

SÍNTESIS DE UN COMPÓSITO NANOESTRUCTURADO SOPORTADO EN QUITOSANO- GMA PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO FOTOSENSIBILIZADOR

SYNTHESIS OF NANOSTRUCTURED COMPOSITE
SUPPORTED IN CHITOSAN-GMA FOR ITS POSSIBLE
APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY

Luis Adrián Ontiveros Gómez¹⁺
Beatriz Liliana España Sánchez²
Eduardo Arturo Elizalde Peña^{1*}

¹ Universidad Autónoma de Querétaro, México.

² Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico
en Electroquímica, México.

⁺ lontiveros14@alumnos.uaq.mx;

^{*} eelizalde@uaq.edu.mx

² lespana@cideteq.mx





RESUMEN

La terapia fotodinámica es una técnica alternativa para el tratamiento del cáncer y diversas enfermedades mediante luz, oxígeno molecular y un fotosensibilizador (Fs). Un Fs es una molécula especializada en absorber un fotón para estimular la promoción de un estado basal a un estado triplete excitado que, al encontrarse con oxígeno molecular, es capaz de producir especies reactivas de oxígeno. En el presente trabajo, se reporta la síntesis de un compuesto nanoestructurado de nanoesferas de carbono (CNS) usado como fotosensibilizador conjugado con nanopartículas de oro (AUNPS) soportados en una matriz de quitosano-GMA (Q-GMA). Se observó por medio de las caracterizaciones de FT-IR, UV-VIS y SEM 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; ambos compuestos constituyen fotosensibilizadores potenciales para su aplicación en terapia fotodinámica.

Palabras clave: fotosensibilizadores, nanopartículas, oxígeno singlete, terapia fotodinámica.

Se buscan nuevos materiales y compuestos que sean de utilidad en tratamientos menos invasivos para el cáncer que las alternativas actuales.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is an alternative technique for cancer treatment and other

diseases. To have a photodynamic effect, it is imperative to have light, molecular oxygen, and a photosensitizer. A photosensitizer is a specialized molecule that absorbs light to stimulate the promotion from ground state to a triplet excited state, that interacts directly with molecular

oxygen to obtain reactive oxygen species. In the present work, the synthesis of a nanostructured composite made of carbon nanosphere (CNS) used as a photosensitizer, conjugated with gold nanoparticles (AUNPS) supported in a Chitosan-GMA matrix is reported. It was observed through the characterization of FT-IR, UV-VIS and SEM that conjugation did not alter the chitosan matrix and that the photosensitizer also maintained the AUNPS characteristic plasmon in the samples Q-GMA-CNS-AUNPS with a concentration of 0.4 and 0.6 mM. These two compounds are considered as potential photosensitizers for their application in PDT.

Keywords: photosensitizer, up-converting nanoparticles, singlet oxygen, photodynamic therapy.

INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica (PDT, photodynamic therapy) es una técnica no invasiva para el tratamiento de enfermedades no oncológicas, así como diferentes tipos de cáncer en distintas locaciones; involucra el uso de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por un Fs (o por un colorante no tóxico) con la presencia de luz de baja intensidad y oxígeno molecular [1], [2]. Se basa en la acumulación del compuesto en tejidos patológicos a través de la aplicación local o sistémica, seguido de la absorción de radiación a una longitud de onda apropiada para iniciar un proceso de activación, la cual desemboca en la destrucción selectiva de células indeseables.

Un fotosensibilizador ideal debe tener alta pureza química, estabilidad a temperatura ambiente y solubilidad en el cuerpo, selectividad, además de no tener

toxicidad en oscuro ni absorción solapada con melatonina, hemoglobina ni oxihemoglobina. En la búsqueda de esas propiedades, los Fs se han desarrollado en generaciones; y cada una resuelve los problemas de la anterior [3].

