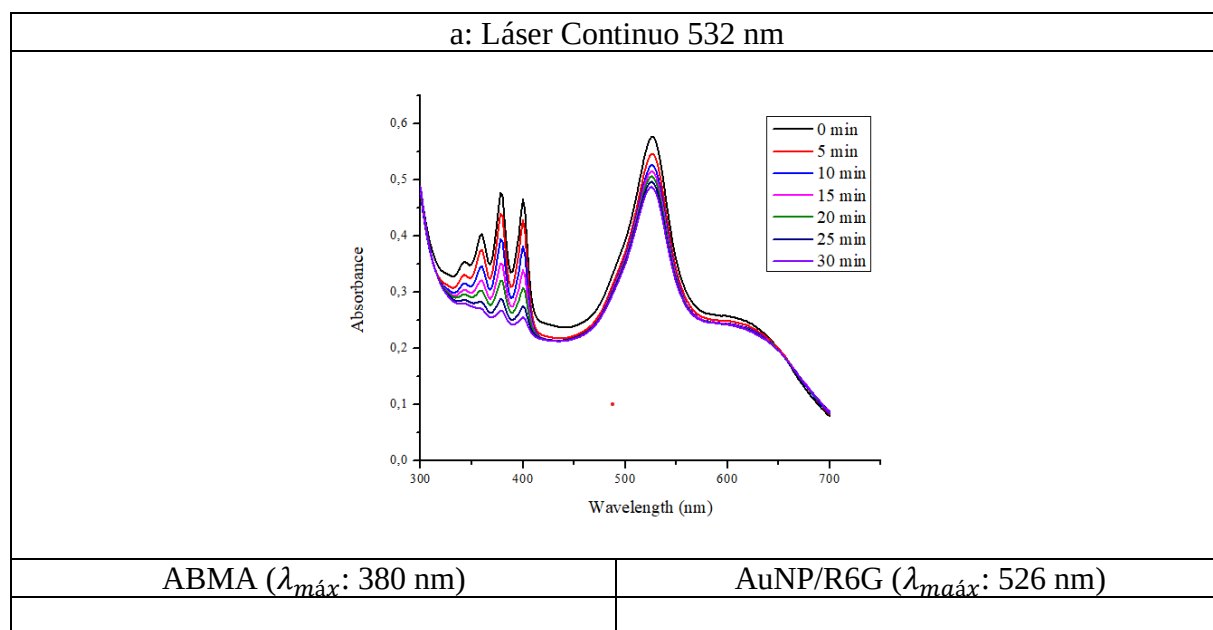
La irradiación de la mezcla AuNP/R6G con el láser continuo de 532 nm (figura 27a) no produce fotodegradación en el DCPIP, por lo que no hay evidencia de la producción de especies radicáticas oxidantes como el ion radical superóxido o el ion radical hidroxilo, o sea no indica la ocurrencia de reacciones de transferencia tipo I con el oxígeno como sustrato. Sin embargo, si hubo fotodegradación de la banda de absorción de 528 nm (11%), donde se solapa la banda de intensidad de la R6G y el LSPR de las AuNP. Dado el comportamiento de la figura 19a (AuNP + DCPIP) donde no hubo fotodegradación ni de las AuNP ni del DCPIP bajo irradiación con luz continua, y el de la figura 23a (R6G + DCPIP) donde tampoco se observa decoloración del DCPIP, pero sí de la R6G, podemos concluir que la decoloración que se observa en la figura 27a es debido a la fotodegradación de la R6G

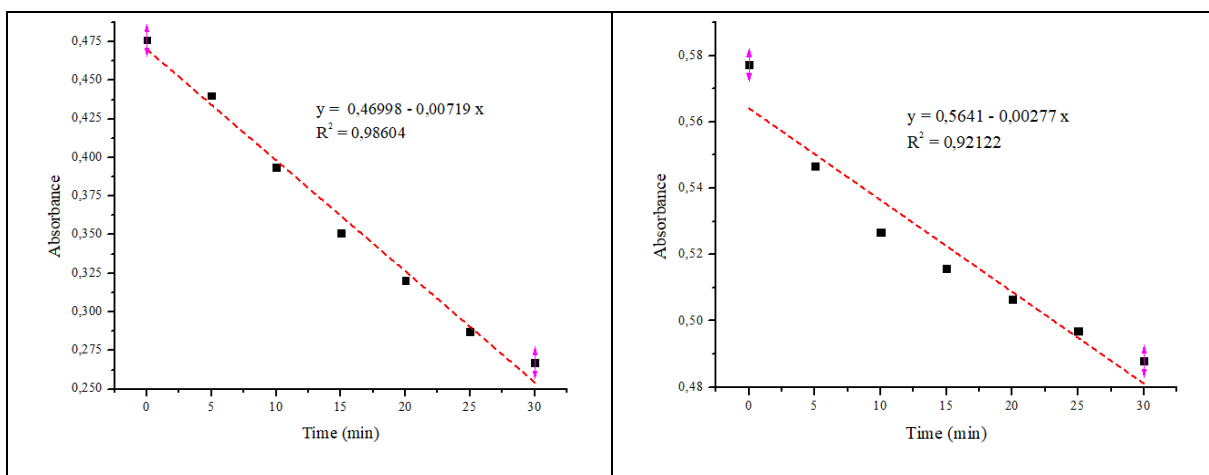
que consistentemente hemos visto en todas las irradiaciones. Ya se ha mencionado anteriormente que esa fotodegradación (en ausencia de blanqueamiento del DCPIP) es probablemente debido a la producción de oxígeno singlete, particularmente en esta irradiación continua donde no hay ocurrencia de cavitación.

La irradiación con los láseres pulsados de 532 nm y 1064 nm produjo en ambos casos la decoloración del DCPIP (17.6% y 32% respectivamente) y de la banda de absorción máxima a 528 nm (30% y 51% respectivamente) que incluye tanto a la R6G como al LSPR de las AuNP. En este caso sí hay ocurrencia de cavitación y cambios en la forma y tamaño de las AuNP, por tanto, la degradación de la banda de 528 nm no es solo debido al blanqueamiento de la R6G, sino además a los cambios inducidos en las AuNP. En dichos cambios se espera que haya fragmentación con la consiguiente ionización de átomos de oro. Los electrones liberados pueden reaccionar con el oxígeno molecular formando el ion radical superóxido o pueden directamente reducir el DCPIP provocando su decoloración. Estas especies oxidantes que se producen pueden además reaccionar con la propia R6G contribuyendo también su decoloración. El comportamiento aquí visto es similar al observado en las figuras 19b, 19c y 23c.

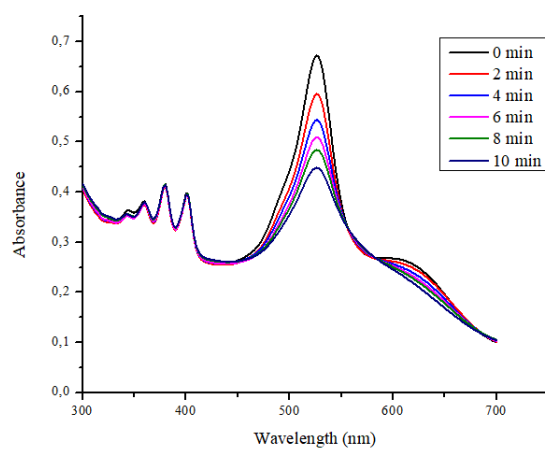
AuNP/R6G + ABMA

El comportamiento de la mezcla AuNP/R6G en presencia del ABMA frente a la irradiación con los tres láseres se muestra en la figura 28.



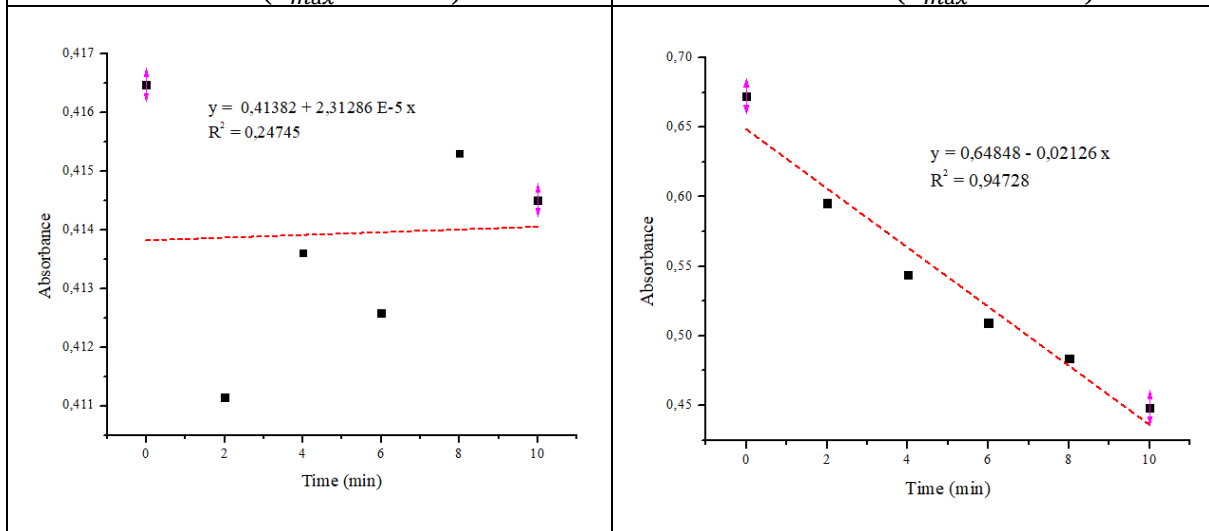


b: Láser Pulsado 532 nm



ABMA ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 360 nm)

