



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**



**DIPF**  
POSGRADO  
INGENIERÍA

Síntesis de compuesto nanoestructurado para la producción de  
especies reactivas de oxígeno con aplicación en actividad  
fotodinámica

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Nanotecnología

**Presenta:**

Luis Adrián Ontiveros Gómez

**Dirigido por:**

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Enero 2023)  
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Síntesis de compósito nanoestructurado para la  
producción de especies reactivas de oxígeno con  
aplicación en actividad fotodinámica

**por**

Luis Adrián Ontiveros Gómez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** IGMAC-213030-0123-123



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**



**DIPF**  
POSGRADO  
INGENIERÍA

Síntesis de compuesto nanoestructurado para la producción de especies reactivas de oxígeno con aplicación en actividad fotodinámica

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Nanotecnología

**Presenta:**

Luis Adrián Ontiveros Gómez

**Dirigido por:**

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Dr. Jose Alberto Rodríguez Morales

Secretario

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Vocal

Dra. Liliana España Sánchez

Sinodal

Dra. Minerva Guerra Balcázar

Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Enero 2023)

México

## Agradecimientos

*Primero que nada, quiero agradecer a mis padres por siempre apoyarme y hacerme ver que la vida siempre está llena de retos y soluciones. A ustedes con todo mi cariño.*

*A mis sinodales, que sin sus observaciones previas ,el trabajo aquí presente, no hubiera sido lo que es ahora. Siempre tendré en cuenta sus consejos.*

*A los maestros Tonantzi Moreno, Omar Fonseca y Raúl Saleme por su apoyo en las caracterizaciones y estudios de MTT, HR-SEM y TGA, respectivamente.*

*A mi hermano, por siempre impulsarme a estudiar y que sin sus buenos consejos durante toda mi vida, no hubiera podido animarme a estudiar una maestría y ser parte de lo que soy hoy en día.*

*A mi prometida, Ale. Ella es la razón por la que siempre quiera mejorar y superarme día a día. Hermosa, este trabajo es una pequeña muestra de lo que he logrado gracias a tu apoyo incondicional. Lo estamos logrando y lo vamos a hacer.*

*Por último, quiero agradecer a la Univesidad Autónoma de Querétaro por recibirme en el posgrado y hacerme sentir que es mi segunda casa. Siempre llevaré conmigo en lema de "Educo en la verdad y en el honor".*

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	4
RESUMEN.....	5
Abstract.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES.....	7
Terapia Fotodinámica (PDT).....	8
Mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno.....	9
Fotosensibilizadores.....	12
Primera generación de fotosensibilizadores.....	13
Segunda generación de fotosensibilizadores.....	14
Tercera generación de fotosensibilizadores.....	17
Cuarta generación de fotosensibilizadores.....	21
Quitina y quitosano.....	24
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	27
Materiales.....	28
Síntesis.....	29
Caracterización fisicoquímica.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Síntesis.....	34
FT-IR.....	36
UV-VIS.....	40
SEM y HR-SEM.....	44
TGA.....	49
Rendimiento cuántico de $^1O_2$ .....	52
Viabilidad celular (MTT).....	56
CONCLUSIÓN.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## RESUMEN

En el siguiente trabajo de investigación, se presenta la elaboración de un compuesto nanoestructurado de nanoesferas de carbono y nanopartículas de oro soportado en una matriz de quitosano-GMA. Se observó por medio de las caracterizaciones de FT-IR que se conservaron los enlaces C-O-C en los espectros, indicando que la matriz de quitosano se conservó; de igual manera, se pudo distinguir las atenuaciones de las absorbancias de los grupos NH<sub>2</sub> en las conjugaciones con las nanopartículas, indicando la unión química con esta al igual que con las nanoesferas en donde las atenuaciones se pueden ver en la zona de los dobles enlaces; el UV-VIS y el SEM demostraron que los compósitos no alteraron la estructura de la matriz ni del plasmón característico de las AuNPs en las muestras de Q-GMA-CNS-AuNPs a 0.4 y 0.6 mM, los cuales son considerados como fotosensibilizadores potenciales para su aplicación en terapia fotodinámica.

## Abstract

*In the present research work a thesis project is reported, which consists in the synthesis of a nanostructured composite based on carbon nanospheres and gold nanoparticles supported in a chitosan-GMA matrix. It was observed through the characterizations of FT-IR that the C-O-C tension groups were conserved, which indicates that there was no degradation of the biopolymer; also, it can be observed two attenuations: the NH<sub>2</sub> absorbencies when conjugated with gold nanoparticles, indicating a chemical bond with the chitosan matrix; and the double bond attenuation*

*when conjugated with the carbon nanospheres, which indicates, again, a chemical bond; the UV-VIS spectra and the SEM images, showed that the composites Q-GMA-CNS-AuNPs at 0.4 and 0.6 mM did not alter the matrix structure as well as the plasmon present in the gold nanoparticles. These are considered as potential photosensitizers for their application in photodynamic therapy.*

## INTRODUCCIÓN.

La terapia fotodinámica antimicrobiana (PDT) o inactivación fotodinámica (PDI), es un tratamiento poco invasivo para el cáncer y enfermedades benignas en el que se obtiene la destrucción de estas células no deseables, además de la inactivación de microorganismos patogénicos; se da a través de la activación de un fotosensibilizador (FS) por medio de radiación en la región visible o infrarroja que, con la presencia de oxígeno molecular, se tiene la producción de oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno; mismas que dañan, matan o inactivan células y microorganismos no deseables [1]. Los FS pueden presentar aplicaciones restringidas debido a efectos adversos tales como: fotosensibilidad cutánea, baja solubilidad acuosa y poca selectividad, por lo que su uso en nanosistemas basados en quitosano, al igual que el desarrollo de nuevos FS con propiedades optimizadas, es crucial para el mejoramiento de estos tratamientos [2].

Debido a las propiedades de actividad fotodinámica y buena citotoxicidad en células de cáncer presentadas por las nanoesferas de carbono y el acoplamiento sinérgico de las nanopartículas de oro con los fotosensibilizadores, se ha considerado el uso de ambas especies en conjunto para la síntesis del compuesto nanoestructurado con

actividad fotodinámica. De igual manera, el quitosano ha mostrado tener buena interacción con las nanoestructuras de carbono por medio de la conjugación química de los grupos amino del quitosano con los dobles enlaces C=C [3]; al soportar los FS en quitosano, se tiene que los parámetros fotofísicos y la estabilidad de los FS mejoran, reduciendo la posibilidad de generación de fotoproductos y vías de desactivación [4]. Debido a todas estas propiedades, se ha considerado al quitosano en el desarrollo del sistema quitosano-fotosensibilizador-nanopartículas para mejorar la acción fotodinámica en contra de células de cáncer.

## ANTECEDENTES.

El cancer de colon es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en México y es el responsable de más de 700,000 muertes al año en el mundo; se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células en cualquiera de las cuatro porciones de colon (ascendente, transverso, descendente y sigmoide) y en el recto [5]. Dentro de los principales tratamientos se tiene la cirugía radical, la cual consiste en el extirpación completa del tumor junto con una parte del intestino dañado [6]. La terapia de radiación, ha demostrado ocasionar daño al ADN de células, el cual provoca la inevitable muerte celular; la quimioterapia, tiene efectos de toxicidad y efectos adversos, que pueden disminuir la calidad de vida del paciente. Por lo mismo, se han buscado métodos alternativos para el tratamiento del cáncer, reducir los efectos secundarios, prevenir la recurrencia y metástasis de estos.

## Terapia Fotodinámica (PDT).

En sus inicios, la terapia fotodinámica (PDT) se conocía como fotoquimioterapia, sin embargo, el término se modificó para resaltar la naturaleza poco dañina del fotosensibilizador (FS) utilizado [7]; es una terapia no invasiva usada para enfermedades no oncológicas, así como de cáncer de distintos tipos; se ha utilizado con éxito en dermatología, oncología, ginecología y urología. Se basa en la aplicación local o sistémica de un compuesto fotosensible, conocido como fotosensibilizador, el cual se acumula en tejidos no deseados; absorben luz a determinada longitud de onda ( $\lambda$ ), iniciando la activación de este, seguido de la inactivación selectiva de células o bacterias inapropiadas.

Este tratamiento fue observado por primera vez por von Tappeiner y Oscar Raab durante sus investigaciones de la influencia de acridina y derivados en infusorias junto con otros protozoan; incubaron estos últimos *in vitro* con los colorantes mencionados a diferentes concentraciones para determinar el umbral de toxicidad, los cuales demostraron variaciones con la presencia de la luz diurna. Se conocía que estos compuestos eran capaces de absorber luz y emitir fluorescencia, por lo que se especuló que este efecto tóxico presente era mediado por este fenómeno, llamándolo terapia fotodinámica [8].

La terapia fotodinámica tiene los siguientes requerimientos:

1. Fotosensibilizador (FS).
2. Luz (a determinada  $\lambda$ ).
3. Oxígeno.

Se usa en tratamientos de inflamación y es una alternativa en el tratamiento de infecciones de bacterias resistentes [9].

### Mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno.

La terapia fotodinámica usa fotosensibilizadores (FS) que son activados mediante la absorción de luz para iniciar un estado excitado, seguido por la transición a un estado de triplete excitado de larga duración. Este estado triplete, puede someterse a una reacción fotoquímica con presencia de oxígeno, para formar especies reactivas de oxígeno (ROS) al igual que oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), que son capaces de destruir células de cáncer, microbios patogénicos y tejidos no deseados.

Los fotosensibilizadores, tienen un arreglo particular de los electrones en sus orbitales moleculares, donde en estado fundamental, tienen pares de electrones con espines opuestos en orbitales de baja energía; la absorción de luz fomenta la excitación de un electrón a orbitales de mayor energía sin cambio de espín. Este estado, denominado como singulete ( $S_1$ ) es un estado de poca duración (nanosegundos) dando como consecuencia que el FS pueda perder su energía regresando al estado fundamental, emitiendo luz (fluorescencia) o por calor. De manera alternativa, el estado  $S_1$ , puede pasar por un proceso conocido como cruzamiento de intersistema (*ISC*, por sus siglas en inglés), donde el espín del electrón excitado se invierte, siendo esta la razón de que este estado triplete ( $T_1$ ) sea de larga duración (microsegundos).

Del estado  $T_1$ , el FS se puede relajar al estado fundamental emitiendo luz (fosforescencia) o transfiriendo energía a otra molécula; también puede perder energía por conversiones internas o transiciones sin radiación durante una colisión

de moléculas. Mientras más dure el estado  $T_1$ , mayor será la probabilidad de colisionar con otras moléculas, resultando en la producción de especies reactivas químicas [10].

Como se puede observar en la Figura 1, las especies reactivas de oxígeno (ROS), se forman a través de dos mecanismos:

1. Tipo I: Se transfiere un electrón a un sustrato, dando como resultado la producción de radicales o iones radicales que interaccionan con oxígeno para generar especies citotóxicas, tales como el radical hidroxilo, aniones superóxidos y peróxido de hidrógeno.
2. Tipo II: El fotosensibilizador en estado de triplete excitado, participa con oxígeno triplete ( $^3O_2$ ), y a través de una transferencia de energía, se genera el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), siendo este último el responsable de los efectos en PDT [11], [12].

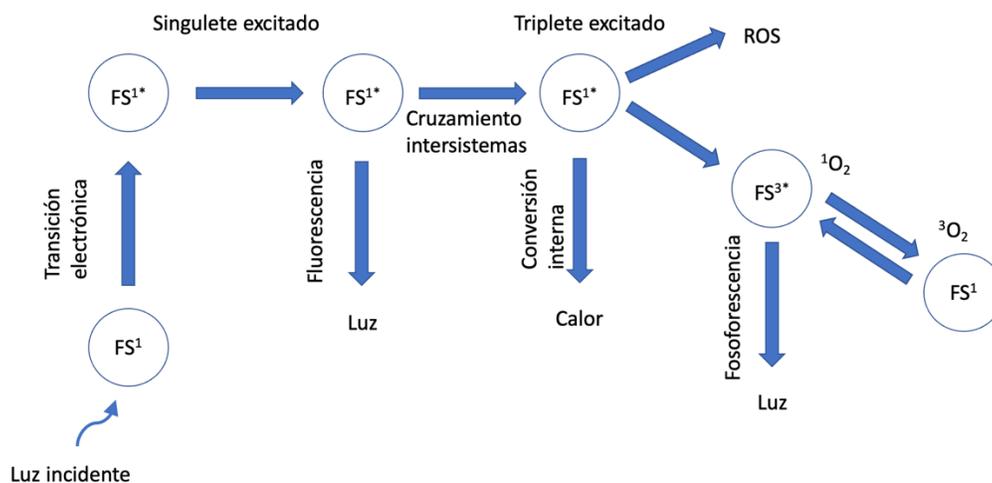


Figura 1. Esquema ilustrado de los mecanismos I y II para la obtención de ROS (Imagen adaptada de: [11]).

Por ende, tenemos tres procesos involucrados: radiativo (excitación y fluorescencia), no radiativo (*ISC*, conversión interna y fosforescencia) y *quenching*. Este último proceso incluye la transferencia de energía y carga así como la abstracción de hidrógeno y desactivación física (Tabla 1).

Tabla 1. Mecanismos de reacción de un FS en PDT [13].

Proceso	Paso	Reacción
Radiativo	Excitación	$FS(S_0) + h\nu \rightarrow FS(S_1)$
	Fluorescencia	$FS(S_1) \rightarrow FS(S_0) + h\nu_F$
No radiativo	<i>ISC</i>	$FS(S_1) \rightarrow FS(T_1)$
	Conversión interna	$FS(S_1) \rightarrow FS(S_0)$
	Fosforescencia	$FS(T_1) \rightarrow FS(S_0) + h\nu_p$
<i>Quenching</i>	Transferencia de energía	$FS(T_1) + {}^3O_2 \rightarrow FS(S_0) + {}^1O_2$
	Transferencia de electrones	$FS(T_1) + {}^3O_2 \rightarrow FS^+ + O_2^-$
	Desactivación física	$FS(T_1) + {}^3O_2 \rightarrow FS(S_0) + {}^3O_2$

Una vez en el cuerpo, los fotosensibilizadores actúan en tres distintas maneras en las células no deseadas:

1. Daño celular.
2. Daño vascular.
3. Activación del sistema inmune.

En el daño celular, se tiene la interacción con la mitocondria, donde se estimula la apoptosis por medio de la liberación de citocromas c; de igual manera, al interactuar con el citoplasma se estimula el mismo mecanismo con el daño a la proteína NF- $\kappa$ B, la cual es responsable de la transcripción del ADN; al tener contacto con el retículo endoplasmático se estimula la autofagia a través de la activación de la

proteína mTOR, responsable de la transcripción del ARN-m; por otra parte, también se estimula la desintegración de la membrana celular, provocando necrosis; en el daño vascular, se tiene la disminución local del oxígeno y nutrientes, resultando en apoptosis, necrosis o autofagia. Por último, al activar el sistema inmune, se activan las células T, mismas que estimulan la apoptosis [14].

Los tratamientos contra el cáncer alteran muchas expresiones de funciones celulares, incluyendo las proteínas de respuesta contra estrés, conocidas como proteínas de choque térmico (*HSPs*, por sus siglas en inglés); estas, tienen un comportamiento dual: tienen propiedades anticáncer, al igual que asisten la supervivencia de las células y resistencia a la apoptosis a través de reparaciones y replegamiento de péptidos mal doblados o dañados, provocando mecanismos de resistencia celular, los cuales pueden afectar el rendimiento de la *PDT* [15].

### Fotosensibilizadores.

Un fotosensibilizador ideal, se distingue por tener [9], [16]:

1. Gran pureza química.
2. Estabilidad a temperatura ambiente.
3. Fotosensibles únicamente con la presencia de luz.
4. Absorción mínima a 400 a 600 nm.
5. Bandas de absorción no superpuestas con melatonina o hemoglobina.
6. Soluble en el cuerpo.
7. Selectividad.
8. Económico.

La mayoría de los fotosensibilizadores tienen estructuras tetrapirrólicas cíclicas tales como: porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, entre otras [10].

## Primera generación de fotosensibilizadores

El primer FS utilizado fue la hematoporfirina (Hp), el cual es una mezcla de compuestos porfirínicos. La purificación y modificación de la Hp, llevó al descubrimiento de un compuesto derivado, denominado como HpD, el cual mostró tener mejores propiedades en cuanto a selectividad tumoral, induciendo una baja en la fotosensibilidad de la piel en comparación con Hp. Su síntesis consiste en un tratamiento con una mezcla de ácido sulfúrico, seguido de una precipitación una vez neutralizado para estimular la formación de una serie de ésteres de porfirinas con cadenas laterales de los grupos  $-\text{CH}=\text{CH}_2$  y  $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ ; estos productos se disuelven en bases diluidas para generar soluciones inyectables [17].

Seguido a esto, se introdujo la mezcla de dímeros de Hp junto con oligómeros de HpD, los cuales se obtienen de sangre bovina, teniendo como resultado la Fotofrina [18]. Su componente principal es la dihematoporfirina y ha sido probado con cáncer de pulmón, colorrectal, mama, oral y de ovarios [19]–[23]

Los compuestos de esta generación presentan ciertas desventajas, tales como: baja pureza y penetración en los tejidos debido a un máximo de absorción en la zona de los 630 nm.; además, se presentó hipersensibilidad a la luz por varias semanas, debido a la vida media prolongada del FS y su acumulación en la piel. Debido a estas desventajas, se tuvo la necesidad de investigar nuevos compuestos y desarrollar la segunda generación de fotosensibilizadores [9].

## Segunda generación de fotosensibilizadores

Esta generación de fotosensibilizadores, incluyen derivados de hematoporfirinas y fotosensibilizadores sintéticos tales como: benzoporfirinas, clorinas, ácido 5-aminolevulinico, texapirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas y colorantes sintéticos.

Este tipo de fotosensibilizadores, se caracterizan por una alta pureza y mayor rendimiento de oxígeno singulete, además de mayor penetración en los tejidos, debido a que tienen su máximo de absorción en la zona de los 650-800 nm; tienen efectos secundarios menores, mayor especificidad de tejidos cancerígenos y una mayor eliminación del fotosensibilizador en el cuerpo [9].

El ácido 5-aminovulénico (ALA) es un compuesto importante por su uso como precursor de la Protoporfirina IX; se puede usar de manera tópica u oral en aplicaciones clínicas en gliomas humanos y carcinoma de colon, al igual que el mejoramiento del contraste de cáncer de cerebro y gliomas malignos [24]–[28].