En la primera generación tenemos la introducción de una mezcla de porfirinas denominada *derivados de hematoporfirina (HpD) y la fotofrina*. Estos compuestos han sido probados contra cáncer de pulmón, colorrectal, mama, oral y de ovarios [4]-[8]. Los inconvenientes con esta generación son su poca pureza química, baja penetración tisular y el extendido tiempo de vida media, el cual provoca hipersensibilidad en la piel.

Los elementos característicos de la segunda generación incluyen alta pureza química, elevado rendimiento de formación de oxígeno singlete (1O_2), rápida eliminación del cuerpo y mejor penetración en los tejidos. Esta última se debe a los máximos de absorción en los rangos de 650-800 nm [9]. Los Fs de esta generación incluyen texafirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianina y colorantes sintéticos. Su principal desventaja radica en dos problemas: poca selectividad y tendencia a agregarse. Debido a que la capacidad de producir 1O_2 es una propiedad exclusiva de especies monoméricas, fue necesario el estudio de nuevos compuestos de apoyo [10].

Las estructuras moleculares planas de los Fs que son necesarias para la absorción de luz, les confieren propiedades hidrofóbicas que promueven su agregación [11]; por ello, el principal objetivo de la tercera generación es aumentar la selectividad y distribución por medio de la combinación con

moléculas receptoras, anticuerpos y marcadores de superficie tumorales. Estas modificaciones se pueden obtener por medio del encapsulamiento o inmovilización del Fs en nanoplataformas [12][13].

La aplicación de nanomateriales con Fs ha sido extensamente estudiada y durante el desarrollo de la tercera generación se descubrió la habilidad de generar 1O_2 de los nanomateriales con altos rendimientos cuánticos. Dentro de estos compuestos tenemos nanopartículas, nanotubos de carbono, grafeno, nanoesferas de carbono y puntos cuánticos que han sido probados y han demostrado una alta especificidad en células de cáncer de mama, hígado y páncreas, etcétera [14]-[18].

El quitosano es un vehículo transportador de fármacos, así como de nanopartículas y Fs [19] que ha mostrado una 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 [20]; de igual manera, al soportar un Fs en este biopolímero, se ha observado que los parámetros fotofísicos y de estabilidad mejoran, reduciendo la posibilidad de generación de fotoproductos y vías de desviación [21].

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados fueron quitosano (Q), ácido acético, acetonitrilo, glicidimetacrilato, ácido cloroáurico (*Sigma Aldrich*) y nanoesferas de carbono (CNS) (CIDETEQ). La preparación del Quitosano-GMA (Q-GMA) se llevó a cabo mediante la técnica de Elizalde et al. a través de la precipitación de la mezcla de quitosano y glicidimetacrilato en acetonitrilo [22]; la

síntesis de las nanopartículas de oro a 0.2, 0.4 y 0.6 mM se realizó por medio de la reducción del ácido cloroáurico en quitosano y Q-GMA por separado; para la mezcla de las nanoesferas de carbono y las muestras anteriores, se realizó la incorporación del nanomaterial al 10 % w/v. No se usó purificación adicional en los reactivos y se utilizaron como se recibieron.

CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO (FT-IR)

Se prepararon películas de espesor menor a 70 μm realizando barridos de 4000 a 450 cm^{-1} donde se identificaron las vibraciones de los grupos principales de quitosano y Q-GMA con las nanopartículas de oro y nanoesferas con ayuda del equipo Spectrum Two_{TM}.

ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS)

Se utilizaron muestras líquidas de las mezclas de quitosano y Q-GMA con las nanopartículas de oro y nanoesferas para medir el plasmón presente en ellas. Se realizó el análisis de 350 a 800 nm con el equipo GENESYSTEM 10S de la marca THERMO Scientific.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La morfología superficial y distribución de las nanopartículas de oro con las nanoesferas se realizó por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JSM 6010 LA con voltajes de aceleración de 15 y 20 kV y ampliación de 50 a 6000x.

