



"1983-2023- 40 años de la
Democracia"

Secretaría de Posgrado y Cooperación Internacional
Universidad Nacional de Río Cuarto

Anexo I (B)- DISPOSICIÓN SPyCI N° 169/23 (24 abril de 2023)

Metadatos de la TESIS DOCTORAL

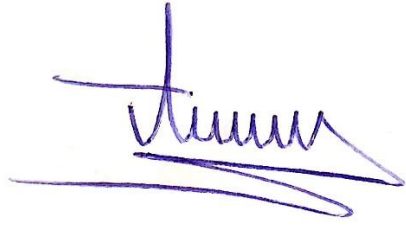
(se recomienda incorporar los metadatos en una página del/de la TF/TFI/Tesis)

- Título completo: **Síntesis y Caracterización de nanopartículas de polímeros conjugados con aplicaciones en fototerapias**
- Autor/es: **Sosa Lochedino Arianna Lourdes.**
- Filiación: **Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, UNRC, Río Cuarto Córdoba, Argentina;**
- Palabras clave: **nanopartículas/ fototerapias**
- Evaluado por pares: **SI**
- Fecha: **03/06/2026**
- Formato: **pdf**
- Idioma: **español**
- Financiamiento: **UNRC, CONICET y FONCyT**
- Condiciones de uso: **CC BY-NC-SA**

A modo de recordatorio y según consta en Régimen de Carreras de Posgrado se transcribe la leyenda que debe aparecer **OBLIGATORIAMENTE** en el/la TF/TFI/Tesis:

*"Informo que, de acuerdo a lo que prescribe la **Ley N° 26.899**^(*) (2013), su Reglamento Operativo (Resolución 753-E/2016) y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución del Consejo Superior N° 202/2021), **este documento es resultado del financiamiento total o parcial otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto**".*

() La Ley N° 26.899 define por financiamiento total o parcial con fondos públicos, a la inversión que el Estado realiza ya sea de forma directa, (como el pago de salarios, incentivos, subsidios, etc.), o indirecta (el acceso a bibliografía científica adquirida con fondos públicos, la utilización de la infraestructura de las instituciones y organismos, el uso de insumos y equipamientos, el financiamiento total o parcial de viajes, etc.) para el desarrollo de la actividad científica, tecnológica y de innovación.*

A handwritten signature in blue ink, featuring a stylized 'A' and 'L' followed by a series of loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Sosa Lochedino, Arianna Lourdes

Firma y aclaración del autor del TF/TFI/Tesis



creer crear crecer

Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Químicas

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
POLÍMEROS CONJUGADOS CON APLICACIONES EN
FOTOTERAPIAS**

Lic. Arianna Lourdes Sosa Lochedino

Director: Rodrigo Emiliano Palacios

Co-Director: Carlos Alberto Chesta

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Año 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas Y Naturales

Departamento de Química

Lic. Arianna Lourdes Sosa Lochedino

Firma..... Aclaración

Dr. Rodrigo Emiliano Palacios

Firma..... Aclaración

Dr. Carlos Alberto Chesta

Firma..... Aclaración

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Natalia Belén Rumie Vittar	Instituto de Biotecnología Ambiental y Salud, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto Universidad
---------------------------------	---

Firma Aclaración

Dr. Gustavo Marcelo Morales Instituto de Investigaciones en Tecnologías
Energéticas y Materiales Avanzados,
Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Exactas, Físico-Químicas y Naturales,
Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma Aclaración

Dr. Andrés Héctor Thomas Instituto de Investigaciones Físico-Químicas,
Teóricas y Aplicadas, Universidad Nacional De
La Plata, Facultad De Cs.Exactas.

Firma Aclaración

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha

Calificación

“Lo que hacemos es tan solo una
gota en el mar, pero el mar sería
menos si le faltara una gota”

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

A Dios en su Infinita Misericordia, que en sus misteriosos designios me puso en este momento y lugar. A veces no entendemos sus planes, pero siempre hay una razón de todo lo que hace y permite.

A mi familia, por ser el mayor de los regalos que podría haber recibido. A mis padres: Myriam y Rubén porque son y serán siempre mi sostén y mi refugio seguro. Gracias por alentarme en cada empresa que deseo comenzar, por apoyarme en todas las instancias durante el desarrollo de mi carrera profesional, que todos los sacrificios que uno realiza tienen algún día su recompensa, por animarme a nunca rendirme y a no temer ante las dificultades. A mi hermana Chiara, por ser una grata compañía todos estos años y por demostrarme que a veces la sabiduría no viene siempre con la edad. A mis tíos y primos, por acompañarme, alentarme y animarme a seguir.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por abrirme sus puertas y darme la posibilidad de acceder a este título. Agradezco la lucha incansable por la educación pública y de calidad, a la que todos deberían poder acceder libremente. A CONICET y AGENCIA por el financiamiento otorgado, porque de otra manera no hubiera sido posible realizar un doctorado.

A mis directores Rodrigo y Carlos, un agradecimiento especial por el acompañamiento dado durante estos cinco años. Gracias por animarse al desafío de acompañar a una Lic. en Biotecnología en un doctorado en Ciencias Químicas. Gracias por su paciencia, desde tener que recordar conocimientos de química básicos para un químico hasta acompañarme en la escritura y corrección de esta tesis en tiempo récord.

A los miembros del comité de seguimiento de mi tesis y posteriormente mis jurados en la defensa de la misma: Belén, Andrés y Gustavo. Gracias por la dedicación que pusieron durante la lectura y corrección de los informes y tesis especialmente por su contribución en el trayecto final.

Al grupo de photomat, que amablemente le abrió las puertas a una doble extranjera porque ni era química ni era de Córdoba. A los investigadores: Lorena, Luis y Emmanuel, gracias por estar dispuestos y brindarme ayuda durante los años de doctorado. A mis compañeros becarios: Ana, Gonzalo, Lucía, Matías, Rocío, Emilia y Rodrigo. Gracias por

las risas y las interminables charlas dentro y fuera del laboratorio. Por brindar siempre una sonrisa y su disposición a ayudar en experimentos, escritura, congresos y todas las demás aristas que abarca un doctorado. Gracias especialmente por prestar un oído para escuchar y darme aliento en los momentos más duros. Estoy segura de que será una de las cosas que más extrañe de esta etapa, no se si encontraré un mejor grupo de compañeros de doctorado.

A mis compañeras de química: Micaela, Agostina, María y María José. Gracias por brindarme su amistad todos estos años, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ese entendimiento mutuo desde el inicio y por hacer mas llevaderos los interminables días de laboratorio. Por la compañía mutua en cada etapa y por todos esos mates compartidos.

A mis amigos de siempre, a aquellos que han permanecido firmes a pesar del tiempo y la distancia. Tal vez nos veamos unas pocas veces al año, pero siempre me reciben con los brazos abiertos. Gracias por ser parte de cada momento de mi vida y permitirme serlo de las suyas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.2. Objetivos.....	13
1.3. Hipótesis	13
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Resistencia a los antibióticos como desafío terapéutico global.....	16
2.1. <i>S. aureus</i> como ejemplo representativo de bacterias Gram positivas.....	17
2.3. Biofilms: complejas comunidades microbianas organizadas	19
2.3.1. Formación de un biofilm	20
2.3.2. Componentes de la matriz extracelular del biofilm.....	22
2.3.3. Dificultades en la erradicación de biofilms	24
2.4. Glioblastoma, incidencia y pronóstico	25
2.5. Inactivación fotodinámica microbiana y terapia fotodinámica contra el cáncer	27
2.5.1. Especies reactivas de oxígeno	28
2.5.2. Fotosensibilizadores	30
2.5.2.1. Clasificación de fotosensibilizadores	31
2.5.2.2. Porphirinas	33
2.6. Polímeros conjugados.....	35
2.7. Nanopartículas de polímeros conjugados	38
2.7.1. Dopado de NPCs con porfirinas	39
2.7.2. Agregado de polímeros estabilizante a las NPC	43
2.7.3. Modificaciones superficiales de las NPCs.....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Materiales	41
3.2. Métodos	48

3.2.1. Nanopartículas de polímeros conjugados	48
3.2.1.1. Composición y nomenclatura de NPC.....	48
3.2.1.2. Síntesis de NPCs.....	50
3.2.1.3. Síntesis de NPCs, modificación del diámetro	51
3.2.1.4. Síntesis de NPCs del tipo <i>core/shell</i>	52
3.2.1.5. Síntesis de NPC con polímeros Tetronics®.....	53
3.2.1.6. Dopado superficial de NPC con Pt-TCPP	54
3.3. Caracterización de NPCs.....	56
3.3.1. Espectroscopía UV-vis.....	56
3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia	57
3.3.3. Dispersión dinámica de la luz.....	52
3.3.4. Potencial Z.....	58
3.3.5. Imágenes de TEM de partículas	59
3.3.6. Rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$	60
3.3.7. Rendimiento cuántico de fluorescencia de NPC y NPC-CS	61
3.4. Ensayos biológicos	62
3.4.1. Mantenimiento de cepas	62
3.4.2. Ensayos de adsorción	62
3.4.2.1. Citometría de flujo.....	63
3.4.2.2. Mediciones de ζ de MRSA incubado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA:PtOEP@PFN	64
3.4.2.3. Imágenes de TEM.....	64
3.5. Inactivación fotodinámica microbiana	67
3.5.1. PDI sobre cultivos planctónicos	68
3.5.2. Ensayos de PDI sobre biofilms.....	69
3.5.3. Efecto post fotodinámico sobre cultivos planctónicos	69
3.5.3.1. Recuento de colonias	69
3.5.3.2. Curva de crecimiento post irradiación.....	70
3.5.3.3. Microscopía electrónica de barrido para cultivos planctónicos.....	70

3.5.4. Efecto post fotodinámico sobre biofilms maduros	71
3.5.4.1. Cristal Violeta	72
3.5.4.2. Ensayo de MTT	72
3.5.4.3. Ensayo de resazurina	73
3.5.4.4. Cuantificación de proteínas libres en el sobrenadante del biofilm.....	74
3.5.4.5. Tinción de la matriz de EPS	75
3.5.4.6. Microscopía electrónica de barrido para biofilms	75
3.6. Ensayos de biocompatibilidad en células eucariotas.....	76
3.6.1. Ensayo de MTT sobre fibroblastos.....	76
3.6.2. Ensayo de hemólisis de eritrocitos	77
3.7. Análisis estadísticos.....	78
4. RESULTADOS.....	80
4.1. PARTE I.....	80
4.1.1. Caracterización del PC catiónico PFN	81
4.1.2. Caracterización de los componentes que conformarán a las NPCs <i>core/shell</i>	82
4.1.3. Síntesis de NPCs con distintos agregados de PFN	83
4.1.3.1. Caracterización de NPC con agregado de distintos % de PFN	84
4.1.4. Síntesis de NPC:PSMA@PFN	88
4.1.4.1. Caracterización de NPC:PSMA@PFN	89
4.1.4.2. Estudio de la estabilidad coloidal de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en medios biológicos	95
4.1.4.3. Caracterización de NPC:PSMA+PtOEP@PFN	98
4.1.5. Medición del ζ de NPC:PSMA y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	100
4.1.6. Cálculo del Φ_{Δ} de NPC:PSMA+PtOEP@PFN	102
4.1.7. Interacción entre bacterias y NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	103
4.1.7.1. Citometría de flujo.....	103
4.1.7.2. Cálculo del ζ de bacterias, bacterias + nanopartículas	107
4.1.7.3. Imágenes de TEM de bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN.....	109
4.1.8. Estudios de PDI	113

4.1.8.1. Citotoxicidad fotoinducida sobre cultivos planctónicos.....	113
4.1.8.1.1. Curva de muerte.....	113
4.1.8.1.2. Curva de crecimiento post PDI.....	115
4.1.8.1.3. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos	118
4.1.8.2. Estudios de citotoxicidad fotoinducida en biofilms	125
4.1.8.2.1. Cuantificación de la biomasa total	125
4.1.8.2.2. Ensayo de actividad metabólica	127
4.1.8.2.3. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante de biofilms	129
4.1.8.2.4. Tinción de la matriz de EPS	130
4.1.8.2.5. Imágenes de SEM de biofilms.....	131
4.1.9. Ensayos de viabilidad en eucariotas	134
4.1.9.1. Actividad metabólica en fibroblastos	134
4.1.9.2. Hemólisis de eritrocitos	136
4.2. RESULTADOS – PARTE II	139
4.2.1. Caracterización de NPC:T-1107, NPC:T-GLU y NPC:PSMA.....	140
4.2.2. Ensayos de incorporación de NPC con distintos PE	146
4.3. Resultados parte III.....	151
4.3.1. Síntesis de NPC, modificación del diámetro	151
4.3.1.1. Variación de la Temperatura	152
4.3.1.2. Variación del pH y la fuerza iónica	153
4.3.1.3. Agregado de un surfactante	154
4.3.1.4. Modificando la concentración del polímero estabilizante.....	155
4.3.2. Caracterización extendida de NPC:PSMA y NPC:PSMA ₅₀₀	157
4.3.2.1. Caracterización de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP.....	161
4.3.3. Ensayos de PDI con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP	166
4.3.3.1. Estudio del efecto post fotodinámico en cultivos planctónicos.....	166
4.3.3.2. Estudio del efecto post fotodinámico sobre biofilms maduros.....	168
4.3.3.2.1. Cuantificación de la biomasa total	168

4.3.3.2.2. Ensayo de actividad metabólica	169
4.3.3.2.3. Cuantificación de proteínas libres en el sobrenadante del biofilm.....	170
4.3.3.2.4. Tinción de la matriz de EPS	171
4.3.4. Ensayos de viabilidad celular en células eucariotas	173
4.3.4.1. Actividad metabólica en fibroblastos	173
4.3.4.2. Hemólisis de eritrocitos	174
4.4. RESULTADOS – PARTE IV	177
4.4.1. Caracterización de los componentes.....	178
4.4.2. Adsorción de Pt-TCPP sobre la superficie de NPC	179
5. CONCLUSIONES.....	192
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196
7. Anexo.....	217
8. Trabajos científicos publicados	223
8.1. Trabajo enviado para publicar	223
8.2. Presentaciones a congresos.....	223

RESUMEN DE FIGURAS

Figura 1. Descripción del mecanismo de resistencia a los ATB	9
Figura 2. Estructura externa de una bacteria Grampositiva.....	18
Figura 3. Etapas de formación de un biofilm	22
Figura 4. Componentes de la matriz de un biofilm maduro	23
Figura 5. diagrama de Jablonski.	31
Figura 6. Ejemplos de porfirinas utilizadas como PS.....	36
Figura 7. Ejemplos de PC.....	35
Figura 8. Diagrama de Jablonski para el sistema de NPC de F8BT dopada con PtOEP (NPC:PtOEP).....	40
Figura 9. Proceso de ET dentro del sistema de NPC:PtOEP.....	42
Figura 10. Reacción de hidrólisis del PSMA en entornos acuosos	43
Figura 11. Esquema de síntesis de NPCs.....	51
Figura 12. Esquema de síntesis de NPCs del tipo <i>core/shell</i>	53
Figura 13. Estructuras químicas de los PE Tetronics®.	54
Figura 14. Dopado superficial de Pt-TCPP.....	56
Figura 15. Esquema de panel de lámparas LED.....	68
Figura 16. Espectro de absorción UV-vis y fluorescencia del PFN	81
Figura 17. Espectros de absorción de los componentes de NPCs <i>core/shell</i>	82
Figura 18. Espectros de emisión de los componentes utilizados en la síntesis de NPCs	83
Figura 19. Espectros de absorción UV-vis para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN	84
Figura 20. Espectros de emisión normalizada para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN.....	85
Figura 21. Espectros de excitación normalizados para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN	86
Figura 22. DH de NPC@PFN _n	88
Figura 23. Espectros de absorción UV-vis de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN	89

Figura 24. Espectros de emisión de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN	90
Figura 25. Espectros de excitación de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN ...	92
Figura 26. Espectros usados para calcular la ET de NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN.....	93
Figura 27. DH de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN.....	94
Figura 28. Suspensión de NPC y NPC-CS en PBS	95
Figura 29. Curvas de crecimiento de MRSA en distintos medios de cultivo.	97
Figura 30. Comparación de espectros de absorción de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN en glucosa al 10 %.	98
Figura 31. Distribución de tamaños de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN obtenida mediante DLS	99
Figura 32. imágenes de TEM de NPC:PSMA+PtOEP@PFN.....	100
Figura 33. ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN.....	101
Figura 34. Espectros de luminiscencia NIR de $^1\text{O}_2$ utilizados para la determinación del Φ_Δ de NPC:PSMA+PtOEP@PFN	102
Figura 35. Histogramas de emisión de células individuales de cada muestra recogidos en el canal verde	105
Figura 36. Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales recogidos en el canal verde	106
Figura 37. Medición de ζ promedio de bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	108
Figura 38. Imágenes de TEM de MRSA incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN.....	110
Figura 39. Diámetro de MRSA a partir de imágenes de TEM	111
Figura 40. Curva de muerte de MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	114
Figura 41. Curvas de crecimiento post PDI para MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	117
Figura 42. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 3 y 7 KX.	120
Figura 43. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 10 y 13 KX	122
Figura 44. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 15 y 20 KX.	123
Figura 45. Cuantificación de la biomasa total de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	126

Figura 46. Ensayo de actividad metabólica sobre biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN.	128
Figura 47. Cuantificación de proteínas liberadas al sobrenadante de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	130
Figura 48. tinción de la matriz de EPS de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	131
Figura 49. imágenes de SEM de biofilms maduros sin tratar y tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	133
Figura 50. Ensayo de MTT con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN sobre fibroblastos	135
Figura 51. Microscopía de fluorescencia confocal de fibroblastos incubados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN	136
Figura 52. Hemólisis de eritrocitos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN	137
Figura 53. Esquema de membra conteniendo el receptor GLUT e interacciones posibles con NPC:PSMA y NPC:T-GLU	140
Figura 54. Espectros de absorción de NPC:PSMA _n , NPC:T-1107 _n y NPC:T-GLU _n	141
Figura 55. Espectros de emisión de NPC:PSMA _n , NPC:T-1107 _n y NPC:T-GLU _n	143
Figura 56. Espectros de excitación normalizados de NPC:PSMA _n , NPC:T-1107 _n y NPC:T-GLU _n	144
Figura 57. DH de NPC:PSMA _n , NPC:T-1107 _n y NPC:T-GLU _n	145
Figura 58. ζ para NPC:PSMA _n , NPC:T-1107 _n y NPC:T-GLU _n	146
Figura 59. Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales T98G recogidos en el canal verde, incubadas en DMEM	147
Figura 60: Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales T98G recogidos en el canal verde, incubadas en PBS.....	148
Figura 61. Síntesis de NPC _n , modificación de la temperatura del medio acuoso.....	152
Figura 62. Síntesis de NPC _n , variación del pH y la fuerza iónica	153
Figura 63. Síntesis de NPC _n , agregado de un surfactante	155
Figura 64. Síntesis de NPC:PSMA _n , modificando la concentración de PE	156
Figura 65. Espectros de absorción de NPC:PSMA y NPC:PSMA ₅₀₀	158
Figura 66. Espectros de emisión de NPC:PSMA y NPC:PSMA ₅₀₀	159
Figura 67. Espectros de excitación normalizados de NPC:PSMA y NPC:PSMA ₅₀₀	160

Figura 68. Espectros de absorción de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP.....	162
Figura 69. Distribución de tamaño de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP mediante DLS.....	163
Figura 70. Mediciones del diámetro de NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP mediante TEM.	164
Figura 71. ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP.	165
Figura 72. Citotoxicidad fotoinducida en cultivos planctónicos de MRSA con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP	167
Figura 73. Cuantificación de la biomasa total de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP.....	168
Figura 74. Ensayo de actividad metabólica sobre biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP	170
Figura 75. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante de biofilms tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP	171
Figura 76. Tinción de la matriz de EPS de biofilms tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP	172
Figura 77. Ensayo de actividad metabólica con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA ₅₀₀ +PtOEP sobre fibroblastos.....	174
Figura 78. Hemólisis de eritrocitos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP sobre fibroblastos	175
Figura 79. Espectros de absorción de NPC y Pt-TCPP	178
Figura 80. Espectros de emisión de NPC y Pt-TCPP	179
Figura 81. 1° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de absorción.	180
Figura 82. 1° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión.	181
Figura 83. 2° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de absorción	182
Figura 84. 2° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión.	183
Figura 85. Espectros de emisión sucesivos de NPC	184
Figura 86. 3° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión	185
Figura 87. 4° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión	186
Figura 88. Espectros de emisión de NPC:PSMA@PFN en buffer fosfato a pH = 8, 1×10^{-4} M..	188
Figura 89. Ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC:PSMA@PFN	189
Figura 90. Diagrama de dispersión de citometría de flujo	219
Figura 91. Diagrama de dispersión de citometría de flujo	220

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de las distintas formulaciones de NPC.....	49
Tabla 2: Condiciones para los 4 ensayos de adsorción de la porfirina Pt-TCPP sobre la superficie de las NPC.	55
Tabla 3. Cálculo de ET para NPC@PFN _n	87

ÍNDICE DE FÓRMULAS

(1)	31
(2)	55
(3)	55
(4)	60
(5)	60
(6)	60
(7)	60
(8)	60
(9)	61
(10)	68
(11).....	71

ABREVIATURAS

Números y símbolos

% p/p: porcentaje peso en peso

% p/v: porcentaje peso en volumen

ϕ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia

$\overline{D_H}$: diámetro hidrodinámico promedio

$\cdot OH$: radical hidroxilo

ζ : potencial Z

ϵ : coeficiente de extinción molar

λ_{emi} : longitud de onda de emisión

λ_{exc} : longitud de onda de excitación

Φ_{Δ} : rendimiento cuántico de producción de 1O_2

$^1F8BT^*$: estado singlete excitado de F8BT

$^1PtOEP^*$: estado singlete excitado de PtOEP

1O_2 : oxígeno singlete

$^3F8BT^*$: estado triplete excitado de F8BT

3O_2 : molécula de oxígeno en el estado fundamental

$^3PtOEP^*$: estado triplete excitado de PtOEP

A

abs: absorbancia

ATBs: antibióticos

B

BHE: barrera hematoencefálica

BODIPY: borodipirrometeno

C

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades

CMC: concentración micelar crítica

-COOH: grupo funcional carboxilo

CV: cristal violeta

CW: calcofluor white

D

D_H : diámetro hidrodinámico

DLS: dispersión dinámica de la luz

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

E

EPR: efecto de permeación y retención

EPS: exopolisacáridos

ET: transferencia de energía

ET-SS: transferencia de energía singlete – singlete

ET-TT: transferencia de energía triplete – triplete

F

F8BT: poli[(9,9- di-n-octilfluorenil-2,7-diil)-alt-(benzo[2,1,3]-tiadiazol-4,8-diil)]

FRET: Transferencia de Energía Resonante de Förster

FSC: dispersión frontal

G

GBM: glioblastoma

GLUT: transportadores de glucosa

H

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

Hereto-ET: transferencia de energía heteróloga

Homo-ET: transferencia de energía homóloga

HSA: albúmina de suero humano

I

I Poly: índice de polidispersidad

I₀/I: intensidad de fluorescencia inicial versus intensidad de fluorescencia

I_F: intensidad de fluorescencia

IP: yoduro de propidio

ISC: cruce entre sistemas

I_i: intensidad de fluorescencia integrada

M

M: concentración molar

MRSA: *S. aureus* resistente a la metilicina

MTT: Azul de tiazolil bromuro de tetrazolio

N

-NH₂: grupo funcional amina

NIR: infrarrojo cercano

NPCs: nanopartículas de polímeros conjugados

O

O₂^{•-}: anión superóxido

OD: densidad óptica

OD₆₀₀: densidad óptica a 600 nm

P

PBS: buffer fosfato salino

PC: polímero conjugado

PCs: polímeros conjugados

PDI: inactivación fotodinámica microbiana

PE: polímero estabilizante

PEI: polietilenimina

PEO: poli(óxido de etileno)

PEs: polímeros estabilizantes

PFN: poli[(9,9-bis(60-(N,N,N-trimetilamonio)hexil)-2,7-fluoreno)-alt-2,7 (9,9dioctilfluoreno)] dibromo

PM: peso molecular

PPF: copolímero de poli(porfirina)-b-poli(fluoreno)

PS: fotosensibilizadores

PSMA: poli(estereno-co-anhidrido maleico)

PS-PEG-COOH: copolímero de poliestireno y polietilenglicol funcionalizado con grupo carboxilo

PtOEP: octaetilporfirina de Platino

Pt-TCPP: Pt (II) meso-tetra(4-carboxifenil) porfirina

R

RAM: resistencia a los antimicrobianos

Resazurina: Sal sódica de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

S

S₁: estado excitado singlete

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S₀: estado fundamental singlete

SD: desviación estándar

SEM: microscopía electrónica de barrido

FBS: suero fetal bovino

SSC: dispersión lateral

T

T X-100: Tritón X-100

T₁: estado excitado triplete

T-1107: polímero Tetronic® T-1107

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TDF: terapia fotodinámica contra el cáncer

T-GLU: polímero Tetronic® T-1107 funcionalizado con D-(+)-glucono-1,5-lactona

THF: tetrahidrofurano

TS: tripteína soya

U

CFU/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro

UV-vis: ultravioleta – visible

W

WHO: Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos constituye una de las principales amenazas sanitarias a nivel mundial, impulsada por la creciente y continua aparición de bacterias multirresistentes como consecuencia del abuso, el uso inadecuado y la implementación de protocolos terapéuticos ineficientes en la administración de antibióticos. De manera paralela, en el ámbito del tratamiento del cáncer, la resistencia a la quimioterapia, la escasa selectividad de numerosos fármacos antineoplásicos y su elevada toxicidad sistémica limitan significativamente la eficacia clínica, favorecen la recurrencia tumoral y deterioran la calidad de vida de los pacientes. En conjunto, ambas problemáticas evidencian la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras que superen las limitaciones de las terapias convencionales, eviten los mecanismos clásicos de resistencia y reduzcan los efectos adversos asociados.

En este contexto se encuentra la terapia fotodinámica microbiana y la terapia fotodinámica aplicada al tratamiento del cáncer como alternativas terapéuticas prometedoras. Estas estrategias se basan en el empleo de fotosensibilizadores que, tras su activación por luz y en presencia de oxígeno molecular, inducen la producción de especies reactivas de oxígeno capaces de provocar la muerte selectiva de bacterias y células tumorales. La elevada selectividad del tratamiento, la baja toxicidad sistémica y la escasa probabilidad de inducción de resistencia colocan a la terapia fotodinámica como una opción alternativa frente a las limitaciones propias de los tratamientos tradicionales.

En esta tesis se proponen distintas estrategias para el desarrollo de nanopartículas de polímeros conjugados, las cuales están destinadas a ser utilizadas como fotosensibilizadores en las fototerapias con objetivo mejorar la eficiencia de la terapia fotodinámica tanto en el tratamiento del cáncer (particularmente sobre células de glioblastoma), como en la inactivación fotodinámica microbiana de cultivos planctónicos y biofilms maduros de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

Las nanopartículas de polímero conjugado se sintetizaron mediante un método de nanoprecipitación controlada utilizando el polímero poli[(9,9-di-*n*-octilfluorenil-2,7-diil)-*alt*-(benzo[2,1,3]-tiadiazol-4,8-diil)]. Con el fin de mejorar la estabilidad coloidal y funcionalizar la superficie de las nanopartículas, se emplearon distintos polímeros

estabilizantes, incluyendo poli(estireno-co-anhídrido maleico), Tetronic® T-1107 (70 % p/p de poli(óxido de etileno)) y Tetronic® T-1107 modificado con D-(+)-glucono-1,5-lactona. Asimismo, para incrementar la eficiencia en la generación de especies reactivas de oxígeno propia de los polímeros conjugados, las nanopartículas se doparon volumétricamente con octaetilporfirina de platino(II) o superficialmente con meso-tetra(4-carboxifenil)porfirina de Pt(II). Adicionalmente, la carga superficial de las nanopartículas se modificó mediante la adsorción de un segundo polímero conjugado, poli[(9,9-bis(3'-(N,N,N-dimetil)-N-etilamonio-propil)-2,7-fluoreno-*alt*-2,7-(9,9-dioctilfluoreno))] dibromuro, obteniéndose así sistemas del tipo *core/shell*.

Las distintas estrategias de diseño de las nanopartículas se centraron, por un lado, en la reducción de su diámetro con el fin de favorecer la penetración hacia el interior de los biofilms y, por otro, en la modificación de la carga superficial para obtener nanopartículas catiónicas capaces de interactuar de manera más eficiente con las envolturas bacterianas y con los componentes aniónicos de la matriz del biofilm. Paralelamente, se evaluó el uso de diferentes polímeros estabilizantes para funcionalizar la superficie de las nanopartículas y promover su interacción e internalización en células tumorales. Por último, se doparon superficialmente las nanopartículas con el objetivo de incrementar la eficiencia en la producción de especies reactivas de oxígeno con respecto a las nanopartículas dopadas volumétricamente.

Se lograron obtener nanopartículas de polímero conjugado de diámetro reducido mediante la variación de distintos parámetros de síntesis, tales como la concentración del polímero estabilizante y el empleo de diferentes medios acuosos, incluyendo soluciones a distintas temperaturas, soluciones buffer a diferentes valores de pH y soluciones de surfactantes. Mediante estas estrategias fue posible sintetizar nanopartículas con diámetros de hasta 5 nm. La incorporación de un segundo polímero conjugado permitió la obtención de nanopartículas del tipo *core/shell*, logrando invertir la carga superficial y produciendo un cambio en el potencial zeta de -27 a $+16$ mV. Asimismo, se desarrollaron nanopartículas estabilizadas con distintos polímeros para optimizar su interacción con células tumorales. Finalmente se obtuvieron nanopartículas dopadas superficialmente con distintas concentraciones de porfirina. La caracterización fisicoquímica de los sistemas obtenidos se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-visible y de fluorescencia, dispersión dinámica de la luz, microscopía electrónica de transmisión y mediciones de potencial zeta.

Finalmente, se estudió la interacción de las nanopartículas *core/shell* con bacterias en estado planctónico mediante las técnicas de citometría de flujo, potencial zeta y microscopía electrónica de transmisión. Posteriormente se realizaron ensayos de inactivación fotodinámica microbiana tanto en cultivos planctónicos, mediante recuento de colonias y curvas de crecimiento post irradiación, como en biofilms, mediante las técnicas de cristal violeta, reducción del azul de tiazolil bromuro de tetrazolio, ensayo de la resazurina, cuantificación de proteínas libres en el sobrenadante, tinción de la matriz de exopolisacáridos y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados evidenciaron una mejora significativa en la eficiencia de la inactivación fotodinámica microbiana al emplear nanopartículas de diámetro reducido y nanopartículas *core/shell*, en comparación con nanopartículas de polímero conjugado desarrolladas previamente por el grupo de trabajo. No se observó una mejora en la vectorización hacia células tumorales al utilizar nanopartículas funcionalizadas con Tetronic® T-1107 ni con Tetronic® T-1107 modificado con D-(+)-glucono-1,5-lactona mediante la técnica de citometría de flujo. Asimismo, el dopado superficial con porfirina no condujo a una mejora en la transferencia de energía responsable de la generación de oxígeno singlete en comparación con el dopado volumétrico. En conjunto, estos resultados confirman las hipótesis planteadas y demuestran que el diseño racional de nanopartículas de polímero conjugado permite optimizar su desempeño en terapias fotodinámicas antibacterianas.

ABSTRACT

Antibiotic resistance constitutes one of the major global health threats, driven by the increasing and continuous emergence of multidrug-resistant bacteria as a consequence of antibiotic misuse, inappropriate use, and the implementation of ineffective therapeutic protocols in antibiotic administration. In parallel, within the field of cancer treatment, resistance to chemotherapy, the poor selectivity of many antineoplastic drugs, and their high systemic toxicity significantly limit clinical efficacy, promote tumor recurrence, and impair patients' quality of life. Taken together, both issues highlight the urgent need to develop innovative therapeutic strategies that overcome the limitations of conventional therapies, bypass classical resistance mechanisms, and reduce associated adverse effects.