AuNP/R6G ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 526 nm)



c: Láser Pulsado 1064 nm

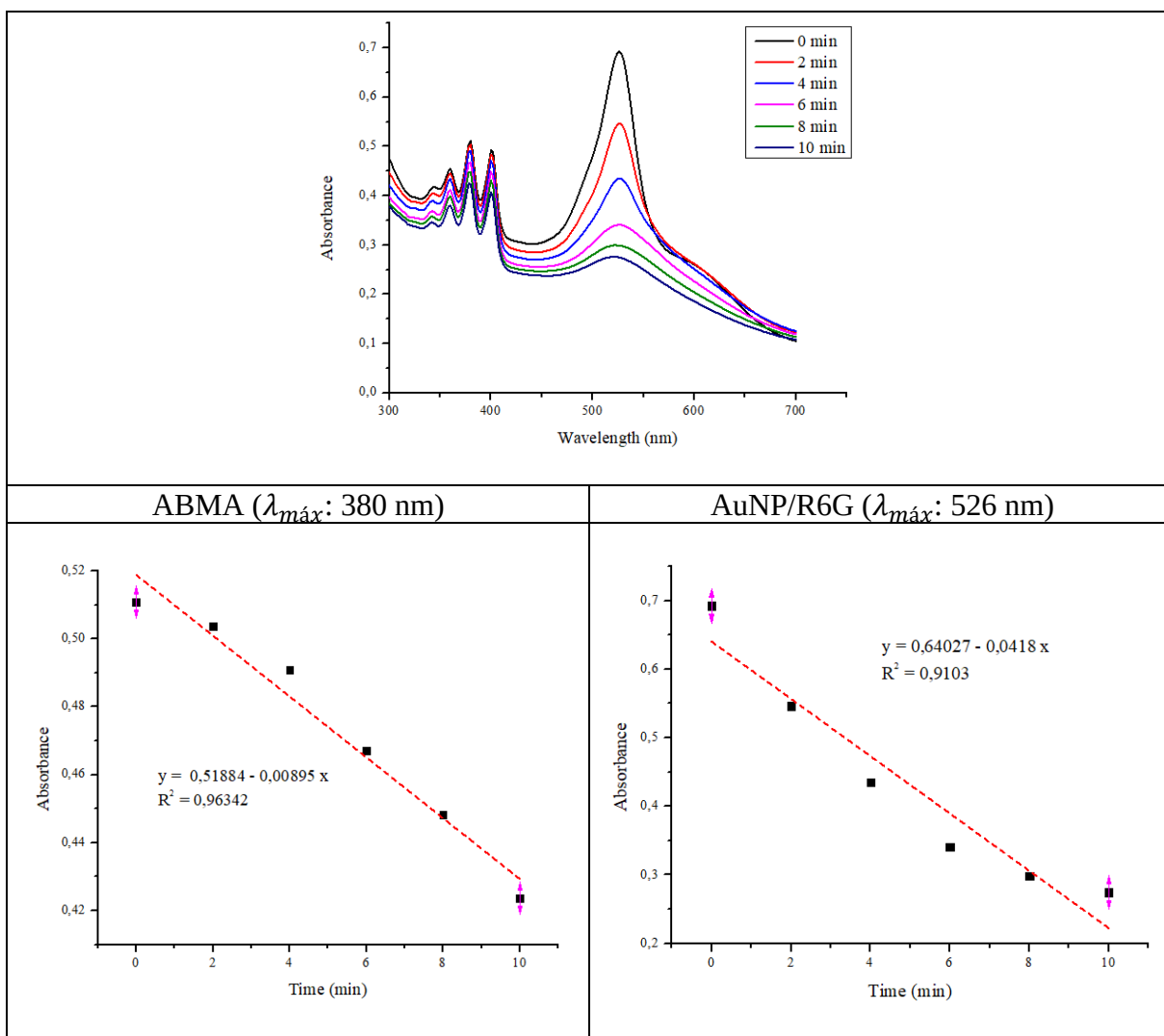


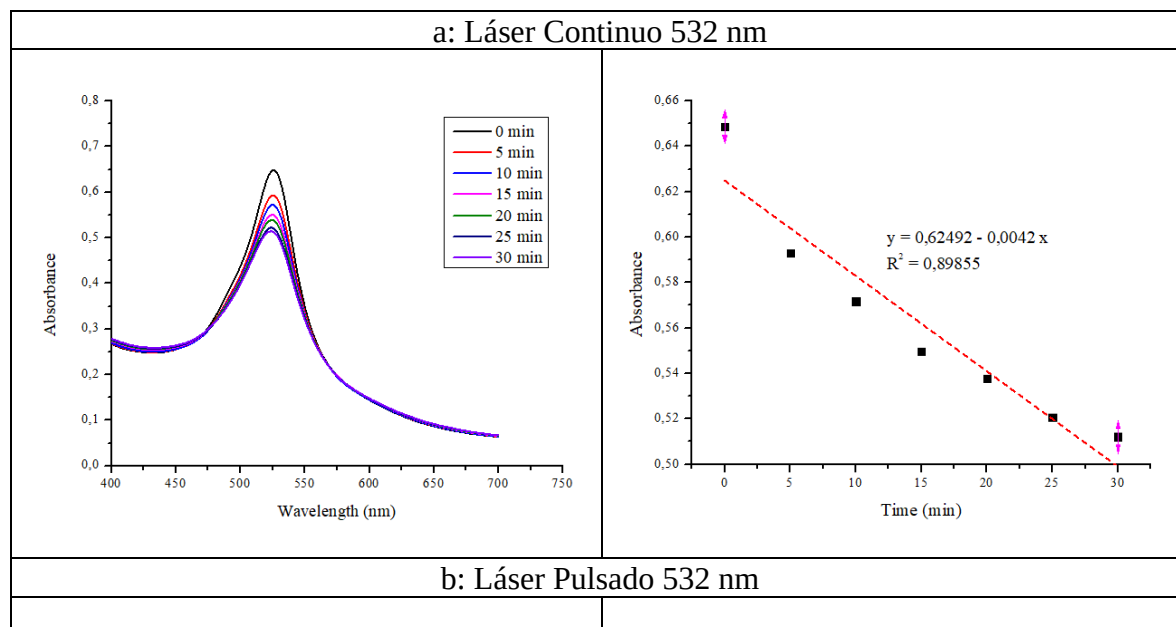
Figura 19. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/R6G +ABMA, pendiente de pico de absorbancia de AuNP+R6G ($\lambda = 526$ nm) vs. tiempo y pendiente de pico de absorbancia de ABMA ($\lambda = 380$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

La irradiación con los tres láseres mostró, al igual que en caso anterior, decoloración de la banda de 526 nm donde se incluyen tanto el máximo de absorción de la R6G como el LSPR de las AuNp. Esta decoloración fue del 16% para la luz continua, del 34% para el pulsado de 532 nm y del 61% para la luz pulsada de 1064 nm. La banda del ABMA se decoloró un 44% con la luz continua, no hubo decoloración alguna con la luz pulsada de 532 nm, y esta no es concluyente en el caso de 1064 nm, ya que más que una decoloración la figura 28c muestra un desplazamiento de todo el espectro hacia menores intensidades, simulando una decoloración del ABMA. La decoloración del ABMA con la luz continua confirma y demuestra la producción de oxígeno singlete. Sin embargo, el resultado obtenido con luz pulsada de 532 nm y 1064 nm es inesperado, aunque consistente con el obtenido en las figuras 24b y 24c (irradiación de la R6G individual en presencia de ABMA con luz pulsada a 532

nm y 1064 nm). La bibliografía reporta que la fotodegradación de la R6G es debido a la producción de oxígeno singlete, y se confirma esto en el caso de la irradiación continua, pero en ningún caso se evidenció con la luz pulsada. De hecho, Cruz-Rodríguez irradió AuNP de 5 nm en presencia de ABMA con luz pulsada de 532 nm y 1064 nm e induce fotoblanqueamiento del ABMA, resultado que tampoco ocurrió en esta ocasión con las AuNP de 20 nm. Este resultado indica que la luz pulsada en la mezcla, al parecer interactúa más con las AuNP de 20 nm que con la R6G. La interacción con estas AuNP de 20 nm no indica producción de oxígeno singlete, como en el caso de las AuNP 5 nm (13), probablemente por cavitación.

AuNP/R6G + FA analizado por UV-Vis

El comportamiento de la mezcla AuNP/R6G en presencia del sustrato FA frente a la irradiación con los tres láseres, analizado por UV-Vis se muestra en la figura 29. Este análisis muestra el comportamiento de la mezcla AuNP/R6G.