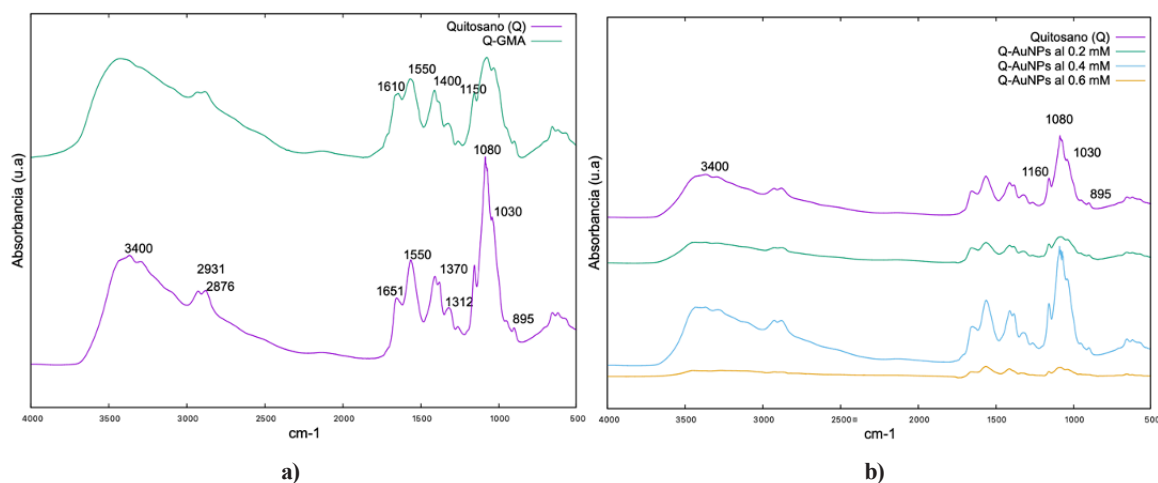


Figura 1. Espectro de FT-IR de a) Q y Q-GMA y b) Q-AuNP's al 0.2, 0.4 y 0.6 mM.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En la Figura 1a se muestra la comparación de los espectros de IR de Q y Q-GMA; podemos observar que el espectro del primero tiene el estiramiento característico (n) de los grupos O-H y N-H en la zona de los 3400 cm^{-1} ; en 2931 y 2876 cm^{-1} , las tensiones asimétrica y simétrica del grupo CH_2 , respectivamente; en 1650 cm^{-1} tenemos la tensión característica del grupo amida con su deformación en 1550 cm^{-1} ; en la zona de los 1370 cm^{-1} tenemos la tensión del grupo -NHCO con el estiramiento del grupo C-N en 1312 cm^{-1} ; en el rango de 1080 a 1030 cm^{-1} , tenemos la tensión asimétrica y simétrica del grupo C-O con los picos característicos de los sacáridos en 1160 y 895 cm^{-1} . El compuesto sintetizado de Q-GMA presenta un corrimiento del grupo C=O en 1600 cm^{-1} ; en 1550 cm^{-1} tenemos el estiramiento característico del grupo C=C al igual que las deformaciones de los grupos CH_3 y C-O-C en 1400 y 1160 cm^{-1} , respectivamente.

A su vez, la Figura 1b expone el espectro de FT-IR de la conjugación de Q con AuNPs. Se observa una atenuación en las tensiones y deformaciones de los grupos O-H y NH_2 que sugiere que los grupos O-H

participan en la quelación con las nanopartículas con el grupo NH_2 . Adicionalmente, la atenuación en la zona de las 3400 cm^{-1} muestra que los grupos antes mencionados también participaron en la reducción y estabilización de las AuNPs [23]. De igual manera, no se muestra cambio significativo en la estructura, ya que no desaparecieron los picos característicos del Q en el grupo C-O-C mostrados en la Figura 1a.