Las texapirinas son porfirinas tetrapirrólicas de tipo pensata con energías de absorción ópticas bajas para la formación de estados excitales triplete ( $T_1$ ) con alto rendimiento cuántico de oxígeno singulete. Se ha probado exitosamente en *PDT* con células de cáncer de mama [29]; por otro lado, las clorinas tienen aplicación como fármacos citotóxicos debido a que cuentan con bandas de absorción de tipo Soret y Q a 415 y 650 nm, respectivamente [30].

Las bacterioclorinas contienen un sistema tetrapirrólico completo con dos pirroles reducidos en los lados opuestos del macrociclo; son compuestos que absorben en el infrarrojo cercano (*NIR*), debido a una reducción progresiva de  $2e^-/2H^+$ , la cual cambia el espacio prohibido de los orbitales *HOMO* y *LUMO* que, después de la reacción la absorción en el *NIR* incrementa, lo que permite que la radiación penetre más en los tejidos; de igual manera, tienen baja toxicidad en oscuro y alta fototoxicidad en células de varios tipos de cáncer [1], [31].

Las ftalocianinas tienen propiedades superiores de síntesis ya que ofrecen la posibilidad de modificaciones para alterar su hidrofiliidad, estabilidad y absorción a longitudes de onda mayores, estimulando altos coeficientes de extinción y rendimientos de  $^1O_2$  [32]. Estructuralmente, se asemejan a las porfirinas con la diferencia de que en este compuesto se cuenta con un anillo del macrociclo mayor. De igual manera, estas estructuras tienen un metal de coordinación en su interior, lo cual ofrece la posibilidad de controlar sus características físicas por medio de modificaciones sintéticas [33], [34]. Los complejos que forma con los metales, difiere de acuerdo a si son metales de capa abierta o cerrada: cuando son de capa abierta (o paramagnéticos), se tienen complejos con excitaciones de  $T_1$  menores, debido a su incremento del intercruciamiento intersistemal al estado basal; algunos ejemplos son el  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $VO^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$  y  $Pd^{2+}$ ; al tener metales de capa cerrada (o diamagnéticos), se producen altos rendimientos de  $T_1$  con tiempos de vida mayores. Estos metales son  $Zn^{3+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Ga^{3+}$ [35].

Por último, tenemos a los colorantes sintéticos, los cuales son utilizados en la terapia de inactivación fotodinámica (*aPDI*, por sus siglas en inglés), donde sus aplicaciones en *PDT* incluyen a las sales de fenotiazina, azul de toluidina, fenotiazina y rosa de Bengala. Estos colorantes contienen orbitales deslocalizados, los cuales aportan una buena absorción en el rango visible; algunos contienen metales pesados en su estructura, confiriendo incrementos en su rendimiento de  $T_1$  al igual que facilidades en el *ISC* [36]–[39].

Sus desventajas radican en su baja solubilidad en agua, la cual es un factor limitante en la administración intravenosa de este; de igual manera, tiene poca especificidad hacia las células tumorales además de una tendencia a agregarse en solución, por lo que se lleva a investigaciones de nuevos métodos de transporte de fármacos.

En la Figura 2, podemos ver algunos ejemplos de los fotosensibilizadores más característicos de estas dos primeras generaciones.

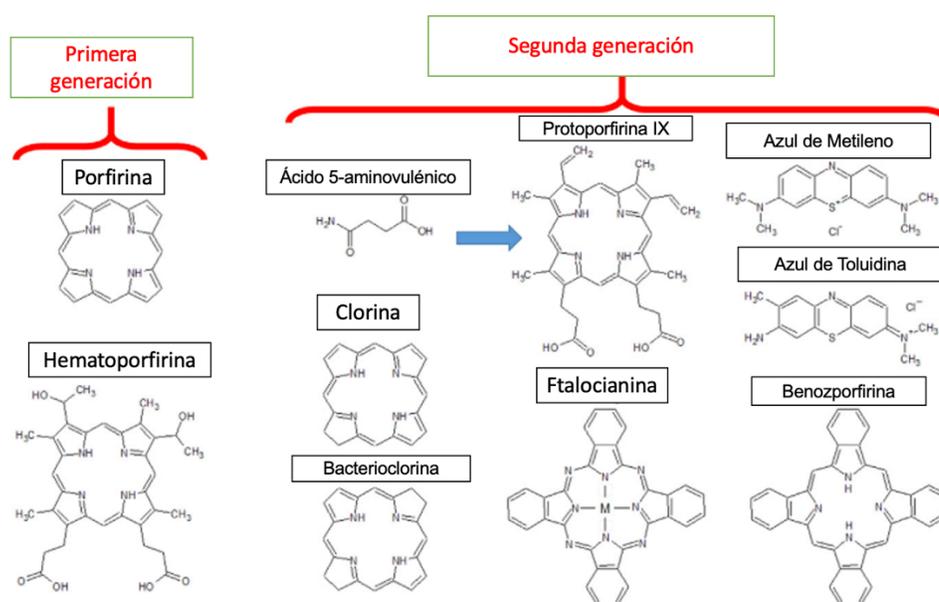


Figura 2. Ejemplos de fotosensibilizadores de la 1<sup>er</sup> y 2<sup>da</sup> generación (Imagen adaptada de: [40]).

### Tercera generación de fotosensibilizadores

El objetivo de los fotosensibilizadores de tercera generación es incrementar la selectividad de estos a través de ciertas modificaciones: combinación con moléculas receptoras, anticuerpos monoclonales dirigidos a un antígeno específico, uso de marcadores de superficie tumorales como receptores de factor de crecimiento o receptores de transferina u otras hormonas. Dichas modificaciones pueden ser obtenidas por medio del encapsulamiento o inmovilización en nanoplataformas, los cuales pueden adquirir distintos mecanismos de selectividad [41], [42].

### Nanopartículas

Las nanopartículas se definen como partículas de tamaño submicrométrico ( $\times 10^{-9}$ ), lo que les confiere ventajas al ser usadas como transportadores de fármacos. Se pueden usar como protección contra enzimas degradantes y como controladores de dosificado en células marcadas. Estas propiedades se deben a las dimensiones de las nanopartículas, ya que les permite penetrar en las células además de dar fotoestabilidad y biocompatibilidad a través de caminos metabólicos naturales [43]. Su alta área superficial, es de mucha utilidad en *PDT* debido a que incrementa efectivamente la concentración del FS que puede ser transportado además de conferir anfifilicidad, permitiendo el transporte sin daño en el torrente sanguíneo. De igual manera, confiere permeabilidad aumentada y un efecto de retención conocido como *EPR* (por sus siglas en inglés), promoviendo la retención del FS en el tejido marcado [44]. Algunos ejemplos de sus aplicaciones, son las nanopartículas de cianoacrilato con tamaños entre 150 y 250 nm sintetizados a través de una polimerización interfacial en una emulsión de agua y aceite para la encapsulación

de ftalocianina o derivados de naftalocianina, obteniendo buenos resultados en su aplicación en *PDT* en diferentes zonas malignas del cuerpo [45]; otra aplicación es el uso de PLGA y nanopartículas de dipirrometano de boro diodinado con un recubrimiento de quitosano, el cual demostró mejoras en la fotocitotoxicidad y selectividad sobre células cancerígenas murinas (4T1) y pecho (MDA-MB-231) [46].

### Fullerenos

Los fullerenos fueron sintetizados por primera vez por Kroto *et al.* a través de la vaporización inducida de laser de grafito con un flujo de alta densidad de helio [47]. La estructura de esta forma alotrópica del carbono, consiste en átomos de carbono unidos en anillos de pentágonos y hexágonos, donde los compuestos más comunes son los  $C_{60}$  y el  $C_{70}$  con deficiencia de un electrón, favoreciendo su interacción con compuestos que poseen grupos donadores de electrones [48], [49]. Los derivados de este nanomaterial son empleados como vehículos apropiados para el transporte de fármacos en consideración de sus propiedades fotoquímicas, baja toxicidad sistémica y propiedades de fluorescencia superiores, por lo que son utilizados satisfactoriamente para el transporte de fármacos de quimioterapia, FS o agentes fototérmicos aumentando los efectos contra el cáncer [50]; como se ha visto con un híbrido de porfirina-fullereno con solubilidad aumentada y habilidades de complejamiento de catión superiores y con un alto rendimiento cuántico de oxígeno singulete [51].

### Grafeno

El grafeno consiste en una o varias laminas de carbono arregladas en anillos de seis miembros con el grosor de un átomo de C con hibridación  $sp^2$ ; posee una gran área superficial ya que su superficie planar permite usar las dos superficies para sorción; tiene una alta fuerza mecánica, elasticidad y conducción térmica [52]. Su forma oxidada (GO), tiene mejor solubilidad en medios acuosos, una absorbancia intrínseca en el *NIR*, fácil modificación de superficie y biocompatibilidad, lo cual permite su uso en numerosas aplicaciones biológicas, por lo que en *PDT* ha sido utilizado para entregar FS a células tumorales y mejoramiento del efecto, dañando células malignas, como se ha visto con la funcionalización de las láminas con el copolímero plurónico conjugado con azul de metileno (por medio de una interacción electrostática), demostrando un mayor consumo de las células de cáncer que las células sanas [53].

### Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (*CNT*, por sus siglas en inglés) consisten en una lámina de grafeno enrolladas con dimensiones nanométricas. Este fenómeno da el origen a dos tipos de *CNT*: *single walled carbon nanotubes (SWCNT)* y *multi-walled carbon nanotubes (MWCNT)* [54]. Generalmente, estos nanomateriales son insolubles en la mayoría de los solventes y soluciones acuosas, por lo que al ser funcionalizados con grupos carboxilo e hidroxilo aumentan su solubilidad en estos solventes, además de conferirle alta afinidad de adsorción; se pueden ionizar negativamente al aumentar el pH y tiene propiedades ópticas únicas con valores bajos de la banda prohibida junto con fotoluminiscencia en *NIR*. En *PDT*, pueden ser utilizados como

vehículos eficientes de transporte de FS con una alta penetración en la membrana celular; por ejemplo, tenemos que un fotosensibilizador hidrofóbico se puede unir a un *CNT* via interacción  $\pi-\pi$  (como se ha observado en las funcionalizaciones de los *SWCNTs* con veteporfirina) obteniendo un alto rendimiento cuántico de  $^1\text{O}_2$  [55]. De igual manera, se han utilizado con porfirinas, demostrando daños a la membrana celular de bacterias tras irradiación [56]; también se ha observado, al ser recubiertos con azul de evans y Ce6 soportados en albúmina, una fluorescencia dual y una imagen fotoacústica que guía a un efecto sinérgico de terapia fototérmica y fotodinámica (*PTT/PDT*) en tumores [57]. Por otro lado, los *MWCNTs* han demostrado ser una plataforma multifuncional para *PTT/PDT* y quimioterapias via conjugación con tetrahidroxifenilclorinas [58].

#### *Nanopartículas upconverting*

El término *upconverting* es un proceso en donde dos o más fotones de luz incidente son absorbidos y transformados en un solo fotón de mayor energía (emisión anti-stokes), es decir, se tiene la absorción simultánea de dos fotones donde la excitación desde el estado basal se da a partir de este fenómeno [59]. En *PDT*, las nanopartículas de  $\text{NaYF}_4$  dopadas con  $\text{Er}^{3+}$  y  $\text{Tm}^{3+}$  conjugadas con ftalocianina, clorina, ALA y tetrafenilporfirina (TPP) han demostrado mejorar la difusión de *ROS* con bajas concentraciones de FS y una alta reducción en el crecimiento de tumores [44]. Otro ejemplo son las nanopartículas de oro, las cuales combinan dos importantes propiedades: la resonancia de superficie de plasmón (*SPR*, por sus siglas en inglés), la cual ofrece mejoramiento de la luz incidente, incrementando la eficiencia de excitación del FS y la habilidad de convertir luz en calor, lo que da oportunidad de combinar *PDT* y *PTT* [60].

### Puntos cuánticos

Los puntos cuánticos (*QDs*, por sus siglas en inglés) son nanopartículas donde sus electrones y huecos están confinados en las tres dimensiones dentro del radio de Bohr, dando propiedades ópticas únicas tales como amplio rango de absorción con bandas de emisión nítidas, fotoestabilidad, gran área superficial, gran sección transversal de absorción de dos fotones y color de fotoluminiscencia ajustable por tamaño en *NIR*, lo cual es una propiedad importante en imagenología y *PDT* [61]. En esta última, se tienen aplicaciones como por ejemplo, la mezcla no covalente de puntos cuánticos de CdSe y ftalocianina de zinc, la cual tiene altas eficiencias de  $^1\text{O}_2$  con estabilidad del sistema híbrido, donde los *QDs* actúan como donadores de energía [62].

Se ha demostrado que los fotosensibilizadores modificados con nanomateriales efficientizan los rendimientos y mejoran el ataque contra la resistencia celular, por lo que se ha recomendado usar este acercamiento multifuncional para producir compuestos únicos fotoestabilizantes con propiedades intrínsecas [63].

### Cuarta generación de fotosensibilizadores

Los nanomateriales se han usado extensamente con los fotosensibilizadores, y durante el desarrollo de estos compuestos conjugados, se descubrió el comportamiento de FS de los nanomateriales, tales como las nanopartículas, fullerenos, nanotubos de carbono, grafeno y puntos cuánticos. Estos nuevos fotosensibilizadores, pertenecen a una nueva generación debido a su tamaño y propiedades conjuntas que se pueden acumular selectivamente en células de cáncer, provocando menor resistencia celular, además de tener excitaciones a longitudes de onda óptimas.

### Nanopartículas

Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  tienen un efecto único de fototoxicidad estimulado por medio de radiación ultravioleta (producción de *ROS*), lo que los hace unos fotosensibilizadores prometedores [64], [65]. En el 2010, se inició con la aplicación de las nanopartículas de  $\text{ZnO}$  en *PDT* a través del estudio de su efecto fotocatalítico en combinación de UVA-1 en carcinomas, donde se demostró un decremento de la concentración de las células malignas después de quince minutos de irradiación [66]. Las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , pueden absorber radiación UV lo que resulta en una mayor actividad fotodinámica debido a que induce estrés oxidativo en la células no deseadas por medio de la activación de capsase-3, la cual activa el mecanismo de apoptosis [67].

### Fullerenos

Basados en su fotoestabilidad, los *fullerenos* tienen propiedades de FS. De igual manera, presentan bajo fotoblanqueo y modificación estructural directa; funcionan como una antena de captación de luz, lo cual puede ser utilizado para incrementar los rendimientos cuánticos de la producción de *ROS*, herramientas útiles para *PDT* [68]. El problema con los *fullerenos* es su poca dispersabilidad, lo cual es un problema mayor que afecta su solubilidad en muchos solventes, especialmente agua, donde el oxígeno singulete tiene mayor tiempo de vida. Esto ocasionó el desarrollo de muchos métodos de funcionalización con grupos hidrofílicos para incrementar su afinidad en este solvente [69]. En *PDT* ha tenido varias aplicaciones, por ejemplo, el  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ , ha demostrado fototoxicidad contra pigmentos epiteliales

de la retina humana, lo que resultó en la aparición de apoptosis temprana en estas células [70].

### Nanotubos de carbono

Los SWCNTs han sido utilizados como un FS potencial por su fotogeneración de  $^1\text{O}_2$  y otras ROS al ser irradiados, como se ha demostrado con la funcionalización de estos con polietilenimina y polivinilpirrolidona. Estos se han usado en PTT y su aplicación en PDT indica que el efecto fotodinámico no es totalmente dependiente del tiempo de iluminación, sino que también del método de modificación que mejore su efectividad terapéutica en tratamientos contra el cáncer [71], [72]. De igual manera, su modificación con grupos carboxilo facilita su dispersión en agua, lo cual ha demostrado tener mayores rendimientos de  $^1\text{O}_2$  [73].

### Grafeno

Los derivados del grafeno pueden producir ROS al ser irradiados, obteniendo rendimientos cuánticos mayores que los FS de primera y segunda generación [74]. En un estudio realizado por D. Chen *et al.* demostraron que los puntos cuánticos de grafeno, tienen un rendimiento superior debido a presencia de grupos oxigenados y nanopartículas *upconverting* que, al ser irradiadas con NIR, emitían luz visible, obteniendo como resultado una mayor captación celular; este ha sido usado como FS y durante el experimento, se indujo daño nulo a los órganos sanos [75].

### Puntos cuánticos.

Los puntos cuánticos, al tener fotoluminiscencia estable distribuida en las regiones *NIR* y visible, han tenido aplicaciones en imagenología y *PDT*, entre otras. De igual manera, tienen una banda ancha y sección transversal de absorción de dos fotones amplia, las cuales son herramientas útiles para su fotoactivación al ser irradiados con las longitudes de onda en los espectros mencionados [62]. Se ha observado en los puntos cuánticos de CdSe-ZnS, la producción fotoinducida de intermediarios de especies reactivas de oxígeno (*ROI*, por sus siglas en inglés), los cuales han sido estudiados y se han convertido en una investigación emergente por su aplicación en *PDT* debido al daño inducido en el plásmido de ADN, donde se abre la posibilidad de *PDT* dirigida a los núcleos celulares malignos [76]. Debido a sus propiedades ópticas modificables y por su superficie química, los puntos cuánticos tienen ventajas sobre FS convencionales.

### Quitina y quitosano.

La quitina, es la segunda sustancia orgánica más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Como se puede observar en la Figura 3, es un biopolímero lineal insoluble en agua, el cual se obtiene principalmente del exoesqueleto de crustáceos industrialmente procesados tales como camarón, langosta y cangrejo; se disuelve en ácidos concentrados, fluoroalcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio, por lo que se presenta una baja reactividad; tiene un alto peso molecular y su estructura porosa favorece una alta absorción de agua.

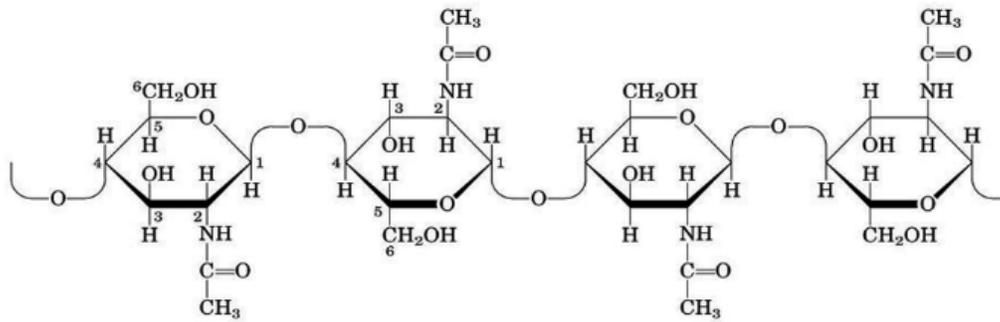


Figura 3. Estructura de la quitina (Imagen extraída de: [77]).