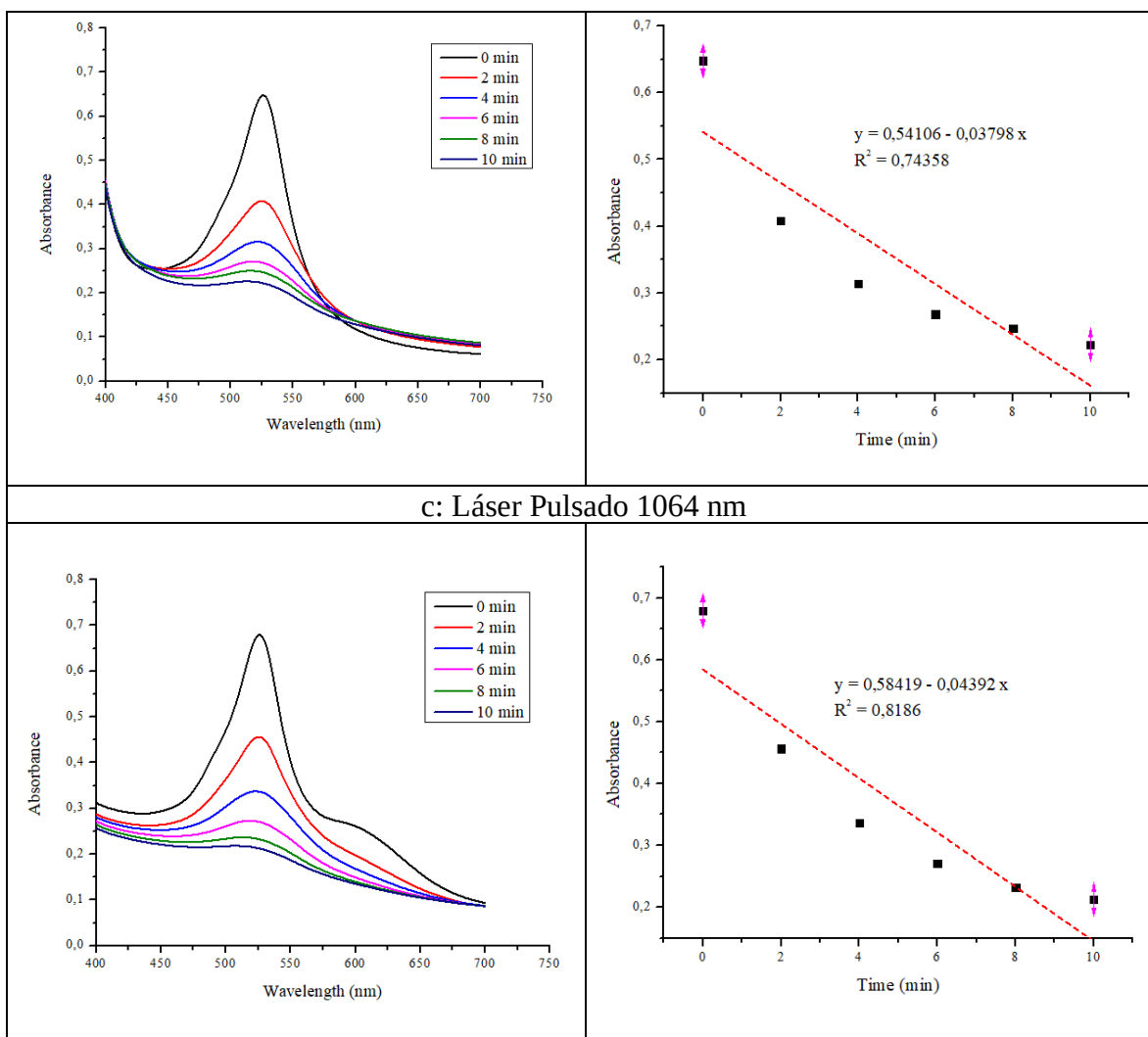
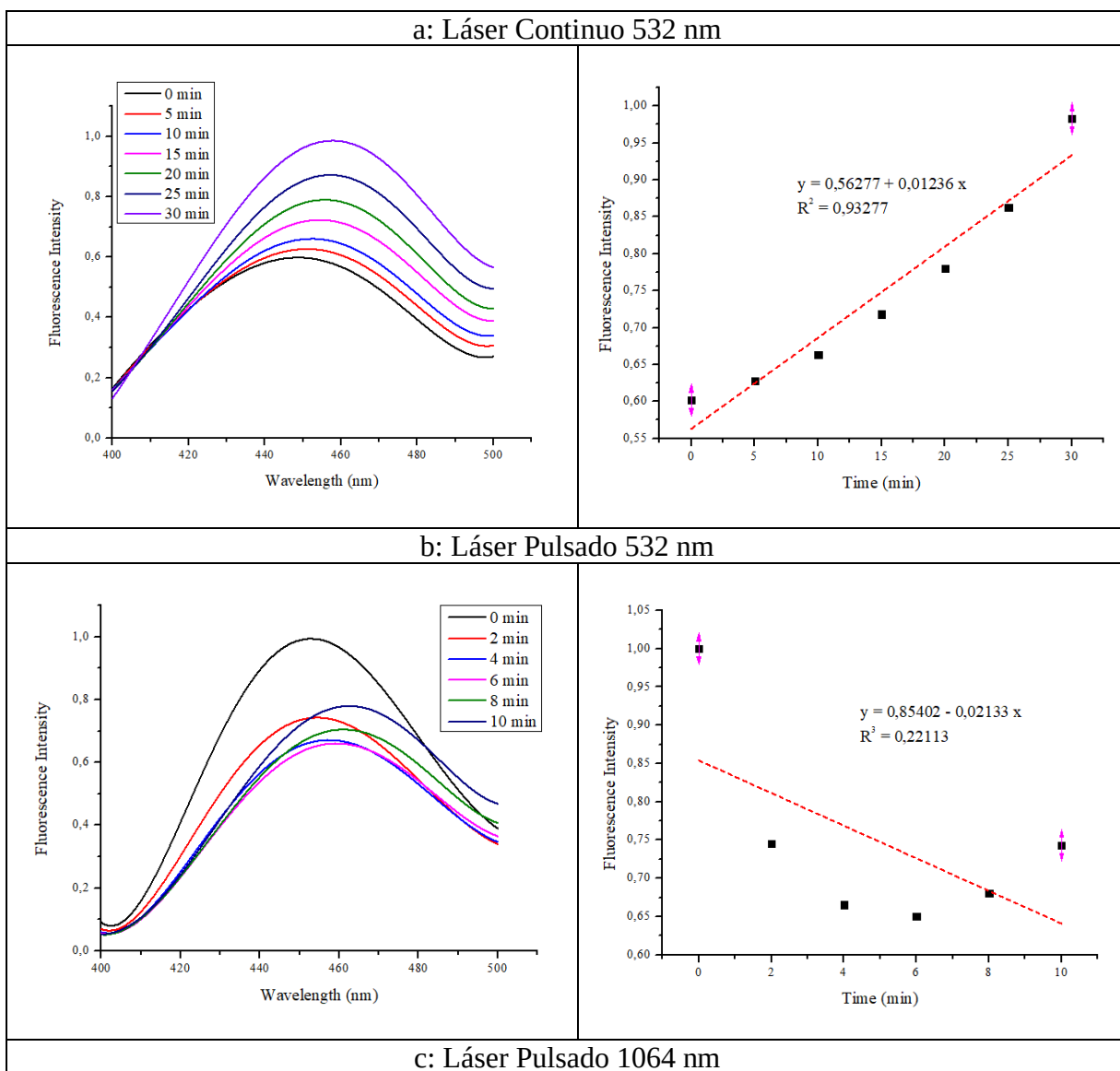


Figura 20. Espectro de absorción de la suspensión de AuNP/ R6G + FA y pendiente de pico de absorbancia de AuNP/R6G ($\lambda = 526 \text{ nm}$) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

En este caso, al igual que en las figuras 27 y 28, la irradiación de la mezcla provoca fotodegradación del máximo de absorción de esta. Con luz continua, la disminución es debido a la fotodegradación de la R6G, ya que, bajo este tipo de irradiación, la figura 16a demostró que las AuNP no cambian ni la posición ni la intensidad del LSPR. En el caso de la luz pulsada a 532 nm y a 1064 nm la banda de mayor intensidad en la absorción de la mezcla (526 nm) se fotoblanquea por dos procesos, por la fotodegradación ya conocida de la R6G y además por los cambios en las propiedades ópticas de las AuNP probablemente debido a la fragmentación o agregación de estas. La disminución de la intensidad del máximo de absorción de la mezcla a 526 nm fue del 20% con luz continua, del 66% con luz pulsada de 532 nm y del 69% con luz pulsada de 1064 nm.

AuNP/R6G + FA analizado por Fluorescencia

El comportamiento de la mezcla AuNP/R6G en presencia del sustrato FA frente a la irradiación con los tres láseres, analizado por fluorescencia se muestra en la figura 30. Este análisis muestra el comportamiento del sustrato FA frente a la irradiación en presencia de la mezcla AuNP/R6G.