En la Figura 2a tenemos el espectro de FT-IR de la conjugación de Q-GMA con AuNPs. Es visible un aumento en el porcentaje de absorbancia de los grupos antes mencionados debido a la presencia de las nanopartículas de oro en las concentraciones de 0.2 y 0.4 mM. La concentración de 0.6 mM mostró una disminución de dichas intensidades debido nuevamente a la conjugación en los grupos amino disponibles del Q-GMA. En la Figura 2b, del espectro de Q-GMA-CNS-AuNPs, notamos 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 cm^{-1} y de los grupos C=C en 1550 cm^{-1} . Este comportamiento también se presenta en los picos característicos de los sacáridos en ambos compuestos en 1160

y 895 cm^{-1} . Entonces, tenemos que las síntesis no alteraron la estructura de las matrices de Q y Q-GMA, ya que se conservó la tensión C-O-C en la zona de los 1160 cm^{-1} .

La caracterización UV-VIS se realizó para verificar el plasmón de las AuNPs en las muestras de Q-GMA y Q. En la Figura 3a, se observa el espectro UV-VIS del Q y sus posteriores modificaciones con las nanopartículas sintetizadas. La imagen muestra que el plasmón es casi indetectable en concentraciones de 0.2 mM de AuNPs; sin embargo, conforme aumenta la concentración de oro, podemos observar el plasmón característico de estas a 528 nm, hasta alcanzar su punto más evidente en 0.6 mM. Por otra parte, en los compuestos de Q-GMA con AuNPs, se puede notar de mejor manera la presencia de este plasmón (Figura 3b). En el espectro de Q-GMA-AuNPs al 0.6 mM de la misma figura, podemos observar una atenuación en la absorbancia del Q-GMA debido a la presencia de las nanopartículas, mismas que, tras observar el espectro de IR de este compuesto, podemos decir que no degradan ni rompen la estructura de la matriz de Q-GMA.

Una vez verificada la presencia del plasmón, se procedió a sintetizar

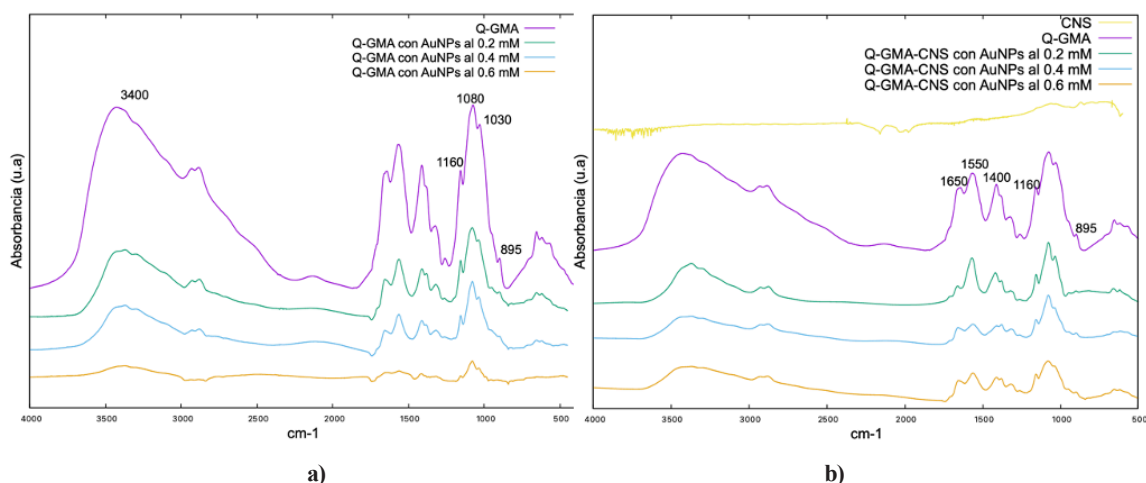


Figura 2. Espectro de FT-IR de a) Q-GMA-AuNPs y b) Q-GMA-CNS-AuNPs.

las muestras de Q-GMA con CNS debido a que la presencia del plasmón es más evidente. La Figura 4 evidencia que los compuestos conservan el efecto plasmón aún en su conjugación con las CNS.