El quitosano, es la forma N-desacetilada de la quitina, la cual, tiene mejores propiedades de reactividad y solubilidad (Figura 4). Se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos tales como: ácido acético, ácido fórmico, cítrico y tartárico, así como en ácidos minerales con excepción del ácido sulfúrico. El grado de desacetilización, varía de un 60 hasta un 90% con pesos moleculares de 50 hasta 2000 kDa.

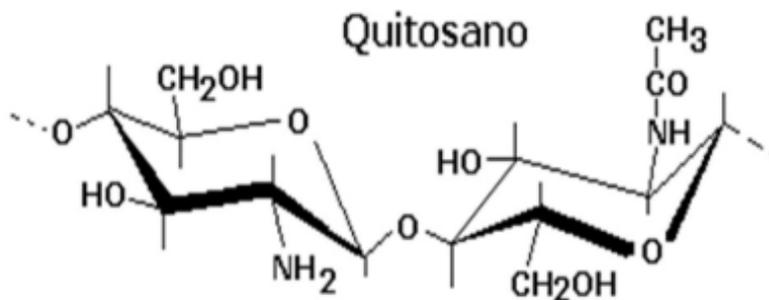


Figura 4. Estructura del Quitosano (Imagen extraída de: [77]).

Dentro de las aplicaciones de estos biopolímeros, tenemos en la industria de alimentos y bebidas: principalmente en aditivos en los alimentos tales como espesantes, gelificantes y emulsificantes; en el tratamiento de aguas: como un coagulante primario de aguas residuales, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites al igual que para la captura de metales pesados; y en la

agricultura: como agente efectivo para el control de enfermedades y plagas vegetales [78] .

Se ha observado que la conjugación del quitosano con fotosensibilizadores presenta la acumulación selectiva en tumores con generación de  $^1\text{O}_2$  en sistemas de glicol-quitosano-fullereno [3], ftalocianina de zinc-nanopartículas-quitosano [79], ficocianina-quitosano-nanotubos de carbono de multipared [80] y clorina-nanotubos de carbono-quitosano [81], entre otros.

La absorción de los fotosensibilizadores soportados en quitosano mejora los parámetros fotofísicos y la estabilidad de estos, reduciendo la posibilidad de generación de fotoproductos y vías de desactivación [4].

## HIPÓTESIS.

La inmovilización de las nanoesferas de carbono (CNS) en un compósito de Quitosano-GMA con nanopartículas de oro promoverá la actividad fotodinámica por medio de un efecto plasmón, que en presencia de oxígeno molecular producirá oxígeno singulente ( $^1\text{O}_2$ ), la cual le proporcionará las características necesarias para la fotodegradación de DPBF para su posible aplicación en degradación de células de cáncer.

## OBJETIVOS.

### Objetivo general.

Obtener un material nanoestructurado de CNS-AuNP soportado en una matriz de Q-GMA con actividad fotodinámica para la producción de ROS y proponerlo como una posible alternativa en el tratamiento de cáncer.

### Objetivos específicos.

- Determinar la presencia de las nanopartículas (NP) y su plasmón junto con su funcionalización por medio de la caracterización de espectroscopía de infrarrojo (IR), ultravioleta-visible (UV-VIS) y SEM.
- Analizar la distribución superficial de las nanoesferas con nanopartículas del compósito por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar el rendimiento cuántico de la producción de oxígeno singulete por medio de la fotodegradación de 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF) a través de la espectroscopía de ultravioleta-visible (UV-VIS).
- Evaluar la citotoxicidad del compósito por medio del ensayo MTT, para determinar su biocompatibilidad.

## MATERIAL Y METODOLOGÍA.

La metodología se ha basado en las buenas prácticas de laboratorio; todas las síntesis se han realizado en laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales de la facultad de ingeniería del Campus Aeropuerto de la U.A.Q., el cual cuenta con las instalaciones necesarias de seguridad, al igual que el equipo

adecuado y calibrado para dichas síntesis. Se ha contado con las medidas de seguridad tales como guantes, mascarillas, gafas de seguridad, bata y zapato cerrado.

Se tomó en cuenta la norma NMX-R-019-SCFI-2011 para la clasificación de los productos químicos de acuerdo con los peligros físicos destinados a la salud y el medio ambiente. De igual manera, se considerará la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para el manejo de la línea inmortal de células HT29, en donde se especifica el tratamiento, manejo y desecho de los residuos biológicos.

## Materiales.

Para llevar a cabo la síntesis de los compósitos nanoestructurados, se emplearon los materiales enlistados en la Tabla 2.

*Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis.*

<b>Reactivo</b>	<b>Proveedor</b>
Quitosano (Q)	Sigma Aldrich
Ácido Acético Glaciar	Sigma Aldrich
Glicidilmetacrilato (GMA)	Sigma Aldrich
Ácido Cloroáurico (HAuCl <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)	Sigma Aldrich
Nanoesferas de Carbono (CNS)	CINVESTAV
HT29	Facultad de Ciencias Naturales (UAQ)

Los materiales se utilizaron como se recibieron sin purificación adicional.

## Síntesis.

Se prepararon tres diferentes compósitos:

1. Q/AuNPs
2. Q-GMA/AuNP.
3. Q-GMA/CNS-AuNP.

Para ello, se realizaron las siguientes síntesis:

### a) Síntesis de Q-GMA.

Este compuesto, se preparó siguiendo la técnica empleada por Elizalde- Peña *et al.* [82] donde por medio de una precipitación en acetonitrilo, se goteó una solución de quitosano previamente diluida en una solución de ácido acético al 0.4M, agitando por dos horas a 50°C. Una vez transcurridas las 2 h, se agregó una solución de ácido acético 0.4M con KOH, después otra solución de ácido acético con glicidilmetacrilato (GMA) y se dejó en agitación por 1 h. Por último, se goteó la solución adquirida en acetonitrilo a 60-70°C en agitación, recuperándose el compuesto en un recipiente ambar con acetonitrilo.

### b) Síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) en Q.

Para las nanopartículas soportadas en quitosano, se usó la técnica empleada por Kimling y Valenzuela Acosta, la cual consiste en usar ácido cloroáurico, (HAuCl<sub>4</sub>) en soluciones de 0.2, 0.4, y 0.6 mM calentada a su punto de ebullición en agitación vigorosa [83], [84]. Posteriormente, se añadió una cantidad equivalente para la reacción de reducción en quitosano al 1% acuoso en solución ácida con agitación vigorosa.

c) Síntesis de AuNPs en Q-GMA.

Se empleó la misma técnica mencionada en el inciso b) con la diferencia de que se empleó una cantidad equivalente de Q-GMA.

d) Compósito de CNS y Q-AuNPs.

Este paso, se llevó a cabo siguiendo la técnica empleada por Ali *et al.*, la cual consiste en dispersar una solución diluida de Q en ácido acético al 2.5%w seguido de la adición de nanoesferas al 20%w con respecto al quitosano [85].

e) Compósito de CNS y Q-GMA-AuNPs

Para este paso, se empleó la misma técnica empleada en el inciso d) con la diferencia de que se usó Q-GMA-AuNPs en vez de quitosano con nanopartículas.

f) Pruebas de radiación

El análisis de la producción de oxígeno singulete, se analizó por medio de la fotodegradación de DPBF, el cual es proporcional a la producción de  $^1\text{O}_2$ . Se preparó una solución de DPBF con una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  y se hicieron a 30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos en soluciones al 16% v/v.

- Prueba de MTT.

Primeramente, se atemperó medio de cultivo previamente esterilizado; se realizó el lavado de los trozos de membranas en medio de cultivo DMEM (X2) o hasta que se observó un cambio a pH neutro, es decir, mantener la coloración roja del medio o ligeramente naranja.

1. Se colocaron los cultivos previamente lavados con PBS y antibiótico en las dos cajas de 96 pozos, donde se irradió con IR una de las placas por 45 s, de acuerdo con el diagrama descrito en la Figura 5.

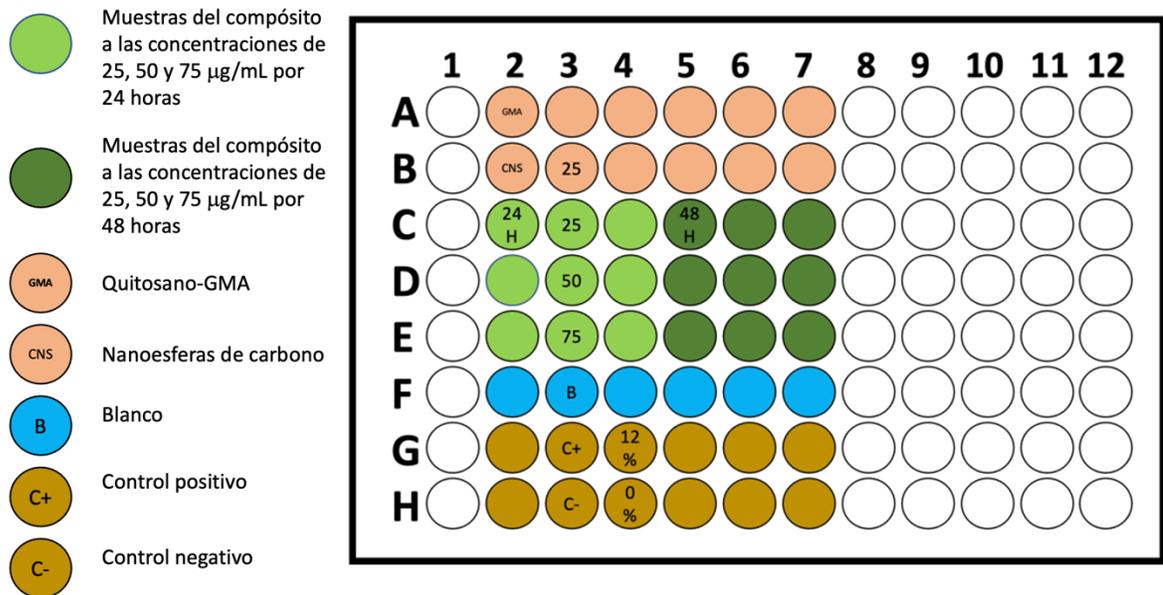


Figura 5. Arreglo de placas de ensayo de viabilidad celular MTT del compuesto de Q-GMA/CNS/AuNPs.

2. Densidad celular: Para realizar el conteo previo se centrifugó la suspensión celular a 2000 rpm durante 8 minutos. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 5 ml de medio nuevo y se realizó el conteo por método directo (cámara de Neubauer; por triplicado), obteniendo una densidad celular total de 437,500 células/mL a través de la ecuación 1[86]:

$$\frac{\# \text{ de células vivas}}{\# \text{ de campos}} \times 10\,000 = \quad (1)$$

3. Preparación células: Para obtener la densidad celular deseada ( $2 \times 10^3$ ) por pozo se procedió a calcular el volumen necesario de STOCK de células que se requiere para cada uno de los pozos (ocupando un volumen de  $100 \mu\text{l}$  c/u), esto para cada uno de los tratamientos.

**PARA EL ENSAYO SE UTILIZARÁN 120 POZOS**

$$(2 \times 10^3) * 120 \text{ pozos} = 240\ 000 \text{ células}$$

$$100 \mu\text{L}/\text{pozo} * 120 \text{ pozos} = 12000 \mu\text{l} = 12 \text{ mL}$$

$$\frac{240\ 000 \text{ células}}{6 \text{ mL}} = 40\ 000 \text{ células/mL}$$

$$C1V1 = C2V2$$

$$V1 = \frac{\left( 40\ 000 \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) (3 \text{ ml})}{(\text{Densidad celular})} = \frac{120\ 000 \text{ células}}{(\text{Densidad celular})}$$

$$= \frac{120\ 000 \text{ células}}{437500 \frac{\text{células}}{\text{mL}}} = 0.2725 \text{ mL}$$

2. Para cada pozo se colocaron  $20 \mu\text{L}$  de la suspensión celular sobre la membrana y  $80 \mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado con suero bovino al 10% y antibiótico al 1% para dejarlos incubar por los tiempos mencionados de la Figura 5.

- Evaluación MTT

Se atemperó el medio de cultivo suplementario, solución MTT e isopropanol.

1. Pasado el tiempo determinado se retiró el medio de los pozos a evaluar y se deshechó.
2. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución MTT y 90  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementario, para dejarlo incubar por 2 horas a 37 °C en oscuro.
3. Pasado el tiempo se retiró la solución sin retirar la membrana de quitosano y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solvente MTT (isopropanol).
4. Se realizó una curva de calibración para las soluciones para observar la adherencia de las células en los compósitos.  
  
\*Se agitó suavemente para retirar el MTT y formazan de la mitocondria celular.
5. Se retiró la solución de cada pozo para después medir la absorbancia en un lector de microplacas ELISA a las longitudes de onda de 595 y 655 nm.

### Caracterización fisicoquímica.

- *Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR).*

Para esta caracterización, se prepararon películas de espesor menor a 70  $\mu\text{m}$ , realizando barridos de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  donde se identificaron las vibraciones de los grupos principales de Q y Q-GMA con las AuNPs y CNS con ayuda del equipo *Spectrum Two<sup>TM</sup>*.

- *Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS).*

Se utilizaron las muestras líquidas de las mezclas de Q y Q-GMA con las AuNPs y CNS para medir el plasmón presente en ellas. El análisis se realizó de 350 a 800 nm con el equipos *Genesys<sup>TM</sup> 10S* de la marca *THERMO Scientific*.

- Microscopía electrónica de barrido (SEM).

El análisis de la morfología y distribución de las AuNPs con las CNS, se realizó por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM) por medio del equipo JSM 6010 LA con voltajes de aceleración de 15 y 20 kV y ampliación de 50 a 6000X.

- Análisis termogravimétrico (TGA).

El análisis termogravimétrico se realizó para el análisis de las transformaciones térmicas que sufrieron los compósitos de Q-GMA con las nanopartículas de oro y nanoesferas de carbono, por lo que se analizó por medio del equipo TGA Q500 de la marca *TA Instruments* con una rampa de de 10 °C/minuto de temperatura ambiente a 600 °C en una atmósfera de O<sub>2</sub>.

- Pruebas de radiación.

Las pruebas de radiación se realizaron para la medición de oxígeno singulete, la cual, se llevó a cabo a partir del uso de una cámara de radiación con una lámpara incandescende tipo reflector BR-40 de luz infrarroja.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Síntesis

En la figura 6, se muestra el inicio de las reacciones de reducción del H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> en Quitosano y Quitosano-GMA. Como se puede observar, en la figura 6A se muestra la síntesis de las AuNPs en quitosano a través de la reducción de ácido cloroáurico donde es notable la coloración rosada después de quince minutos de reacción; mientras que en la figura 6B, se tiene la síntesis de las AuNPs con Q-GMA con una ligera coloración rosada al mismo tiempo de reacción.

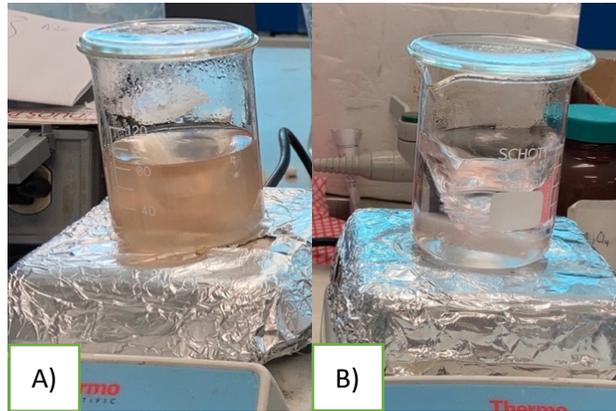


Figura 6. Inicio de síntesis de A) Q y B) Q-GMA con AuNPs.

Después de una hora de reacción, se empezó a observar una coloración rojiza (figura 7A) característica de la nucleación de las nanopartículas de oro con el quitosano; por otra parte, la reacción de reducción con el Q-GMA (figura 7B) se observa una coloración violeta después de 90 minutos: ambas coloraciones, corresponden a la formación de nanopartículas de oro de tamaños entre 60 nm y 90 nm, respectivamente [83].

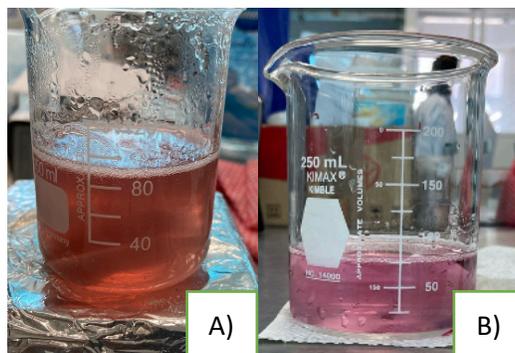


Figura 7. Término de síntesis de A) Q con AuNPs y B) Q-GMA con AuNPs.

## FT-IR

En la Figura 8, se puede observar la comparación de los espectros de IR de Q y Q-GMA, donde primero se puede ver que el espectro de Q tienen el estiramiento característico ( $\nu$ ) del grupo O-H y N-H en la zona de los  $3400\text{ cm}^{-1}$ ; en  $2931$  y  $2876\text{ cm}^{-1}$  la tensión asimétrica y simétrica del grupo  $\text{CH}_2$ , respectivamente; en  $1650$  se tiene la tensión característica del grupo amida con su deformación característica en  $1550\text{ cm}^{-1}$ . En la zona de los  $1370\text{ cm}^{-1}$  se observa la tensión del grupo -NHCO con el estiramiento del grupo C-N en  $1312\text{ cm}^{-1}$ ; en la zona de  $1080$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$ , se tiene la tensión asimétrica y simétrica del grupo C-O con los picos característicos de los sacáridos en  $1160$  y  $895\text{ cm}^{-1}$ . El compuesto sintetizado de Q-GMA presenta un corrimiento del grupo C=O en  $1600\text{ cm}^{-1}$ , lo cual, se debe al desorden estructural ocasionado al estrés en la funcionalización con GMA; en  $1550\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento característico del grupo C=C al igual que las deformaciones de los grupos  $\text{CH}_3$  y C-O-C en  $1400$  y  $1150\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Estas modificaciones le confieren mayor estabilidad térmica al material al igual que una mayor capacidad de funcionalización [87].