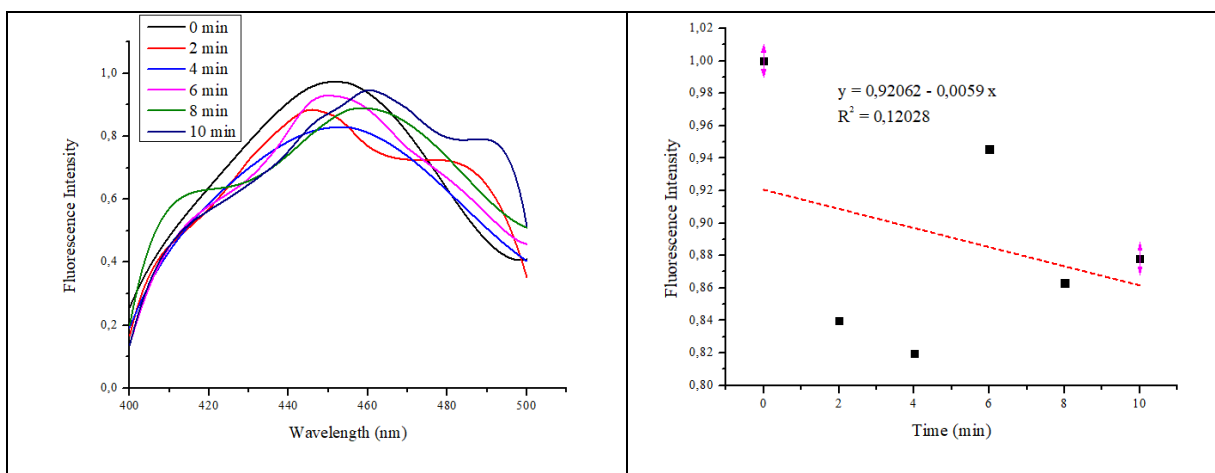


Figura 21. Espectro de intensidad de fluorescencia de la suspensión de AuNP/R6G + FA y pendiente de intensidad de fluorescencia FA ($\lambda_{emi} = 452$ nm) vs. tiempo irradiado con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Solo la irradiación continua de la mezcla evidencia la ocurrencia de reacciones de transferencia con el FA. La figura 30a es la única donde la intensidad de fluorescencia del FA aumenta (63%) con el incremento del tiempo de irradiación, este incremento es la evidencia de la ocurrencia de la reacción. Basados en la figura 30b y 30c, tal reacción de transferencia no ocurre en el caso de la irradiación con luz pulsada de 532 nm y 1064 nm, ya que la intensidad de fluorescencia del FA no se incrementa con el incremento del tiempo de irradiación.

Jiménez-Mancilla y col (10) reportaron la ocurrencia de reacciones de transferencia entre la R6G y el FA bajo irradiación con luz pulsada de 532 nm, el mismo resultado se obtuvo en este trabajo (figura 26b). Experimentos realizados en el laboratorio y aun no reportados demostraron que el mismo tipo de reacciones ocurre bajo irradiación con luz pulsada a 1064 nm, el mismo resultado se obtuvo en este trabajo (figura 26c). Sin embargo, al irradiar la mezcla AuNP/R6G con luz pulsada de 532 nm o de 1064 nm no hay evidencia de la ocurrencia de reacciones de transferencia entre la R6G de la mezcla y el FA. Una vez más este resultado indica que la interacción de la luz favorecida en la mezcla AuNP/R6G es la que ocurre con la AuNP.

5.7 Incremento de la temperatura

ΔT AuNP

El comportamiento del incremento de la temperatura al irradiar la suspensión de AuNP de 20 nm se muestra en la figura 31.

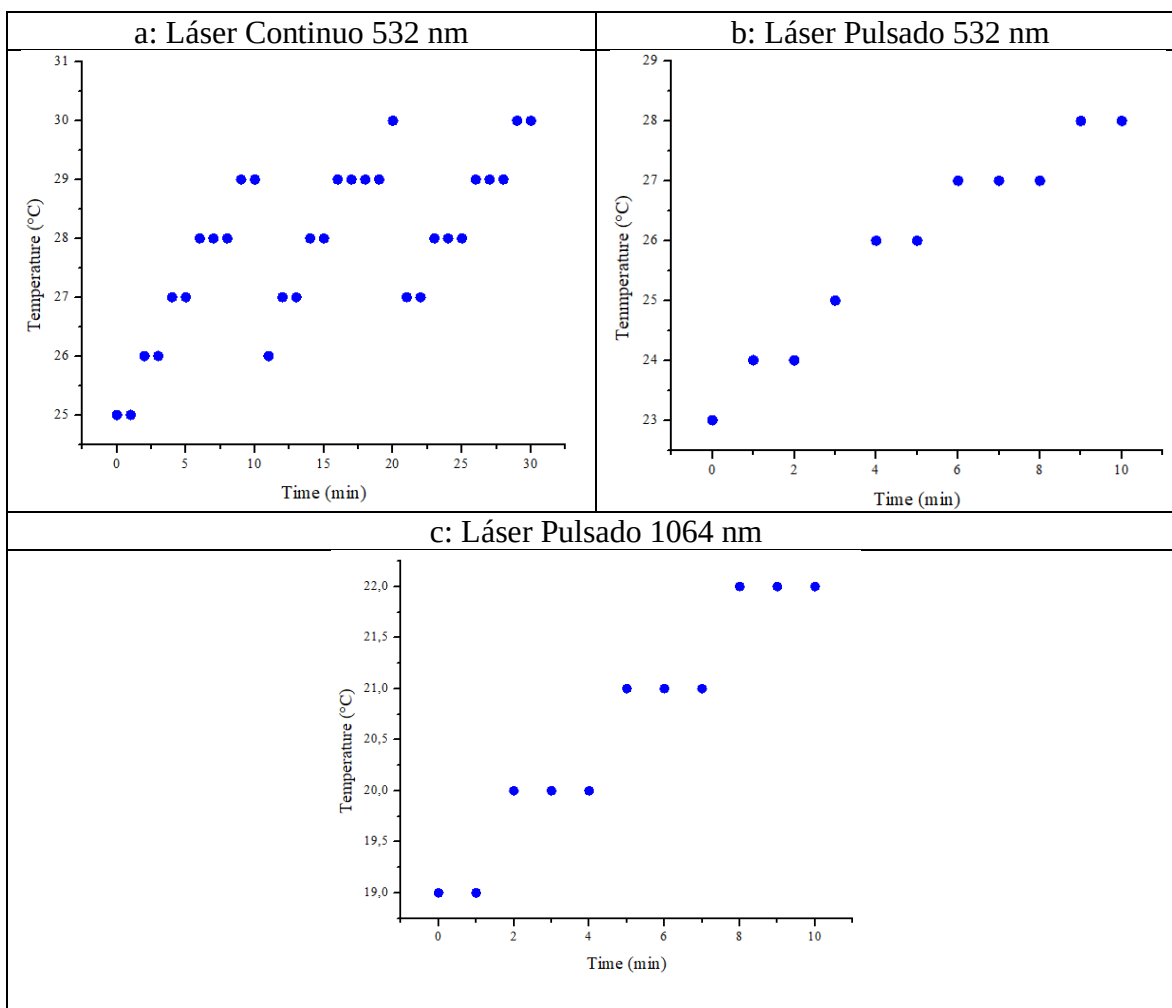


Figura 22. Incremento de temperatura registrado al irradiar AuNP con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

Aunque se midió la temperatura en todas las soluciones y suspensiones irradiadas con los tres láseres para identificar la rapidez del aumento de temperatura de cada una de ellas, los resultados significativos fueron únicamente en las muestras que contenían AuNP. Las soluciones que no contenían AuNP fueron preparadas en H₂O dd, y al irradiarlas ninguna mostró cambios significativos en la temperatura, no hubo incremento en más de 1°C. Por tanto, únicamente se reportan los resultados obtenidos de la irradiación con los tres láseres de las suspensiones de AuNP y AuNP/ R6G.

En el caso de la suspensión de AuNP, el incremento de temperatura registrado en la irradiación con luz continua (3.98 W/cm^2) fue de 5 grados durante los 30 min de irradiación (figura 31a). La determinación del incremento de temperatura se comportó de manera extraña, pues a diferencia de las demás irradiaciones (figura 31b y 31c) donde la temperatura siempre fue en ascenso, en este caso (figura 31a) en dos ocasiones, a los 10 min y a los 15 min, la temperatura cayó como si la suspensión se “enfriara” cosa poco probable. Así que lo más probable es que el incremento real de temperatura haya sido algo mayor que los 5 grados registrados.

La irradiación con luz pulsada de 532 nm (0.03 J/cm^2) y 1064 nm (1.91 J/cm^2) durante 10 min registró un incremento de temperatura de 5°C y 3°C respectivamente (figura 31b y 31c). En este caso la temperatura durante todo el tiempo de irradiación siempre fue en ascenso. El mecanismo fototérmico, es más eficiente a longitudes de onda de 532 nm debido a que la sección eficaz de absorción es mayor que a 1064 nm, ya que a 532 nm la absorción es directa debido a que esa longitud de onda está muy cercana a $\lambda_{\text{máx}}$ de las AuNP. A 1064 nm se requiere, como ya se ha mencionado, una absorción multifotónica, que es de menor probabilidad que la lineal a 532 nm.