In this context, antimicrobial photodynamic therapy and photodynamic therapy applied to cancer treatment emerge as promising therapeutic alternatives. These strategies are based on the use of photosensitizers that, upon light activation in the presence of molecular oxygen, induce the generation of reactive oxygen species capable of selectively killing microorganisms and tumor cells. The high selectivity of the treatment, low systemic toxicity, and low likelihood of resistance induction position photodynamic therapy as an attractive alternative to the inherent limitations of traditional treatments.

In this thesis, different strategies are proposed for the development of conjugated polymer nanoparticles intended for use as advanced photosensitizers. The aim is to improve the efficiency of photodynamic therapy both in cancer treatment—particularly against glioblastoma cells—and in the antimicrobial photodynamic inactivation of planktonic cultures and mature biofilms of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain.

Conjugated polymer nanoparticles were synthesized using a controlled nanoprecipitation method employing the polymer poly[(9,9-di-*n*-octylfluorenyl-2,7-diyl)-alt-(benzo[2,1,3]-thiadiazole-4,8-diyl)]. In order to improve colloidal stability and functionalize the nanoparticle surface, different stabilizing polymers were used, including poly(styrene-co-maleic anhydride), Tetronic® T-1107 (70 wt% poly(ethylene oxide)), and Tetronic® T-1107 modified with D-(+)-glucono-1,5-lactone. Additionally, to enhance the intrinsic reactive oxygen species generation efficiency of conjugated polymers, nanoparticles were volumetrically doped with platinum(II) octaethylporphyrin and surface-

doped with meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin Pt(II). Furthermore, the surface charge of the nanoparticles was modified by adsorption of a second conjugated polymer, poly[(9,9-bis(3'-(N,N,N-dimethyl)-N-ethylammonium-propyl)-2,7-fluorene-alt-2,7-(9,9-dioctylfluorene))] dibromide, yielding core/shell-type systems.

The different nanoparticle design strategies focused, on the one hand, on reducing particle diameter to promote penetration into biofilms, and on the other, on modifying surface charge to obtain cationic nanoparticles capable of interacting more efficiently with bacteria and with the anionic components of the biofilm matrix. In parallel, the use of different stabilizing polymers was evaluated to functionalize the nanoparticle surface and promote interaction and internalization in tumor cells. Finally, nanoparticles were surface-doped with the aim of increasing reactive oxygen species production compared to volumetrically doped nanoparticles.

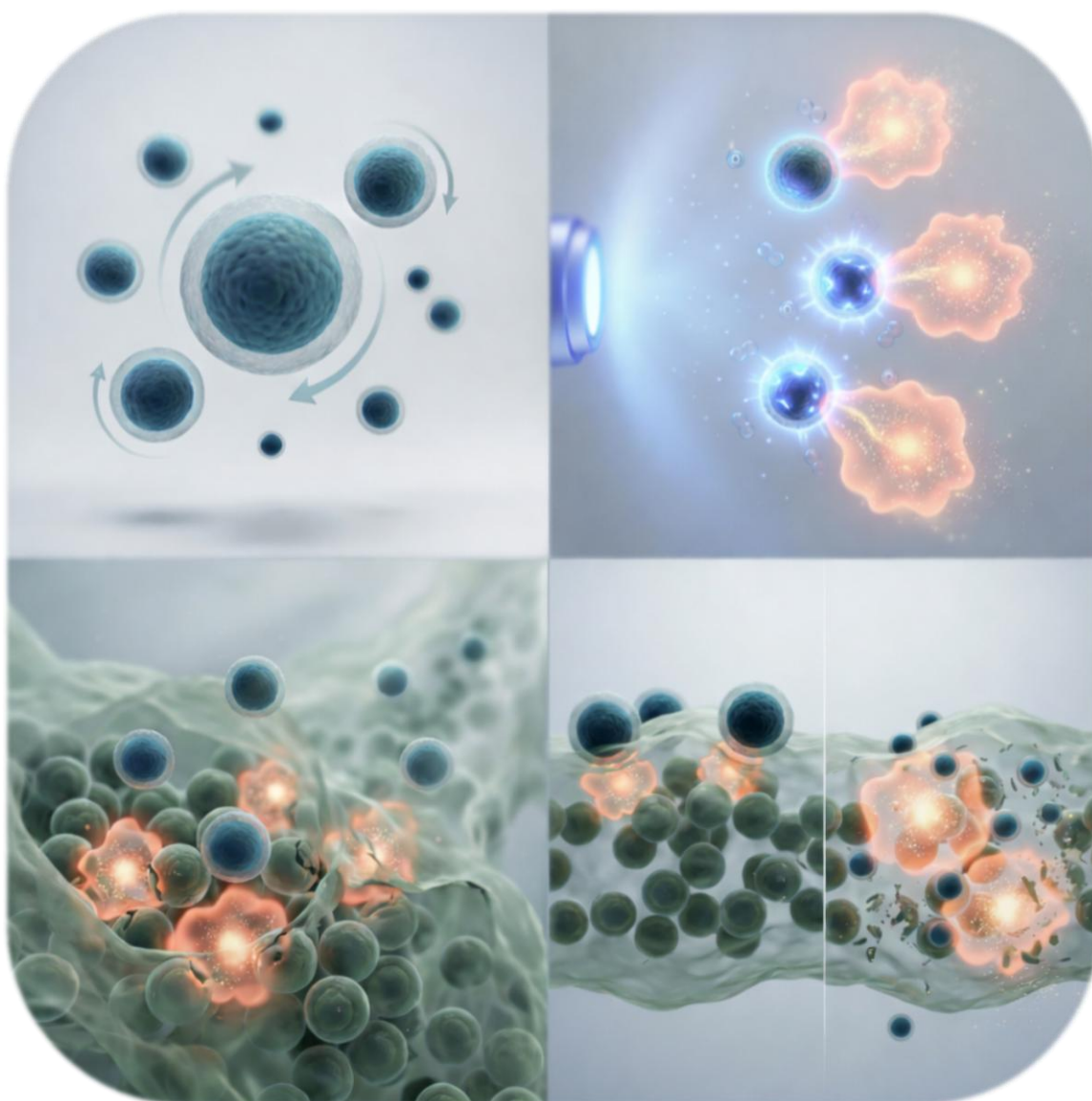
Conjugated polymer nanoparticles with reduced diameters were successfully obtained by varying different synthesis parameters, such as stabilizing polymer concentration and the use of different aqueous media, including solutions at different temperatures, buffer solutions at different pH values, and surfactant solutions. Through these strategies, nanoparticles with diameters as small as 5 nm were synthesized. The incorporation of a second conjugated polymer enabled the formation of core/shell nanoparticles, achieving surface charge inversion and inducing a change in zeta potential from -27 to $+16$ mV. In addition, nanoparticles stabilized with different polymers were developed to optimize their interaction with tumor cells. Finally, nanoparticles surface-doped with different porphyrin concentrations were obtained. Physicochemical characterization of the resulting systems was carried out using UV-visible and fluorescence spectrophotometry, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and zeta potential measurements.

Finally, the interaction of core/shell nanoparticles with planktonic bacteria was studied using flow cytometry, zeta potential measurements, and transmission electron microscopy. Subsequently, antimicrobial photodynamic inactivation assays were performed both on planktonic cultures—using colony counting and post-irradiation growth curves—and on biofilms, employing crystal violet staining, thiazolyl blue tetrazolium bromide reduction, resazurin assays, quantification of free proteins in the supernatant, staining of the

exopolysaccharide matrix, and transmission electron microscopy. The results demonstrated a significant improvement in antimicrobial photodynamic inactivation efficiency when using reduced-diameter nanoparticles and core/shell nanoparticles, compared to conjugated polymer nanoparticles previously developed by the research group. No improvement in targeting toward tumor cells was observed when using nanoparticles functionalized with Tetronic® T-1107 or Tetronic® T-1107 modified with D-(+)-glucono-1,5-lactone, as assessed by flow cytometry. Likewise, surface porphyrin doping did not lead to an improvement in energy transfer responsible for singlet oxygen generation compared to volumetric doping. Overall, these results confirm the proposed hypotheses and demonstrate that the rational design of conjugated polymer nanoparticles enables the optimization of their performance in antibacterial photodynamic therapies.

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la penicilina en 1928, un antibiótico de origen fúngico, constituyó un hito fundamental en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y marcó el inicio de la denominada era de la antibioticoterapia. Esta etapa se caracterizó inicialmente por la introducción de la penicilina y, posteriormente, por el desarrollo e incorporación de nuevos antibióticos (ATBs), los cuales se consolidaron como una estrategia altamente eficaz para el control y tratamiento de infecciones bacterianas. Durante varias décadas, la antibioticoterapia fue considerada la solución definitiva frente a las patologías de origen bacteriano.^{1,2} Sin embargo, tan solo dos años después de la implementación clínica de la penicilina comenzaron a surgir las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistentes a este antibiótico.^{3,4}

Como consecuencia de esta problemática, años más tarde se desarrollaron alternativas sintéticas a los ATBs de origen natural, entre ellas la meticilina, introducida en la década de 1950. Este antibiótico se utilizó principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*. No obstante, apenas diez años después de su introducción clínica se registró la primera cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), a pesar de tratarse de un ATB sintético.³⁻⁵

Si bien la era de la antibioticoterapia revolucionó el tratamiento de las enfermedades infecciosas, también ha generado consecuencias adversas de gran impacto para las generaciones futuras. El uso indiscriminado y el abuso de ATBs, junto con la implementación de protocolos ineficientes de prevención y control de infecciones, han favorecido el desarrollo de bacterias resistentes a múltiples antibióticos.⁶⁻⁸ Como resultado, la disponibilidad de ATBs para el tratamiento de infecciones bacterianas se ha reducido progresivamente. Esta situación se ha tornado particularmente crítica con la aparición de las denominadas “superbacterias”, caracterizadas por una resistencia simultánea a múltiples clases de ATBs.^{3,7}

En la Figura 1 se esquematiza el mecanismo general de desarrollo de la resistencia a los ATBs. Inicialmente, tras un tratamiento antibiótico ineficiente, sobreviven unas pocas bacterias que han podido crecer en las condiciones adversas impuestas por el ATB (representadas en color naranja). Estas bacterias se replican rápidamente, originando una nueva infección que ya no puede ser erradicada mediante el mismo tratamiento, debido a la

resistencia adquirida. Finalmente, la infección causada por bacterias resistentes se transfiere a un nuevo huésped, favoreciendo su propagación.

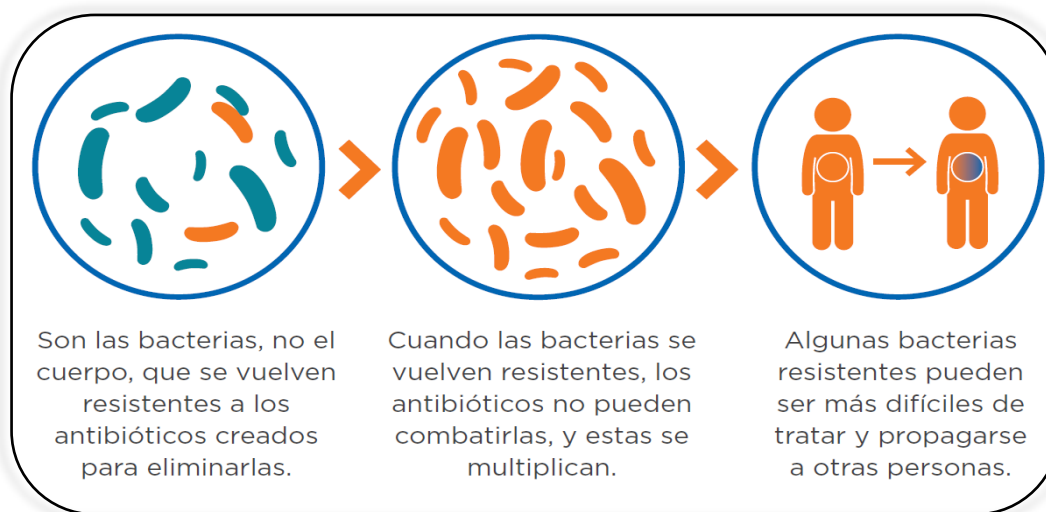


Figura 1. Descripción del mecanismo de resistencia a los ATB Fuente:

<https://www.cdc.gov/antibiotic-use>.

En el año 2013, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) declaró que la humanidad había ingresado en la era “post-antibiótica”, y en 2014 la Organización Mundial de la Salud (WHO) comenzó a advertir formalmente sobre la gravedad que representaban estos patógenos resistentes.⁵ Recientemente, en el año 2024 WHO actualizó la lista de “patógenos bacterianos” estableciendo un orden de prioridad para el desarrollo de nuevas terapias, debido a la resistencia adquirida a los ATBs. En dicha lista, MRSA se ubica dentro de la categoría de “prioridad alta”, principalmente por su elevada prevalencia en entornos hospitalarios, las considerables tasas de morbilidad y mortalidad asociadas, y la gran dificultad para prevenir infecciones causadas por estas cepas.⁹

En este contexto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que sustituyan o complementen a la antibioticoterapia se considera una prioridad a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos sostenidos en investigación y desarrollo de nuevos ATBs, los tiempos requeridos para su aprobación clínica resultan extensos en comparación con la rapidez con la que las bacterias desarrollan mecanismos de resistencia. Por esta razón, una parte significativa de los esfuerzos actuales se orienta hacia alternativas terapéuticas no convencionales.^{4,6,7,10}

Un aspecto central en la resistencia antimicrobiana es la capacidad de muchas bacterias de organizarse en biofilms. Un biofilm es una estructura compleja de microorganismos que viven en comunidad, embebidos en una matriz extracelular compuesta por polisacáridos, proteínas, fibrina, lipoproteínas, lípidos y ADN extracelular, y protegidos por una densa matriz de exopolisacáridos (EPS). Esta matriz desempeña un papel crucial en la patogenicidad bacteriana, ya que actúa como una barrera física y química que confiere una elevada resistencia a la mayoría de las terapias convencionales. Se ha demostrado que las bacterias en biofilms pueden tolerar concentraciones de ATBs hasta 1000 veces superiores a las requeridas para eliminar bacterias en estado planctónico.^{2,11,12} Actualmente, se reconoce que la formación de biofilms es uno de los principales mecanismos que contribuyen al desarrollo y propagación de la resistencia antimicrobiana. El CDC estima que el 65 % de las infecciones bacterianas en humanos están asociadas a biofilms, y que el 80 % de las enfermedades infecciosas crónicas están asociadas a una ineficiente erradicación de estas estructuras.^{2,13} En la actualidad se sabe que más del 90 % de los microorganismos son capaces de crecer en forma de biofilms.^{7,10,14,15} En consecuencia, el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas debe estar principalmente dirigido a este tipo de comunidades microbianas.

Paralelamente a la problemática de la resistencia antimicrobiana, existe otra área crítica de la medicina en la que las terapias convencionales continúan siendo insuficientes: el tratamiento de tumores altamente agresivos del sistema nervioso central, en particular el glioblastoma (GBM). El GBM es el tumor cerebral maligno primario más frecuente en adultos y se caracteriza por un comportamiento altamente infiltrativo y resistente al tratamiento, lo que se traduce en un pronóstico clínico extremadamente desfavorable.¹⁶⁻¹⁹ A pesar de la implementación de un abordaje terapéutico multimodal basado en resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, la supervivencia global de los pacientes continúa siendo limitada, con una mediana inferior a los dos años y una tasa de supervivencia a cinco años menor al 10 %.^{17,20,21} En este contexto, la elevada tasa de recurrencia tumoral y la baja eficacia de las terapias actuales ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas capaces de mejorar el control de esta enfermedad.²¹

En este escenario, la terapia fotodinámica contra el cáncer (TFD) ha emergido como una estrategia terapéutica innovadora, mínimamente invasiva y con alta selectividad espacial, basada en el mismo principio fotoquímico que sustenta la inactivación

fotodinámica microbiana (PDI). Ambos enfoques se basan en la administración de un fotosensibilizador (PS) que, tras su activación mediante luz de una longitud de onda específica, genera especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son capaces de inducir daño oxidativo letal en sistemas biológicos. Mientras que la PDI se orienta a la eliminación de microorganismos patógenos, la TFD se aplica al tratamiento de tejidos tumorales, compartiendo mecanismos de acción fundamentales.

Las fototerapias, han adquirido una relevancia creciente debido a su mecanismo de acción basado en la generación localizada de ROS, capaces de inducir daño oxidativo severo y simultáneo sobre múltiples blancos celulares. A diferencia de las terapias convencionales dirigidas a un único objetivo molecular, las ROS producidas durante la fototerapia oxidan de manera no específica lípidos de membrana, proteínas estructurales y enzimáticas, así como ácidos nucleicos, desencadenando un colapso funcional tanto en células tumorales como en microorganismos patógenos.^{22,23} Esta naturaleza multifocal del daño oxidativo dificulta significativamente el desarrollo de mecanismos de resistencia adquirida, fenómeno ampliamente documentado en bacterias multirresistentes y cada vez más reconocido en el contexto tumoral.^{24,25} Por ello, las fototerapias emergen como una estrategia terapéutica robusta y transversal frente a sistemas biológicos altamente adaptativos, tanto en infecciones bacterianas como en neoplasias agresivas.

Un requisito central para la eficacia tanto de la PDI como de la TFD es el empleo de PS con elevada capacidad de absorción de luz, generación eficiente de ROS, adecuada fotoestabilidad y propiedades fisicoquímicas compatibles con sistemas biológicos complejos. Si bien las porfirinas han sido ampliamente utilizadas como PS, presentan limitaciones relevantes, como baja solubilidad acuosa, tendencia a la agregación, fotoestabilidad limitada y coeficientes de absorción relativamente bajos por molécula.^{4,17,18}

Para subsanar esta limitante, se propone el diseño racional de nanopartículas de polímeros conjugados (NPCs) como plataformas nanoestructuradas prometedoras que reúnen múltiples características asociadas a un PS ideal. Estas nanoestructuras, constituidas por polímeros conjugados (PCs) que se autoensamblan en medios acuosos a pesar de su carácter hidrofóbico, presentan una elevada estabilidad coloidal y propiedades ópticas sobresalientes. En particular, exhiben una alta capacidad de captación de luz, reflejada en elevados coeficientes de absorción efectiva por partícula, lo que les permite actuar como

eficientes antenas fotoactivas. Asimismo, las NPCs posibilitan una generación eficiente de ROS, ya sea de manera intrínseca o mediante la incorporación controlada de PS clásicos en su núcleo hidrofóbico, potenciando la producción de ROS a través de procesos eficientes de transferencia de energía. La matriz polimérica confiere además una mayor fotoestabilidad y ofrece versatilidad para la modificación superficial, favoreciendo la interacción con sistemas biológicos específicos, como biofilms bacterianos o células tumorales. Finalmente, su tamaño nanométrico resulta particularmente ventajoso, ya que facilita la penetración en biofilms microbianos y, en aplicaciones oncológicas, contribuye a una eliminación más eficiente, reduciendo la toxicidad sistémica y mejorando la eficacia de la fototerapia.

1.2. Objetivos

Con base a estos antecedentes, la presente tesis tiene como objetivo general desarrollar sistemas basados en NPCs para su aplicación en fototerapias. De este objetivo general se desprenden tres objetivos específicos:

1. Sintetizar y caracterizar NPC fotoactivas de diámetros medios entre 5-10 nm para facilitar su aplicación en fototerapias
2. Sintetizar y caracterizar NPC fotoactivas con distintas modificaciones superficiales que tengan un impacto en el direccionamiento (vectorización) contra células cancerígenas o bacterianas
3. Sintetizar y caracterizar NPC capaces de generar por irradiación ROS en forma más eficiente que las previamente desarrolladas por nuestro grupo y otros.

1.3. Hipótesis

El desarrollo de la tesis se sustentó en tres hipótesis, las cuales se detallan a continuación:

1. Optimización del tamaño de las NPC

Utilizando distintas estrategias de síntesis es posible obtener NPCs compuestas por F8BT + PSMA + PtOEP significativamente más pequeñas que las obtenidas previamente, con diámetros medios comprendidos entre 5-10 nm para mejorar su desempeño en fototerapias. En particular, la reducción del diámetro facilitaría: i) En PDI: la penetración NPCs hacia zonas más profundas del biofilm, promoviendo la eliminación de estas estructuras multirresistentes y ii) En TFD: la optimización del tamaño para favorecer el aclaramiento hepático y renal.

2. Modificación superficial de las NPC para su aplicación en PDI

Para una eficiente PDI se debe tener en cuenta dos aspectos: por un lado, que las bacterias poseen una densidad de carga negativa superficial y por el otro, que el PS (que en este caso NPCs) debe estar lo suficientemente cerca de las bacterias como para que las ROS

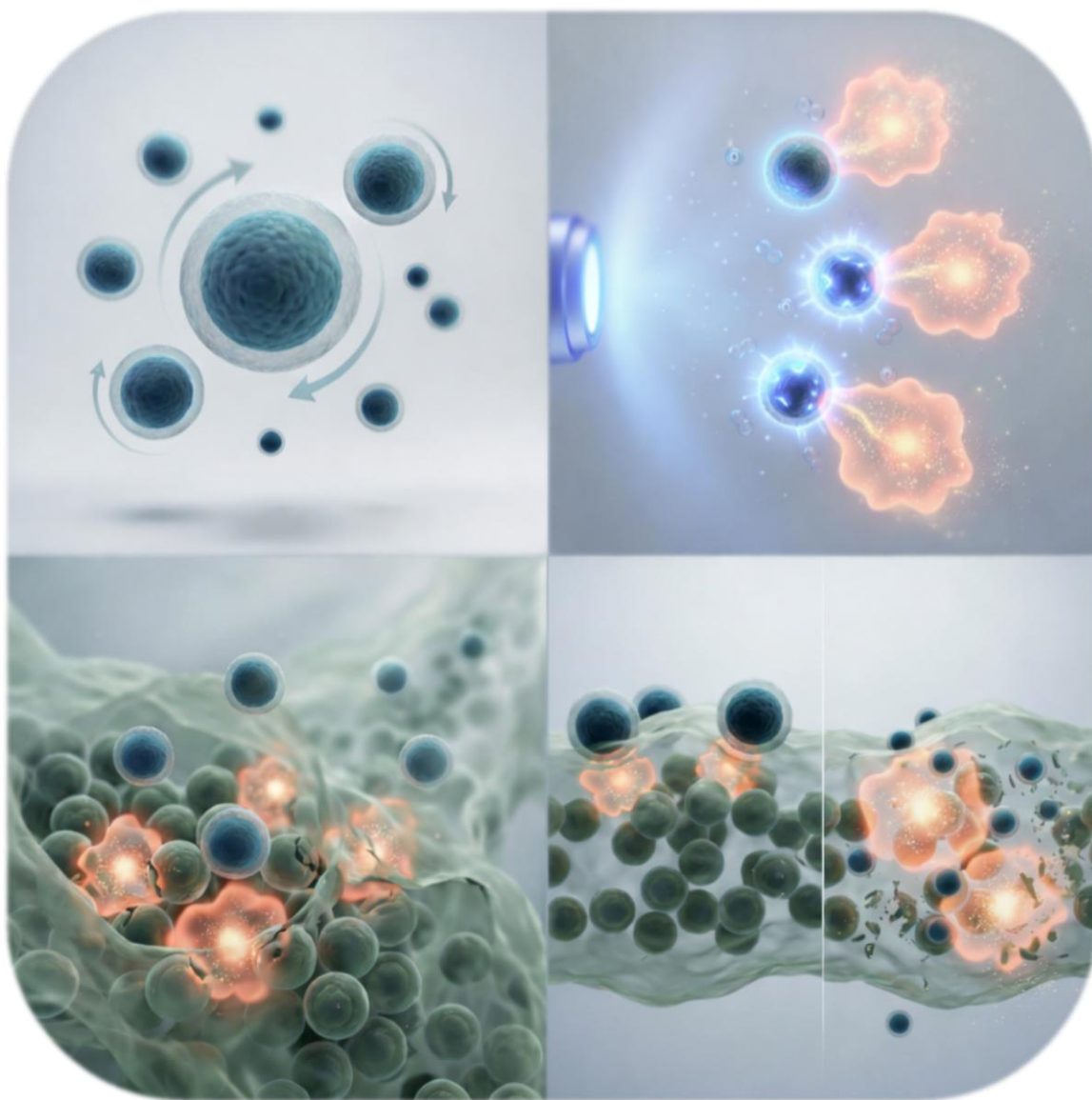
formadas, en particular el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), interaccionen eficientemente con las distintas biomoléculas induciendo daño oxidativo. Este segundo aspecto reviste una gran importancia debido a que el $^1\text{O}_2$ posee un tiempo de vida muy corto en medios biológicos.²⁶ Estudios con diferentes tipos de PS moleculares han demostrado que los mejores PS para PDI son los que poseen una o más cargas positivas, logrando así aumentar hasta 10 veces su adsorción a las superficies bacterianas en comparación con PS neutros o aniónicos. *Mediante la combinación de PC y polímeros con unidades funcionales mediante estrategias de autoensamblado es posible sintetizar: i) NPCs con carga superficial positiva para favorecer su interacción con bacterias y mejorar la PDI.; y ii) NPC con grupos funcionales glucosa para favorecer su interacción con células cancerígenas que usualmente sobreexpresan transportadores de glucosa y mejorar la TFD.*

3. Optimización de las NPC para la producción de $^1\text{O}_2$

Durante los últimos años el grupo de investigación donde se realizó esta tesis desarrollaron NPCs fotoactivas (dopadas volumétricamente con una porfirina metalada, PtOEP) para la PDI contra bacterias multirresistentes a antibióticos y para TFD, las cuales mostraron rendimiento cuántico para la formación de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) del orden de 0,24.²⁷ Si bien dicho rendimientos es bueno, es significativamente menor al de PtOEP ($\Phi_\Delta \sim 1$). En las NPCs dopadas volumétricamente con PtOEP, el estado excitado triplete de la porfirina ($^3\text{PtOEP}^*$) no es el aceptor final de la energía, sino que la energía fluye hacia el estado excitado triplete del PC ($^3\text{F8BT}^*$), los detalles de este proceso se describen en el marco teórico. *Para revertir esta situación se propone dopar superficialmente a las NPCs con una porfirina que permita aumentar el Φ_Δ y en consecuencia mejorar la producción de ROS, en particular de $^1\text{O}_2$.*

Capítulo 2:

MARCO TEÓRICO



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Resistencia a los antibióticos como desafío terapéutico global

La resistencia a los ATBs también denominada de manera más general como resistencia a los antimicrobianos (RAM), constituye actualmente una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. El aumento sostenido de infecciones causadas por microorganismos resistentes se asocia con una mayor frecuencia y duración de las hospitalizaciones, así como con incrementos significativos en la morbilidad y mortalidad, consolidando a la RAM como una de las denominadas “pandemias silenciosas” del siglo XXI. Proyecciones epidemiológicas indican que, en ausencia de medidas efectivas de control, la RAM podría convertirse hacia el año 2050 en la principal causa de muerte a nivel global, superando a patologías como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, con un impacto económico de magnitud considerable sobre los sistemas de salud y la economía mundial.^{2,10,26,28–32}

El desarrollo y la propagación de la RAM responden a múltiples factores interrelacionados. Entre los más relevantes se encuentran el uso excesivo e indiscriminado de ATBs en la práctica clínica, frecuentemente asociado a prescripciones empíricas innecesarias o a la presión ejercida por los pacientes para obtener tratamientos inmediatos, incluso frente a infecciones de origen no bacteriano^{5,32–35}. Asimismo, el uso inapropiado de ATBs (ya sea por una elección incorrecta del fármaco, una dosificación inadecuada o la interrupción prematura de los esquemas terapéuticos) conduce a la generación de concentraciones subinhibitorias que favorecen la selección de mutaciones, alteraciones en la expresión génica y la consecuente aparición de cepas resistentes. Se ha reportado que entre el 30 % y el 50 % de las prescripciones de ATBs presentan errores en la indicación, el agente seleccionado o la duración del tratamiento; y que hasta un 60 % de los ATBs administrados en unidades de cuidados intensivos resultan innecesarios o subóptimos.³⁶ Otro factor determinante es el uso extensivo de ATBs en el ámbito agropecuario, particularmente como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano. Esta práctica favorece la selección de bacterias resistentes que pueden ser transmitidas a los humanos a través de la cadena alimentaria, contribuyendo a la diseminación de la RAM en la población general.³⁵ Finalmente, la disponibilidad limitada de nuevos ATBs agrava esta problemática. El desarrollo de estos fármacos se ha visto fuertemente restringido por barreras económicas y regulatorias, dado que su uso es generalmente de corta duración y menos rentable en

comparación con medicamentos como los destinados al tratamiento de enfermedades crónicas. En consecuencia, los nuevos ATBs suelen reservarse como terapias de “última línea”, lo que reduce aún más las opciones disponibles frente a infecciones causadas por patógenos multirresistentes.^{5,32-35}

2.2. *S. aureus* como ejemplo representativo de bacterias Gram positivas

S. aureus es una bacteria Gram positiva de pequeño tamaño y morfología esférica (comúnmente denominado coco) con un diámetro aproximado de 1 μm , que se caracteriza por su disposición en racimos celulares semejantes a un racimo de uvas. Se considera uno de los principales agentes etiológicos de infecciones en humanos. Su patogenicidad se debe tanto a su gran habilidad de adaptarse a las diversas condiciones ambientales como a la expresión de múltiples factores de virulencia (toxinas, adhesinas, proteínas de superficie, etc.). Estos factores cumplen una doble función: por un lado, permiten que la bacteria sobreviva a ambientes inhóspitos y por el otro, favorecen la propagación de la misma por los tejidos del huésped al que infecta.^{3,37,38} *S. aureus* es uno de los patógenos oportunistas más conocidos, causando muchas enfermedades diferentes que van desde infecciones relativamente leves de la piel y los tejidos blandos hasta enfermedades potencialmente mortales como neumonía y endocarditis. El comportamiento invasivo de *S. aureus* a menudo se desencadena por lesiones o intervenciones médicas, donde la función de barrera de las células o tejidos del huésped se encuentra comprometida.^{39,40}

Desde el punto de vista estructural, *S. aureus* constituye un ejemplo representativo de las bacterias Gram positivas. Las cuales se caracterizan por la presencia de una pared celular gruesa que rodea la membrana plasmática y desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la forma celular, la integridad estructural, la viabilidad y la protección frente al estrés osmótico. En *S. aureus*, la pared celular presenta un espesor aproximado de entre 20 y 80 nm y está compuesta por múltiples capas de peptidoglicano altamente reticulado, que constituye el componente estructural predominante. Asociados a esta matriz se encuentran los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, polímeros aniónicos que anclan la pared celular a la membrana plasmática y son los principales responsables de la carga superficial negativa característica de esta bacteria. Estos polímeros cumplen además funciones clave en la patogénesis, incluyendo la adhesión a células y tejidos del huésped, la formación de

biopelículas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos.^{7,38,39} A diferencia de las bacterias Gram negativas, la pared celular de las Gram positivas presenta un cierto grado de porosidad, lo que permite el paso de pequeñas moléculas a través de su estructura.^{38,41}

En la Figura 2A se esquematiza la organización típica de la pared celular y la membrana plasmática de una bacteria Gram positiva, destacando los principales componentes estructurales responsables de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. En la figura 2B se muestra la estructura química de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, los cuales están conformados por el mismo esqueleto carbonado y difieren en el sitio de anclaje, que puede localizarse en el peptidoglicano de la pared o en un fosfolípido de la membrana plasmática, respectivamente.^{42,43}

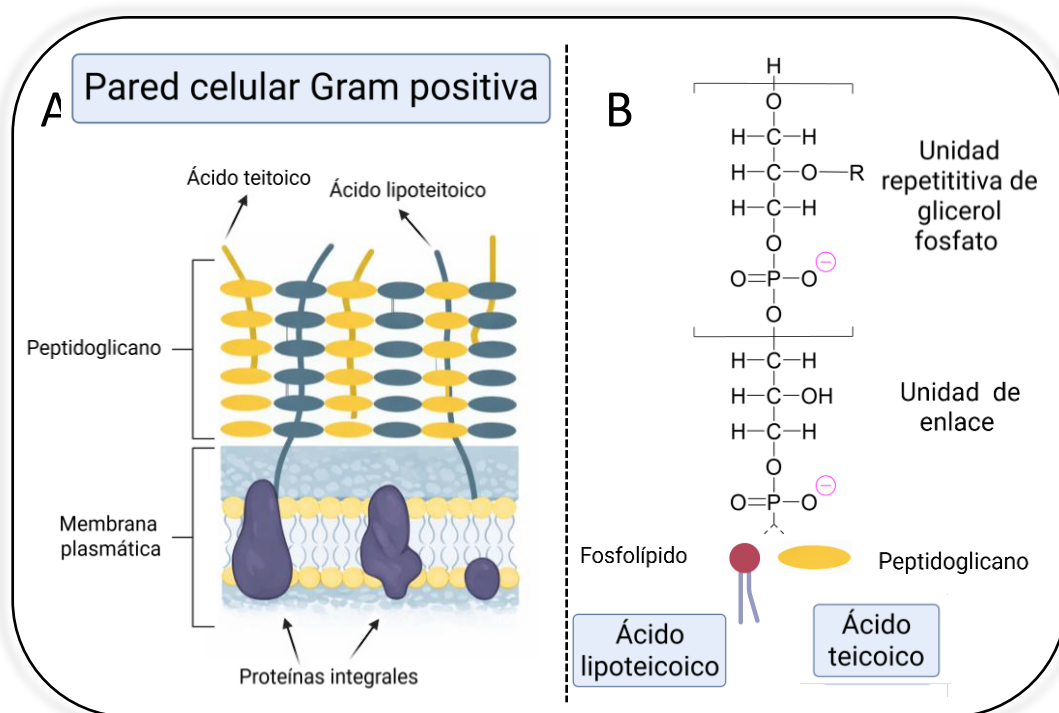


Figura 2. Estructura externa de una bacteria Grampositiva. A: esquema de la membrana plasmática y pared celular. B: estructura química de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos.