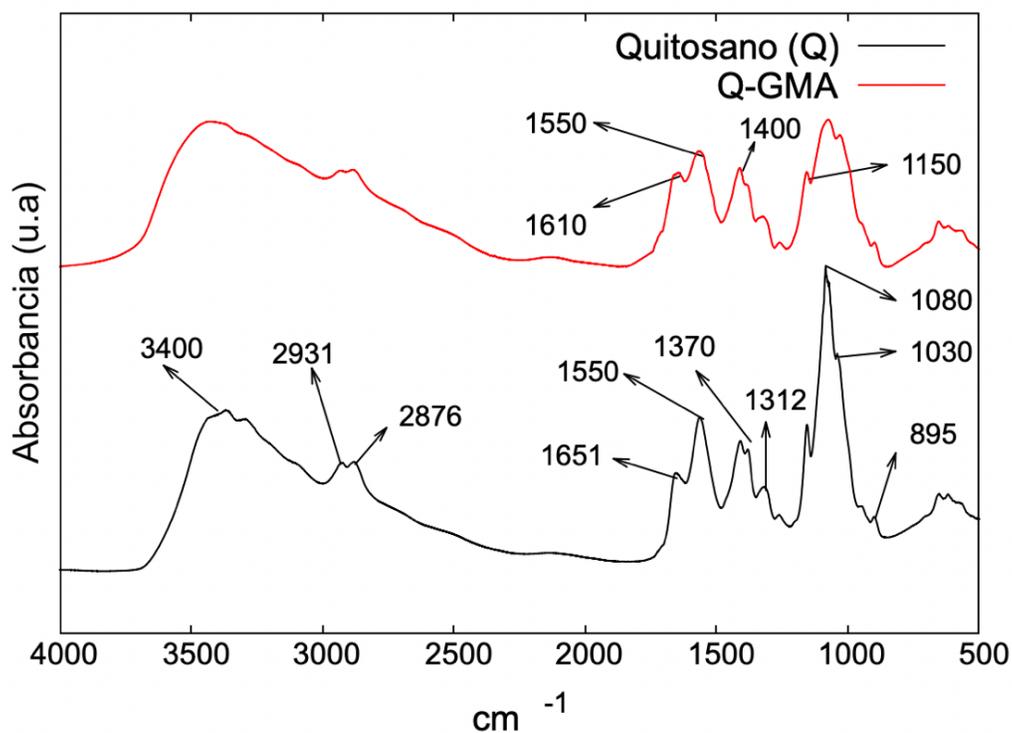


Figura 8. Espectro de FT-IR del Q y Q-GMA.

En la Figura 9, se puede observar el espectro de FT-IR de la conjugación de Q con AuNPs, en donde se tiene una atenuación en las tensiones y deformaciones de los grupos O- H y  $\text{NH}_2$ , sugiriendo que los grupos O-H participan en la quelación con las nanopartículas con el grupo  $\text{NH}_2$ . Adicionalmente, la atenuación en la zona de las  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , muestra que los grupos antes mencionados también participaron en la reducción y estabilización de las AuNPs [88]. De igual manera, no se muestra un cambio significativo en la estructura, ya que no desaparecieron picos característicos del Q en el grupo C-O-C mostrados en la Figura 8.

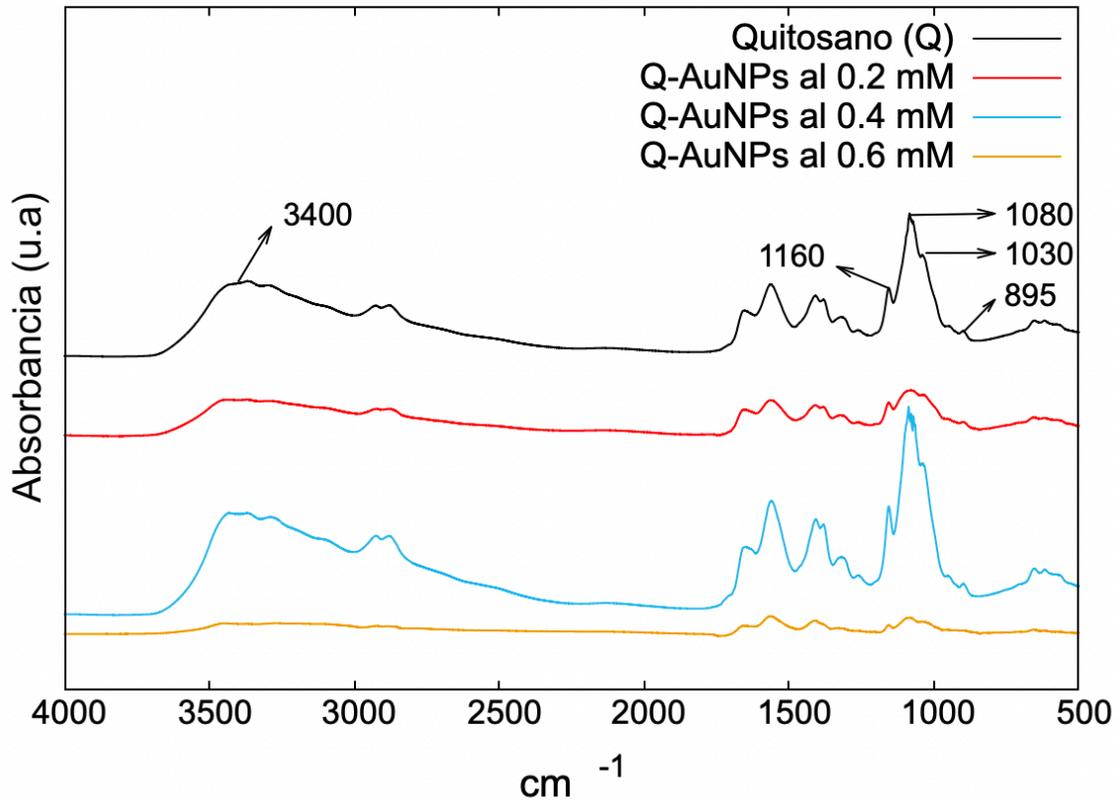


Figura 9. Espectro de FT-IR de Q-AuNPs.

En la Figura 10, se tiene el espectro de FT-IR de la conjugación de Q-GMA con AuNPs. En esta, se observa un corrimiento ligero en las bandas características del polímero del grupo C=C de  $1550 \text{ cm}^{-1}$  a  $1560 \text{ cm}^{-1}$  al igual que en las deformaciones de los grupos C-O-C de  $1150$  a  $1160 \text{ cm}^{-1}$  debido a la presencia de las nanopartículas. De igual manera, se puede notar una disminución en el porcentaje de absorbancia de los grupos amino ( $3400 \text{ cm}^{-1}$ ) debido nuevamente a la presencia y al peso de las nanopartículas de oro en las concentraciones de 0.2 y 0.4 mM [89]. La concentración de 0.6 mM mostró una disminución de dichas intensidades debido

a la conjugación en los grupos disponibles del Q-GMA siendo nuevamente los grupos amino [82].

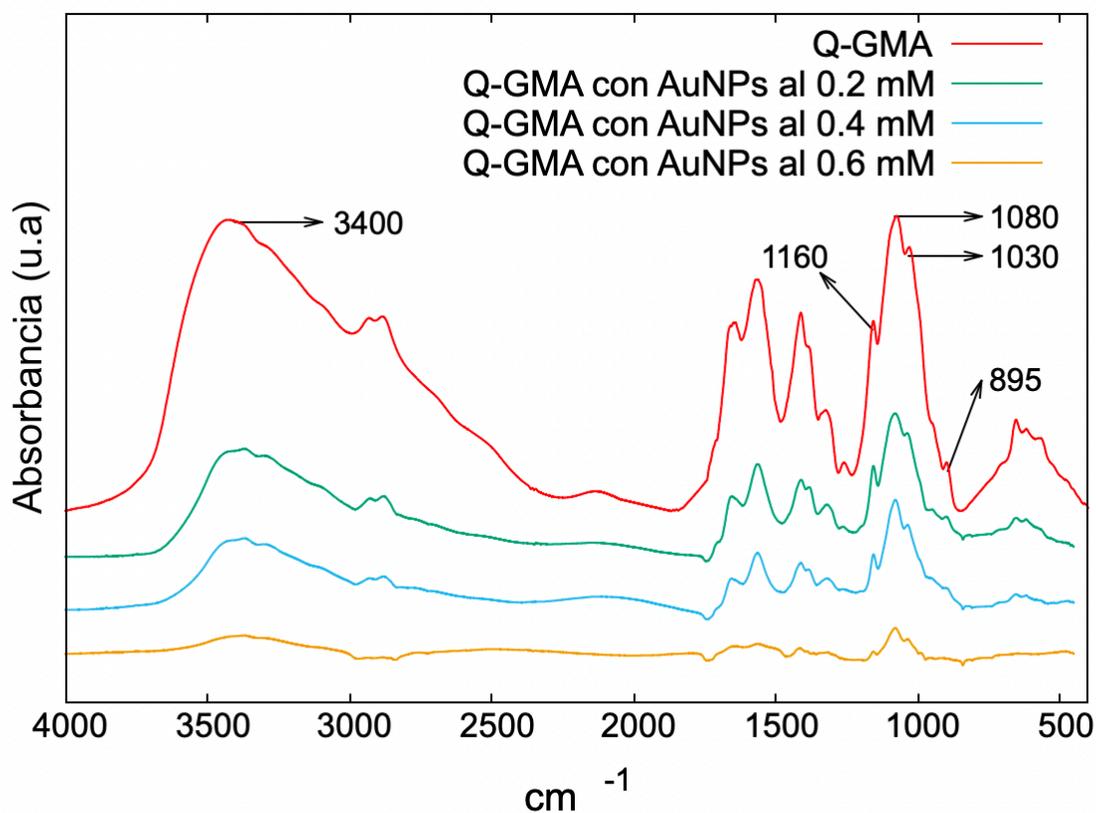


Figura 10. Espectro de FT-IR del Q-GMA-AuNPs.

En la Figura 11, el espectro de Q-GMA-CNS-AuNPs demuestra que la presencia de las nanoesferas de carbono aumentó el porcentaje de absorbancia en las deformaciones y estiramientos de los grupos de C=O en  $1650 \text{ cm}^{-1}$  y de los grupos C=C en  $1550 \text{ cm}^{-1}$ . Este comportamiento también se observa en los picos característicos de los sacáridos en ambos compuestos en  $1160$  y  $895 \text{ cm}^{-1}$ . [90] Teniendo esto en cuenta, se tiene que las síntesis no alteraron la estructura de la matriz de Q y Q-GMA ya que se conservó la tensión C-O-C en la zona de los  $1160$

$\text{cm}^{-1}$ , de igual manera, se muestra la disminución en el porcentaje de absorbancia de los grupos amino debido a que las nanopartículas oro se asocian con estos, como se puede ver en las tensiones de 3400 y 1160  $\text{cm}^{-1}$ .

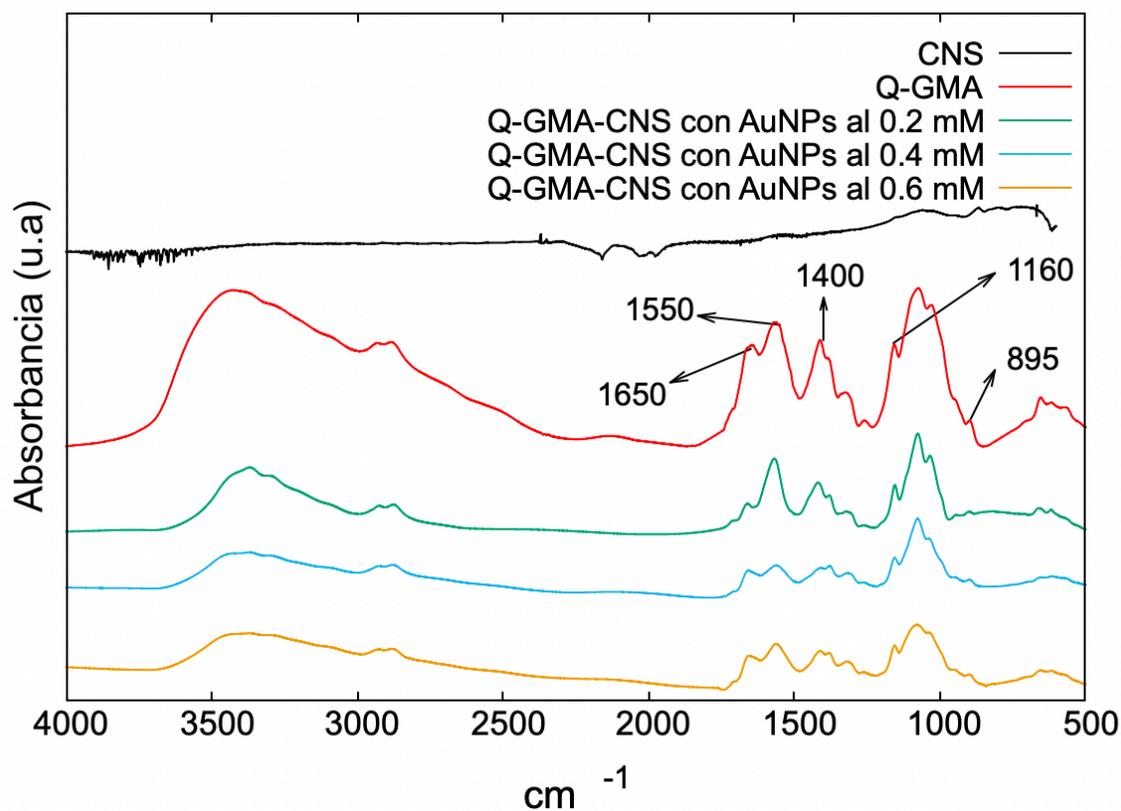


Figura 11. Espectro de FT-IR de Q-GMA-CNS-AuNPs.

## UV-VIS

La caracterización UV-VIS se realizó para verificar el plasmón de las AuNPs en las muestras de Q y Q- GMA. En la Figura 12 se puede apreciar que el espectro de UV-VIS del Q y sus posteriores modificaciones con las nanopartículas sintetizadas. Se observa que el plasmón característico no se puede detectar en concentraciones de 0.2 y 0.4 mM de AuNPs, por lo que se procedió a hacer un análisis de la segunda derivada; sin embargo, conforme se va aumentando la concentración de oro el plasmón característico a 528 nm es mas evidente en 0.6 mM [91].

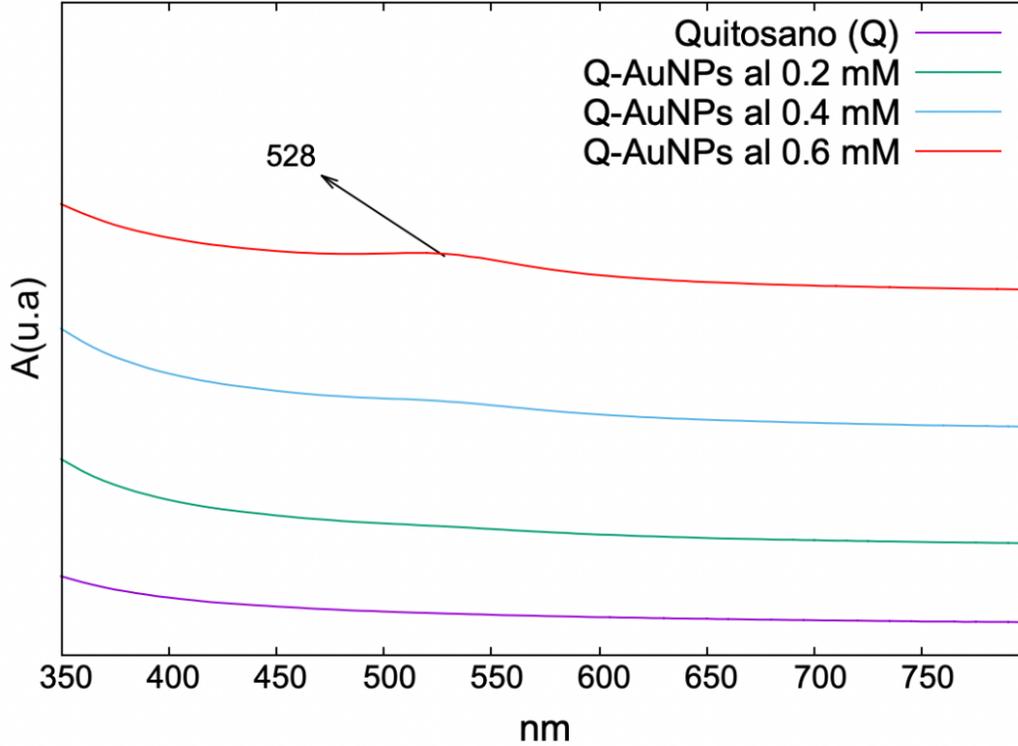


Figura 12. Espectro de UV-VIS de Quitosano conjugado con AuNPs.

En la Figura 13, se tiene la gráfica de la segunda derivada del espectro de la figura 12; se puede apreciar que el plasmón característico no se observa en la concentración de 0.2 mM del compuesto mientras que en las concentraciones de 0.4 y 0.6 mM muestran el cambio en la curvatura en segundo grado, donde el plasmón es perceptible en mayor medida, siendo la concentración de 0.6 mM la que más lo presenta [91].

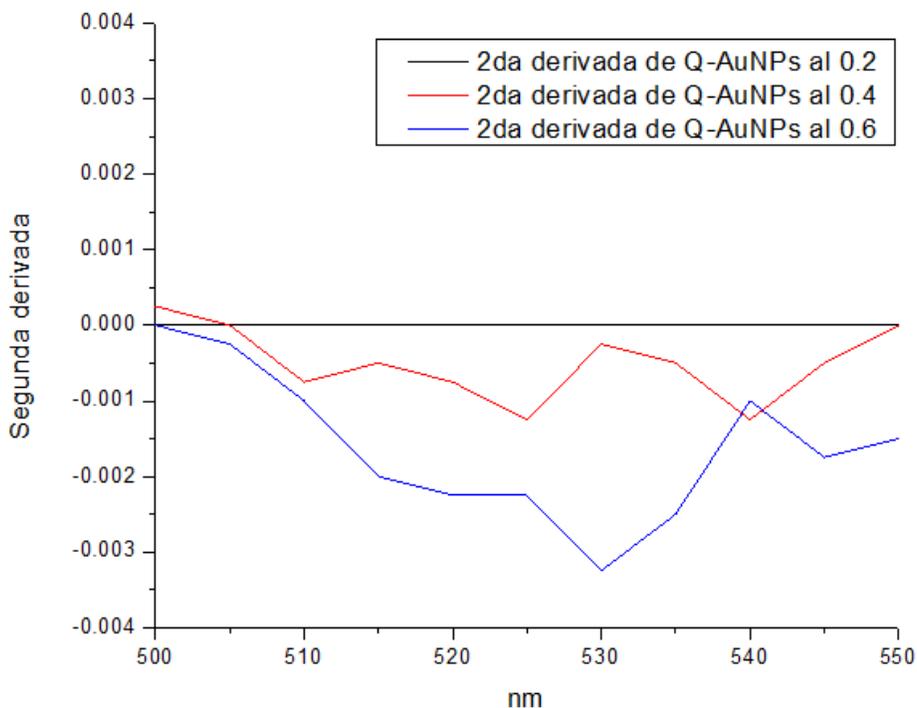


Figura 13. Segunda derivada del espectro de UV-VIS del compuesto de Q-AuNPs.