El incremento térmico se produce debido a diferentes mecanismos de transferencia de energía de la AuNP al medio. Estos dependerán de las características de las AuNP (tamaño, forma y estado de agregación), así como de las propiedades del láser utilizado (tipo de iluminación -continua o pulsada-, longitud de onda, intensidad lumínica, y la duración de los pulsos), además del ángulo de incidencia del láser sobre la suspensión de AuNP y la capacidad calorífica del entorno circundante. (12)

Algunos autores consideran que a mayor energía/cm² debe producirse una mayor población de electrones calientes, que son los responsables principales del incremento de temperatura en las AuNP (37). Los láseres continuos provocan un apreciable efecto fototérmico (19,59), y con los láseres pulsados se logran incrementos de temperatura significativos a intensidades luminosas altas, por lo que debe tenerse en cuenta las dosis máximas que puede soportar la piel (58).

ΔT AuNP/R6G

El comportamiento del incremento de la temperatura al irradiar la suspensión de AuNP/R6G (mezcla) de 20 nm se muestra en la figura 32.

a: Láser Continuo 532 nm	b: Láser Pulsado 532 nm

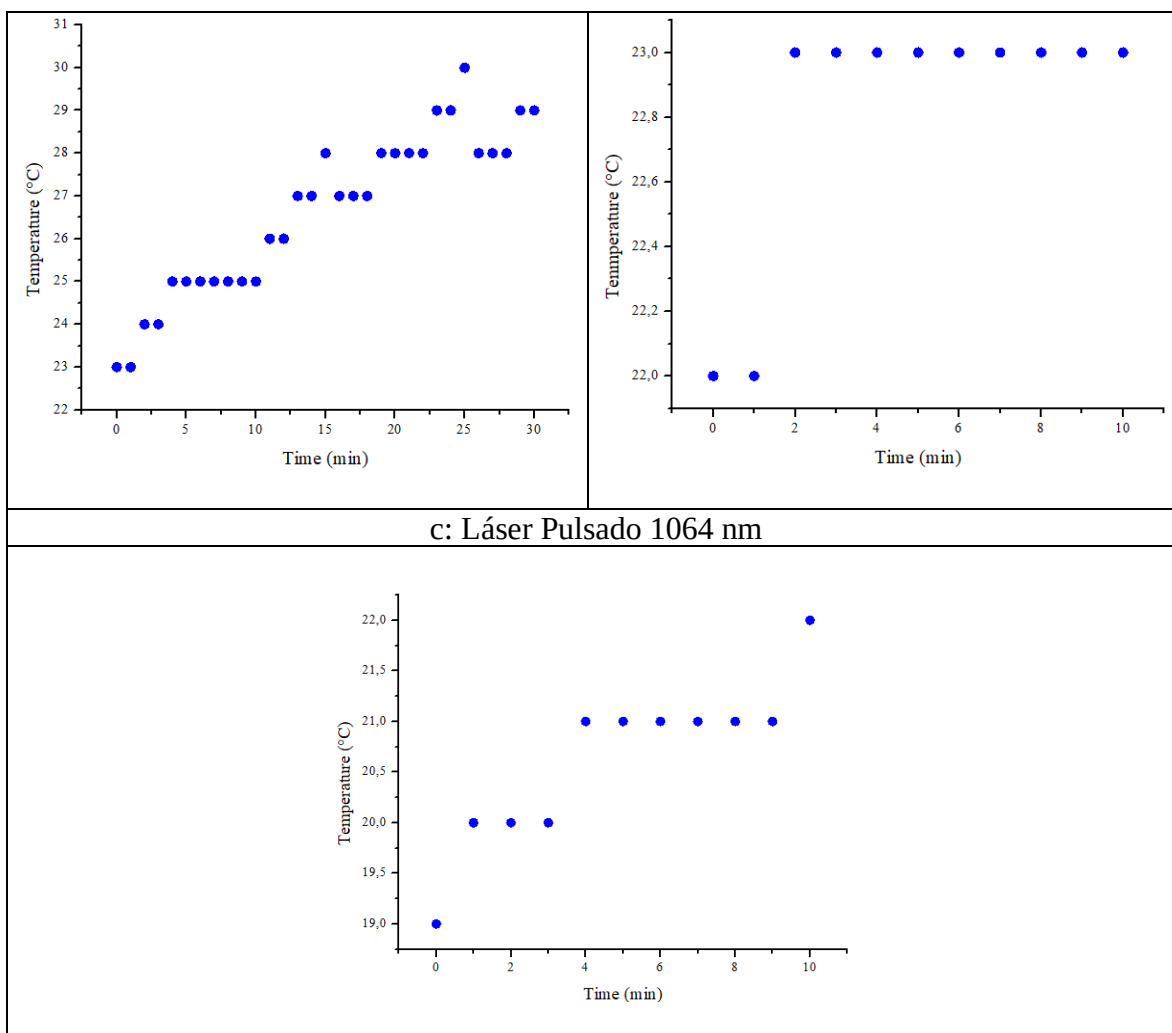


Figura 23. Incremento de temperatura registrado al irradiar la mezcla AuNP/ R6G con a) Láser Continuo 532 nm b) Láser Pulsado 532 nm c) Láser Pulsado 1064 nm.

El incremento de la temperatura registrado en la irradiación de la mezcla (AuNP/R6G) con luz continua fue de 7°C, con luz pulsada de 532 nm fue de 1°C y con luz pulsada de 1064 nm fue de 3°C. En este caso la irradiación con a luz continua de 532 nm fue la que se comportó de manera extraña, pues solo incrementó la temperatura de la mezcla en 1°C. El incremento registrado con la luz pulsada de 1064 nm fue el mismo que registró la suspensión de AuNp sola (3°C).

Un aumento de temperatura en el tejido por encima de 4°C garantiza un calentamiento celular por encima de 41°C. A esta temperatura ya aparecen efectos citotóxicos fototérmicos debido a la desnaturalización de proteínas y el rompimiento de la membrana celular, procesos que son más eficaces en células de cáncer por su baja resistencia a la temperatura en comparación con las células normales (60). Este incremento de temperatura se registró con el láser continuo y con el pulsado de 532 nm en el caso de las AuNP solas. El resultado obtenido con este láser y la mezcla AuNP/R6G en

este trabajo son dudosos, sobre todo porque los experimentos anteriores de este mismo trabajo indican que la interacción con la AuNP está más favorecida que con la R6G, por lo que se esperaba que el incremento de temperatura registrado fuera muy similar o el mismo entre las AuNP solas y la mezcla. Esto sí se observa en el caso del láser continuo y en el pulsado a 1064 nm.

Capítulo 6. DISCUSIÓN

En este estudio, se investigó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente los iones radicales superóxido e hidroxilo, y el oxígeno singlete, la ocurrencia de reacciones de transferencia con el ácido fólico como sustrato y el incremento de la temperatura del medio, cuando una mezcla de AuNP/R6G se irradió bajo irradiación continua de 532 nm, pulsada de 532 nm y pulsada de 1064 nm. Los resultados entre la luz continua y la pulsada, ambas de 532 nm, nos permitirá conocer las diferencias en los efectos ocasionados dependientes del tipo de irradiación, y los resultados de la luz pulsada de 532 nm y 1064 nm nos permitirá conocer la diferencia entre la irradiación lineal y la no lineal (multifotónica). El fin del estudio es conocer el comportamiento de la mezcla a fin de evaluar su potencial aplicación como agente para terapia dual (PDT/PTT). Como el 80% del contenido de la célula es agua, el medio en el cual se realizaron todas las irradiaciones fue agua.

La producción de oxígeno singlete se evaluó utilizando el indicador ABMA. Esta ROS se produce por reacción de transferencia de energía (reacción tipo II) entre el PS* y la molécula de oxígeno del medio. La producción de los iones radicales superóxido e hidroxilo se evaluó utilizando el indicador DCPIP. Estas ROSs se producen por reacciones de transferencia de carga (reacción tipo I) entre el PS* y el oxígeno del medio. La ocurrencia de transferencia de carga (reacción tipo I) entre el PS* y el ácido fólico del medio se evaluó utilizando al propio ácido fólico. Algunas de estas reacciones habían sido anteriormente evaluadas en la R6G y las AuNP de manera individual, fundamentalmente con láser pulsado de 532 nm (13). El interés de estudiar la mezcla AuNP/R6G radica en su potencial aplicación en PDT en medios oxigenados (pues la R6G induce reacciones de transferencia con el oxígeno), y en medios hipóxicos (pues la R6G induce reacciones de transferencia con el FA). La mezcla tiene también potencial uso en PTT debido al incremento de temperatura que induce la irradiación de las AuNP. Hasta el momento hay reportados estudios donde se irradian la R6G o las AuNP de manera individual, pero poco se conocía acerca del comportamiento de la mezcla, que no necesariamente es la suma algebraica del comportamiento de sus componentes individuales.

La tabla 3 resume los resultados obtenidos de las irradiaciones con el láser continuo de 532 nm, el pulsado de 532 nm y el pulsado de 1064 nm de los componentes individuales de la mezcla y de la mezcla con los indicadores DCPIP, ABMA y el sustrato ácido fólico. De ocurrir la formación de oxígeno singlete y de los iones radicales superóxido e hidroxilo, se espera que la R6G, DCPIP y ABMA disminuyan sus intensidades características en UV-Vis con el incremento del tiempo de reacción. De ocurrir reacciones de transferencia con el FA, se espera que la fluorescencia de la muestra que contiene a la R6G y al FA incremente su señal de fluorescencia con el incremento de tiempo de irradiación. De ocurrir lo esperado, la tabla lo indica con la palabra “sí”, de no ocurrir el fotoblanqueo o el incremento de la fluorescencia del FA, entonces indica “no”. En la tabla se indica, además, en el caso de ocurrencia de la reacción estudiada, la pendiente de la variación de la intensidad evaluada con el incremento del tiempo de irradiación y el % de esta variación.