La resistencia de MRSA está estrechamente relacionada con su capacidad de formación de biofilms, lo que implica múltiples mecanismos entre ellos la restricción nutricional, barrera osmótica y procesos asociados al *quorum sensing*. Cuando MRSA forma

un biofilm, su contacto directo con el tejido del huésped se reduce, disminuyendo la respuesta inflamatoria y permitiendo que las bacterias sobrevivan en el cuerpo y produzcan una infección crónica. La formación de biofilms produce una resistencia natural a múltiples antibióticos, lo que le permite sobrevivir en una variedad de entornos de supervivencia deficiente, que son difíciles de eliminar y pueden conducir a la persistencia o recurrencia de la infección.⁴⁴

2.3. Biofilms: complejas comunidades microbianas organizadas

Desde finales de los años setenta, a partir del trabajo pionero de Bill Costerton y colaboradores, quienes introdujeron en 1978 una de las primeras definiciones formales del concepto de biofilm, el estudio de estas comunidades ha adquirido creciente relevancia.⁴⁵ En la actualidad, se conoce ampliamente que la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza no existen comúnmente como células individuales en suspensión, sino que se organizan en comunidades microbianas adheridas a superficies, integradas en ecosistemas altamente estructurados. La percepción y el entendimiento de estas comunidades han evolucionado de manera significativa durante las últimas cuatro décadas, impulsados por el desarrollo de nuevas tecnologías de imagen, métodos bioquímicos y herramientas de biología molecular aplicadas a la caracterización integral de la arquitectura tridimensional de los biofilms, así como un análisis detallado de su organización estructural y funcional hasta la escala nanométrica.^{46,47}

En términos generales, un biofilm se define como un consorcio de microorganismos en el que las células se encuentran adheridas entre sí y a una superficie, que puede ser tanto biótica como abiótica. La formación de biofilms representa una estrategia adaptativa natural frente a condiciones ambientales adversas, y se estima que más del 90 % de los microorganismos conocidos son capaces de desarrollarlos cuando las condiciones son adecuadas, incluyendo cepas de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a antibióticos.^{2,13,44} Estas estructuras complejas cumplen una función protectora fundamental, ya que confieren a las bacterias una mayor tolerancia frente a la acción de los antibióticos y a la respuesta del sistema inmune del huésped, mediante la acción combinada de la matriz extracelular y la liberación de moléculas señalizadoras que modulan la respuesta celular y colectiva del biofilm.⁴⁴

2.3.1. Formación de un biofilm

La formación de un biofilm es un proceso dinámico que se desarrolla en cuatro etapas, las cuales se esquematizan en la figura 3 y se describen a continuación.^{2,11,44,48}

1. Adhesión

El proceso de formación del biofilm se inicia cuando una bacteria entra en contacto con una superficie adecuada y establece interacciones iniciales mediadas por proteínas de su envoltura celular. Una vez adheridas, las células comienzan a proliferar y a emitir señales químicas que facilitan el reclutamiento de bacterias vecinas, dando inicio a las siguientes etapas. En el caso de bacterias carentes de orgánulos motores, como *S. aureus*, la colonización de superficies depende en mayor medida de las propiedades fisicoquímicas de la superficie y de las condiciones hidrodinámicas del medio circundante (debido a que no presentan estructuras motoras como fimbrias y flagelos), que influyen en la adhesión celular.

2. Formación de microcolonias

Tras la adhesión inicial de bacterias individuales, se produce un incremento significativo en la multiplicación y agrupamiento celular donde las bacterias interaccionan entre sí, dando lugar a la formación de estructuras multicelulares denominadas microcolonias. Durante esta etapa, las bacterias comienzan a sintetizar y excretar los componentes de la matriz de EPS, que progresivamente envuelve a las células en crecimiento. La estrecha proximidad entre las bacterias dentro de las microcolonias resulta fundamental para las etapas posteriores, ya que facilita una comunicación intercelular eficiente y una coordinación metabólica que favorece la transición hacia una comunidad microbiana más organizada y funcional

3. Maduración

A medida que aumenta el número de células y se acumula la matriz extracelular, el biofilm adquiere una arquitectura tridimensional cada vez más compleja y estable. La matriz de EPS desempeña un papel central en esta etapa, ya que proporciona soporte estructural a la comunidad microbiana y actúa como una barrera protectora frente a agresiones mecánicas y ambientales. En los biofilms maduros las bacterias ocupan aproximadamente un tercio del

biofilm mientras que el resto corresponde a la matriz de EPS la cual forma una red de canales y poros por donde circulan agua, nutrientes y productos de desechos. Estos canales funcionan como un sistema de transporte interno esencial para la viabilidad de las células localizadas en las regiones más profundas del biofilm. El tiempo requerido para alcanzar la maduración varía según la especie bacteriana y las condiciones ambientales, pudiendo oscilar entre horas y varios días, y depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el pH del medio.

4. Dispersión

La dispersión es la última fase del ciclo de formación del biofilm, y consiste en la liberación de una fracción de las células hacia el entorno circundante, permitiendo la colonización de nuevas superficies. Este proceso puede ser desencadenado por diversos factores, entre ellos el agotamiento de nutrientes, variaciones en los niveles de oxígeno, acumulación de productos de desecho, señales químicas internas y cambios en la dinámica del flujo del medio. Un elemento crucial de esta etapa es la disminución en la producción del EPS, lo que lleva a un debilitamiento de la matriz del biofilm. A su vez, las bacterias expresan enzimas específicas capaces de degradar los componentes de la matriz promoviendo la dispersión celular, lo que permite colonizar nuevas superficies e inicial el ciclo de formación en un nuevo entorno.

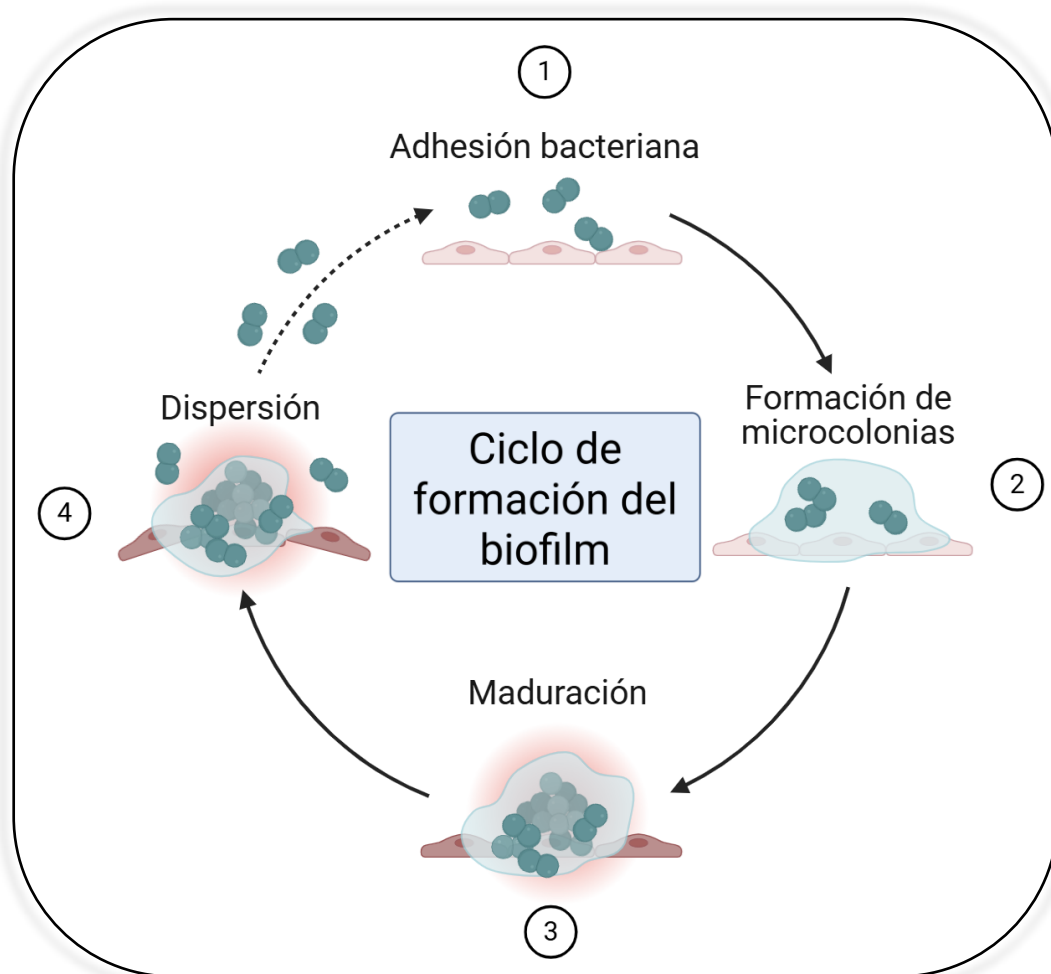


Figura 3. Etapas de formación de un biofilm

2.3.2. Componentes de la matriz extracelular del biofilm

La matriz extracelular del biofilm constituye una estructura altamente organizada y dinámica conformada por diversas biomoléculas entre las cuales se incluyen polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos como el ADN, lípidos, lipoproteínas, proteínas y moléculas involucradas en *quorum sensing*.^{2,11,13} En la figura 4 se esquematizan los principales componentes que componen a la matriz extracelular del biofilm.

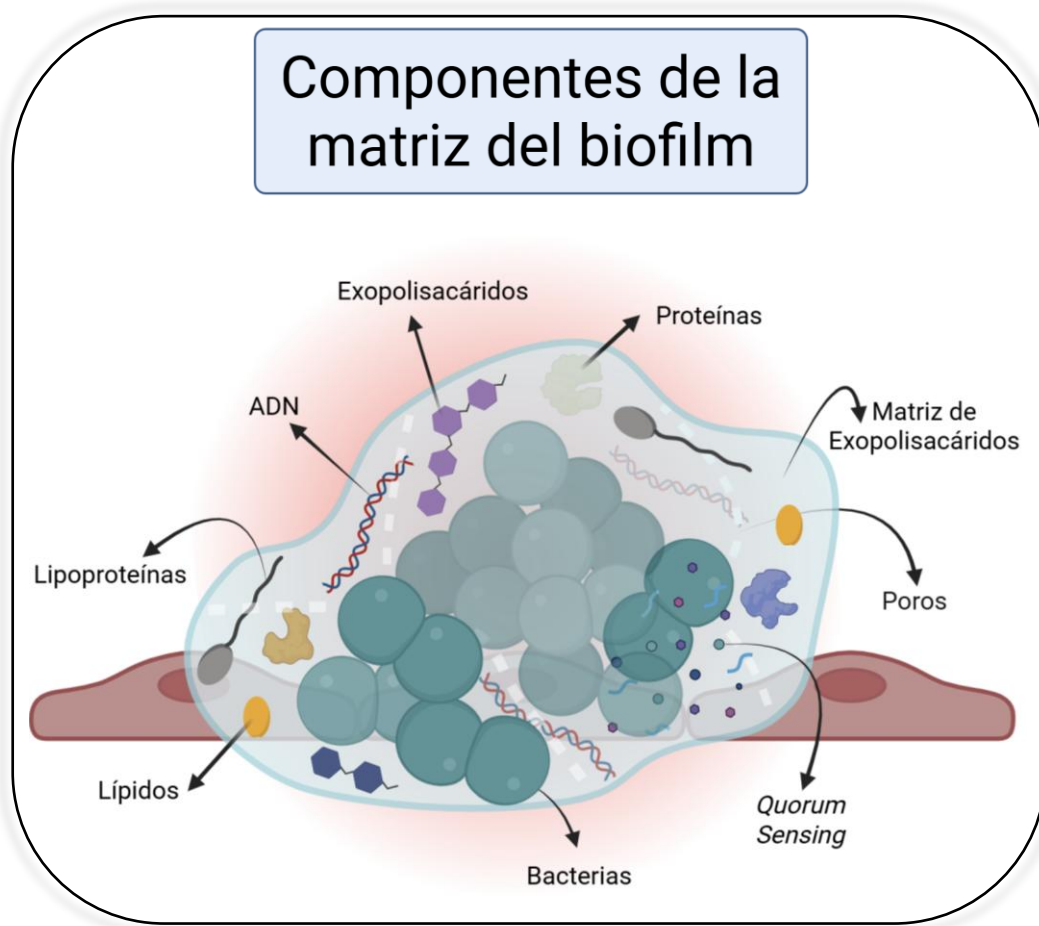


Figura 4. Componentes de la matriz de un biofilm maduro.

Desde el punto de vista funcional, la matriz del biofilm proporciona soporte estructural y protección a las células que integran la comunidad microbiana. Entre sus principales funciones está mejorar la adhesión celular, el secuestro y la retención de nutrientes, así como la protección de las bacterias de agresiones externas. Asimismo, la matriz desempeña un papel dual en la dinámica del biofilm: por un lado, favorece la estabilidad estructural y la adhesión a superficies (procesos críticos durante las etapas de formación y mantenimiento del biofilm) y, por otro, participa activamente en los procesos de migración bacteriana y dispersión celular, contribuyendo a la expansión de la comunidad.¹¹

Debido a su crecimiento tridimensional, los biofilms requieren de canales y poros que permitan la difusión del agua, nutrientes y metabolitos a lo largo de toda la estructura

microbiana. El tamaño y la morfología de los canales están regulados por la densidad del EPS, que conforma una red heterogénea de poros con dimensiones variables. Se ha reportado que el tamaño de poro en biofilms puede oscilar aproximadamente entre ~10 nm hasta ~100 μ m, aunque predominan los poros de menor tamaño.^{1,13,49,50} Estas características estructurales resultan especialmente relevantes en el diseño de estrategias terapéuticas basadas en nanopartículas, ya que su capacidad de penetración depende críticamente de sus dimensiones. En este sentido, se ha propuesto en general que nanopartículas con tamaños de ~5 nm presentan una infiltración más eficiente a lo largo de la matriz del biofilm.⁵¹

2.3.3. Dificultades en la erradicación de biofilms

Los biofilms representan un desafío crítico en el tratamiento de enfermedades bacterianas debido a su estrecha vinculación con la patogenicidad microbiana y la disminución de la eficacia de los ATBs.^{13,52} Estas comunidades estructuradas participan de manera determinante en infecciones asociadas a dispositivos médicos (como catéteres urinarios, implantes oculares y prótesis articulares) así como en patologías crónicas tales como trastornos periodontales y rinosinusitis.^{11,53} En particular, los biofilms formados por *S. aureus* presentan una marcada capacidad de colonizar superficies biomédicas implantables, favoreciendo infecciones persistentes y recurrentes.^{11,53} Una vez formados, resultan extremadamente difíciles de erradicar, lo que contribuye a su elevada carga clínica. Se estima que los biofilms están implicados en aproximadamente el 80 % de las infecciones persistentes y de difícil tratamiento, asociándose con hasta un millón de muertes anuales, lo que subraya su impacto sanitario global.^{2,11,13}

La elevada tolerancia de los biofilms a los ATBs puede explicarse por al menos tres mecanismos principales. En primer lugar, la penetración lenta o restringida de los ATBs limita la concentración efectiva del fármaco a lo largo de toda la estructura del biofilm. En segundo lugar, la presencia de subpoblaciones bacterianas con fenotipo resistente, lo que contribuye a la persistencia de la infección. En tercer lugar, la heterogeneidad metabólica dentro del biofilm genera nichos celulares con limitación de nutrientes y estados de crecimiento diferentes entre las bacterias que se encuentran allí, haciendo que muchas bacterias presenten menor susceptibilidad a los antibióticos convencionales.^{2,11,13,39,52,54,55}

A causa de estos antecedentes, el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas a la antibioticoterapia convencional frente a biofilms se considera una prioridad.⁵⁶⁻⁶² Idealmente, los nuevos tratamientos deben ejercer efectos sostenidos en el tiempo y actuar simultáneamente sobre múltiples dianas microbianas, reduciendo así la probabilidad de selección de resistencia y aumentando la eficacia terapéutica.^{55,63} En respuesta a las limitaciones inherentes al uso prolongado de ATBs, surge la PDI como una estrategia prometedora para el tratamiento de infecciones asociadas a biofilms.

2.4. Glioblastoma, incidencia y pronóstico

El GBM es el tumor cerebral maligno primario más frecuente y agresivo en adultos, y representa aproximadamente el 45–50 % de todos los gliomas diagnosticados en esta población.^{16,17} De acuerdo con la clasificación de la WHO, el glioblastoma corresponde a un astrocitoma de grado IV, caracterizado por un comportamiento altamente infiltrativo, invasivo y resistente al tratamiento.^{18,19} Su incidencia varía según la región geográfica, con valores reportados entre 3,2 y 5,0 casos por cada 100.000 habitantes por año, lo que refleja una importante carga clínica y social a nivel global.^{18,64-66}

Desde el punto de vista clínico, el GBM continúa siendo una neoplasia con un pronóstico extremadamente desfavorable. A pesar de los avances en el diagnóstico por imagen, la caracterización molecular y la implementación de un abordaje terapéutico multimodal que incluye resección quirúrgica del tumor, seguida de radioterapia y quimioterapia con temozolomida, la supervivencia global de los pacientes se sitúa entre 14 y 18 meses, y la tasa de supervivencia a cinco años rara vez supera el 5 – 7 %.^{17,20,21} En ausencia de tratamiento, la supervivencia se reduce drásticamente a aproximadamente 6 – 9 meses tras el diagnóstico.⁶⁷

La recurrencia tumoral es prácticamente inevitable y constituye uno de los principales desafíos clínicos del GBM, ya que la mayoría de los pacientes presentan recaídas dentro de los primeros 8 – 9 meses posteriores al diagnóstico inicial.⁶⁸⁻⁷⁰ Este fenómeno se atribuye a múltiples factores interrelacionados, entre los que se incluyen la marcada heterogeneidad intratumoral, la presencia de células madre de GBM con capacidad de autorrenovación, la activación de mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a los

tratamientos citotóxicos, y la limitada penetración de los fármacos a través de la barrera hematoencefálica (BHE).^{17,71,72}

La BHE constituye una barrera crítica para la eficacia terapéutica en el GBM. Aunque se encuentra alterada de forma heterogénea, dicha disrupción no permite una distribución homogénea y eficaz de los agentes quimioterapéuticos en todo el volumen tumoral, lo que reduce significativamente la exposición efectiva de las células malignas a los tratamientos disponibles.⁷² En consecuencia, la eficacia clínica de fármacos utilizados habitualmente para esta patología como la temozolomida o la carmustina continúa siendo limitada.

A pesar de décadas de investigación intensiva, la morbilidad y mortalidad asociadas a los tumores cerebrales, en particular al GBM, han aumentado de manera sostenida en los últimos años.⁷³ La progresiva pérdida de calidad de vida de los pacientes refuerza la urgencia de identificar nuevas estrategias terapéuticas capaces de mejorar la eficacia del tratamiento estándar.²¹

En un contexto más amplio, el cáncer es una patología que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células como consecuencia de diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen, entre otros procesos, a una reprogramación del metabolismo celular normal. Dentro de estas alteraciones celulares, una muy relevante es la sobreexpresión de GLUT en la membrana plasmática. Esta alteración genética facilita el ingreso de elevadas cantidades de dicho carbohidrato para ser utilizado tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas. La sobreexpresión de los GLUT está presente en múltiples tipos de cáncer y es un reflejo de la dependencia de esta fuente de energía para sostener el rápido crecimiento y su particular supervivencia en entornos hipóxicos (fenómeno conocido como el efecto Warburg). La sobreexpresión de estos transportadores se correlaciona con una mayor agresividad tumoral, resistencia a los tratamientos convencionales y en consecuencia con un peor pronóstico clínico.⁷⁴⁻⁷⁷

En particular, en el GBM, se sobreexpresan principalmente dos GLUT: el GLUT1 facilita la captación de glucosa en condiciones de hipoxia, mientras que GLUT3 contribuye a la agresividad y la resistencia terapéutica de las células tumorales.⁷⁸⁻⁸⁰ Esta sobreexpresión, aunque confiere ventajas metabólicas al tumor, también representa una oportunidad terapéutica, ya que los GLUT pueden actuar como dianas de reconocimiento para sistemas

nanoparticulados. En este sentido, el diseño de nanopartículas funcionalizadas con ligandos de glucosa o análogos permite aprovechar la alta densidad de GLUT en la membrana de la célula tumoral, facilitando una internalización más eficiente y selectiva de fármacos en células tumorales, lo que abre nuevas vías para terapias más específicas.^{74,81-85}

2.5. Inactivación fotodinámica microbiana y terapia fotodinámica contra el cáncer

La PDI y TFD constituyen estrategias terapéuticas emergentes que combinan procesos fotofísicos y fotoquímicos desencadenando un intenso estrés oxidativo capaz de provocar la muerte celular tanto de patógenos bacterianos como de células tumorales.⁸⁶⁻⁸⁸ La técnica se basa en la administración de un PS que, tras su irradiación con luz a una longitud de onda adecuada, alcanza un estado excitado desde el cual transfiere energía al oxígeno molecular, generando radicales libres y distintas ROS.^{2,12,44,52,55,89-92} Estas ROS, son moléculas extremadamente reactivas y su aumento considerable en un corto periodo de tiempo provoca un fuerte estallido oxidativo que ocasiona daño irreversible en múltiples estructuras celulares comprometiendo de manera simultánea la integridad y viabilidad celular.^{2,4}

En el ámbito de los microorganismos, la PDI ha demostrado una elevada eficacia para tratar distintos tipos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo cepas multirresistentes y comunidades organizadas como son los biofilms.^{2,44,52,93-95} En este tipo de sistemas, las ROS producidas inducen un daño estructural considerable sobre los distintos componentes que conforman a la matriz de EPS y a las envolturas bacterianas. El carácter multidiana del daño oxidativo reduce significativamente la probabilidad de desarrollo de resistencia bacteriana, constituyendo una ventaja relevante frente a la antibioticoterapia convencional.^{52,96,97}

En el campo oncológico, la TFD se ha consolidado como una alternativa terapéutica mínimamente invasiva para el tratamiento de diversos tumores sólidos, ya sea como terapia primaria como adyuvante de los tratamientos convencionales.^{98,99} En células tumorales, las ROS generadas tras la activación del PS pueden desencadenar apoptosis, necrosis o autofagia y muerte celular inmunogénica; dependiendo del tipo celular, la localización subcelular del PS, la dosis de luz administrada y el estado metabólico del tumor.¹⁰⁰⁻¹⁰² Además del efecto

citotóxico directo, la TFD puede inducir daño vascular tumoral y estimular respuestas inmunológicas antitumorales, contribuyendo al control local del tumor alterándolo y contribuyendo al colapso del tejido neoplásico.⁹⁸ Además, la PDT se asocia con efectos secundarios leves y puede administrarse repetidamente según la condición clínica del paciente.¹⁰³

Una característica central de las fototerapias, es su naturaleza localizada. La necesidad de la coincidencia espacial y temporal de PS, luz y O₂ restringe el efecto fotodinámico al área irradiada. Asimismo, la corta vida media y el alcance limitado de las ROS minimizan el daño a tejidos circundantes, contribuyendo a un perfil de seguridad favorable.^{25,52,104} Entre las principales ventajas de esta terapia se destacan: (i) su mecanismo de acción rápido y multidiana.^{52,92,96,97,101} (ii) su amplio espectro de acción.^{93,97,98,100,103} (iii) la baja probabilidad de inducir resistencia debido al daño oxidativo inespecífico.^{55,99,105,106} (iv) su compatibilidad con sistemas nanoestructurados, que permiten optimizar la captación de luz, la selectividad biológica y la penetración en biofilms o tejidos tumorales.^{52,55,107}

2.5.1. Especies reactivas de oxígeno

Como se mencionó anteriormente, las ROS son moléculas altamente reactivas y con tiempos de vida media muy cortos. Las ROS forman parte de todos los procesos biológicos, ya que se obtienen como un subproducto natural del metabolismo aeróbico celular. Estas especies desempeñan un doble papel en las células. Son necesarias para el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales como, por ejemplo: señalización celular, metabolismo energético, proliferación de las células madre mediante la estimulación de proteínas específicas, transducción de señales y la defensa frente a agentes exógenos. Pero también se asocian a menudo con el estrés oxidativo cuando, en determinadas situaciones, se produce una cantidad de ROS excesiva que supera en gran medida la capacidad antioxidante propia de la célula. Un desbalance hacia la mayor producción de ROS es crítico, porque al ser moléculas altamente reactivas, pueden atacar en simultáneo los componentes funcionales y estructurales de una célula desencadenando la muerte celular.^{7,8,52,108,109}

Las ROS son especies radicalarias o no radicalarias derivadas del oxígeno caracterizadas por una reactividad química mayor que la del O₂ en estado fundamental, y que participan activamente en reacciones de oxidación – reducción. El O₂ contiene dos electrones

desapareados con configuraciones de espín paralelas en su capa externa. Debido a esta restricción de espín, se produce una reacción redox de un electrón con otros átomos o moléculas, lo que da lugar a varios intermediarios altamente reactivos, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$).⁵² Debido a su alta reactividad, los radicales libres pueden extraer electrones de otros compuestos para lograr estabilizarse. La molécula atacada pierde así su electrón y se convierte en un radical libre, comenzando una reacción en cadena en cascada que termina afectando a la integridad celular.^{52,110}

Por otro lado, el O_2 puede ser excitado electrónicamente para producir 1O_2 .^{89,109,111} El 1O_2 demuestra una reactividad notable hacia compuestos orgánicos ricos en electrones, incluidas moléculas aromáticas policíclicas o alquenos. Varias moléculas biológicas también presentan sitios susceptibles de interacción con 1O_2 , como bases purínicas en el ADN, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos específicos como triptófano, tirosina, histidina, metionina y cisteína.^{96,110} El 1O_2 produce la oxidación de ácidos grasos insaturados, ácidos nucleicos, proteínas y membranas mitocondriales, provocando así la muerte celular. De todas las especies reactivas, el 1O_2 se considera el más relevante por ser la especie más reactiva de todas.^{52,91,104,112} Y, en consecuencia de su elevada reactividad presenta un tiempo de vida corto, el cual depende del medio en el que se encuentre. Ogilby y colaboradores¹¹³ estimaron un coeficiente de difusión del 1O_2 intracelular en el rango $\sim 2 - 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, lo que significa que el dominio espacial de la actividad intracelular del 1O_2 probablemente tendrá un radio esférico de $\sim 100 \text{ nm}$.

El estrés oxidativo es la causa de muchas enfermedades como Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoides, etc. La alta reactividad química y su capacidad de oxidar de manera inespecífica distintos componentes celulares, hacen de las ROS un arma potencialmente eficiente para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por una proliferación patológica de células como el cáncer o una infección microbiana.^{7,8,108,109} Debido a estos efectos, se las considera como una terapia alternativa novedosa para el tratamiento de bacterias resistentes a ATB.^{52,89,104,114} Es importante combinar la PDI con un enfoque que permita, simultáneamente, la unión del PS al EPS y su permeabilización a través de la matriz extracelular para alcanzar las células más profundas de la biopelícula, lo que facilita la acción eficiente de ROS.⁵²

2.5.2. Fotosensibilizadores

Cuando el PS es irradiado en un rango espectral adecuado (idealmente centrado en el máximo de absorción de esa molécula) se induce su transición hacia estados electrónicos de energía elevados, lo que puede resultar en la posterior formación de ROS como se describe a continuación y se esquematiza en la figura 5.

En su estado electrónico fundamental singlete (S_0), el PS presenta una configuración electrónica estable caracterizada por electrones apareados en los orbitales moleculares de menor energía. Cuando la molécula absorbe radiación electromagnética, se produce una transición electrónica que promueve a un electrón a un orbital de mayor energía, generando el primer estado electrónico excitado singlete (S_1). Esta transición implica un cambio en la configuración electrónica de la molécula, la cual es una redistribución electrónica asociada a un nuevo estado energético. Desde el estado S_1 , la molécula puede retornar al estado fundamental mediante emisión radiativa (fluorescencia) o bien desactivarse a través de procesos no radiativos. Alternativamente, puede ocurrir un cruce intersistema (ISC), que consiste en proceso no radiativo mediante el cual la molécula pasa desde S_1 al primer estado excitado triplete (T_1). Aunque esta transición implica un cambio en la multiplicidad de espín y está formalmente prohibida por las reglas de selección, puede tener lugar debido al acoplamiento espín – órbita, que mezcla estados de diferente multiplicidad y aumenta la probabilidad de ISC. La eficiencia del ISC y el tiempo de vida del estado T_1 son factores críticos para la generación de ROS, ya que los estados triplete suelen presentar tiempos de vida significativamente mayores que los estados singlete excitados, favoreciendo interacciones bimoleculares con el O_2 . Una vez que el PS se encuentra en el estado T_1 , puede retornar al estado fundamental mediante emisión radiativa (fosforescencia) o participar en procesos de fotosensibilización que conducen a la formación de ROS.