Por otra parte, en los compuestos de Q-GMA con AuNPs, se puede notar de mejor manera la presencia de este plasmón (figura 14); en el espectro de Q-GMA-AuNPs al 0.6 mM se tiene una atenuación en la absorbancia del Q-GMA debido a la presencia de las nanopartículas, mismas que al observar el espectro de IR de este compuesto (tensiones en la zona de los 3400 y 1160  $\text{cm}^{-1}$ ), podemos decir que no se tiene una degradación o ruptura de la estructura de la matriz de Q-GMA [91]. Una vez verificada la presencia del plasmón, se procedió a sintetizar las muestras de Q-GMA con CNS debido a que la presencia del plasmón es más evidente.

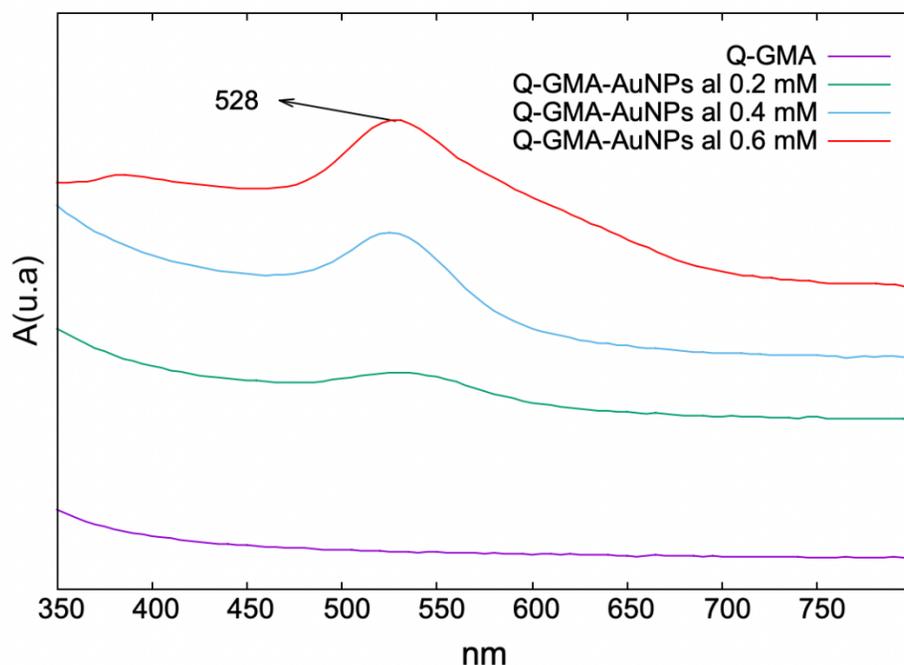
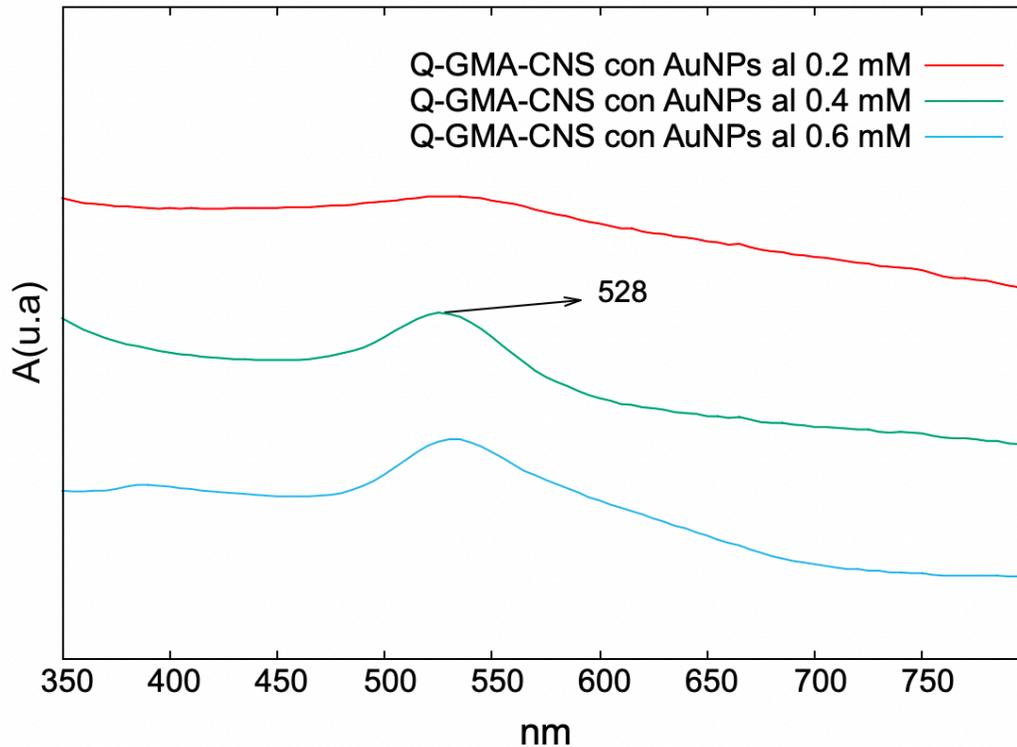


Figura 14. Espectro de UV-VIS de A) Q-AuNPs y B) Q-GMA-AuNPs.

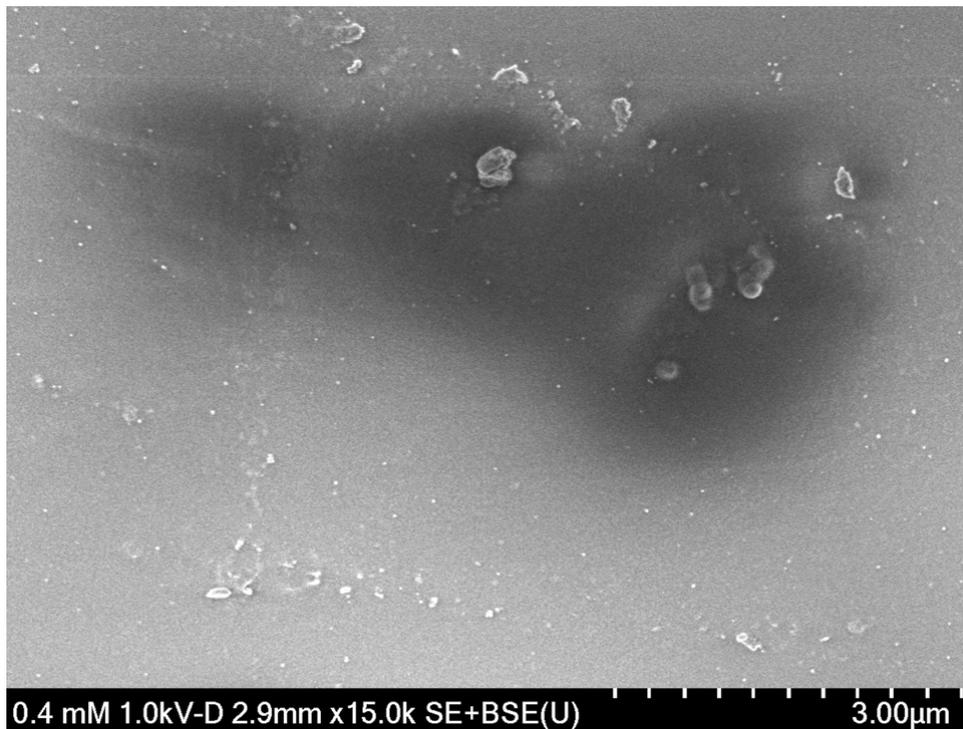
En la Figura 15, se tiene que los compuestos conservan el efecto plasmón aún con su conjugación con las CNS. Se puede observar que en la zona de los 800 nm hay una absorbancia débil pero que debe considerarse para la activación del fotosensibilizador ya que al tener el plasmón de las AuNPs, es posible la absorción de dos fotones y convertirlas en un solo fotón de más alta energía (emisión antistokes), es decir, la transición de estado basal a estado excitado será a través de la absorción simultánea de dos fotones de baja energía [92]. Los resultados obtenidos bajo los valores de experimentación planteados y expuestos en los espectros de FT-IR y UV-VIS, permiten plantear la posibilidad de aprovechar la resonancia superficial del plasmón (*SPR*, por sus siglas en inglés) para usar esta energía de absorción en forma de calor, lo que permitirá incrementar la eficiencia de excitación de las nanoesferas, así como la oportunidad de combinar terapia fotodinámica con terapia fototérmica (PDT/PTT) [59].



*Figura 15. Espectro de UV-VIS de Q-GMA-CNS- AuNPs.*

### SEM y HR-SEM

Debido a que las muestras de Q-GMA-CNS- AuNPs al 0.4 y 0.6 mM conservaron el plasmón y la estructura de la matriz se mantuvo, se seleccionaron para su caracterización por HR-SEM y SEM. En la Figura 16 se puede observar al Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM en donde se aprecia la distribución de los clusters de nanoesferas de carbono con las nanopartículas en una matriz de Q-GMA. Por otra parte, se observa que las CNS se encuentran en la estructura de manera superficial, confirmando la formación de un compuesto nanoestructurado.



*Figura 16. Imagen SEM de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM.*

El histograma mostrado en la Figura 17, muestra que en una población de 20 partículas, el tamaño medio de las nanopartículas asociadas a una morfología cuasi-esférica es de 76.7 nm con una distribución normal sesgado a la derecha, donde la media es mayor a la mediana. Las nanopartículas mostradas en la Figura 18, corresponde a una morfología cuasi-esférica que se relaciona directamente con el plasmón y tamaño reportados con anterioridad en las figuras 7, 11 y 15 [93].

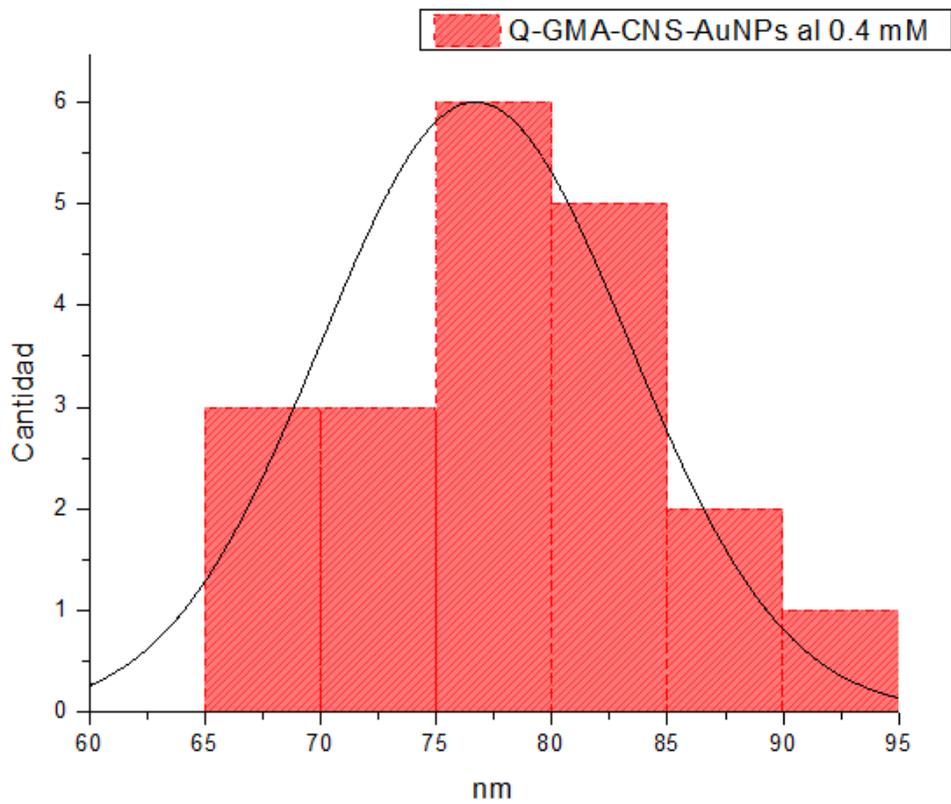


Figura 17. Histograma de AuNPs en Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM

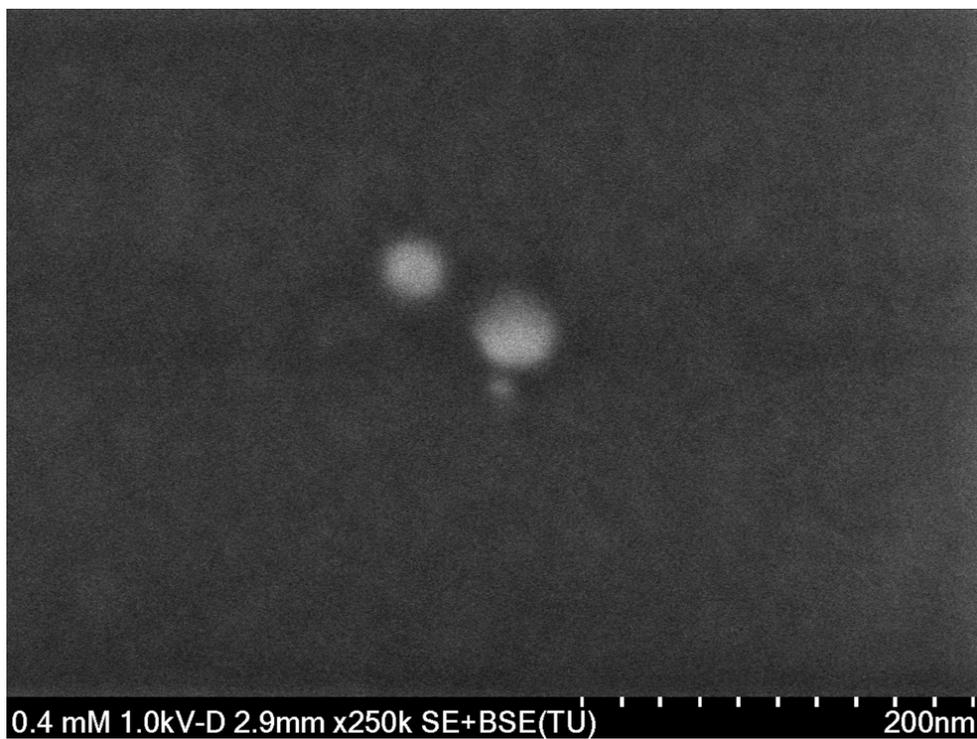
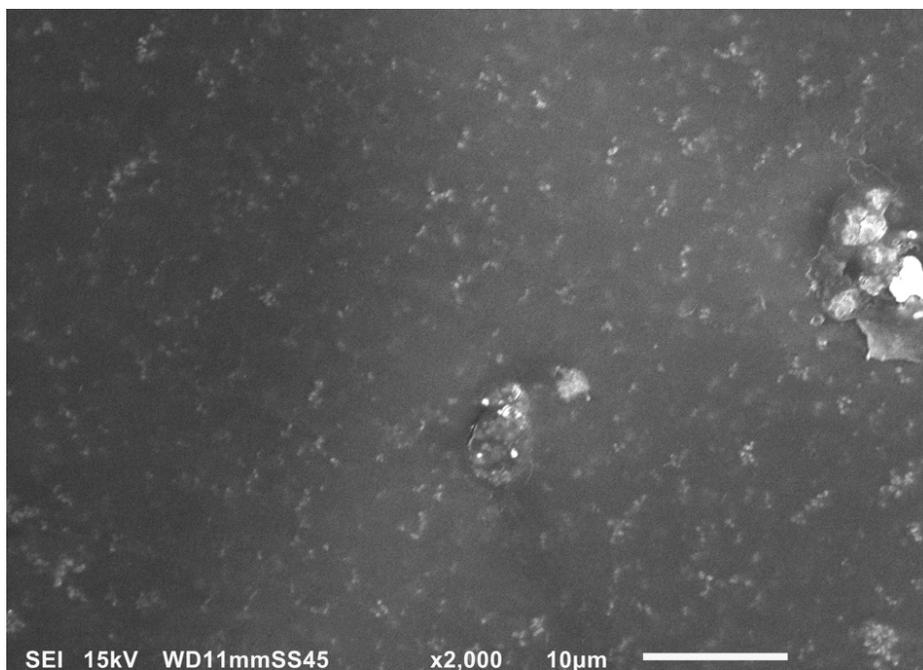


Figura 18. Imagen HR-SEM de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM.

En la Figura 19, se tiene la micrografía SEM de la distribución de la muestra de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM en donde es evidente la mayor cantidad de nanopartículas en la superficie, ya que se encuentran distribuidas de manera más uniforme en la matriz. De igual manera, se tiene la formación de clusters de nanopartículas, lo cual, es común en reacciones de reducción de  $\text{HAuCl}_4$ , sin embargo, esto no afectó el plasmón mostrado en la figura 14 [83].



*Figura 19. Imagen SEM de Q-GMA-AuNPs al 0.6 mM.*

El histograma mostrado en la Figura 20, muestra el análisis de una población de 20 partículas de la Figura 19, donde el tamaño medio es de 77.8 nm; su distribución corresponde a una sesgada a la izquierda, la cual indica que la moda es menor a la mediana y a su vez a la media: esto significa que el tamaño de nanopartículas es menor al tamaño medio. Por otra parte, en la Figura 21, se tiene una imagen de

SEM donde se puede apreciar que la morfología de las nanopartículas es cuasi-esférica, la cual, confirma los resultados obtenidos en los espectros de UV-VIS y FT-IR mostrados en las figuras 7, 11 y 15 acerca de la morfología y la interacción del quitosano.