Tabla 3. Ocurrencia de las reacciones estudiadas en la mezcla, rapidez de la ocurrencia (pendiente m) y % de variación de la señal de intensidad evaluada durante el tiempo de irradiación estudiado.

	Continuo a 532 nm		Pulsado a 532 nm		Pulsado a 1064 nm	
	AuNP o R6G o AuNP/R6G	DCPIP o ABMA o FA	AuNP o R6G o AuNP/R6G	DCPIP o ABMA o FA	AuNP o R6G o AuNP/R6G	DCPIP o ABMA o FA
AuNP solas	No		Sí (33%) m = -0.01326		Sí (18.7%) m = -0.01056	
AuNP + DCPIP	No	No	Sí (51%) m = -0.03069	Sí (50%) m = -0.03311	Sí (24%) m = -0.03355	Sí (43%) m = -0.05443
AuNP + ABMA	No	No	Sí (28%) m = -0.01306	No	Sí (47%) m = -0.00456	No
AuNP + FA	No	No	Sí (47.5%) m = -0.0183	No	Sí (42.5%) m = -0.01809	Sí (17.8%) m = +0.03383
R6G solas	Sí (17.4%) m = -0.00189		Sí (19.6%) m = -0.00517		Sí (30%) m = -0.00911	
R6G + DCPIP	Sí (21%) m = -0.0031	No	Sí (13%) m = -0.00637	No	Sí (30%) m = -0.01679	Sí (18%) m = -0.01034
R6G + ABMA	Sí (33%) m = -0.003	Sí (80%) m = -0.0062	Sí (35%) m = -0.00381	No	Sí (34%) m = -0.01063	No
R6G + FA	Sí (56%) m = -0.0054	Sí (50%) m = +0.01437	Sí (40.6%) m = -0.01369	Sí (30%) m = +0.0298	Sí (58%) m = -0.02408	Sí (52%) m = +0.04284
AuNP/R6G solas	Sí (16.4%) m = -0.0012		Sí (35.4%) m = -0.02125		Sí (58%) m = -0.04142	
AuNP/R6G + DCPIP	Sí (11%) m = -0.00236	No	Sí (30%) m = -0.02383	Sí (17.6%) m = -0.01095	Sí (51%) m = -0.04593	Sí (32%) m = -0.02266
AuNP/R6G + ABMA	Sí (16%) m = -0.00277	Sí (44%) m = -0.00719	Sí (34%) m = -0.02126	No	Sí (61%) m = -0.0418	No
AuNP/R6G + FA	Sí (20%) m = -0.0042	Sí (63%) m = +0.01236	Sí (62%) m = -0.03798	No	Sí (69%) m = -0.04392	No

Se consideró ocurrencia de reacción cuando la variación de la intensidad de la señal entre el inicio y el final de la irradiación fue mayor a 10%.

Reacciones ocurridas con láser continuo de 532 nm y el pulsado de 532 nm

La diferencia principal entre estos dos tipos de láseres es la manera en que se “deposita” la energía en la muestra. La siguiente figura tomada de <https://lasersafetyindustries.com/blogs/laser-safety-buyers-guide/continuous-wave-cw-laser-vs-a-pulsed-laser> muestra gráficamente esta diferencia.

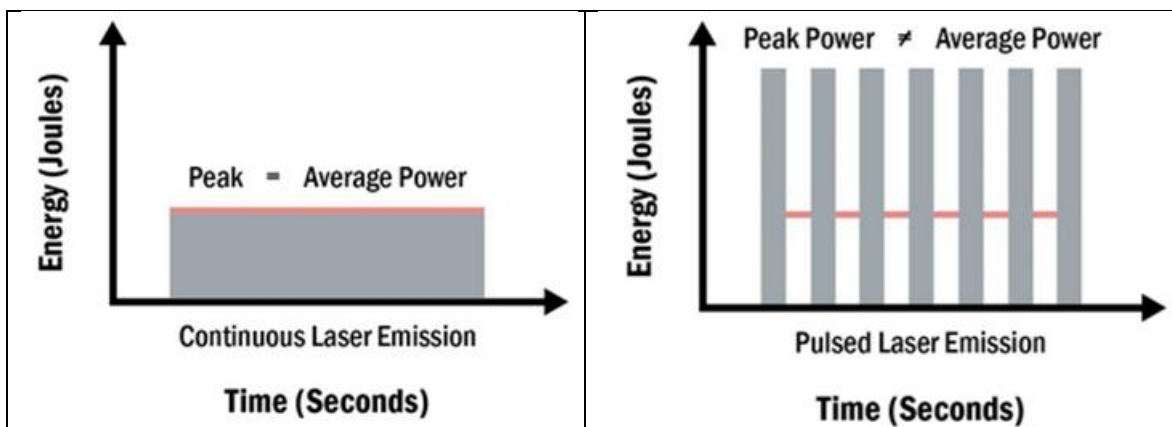


Figura 24. Deposición de energía entre un láser continuo y uno pulsado.

La irradiación con luz continua deposita la misma energía a lo largo de toda la irradiación de manera interrumpida, y el promedio de energía entregado es igual al entregado en cualquier momento durante la irradiación. La irradiación con luz pulsada deposita la energía de manera intermitente, en forma de ráfagas (pulsos). En cada pulso se deposita una cantidad de energía muy alta y el promedio de energía entregado es menor al entregado en cada pulso. La diferencia radica entonces en la manera de entregar la energía, uno es constante y el otro es en pulsos, pero en cada pulso se entrega una cantidad “descomunal” de energía. Esta es la razón de que el láser pulsado induzca cavitación y el continuo no. La cavitación también interactúa con los componentes del medio, lo que provoca en ellos efectos diferentes a los que ocurren durante la irradiación continua.

De la tabla 3 podemos ver que la irradiación de las AuNP con el láser continuo no produjo cambios en las propiedades ópticas de estas. La posición e intensidad de la LSPR se mantiene constante durante todas las irradiaciones. Al no provocar cambios en la AuNP y estas no tener propiedades fluorescentes, pues entonces la irradiación con luz continua no produjo ningún tipo de reacción por transferencia. Si embargo, la irradiación con el láser pulsado de 532 nm produjo cambios en las propiedades ópticas de las AuNP. Las pendientes negativas (-0.01326, -0.03069, -0.01306, -0.0183) indican que durante la irradiación de las AuNP solas o en presencia de DCPIP, ABMA y FA la intensidad del LSPR fue disminuyendo con el incremento del tiempo de irradiación. Esta modificación en el tamaño de las AuNP fue debido al proceso de cavitación que ocurre bajo irradiación pulsada a longitudes de onda cercanas al LSPR. El hecho que bajo este tipo de irradiación solo ocurriera la reacción con el DCPIP lo confirma. El DCPIP se reduce no solo en presencia de los

iones radicales superóxido e hidroxilo, sino también con electrones presentes en el medio. No es posible predecir cual de estas especies redujo al DCPIP, pero sí hay evidencias que nos indican que la AuNP se fragmentó, probablemente en ese proceso se liberaron electrones que directamente reaccionaron con el DCPIP o reaccionaron con el oxígeno del medio formando ROS que redujeron al DCPIP. La no ocurrencia de reacción con el ABMA indica que no hubo transferencia energética, lo cual es esperado dado que las AuNP no se excitan por absorción de luz, no tienen propiedades fluoróforas.

La tabla 3 indica que la R6G interactuó en todos los casos evaluados con la luz continua y la pulsada de 532 nm. En todos los casos hubo fotodegradación del fluoróforo, efecto esperado dadas las conocidas propiedades fluoróforas de este compuesto. Con ambos láseres se demostró que una vez excitada la R6G, esta induce reacciones de transferencia con el ácido fólico como sustrato. Esta reacción es particularmente importante en PDT pues no requiere la presencia de oxígeno y por tanto es útil en ambientes hipóxicos. La irradiación de la R6G en presencia de ABMA con luz continua indicó la producción de oxígeno singlete, ya que hubo fotodegradación del ABMA ($m=-0.0062$). Sin embargo, dicha reacción no ocurrió con luz pulsada de 532 nm, hecho no esperado y hasta este momento inexplicado. La literatura reporta que la degradación de la R6G es debida a la formación de oxígeno singlete, la irradiación con luz pulsada de 532 nm en este trabajo indica que no es la única causa. No hubo degradación del ABMA ni de DCPIP bajo irradiación con luz pulsada a 532 nm, lo que indica que otra reacción fotoquímica está teniendo lugar, una autoreducción de la R6G podría ser (o sea que la $R6G^*$ reacciona con R6G produciendo otro compuesto y consumiendo R6G).