En el mecanismo de fotosensibilización Tipo I, el estado triplete del PS reacciona con sustratos en el medio (incluido el O_2) mediante transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno, generando iones radicales y radicales libres como $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ y especies derivadas como H_2O_2 . Este mecanismo puede operar incluso en condiciones de baja concentración de oxígeno y suele asociarse con daño oxidativo en componentes celulares, particularmente en membranas lipídicas. En el mecanismo de fotosensibilización Tipo II, el PS en estado T_1 transfiere energía electrónicamente al O_2 en su estado fundamental triplete (3O_2), promoviendo su conversión a 1O_2 . La eficiencia de este proceso depende tanto del

rendimiento cuántico del estado triplete como de la concentración de oxígeno disponible en el medio. Como se mencionó anteriormente, el $^1\text{O}_2$ es altamente reactivo y puede inducir peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño en ácidos nucleicos, desencadenando procesos que culminan en la inactivación celular o microbiana. Los mecanismos Tipo I y Tipo II compiten entre sí y la predominación de uno u otro depende de las propiedades estructurales del fotosensibilizador (por ejemplo, factores que modulan el acoplamiento espín – órbita y la eficiencia del ISC), así como de las condiciones del entorno, incluyendo la disponibilidad del O_2 y la naturaleza del microambiente molecular.^{12,52,55,89,94,97,104,105,111,112,115}

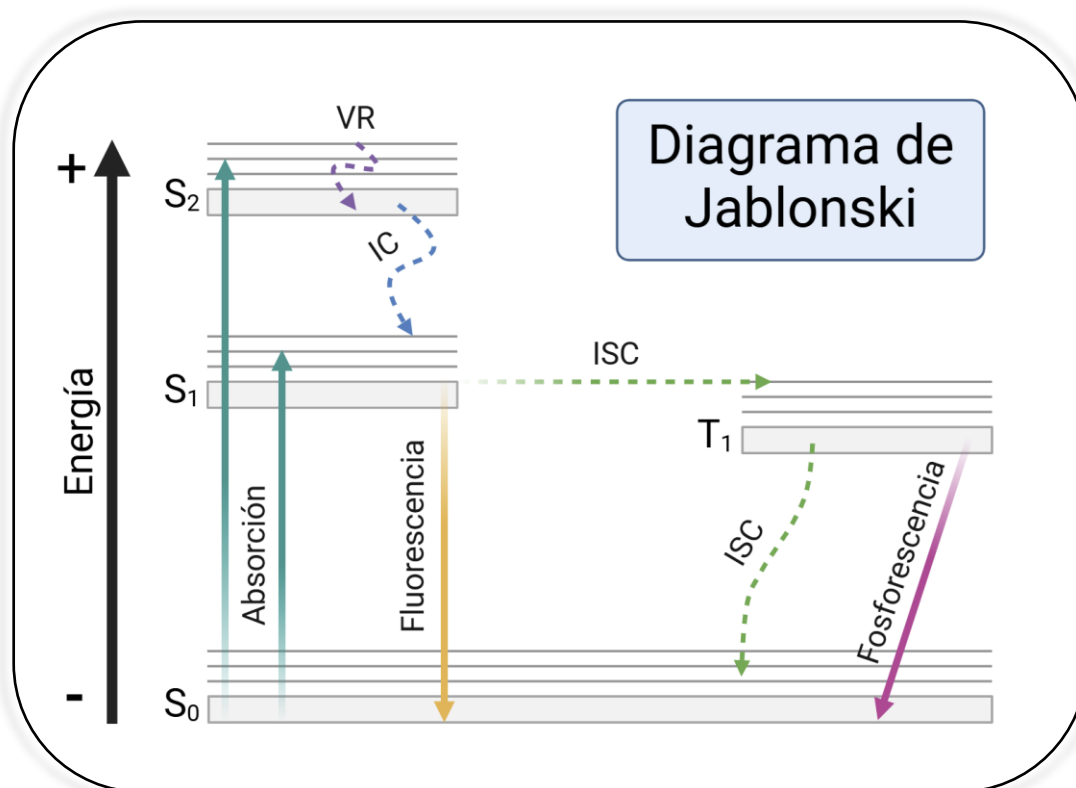


Figura 5. diagrama de jablonski. Las líneas continuas indican procesos radiativos y las punteadas procesos no radiativos. VR: relajación vibracional, IC: conversión interna, ISC: cruce entre sistemas.

2.5.2.1. Clasificación de fotosensibilizadores

En fototerapias, los PS se clasifican tradicionalmente en tres generaciones, en función de su desarrollo temporal teniendo en cuenta la evolución estructural, optimización fotofísica y mejora en el desempeño terapéutico.^{52,94,107,116–118}

1. Fotosensibilizadores de primera generación

Fueron desarrollados en la década de 1970 y están constituidos por porfirinas naturales y sus derivados. Estas moléculas representaron un avance significativo en los inicios de las fototerapias, pero su aplicación evidenció diversas limitaciones. Entre las cuales se destacan la fototoxicidad cutánea prolongada, la presencia de citotoxicidad en oscuridad y coeficientes de absorción relativamente bajos en la región que comprende entre 650 – 800 nm. La absorción en esta región particularmente relevante en la TFD, dado que en dicha región se encuentra la ventana óptica biológica donde se produce una mayor penetración tisular de la luz. No obstante, en el contexto de la PDI, esta limitación es menos crítica, ya que las infecciones de este tipo tienden a localizarse en tejidos superficiales. Ejemplos representativos de esta generación incluyen la hematoporfirina y sus derivados, la hipericina y la curcumina.

2. Fotosensibilizadores de segunda generación

Consisten en compuestos sintéticos diseñados para superar las limitaciones que presentan los PS de primera generación. Estos presentan un mayor coeficiente de absorción molar por encima de 650 nm, mayores rendimientos cuánticos de formación de ROS y menor toxicidad en oscuridad. Dentro de esta categoría se encuentran colorantes catiónicos, los cuales muestran mayor afinidad por las superficies microbianas cargadas negativamente, incrementando su eficacia antimicrobiana. Entre los ejemplos más relevantes se encuentran las ftalocianinas, clorinas, benzoporfirinas, azul de metileno, azul de toluidina y diversos derivados de borodipirrometeno (BODIPY).

3. Fotosensibilizadores de tercera generación

Se obtienen a partir de la modificación estructural o formulación avanzada de PS de segunda generación con el objetivo de mejorar su selectividad, biodistribución y acumulación preferencial en el sitio a tratar. Lo cual permite reducir la dosis de PS utilizado y minimizar la toxicidad en oscuridad mejorando en consecuencia la eficiencia de la

fototerapia. Estas estrategias incluyen la conjugación con moléculas diana (como anticuerpos, péptidos y carbohidratos) y la encapsulación en sistemas de liberación controlada, tales como micelas, liposomas y nanopartículas.

2.5.2.2. Porfirinas

Entre los distintos PS que se pueden utilizar para PDI, las porfirinas cumplen un papel relevante por ser de las más antiguas y ampliamente utilizadas. Dichas moléculas están compuestas por un anillo macrocíclico aromático con cuatro residuos tipo pirrol. En su estructura típicamente presentan 26 electrones π , de los cuales 18 electrones forman parte de un sistema π conjugado aromático. Poseen fuertes bandas de absorción alrededor de los 400 nm (banda Soret) y bandas de absorción más débiles entre 500 y 800 nm (bandas Q).^{105,115,119,120} Estos PS exhiben Φ_{Δ} elevados actuando entonces predominantemente de acuerdo con el mecanismo de Tipo II.^{12,52,121} En la figura 6 se muestran dos ejemplos de porfirinas metaladas con átomos pesados: octaetilporfirina de platino (PtOEP) y Pt (II) meso-tetra(4-carboxifenil) porfirina (Pt-TCPP):

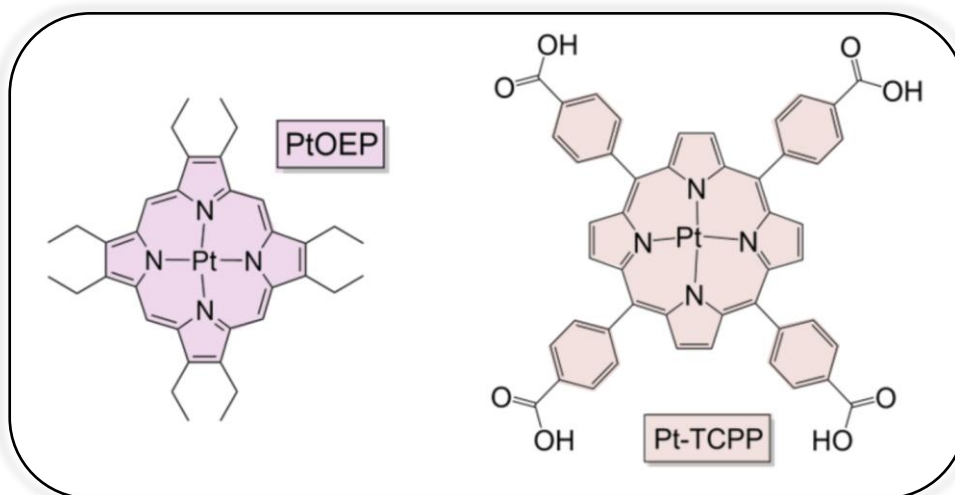


Figura 6. Ejemplos de porfirinas utilizadas como PS.

Los PS de este tipo presentan varias limitaciones, entre ellas fotoblanqueo significativo, citotoxicidad en oscuridad, susceptibilidad variable entre distintas cepas⁴ y baja solubilidad en medios acuosos. De todas las limitantes, las más relevantes son el

fotoblanqueo (proceso que implica la degradación de las moléculas tras cierto tiempo de exposición a la luz) y la baja solubilidad en medios acuosos y fisiológicos que favorece la agregación molecular en estos entornos. La agregación tiene un doble efecto adverso: dificulta su biodisponibilidad comprometiendo sus propiedades fotodinámicas. En conjunto, ambos efectos disminuyen significativamente la eficiencia de las fototerapias.^{44,55,89,90,94,104,105,115}

Por otro lado, para que un PS sea adecuado para fototerapias debe cumplir con ciertos requerimientos^{26,52,55,96,97,112,115}:

- † Absorber eficientemente radiación electromagnética, es decir, poseer altos coeficientes de absorción.
- † Tener un pequeño tamaño para facilitar la adsorción a la bacteria (un pequeño tamaño y amplia superficie de contacto permite una mejor internalización por las membranas celulares) y difusión dentro del biofilm.¹⁰⁵
- † Poseer un átomo pesado para favorecer la formación de estados tripletes de larga duración (efecto del átomo pesado) y en consecuencia la generación $^1\text{O}_2$ con altos rendimientos cuánticos.
- † Buena resistencia a la transformación para que la molécula sea estable, es decir un bajo rendimiento cuántico de fotoblanqueo. Así, una misma molécula puede participar de un gran número ciclos de fotoexcitación y formación de ROS antes de tornarse inactiva.
- † En particular para PDI, poseer una significativa densidad de carga positiva para favorecer la interacción electrostática con las membranas bacterianas que poseen carga negativa. Los PS con carga positiva muestran excelentes efectos letales fotoinducidos sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas debido a la fuerte interacción electrostática entre las superficies bacterianas y los PS.
- † En particular para TFD, poseer un perfil de biodistribución adecuada beneficiado por el efecto de permeación y retención (EPR) y fácil eliminación para evitar su acumulación en órganos vitales y generar toxicidad a largo plazo (como inflamación crónica o alteración del funcionamiento normal de los órganos).¹²²
- † Poseer elevada solubilidad o estabilidad coloidal en medios acuosos.

Con el fin de superar las limitaciones de los PS de primera y segunda generación y cumplir con los requisitos necesarios para obtener una elevada eficiencia terapéutica en las

fototerapias, surge el desarrollo de PS de tercera generación basados en NPCs. Estas no solo actúan como sistemas transportadores de porfirinas, sino que también pueden funcionar como PS *per se*, amplificando la capacidad de generación de ROS. Estas estrategias se describen en las siguientes secciones.

2.6. Polímeros conjugados

En las últimas décadas, los PCs han atraído mucha atención en el ámbito científico y tecnológico, ya que pueden combinar las mejores características de los materiales semiconductores inorgánicos (buenas propiedades eléctricas y ópticas) con las de los polímeros orgánicos sintéticos (flexibilidad mecánica, procesamiento simple y bajo costo).^{123,124} En la figura 7 se ejemplifica la estructura química de dos PCs derivados del polifluoreno. Del lado izquierdo se encuentra el poli[(9,9- di-n-octilfluorenil-2,7-diil)-alt-(benzo[2,1,3]-tiadiazol-4,8-diil)] (F8BT) y del lado derecho se encuentra el PC catiónico poli[(9,9-bis(60-(N,N,N-trimetilamonio)hexil)-2,7-fluoreno)-alt-2,7 (9,9diocetilfluoreno)] dibromo (PFN).

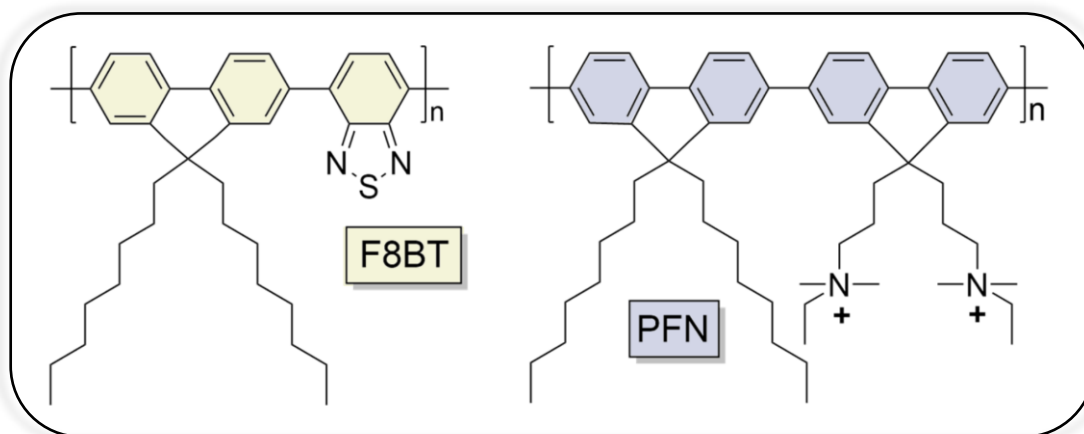


Figura 7. Ejemplos de PC.

Los PCs se usaron inicialmente de forma amplia en dispositivos optoelectrónicos, como diodos emisores de luz, células fotovoltaicas y transistores de efecto de campo, debido a su excelente conductividad y propiedades de absorción de luz.^{125,126} Como se detallará más adelante, estudios posteriores revelaron que la estructura π -conjugada de los PCs no

solo sobresale en aplicaciones optoelectrónicas, sino que también estimula la producción de elevadas cantidades de ROS a través de la eficiente ET intrapartícula (combinada en ocasiones con transferencia de electrones), una característica muy deseable en las fototerapias. Este descubrimiento amplió su aplicación en esta área terapéutica, estableciendo a los PCs como PS prometedores para la PDI y TFD.^{94,111,126,127}

Debido a su estructura, los PCs presentan múltiples propiedades^{6,7,27,93,94,120,128,129}:

- † Poseen una gran capacidad para la captación de luz
- † Generalmente presentan elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia
- † Son fotoestables
- † Son biocompatibles
- † Poseen una estructura muy variable y modificable
- † Interaccionan con el O₂ para formar ROS pudiendo ser utilizados como PS
- † Pueden combinarse fácilmente con otros materiales, potenciando así las propiedades intrínsecas de cada uno de los materiales individuales gracias a la ocurrencia de procesos de ET intrapartícula.

Los PCs son macromoléculas orgánicas formadas por una serie de unidades repetitivas concatenadas entre sí por una sucesión de enlaces simples y dobles (o triples) alternados a lo largo de la cadena. Sin embargo, la conjugación electrónica efectiva (deslocalización de electrones π) se mantiene solo en cortos segmentos (de unas pocas unidades) de la cadena principal. Dichos segmentos tienen longitud y energía variable^{94,130,131}, los cuales se denominan “cuasi-cromóforos” debido a que están esencialmente desacoplados electrónicamente^{128,130,132–135}. Así una cadena individual de PC se considera un sistema multicromofórico. La excitación electrónica en estos materiales (excitón) se localiza (temporalmente) en los cuasi-cromóforos individuales y se transporta eficientemente a través del material mediante transferencia de energía (ET) entre cromóforos vecinos.

La capacidad del excitón para difundir a través de las cadenas del PC permite una ET eficiente hacia un aceptor (como, por ejemplo: un PS).¹³⁶ Este fenómeno de difusión excitónica a través de los cromóforos del PC (homo-ET) constituye la base de los procesos de ET que ocurren en los PCs. A nivel molecular, la ET puede describirse mediante distintos mecanismos, principalmente los de tipo Förster y Dexter como se explica más adelante.

Los procesos de ET ocurren cuando una molécula excitada (donor) regresa al estado fundamental cediendo su energía a otro compuesto (aceptor). Ese proceso puede ocurrir de manera radiativa si el aceptor absorbe la luminiscencia emitida por el donador (mecanismo trivial), o de manera no radiativa si la transferencia de energía se produce mediante interacciones físicas entre el donador y el aceptor durante el tiempo de vida del estado excitado del donador.

A su vez, la ET no radiativa se divide en dos tipos: la transferencia de energía resonante del tipo Förster (FRET) cuando las interacciones entre el donador y el aceptor se producen mediante interacciones coulombicas; y la transferencia de energía del tipo Dexter cuando se produce un solapamiento orbital entre donador y aceptor. En el sistema de NPCs compuestas por PCs, es el mecanismo de FRET el que adquiere una mayor relevancia. La desactivación por FRET, es un mecanismo de largo alcance que opera típicamente a distancias entre 1 y 100 nm y su eficiencia depende marcadamente de la separación espacial entre donador y aceptor. La velocidad de la transferencia de energía se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$k_{T(r)} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1)$$

Donde:

r = distancia donador-aceptor

τ_d = tiempo de vida del donador en ausencia de transferencia de energía (es decir, tiempo de vida intrínseco del estado excitado del donador)

R_0 = radio de Förster del par donador-aceptor

Esto quiere decir que la eficiencia del proceso de FRET depende significativamente de la separación espacial entre donador y aceptor como se mencionó anteriormente, disminuyendo de forma inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia. Esta relación confiere a FRET una sensibilidad a cambios estructurales o dinámicos en sistemas moleculares. Para que un proceso de FRET sea eficiente, deben cumplirse ciertas condiciones: que exista un solapamiento espectral significativo entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor y que ambos estén ubicados a una proximidad adecuada (generalmente menor a 10 nm). Además, los dipolos de transición de

ambas moléculas deben encontrarse en una orientación favorable. Otra condición para un eficiente proceso de FRET, es un elevado rendimiento cuántico de emisión del donador asegurando que la ET compita eficientemente con otros procesos de desactivación. Por último, un índice de refracción del medio acorde, ya que el mismo favorece la intensidad del campo dipolar involucrado.^{137,138} Este proceso de ET en los PCs, es un proceso clave que determina sus propiedades ópticas y electrónicas, siendo fundamental para su desempeño en dispositivos fotónicos, sensores y sistemas biológicos.^{124,127,139,140}

Mientras que el mecanismo de transferencia

2.7. Nanopartículas de polímeros conjugados

Las NPCs presentan una clase emergente de materiales a nanoescala multifuncionales que combinan las propiedades de los PCs y nanopartículas en general, definiendo una nueva clase de materiales fotoactivos prometedores. En las últimas décadas han captado un gran interés en aplicaciones biológicas debido sus propiedades sobresalientes, combinadas con metodologías de síntesis relativamente simples.^{27,94,136}. Entre las principales aplicaciones se incluye su utilización como PS para fototerapias antibacterianas y anticancerígenas^{95,141–145}, como fotoiniciadores de polimerización^{146–148}, transportadores de fármacos y liberación controlada de los mismos¹⁴⁹, terapia fotodinámica y fototérmica combinada^{150–152}, marcado celular^{153,154}, monitoreo de parámetros de interés biológico^{155,156}, y bioimagen^{136,157,158}. Además de las características propias de los PCs que las conforman, las NPCs muestran las siguientes propiedades^{125,153–161}:

- † Poseen diámetros normalmente comprendidos entre 10-200 nm
- † Forman suspensiones estables en medios acuosos
- † Muestran una baja citotoxicidad intrínseca
- † Sus propiedades ópticas y fotoquímicas pueden modificarse de forma sencilla mediante la incorporación de dopantes moleculares
- † Sus propiedades superficiales pueden ser modificadas sencillamente mediante técnicas de autoensamblado y/o incorporación de polímeros anfifílicos.

Las NPCs pueden obtenerse a partir de diferentes técnicas, siendo la más extensamente utilizada el método de reprecipitación controlada también llamado

nanoprecipitación. En dicho método, el PC se disuelve en un solvente orgánico donde presenta elevada solubilidad y luego se transfiere rápidamente a un solvente donde dicho PC es insoluble (habitualmente agua); ambos solventes deben ser miscibles entre sí. La incorporación del segundo solvente produce el plegamiento de las cadenas poliméricas sobre sí mismas dando origen a las NPCs.^{60,125,136,162,163} Con este método, es posible controlar el tamaño de las NPCs^{136,161} y sus propiedades pueden ajustarse fácilmente combinando diferentes PCs y agregando polímeros surfactantes para modificar su superficie. Para una NPCs dada, estas propiedades dependen en gran medida de la naturaleza del PC, los cromóforos que lo componen, la conformación y extensión de su cadena y el grado de agregación. Además, las cargas superficiales u otros grupos funcionales de los PCs tienen un efecto significativo en las propiedades de las NPCs.¹²⁵

2.7.1. Dopado de NPCs con porfirinas

En algunos casos, las NPCs suelen estar dopadas con colorantes, particularmente con porfirinas.^{44,59,93,95,163–166} El dopado de las NPCs con porfirinas puede ser volumétrico o superficial. En el dopado volumétrico, las porfirinas quedan incluidas en el interior de la matriz polimérica de las NPCs durante el proceso de síntesis. Mientras que en el dopado superficial, la porfirina es adsorbida a la superficie de las NPCs previamente sintetizada o unida covalentemente a grupos funcionales que decoran la superficie de las NPCs. En el grupo de investigación se ha estudiado detalladamente el sistema de NPCs formadas por el PC F8BT y dopadas volumétricamente con la porfirina PtOEP, cuyos resultados se encuentran publicados en el trabajo de Spada y colaboradores²⁷ y que tenían como objetivo incrementar el rendimiento cuántico de $^1\text{O}_2$. En la figura 8 se esquematiza el mecanismo de fotoproducción de esta ROS. En dicha investigación se concluyó que el F8BT absorbe fotones (paso 1. Absorción) poblando su primer estado excitado ($^1\text{F8BT}^*$) y transfiere energía con alta eficiencia a la PtOEP (transferencia de energía singlete – singlete tipo Föster (TE-SS, paso 2)) poblando su primer estado excitado ($^1\text{PtOEP}^*$). Como la porfirina está metalada, rápidamente genera ISC (paso 3), el $^3\text{PtOEP}^*$. Pero como el $^3\text{F8BT}^*$ posee menor energía que $^3\text{PtOEP}^*$ se produce una transferencia de energía triplete – triplete tipo Dexter (TE-TT, paso 4) desde la PtOEP excitada hacia el F8BT. Finalmente, es el $^3\text{F8BT}^*$ el encargado de interactuar con el O_2 para producir $^1\text{O}_2$ (paso 5).

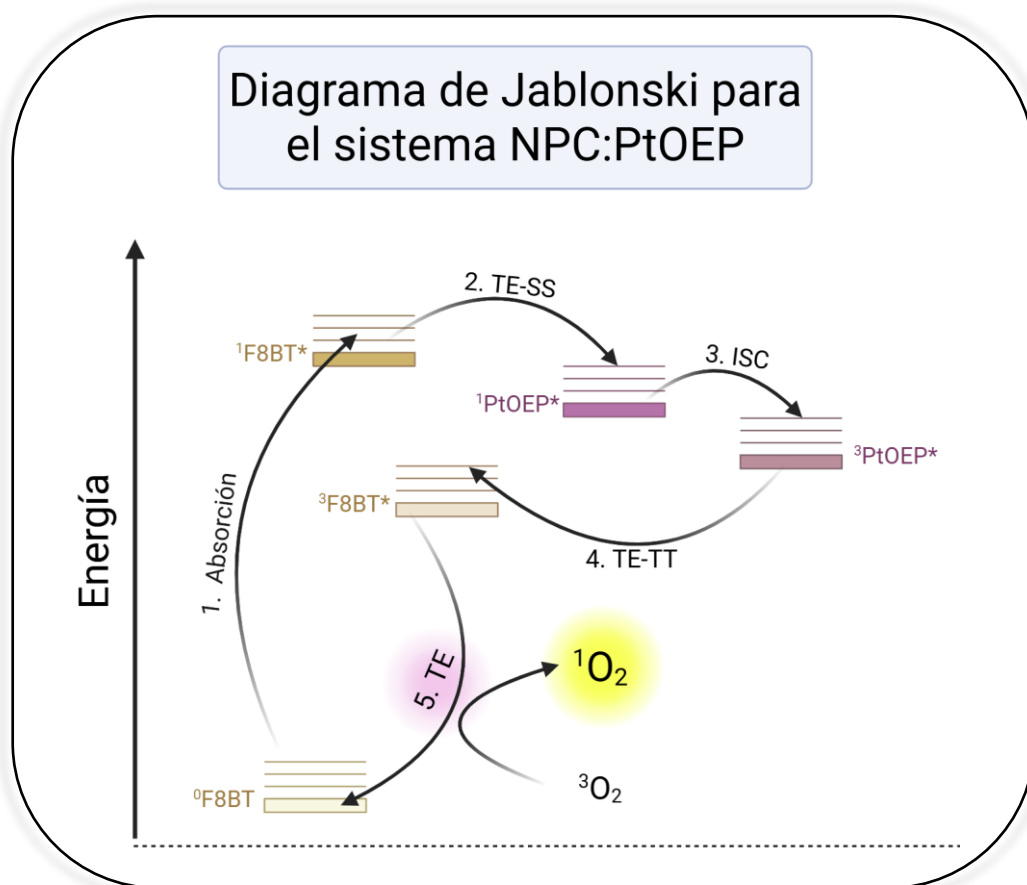


Figura 8. Diagrama de Jablonski para el sistema de NPC de F8BT dopada con PtOEP (NPC:PtOEP)

En investigaciones posteriores, se reportó la elevada eficiencia de estas NPC como PS en PDI de patógenos resistentes a antibióticos.^{93,95}, en la TFD de células cancerígenas^{122,141–145} y como sonosensibilizadores en sonoterapia contra patógenos bacterianos¹⁶⁴.

Cuando la porfirina y el PC son elegidos apropiadamente, se produce una ET amplificada intrapartícula desde el PC hacia la porfirina, debido a que el PC actúa como “antena” captando y canalizando la energía de excitación hacia la porfirina.^{27,124,159,167,168} Este efecto “antena” es un parámetro empírico que determina el grado de excitación amplificada del dopante (aceptor) cuando se excita al PC (donor).^{94,167} Como se mencionó anteriormente los excitones en la matriz del PC difunden rápida y eficientemente dentro de la NPC (homo-ET), permitiendo que la excitación electrónica alcance las inmediaciones del aceptor (independientemente de sus coordenadas iniciales en la NPC) y pueda ser transferida al mismo (hetero-ET). El mecanismo dominante de estos eventos es FRET^{94,169} el cual se

detalló previamente. El efecto antena efectivamente produce un aumento en la tasa de formación del estado excitado de la porfirina (aceptor), que a su vez resulta consecuentemente en un aumento el Φ_{Δ} al que se obtendría excitando a la porfirina directamente.^{27,165,169}

En la figura 9 se esquematiza el efecto “antena” producido en el sistema de NPC:PtOEP. En el panel superior se muestra una cadena del PC F8BT y en amarillo se muestra la estructura de “cuasi-cromoforos” que abarca algunas cadenas poliméricas. Cuando los “cuasi-cromoforos” se excitan, son capaces de realizar el proceso de homo-ET (indicada con una flecha verde) a lo largo de toda la cadena polimérica. Este proceso ocurre también en la NPC pudiendo transportar la energía a lo largo de toda la estructura. En el panel intermedio se muestran todas las especies excitadas que se pueden encontrar en una NPC:PtOEP, las cuales son $^1\text{PtOEP}^*$ en fucsia, $^3\text{PtOEP}^*$ en lila, $^1\text{F8BT}^*$ en amarillo y $^3\text{F8BT}^*$ en naranja. Por último, en el panel inferior se muestra el proceso de transferencia energía desde que se excita el F8BT hasta la producción del $^1\text{O}_2$. En primer lugar, se irradia la NPC:PtOEP con una fuente de luz que tiene un máximo de emisión centrado en 456 nm donde absorbe exclusivamente el PC. Una vez que se pobló el $^1\text{F8BT}^*$ se producen procesos de homo -ET entre distintos excitones a lo largo de la estructura de la partícula. En un segundo paso, se produce un proceso de hetero -ET desde el $^1\text{F8BT}^*$ hacia el $^1\text{PtOEP}^*$. Como se mencionó anteriormente, debido a la presencia del átomo pesado en su estructura, rápidamente se produce un rápido y completo proceso de ISC desde $^1\text{PtOEP}^*$ hasta $^3\text{PtOEP}^*$ (tercer paso). En el sistema de NPC:PtOEP, se produce un paso adicional (paso 4) de TE, que va desde $^3\text{PtOEP}^*$ hacia $^3\text{F8BT}^*$, debido a que éste último estado es de menor energía que el triplete excitado de la porfirina. Por último, es el $^3\text{F8BT}^*$ el encargo de producir $^1\text{O}_2$ mediante un proceso de ET-TT hacia el $^3\text{O}_2$.

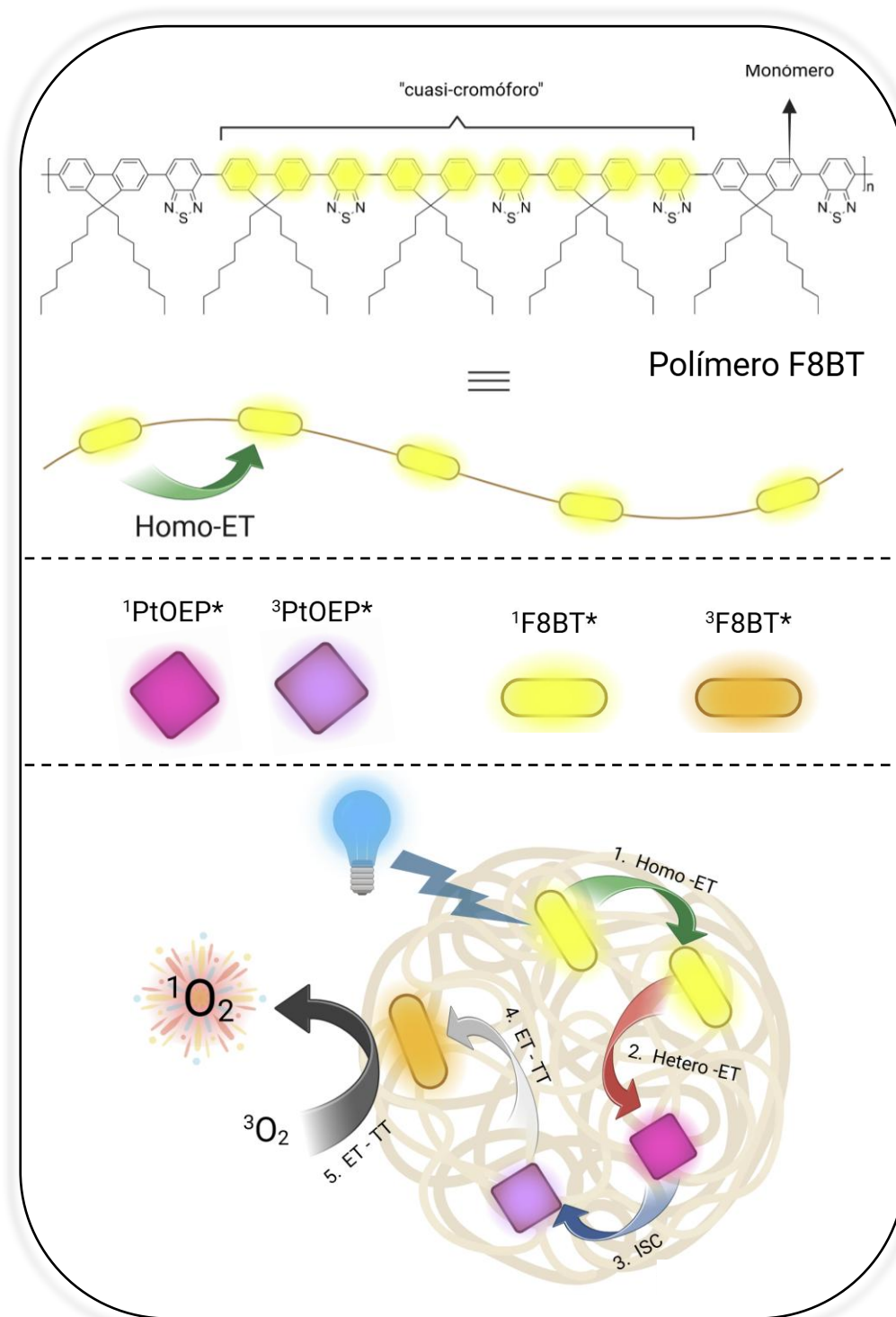


Figura 9. Proceso de ET dentro del sistema de NPC:PtOEP. Panel superior, descripción de las estructuras de “cuasi-cromóforos” dentro del PC F8BT. Panel intermedio: descripción de los estados excitados de todas las especies que participan en el proceso de ET. Panel inferior: proceso de ET desde que se irradia la NPC:PtOEP hasta que se produce el $^1\text{O}_2$.