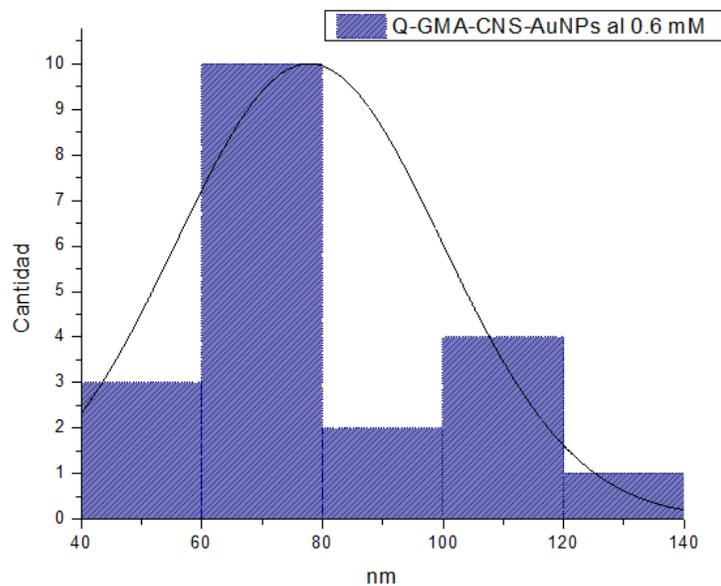
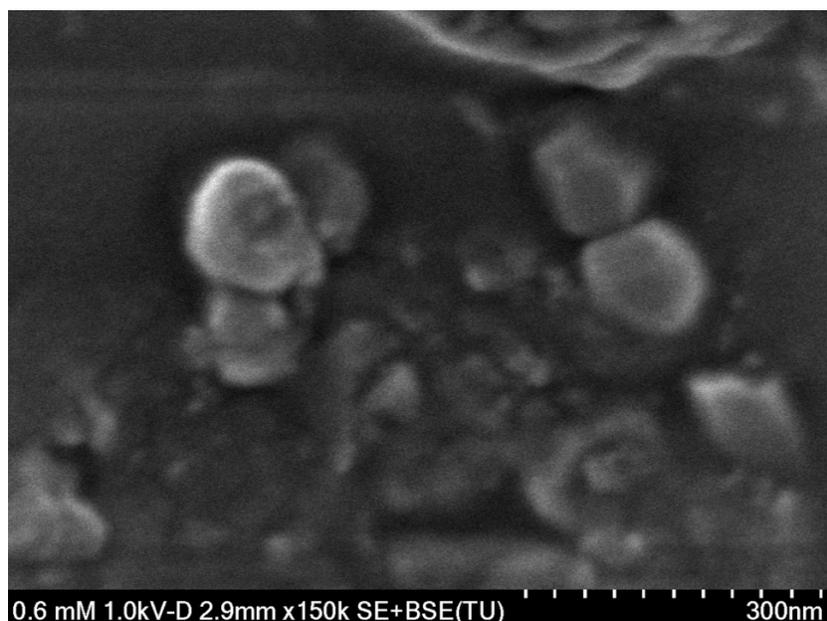


Figura 20. Histograma de AuNPs en Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM.



*Figura 21. Imagen HR-SEM de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM.*

## TGA

Los termogramas obtenidos a partir de la técnica de TGA, muestran la variación en pesos con el correspondiente cambio de temperatura, como se muestra en la Figura 22; se tiene el espectro de TGA con su derivada de las CNS donde se presenta un comportamiento estable entre los 35 y 500°C; a los 520.54°C, se da la transformación química completa de las CNS, correspondiente a la pérdida del 97.24% de peso, teniendo una alta pureza de este compuesto [80].

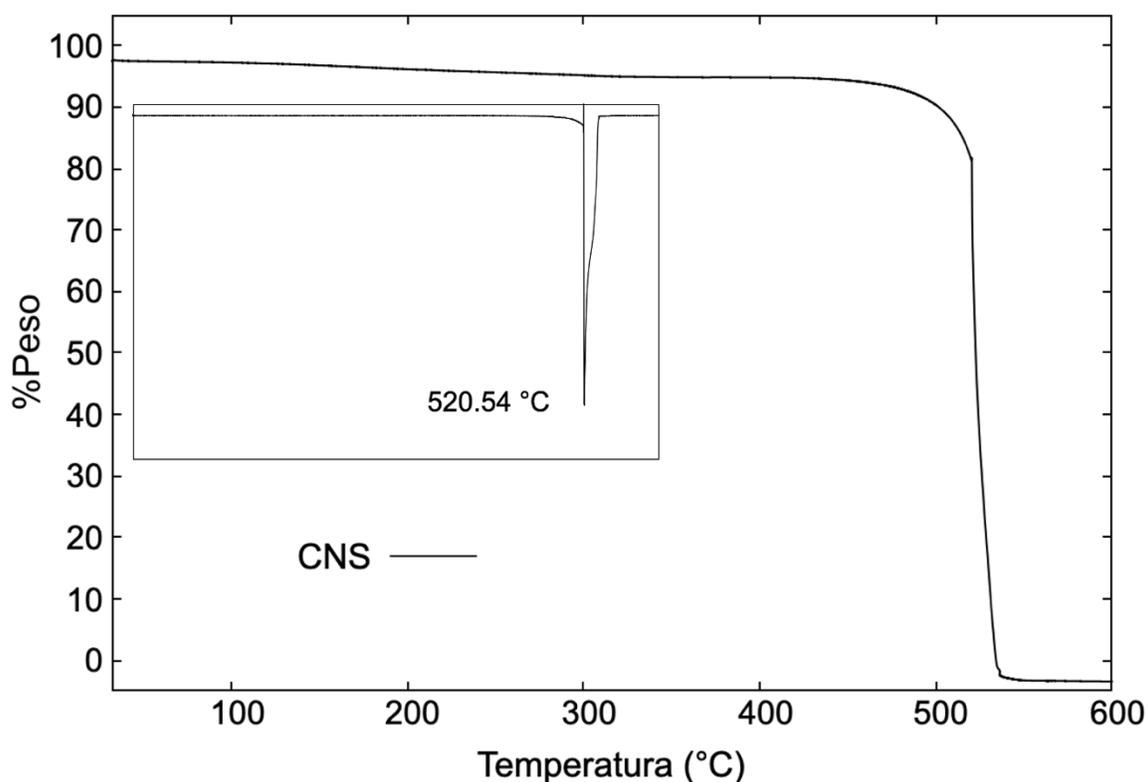


Figura 22. TGA de CNS.

En la Figura 23, se puede observar el termograma de TGA del compuesto Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM donde la pérdida de peso a los 293.83 °C corresponden a la pérdida de peso del 47% debido a la disociación del Q-GMA, mismos que se muestran en las tensiones de 1160 y 895  $\text{cm}^{-1}$  del FT-IR; posteriormente, se tiene una pérdida del 17% a los 436.59 °C, la cual está asociada la pérdida de las nanopartículas de oro, las cuales se pueden observar en las tensiones de 1400 y 1150  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las deformaciones de los grupos  $\text{NH}_2$  y C-O-C (figura 11); por último, se tiene otro decaimiento de peso del 24% a los 569.13 °C, la cual corresponde a las nanoesferas en el compuesto, las cuales, han demostrado que al

estar en estructura con nanopartículas de oro, da mas estabilidad, por lo que se presenta un corrimiento del valor de 520.54°C a 569.13 °C [56].

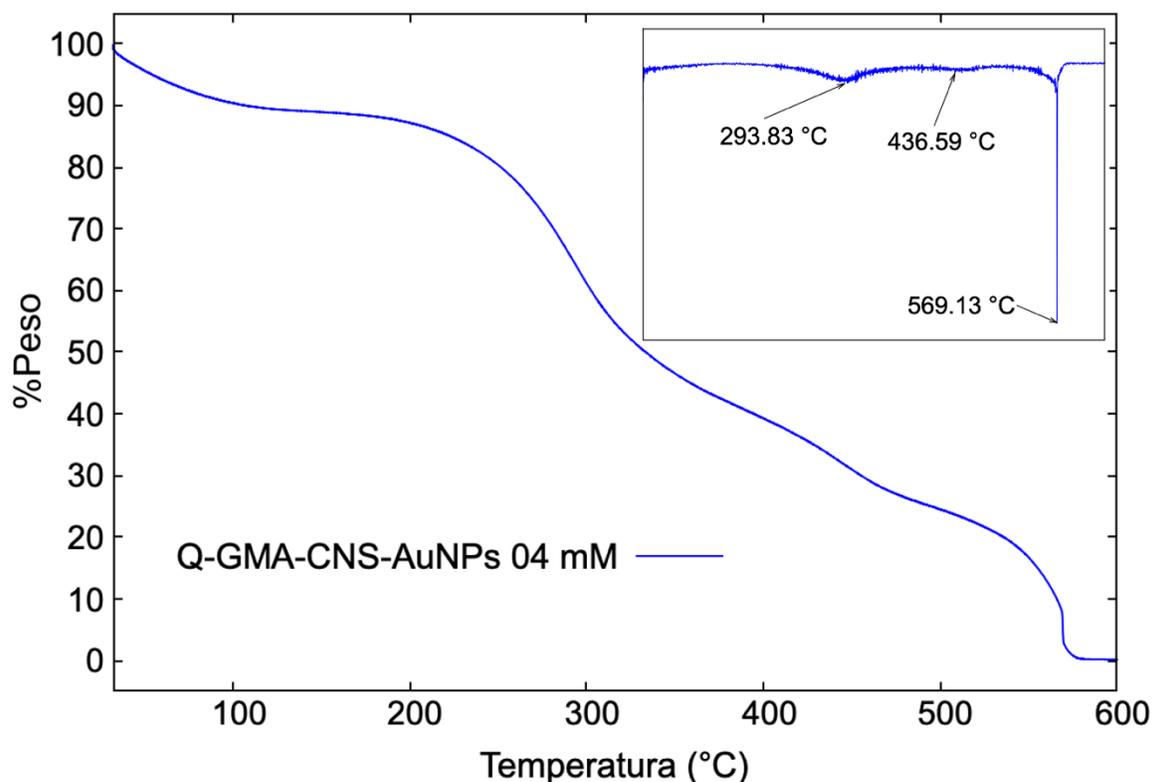


Figura 23. TGA del compuesto Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM.

En la Figura 24, se tiene el espectro de TGA del compuesto Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM donde, la pérdida de peso del 49% se dio a los 297.93 °C correspondiente a la disociación del Q-GMA [87]; a los 449.34 °C se tiene la pérdida del 21% asociado la pérdida de las nanopartículas de oro; y por último, se tiene la pérdida del 18% a los 561.97 °C, la cual corresponde a las nanoesferas en el compuesto [94].

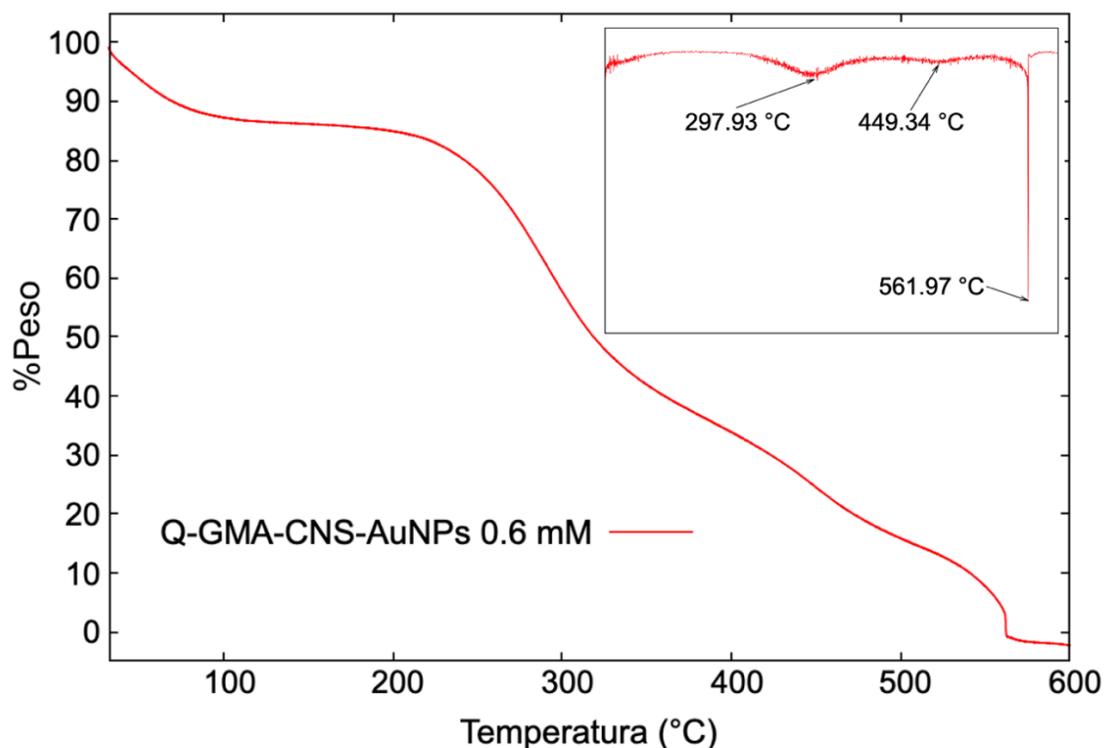


Figura 24. TGA del compuesto Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM.

El análisis de los materiales a través de TGA, muestran que todos ellos presentan tres pérdidas importantes: la primera, alrededor de 295 °C asociada a la disociación del quitosano y el GMA; la segunda, alrededor de 450°C que puede deberse a la pérdida de las nanopartículas de oro; y la tercera, alrededor de los 560°C, está asignada a la pérdida de las nanoesferas de carbono y al material orgánico carbonizado.

#### Rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$ .

El 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF), es un conocido compuesto en las pruebas de rendimiento de  $^1\text{O}_2$ , debido a que su fotodegradación a lo largo del tiempo es proporcional a la producción de oxígeno singulete [95].

Para medir el rendimiento cuántico de las muestras, se realizaron las pruebas en una cámara de radiación infrarroja con soluciones de DPBF con los siguientes compuestos:

1. CNS.
2. Azul de metileno al  $3.13 \times 10^{-4}$  M.
3. Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM.
4. Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM.

El análisis de los compósitos se realizó en los primeros tres minutos dividido en lapsos de 30 segundos, como se puede observar en la Figura 25. De igual manera, se demuestra que el compósito degrada el DPBF de manera proporcional en el tiempo, confirmando el correcto funcionamiento de la cámara de radiación y del compósito [96]. El azul de metileno, es un compuesto usado como referencia para la obtención del rendimiento cuántico de cada compósito por lo que se midió su comportamiento en el DPBF [97]. Como se puede observar en los compuestos, se tiene una disminución en la concentración proporcional en el tiempo, donde a los tres minutos se obtiene una mayor cantidad de degradación del DPBF.

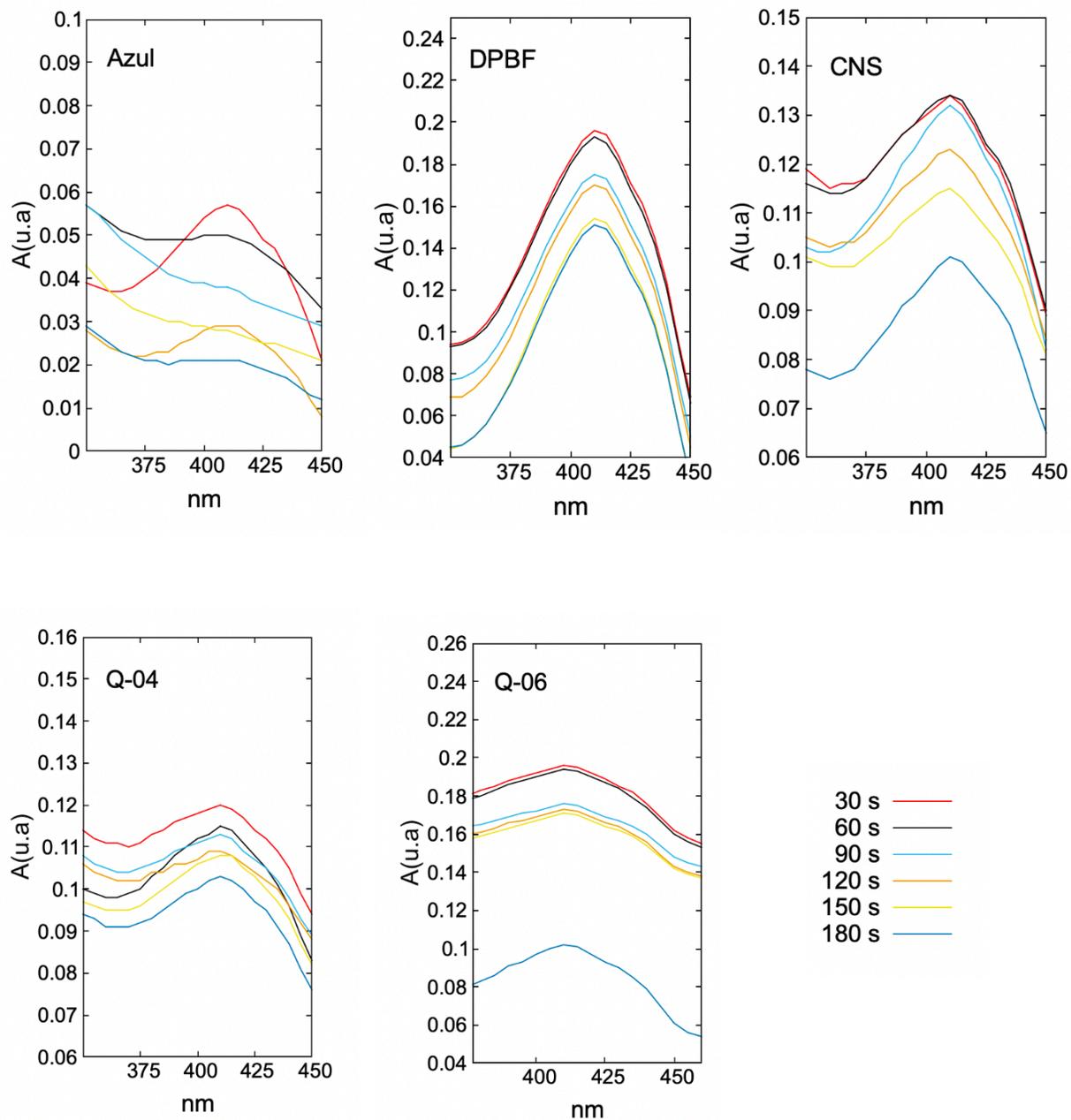


Figura 25. Degradación del DPBF en diferentes tiempos.