A partir de la tabla 3 notamos que la irradiación de la mezcla AuNP/R6G con luz continua produjo fotodegradación en el máximo de absorción de la muestra, que incluye el máximo de absorción de la R6G y el LSPR de las AuNP. Este resultado era esperado ya que la R6G sufre fotodegradación bajo esta irradiación. Dado que la R6G se fotodegrada pero las AuNP no, es de esperar que la fotodegradación que se observa en la muestra sea debido a la R6G. Como la R6G bajo la irradiación continua reaccionó con el ABMA y FA, es de esperar entonces que, aunque las AuNP no reaccionen, la mezcla también lo haga como ocurrió. Al comparar los porcentajes de degradación del ABMA o el incremento de la señal en el caso del FA, entre la R6G y la mezcla AuNP/R6G bajo la irradiación que nos ocupa (continua), se observa que los porcentajes de variación son siempre menores en la mezcla (en comparación a la R6G, aun cuando en ambas muestras hay la misma cantidad de R6G. Este resultado indica que, aunque la luz interactúa con ambos componentes, lo hace preferentemente con la AuNP.

A partir de la tabla 3 se observa que la irradiación de la mezcla con luz pulsada de 532 nm produjo, al igual que con luz continua, fotodegradación en todas las muestras irradiadas, resultado esperado ya que las AuNP y la R6G de manera individual también sufrieron degradación bajo esta irradiación. La mezcla, al igual que las AuNP reaccionó con el DCPIP. Aunque la R6G reaccionó con el FA bajo irradiación pulsada a 532 nm, la mezcla no lo hizo, siendo esta otra evidencia de que la interacción de la luz es mayoritariamente con la AuNP. Aunque la mezcla y la R6G bajo irradiación continua reaccionaron con el ABMA, la mezcla no reaccionó con este indicador bajo irradiación pulsada de 532 nm, como tampoco lo había hecho la R6G bajo la misma irradiación. La mezcla reaccionó con el FA bajo irradiación continua y no lo hizo bajo irradiación pulsada, y para este comportamiento no tenemos una explicación clara. Entendemos que en la mezcla la luz interactúa más con la AuNP que con la R6G, pero si hubo reacción con luz continua entre la mezcla y el FA la esperábamos también con la pulsada, pero esto no ocurrió. Tal parece que el proceso de recuperación de la muestra entre pulso y pulso en la irradiación pulsada no favoreció la reacción con el FA, cosa que ocurrió en la irradiación continua pues la muestra es irradiada en todo momento.

Reacciones ocurridas con láser pulsado de 532 nm (efecto lineal) y el pulsado de 1064 nm (efecto no lineal – multifotónico)

La figura 2 muestra esquemáticamente la absorción lineal y multifotónica de fotones, efectos que ocurren bajo irradiación pulsada con 532 nm y 1064 nm respectivamente. La tabla 3 muestra que excepto dos reacciones que ocurrieron a 1064 nm y no a 532 nm, todas las ocurridas a 532 nm también ocurrieron a 1064 nm. Las dos reacciones extras ocurridas a 1064 nm son AuNP+FA y R6G+DCPIP. La intensidad de fotones empleada en la irradiación pulsada a 1064 nm es mucho mayor que la empleada en la pulsada 532 nm, esta diferencia podría explicar dichas reacciones, sobre todo porque ocurrieron en muestras que no son la mezcla AuNP/R6G. Todas las reacciones ocurridas en la irradiación pulsada de 532 nm en la muestra, ocurrieron también en la irradiación a 1064 nm.

Consideraciones generales

La irradiación de AuNP mostró una dependencia clara de la longitud de onda y el tipo de láser. Con láser continuo de 532 nm, las AuNP demostraron estabilidad óptica, lo que sugiere una menor interacción con el medio y una ausencia de cambios significativos en su estructura. En contraste, la irradiación con láser pulsado de 532 nm y 1064 nm resultó en una disminución considerable de la intensidad de LSPR, indicando una fragmentación de las AuNP, probablemente debido a procesos de cavitación y ablación. Esto se alinea con estudios previos que sugieren una mayor susceptibilidad de las AuNP a procesos de fragmentación bajo irradiación pulsada

Los resultados obtenidos con las combinaciones de AuNP y PS, como R6G, indica que la presencia de AuNP puede potenciar la producción de especies reactivas mediante la transferencia electrones. Esto es particularmente evidente en la fotodegradación del DCPIP observada en la mezcla AuNP/R6G bajo las tres irradiaciones realizadas. Este resultado destaca el potencial de las AuNP en aplicaciones donde la generación controlada de especies reactivas (no necesariamente de oxígeno) es deseada, como en la PDT.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden tener implicaciones importantes en aplicaciones fototérmicas y fotodinámicas, donde la producción controlada de especies reactivas y el incremento controlado de la temperatura es crucial. Además, el estudio de la estabilidad y la fotodegradación de los compuestos bajo diferentes condiciones de irradiación es relevante para el desarrollo de nuevas terapias basadas en luz.

Capítulo 7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones a las que se arriba en este trabajo son las siguientes:

- El láser continuo mostró que la R6G, al absorber luz continuamente, se excita hasta llegar al cruce intersistema y genera oxígeno singlete. Sin embargo, este fenómeno no se observa con el láser pulsado, posiblemente debido a que los pulsos no permiten una excitación suficiente para que ocurra la reacción de transferencia (tipo I).
- La excitación de la R6G no produce especies reactivas de oxígeno como el ion radical superóxido o hidroxilo, ya que el DCPIP no se decoloró ni bajo irradiación continua ni bajo pulsada de 532 nm.
- La excitación de la R6G produce reacciones de transferencia con el ácido fólico con los tres láseres. Dicha reacción no se observó en la mezcla bajo ningún tipo de irradiación. Esto indica que en la mezcla hubo menos interacción de la luz con la R6G.
- La irradiación de las AuNP no produce oxígeno singlete ni especies reactivas, ni reacciones de transferencia por excitación de la AuNP, no hay reacción bajo luz continua. Bajo luz pulsada hay producción de especies reactivas reductoras probablemente debido a la fragmentación de las AuNP.
- Los resultados indican que la luz interactúa de manera preferente con la AuNP y en menor medida con la R6G cuando están en la muestra.
- La irradiación de la mezcla AuNP(20 nm)/R6G con luz continua de 532 nm produciría oxígeno singlete, reacciones de transferencia con el ácido fólico (útiles en medios hipóxicos) e incrementaría la temperatura. Su desventaja es que se requiere introducir una sonda que lleve la luz al tejido de interés.
- La irradiación de la mezcla con luz pulsada produciría especies reactivas reductoras (probablemente electrones debido a la fragmentación de las AuNP), e incrementaría la temperatura. Tiene la ventaja que la irradiación a 1064 nm puede realizarse, en teoría, de manera externa.
- La mezcla tiene propiedades que permiten utilizarla como agente terapéutico en terapias híbridas PDT/PTT bajo irradiación con 532 nm (continua o pulsada) y 1064 nm pulsada.

Capítulo 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yassine AA, Lo WCY, Saeidi T, Ferguson D, Whyne CM, Akens MK, et al. Photodynamic therapy outcome modelling for patients with spinal metastases: a simulation-based study. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
2. Bulavinets T, Kulpa-Greszta M, Tomaszewska A, Kus-Liśkiewicz M, Bielatowicz G, Yaremchuk I, et al. Efficient NIR energy conversion of plasmonic silver nanostructures fabricated with the laser-assisted synthetic approach for endodontic applications. *RSC Adv*. 2020 Oct 23;10(64):38861–72.
3. Croissant JG, Durand JO. Mesoporous Silica-Based Nanoparticles for Light-Actuated Biomedical Applications via Near-Infrared Two-Photon Absorption. In: *Enzymes*. Academic Press; 2018. p. 67–99.
4. Amendola V, Pilot R, Frasconi M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. Vol. 29, *Journal of Physics Condensed Matter*. Institute of Physics Publishing; 2017.
5. Sarfraz N, Khan I. Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications. Vol. 16, *Chemistry - An Asian Journal*. John Wiley and Sons Ltd; 2021. p. 720–42.
6. Chen X, Li QW, Wang XM. Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics. In: *Precious Metals for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd; 2014. p. 163–76.
7. Huang X, Kang B, Qian W, Mackey MA, Chen PC, Oyelere AK, et al. Comparative study of photothermal lysis of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers. *J Biomed Opt*. 2010;15(5):058002.
8. He Y, Gao Q, Lv C, Liu L. Improved photothermal therapy of brain cancer cells and photogeneration of reactive oxygen species by biotin conjugated gold photoactive nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2021 Feb 1;215.
9. Guerrero-Florez V, Mendez-Sanchez SC, Patrón-Soberano OA, Rodríguez-González V, Blach D, Fernando Martínez O. Gold nanoparticle-mediated generation of reactive oxygen species during plasmonic photothermal therapy: A comparative study for different particle sizes, shapes, and surface conjugations. *J Mater Chem B*. 2020 Apr 14;8(14):2862–75.
10. Jiménez-Mancilla NP, Aranda-Lara L, Morales-Ávila E, Camacho-López MA, Ocampo-García BE, Torres-García E, et al. Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2021 Mar 15;409.
11. Raes L, van Heck C, Michiels J, Stremersch S, Fraire JC, Brans T, et al. Gold nanoparticle-mediated photoporation enables delivery of macromolecules over a wide range of molecular weights in human CD4+ T cells. *Crystals (Basel)*. 2019 Aug 1;9(8).
12. Gutierrez-Cruz, Ancira-Cortez, Camacho-López A, Isaac-Olivé. Calentamiento de nanopartículas de oro inducido por excitación fotónica y multifotónica.