2.7.2. Agregado de polímeros estabilizante a las NPC

Debido a la naturaleza orgánica de los PCs, las NPCs son esencialmente hidrofóbicas; por ello se suelen incorporar polímeros estabilizantes (PEs) en su estructura, los cuales están constituidos por moléculas anfifílicas que se ubican espontáneamente en la superficie de las NPC. La función principal de los PEs es aumentar la estabilidad coloidal de las suspensiones de NPCs en medios con elevada fuerza iónica, los cuales son condiciones comunes en las aplicaciones biológicas.^{14,60} Además, estos polímeros proveen de grupos funcionales terminales como carboxilo (-COOH) o grupos amino (-NH₂), que pueden emplearse posteriormente como “anclas” para la derivatización superficial de las NPCs. Esta modificación permite la vectorización de las NPCs hacia dianas más específicas como en el caso de marcado celular^{50,129,170}, monitoreo de parámetros de interés biológico^{109,120}, bioimagen y biosensado¹²⁹ y TFD e PDI^{60,86–88,93,94,128,129,167}, entre otras.

Un claro ejemplo de PE es el poli(estereno-co-anhídrido maleico) (PSMA) que está compuesto por bloques alternos de anhídrido maleico (componente hidrofílico cuando se hidroliza) y estireno (componente hidrofóbico). La estructura del PSMA y su reacción de hidrólisis en medio acuoso se muestra en la figura 10. Cuando el PSMA participa como componente estabilizador de las NPCs, el grupo éster maleico de su estructura se hidroliza en presencia de agua generando grupos carboxilos. Estos grupos funcionales, le confieren al PSMA la capacidad de estabilizarse tanto en solventes orgánicos o acuosos.

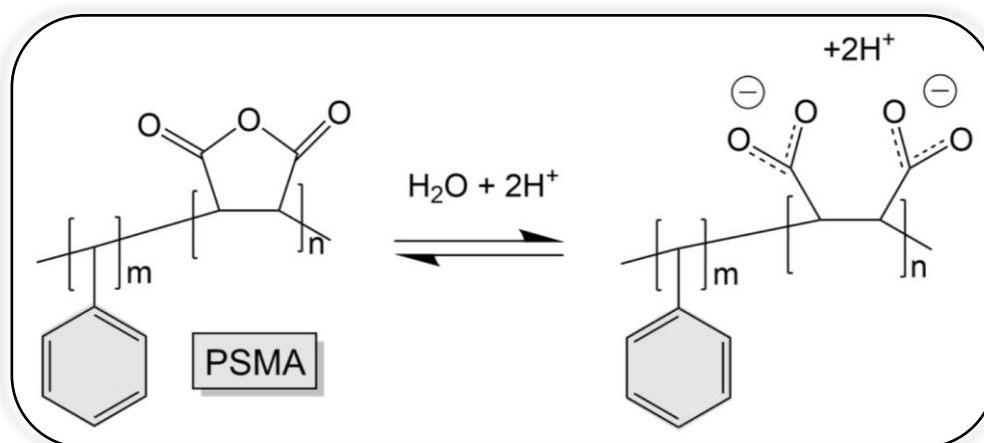


Figura 10. Reacción de hidrólisis del PSMA en entornos acuosos.

En un trabajo publicado por Wu y colaboradores¹⁷¹ se han reportado los beneficios de la utilización de PSMA en la síntesis de NPCs. En dicho trabajo, el PSMA se disolvió junto con el PC F8BT, por lo tanto, quedó incluido en la matriz de las NPCs. Los grupos funcionales -COOH del PSMA quedaron en la superficie de las NPC, disponibles para conjugaciones posteriores. Dentro del grupo de investigación donde se desarrolla esta tesis se ha utilizado ampliamente al PSMA como PE de las NPCs utilizadas en TFD e PDI^{122,141,145,164}.

2.7.3. Modificaciones superficiales de las NPCs

Como se mencionó anteriormente, las NPCs pueden modificarse superficialmente para distintas aplicaciones. En el contexto de esta tesis, dichas modificaciones tienen el objetivo de favorecer su interacción con las diversas dianas biológicas y mejorar, en consecuencia, la eficiencia terapéutica en las fototerapias. La funcionalización puede lograrse de dos maneras^{136,172}:

† Funcionalización directa:

Este es el método más conveniente para adicionar moléculas específicas en la superficie de las NPCs, como por ejemplo anticuerpos o proteínas. Para ello, es necesario que la superficie de las mismas esté coronada con grupos funcionales específicos que permitan la conjugación. Los grupos más comunes son los ya mencionados grupos -COOH y -NH₂ porque permiten una adición mediante la formación de enlaces covalentes amida. Sin embargo, las principales desventajas de esta estrategia de funcionalización radican en sus procesos de síntesis costosos y laboriosos.

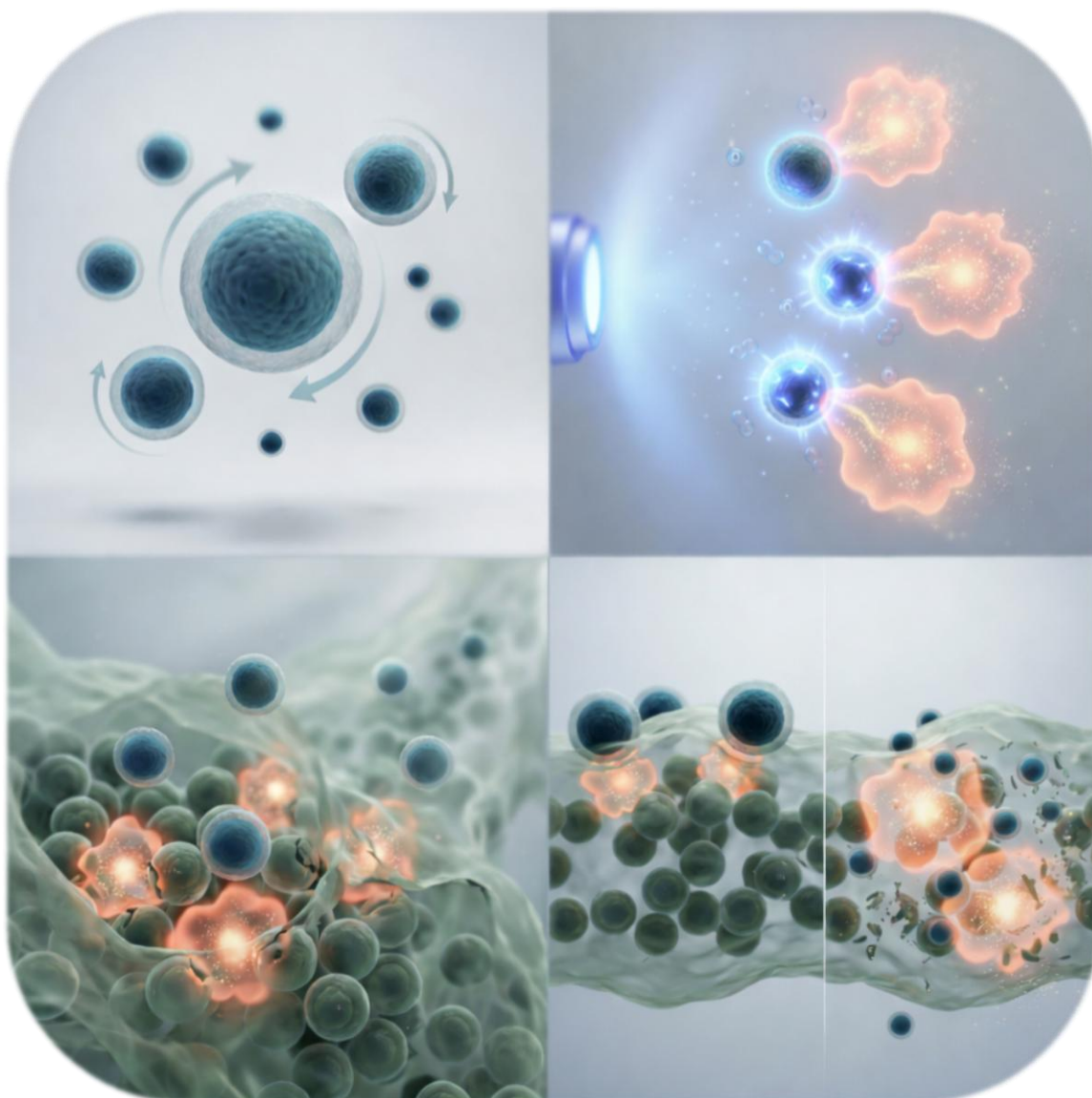
† Funcionalización mediante interacción de afinidad:

Este enfoque involucra la adsorción de moléculas a la superficie de las NPCs mediante un autoensamblado, donde las interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas son la fuerza impulsora de dicha adición. La interacción por afinidad se utiliza principalmente para envolver NPCs desnudas o previamente funcionalizadas con PEs. Si bien esta técnica no es tan específica como la funcionalización directa, es una metodología relativamente sencilla

de realizar y presenta generalmente buenos resultados. Un claro ejemplo es la modificación de la carga superficial de las NPCs con el agregado de una envoltura de algún nanomaterial de carga opuesta .

Capítulo 3:

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para la síntesis de todos los tipos de NPC se utilizó el PC poli[(9,9- di-n-octilfluorenil-2,7-diil)-alt-(benzo[2,1,3]-tiadiazol-4,8-diil)] (F8BT, peso molecular (PM) promedio 7000 g/mol, 99,9 % de pureza, CAS: 210347-52-7, American Dye Source Inc.). Para la síntesis de NPCs con diferentes tamaños se utilizó una solución de NaCl (grado analítico, CAS: 7647-14-5, Cicarelli), buffer de ácido acético/acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, grado analítico, Cicarelli) a pH = 4 y 7, buffer fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, grado analítico, Cicarelli) a pH = 10 y Tritón X-100 (T X-100, grado analítico CAS 12627-38-2, Sigma-Aldrich). Como PE se usó poli(estireno-co-anhídrido maleico) (PSMA, 68 % de estireno, PM promedio 1700 g/mol, pureza del 100 %, CAS: 26762-29-8, SigmaAldrich), el polímero Tetronic T-1107® (T-1107, 70 % p/p de poli(óxido de etileno) (PEO), peso molecular de 15 kg/mol; contenido de PEO del 70 %; donado por el profesor Alejandro Sosnik). Y el polímero Tetronic T-1107® funcionalizado con D-(+)-glucono-1,5-lactona (T-GLU, también donado por Sosnik). Para realizar el dopaje volumétrico de las NPCs se utilizó octaetilporfirina de Platino (II) (PtOEP, PM 727 g/mol, 95 % de pureza, CAS: 31248-39-2, Frontier Scientific) y para el dopaje superficial la Pt(II) meso-tetra(4-carboxifenil) porfirina (Pt-TCPP CAS: 94288-45-6, Frontier Scientific, PM: 983.85 g/mol). Para todos los tipos de NPCs del tipo *core/shell* se utilizó el polímero conjugado poli[(9,9-bis(3'-(N,N,N-dimetil)-N-etilamonio-propil,27-fluoreno-alt-2,7-(9,9-dioctilfluoreno)) dibromuro (PFN, PM promedio 150000 g/mol, CAS: 889672-99-5, Ossila). Se utilizaron óxido de deuterio (D_2O , 99,9% de pureza, Sigma-Aldrich), eosina Y (99%, Sigma-Aldrich) para obtener el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ se utilizó como referencia Rodamina 6G (Fluka, 98,5% de pureza, CAS: 989-38-8) .

Para la disolver los polímeros se utilizó el solvente tetrahidrofurano (THF, grado analítico, CAS: 109-99-9, Sintorgan) recientemente destilado, con excepción del PFN que se disolvió en metanol anhidro (grado analítico, CAS: 67-56-1, Sintorgan). Se empleó agua bidestilada que fue posteriormente purificada por un equipo ELGA PURELAB Classic UV (~18,2 M Ω /cm) que remueve iones, materia orgánica y material particulado (filtro 0,2 mM) para la obtención de agua ultrapura. Para los ensayos de potencial Z se utilizó una celda de capilar delgada (modelo DTS1070, Malvern) y para los ensayos de microscopía electrónica

de transmisión (TEM) se utilizaron grillas de cobre (tamaño 300 mesh) sobre un soporte de formar/carbon (FCF300-CU, Electron Microscopy Sciences).

Para los ensayos de cultivo se utilizó caldo y agar tripteína-soya (TS, Britania), buffer fosfato salino (PBS) a pH = 7,4 (NaCl 84 %, KCl 2 %, Na₂HPO₄ 12 %, KH₂PO₄ 2 % Biopack), D-glucosa (Cicarelli), glicerol (Cicarelli), KI (Biopack), cloramina T (Biopack), ácido acético glacial 99,9 % (Cicarelli), Cristal Violeta (CV, British Drug Houses. standard stains, CAS: 548-62-9), metanol, Azul de tiazolil bromuro de tetrazolio (MTT, Sigma Life Sciences, CAS:298-93-1), dimetilsulfóxido (DMSO, Cicarelli), Sal sódica de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido (resazurina, BLDpharm, CAS: 62758-13-8), calcofluor white (CW, Sigma-Aldrich), reactivo de Bradford (para rango de proteínas de 0,1 a 1,4 mg/mL, Sigma), albúmina sérica humana (HSA Sigma) de 96 % de pureza. Tanto para el diluir PBS como para disolver glucosa se utilizó agua destilada estéril.

Para visualizar los cultivos bacterianos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se utilizó glutaraldehído (Sigma Aldrich) al 2,5 % para fijar las bacterias. Se utilizaron vidrios cubreobjetos (Sail Brand), polietilenimina (PEI) al 0,1 % (Sigma Aldrich) glutaraldehído al 0,5 %. Se prepararon soluciones de etanol (Cicarelli) a distintos porcentajes y de acetona (Sintorgan). Se utilizaron las sales Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ (Cicarelli) para preparar el buffer de lavado (0,2 M).

Para los ensayos en fibroblastos se utilizó el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM, Gibco®) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS, Internegocios, S.A, Buenos Aires, Argentina) y 1% v/v de una solución acuosa de antibióticos (penicilina 104 unidades/mL – estreptomicina 10 mg/mL, Gibco®).

3.2. Métodos

3.2.1. Nanopartículas de polímeros conjugados

3.2.1.1. Composición y nomenclatura de NPC

Todos los tipos de NPCs contienen como elemento principal, y en ocasiones único, el PC F8BT. Cuando se le agregó algún PE, se utilizó PSMA, T-1107 o T-GLU. Para estudiar el efecto de la PDI, todas las NPCs fueron dopadas volumétricamente con la porfirina PtOEP. Por último, para mejorar el Φ_{Δ} de las NPCs, estas se doparon superficialmente con la

porfirina Pt-TCPP. La relación en masa entre PC, PE y porfirina que conforman a las distintas NPCs se estableció de la siguiente manera a menos que se indique lo contrario: la masa del PC F8BT se mantuvo fija en 100 mg/L para todos los tipos de partículas. La concentración de los demás componentes utilizados (PE, porfirina y PC) se reporta como valor porcentual de su masa relativa a la masa del F8BT (% p/p).

Con el objetivo de presentar una clara identificación de las distintas formulaciones de partículas desarrolladas a lo largo de toda la tesis, se estableció un sistema de nomenclatura uniforme basado en la composición de PC, PE, porfirina y concentración de cada uno de ellos. Los detalles de cada formulación de NPCs se presentan en la tabla 1 y la metodología de síntesis junto con la variación de cada uno de sus componentes se detalla en las siguientes secciones. Cabe aclarar que el F8BT es el componente principal de las partículas y, como es común a todas las formulaciones realizadas, se encuentra implícito en la nomenclatura.

Tabla 1. Nomenclatura de las distintas formulaciones de NPC.

<i>Nomenclatura</i>	<i>Componentes de la partícula [% p/p]</i>	<i>Color distintivo</i>
NPC	100 de F8BT	
NPC₅₀	50 de F8BT	
NPC₂₀	10 de F8BT	
NPC:PSMA	100 de F8BT + 20 de PSMA	
NPC:PSMA+PtOEP	100 de F8BT + 20 de PSMA + 10 PtOEP	
NPC:PSMA_n	100 de F8BT + 40, 60, 80, 100, 200, 300 400 o 500 de PSMA	
NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP	100 de F8BT + 500 de PSMA + 10 de PtOEP	
NPC@PFN_n	100 de F8BT + 10–100 de PFN	

NPC:PSMA@PFN	100 de F8BT + 20 de PSMA + 70 de PFN
NPC:PSMA+PtOEP@PFN	100 de F8BT + 500 de PSMA + 10 de PtOEP + 70 de PFN
NPC:T-1107_n	100 de F8BT + 20 o 40 de T-1107
NPC:T-GLU_n	100 de F8BT + 20 o 40 de T-GLU
NPC@Pt-TCPP	100 de F8BT + distintas concentraciones de Pt-TCPP
NPC:PSMA@PFN@Pt- TCPP	100 de F8BT + 20 de PSMA + 70 de PFN + distintas concentraciones de Pt-TCPP

Las concentraciones de 100 % p/p de F8BT, 20 % p/p de PSMA, 10 p/p de PtOEP y 70 % p/p de PFN son consideradas como las “concentraciones estándar” de las NPCs. Por esa razón solamente se indican con subíndice cuando las concentraciones son diferentes a estas.

3.2.1.2. Síntesis de NPCs

Todas las NPCs obtenidas se sintetizaron mediante la misma metodología de síntesis denominada comúnmente como nanoprecipitación o reprecipitación controlada, y que se esquematiza en la figura 11. Primeramente, los componentes que van a formar parte de las NPCs (PC, PE y porfirina cuando corresponde) se disolvieron en 5 mL de THF. Esta solución se denomina “stock de inyección” y se caracteriza porque todos los compuestos presentan una elevada solubilidad en dicho solvente. En un segundo paso, se tomaron 100 µL del stock de inyección y se inyectaron rápidamente en 2,5 mL de agua ultrapura en agitación vigorosa (1500 rpm), este proceso se repitió 6 veces. Luego, el THF se eliminó mediante un rotavapor a 60 °C y 0,07 mPa. Cuando fue necesario eliminar agua para concentrar las partículas, la

temperatura del rotavapor se mantuvo a 80 °C y la presión a 0,07 mPa durante 5 min aproximadamente (según la cantidad de agua a evaporar).

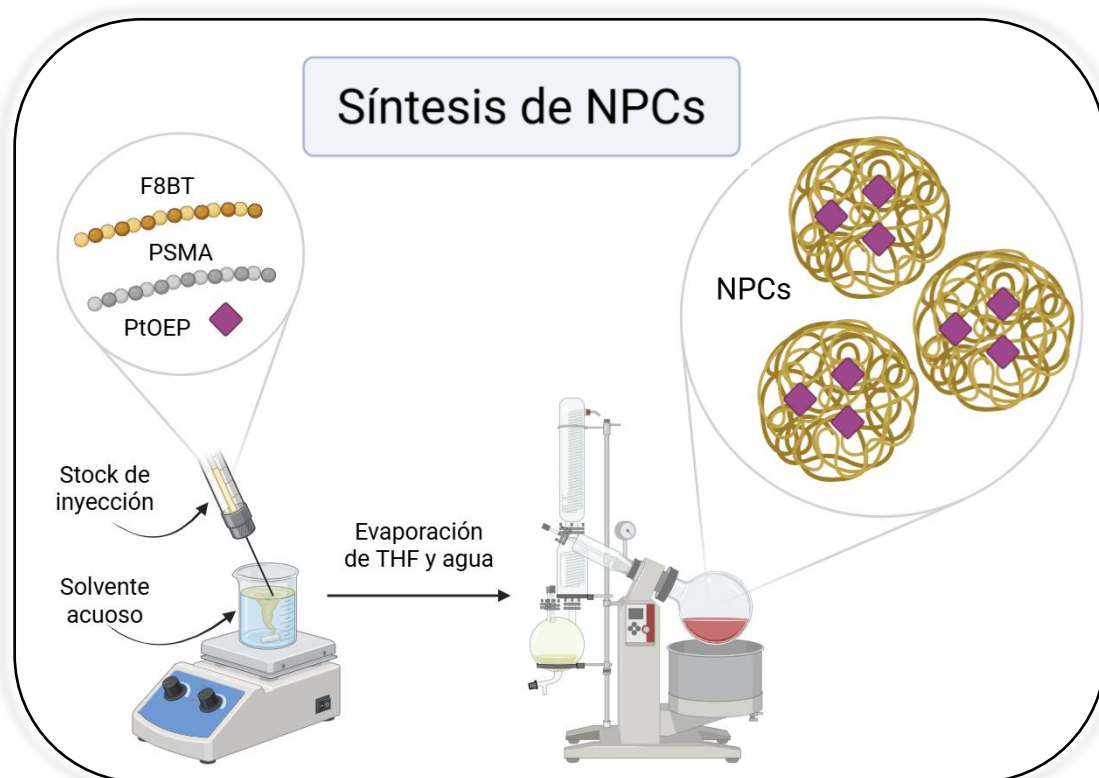


Figura 11. Esquema de síntesis de NPCs. Todas las NPCs se sintetizaron siguiendo el mismo esquema de síntesis y se modificó la presencia y concentración de cada componente según fue necesario. En amarillo se representa el PC F8BT, en gris el PE PSMA y en fucsia la porfirina Pt-TCPP. Los círculos amarillos representan a las NPCs formadas.

3.2.1.3. Síntesis de NPCs, modificación del diámetro

Para la obtención de NPCs de diferentes tamaños se utilizó el mismo método nanoprecipitación previamente descrito, pero realizando las siguientes modificaciones:

Primeramente, la concentración del PC y la composición del medio acuoso donde se realizó la síntesis de las partículas. Se sintetizaron de manera simultánea NPCs compuestas por F8BT con una concentración de 100, 50 y 20 mg/L del mismo (denominadas NPC, NPC₅₀ y NPC₂₀ respectivamente) sobre los siguientes medios acuosos: agua pura a 0 °C, 25 °C y 50 °C; soluciones buffer a pH = 4, 7 y 10; solución acuosa de NaCl (6×10^{-4} M) y solución

acuosa de Tritón X-100 (9×10^{-5} M, T X-100). Es importante aclarar que la concentración micelar crítica (CMC) de Tx-100 está comprendida entre 5×10^{-4} M y 9×10^{-4} M.^{173,174}

En una segunda instancia, se mantuvo fija la concentración de F8BT en 100 mg/L y se modificó la concentración del PE PSMA de la siguiente manera: 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 y 500 % p/p (denominadas como NPC:PSMA_n, donde n = concentración de PSMA).

Para todos los casos, se realizaron 4 réplicas de forma independiente para la síntesis de cada muestra.

3.2.1.4. Síntesis de NPCs del tipo *core/shell*

Con el objetivo de modificar la carga superficial de las partículas, se empleó un segundo PC catiónico denominado PFN. Inicialmente se obtuvieron NPCs siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.1.2. Estas NPCs ahora se consideran como el núcleo (*core*) de las nuevas partículas. Posteriormente se adsorbió el PFN formando una capa (*shell*) en la superficie de las NPCs, dando origen a las NPCs del tipo *core/shell*. El proceso de autoensamblado es impulsado por las fuerzas de atracción electrostáticas entre la NPCs aniónica y la capa catiónica del PC. Para la formación del *shell*, se disolvió el PFN en un pequeño volumen de metanol (50 μ L) para no afectar significativamente la composición del solvente dispersante y en consecuencia no desestabilizar la suspensión coloidal de NPCs, ni modificar sus propiedades fotodinámicas. La solución de PFN se inyectó en una dispersión de NPCs bajo agitación magnética (1500 rpm), como se esquematiza en la figura 12.

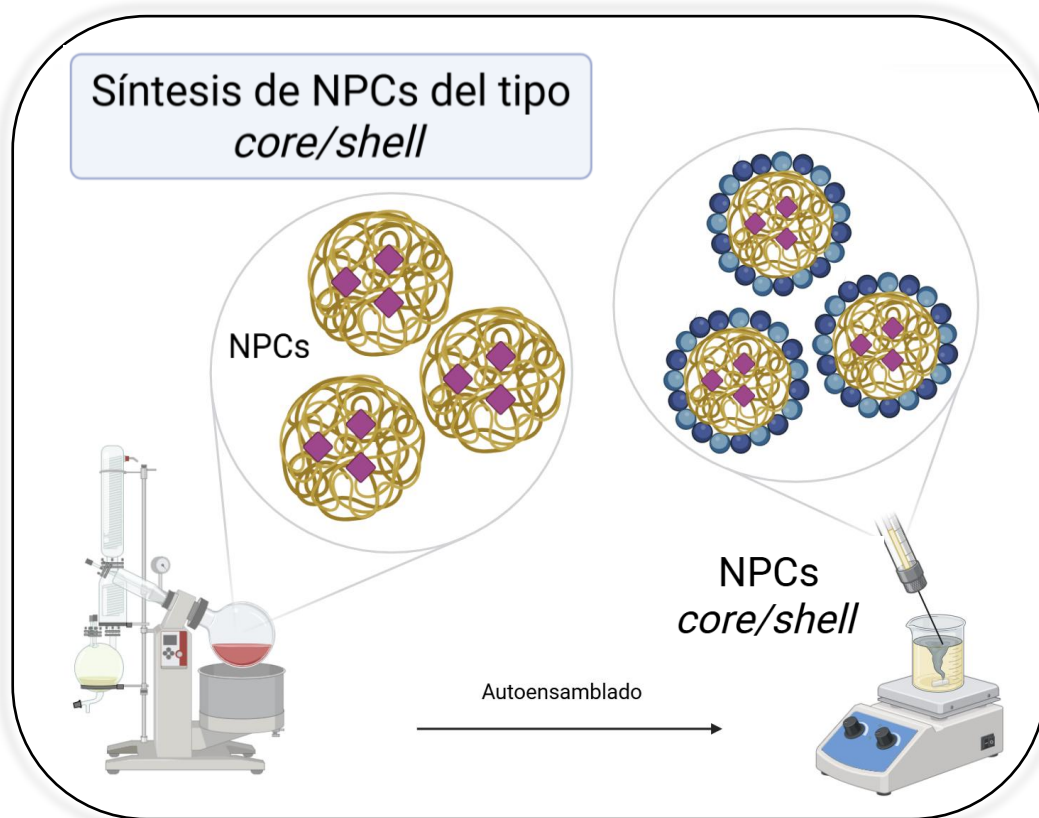


Figura 12. Esquema de síntesis de NPCs del tipo *core/shell*. En amarillo se representa la obtención de NPCs y en azul la formación del *shell* de PFN sobre las NPCs.

Para el desarrollo de este tipo de partículas, inicialmente se obtuvieron NPCs compuestas solamente por F8BT y se testearon distintas concentraciones de PFN (denominadas NPC@PFN_n donde n = concentración de PFN). Luego de definir una adecuada concentración de PFN para la obtención de NPC *core/shell*, en una segunda instancia se obtuvieron NPCs *core/shell* utilizando como núcleo a NPC estabilizado con PSMA (NPC:PSMA@PFN) y se doparon volumétricamente con la porfirina PtOEP (NPC:PSMA+PtOE@PFN) para realizar los ensayos de PDI.

3.2.1.5. Síntesis de NPC con polímeros Tetronics®

Con el objetivo de mejorar la acumulación de partículas sobre células cancerígenas se sintetizaron NPCs con dos PE diferentes: T-1107 y T-GLU (denominadas como NPC:T-

1107_n y NPC:T-GLU_n respectivamente, donde n = concentración del PE). La metodología de síntesis se describe es igual que para el resto de las partículas ya descritas, donde los PE se disolvieron junto con el F8BT en el stock de inyección, al igual que con el PE PSMA. En la figura 13 se muestran las estructuras químicas los PE T-1107, T-1107-GLU.

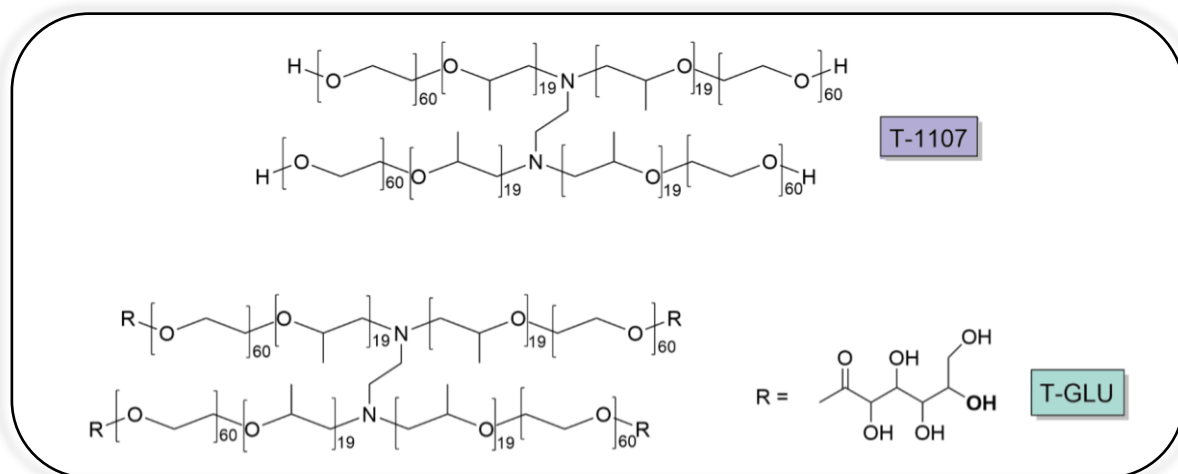


Figura 13. Estructuras químicas de los PE Tetronics®. En color violeta se muestra T-1107 y en verde agua T-GLU.

3.2.1.6. Dopado superficial de NPC con Pt-TCPP

Las NPCs utilizadas para explorar la estrategia de dopado superficial con la porfirina Pt-TCPP, se sintetizaron según el método de nanoprecipitación. Para estos ensayos, se utilizaron dos tipos de NPCs: NPC compuestas solamente por F8BT (NPC@Pt-TCPP) y NPC:PSMA@PFN (denominadas como NPC:PSMA@PFN@Pt-TCPP).

La suspensión de NPCs obtenida fue diluida posteriormente en buffer fosfato (pH = 8). Las concentraciones de NPCs, Pt-TCPP y buffer usado para cada ensayo de adsorción se encuentran detalladas en la tabla 2. En los ensayos 1, 3 y 4 la porfirina se incorporó usando una solución en THF; mientras que en el ensayo n° 2 se incorporó a partir de una mezcla de Pt-TCPP y NPC en buffer. En todos los casos el “volumen de Pt-TCPP agregado” hace referencia al volumen de solución conteniendo porfirina que se agrega a la suspensión de partículas, como se detalla en la figura 14.

Tabla 2: Condiciones para los 4 ensayos de adsorción de la porfirina Pt-TCPP sobre la superficie de las NPC.