Hay una absorbancia débil en la zona de los 800 nm, pero que debe considerarse para la activación del fotosensibilizador, ya que al tener el plasmón de las AuNPs, es posible sumar 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.

De igual manera, este estudio permite suponer que la resonancia superficial del plasmón (SPR por sus siglas en inglés) es aprovechable 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) [24].

Debido a que las muestras de Q-GMA-CNS-AuNPs al 0.4 y 0.6 mM conservaron el plasmón, se seleccionaron para su caracterización por SEM. En la Figura 5 se

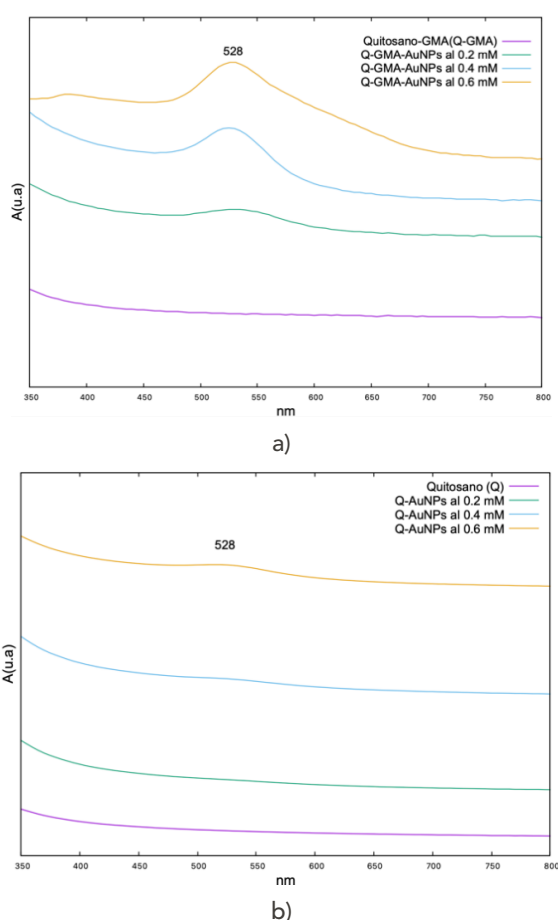


Figura 3. Espectro de UV-VIS de a) Q-AuNPs y b) Q-GMA-AuNPs.

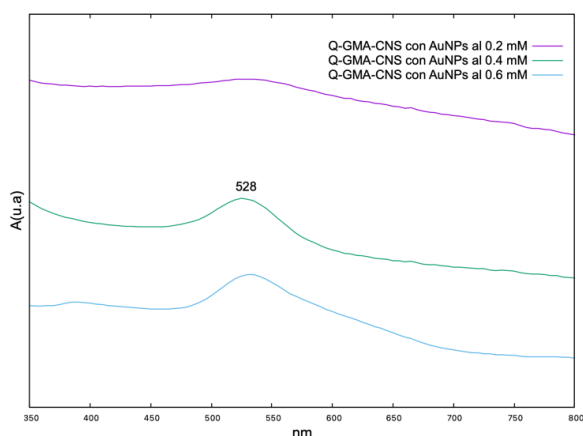


Figura 4. Espectro de UV-VIS de Q-GMA-CNS-AuNPs.



aprecian puntos blancos brillantes en el Q-GMA-CNS-AUNPS al 0.4 mM (marcados en círculos rojos) que se atribuyen a la distribución de los clusters de nanoesferas de carbono funcionalizados con las nanopartículas en una matriz de Q-GMA; sin embargo, es necesaria una prueba TEM para identificarlos formalmente.