13. Cruz-Rodríguez JC, Camacho-López MA, Torres-García E, Aranda-Lara L, Morales-Avila E, Díaz-Sánchez LE, et al. Characterization of the absorption properties of 5 nm spherical gold nanoparticles functionalized with dodecanethiol and without functionalization with potential therapeutic applications. *Phys Scr.* 2023 May 1;98(5).
14. Kessel D, Oleinick NL. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. Vol. 94, *Photochemistry and Photobiology*. Blackwell Publishing Inc.; 2018. p. 213–8.
15. Chen B, Agostinis P, De Witte PA. Synergistic effect of photodynamic therapy with hypericin in combination with hyperthermia on loss of clonogenicity of RIF-1 cells. Vol. 18, *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 2001.
16. Overchuk M, Weersink RA, Wilson BC, Zheng G. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine. Vol. 17, *ACS Nano*. American Chemical Society; 2023. p. 7979–8003.
17. Jahn B, Jonasson NSW, Hu H, Singer H, Pol A, Good NM, et al. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2020 Mar 1;25(2):199–212.
18. Quintos-Meneses HA, Aranda-Lara L, Morales-Ávila E, Torres-García E, Camacho-López MÁ, Sánchez-Holguín M, et al. In vitro irradiation of doxorubicin with ¹⁸F-FDG Cerenkov radiation and its potential application as a theragnostic system. *J Photochem Photobiol B*. 2020 Sep 1;210.
19. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. Vol. 1, *Journal of Advanced Research*. 2010. p. 13–28.
20. Tocho JO. Libros de Cátedra.
21. Pratheesh Kumar S, Elangovan S, Mohanraj R, Sathya Narayanan V. Significance of continuous wave and pulsed wave laser in direct metal deposition. In: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd; 2021. p. 8086–96.
22. Klimenko V V., Bogdanov AA, Knyazev NA, Rusanov AA, Dubina M V. Different photodynamic effect between continuous wave and pulsed laser irradiation modes in k562 cells in vitro. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2014.
23. Nomura S, Morimoto Y, Tsujimoto H, Arake M, Harada M, Saitoh D, et al. Highly reliable, targeted photothermal cancer therapy combined with thermal dosimetry using a near-infrared absorbent. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
24. Han HS, Choi KY. Advances in nanomaterial-mediated photothermal cancer therapies: Toward clinical applications. Vol. 9, *Biomedicines*. MDPI AG; 2021.
25. Estelrich J, Antònia Busquets M. Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy. Vol. 23, *Molecules*. MDPI AG; 2018.

26. Zhao L, Zhang X, Wang X, Guan X, Zhang W, Ma J. Recent advances in selective photothermal therapy of tumor. Vol. 19, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd; 2021.
27. Estelrich J, Antònia Busquets M. Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy. Vol. 23, *Molecules*. MDPI AG; 2018.
28. Dąbrowski JM, Arnaut LG. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. Vol. 14, *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry; 2015. p. 1765–80.
29. Wilson BC, Weersink RA. The Yin and Yang of PDT and PTT. Vol. 96, *Photochemistry and Photobiology*. Blackwell Publishing Inc.; 2020. p. 219–31.
30. Kim HS, Lee DY. Near-infrared-responsive cancer photothermal and photodynamic therapy using gold nanoparticles. Vol. 10, *Polymers*. MDPI AG; 2018.
31. Bekmukhametova A, Ruprai H, Hook JM, Mawad D, Houang J, Lauto A. Photodynamic therapy with nanoparticles to combat microbial infection and resistance. Vol. 12, *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry; 2020. p. 21034–59.
32. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. Vol. 115, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2015. p. 1990–2042.
33. Blum NT, Zhang Y, Qu J, Lin J, Huang P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. Vol. 8, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
34. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. Vol. 85, *Photochemistry and Photobiology*. 2009. p. 1053–74.
35. Macdonald - Unknown - Basic principles of photodynamic therapy-annotated.
36. Calin MA, Parasca S V. Photodynamic therapy in oncology. In: *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. National Institute of Optoelectronics; 2006. p. 1173–9.
37. Cruz-Rodríguez JC, Camacho-López MA, Torres-García E, Aranda-Lara L, Morales-Avila E, Díaz-Sánchez LE, et al. Characterization of the absorption properties of 5 nm spherical gold nanoparticles functionalized with dodecanethiol and without functionalization with potential therapeutic applications. *Phys Scr*. 2023 May 1;98(5).
38. Hirakawa K, Ito H. Rhodamine-6G can photosensitize folic acid decomposition through electron transfer. *Chem Phys Lett*. 2015 May 1;627:26–9.
39. Zhao L, Zhang X, Wang X, Guan X, Zhang W, Ma J. Recent advances in selective photothermal therapy of tumor. Vol. 19, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd; 2021.
40. Milena S, Gallón N, Serna J. Activity of sulfated polysaccharides from microalgae *Porphyridium cruentum* over degenerative mechanisms of the skin View project Optical encryption and multiplexing View project [Internet]. 2016. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/260413196>

41. Gao Q, Zhang J, Gao J, Zhang Z, Zhu H, Wang D. Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. Vol. 9, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
42. Peiris S, McMurtrie J, Zhu HY. Metal nanoparticle photocatalysts: Emerging processes for green organic synthesis. *Catal Sci Technol*. 2016;6(2):320–38.
43. De Freitas LF, Varca GHC, Batista JGDS, Lugão AB. An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies. Vol. 8, *Nanomaterials*. MDPI AG; 2018.
44. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett*. 2005 May;5(5):829–34.
45. Song J, Zhou J, Duan H. Self-assembled plasmonic vesicles of SERS-encoded amphiphilic gold nanoparticles for cancer cell targeting and traceable intracellular drug delivery. *J Am Chem Soc*. 2012 Aug 15;134(32):13458–69.
46. Shukla R, Chanda N, Zambre A, Upendran A, Katti K, Kulkarni RR, et al. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198 AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1121174109
47. Zhang Y, Qian J, Wang D, Wang Y, He S. Multifunctional gold nanorods with ultrahigh stability and tunability for in vivo fluorescence imaging, SERS detection, and photodynamic therapy. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2013 Jan 21;52(4):1148–51.
48. Zhu J, Zheng L, Wen S, Tang Y, Shen M, Zhang G, et al. Targeted cancer theranostics using alpha-tocopheryl succinate-conjugated multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2014;35(26):7635–46.
49. Topete A, Alatorre-Meda M, Iglesias P, Villar-Alvarez EM, Barbosa S, Costoya JA, et al. Fluorescent drug-loaded, polymeric-based, branched gold nanoshells for localized multimodal therapy and imaging of tumoral cells. *ACS Nano*. 2014 Mar 25;8(3):2725–38.
50. Tao Y, Ju E, Ren J, Qu X. Bifunctionalized mesoporous silica-supported gold nanoparticles: Intrinsic oxidase and peroxidase catalytic activities for antibacterial applications. *Advanced Materials*. 2015 Feb 1;27(6):1097–104.
51. Muthu MS, Kutty RV, Luo Z, Xie J, Feng SS. Theranostic vitamin E TPGS micelles of transferrin conjugation for targeted co-delivery of docetaxel and ultra bright gold nanoclusters. *Biomaterials*. 2015 Jan 1;39:234–48.
52. Hao Y, Zhang B, Zheng C, Ji R, Ren X, Guo F, et al. The tumor-targeting core-shell structured DTX-loaded PLGA@Au nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. *Journal of Controlled Release*. 2015 Dec 28;220:545–55.
53. Cantelli A, Battistelli G, Guidetti G, Manzi J, Di Giosia M, Montalti M. Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics. *Dyes and Pigments*. 2016 Dec 1;135:64–79.
54. Hirakawa K, Ito H. Rhodamine-6G can photosensitize folic acid decomposition through electron transfer. *Chem Phys Lett*. 2015 May 1;627:26–9.

55. Nakamura Y, Nagaya T, Sato K, Okuyama S, Ogata F, Wong K, et al. Cerenkov radiation-induced photoimmunotherapy with ¹⁸F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine*. 2017 Sep 1;58(9):1395–400.
56. Kotagiri N, Sudlow GP, Akers WJ, Achilefu S. Breaking the depth dependency of phototherapy with Cerenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. *Nat Nanotechnol*. 2015 Apr 9;10(4):370–9.
57. Carrasco E, Stockert JC, Juarranz A, Blázquez-Castro A. Plasmonic Hot-Electron Reactive Oxygen Species Generation: Fundamentals for Redox Biology. Vol. 8, *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A.; 2020.
58. Chadwick SJ, Salah D, Livesey PM, Brust M, Volk M. Singlet oxygen generation by laser irradiation of gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*. 2016 May 19;120(19):10647–57.
59. Yang Y, Hu Y, Du H, Ren L, Wang H. Colloidal plasmonic gold nanoparticles and gold nanorings: Shape-dependent generation of singlet oxygen and their performance in enhanced photodynamic cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2018 Apr 5;13:2065–78.
60. Gutierrez-Cruz FV, Ancira-Cortez A, Camacho-López MÁ, Isaac-Olivé K, Jiménez-Mancilla N. Calentamiento de nanopartículas de oro inducido por excitación fotónica y multifotónica. *CIENCIA ergo-sum*. 2022 Aug 30;30(2).