<i>N° de ensayo</i>	<i>NPC [mg/L]</i>	<i>Pt-TCPP [M]</i>	<i>Buffer pH = 8 [M]</i>	<i>Volumen de solución conteniendo Pt- TCPP agregada [μL]</i>
1°	2,4	$1,1 \times 10^{-3}$	0,05	0,5
2°	10,0	$1,0 \times 10^{-5}$	0,05	100
3°	2,4	$1,1 \times 10^{-3}$	0,01	1,0
4°	2,4	$2,2 \times 10^{-4}$	0,01	1,0
5°	2,4	$1,1 \times 10^{-3}$	-	1

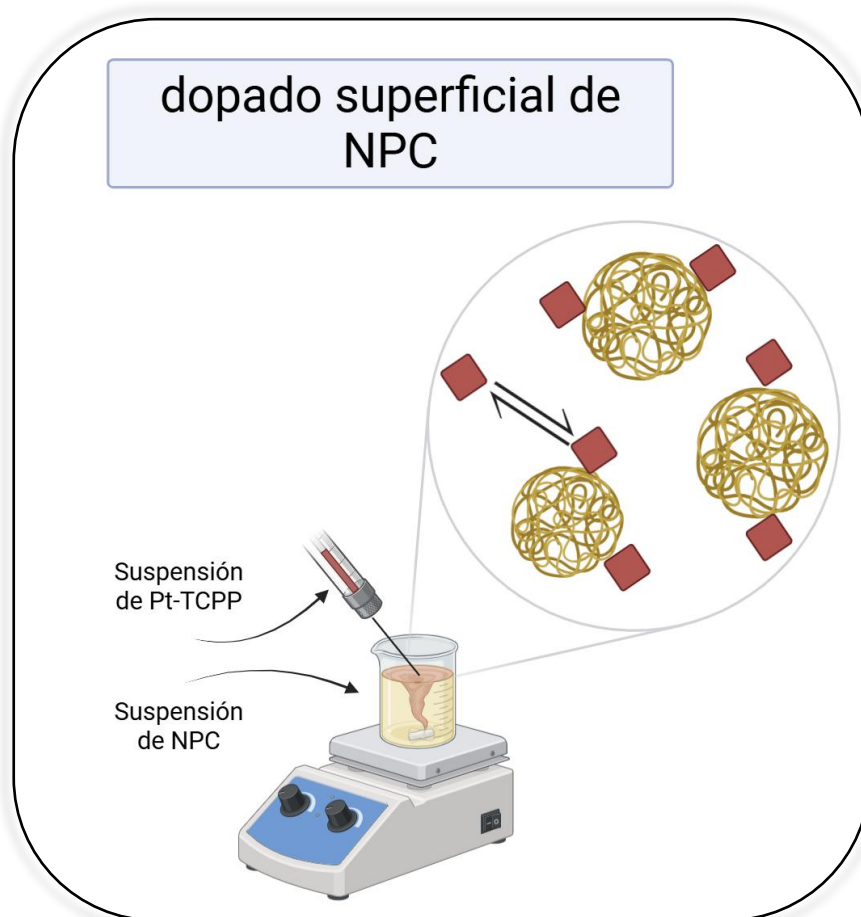


Figura 14. Dopado superficial de Pt-TCPP. En primer lugar, se tiene una suspensión de NPC a la cual se le van agregando pequeños volúmenes de una solución compuesta por Pt-TCPP o NPC@Pt-TCPP. El agregado de dicha solución se realizó en agitación constante. Los hexágonos color rojo representan a Pt-TCPP y los círculos amarillos a las NPC.

3.3. Caracterización de NPCs

3.3.1. Espectroscopía UV-vis

La espectroscopía ultravioleta – visible (UV-vis) es una técnica analítica basada en la interacción de la radiación electromagnética con la materia, y abarca las regiones del ultravioleta (200 – 400 nm), visible (400 – 800 nm) del espectro electromagnético. El fundamento de esta técnica se basa en la absorción de fotones por parte de los distintos componentes de una muestra, lo que provoca transiciones electrónicas entre niveles electrónicos de energía molecular. Los espectros de absorción proporcionan información sobre la estructura molecular y la concentración de las sustancias presentes en una muestra.

Se tomaron espectros de absorción UV-vis, para evaluar la presencia de cada uno de los componentes que conforman a cada una de las partículas. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Agilent 8453 con detector de arreglo de fotodiodos. La fuente de excitación consiste en una cámara con lámpara de tungsteno (G1103-60001) y lámpara de deuterio (2140-0605). Su intervalo espectral de trabajo está comprendido entre 190 nm y 1100 nm. Se utilizaron celdas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

La cuantificación de concentraciones de todos los tipos de NPCs se realizó a partir de esta técnica, utilizando el valor del máximo de absorbancia del F8BT a 456 nm y el coeficiente de extinción molar (ϵ) calculado experimentalmente en estudios previos del grupo de trabajo¹⁷⁵

3.3.2. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica analítica basada en la emisión de radiación electromagnética por parte de una molécula que ha absorbido previamente fotones de suficiente energía. El fundamento de esta técnica se basa en los procesos de excitación electrónica y relajación radiativa.

Se obtuvieron espectros de excitación y emisión en estado estacionario utilizando un espectrofluorómetro Horiba FluoroMax-4 Plus. El equipo utiliza como fuente de excitación una lámpara de arco de xenón sin ozono de 150 W, montada verticalmente y operando en modo continuo. Como detector principal posee un tubo fotomultiplicador (PMT, R928P) con sensibilidad en el rango espectral 190-940 nm. También posee un detector de InGaAs (FM-NIR-IGA1.9) refrigerable con nitrógeno líquido junto con una rejilla NIR (600 líneas mm⁻¹, haz de 1250 nm, K-550). Adicionalmente el equipo posee un fotodiodo de referencia que permite monitorear en tiempo real la intensidad de excitación, posibilitando la adquisición de espectros corregidos instrumentalmente. Se trabajó con celdas de cuarzo, y la apertura (rendija) de los monocromadores, la posición fija o rango espectral de excitación y de emisión se configuró de acuerdo a cada una de las muestras estudiadas.

Se tomaron espectros de emisión y excitación, cuando se indica, de los distintos componentes de las NPCs: F8BT, PFN, PtOEP y Pt-TCPP. Para tomar los espectros de emisión (o excitación) siempre se tomó como longitud de onda de excitación (λ_{exc}) (o

emisión λ_{exc}) al valor donde se detecta el máximo de absorción (o emisión). A menos que se indique lo contrario, para tomar espectros de emisión se utilizaron ambos slits (emisión y excitación) con paso espectral de 1 nm y señal S1c y para tomar los espectros de excitación se utilizaron slits de paso espectral de 1 y 2 nm para excitación y emisión respectivamente y señal S1/R1c.

3.3.3. Dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica óptica utilizada para determinar la distribución de diámetros hidrodinámicos (D_H) de partículas suspendidas en un fluido. Su fundamento se basa en la interacción de la radiación láser monocromática con partículas en movimiento browniano. Esta técnica determina el coeficiente de difusión traslacional de las partículas que están dispersas en solución mediante la cuantificación dinámica de las fluctuaciones en la luz dispersada. Esta información, es luego convertida mediante un algoritmo matemático en distribuciones de D_H de partículas.

Se utilizó un equipo marca Malvern modelo 4700 equipado con un láser de longitud de onda 488 nm. Las medidas se realizaron con un ángulo de dispersión de 90 °C, una temperatura de 25 °C y un tiempo de estabilización de muestra de 120 segundos y se utilizó una suspensión de 10 mg/L de nanopartículas en agua ultrapura a menos que se indique lo contrario. Los resultados se analizaron con el software del equipo para obtener la distribución de D_H y el índice de polidispersidad (I Poly). Dicho software, realiza un ajuste multiexponencial (CONTIN) de las curvas de correlación obtenidas para adquirir la distribución de tamaños de partículas por intensidad, volumen y número. En esta tesis se reportan solo los resultados por número. En todos los casos, se midió el D_H de tres réplicas independientes y se calculó la media o diámetro hidrodinámico promedio ($\overline{D_H}$) y la desviación estándar (SD).

3.3.4. Potencial zeta

El potencial Zeta (ζ) es una técnica que describe el potencial eléctrico en la interfase entre una partícula y el medio líquido en el que está suspendida. El signo y la magnitud de ζ están directamente relacionados con la carga superficial, lo cual constituye un parámetro

fundamental para evaluar la estabilidad coloidal y las interacciones electrostáticas en sistemas nanoparticulados.

Para medir el ζ de las NPC:PSMA, NPC:PSMA@PFN, NPC:T-1107₂₀ Y NPC:T-GLU₂₀ se utilizó el equipo de dispersión dinámica de luz Zetasizer ZS90, Malvern en una colaboración realizada con la Dra. Virginia Aissa del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Córdoba UNITEFA-CONICET. Para la medición se utilizó una suspensión de partículas de una concentración de 6 mg/L aproximadamente, la cual se colocó en una celda capilar plegada (Malvern). El equipo fue seteado para que mida 3 veces la misma muestra y arroje como resultado el promedio de dichas mediciones; a su vez cada muestra se hizo por triplicado. A partir de cada réplica y las 3 mediciones realizadas se calculó un promedio y SD para cada grupo de trabajo.

Para el resto de las medidas de ζ se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz Zetasizer Advance Series (Malvern Panalytical Zetasizer). Para la medición se utilizó una suspensión de partículas de una concentración de 10 mg/L, la cual se colocó en una celda capilar plegada. El equipo fue seteado para que mida 3 veces la misma muestra y arroje como resultado el promedio de dichas mediciones; a su vez cada muestra se hizo por triplicado. A partir de cada réplica y las 3 mediciones realizadas se calculó un promedio y SD para cada grupo de trabajo.

3.3.5. Imágenes de TEM de partículas

TEM es una técnica de caracterización que utiliza un haz de electrones de alta energía para obtener imágenes de alta resolución. El fundamento de esta técnica se basa en la interacción de los electrones irradiados a través de una muestra ultrafina con los átomos del material. Debido a la longitud de onda extremadamente corta de los electrones acelerados, TEM alcanza una resolución espacial mucho mayor que la de los microscopios ópticos convencionales.

Se tomaron imágenes de TEM solamente para NPC:PSMA+PtOEP@PFN y NPC:PSMA₅₀₀. La preparación de las muestras fue diferente para los dos tipos de partículas: para el caso de NPC:PSMA+PtOEP@PFN la muestra contenía no solo nanopartículas si no también bacterias y la descripción del ensayo se encuentra más adelante en la sección 3.4.2.3.

La preparación de NPC:PSMA₅₀₀ consistió en hacer una solución de 2 mg/L y se colocaron 50 μ L en forma de gota sobre la superficie de un cuadrado de parafilm, inmediatamente se colocó una grilla TEM sobre la superficie de la gota y se dejó incubando durante 5 minutos. Luego se retiró la grilla y el exceso de líquido se eliminó con un papel secante. Posteriormente se coloraron 50 μ L agua ultrapura sobre el cuadrado de Parafilm y se depositó la grilla, la cual se dejó incubar por 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, se retiró la grilla y se secó con papel secante. Por último, se dejó secar la grilla al aire. La preparación de todas las muestras y su visualización se adaptó del protocolo publicado por Kirov y colaboradores¹⁷⁶, la energía del haz de electrones utilizado fue de 100 kV y se tomaron imágenes a distintas magnificaciones.

Para determinar el tamaño de los dos tipos de partículas, se utilizó el software ImageJ, tomando como referencia de calibración la barra de escala de cada imagen. Se trazaron dos rectas perpendiculares para obtener 2 medidas independientes del diámetro de cada partícula (esto mejora la estimación del diámetro representativo para partículas no perfectamente esféricas). Se analizaron 10 imágenes por muestra (dos de cada escala). A partir de la distribución de diámetros obtenidos, se realizó un ajuste con una función gaussiana y se obtuvieron los valores de promedio y SD.

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

El Φ_Δ cuantifica la eficiencia fotofísica del fotosensibilizador para la producción de $^1\text{O}_2$. Este parámetro representa la probabilidad de que un fotón absorbido produzca la formación de $^1\text{O}_2$. Se determinó el Φ_Δ producido por NPC:PSMA+PtOEP@PFN mediante el monitoreo de la fosforescencia característica del $^1\text{O}_2$ centrada en ~ 1270 nm. Este enfoque permite la detección directa del $^1\text{O}_2$ y se considera uno de los métodos más confiables para la determinación de Φ_Δ , especialmente por la ausencia de sondas o atrapadores donde la modificación espectroscópica de esos compuestos se relaciona con la producción de $^1\text{O}_2$. Estos experimentos se hicieron en colaboración con el Dr. Emmanuel Odella, miembro del grupo de investigación. Las mediciones de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ en estado estacionario se llevaron a cabo utilizando un detector de InGaAs refrigerado por nitrógeno líquido (FM-NIR-IGA1.9) y una red de difracción optimizada para NIR (600 líneas mm^{-1} , blaze de 1250 nm, K-550), ambos incorporados en un espectrofluorómetro Horiba FluoroMax-4 Plus. Los

espectros de emisión de NIR se registraron utilizando rendijas de excitación y emisión de 30 nm. La intensidad total de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ para cada muestra se calculó integrando la banda de emisión centrada en ~ 1270 nm. Las señales de fondo (obtenidas de experimentos idénticos, pero en soluciones saturadas de N_2) se restaron antes de la integración de la emisión. El Φ_Δ se calculó comparando las intensidades de fosforescencia integradas producidas por nanopartículas y eosina Y ($\Phi_\Delta = 0,58$ en D_2O)¹⁷⁷. La absorbancia de las nanopartículas y la eosina Y se igualaron a la longitud de onda de excitación de 486 nm. Todos los experimentos se realizaron en D_2O a temperatura ambiente.

3.3.7. Rendimiento cuántico de fluorescencia de NPC y NPC-CS

Para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se sintetizaron NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN, pero sin PtOEP. Se aplicó el método comparativo¹³⁷ utilizando rodamina 6G como referencia ($\phi_F = 0,96$ en agua¹⁷⁸). Se igualaron los valores de absorbancia a la longitud de onda de excitación (486 nm) para las 3 muestras (NPC:PSMA, NPC:PSMA@PFN y rodamina 6G) y se tomaron espectros de emisión en exactamente las mismas condiciones (idénticos parámetros instrumentales). Los espectros de emisión medidos en longitud de onda (λ) se transformaron para expresar las abscisas en número de onda ($\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$). Para esto, la intensidad del espectro expresado en número de onda (I) se calculó utilizando la siguiente fórmula para cada punto (¹³⁷ página 54):

$$I = \lambda^2 I(\lambda) \quad (2)$$

Donde:

$I(\lambda)$ = intensidad del espectro de emisión medido en longitud de onda

Luego se integró el área bajo el espectro para cada muestra y el resultado de la integral es lo que se tomó como valor de intensidad integrada (I_i). Los ϕ_F se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\phi_F = \phi_{F,R} \frac{I_i}{I_{iR}} \frac{Abs_R}{Abs} \frac{\eta^2}{\eta_R^2} \quad (3)$$

Donde:

ϕ_F = rendimiento cuántico de fluorescencia de la muestra

$\phi_{F,R}$ = rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia

I_i = intensidad integrada de fluorescencia de la muestra

I_R = intensidad integrada de fluorescencia de la referencia

Abs = absorbancia de la muestra

Abs_R = absorbancia de la referencia

η = índice de refracción del medio donde se encuentra la muestra

η_R = índice de refracción del medio donde se encuentra la referencia

3.4. Ensayos biológicos

3.4.1. Mantenimiento de cepas

Se utilizó una cepa de la bacteria MRSA 773 obtenida a partir de un aislamiento clínico adquirido previamente en el grupo de investigación. El cultivo bacteriano se almacenó en caldo TS con 10 % de glicerol a - 40 °C. Para su utilización, el inóculo bacteriano se descongeló rápidamente y cultivó en condiciones aeróbicas en caldo TS en una estufa con agitación (100 revoluciones por minuto (rpm)) a 37 °C durante 24 hs. Posteriormente, se realizó un repique en agar TS y se incubó a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizó un nuevo repique en agar TS y se dejó incubando a 37 °C durante 24 h. Luego se seleccionó una colonia aislada y se realizó un repique en una segunda placa de agar TS y se dejó incubando a 37 °C durante 24 h. Este segundo repique en placa de agar se realizó con la intención de obtener un cultivo puro a partir clones de una misma colonia. Todos los ensayos biológicos se realizaron tomando colonias aisladas de la segunda placa de agar.

3.4.2. Ensayos de adsorción

La interacción entre MRSA y partículas resulta fundamental para optimizar la eficiencia del proceso de PDI. La caracterización de esta interacción permite comprender cómo ciertas características de las nanopartículas (como su D_H y carga superficial) influyen en la interacción con las superficies bacterianas y en consecuencia afectan la eficiencia de la PDI. Para estudiar dicha interacción realizaron medidas de citometría de flujo, ζ y, por último, se tomaron imágenes de TEM de una suspensión bacteriana + NPC:PSMA+PtOEP@PFN.

3.4.2.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite la cuantificación y caracterización multiparamétrica de células individuales, a medida que estas atraviesan un haz de luz. Su fundamento se basa en la dispersión y emisión de luz cuando las células interceptan dicho haz. Los detectores ópticos del equipo registran en simultaneo múltiples señales: i) la dispersión frontal (FSC), relacionada con el tamaño celular; ii) la dispersión lateral (SSC), asociada con la complejidad interna o granularidad (lo cual es muy útil cuando se pretende diferenciar distintas poblaciones celulares) y iii) la emisión de fluorescencia propia de cada célula o marcadas previamente con un fluoróforo.

Para realizar estas mediciones, se adaptó el protocolo de los trabajos de Martinez y colaboradores^{93,164}. Se seleccionó una colonia de un cultivo puro y se resuspendió en 5 mL de caldo TS que se incubó toda la noche a 37 °C en agitación (100 rpm). Se tomó dicho cultivo y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min (microcentrífuga para eppendorf GELEC 134D). Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado del precipitado (donde se encuentran las células) con glucosa al 10 % peso en volumen (% p/v, es decir 10 g de glucosa en un volumen final de 100 mL de agua), previamente esterilizada usando un filtro de 0,22 μm estéril; y se volvió a centrifugar en iguales condiciones, este paso se repitió 3 veces. Por último, se resuspendió el precipitado en glucosa al 20 % p/v y se ajustó la carga bacteriana midiendo densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) = 0,2 y posteriormente se diluyó a la mitad con una suspensión de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN de 20 mg/L y se incubó por 1 y 24 h a 37°C en agitación y en oscuridad. Las concentraciones finales usadas de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN fueron de 5 y 10 mg/L.

Para estudiar la interacción entre NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-GLU₂₀ y células tumorales, se utilizó la línea celular de GBM T98G (ATCC® CRL-1690™). Esta línea fue derivada de un paciente masculino de 61 años con glioblastoma. Los ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. Luis Ibarra y la Lic. Lucía Beagué, miembros del grupo de investigación. Las células se cultivaron durante 24 hs con medio de cultivo DMEM suplementado. Posteriormente se utilizaron 10⁴ células/mL y se incubaron con 10 mg/L de NPC:PSMA, NPC:T-1107₂₀ o NPC:T-GLU₂₀ durante 30 minutos, 1 y 4 h. La incubación de células y partículas se realizó en dos medios de cultivo diferentes: DMEM y en PBS.

Las mediciones de todas las muestras se realizaron en un citómetro de flujo de mesada (Guava EasyCyte 6-2 L, Merck Millipore). Además de número, tamaño y complejidad celular, se monitoreó la fluorescencia en el “canal verde” (green B, excitación = 488 nm y emisión = 510-540 nm). Los resultados obtenidos se expresaron como histogramas de intensidad de emisión (canal verde) de células individuales y se obtuvo la media geométrica de los mismos. Se hicieron 3 réplicas de cada muestra y se obtuvo media y SD.

3.4.2.2. Mediciones de ζ de MRSA incubado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA:PtOEP@PFN

Para las medidas de ζ , la preparación de la muestra fue igual que para citometría de flujo (sección 3.4.2.1.) excepto que se utilizaron suspensiones de concentración de 5 mg/L para NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN y tiempos de incubación de 1 h. El equipo utilizado se encuentra descrito en la sección 3.3.4.1. Se midió el ζ las siguientes muestras: control de bacterias, bacterias + NPC:PSMA+PtOEP y bacterias + NPC:PSMA+PtOEP@PFN. El equipo fue programado para que mida 3 veces la misma muestra y arroje como resultado el promedio de dichas mediciones + SD; a su vez cada muestra se midió por triplicado.

3.4.2.3. Imágenes de TEM

Para completar los ensayos que evalúan la interacción de NPC:PSMA+PtOEP@PFN con bacterias, se tomaron imágenes de TEM. Dichas imágenes permitieron confirmar que las NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Inicialmente, se seleccionó una colonia de un cultivo puro y se resuspendió en 5 mL de caldo TS incubado durante toda la noche a 37 °C en agitación (100 rpm). Se tomó dicho cultivo y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado del precipitado con una solución de glucosa al 10 % p/v estéril para centrifugarlas nuevamente en iguales condiciones, este paso de lavado se realizó 3 veces. Por último, se ajustó la concentración de bacterias ($OD_{600} = 0,2$) en una solución de glucosa al 20 % p/v y posteriormente se diluyó a la mitad con una suspensión de 20 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Se incubó durante 30 min a 37 °C a 100 rpm en oscuridad. La concentración final de NPC:PSMA+PtOEP@PFN es de 10 mg/L, el doble que la máxima utilizada para los tratamientos de PDI. De esta forma, lo que se pretende es tener una cantidad suficiente de partículas para que pueda apreciarse su adhesión en la mayoría de las bacterias presentes en el medio. Se tomaron 50 μ L de la suspensión de bacterias + NPC:PSMA+PtOEP@PFN y se colocó en forma de gota sobre la superficie de un cuadrado de parafilm, inmediatamente se colocó una grilla TEM sobre la superficie de la gota y se dejó incubando durante 10 min. Luego se retiró la grilla y el exceso de líquido se eliminó con un papel secante. Posteriormente se coloraron 50 μ L de solución de glutaraldehído al 0,5 % (0,5 g de glutaraldehído en 100 mL de glucosa al 10 %), se dejó incubar durante 2 min, y luego se secó el exceso de líquido con papel secante. Se colocó 1 mL/ependorf de solución acuosa de glucosa de 10 % p/v en 3 tubos eppendorf, y se sumergió la grilla 10 veces en cada tubo con el objetivo de lavar el material no adherido a la misma, secándola antes de sumergirla en el siguiente tubo. Por último, se dejó secar la grilla al aire y se realizó la visualización a 100 kV tomando imágenes a distintas magnificaciones.

A partir de las imágenes de TEM se determinó el diámetro de las bacterias de la cepa de MRSA utilizada en esta tesis. Dicha determinación se realizó de la misma manera que para la determinación del diámetro de NPC:PSMA+PtOEP@PFN descrito en la sección 3.3.5. Una vez obtenidos los diámetros de NPC:PSMA+PtOEP@PFN y MRSA se determinó el número de partículas necesario para formar una monocapa sobre la superficie de una bacteria de MRSA.

Como esta bacteria tiene una estructura esférica, la superficie total de una bacteria es:

$$S_c = 4\pi R^2 \quad (4)$$

Donde:

S_c = superficie de la bacteria

R = radio de la bacteria

Suponiendo que $r \ll R$, donde r es el radio de las NPC:PSMA+PtOEP@PFN, el número máximo de partículas (N_c) que pueden acomodarse sobre la superficie de la bacteria puede obtenerse considerando un empaquetamiento bidimensional de círculos de superficie:

$$S_{np} = \pi r^2 \quad (5)$$

Sobre la superficie S_c :

$$N_c = \frac{S_c}{S_{np}} \eta \quad (6)$$

Donde:

η = densidad de empaquetamiento

la mayor densidad de empaquetamiento posible es el empaquetamiento hexagonal:

$$\eta = \frac{\pi\sqrt{3}}{6} \quad (7)$$

Lo que conduce a:

$$N_c = \frac{2\pi R^2}{\sqrt{3}r^2} \quad (8)$$

Por otro lado, se estimó de forma muy general la concentración molar (M) de una suspensión de 10 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN (que es la concentración utilizada en este ensayo). Para realizar este cálculo se consideró solamente la masa de F8BT y no se tuvo en cuenta el resto de los componentes que conforman a la partícula. El desarrollo de esta fórmula se ha descrito en publicaciones previas del grupo de trabajo^{27,167}:

$$[NPC] = \frac{6C_{NP}}{\rho\pi N} \left(\frac{1}{\mu(\mu^2 + 3\sigma^2)} \right) \quad (9)$$

Donde:

C_{NP} = concentración de partículas en g/L

ρ = densidad del F8BT que es

N = número de Avogadro

σ = ancho de distribución

μ = diámetro de la partícula

3.5. Inactivación fotodinámica microbiana

Los ensayos de PDI se realizaron utilizando un fotoirradiador con lámparas LED de emisión centrada a 456 nm aproximadamente. La irradiancia de la muestra fue medida en el plano de la muestra, y se mantuvo constante a 16 mW/cm². A menos que se indique lo contrario la dosis de luz total usada para ensayos de PDI sobre cultivos planctónicos fue de 28, 8 J/cm² y sobre biofilms fue 57,6 J/cm².

En la figura 15 se muestra un esquema de la fuente de irradiación utilizada para los ensayos de PDI sobre cultivos planctónicos y biofilms.

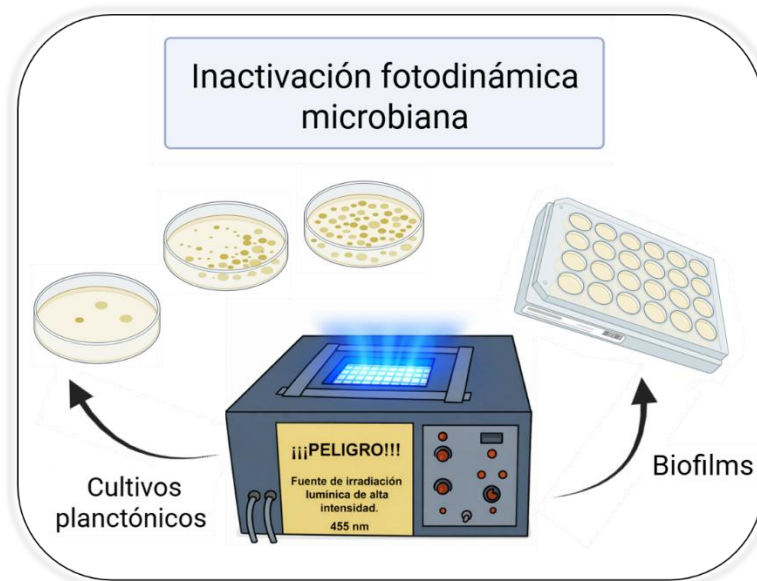


Figura 15. Esquema de panel de lámparas LED. Utilizado para PDI de biofilms y cultivos planctónicos.

3.5.1. PDI sobre cultivos planctónicos

La preparación de cultivos planctónicos para realizar ensayos de PDI se realizó de la siguiente manera: primeramente, se tomó una colonia aislada de un cultivo puro y se incubó en 5 mL de caldo TS durante 18 h a 37 °C con agitación (100 rpm). Posteriormente, se tomaron 100 µL de esta suspensión y se añadieron a 2 mL de una solución de caldo TS, y la mezcla se incubó con agitación a 37 °C hasta alcanzar una $OD_{600} = 0,2$. Esto permite obtener una población metabólicamente activa en la fase de crecimiento logarítmico. Una vez alcanzada la carga bacteriana deseada, se realizó una dilución 1:1000 en una solución de glucosa al 20% p/v (inóculo). Para los ensayos de PDI donde se realizó recuento de colonias, NPC:PSMA+PtOEP, NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN se diluyeron en agua ultrapura estéril para alcanzar concentraciones de 10 y 2 mg/L. En una placa de 48 pocillos, se añadieron 250 µL de inóculo a cada pocillo, seguidos de 250 µL de las dispersiones de nanopartículas. Las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C con agitación. Tras la dilución con el inóculo, las concentraciones finales de nanopartículas fueron de 5 y 1 mg/L, mientras que la concentración final del inóculo fue de 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Cuando se realizaron curvas de crecimiento post PDI, la concentración final del inóculo fue de $OD_{600} = 0,2$, para poder seguir el

experimento por espectrofotometría UV-Vis. Las concentraciones finales de partículas para este ensayo también fueron de 5 y 1 mg/L.

3.5.2. Ensayos de PDI sobre biofilms

Para los ensayos de PDI se utilizaron biofilms maduros de 96 hs de crecimiento, dado que esta etapa representa un estado irreversible del desarrollo del biofilm y reviste una mayor relevancia clínica en el contexto del tratamiento de infecciones. Primeramente, se tomó una colonia aislada de un cultivo puro y se incubó en 5 mL de caldo TS durante 18 h. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de esta suspensión a 2 mL de caldo TS y se cultivó a 37 °C con agitación (100 rpm) hasta alcanzar una $OD_{600} = 0,2$; lo que representa una población metabólicamente activa en la fase de crecimiento logarítmico. A continuación, se diluyó diez veces la suspensión bacteriana en caldo TS suplementado con glucosa y NaCl al 1 % p/v (1 g de glucosa o NaCl en 100 mL de caldo TS). Las biopelículas se cultivaron sobre vidrios de 0,5 x 0,5 mm, los cuales previamente se limpiaron por sonicación (5 min) sucesivamente con acetona, etanol y agua y se esterilizaron previo al cultivo con una lámpara de UV. Los vidrios se coloraron en una placa de 48 pocillos y se añadieron 500 μ L/pocillo de la suspensión bacteriana. Posteriormente, se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo antiguo y se añadieron 500 μ L/pocillo de medio de cultivo suplementado fresco. Este proceso se repitió a las 48 y 72 horas para obtener finalmente una biopelícula madura de 96 horas. Para los ensayos de PDI, se retiró el medio de cultivo y los biofilms formados fueron lavados tres veces con solución de glucosa al 10 %. A continuación, se añadieron 250 μ L de glucosa al 20 % y 250 μ L de suspensión de partículas (40 o 20 mg/L). Las partículas fueron incubadas con las bacterias durante 30 min a 37 °C en oscuridad con agitación (100 rpm). Transcurrido el tiempo, las muestras se irradiaron durante 1 h con un fotoirradiador. La concentración final de partículas fue de 20 y 10 mg/L según el ensayo realizado.

3.5.3. Efecto post fotodinámico sobre cultivos planctónicos

3.5.3.1. Recuento de colonias

Para analizar el efecto citotóxico producto de la PDI sobre cultivos planctónicos se realizó un recuento de colonias para cuantificar la disminución de la carga bacteriana en

respuesta a los distintos tratamientos. Luego de la irradiación de la muestra, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 3 alícuotas de 10 μ L de cada dilución en una placa de agar TS. Se incubaron durante 18-24 h y se realizó recuento de colonias. Los datos se representaron como log UFC/mL vs tiempo de irradiación para determinar cuántos logaritmos disminuyeron a causa del tratamiento de PDI.

3.5.3.2. Curva de crecimiento post irradiación

Este ensayo se realizó solamente para NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN debido a que fueron los tratamientos que mostraron un efecto de fotodinámico significativo. La curva de crecimiento post irradiación es una técnica que consistió en evaluar el crecimiento de las bacterias que sobrevivieron al proceso de PDI. Para ello, luego de 30 min de irradiación se midió la OD₆₀₀ de todas las muestras, a intervalos de 1h, durante un total de 8 h. Los resultados se expresaron como OD₆₀₀ vs tiempo. Para cada muestra se realizaron tres réplicas independientes y se calculó media y SD.

3.5.3.3. Microscopía electrónica de barrido para cultivos planctónicos

Con el objetivo de conocer el daño inducido sobre la bacteria a nivel estructural causado por la fototerapia se tomaron imágenes de SEM (SEM Carl Zeiss EVO MA 10 con EDAX) de una muestra de cultivo planctónico previamente tratada (ver sección 3.5.1.). Las muestras fueron pretratadas como se describe a continuación:

Preparación de los vidrios soportes de la muestra

Se tomó un cubreobjeto comercial y se cortó para obtener piezas de vidrio de 5 x 5 mm, tamaño requerido para el portamuestras del equipo de secado por punto supercrítico. Luego los vidrios se limpiaron mediante sonicación con acetona por 10 min y se secaron con papel adsorbente. Para favorecer la adherencia del cultivo planctónico a la superficie del vidrio, los vidrios se sumergieron en una solución de PEI al 0,1 % p/v (0,1 g de PEI en 100 mL finales de buffer fosfato 0,1 M) durante toda la noche. Una vez evaporada la solución de PEI, los vidrios se lavaron con agua ultra pura y se secaron en estufa.

Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se adaptó el protocolo del trabajo de Rimal y colaboradores¹⁷⁹. Luego del tratamiento de PDI la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en buffer fosfato 0,02 M a pH 7,2 y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Esta etapa de lavado se realizó 3 veces. El precipitado del último lavado se resuspendió en una solución fría (4°C) de glutaraldehído al 2,5 % p/v (2,5 g de glutaraldehído en 100 mL finales de buffer fosfato 0,1 M), se colocaron 50 µL de esta solución sobre el vidrio previamente recubierto con PEI y se dejó incubar por 30 min. Por último, se lavaron suavemente dos veces los vidrios con buffer fosfato 0,02 M.