En la Figura 6 se exhibe la micrografía de la muestra de Q-GMA-CNS-AUNPS al 0.6 mM; los clusters que se observan, atribuidos a la distribución y forma esférica de las nanopartículas con las nanoesferas, son más notorios.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados por las caracterizaciones demuestran que se obtuvo un compuesto 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 es química, como se puede ver en las atenuaciones de las tensiones de los grupos NH_2 ; por otra parte, las nanopartículas complejizadas con las nanoesferas conservaron su efecto plasmón en los compósitos de Q-GMA-CNS-AUNPS en concentraciones de 0.4 y 0.6 mM (UV-VIS), y mostraron una distribución uniforme en clusters sobre toda la estructura (SEM). Dado que la PDT es menos invasiva que los procedimientos quirúrgicos y los efectos secundarios son menores que la quimioterapia y radioterapia, 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.

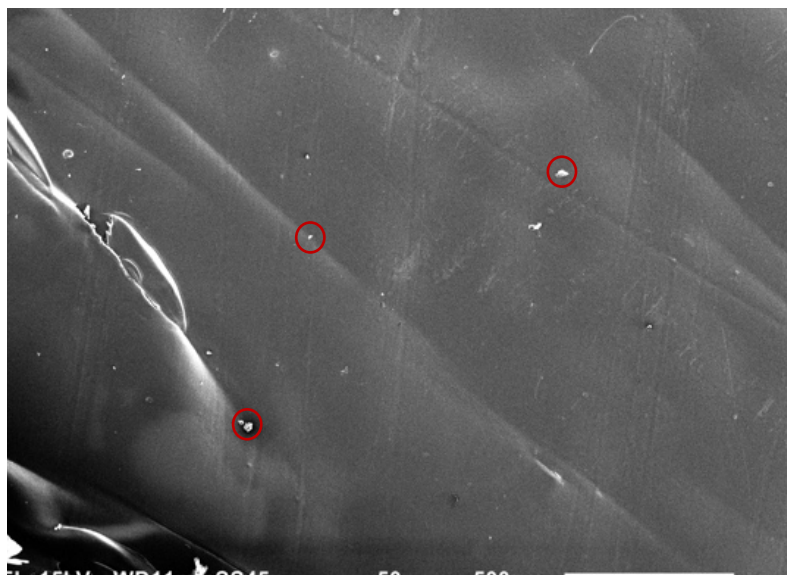


Figura 5. Imagen SEM de Q-GMA-CNS-AUNPS al 0.4 mM.

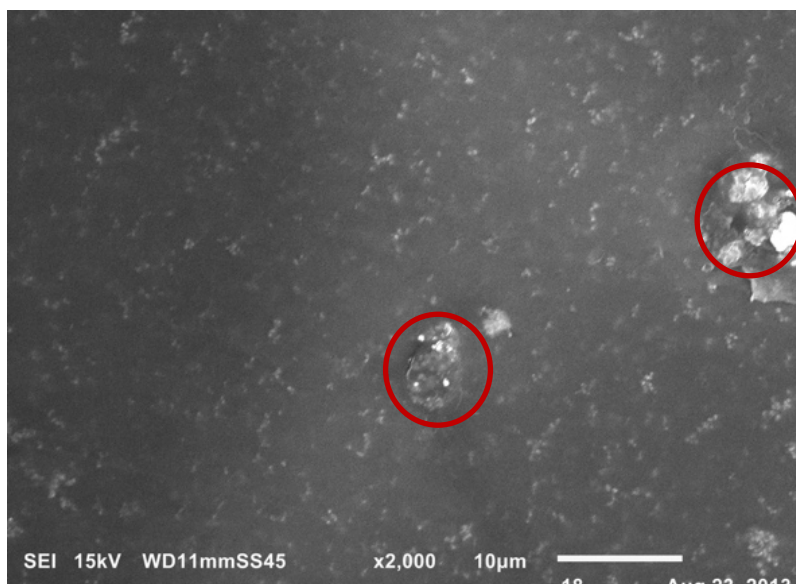


Figura 6. Imagen SEM de Q-GMA-CNS-AUNPS al 0.6 mM.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo de CONACYT, además del apoyo de las Dras. Sandra Rivas y Alejandra Álvarez para las caracterizaciones de SEM y espectroscopias, respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] F. S. De Rosa y M. V. L. B. Bentley, "Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives", *Pharm. Res.*, vol. 17,

no. 12, pp. 1447–1455, 2000, doi: 10.1023/A:1007612905378.