De acuerdo a los datos obtenidos, se realizó la curva y el ajuste de los datos en la Figura 26, donde se presenta el comportamiento de los fotosensibilizadores en el tiempo, donde Q-4 y Q-6 se refiere a los compósitos de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM y Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM, respectivamente.

Para el rendimiento cuántico de la producción de oxígeno singlete, se realizó una curva de azul del metileno, ya que este, al servir de referencia, se puede calcular el rendimiento cuántico de los compósitos de Q-GMA-CNS-AuNPs por medio de la ecuación 2 [98]:

$$\phi_{\Delta}(D) = \phi(R) \frac{m(D)}{m(R)} \quad (2)$$

Donde (D) se refiere a la muestra desconocida, (R) a la muestra de referencia y  $m$  a la pendiente de la muestra de la absorbancia contra tiempo. En la tabla 3, se pueden observar los valores del rendimiento cuántico de los compuestos, teniendo como referencia que el  $\phi_{\Delta}$  del azul de metileno es de 0.52 y su pendiente  $-0.007369$  [98].

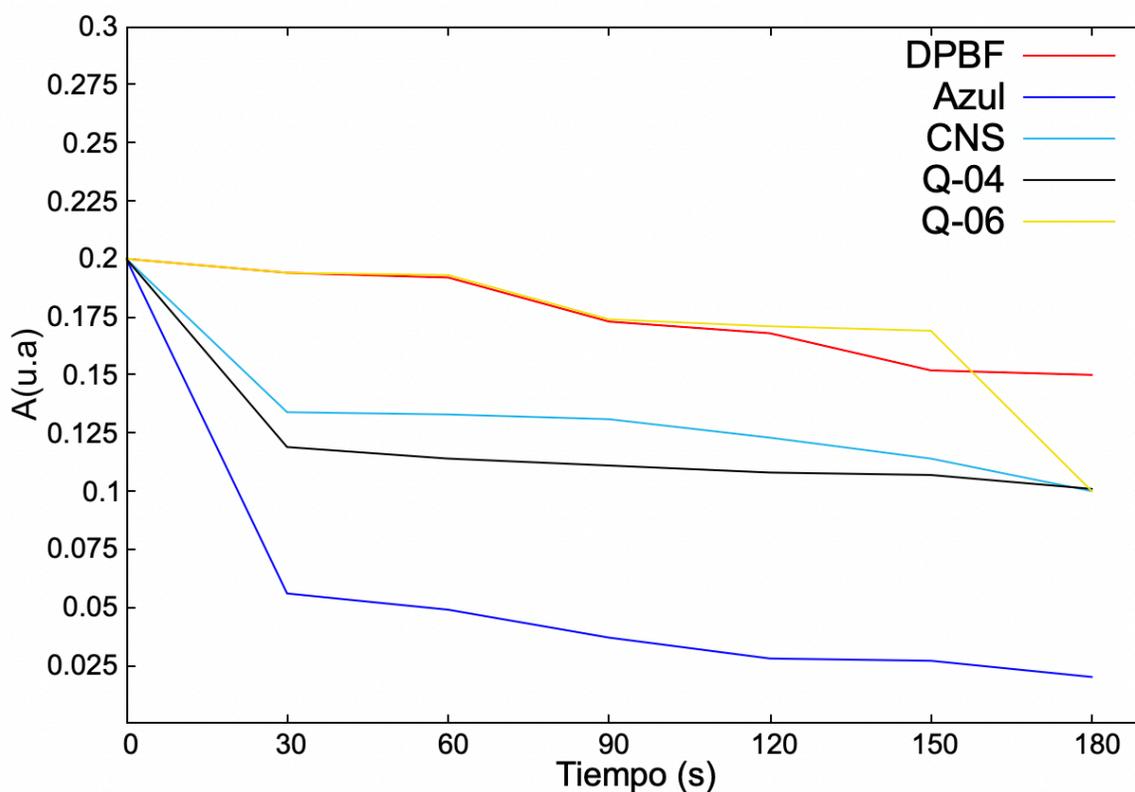


Figura 26. Degradación del DPBF en el tiempo.

Tabla 3. Resultados de rendimiento cuántico

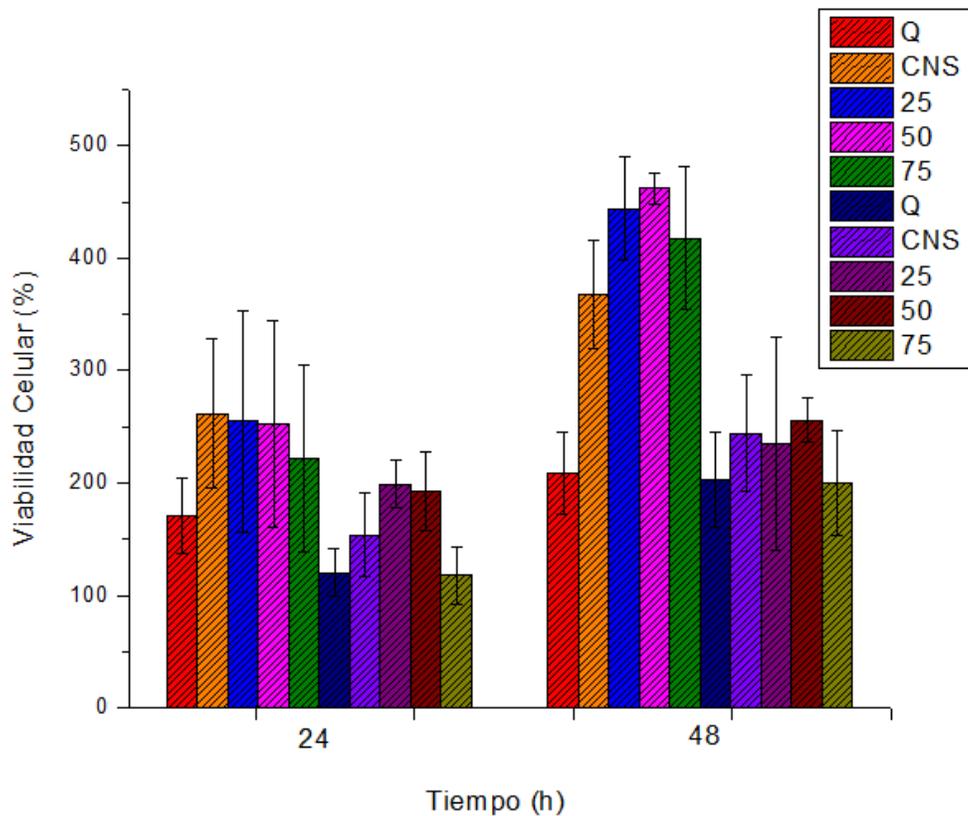
Compuesto	Recta	$\phi_{\Delta}$
Nanoesferas	$f(x) = -0.00041667x + 0.2016$	0.29
Q-04	$f(x) = -0.0003892x + 0.1578$	0.27
Q-06	$f(x) = -0.0004428x + 0.21143$	0.31

#### Viabilidad celular (MTT)

Por otra parte, en la Figura 27 se puede observar el resultado del porcentaje de viabilidad celular contra el tiempo de análisis; los datos, se encuentran agrupados en cinco materiales, donde Q es quitosano-GMA, CNS nanoesferas de carbono y los siguientes tres datos (25, 50 y 75) las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto completo de Q-GMA/CNS/AuNPs al 0.6 mM; de igual forma, las primeras cinco columnas corresponden a las células irradiadas, mientras que las siguientes cinco a las no irradiadas tanto para 24 como para 48 h.

Se puede observar que en las primeras 24h (irradiadas), se tiene un aumento en porcentaje de viabilidad celular donde se obtuvieron valores de 70.9, 161.8, 154.5, 152.7 y 121.8%, para Q, CNS, 25, 50 y 75, respectivamente. Rana Begun *et. al.* reportaron que la irradiación terapéutica aumenta el ATP de la mitocondria,

aumentando el tiempo de vida de las células y su dispersión [99]; este fenómeno se presentó debido a que no hubo un estímulo suficiente de radiación. Por otra parte, al no estar irradiado, se detuvo el porcentaje de viabilidad, donde se pudo relentizar la proliferación de las células de cáncer en 79.5, 46.2, 1.3, 7.7 y 82.2%, para los compositos de Q, CNS, 25, 50 y 75, respectivamente, donde el tiempo de duplicación normal de las células corresponde a 24 h. Lo mismo se observa a las 48 h, donde los datos que corresponden a la parte irradiada, tienen una duplicación exponencial de las células, mientras que las no irradiadas presentan el mismo comportamiento que a las 24 h, es decir, detuvieron la duplicación celular.



*Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular.*

Para medir la selectividad de los compósitos se realizó una curva de calibración de los compósitos (Figura 28), donde se tiene que estos se ajustaron a la recta presentada en la ecuación 3 con un  $R^2$  de 0.97.

$$f(x) = 0.000325x + 0.00120833 \quad (3)$$

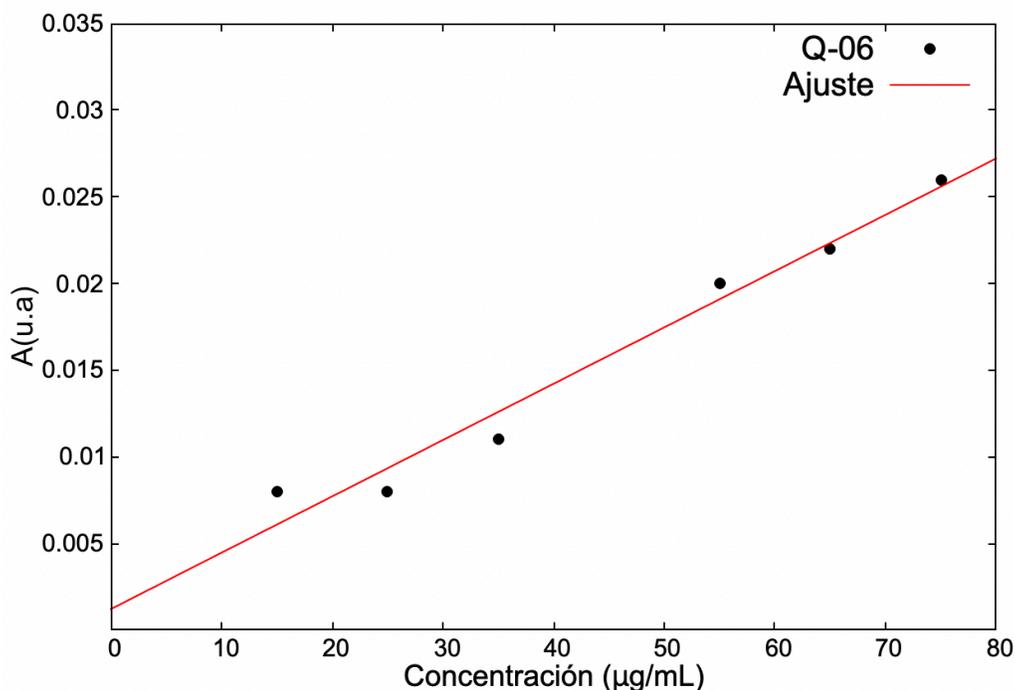


Figura 28. Curva de calibración de compósito en ensayo MTT.

En la tabla 4, se reportan los datos correspondientes a las concentraciones del compósito en los pozos una vez retiradas las células; estos datos corresponden a los ajustados a la curva de la Figura 28 donde las concentraciones de 25 µg/mL no se adhirieron a las células, mientras que a las concentraciones de 50, se tiene que en la parte irradiada el 76% del compósito se adhirió a las células, mientras que la parte no irradiada fue del 46%; del mismo modo, en la concentración de 75 mg/mL, en la parte irradiada se adhirió el 53.7% y en la no irradiada el 51.6%.

Tabla 4. Resultados de concentraciones iniciales y después de retirar células ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Concentración inicial	Conc. Irradiado	Conc. Sin Irradiar
25	25	25
50	12.7	28.1
75	34.7	36.3

## CONCLUSIÓN.

Los resultados presentados por las caracterizaciones demuestran que se obtuvo un compósito nanoestructurado soportado en una matriz de Q-GMA, debido a que las tensiones características de los grupos C-O-C obtenidos en la caracterización de FT-IR se conservaron; de igual manera, la unión de las nanopartículas con el Q-GMA aparenta ser químico debido a las atenuaciones de las tensiones de los grupos  $\text{NH}_2$ ; por otra parte, las nanopartículas complejadas con las nanoesferas conservaron su efecto plasmón (como se observa en los espectros de UV-VIS) en los compósitos de Q-GMA-CNS-AuNPs en concentraciones de 0.4 y 0.6 mM estando distribuidas de manera uniforme en toda la estructura en forma de clusters, al igual de que los tamaños para las nanoesferas es de alrededor de 400 nm y las nanopartículas de oro de 60 nm (SEM y HR-SEM). Estas propiedades, hacen que el material pueda ser considerado como un potencial fotosensibilizador para su aplicación en terapia fotodinámica; dado que este método es menos invasivo que los procedimientos quirúrgicos y los efectos secundarios son menores que la quimioterapia y radioterapia, por lo que la investigación de nuevos fotosensibilizadores que sean estables, con efecto plasmón y que estén distribuidos de manera uniforme en la estructura es necesaria para migrar a este tratamiento fotodinámico.

Posteriormente, el estudio de TGA midió la transformación térmica del compuesto nanoestructurado donde se tiene que las pérdidas de peso a las temperaturas que se sometió el análisis, están asociadas a la degradación del Q-GMA y sus enlaces con las nanopartículas; de igual manera, se demostró que la cantidad de nanoesferas en cada compuesto corresponde al 24 y 18% en peso para los compósitos de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 mM y Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.6 mM, respectivamente.

Se encontró que los compósitos de Q-GMA-CNS-AuNPs tienen la habilidad de generar  $^1\text{O}_2$  por medio de la degradación de DPBF, teniendo un aumento en el rendimiento cuántico en el compuesto de 0.6 mM del 6.9% tomando como referencia las nanoesferas de carbono.

El análisis de MTT dio como resultado que los compósitos tienen la capacidad de frenar la proliferación de las células de cáncer HT29 sin estímulo, mientras que al irradiar, se pudo observar un aumento en la proliferación y metástasis de las células. Por otra parte, tenemos que se tiene una adherencia a las células mayores al 50% en las concentraciones de 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$ , siendo mayores a la hora de irradiar, debido a que se tiene un aumento en la proliferación celular, provocando mayor adherencia.

Finalmente, se puede decir que los compósitos nanoestructurados de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 y 0.6 mM fueron debidamente sintetizados donde tenemos la sinergia de los compuestos de Q-GMA-nanopartículas de oro-nanoesferas de carbono, para la de generación de oxígeno singulete, por lo que es posible su aplicación como

fotosensibilizador en terapia fotodinámica, confirmando la hipótesis planteada en el presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. Sperandio, Y.-Y. Huang, and M. Hamblin, "Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria," *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 8, no. 2, pp. 108–120, 2013, doi: 10.2174/1574891x113089990012.
- [2] G. M. F. Calixto *et al.*, "Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review," *AAPS PharmSciTech*, vol. 20, no. 7. Springer New York LLC, Oct. 01, 2019, doi: 10.1208/s12249-019-1407-y.
- [3] D. S. Kwag, N. M. Oh, Y. T. Oh, K. T. Oh, Y. S. Youn, and E. S. Lee, "Photodynamic therapy using glycol chitosan grafted fullerenes," *Int. J. Pharm.*, vol. 431, no. 1–2, pp. 204–209, 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.038.
- [4] D. P. Ferreira *et al.*, "Characterization of a Squaraine/Chitosan System for Photodynamic Therapy of Cancer," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 7, pp. 1212–1220, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b11604.
- [5] "Cáncer de colon y recto." <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html> (accessed Sep. 22, 2022).
- [6] FRANCISCO LÓPEZ, "Actualizaciones En El Diagnóstico Y Tratamiento Quirúrgico De Los Update in the Diagnosis and Surgical Treatment of Colon Cancer," vol. 24, no. 4, pp. 645–653, 2013.
- [7] D. Luo, K. A. Carter, D. Miranda, and J. F. Lovell, "Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors," *Adv. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–24, 2017, doi: 10.1002/advs.201600106.
- [8] R. M. Szeimies, J. Dräger, C. Abels, and M. Landthaler, "Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology," *Compr. Ser. Photosciences*, vol. 2, no. C, pp. 3–15, 2001, doi: 10.1016/S1568-461X(01)80105-8.

- [9] S. Kwiatkowski *et al.*, “Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 106. Elsevier Masson SAS, pp. 1098–1107, Oct. 01, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [10] L. Benov, “Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions,” 2014, doi: 10.1159/000362416.
- [11] X. Li *et al.*, “Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 379, pp. 147–160, 2019, doi: 10.1016/j.ccr.2017.08.003.
- [12] L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka, and M. R. Hamblin, “Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 44, no. 6, pp. 490–499, 2012, doi: 10.1002/lsm.22045.
- [13] F. Wilkinson, W. P. Helman, and A. B. Ross, “Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution,” *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 22, no. 1, pp. 113–262, 1993, doi: 10.1063/1.555934.
- [14] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, “Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 2516–2539, 2011, doi: 10.3390/cancers3022516.
- [15] C. C. Benz and C. Yau, “Ageing, oxidative stress and cancer: Paradigms in parallax,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 11, pp. 875–879, 2008, doi: 10.1038/nrc2522.
- [16] H. Abrahamse and M. R. Hamblin, “New photosensitizers for photodynamic therapy,” *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 4. Portland Press Ltd, pp. 347–364, Feb. 15, 2016, doi: 10.1042/BJ20150942.
- [17] D. Kessel, “Photodynamic therapy: From the beginning,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–7, 2004, doi: 10.1016/S1572-1000(04)00003-1.
- [18] J. Zhang, C. Jiang, J. P. Figueiró Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, and L. A. Muehlmann, “An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy,” *Acta Pharmaceutica*

*Sinica B*, vol. 8, no. 2. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 137–146, Mar. 01, 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2017.09.003.