Una vez fijada la muestra sobre el vidrio se procedió a realizar las etapas de deshidratación de la muestra, donde se aseguró no dejar el vidrio expuesto al aire en ningún momento. Se utilizaron soluciones agua/etanol de concentración creciente de etanol: 30, 50, 70, 90 y 100 %, las cuales se pusieron en contacto con las muestras durante 5 min cada una. Luego se pasaron las muestras por una solución que contenía 50 % de etanol y 50 % de acetona durante 5 min y finalmente las muestras se guardaron en un tubo que contenía acetona anhidra. Las muestras se enviaron a Córdoba para ser acondicionadas mediante secado por punto crítico y se metalizaron con una aleación de oro-paladio (70:30).

Visualización de la muestra

Para todas las muestras, se utilizó un voltaje de 3 kV, una distancia de trabajo de 11 mm y la señal fue colectada por el detector de electrones secundarios, lo cual permitió observar la topografía de la muestra. Se obtuvieron imágenes con una magnificación de 3, 7, 10, 13, 15 y 20 KX. Se estudiaron 2 réplicas por cada muestra/condición y se tomaron 2 fotos por cada magnificación.

3.5.4. Efecto post fotodinámico sobre biofilms maduros

El análisis post-fotodinámico de los biofilms se enfocó en dos aspectos estructurales principales: el daño a nivel celular y las alteraciones en la matriz de EPS. Con este propósito, se llevaron a cabo los siguientes ensayos: cuantificación de biomasa total mediante CV, evaluación de la actividad metabólica a través de los ensayos de MTT y resazurina, y determinación de proteínas libres en el sobrenadante. Adicionalmente, el daño producido a

matriz de los biofilms se evaluó mediante la tinción el colorante fluorescente CW y se obtuvieron imágenes de SEM.

3.5.4.1. Cristal Violeta

El ensayo de CV permite la cuantificación de la biomasa total de un biofilm, ya que, por su carga positiva, se adhiere tanto a las células bacterianas como a los componentes de la matriz de EPS. Este método se utiliza como un parámetro inicial para evaluar el impacto de la terapia fotodinámica, ya que una reducción en la densidad de biomasa puede indicar un daño de la estructura y células del biofilm como resultado de la fototerapia.

El protocolo se adaptó del trabajo de Martínez y colaboradores⁹³. Partiendo de biofilms tratados con los distintos tipos de partículas (sección 3.5.2.), se realizaron 3 lavados con PBS y luego se fijó la biomasa adherida a la placa con 500 μ L/pocillo de metanol durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez fijado el biofilm se volvió a lavar 3 veces con PBS. Se agregó 500 μ L/pocillo de solución de CV 0,1 % v/v (0,1 mL de CV comercial en 100 mL finales de agua) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido el tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó 500 μ L/pocillo de una solución decolorante de ácido acético glacial al 33 % v/v (33 mL de ácido acético en 100 mL de agua), se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente, se tomaron 100 μ L/pocillo y se pasaron a una nueva placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas. Adicionalmente se midió la absorbancia de la solución decolorante a 570 nm, cuyo valor se restó en cada muestra. Para expresar los datos obtenidos, se consideró al promedio del grupo control (en oscuridad o irradiado según corresponda) como el 100 % de biomasa y en base a ello se establecieron los porcentajes de reducción de la biomasa de las muestras en oscuridad o irradiadas.

3.5.4.2. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT mide la actividad metabólica de las mitocondrias mediante la reacción de reducción de la sal de MTT formando cristales de formazán (compuesto altamente coloreado) que son insolubles en medios acuosos. Esto permite establecer una

relación entre actividad metabólica y viabilidad celular, donde se asume que a mayor actividad mitocondrial mayor es la viabilidad celular.

Para realizar dicho ensayo se adaptó el protocolo publicado previamente en el trabajo de Martínez y colaboradores⁹³. Luego del tratamiento, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se agregó 500 μ L/pocillo de solución de MTT (200 mg/L en PBS) y se incubó durante 4 hs en oscuridad a 37°C y agitación (100 rpm). Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y los cristales de formazán se disolvieron con 300 μ L/pocillo de DMSO, se agitó unos min se tomaron 100 μ L/pocillo y se pasaron a una nueva placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. Adicionalmente se midió la absorbancia de la solución de DMSO a 540 nm, cuyo valor se restó en cada muestra. Para expresar los datos obtenidos, se consideró al promedio del grupo control (en oscuridad o irradiado según corresponda) como el 100 % de viabilidad celular y en base a ello se establecieron los porcentajes de disminución de la viabilidad celular en oscuridad o irradiadas.

3.5.4.3. Ensayo de resazurina

El ensayo de la resazurina, mide actividad metabólica celular debido a que las enzimas respiratorias reducen la sal de resazurina (de color azul y no fluorescente) a resorufina (de color rosa y fluorescente). Esta técnica tiene la particularidad de que se puede medir mediante espectroscopía UV-vis y espectroscopía de fluorescencia. Al igual que MTT, dicha técnica mide actividad metabólica por lo que se asume que la actividad metabólica está directamente relacionada con la viabilidad celular.

Este ensayo se midió mediante espectroscopía UV-vis siguiendo adaptando el protocolo publicado en el trabajo publicado de Lee y Jain.¹⁸⁰ Partiendo del biofilm maduro tratado con NPC y NPC-500 + luz (descrito en la sección 3.5.), se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó 500 μ L/pocillo de resazurina (90,9 mg/L en PBS) y se incubó durante 3 hs en oscuridad a 37°C y agitación (100 rpm). Transcurrido ese tiempo se diluyó 10 veces la muestra y se midió absorbancia a 570 nm (Abs_{570} : máximo de absorción de resorufina) y 620 nm (Abs_{620} : absorción de resazurina). Para calcular el % de reducción de resazurina calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(\epsilon_{\text{resa-620}} \times \text{Abs}_{570}) - (\epsilon_{\text{resa-570}} \times \text{Abs}_{620})}{(\epsilon_{\text{reso-570}} \times \text{Abs}_{620}) - (\epsilon_{\text{reso-620}} \times \text{Abs}_{570})} \quad (10)$$

Donde:

$\epsilon_{\text{resa-620}}$ = ϵ de resazurina a 620 nm que es igual a $112900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\epsilon_{\text{resa-570}}$ = ϵ de resazurina a 570 nm que es igual a $80586 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\epsilon_{\text{reso-570}}$ = ϵ de resazurina a 570 nm que es igual a $14652 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\epsilon_{\text{reso-620}}$ = ϵ de resazurina a 620 nm que es igual a $4874 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Para expresar los datos obtenidos, se consideró al promedio del grupo control (en oscuridad o irradiado según corresponda) como el 100 % de viabilidad celular y en base a ello se establecieron los porcentajes de reducción de la biomasa de las muestras en oscuridad o irradiadas.

3.5.4.4. Cuantificación de proteínas libres en el sobrenadante del biofilm

En este ensayo la reacción de Bradford se usa para cuantificar las proteínas del biofilm que se han liberado al sobrenadante luego de la PDI. Estas proteínas liberadas pueden surgir tanto de la lisis celular como de la desintegración de componentes proteicos de la matriz de EPS y son un indicativo del daño oxidativo producto de la fototerapia. Para ello, se utilizó el reactivo colorimétrico de Bradford¹⁸¹, que cuantifica la concentración de proteínas utilizando una curva patrón construida con una proteína estándar de concentración conocida, en este caso HSA.

Para realizar este ensayo, se adaptó el protocolo publicado en el trabajo de Parween y colaboradores¹⁸². Tras el tratamiento de PDI (descrito en la sección 3.5.2.), se tomaron 50 μL del sobrenadante del biofilm y se mezclaron con un exceso de reactivo de Bradford (250 μL del reactivo + 50 μL de muestra), incubando la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la muestra se diluyó ocho veces y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los patrones se prepararon a partir de una solución de 1 mg/mL de HSA en agua ultra pura y se diluyeron a la mitad de manera seriada. Se siguió el

mismo procedimiento, realizado para los tratamientos, para determinar la absorbancia de los patrones y luego construir la correspondiente curva de calibración. Finalmente se utilizó dicha curva para calcular la concentración de proteínas liberadas al sobrenadante.

3.5.4.5. Tinción de la matriz de EPS

Con el objetivo de evaluar el daño fotoinducido sobre la matriz extracelular del biofilm, se empleó el colorante fluorescente CW, el cual presenta alta afinidad por polisacáridos estructurales como la celulosa y los β -glucanos, componentes clave de dicha matriz. El CW se une específicamente a enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos, permitiendo la visualización y cuantificación indirecta de la integridad de la matriz extracelular mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.¹⁸³

Luego del tratamiento, se agregaron 2 mL de solución de CW (0,15 mM, en PBS) a cada muestra y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró el colorante, se realizaron tres lavados con PBS y se dejó secar la muestra en posición vertical. La visualización de la muestra se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia de construcción artesanal.^{164,184} Primeramente, se tomaron imágenes de campo claro y luego imágenes de fluorescencia. El microscopio está equipado con una fuente de excitación LED UV (máximo de emisión ~ 370 nm; FWHM ~ 7 nm) cuya emisión se colima con lentes y se dirige a la muestra usando un filtro dicróico (390DRLP, Omega). La emisión de la muestra se colectó con un objetivo Reichert 40x 0,66NA, se filtró espectralmente con un filtro de emisión de paso largo (390ALP, Omega), y se enfocó en el chip de una cámara CMOS (IDS, U3-3060CP-M-GL).

3.5.4.6. Microscopía electrónica de barrido para biofilms

El daño micro/nano-estructural del biofilm producido por la fototerapia fue evaluado directamente mediante la obtención de imágenes SEM. La preparación de las muestras se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para cultivos planctónicos (sección 3.5.3.3.), con excepción de la etapa final del secado. En este caso, no se realizó el secado supercrítico; si no que después de la última etapa de deshidratación con etanol, las muestras se dejaron en

un desecador durante 48 h. Posteriormente se metalizaron con oro y la visualización se realizó en las mismas condiciones detalladas en la sección 3.5.3.3.

3.6. Ensayos de biocompatibilidad en células eucariotas

Los ensayos de biocompatibilidad sobre células eucariotas se consideran un requisito fundamental para evaluar la seguridad (es decir la biocompatibilidad con el huésped) de las nanopartículas utilizadas en la PDI. Para un análisis integral, se seleccionaron dos ensayos complementarios: i) viabilidad de fibroblastos, que evalúa la citocompatibilidad o toxicidad directa sobre células tisulares; y ii) hemólisis (porcentaje de lisis de eritrocitos), que evalúa la hemocompatibilidad, un indicador clave de seguridad sistémica ante un posible contacto con la sangre.

3.6.1. Ensayo de MTT sobre fibroblastos

Se eligieron fibroblastos porque representan el modelo estándar de células eucariotas no tumorales utilizadas para determinar la citotoxicidad basal de nanomateriales, ya que participan activamente en la formación y regeneración de tejido conectivo. Su alta sensibilidad a cambios en la morfología, adhesión y metabolismo los hace buenos indicadores de biocompatibilidad tisular¹²².

Para realizar estos ensayos, se trabajó en colaboración con el Dr. Luis Ibarra y el Dr. Matías Caverzan, integrantes del grupo de investigación. El protocolo utilizado está publicado en un trabajo previo de dichos autores¹²². Se utilizaron líneas celulares MCR-5 derivadas de fibroblastos humanos (ATCC® CCL-171™). Se cultivaron 10^4 células/pocillo durante 24 h en placas de 96 pocillos utilizando medio DMEM suplementado. Se retiró el medio y las células se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C con soluciones de partículas (100 µL/pocillo) a diferentes concentraciones en dextrosa al 5 % durante 1 h en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, la solución se sustituyó por DMEM fresco suplementado y las células se incubaron durante 24 h en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. El medio de crecimiento se sustituyó por 100 µL/pocillo de DMEM con 100 µg/mL de solución de MTT (0,5 mg/L) y las placas se incubaron durante 2 h en una atmósfera de CO₂

al 5 % a 37 °C. Tras la incubación, se descartó el sobrenadante y los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 100 µL de DMSO por pocillo, con agitación suave para asegurar su completa disolución. La absorbancia de las muestras y el solvente se midió a 570 nm para luego restar el blanco. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular = $100 \times (\text{absorbancia del tratamiento} / \text{absorbancia media del control})$.

3.6.2. Ensayo de hemólisis de eritrocitos

El ensayo de hemólisis es un que permite identificar la hematocompatibilidad de nanomateriales proporcionando información relevante sobre posibles interacciones adversas con los distintos componentes sanguíneos. Su fundamento se basa en la cualificación de la ruptura de la membrana eritrocitaria y la consecuente liberación de la hemoglobina. Una tasa de hemólisis menor al 5 % es considerada aceptable según normas ISO 10993-4 para materiales biomédicos¹⁸⁵.

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo publicado previamente en el trabajo de Abalos y colaboradores¹⁸⁶. Se evaluó el comportamiento hemolítico en oscuridad de distintas nanopartículas sobre eritrocitos de adultos sanos. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre de adultos humanos sanos a las cuales se les agregó heparina como anticoagulante tras la extracción. Luego, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y los eritrocitos contenidos en el precipitado se lavaron con solución de glucosa al 10 % volviendo a centrifugarse a 2000 rpm. Este paso de lavado se realizó 3 veces. Posteriormente, se realizó la solución de eritrocitos se diluyó cinco veces en una solución de glucosa al 20 %, y en una segunda instancia se esta suspensión se diluyó a la mitad con las suspensiones de NPCs de modo tal que la concentración final de eritrocitos fue de 1:10 y distintas concentraciones de partículas. Se incubó por 1 h a 37 °C en oscuridad y se centrifugó la solución a 2500 rpm por 10 min para eliminar los eritrocitos del medio, se tomaron 100 µL de cada muestra y se midió la absorbancia a 450 nm. Como control positivo de hemólisis total, se añadió a una muestra solución acuosa de T X-100 al 1% v/v (1 mL de T X-100 en 100 mL de glucosa al 10 %). El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

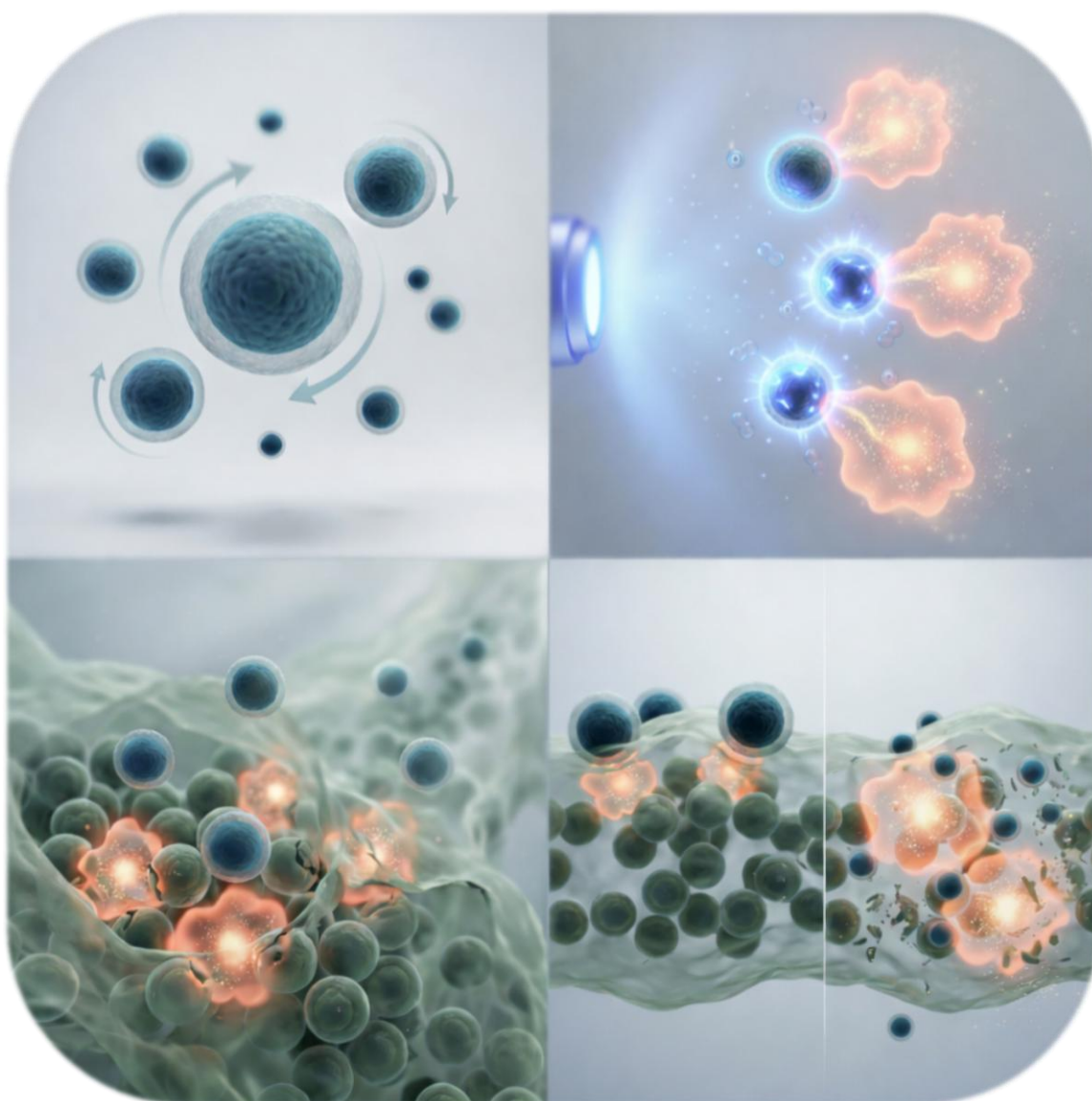
$$\% \text{ de hemólisis} = \left(\frac{\text{abs muestra} - \text{abs control}}{\text{abs control positivo}} \right) \times 100 \quad (11)$$

3.7. Análisis estadísticos

Todos los datos cuantitativos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD) de las distintas réplicas, a menos que se indique lo contrario. Los siguientes experimentos se realizaron por triplicado: caracterización de partículas, unión bacteriana y estudio post fotodinámico de cultivos planctónicos. Los ensayos post fotodinámicos de biofilms se midieron por octuplicado. Los ensayos de biocompatibilidad de células eucariotas se hicieron por quintuplicado. La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. En los gráficos, las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se indican con asteriscos, de acuerdo con los siguientes umbrales de probabilidad (valor p): * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$, *** para $p < 0.001$ y **** para $p < 0.0001$.

Capítulo 4:

RESULTADOS PARTE I



4. RESULTADOS

4.1. PARTE I

En la primera parte de este capítulo se describen los resultados obtenidos para el siguiente objetivo específico: **Sintetizar y caracterizar NPCs fotoactivas con distintas modificaciones superficiales que tengan un impacto en el direccionamiento (vectorización) contra células cancerígenas o bacterianas.** Para una mejor comprensión, los resultados de este objetivo se dividieron en dos partes: la primera está enfocada en el direccionamiento de las partículas desarrolladas hacia células bacterianas, y la segunda parte se enfoca en el desarrollo de partículas orientadas hacia células cancerígenas. Los resultados correspondientes a la segunda parte de este objetivo se abordarán en la parte II de este capítulo.

En esta sección se detallan resultados obtenidos para el desarrollo de NPCs del tipo *core/shell*, las cuales se diseñaron específicamente para mejorar la interacción con las envolturas bacterianas. La estrategia para el desarrollo de estas nuevas partículas se basó en la incorporación de un PC catiónico denominado PFN (figura 8), el cual se adsorbió en la superficie de una NPCs previamente desarrollada dentro del grupo de trabajo. En base a antecedentes previamente publicados, se sabe que las NPCs presentan carga superficial negativa^{141,175}, por lo tanto el desarrollo experimental de esta etapa se basó en las siguientes hipótesis:

- † Debido a la diferencia de cargas entre el PC catiónico PFN y la NPCs aniónica, se lograría adsorber el PFN en la superficie de las mismas originando a las nanopartículas del tipo *core/shell*. Este proceso debería invertir la carga superficial de las NPCs
- † Las NPCs *core/shell* conservarían la eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ que presentan las NPCs desarrolladas previamente^{27,142}
- † Debido a su carga positiva, las NPCs del tipo *core/shell* interaccionarían en mayor medida con las envolturas bacterianas y componentes de la matriz del biofilm que las previamente desarrolladas. Esta mejora en la interacción se correspondería a que dichos componentes bacterianos exhiben una carga superficial negativa
- † Una mejora en la interacción entre bacterias y NPCs del tipo *core/shell* debería traducirse en una mayor eficiencia en la PDI

†

4.1.1. Caracterización del PC catiónico PFN

El PFN es un polímero conjugado catiónico que absorbe fuertemente en el rango UV-A, su máximo de absorción se encuentra a 392 nm y presenta un espectro de emisión de fluorescencia que consta de varios vibrónicos que emiten por encima de los 400 nm (figura 16). A causa de los grupos amonios cuaternarios en su estructura (figura 7), el PFN se disuelve con gran facilidad en metanol y etanol, es parcialmente soluble agua, pero es insoluble en THF.

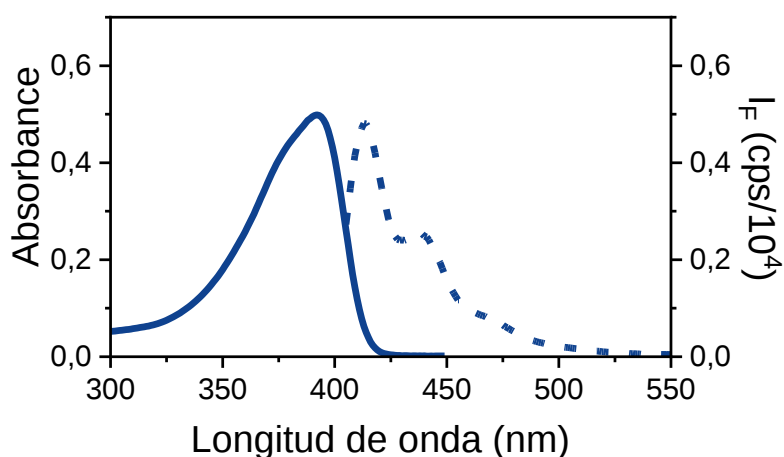


Figura 16. Espectro de absorción UV-vis y fluorescencia del PFN. La línea continua corresponde al espectro de absorción (4,2 mg/L) y la discontinua al espectro emisión de fluorescencia (1,06 mg/L, $\lambda_{exc} = 392$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 405$ -600 nm slit 1, señal S1c). Para ambas medidas, el PFN está disuelto en metanol.

El PFN presenta un ϵ de 93,97 ($L g^{-1} cm^{-1}$) a 392 nm obtenido de manera empírica en este trabajo, usando la ley de Lambert y Beer. Se utilizó el valor de ϵ para calcular la concentración de PFN necesaria para realizar los ensayos de adsorción de dicho polímero sobre la superficie de las NPCs.

Es importante destacar que el valor de ϵ calculado para PFN es similar al calculado previamente dentro del grupo de trabajo para el PC polifluoreno (PFO, $\epsilon_{392} = 104 L g^{-1} cm^{-1}$).¹⁸⁷ Este resultado es esperable porque ambos polímeros son muy similares estructuralmente y la única diferencia entre ellos se debe a la presencia de los grupos amonios cuaternarios en el PFN.

4.1.2. Caracterización de los componentes que conformarán a las NPCs *core/shell*

En la figura 17 se muestran los espectros de absorción de las siguientes soluciones: PFN en metanol (curva azul), F8BT en THF (curva amarilla) y PtOEP en THF (curva fucsia). En el rango espectral estudiado el espectro del PFN muestra un solo pico a ~ 390 nm, como se mencionó anteriormente, mientras que el F8BT presenta 2 picos característicos a ~ 325 y ~ 455 nm, los cuales mantienen sus posiciones espectrales en las NPC. Asumiendo que el contacto cercano de los componentes no afecta significativamente a sus transiciones electrónicas desde el estado fundamental, el espectro de las NPCs *core/shell* debe tener una estructura que contenga a los 3 picos característicos de los dos polímeros que las conforman. En el espectro de absorción de PtOEP, se observan claramente los picos correspondientes a las típicas bandas Soret y Q de las porfirinas. Dichas transiciones también deberían observarse en el espectro de las NPCs *core/shell* cuando se encuentren dopadas volumétricamente con dicha porfirina.

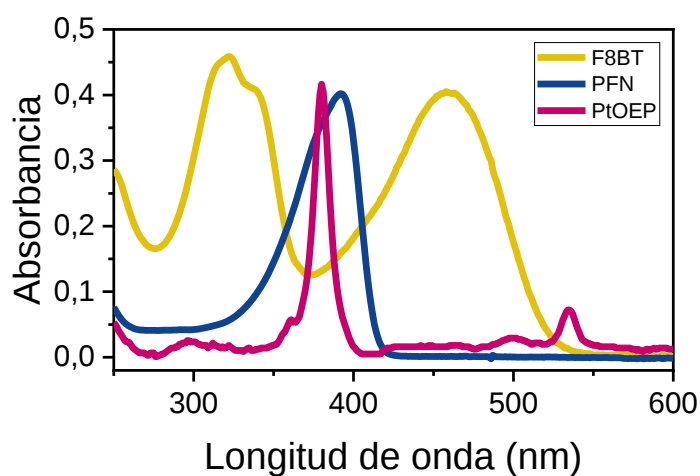


Figura 17. Espectros de absorción de los componentes de NPCs *core/shell* Espectros de absorción de F8BT en THF (9,7 mg/L, amarillo), PFN en metanol (4,2 mg/L, azul) y PtOEP en THF (fucsia, 2,7 mg/L).

En la figura 18, se observan los espectros de emisión del PFN en metanol (curva azul), F8BT en THF (curva amarilla) y PtOEP en THF (curva fucsia). Para tomar estos espectros se prepararon soluciones de cada uno de dichos componentes con una absorbancia

de 0,1 a la longitud de onda usada para realizar la excitación. Para tomar el espectro de emisión de la porfirina, la solución fue desoxigenada con N_2 durante 20 minutos; esto se debe a que el O_2 desactiva eficientemente la emisión de la misma. El espectro de emisión del PFN tiene su máximo de emisión en 413 nm. El espectro de emisión del F8BT tiene su máximo de emisión a 540 nm. En la figura también se observa que a 600 nm la intensidad de emisión del F8BT es elevada mientras que la emisión del PFN es esencialmente nula. Esto es una consideración importante para ensayos posteriores. La porfirina PtOEP muestra un máximo de emisión alrededor de 650 nm.

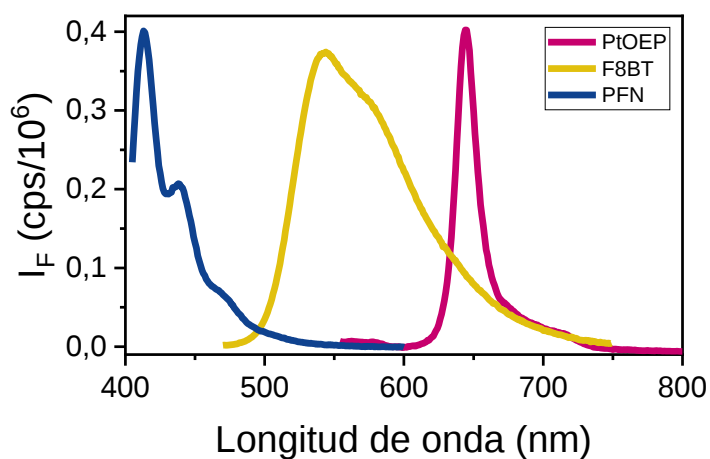


Figura 18. Espectros de emisión de los componentes utilizados en la síntesis de NPCs *core/shell*. Espectros de emisión de F8BT en THF (amarillo, 2,4 mg/L, $\lambda_{exc} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 470$ -750 nm slit 1, señal S1c), PFN en metanol (azul, 1,06 mg/L, $\lambda_{exc} = 392$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 405$ -600 nm slit 1, señal S1c) y PtOEP en THF (0,6 mg/L, $\lambda_{exc} = 535$ nm slit 2, $\lambda_{emi} = 555$ -900 nm slit 3, señal S1c).

4.1.3. Síntesis de NPCs con distintos agregados de PFN

En la primera etapa de obtención de NPCs del tipo *core/shell*, se sintetizaron NPCs compuestas solamente por F8BT (denominadas como NPC) y posteriormente se adicionaron distintas concentraciones de PFN para formar el *shell* (10 – 100 % p/p), los detalles experimentales se describen en la sección 3.2.1.4. Se utilizó una suspensión de NPC para cada % de PFN agregado, por esta razón las medidas son independientes entre sí. Una vez obtenidas, se caracterizaron espectrofotométricamente, se midió su D_H y se evaluó la estabilidad coloidal de las mismas. En función de estos parámetros analizados, se seleccionó

una concentración de PFN definitiva. Es importante destacar que el F8BT es un PC eléctricamente neutro pero, por mecanismos que aún no están del todo esclarecidos, cuando se autoensambla formando NPC, presenta carga superficial negativa en suspensiones acuosas. Una posible explicación sería la oxidación superficial de dicha partícula durante su síntesis por nanoprecipitación.¹⁸⁸ En este contexto, las interacciones electrostáticas entre PFN y NPC tendrían un papel crucial en la arquitectura de las NPCs *core/shell*. En consecuencia, la proporción de PFN utilizado es un parámetro crítico para la obtención de partículas coloidalmente estables y que a su vez preserven las propiedades fotodinámicas tan deseables de este sistema.

4.1.3.1. Caracterización de NPC con agregado de distintos % de PFN

La figura 19 presenta los espectros de las suspensiones de NPC a las que se agregaron distintos porcentajes de PFN. En los espectros se observa la presencia de las bandas características de los dos PCs: el pico que corresponde al PFN a ~ 400 nm y los dos picos del F8BT a ~ 325 y ~ 455 nm. A medida que aumenta el % de PFN, se observa como aumenta la intensidad de la banda a ~ 400 nm, mientras que el resto del espectro se mantiene aproximadamente igual, con excepción de las NPC que contienen 10 y 20 % de PFN. Estos dos últimos espectros no se muestran debido a que a estas concentraciones de PFN la dispersión de NPC se torna inestable y las mismas precipitan.

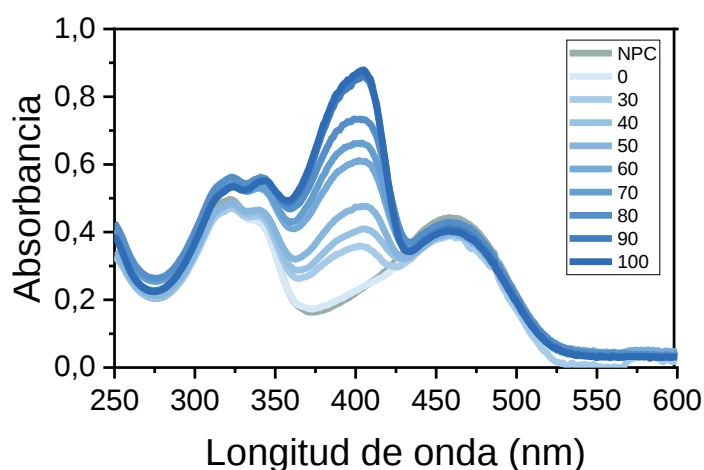


Figura 19. Espectros de absorción UV-vis para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN. NPC (10 mg/L, gris) y NPC + distintos % de PFN (celeste). Los

colores van desde el celeste claro al más oscuro a medida que aumenta la concentración de PFN.

Se tomaron espectros de excitación y emisión de las suspensiones de NPC con agregado de distintos porcentajes de PFN. Para adquirir dichos espectros, se igualaron las absorbancias de todas las suspensiones a $\lambda_{456} = 0,1$ y se tomaron en iguales condiciones instrumentales monitoreando la fluorescencia del F8BT. En un paso posterior, se normalizaron todos los espectros utilizando como referencia al espectro de emisión de NPC. En la figura 20 se presentan los espectros de emisión normalizados de las suspensiones de NPC con distintos agregados de PFN. En dichos espectros, se observa un angostamiento del espectro de emisión de las NPC a medida que aumenta el % de PFN agregado. Se conoce que el espectro de emisión de las NPC es la convolución de la respuesta de los “cuasi-cromóforos” que se encuentran en mayor o menor medida expuestos al agua. Luego, los resultados mostrados en la figura 20 podrían indicar que la presencia del PFN hace menos polar el medio percibido por los “cuasi-cromóforos” del F8BT.