- [2] G. B. Kharkwal, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, T. Dai y M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy for infections: Clinical applications", *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, no. 7, pp. 755–767, 2011, doi: 10.1002/lsm.21080.
- [3] 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.

- [4] T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle y A. Mittleman, "Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors", *Cancer Res.*, vol. 38, no. 8, pp. 2628–2635, 1978.
- [5] 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](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1).
- [6] 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](https://doi.org/10.1111/ijlh.12426).
- [7] 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](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(97)80825-9).
- [8] C. M. Peterson, R. Reed, C. J. Jolles, K. Parker Jones, R. C. Straight y 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](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91786-A).
- [9] A. Chiaviello, I. Postiglione y G. Palumbo, "Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: A brief overview", *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 1014–1041, 2011, doi: [10.3390/cancers3011014](https://doi.org/10.3390/cancers3011014).
- [10] M. C. García Vior, L. E. Dicelio y J. Awruch, "Synthesis and properties of phthalocyanine zinc(II) complexes replaced with oxygen and sulfur linked adamantane moieties", *Dye. Pigment.*, vol. 83, no. 3, pp. 375–380, 2009, doi: [10.1016/j.dyepig.2009.06.006](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2009.06.006).
- [11] 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](https://doi.org/10.1042/BJ20150942).
- [12] 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](https://doi.org/10.1038/bjp.2008.98).
- [13] 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](https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.59).
- [14] J. Li, D. Guo, X. Wang, H. Wang, H. Jiang y B. Chen, "The photodynamic effect of different size ZnO nanoparticles on cancer cell proliferation in vitro", *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 5, no. 6, pp. 1063–1071, 2010, doi: [10.1007/s11671-010-9603-4](https://doi.org/10.1007/s11671-010-9603-4).
- [15] S. J. He et al., "CdSe/ZnS quantum dots induce photodynamic effects and cytotoxicity in pancreatic cancer cells", *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 21, pp. 5012–5022, 2016, doi: [10.3748/wjg.v22.i21.5012](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i21.5012).
- [16] K. D. Patel, R. K. Singh y 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](https://doi.org/10.1039/c8mh00966j).
- [17] T. Murakami, "Stimuli-responsive systems of therapeutics photodynamic action of single-walled carbon nanotubes", *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 65, no. 7, pp. 629–636, 2017.
- [18] D. Chen et al., "Efficacy dependence of photodynamic therapy mediated by upconversion nanoparticles: subcellular positioning and irradiation productivity", 2017, doi: [10.1002/smll.201602053](https://doi.org/10.1002/smll.201602053).
- [19] G. M. F. Calixto et al., "Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review", *AAPS PharmSciTech*, vol. 20, no. 7, 2019, doi: [10.1208/s12249-019-1407-y](https://doi.org/10.1208/s12249-019-1407-y).
- [20] D. S. Kwag, N. M. Oh, Y. T. Oh, K. T. Oh, Y. S. Youn y 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](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.038).
- [21] 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](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11604).
- [22] E. A. Elizalde-Peña et al., "Synthesis and characterization of chitosan-g-glycidyl methacrylate with methyl methacrylate", *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 9, pp. 3963–3969, 2007, doi: [10.1016/j.eurpolymj.2007.06.004](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.004).
- [23] S. Pu, J. Li, L. Sun, L. Zhong y 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](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.007).
- [24] 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.