- [19] T. C. Z. Haixia Qiu, Michael M. Kim, Rozhin Penjweini, Jarod C. Finlay, Theresa M. Busch, Tianhao Wang, Wenshen Guo, Keith A. Cengel, Charles B. Simone II, Eli Glatstein, “Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, no. 1, pp. 42–49, 2016, doi: 10.1111/ijlh.12426.
- [20] B. Sun, W. Li, and N. Liu, “Curative effect of the recent photofrin photodynamic adjuvant treatment on young patients with advanced colorectal cancer,” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 2071–2074, 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4179.
- [21] X. Wang *et al.*, “Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, Sinoporphyrin sodium,” *Theranostics*, vol. 5, no. 7, pp. 772–786, 2015, doi: 10.7150/thno.10853.
- [22] J. M. Nauta *et al.*, “Photofrin-mediated photodynamic therapy of chemically-induced premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the palatal mucosa in rats,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 26, no. 3, pp. 223–231, 1997, doi: 10.1016/S0901-5027(97)80825-9.
- [23] C. M. Peterson, R. Reed, C. J. Jolles, K. Parker Jones, R. C. Straight, and A. M. Poulson, “Photodynamic therapy of human ovarian epithelial carcinoma, OVCAR-3, heterotransplanted in the nude mouse,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 167, no. 6, pp. 1852–1855, 1992, doi: 10.1016/0002-9378(92)91786-A.
- [24] I. Yoon, J. Z. Li, and Y. K. Shim, “Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy,” *Clin. Endosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 7–23, 2013, doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.
- [25] A. Orenstein *et al.*, “A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model,” *Br. J. Cancer*, vol. 73, no. 8, pp. 937–944, 1996, doi: 10.1038/bjc.1996.185.
- [26] M. Rapp, M. Kamp, H. J. Steiger, and M. Sabel, “Endoscopic-Assisted Visualization of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Malignant

- Glioma Surgery: A Technical Note,” *World Neurosurg.*, vol. 82, no. 1–2, pp. e277–e279, 2014, doi: 10.1016/j.wneu.2013.07.002.
- [27] R. Díez Valle, J. Slob, J. Galván, C. Arza, C. Romariz, and C. Vidal, “Observational, retrospective study of the effectiveness of 5-aminolevulinic acid in malignant glioma surgery in Spain (The VISIONA study),” *Neurol. (English Ed.)*, vol. 29, no. 3, pp. 131–138, 2014, doi: 10.1016/j.nrleng.2013.05.004.
- [28] A. Harriman, B. G. Maiya, T. Murai, G. Hemmi, J. L. Sessler, and T. E. Mallouk, “Metalloporphyrins: A new family of photosensitizers for efficient generation of singlet oxygen,” *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 5, pp. 314–316, 1989, doi: 10.1039/C39890000314.
- [29] S. W. Young *et al.*, “Lutetium texaphyrin (PCI-0123): A near-infrared, water-soluble photosensitizer,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 63, no. 6, pp. 892–897, 1996, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb09647.x.
- [30] Y. Ye, L. X. Wang, D. P. Zhang, Y. J. Yan, and Z. L. Chen, “Studies on photodynamic mechanism of a novel chlorine derivative (TDPC) and its antitumor effect for photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo*,” *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1142/S1793545815400015.
- [31] B. Pucelik, A. Sułek, and J. M. Dąbrowski, “Bacteriochlorins and their metal complexes as NIR-absorbing photosensitizers: properties, mechanisms, and applications,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 416, 2020, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213340.
- [32] E. Ranyuk, N. Cauchon, K. Klarskov, B. Guérin, and J. E. Van Lier, “Phthalocyanine-peptide conjugates: Receptor-targeting bifunctional agents for imaging and photodynamic therapy,” *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 4, pp. 1520–1534, 2013, doi: 10.1021/jm301311c.
- [33] P. . Janine D. Miller, M.D. Elma D. Baron, M.D., Heather Scull, M.S., Andrew Hsia, B.A., Jeffrey C. Berlin, Ph.D., Thomas McCormick, Ph.D., Valdir Colussi, Ph.D., Malcolm E. Kenney, Ph.D., Kevin D. Cooper, M.D. and Nancy Oleinick, “Photodynamic Therapy with the Phthalocyanine Photosensitizer,” *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 3, pp. 316–323, 2019, [Online]. Available: <https://www.asahq.org/resources/clinical-information/asa->

physical-status-classification-system.%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/s00464-018-6591-4.

- [34] R.-M. Ion, "Porphyrins and Phthalocyanines: Photosensitizers and Photocatalysts," *Phthalocyanines Some Curr. Appl.*, no. June, 2017, doi: 10.5772/intechopen.68654.
- [35] J. R. Darwent, P. Douglas, A. Harriman, G. Porter, and M. C. Richoux, "Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 44, no. 1, pp. 83–126, 1982, doi: 10.1016/S0010-8545(00)80518-4.
- [36] M. Wainwright and K. B. Crossley, "Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons?," *J. Chemother.*, vol. 14, no. 5, pp. 431–443, 2002, doi: 10.1179/joc.2002.14.5.431.
- [37] S. P. Tseng *et al.*, "Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates," *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 50, no. 1, pp. 46–54, 2017, doi: 10.1016/j.jmii.2014.12.007.
- [38] J. P. Tardivo, F. Adami, J. A. Correa, M. A. parecid. S. Pinhal, and M. S. Baptista, "A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 11, no. 3, pp. 342–350, 2014, doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.04.007.
- [39] A. C. B. P. Costa, V. M. C. Rasteiro, C. A. Pereira, R. D. Rossoni, J. C. Junqueira, and A. O. C. Jorge, "The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*," *Mycoses*, vol. 55, no. 1, pp. 56–63, 2012, doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x.
- [40] L. F. De Freitas and M. R. Hamblin, *Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes*. Elsevier Inc., 2016.
- [41] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic therapy: Novel third-generation photosensitizers one step closer?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 154, no. 1, pp. 1–3, 2008, doi: 10.1038/bjp.2008.98.
- [42] H. Kataoka *et al.*, "New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers," *Ann. Transl. Med.*, vol. 5, no. 8, pp. 1–7, 2017, doi: 10.21037/atm.2017.03.59.

- [43] G. M. F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. De Freitas, C. R. Fontana, M. Chorilli, and A. M. Grumezescu, "Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review," *Molecules*, vol. 21, no. 3, pp. 1–18, 2016, doi: 10.3390/molecules21030342.
- [44] S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 4, pp. 1990–2042, 2015, doi: 10.1021/cr5004198.
- [45] A. Labib, V. Lenaerts, F. Chouinard, J. C. Leroux, R. Ouellet, and J. E. van Lier, "Biodegradable Nanospheres Containing Phthalocyanines and Naphthalocyanines for Targeted Photodynamic Tumor Therapy," *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 8, no. 8, pp. 1027–1031, 1991, doi: 10.1023/A:1015809124895.
- [46] S. H. Voon *et al.*, "Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid)- diiodinated boron-dipyrromethene nanoparticles improve tumor selectivity and stealth properties in photodynamic cancer therapy," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1431–1452, 2016, doi: 10.1166/jbn.2016.2263.
- [47] R. F. C. & R. E. S. H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, "C60: Buckminsterfullerene," *Nature*, vol. 318, pp. 162–163, 1985.
- [48] J. R. Baena, M. Gallego, and M. Valcárcel, "Fullerenes in the analytical sciences," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 3, pp. 187–198, 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00306-0.
- [49] R. Lucena, B. M. Simonet, S. Cárdenas, and M. Valcárcel, "Potential of nanoparticles in sample preparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 4, pp. 620–637, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.069.
- [50] D. Lu, R. Tao, and Z. Wang, "Carbon-based materials for photodynamic therapy: A mini-review," *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, vol. 13, no. 2. Higher Education Press, pp. 310–323, Jun. 01, 2019, doi: 10.1007/s11705-018-1750-7.
- [51] I. G. Safonov, P. S. Baran, and D. I. Schuster, "Synthesis and photophysics of a novel porphyrin-C60 hybrid," *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, no. 47, pp. 8133–8136, 1997, doi: 10.1016/S0040-4039(97)10184-8.

- [52] K. Albert and H. Y. Hsu, "Carbon-based materials for photo-triggered theranostic applications," *Molecules*, vol. 21, no. 11, pp. 1–29, 2016, doi: 10.3390/molecules21111585.
- [53] A. Sahu, W. Il Choi, J. H. Lee, and G. Tae, "Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy," *Biomaterials*, vol. 34, no. 26, pp. 6239–6248, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.066.
- [54] C. Bendicho, C. Bendicho-Lavilla, and I. Lavilla, "Nanoparticle-assisted chemical speciation of trace elements," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 109–121, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.12.015.
- [55] X. Ma *et al.*, "Single-walled carbon nanotubes alter cytochrome c electron transfer and modulate mitochondrial function," *ACS Nano*, vol. 6, no. 12, pp. 10486–10496, 2012, doi: 10.1021/nn302457v.
- [56] U. Sah, K. Sharma, N. Chaudhri, M. Sankar, and P. Gopinath, "Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of *Staphylococcus aureus*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 162, pp. 108–117, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.046.
- [57] D. C. Hone *et al.*, "Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy," *Langmuir*, vol. 18, no. 8, pp. 2985–2987, 2002, doi: 10.1021/la0256230.
- [58] I. Marangon, C. Ménard-Moyon, A. K. A. Silva, A. Bianco, N. Luciani, and F. Gazeau, "Synergic mechanisms of photothermal and photodynamic therapies mediated by photosensitizer/carbon nanotube complexes," *Carbon N. Y.*, vol. 97, pp. 110–123, 2016, doi: 10.1016/j.carbon.2015.08.023.
- [59] D. K. Chatterjee and Y. Zhang, "Upconverting nanoparticles as nano-transducers for photodynamic therapy in cancer cells," *Tech. Proc. 2008 NSTI Nanotechnol. Conf. Trade Show, NSTI-Nanotech, Nanotechnol. 2008*, vol. 2, pp. 69–72, 2008.
- [60] H. Du Yamin Yang, Ning Gao, Yue Hu, Chao Jia, Tsengming Chou and & Hongjun Wang, "Gold nanoparticle-enhanced photodynamic therapy: effects

of surface charge and mitochondrial targeting,” *viability mesoporous silica nanoparticles drug Deliv.*, vol. 6, pp. 1239–1241, 2015.

- [61] Michalet, X, Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., “Quantum Dots for Live Cells ,” vol. 538, no. 2005, pp. 538–545, 2013, doi: 10.1126/science.1104274.
- [62] A. C. S. Samia, X. Chen, and C. Burda, “Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 51, pp. 15736–15737, 2003, doi: 10.1021/ja0386905.
- [63] E. P. Chizenga and H. Abrahamse, “Nanotechnology in modern photodynamic therapy of cancer: A review of cellular resistance patterns affecting the therapeutic response,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070632.
- [64] H. Zhang, Y. Shan, and L. Dong, “A comparison of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1450–1457, 2014, doi: 10.1166/jbn.2014.1961.
- [65] S. Çeşmeli and C. Biray Avci, “Application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in cancer therapies,” *J. Drug Target.*, vol. 27, no. 7, pp. 762–766, 2019, doi: 10.1080/1061186X.2018.1527338.
- [66] Hackenberg S., Scherzed, A. , Kessler, M. , Froelich, K., Ginzkey, C. , Koehler, C.K., Burghartz, M., Hagen, R. and Kleinsasser, N., “Zinc oxide nanoparticles induce photocatalytic cell death in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro STEPHAN,” *Int. J. Oncol.*, vol. 37, pp. 1583–1590, 2010, doi: 10.3892/ijo\_00000812.
- [67] R. Fujiwara, Y. Luo, T. Sasaki, K. Fujii, H. Ohmori, and H. Kuniyasu, “Cancer therapeutic effects of titanium dioxide nanoparticles are associated with oxidative stress and cytokine induction,” *Pathobiology*, vol. 82, no. 6, pp. 243–251, 2015, doi: 10.1159/000439404.
- [68] K. D. Patel, R. K. Singh, and H. W. Kim, “Carbon-based nanomaterials as an emerging platform for theranostics,” *Mater. Horizons*, vol. 6, no. 3, pp. 434–469, 2019, doi: 10.1039/c8mh00966j.

- [69] A. Herreros-López *et al.*, “Nanocrystalline cellulose-fullerene: Novel conjugates,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 164, pp. 92–101, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.068.
- [70] J. E. Roberts, A. R. Wielgus, W. K. Boyes, U. Andley, and C. F. Chignell, “Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 228, no. 1, pp. 49–58, 2008, doi: 10.1016/j.taap.2007.12.010.
- [71] T. Murakami *et al.*, “Photodynamic and photothermal effects of semiconducting and metallic-enriched single-walled carbon nanotubes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 43, pp. 17862–17865, 2012, doi: 10.1021/ja3079972.
- [72] L. Wang *et al.*, “Photodynamic effect of functionalized single-walled carbon nanotubes: A potential sensitizer for photodynamic therapy,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 9, pp. 4642–4651, 2014, doi: 10.1039/c3nr06835h.
- [73] C. Y. Chen and R. G. Zepp, “Probing Photosensitization by Functionalized Carbon Nanotubes,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 23, pp. 13835–13843, 2015, doi: 10.1021/acs.est.5b01041.
- [74] J. Ge *et al.*, “A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation,” *Nat. Commun.*, vol. 5, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1038/ncomms5596.
- [75] D. Chen *et al.*, “Efficacy dependence of photodynamic therapy mediated by upconversion nanoparticles: subcellular positioning and irradiation productivity,” 2017, doi: 10.1002/smll.201602053.
- [76] V. Biju, S. Mundayoor, R. V. Omkumar, A. Anas, and M. Ishikawa, “Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 2, pp. 199–213, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.11.007.
- [77] C. Lares V, “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 4, no. 2, pp. 91–109, 2003.
- [78] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, and C. Aiello, “Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications,” *Rev.*

- Tecnocientífica URU*, no. August 2016, pp. 53–58, 2011, doi: 2244-775X.
- [79] S. Cui *et al.*, “In vivo targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 1, pp. 676–688, 2013, doi: 10.1021/nn304872n.
- [80] X. Liao and X. Zhang, “Preparation, characterization and cytotoxicity of carbon nanotube-chitosan-phycoerythrin complex,” *Nanotechnology*, vol. 23, no. 3, 2012, doi: 10.1088/0957-4484/23/3/035101.
- [81] H. Xiao *et al.*, “Photodynamic effects of chlorin e6 attached to single wall carbon nanotubes through noncovalent interactions,” *Carbon N. Y.*, vol. 50, no. 4, pp. 1681–1689, 2012, doi: 10.1016/j.carbon.2011.12.013.
- [82] E. A. Elizalde-Peña *et al.*, “Synthesis and characterization of chitosan-glycidyl methacrylate with methyl methacrylate,” *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 9, pp. 3963–3969, 2007, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2007.06.004.
- [83] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech, “Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 32, pp. 15700–15707, 2006, doi: 10.1021/jp061667w.
- [84] E. M. Valenzuela-Acosta, E. Prokhorov, O. Arias de Fuentes, G. Luna-Barcenas, R. A. Mauricio-Sánchez, and E. A. Elizalde-Peña, “Chitosan-Gold Nanocomposite for Copper Ions Detection,” *Curr. Nanosci.*, vol. 12, no. 6, pp. 754–761, 2016, doi: 10.2174/1573413712666160811120845.
- [85] F. Ali, S. B. Khan, T. Kamal, Y. Anwar, K. A. Alamry, and A. M. Asiri, “Anti-bacterial chitosan/zinc phthalocyanine fibers supported metallic and bimetallic nanoparticles for the removal of organic pollutants,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 173, pp. 676–689, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.074.
- [86] R. Kwizera *et al.*, “Evaluation of trypan blue stain in a haemocytometer for rapid detection of cerebrospinal fluid sterility in HIV patients with cryptococcal meningitis,” *BMC Microbiol.*, vol. 17, no. 1, 2017, doi: 10.1186/s12866-017-1093-4.
- [87] N. Flores-Ramírez *et al.*, “Characterization and degradation of functionalized chitosan with glycidyl methacrylate,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 16, no. 4, pp. 473–488, 2005, doi: 10.1163/1568562053700174.
- [88] S. Pu, J. Li, L. Sun, L. Zhong, and Q. Ma, “An in vitro comparison of the

- antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 211, no. December 2018, pp. 161–172, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.02.007.
- [89] Y. Wu, F. Zuo, Y. Lin, Y. Zhou, Z. Zheng, and X. Ding, “Green and Facile Synthesis of Gold Nanoparticles Stabilized by Chitosan,” *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 51, no. 5, pp. 441–446, 2014, doi: 10.1080/10601325.2014.893142.
- [90] P. R. Wei, Y. Kuthati, R. K. Kankala, and C. H. Lee, “Synthesis and characterization of chitosan-coated near-infrared (NIR) layered double hydroxide-indocyanine green nanocomposites for potential applications in photodynamic therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 20943–20968, 2015, doi: 10.3390/ijms160920943.
- [91] H. Huang and X. Yang, “Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate,” *Biomacromolecules*, vol. 5, no. 6, pp. 2340–2346, 2004, doi: 10.1021/bm0497116.
- [92] L. Xie *et al.*, “Functional long circulating single walled carbon nanotubes for fluorescent/photoacoustic imaging-guided enhanced phototherapy,” *Biomaterials*, vol. 103, pp. 219–228, 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.058.
- [93] H. Xia, Y. Xiahou, P. Zhang, W. Ding, and D. Wang, “Revitalizing the Frens Method to Synthesize Uniform, Quasi-Spherical Gold Nanoparticles with Deliberately Regulated Sizes from 2 to 330 nm,” *Langmuir*, vol. 32, no. 23, pp. 5870–5880, 2016, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01312.
- [94] A. D. Tiwari, A. K. Mishra, S. B. Mishra, O. A. Arotiba, and B. B. Mamba, “Green synthesis and stabilization of gold nanoparticles in chemically modified chitosan matrices,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 48, no. 4, pp. 682–687, 2011, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.02.008.
- [95] D. Chen *et al.*, “Efficacy Dependence of Photodynamic Therapy Mediated by Upconversion Nanoparticles: Subcellular Positioning and Irradiation Productivity,” *Small*, vol. 13, no. 13, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1002/sml.201602053.
- [96] L. Wang *et al.*, “Using Hollow Carbon Nanospheres as a Light-Induced Free

Radical Generator To Overcome Chemotherapy Resistance,” 2014, doi: 10.1021/ja511560b.

- [97] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, “Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 1 SPEC. ISS., pp. 1–23, 2005, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
- [98] K. and R. W. R. Irene E, “[2] P h o t o s e n s i t i z e d Production of Singlet Oxygen,” vol. 319, pp. 20–28, 2000.
- [99] R. Begum, K. Calaza, J. H. Kam, T. E. Salt, C. Hogg, and G. Jeffery, “Near-infrared light increases ATP, extends lifespan and improves mobility in aged *Drosophila melanogaster*,” *Biol. Lett.*, vol. 11, no. 3, pp. 25–28, 2015, doi: 10.1098/rsbl.2015.0073.