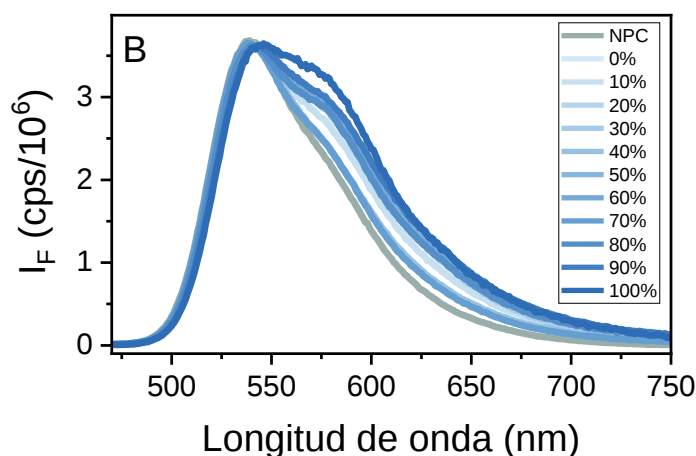


Figura 20. Espectros de emisión normalizada para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN. Los colores van desde celeste claro al más oscuro a medida que aumenta la concentración de PFN. Condiciones de medición para todas las muestras: $\lambda_{exc} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 470-750$ nm slit 1, señal S1c, 2,4 mg/L.

En cuanto a los espectros de excitación, se fijó la longitud de onda de emisión a 600 nm, en vez de 540 nm, que corresponde al máximo de emisión del F8BT, dado que a esta longitud de onda se observa algo de la emisión del PFN (ver figura 18), mientras que a 600 nm dicha emisión es insignificante. De esta forma, el monitoreo a 600 nm asegura la detección de fotones emitidos exclusivamente por F8BT. En la figura 21 se presentan los espectros de excitación normalizándolos al máximo de absorción de las NPC (456 nm) con los distintos % de PFN. En dichos espectros se observa, además de la estructura propia del F8BT con sus dos bandas en ~ 325 y ~ 450 nm, la característica del PFN a ~ 400 nm.

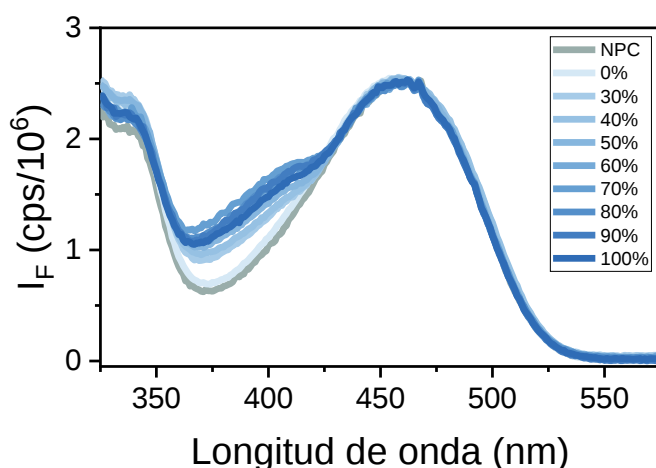


Figura 21. Espectros de excitación normalizados para suspensiones de NPC con agregado de distintos % de PFN. NPC (2,4 mg/L, gris) y NPC + distintos % de PFN (celeste). Los colores van desde el celeste más claro al más oscuro a medida que aumenta la concentración de PFN. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{emi}} = 600$ nm slit 1, $\lambda_{\text{exc}} = 325\text{-}590$ nm slit 2, señal S1/R1c).

La aparición de este ultima banda a ~ 400 nm cuando se monitorea exclusivamente la fluorescencia del F8BT, da indicio de un proceso de ET-SS desde el PFN hacia el F8BT. Dicho proceso es termodinámicamente factible debido a que el primer estado excitado de PFN ($^1\text{PFN}^*$) tiene mayor energía que el $^1\text{F8BT}^*$, sumado a la superposición espectral entre la emisión del PFN (que actúa como donador de energía) y la absorción del F8BT (que actúa como aceptor de energía. Otro requisito para que se produzca el proceso de ET-SS es la corta distancia que debe haber entre donador y aceptor como se detalló en el marco teórico (sección

2.7.1.). Este último requerimiento permite confirmar la efectiva adsorción del PFN a la superficie del F8BT originando así a las NPC@PFN_n.

Se calculó el porcentaje de ET a partir de los espectros de absorción y excitación de las NPC y NPC@PFN_n (el detalle de este cálculo se desarrolla más abajo en la sección 4.1.4.1.) y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. Inicialmente, a medida que aumenta el % de PFN, se observa un aumento de la ET, siendo mayor el % de ET para el 70 % de PFN. Sin embargo, con los aumentos posteriores de PFN el % de ET comienza a disminuir. Este resultado es consistente con el engrosamiento del *shell*, el cual aleja al dado de energía del *core* y en consecuencia, disminuye la eficiencia del proceso de ET-SS.

Tabla 3. Cálculo de ET para NPC@PFN_n

<i>Porcentaje de PFN en NPC@PFN_n (%)</i>	<i>Transferencia de energía (~ %)</i>
30	15
40	15
50	15
60	15
70	20
80	15
90	10
100	7,5

Los resultados hasta aquí mostrados confirman que efectivamente se produce la adsorción del PFN en la superficie de la NPC con la consecuente formación de la NPC@PFN_n. De todos los % de PFN utilizados, cuando la proporción de PFN es del 70 % (NPC@PFN) se registró la mayor eficiencia en la ET, la cual se encuentra alrededor del 20 %.

Por último, se midió el tamaño de las suspensiones de NPC@PFN_n para evaluar si la presencia del PFN modifica significativamente el D_H de las mismas y los resultados

obtenidos se presentan en la figura 22, concluyéndose que se producen cambios significativos en el $\overline{D_H}$ de las NPC@PFN_n a medida que aumenta el % del PFN.

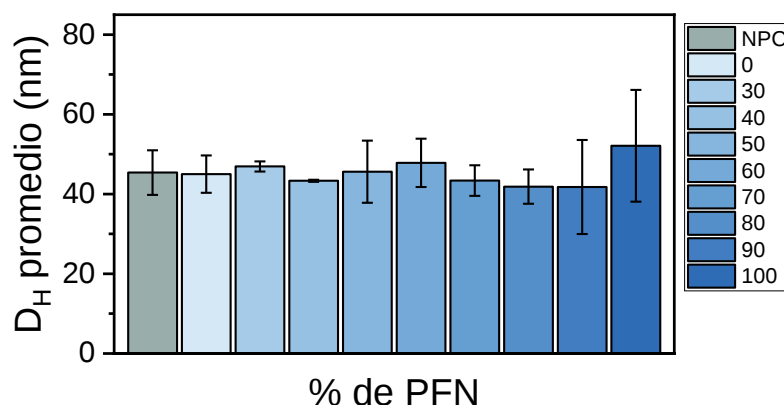


Figura 22. $\overline{D_H}$ de NPC@PFN_n. El rango de colores va desde celeste claro a oscuro a medida que aumenta el % de PFN. Concentración de partículas usada: 10 mg/L.

De todas las NPC@PFN_n obtenidas, se eligió a NPC@PFN₇₀ para posteriores estudios, denominada de ahora en más simplemente como NPC@PFN. La elección de esta partícula se debe principalmente a que mostró el mayor porcentaje de TE, indicativo de la formación del *core*. Pero un gran inconveniente que presentan las NPC@PFN₇₀, es una limitada estabilidad coloidal dificultando la posibilidad de obtener soluciones concentradas; siendo este un requisito imprescindible para los ensayos de PDI sobre cultivos bacterianos. Para resolver este inconveniente se procedió a realizar NPCs *core/shell* modificando la composición del *core*. En base a antecedentes previos, se sabe que el agregado de un PE anfífilico aumenta la estabilidad coloidal de las partículas en suspensiones acuosas y principalmente en soluciones de elevada fuerza iónica (buffers). Por lo que se procedió a la utilización de NPC:PSMA como *core* de las NPCs *core/shell*.

4.1.4. Síntesis de NPC:PSMA@PFN

En esta sección se realiza un estudio comparativo entre NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN, con el objetivo de evaluar si la presencia del PSMA afecta la fotofísica de las NPCs *core/shell*.

4.1.4.1. Caracterización de NPC:PSMA@PFN

El primer paso en la caracterización consistió en tomar espectros de absorción UV-vis de NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN, los cuales se presentan en la figura 23. Es importante aclarar que a partir de este momento todos los tipos de NPCs *core/shell* contienen 70 % de PFN, independientemente de la composición del *core*. En color gris y beige se presentan los espectros de absorción de NPC y NPC:PSMA respectivamente, mientras que en color celeste y verde muestran los espectros de absorción de NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN respectivamente. Para estas dos últimas, en ambas se evidenció la presencia del PFN a ~ 400 nm. Al mismo tiempo, se identificaron las bandas características del F8BT con sus transiciones a ~ 325 y ~ 456 nm en todos los casos.

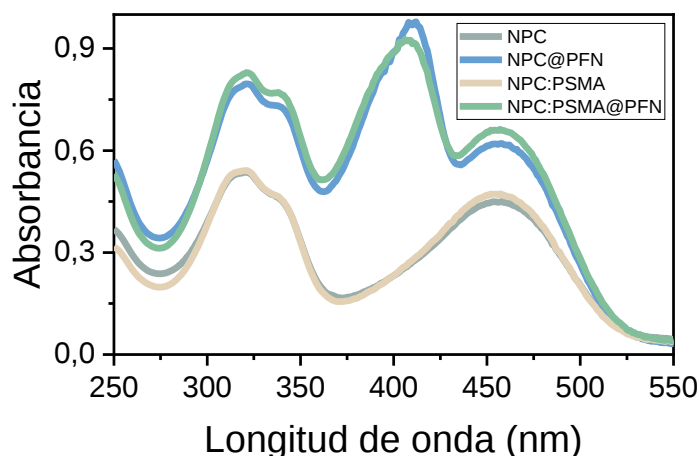


Figura 23. Espectros de absorción UV-vis de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN. Gris: NPC (9,7 mg/L), celeste: NPC@PFN (13,7 mg/L), beige: NPC:PSMA(10,2 mg/L) y verde: NPC:PSMA@PFN (15,8 mg/L).

En segunda instancia, se tomaron espectros de emisión de las cuatro partículas. Estos experimentos se realizaron igualando las absorbancias de todas las suspensiones a $\lambda_{456} = 0,1$ y se tomaron en iguales condiciones instrumentales. En un paso posterior, se normalizaron todos los espectros utilizando como referencia al espectro de emisión de NPC:PSMA. Los espectros de emisión se presentan en la figura 24. Cuando los espectros no se encuentran normalizados (figura 24A), se observa una mayor I_F para NPC@PFN (curva celeste) y

NPC:PSMA@PFN (curva verde) con respecto a NPC (curva gris) y NPC:PSMA (curva beige) respectivamente. El aumento en la I_F es más significativo cuando las partículas contienen PSMA. Este efecto podría explicarse considerando un cambio en la población o un cambio en la accesibilidad de los sitios de extinción de excitones no emisivos o centros de recombinación (Q), los cuales han sido reportados previamente para este tipo de partículas.¹⁶⁷ Estos sitios Q son defectos que se encuentran principalmente en la superficie de las NPC y pueden provenir de defectos en la síntesis del polímero o a especies cargadas como polarones (pares hueco/electrón débilmente interactuantes). Luego, la presencia del PFN podría estar neutralizando la carga negativa de los polarones impidiendo la interacción excitón – sitio Q.

Cuando los espectros están normalizados (figura 24B), se observa un afinamiento en la estructura típica del espectro de emisión (del F8BT contenido en la NPC) para las NPC:PSMA@PFN (curva verde). La modificación en el espectro de emisión de esta formulación, da un indicio de que existe una mayor interacción entre F8BT y PFN producto de la formación de la NPC:PSMA@PFN, que en la NPC.

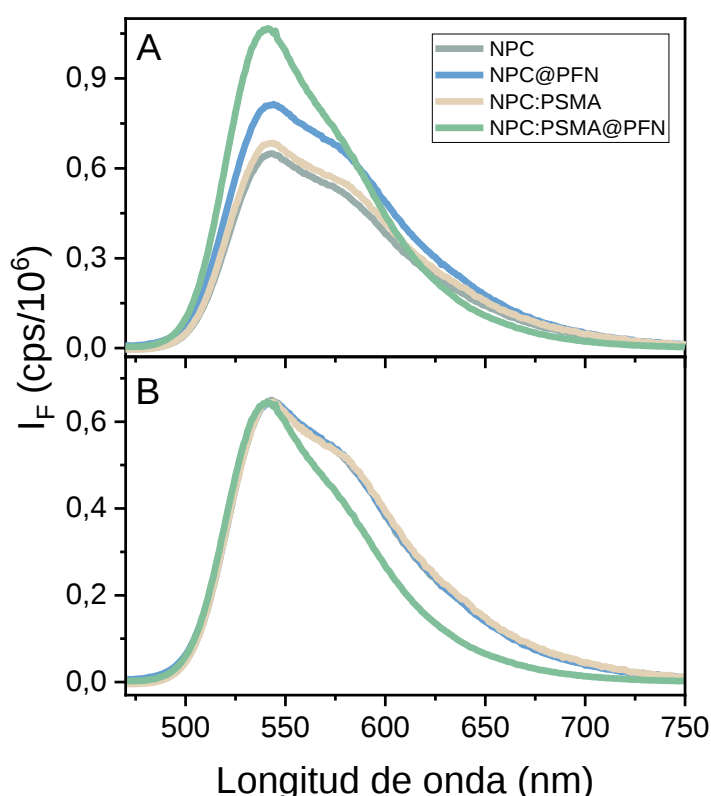


Figura 24. Espectros de emisión de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN. (A) Espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. Gris: NPC,

celeste: NPC@PFN, beige: NPC:PSMA y verde: NPC:PSMA@PFN. Condiciones de medición para todas las muestras: $\lambda_{\text{exc}} = 456 \text{ nm}$ slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750 \text{ nm}$ slit 1, señal S1c, 2,4 mg/L.

Como la diferencia de I_F entre NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN es bastante significativa, se calculó el ϕ_F de ambas nanopartículas (según el protocolo detallado en la sección 3.3.6. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para NPC:PSMA el $\phi_F = 0,093$ y para NPC:PSMA@PFN el obtenido fue de $\phi_F = 0,16$, casi el doble que el obtenido para NPC.

Por otro lado, se tomaron espectros de excitación normalizados correspondientes a las cuatro formulaciones, los cuales se muestran en la Figura 25. De manera análoga a lo observado para las NPC@PFN_n (ver Figura 21), se evidencia la aparición de una banda centrada en $\sim 400 \text{ nm}$, atribuida a la adsorción del PFN en la superficie de las NPC@PFN_n. Dado que se midió específicamente la I_F del F8BT, la presencia de esta banda es evidencia de un proceso ET-SS desde el PFN hacia el F8BT, tal como se observó previamente. Asimismo, la contribución relativa de esta banda resulta más intensa en NPC:PSMA@PFN que en NPC@PFN, lo que vuelve a sugerir que la incorporación de PSMA favorecería la adsorción de mayores cantidades de PFN sobre la superficie de la nanopartícula. Este comportamiento puede entenderse considerando la mayor densidad de carga negativa reportada para NPC:PSMA en comparación con NPC, atribuida a la presencia de PSMA, el cual presenta cargas negativas en soluciones acuosas. En consecuencia, se promueve una interacción electrostática más fuerte entre el PFN, de naturaleza catiónica, y la superficie aniónica de las NPC:PSMA.

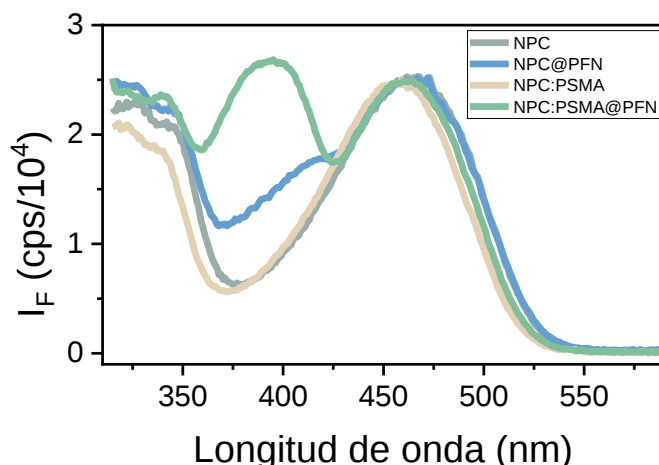


Figura 25. Espectros de excitación de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN. Gris: NPC, celeste: NPC@PFN, beige: NPC:PSMA y verde: NPC:PSMA@PFN. Condiciones de medición para todas las muestras: $\lambda_{\text{emi}} = 600 \text{ nm}$ slit 1, $\lambda_{\text{exc}} = 315\text{-}590 \text{ nm}$ slit 2, señal S1/R1c, 2,4 mg/L.

Se calculó el porcentaje de ET desde el PFN hacia el F8BT, para NPC:PSMA@PFN. Dicho resultado se encuentra alrededor del 70 %, más del triple que el obtenido para NPC usando la misma concentración de PFN (que fue de $\sim 20 \%$, tabla 3). Esto indica que cuando el *core* está compuesto por F8BT + PSMA, aproximadamente el 70 % de los fotones absorbidos por PFN se transfieren al F8BT dentro de la partícula. En la Figura 26 se presentan los espectros de absorción y excitación utilizados para calcular el % de ET desde el PFN hacia el F8BT para NPC@PFN (figura 26A) y hacia a NPC:PSMA@PFN (figura 26B). En la figura 26A se muestra: (i) espectro de absorbancia de NPC (gris), (ii) espectro de absorbancia de NPC@PFN (curva celeste sólido), (iii) espectro de absorción diferencial que es aproximadamente igual a [(ii) – (i)] (curva azul sólido), (iv) espectro de excitación de NPC@PFN (curva celeste discontinuo), (v) combinación lineal de (ii) y (iii) que mejor se ajusta a (iv) (curva negro sólido). Mientras que en la figura 26B se muestra (i) espectro de absorbancia de NPC:PSMA (curva beige), (ii) espectro de absorbancia de las NPC:PSMA@PFN (curva verde sólido), (iii) espectro de absorción diferencial que es aproximadamente igual a [(ii) – (i)] (curva azul sólido), (iv) espectro de excitación de NPC:PSMA@PFN (curva verde discontinuo), (v) combinación lineal de (ii) y (iii) que mejor se ajusta a (iv) (curva negro sólido). La curva negra debe solapar lo mejor posible con cada curva discontinua (espectro de excitación), para ello se va modificando el valor del

parámetro ET (restringido a valores entre 0 y 1) hasta alcanzar el mejor solapamiento entre las mencionadas curvas. Luego se multiplica por 100 y se obtiene la ET %.

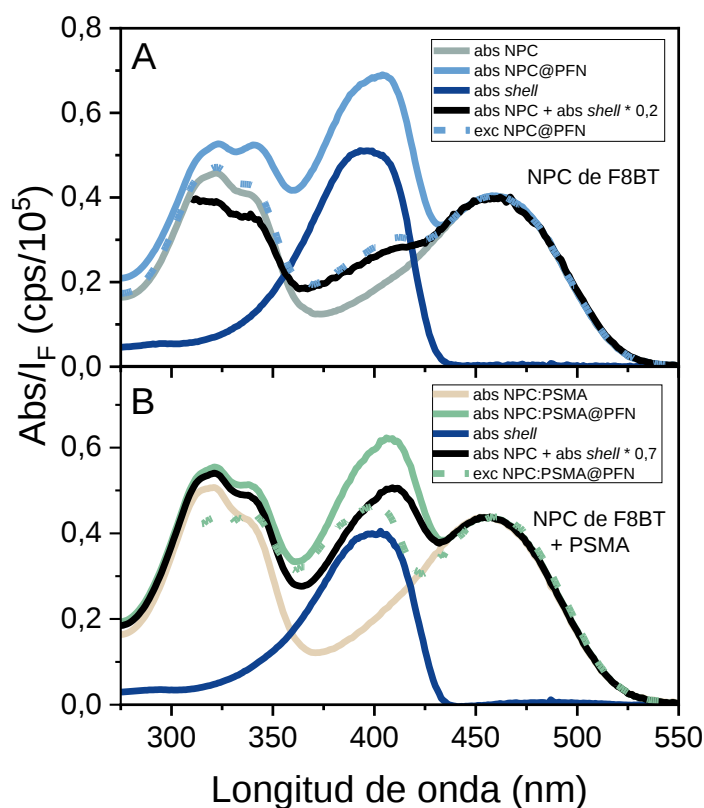


Figura 26. Espectros usados para calcular la ET de NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN.

(A) NPC@PFN: (i) espectro de absorción UV-vis de NPC (gris, 9,6 mg/L), (ii) espectro de absorción UV-vis de NPC@PFN (celeste sólido), (iii) espectro de absorción diferencial $\equiv [(ii) - (i)]$ (azul sólido), (iv) espectro de excitación de NPC@PFN (celeste discontinuo), (v) combinación lineal de (ii) y (iii) que mejor se ajusta a (iv) (negro sólido). (B) NPC:PSMA@PFN. (i) espectro de absorción UV-vis de NPC:PSMA (beige, 10,3 mg/L), (ii) espectro de absorción UV-vis de NPC:PSMA@PFN (verde sólido), (iii) espectro de absorción diferencial $\equiv [(ii) - (i)]$ (azul sólido), (iv) espectro de excitación de NPC:PSMA@PFN, (v) combinación lineal de (ii) y (iii) que mejor se ajusta a (iv) (negro sólido). Condiciones de medición del espectro de excitación: $\lambda_{emi} = 600$ nm slit 1, $\lambda_{exc} = 315-590$ nm slit 2, señal S1/R1c, 2,4 mg/L

También se midió el tamaño de NPC, NPC:PSMA, NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN, con el objetivo de evaluar si la presencia del PFN afecta de manera

significativa al tamaño de las distintas partículas. En la figura 27 se presentan los resultados de $\overline{D}_H$ para los cuatro tipos de partículas, donde se observa una disminución significativa del $\overline{D}_H$ cuando las partículas tienen PSMA (NPC:PSMA curva beige y NPC:PSMA@PFN curva verde) con respecto a aquellas que no poseen el PE (NPC, curva gris y NPC@PFN curva celeste).

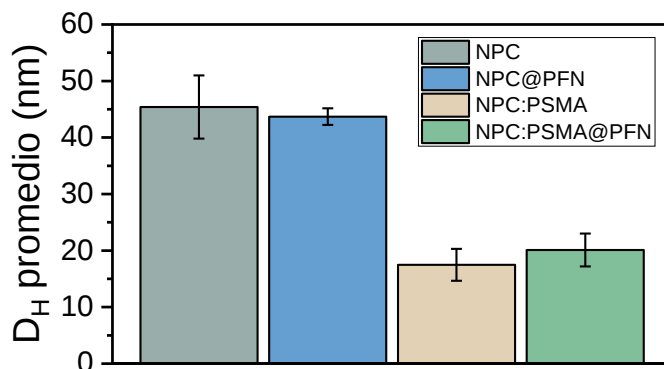


Figura 27. $\overline{D}_H$ de NPC, NPC:PSMA y NPC@PFN y NPC:PSMA@PFN. Gris: NPC. Beige: NPC:PSMA. Celeste: NPC@PFN y verde NPC:PSMA@PFN. Concentración de partículas usada 10 mg/L.

Los valores de $\overline{D}_H$ obtenidos y la disminución del mismo cuando la partícula contiene el PE PSMA, se condice con estudios previos del grupo de trabajo^{27,141}; En todos los casos, cuando se agrega un 20 % de PSMA a la NPC, el $\overline{D}_H$ de NPC:PSMA se reduce aproximadamente a la mitad. Este mismo efecto se registra también para NPC@PFN con respecto a NPC:PSMA@PFN, indicando que la presencia del PSMA estaría favoreciendo un empaquetamiento más compacto de la NPC. Como se mencionó en la introducción, las NPCs *core/shell* presentan una gran ventaja en comparación con sus contrapartes desnudas debido a que esta arquitectura permite combinar las propiedades de los materiales que componen el *core* y el *shell* en un mismo sistema (estructura)^{60,120}.

En base a los resultados obtenidos, y debido a la interacción favorecida entre PFN y NPC:PSMA (mayor % de ET, mayor empaquetamiento de la partícula y mayor estabilidad coloidal en medios acuosos), se eligieron a las NPC:PSMA@PFN para realizar los ensayos de PDI.

4.1.4.2. Estudio de la estabilidad coloidal de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en medios biológicos

Para realizar los ensayos de PDI, es de crucial importancia evaluar primero la estabilidad coloidal de las NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en entornos biológicos. Las propiedades fotoquímicas características del PS (que, en este caso, son las NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN) están relacionadas con su estabilidad coloidal y como consecuencia afectan la efectividad de la PDI¹²⁰. Es importante trabajar con medios aptos para el cultivo de microorganismos donde estas partículas no se aglomeren, ya que la formación de agregados implica la pérdida de sus propiedades fotodinámicas y en consecuencia impediría la aplicación terapéutica deseada. Una consideración muy importante es que el medio de cultivo utilizado en los ensayos de PDI sea ópticamente transparente debido a que en este tipo de terapias su eficiencia depende directamente de la absorción de luz por parte del PS. Un medio de cultivo que tenga un espectro de absorción significativa en el rango de longitudes de onda de irradiación de la fuente de luz, puede competir con el PS por los fotones reduciendo la fracción de luz que puede recibir. Así mismo, un medio de cultivo que posea proteínas, vitaminas y moléculas cromofóricas (como por ejemplo, rojo fenol usado para monitorear el pH) pueden afectar la fotofísica de las partículas comprometiendo la homogeneidad de la dosis de luz aplicada.

En primer lugar, se evaluó la estabilidad de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en PBS, donde se observó a simple vista que en cuestión de minutos se produjo la precipitación de las NPC:PSMA@PFN, mientras que las NPC:PSMA se mantuvieron estables (figura 28). Entonces se descartó la posibilidad de utilizar PBS para los ensayos biológicos. Un resultado similar se observó cuando se evaluó la estabilidad de las NPC:PSMA@PFN en solución salina (NaCl, 0,45 % p/v) (datos no mostrados). Por esta razón directamente se descartó la posibilidad de utilizar las NPC:PSMA@PFN en medios con alta fuerza iónica para realizar los ensayos de PDI.

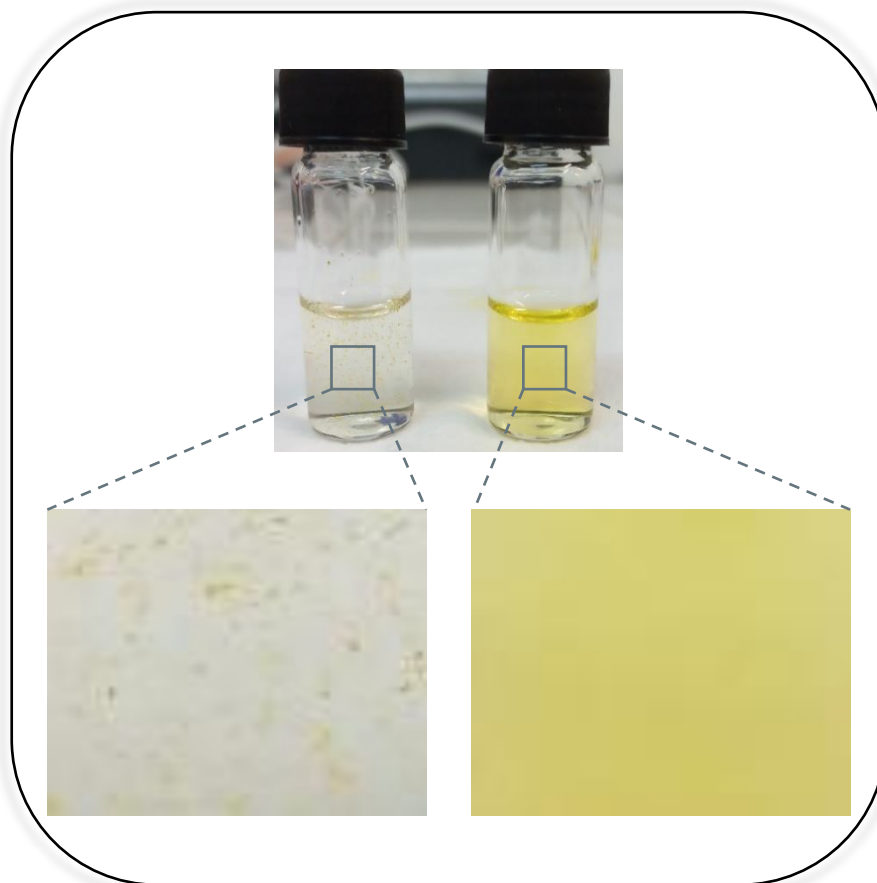


Figura 28. Suspensión de NPC y NPC-CS en PBS. Lado izquierdo se muestra una suspensión de NPC:PSMA@PFN y lado derecho una de NPC:PSMA. Imagen tomada luego de un par de minutos desde que entró en contacto el PBS con ambas partículas.

Debido a la dificultad de lograr mantener estables a las NPC:PSMA@PFN en soluciones salinas, incluso durante cortos períodos de tiempo, y la importancia de mantenerlas estables coloidalmente en un medio apto para el crecimiento bacteriano, se decidió evaluar la estabilidad de dichas partículas en una solución de glucosa al 10 %. Este azúcar es la principal fuente de energía de las células, por lo que su presencia asegura la mínima cantidad de nutrientes necesaria para que las bacterias puedan crecer y reproducirse. Al mantener las NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en glucosa al 10 %, no se evidenciaron signos de precipitación a simple vista de dichas partículas inclusive luego de varios días de incubación. Por lo tanto, se procedió a caracterizar ambos tipos de partículas en este medio.

Previo a la caracterización de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en suspensiones de glucosa, se procedió a realizar una curva de crecimiento de MRSA en dicho medio para evaluar si se ve afectado el crecimiento bacteriano en comparación a su crecimiento en un medio de cultivo rico en nutrientes. Para ello se utilizó como referencia una curva de crecimiento en caldo TS, el cual se considera un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de MRSA. En la figura 29 se muestra la curva de crecimiento de MRSA en glucosa al 10 % en color gris y caldo TS en color negro. Puede observarse que ambas curvas son muy similares, indicando que la solución de glucosa al 10 % es una buena alternativa para el crecimiento de esta cepa bacteriana.

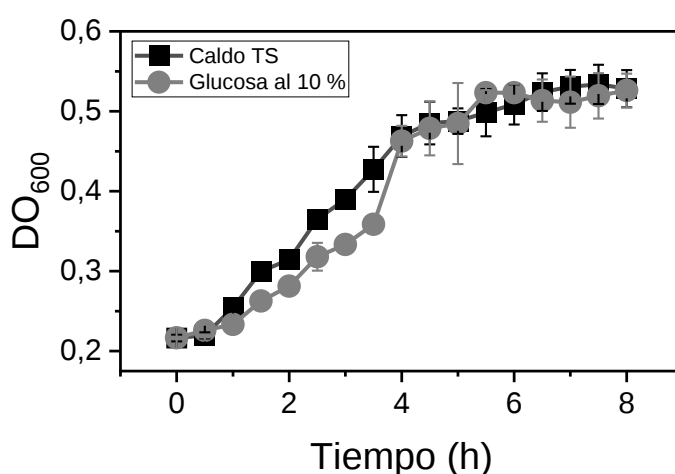


Figura 29. Curvas de crecimiento de MRSA en distintos medios de cultivo.

Caldo TS (negro) y solución de glucosa al 10 % (gris).

Luego de determinar que la solución de glucosa al 10 % es un medio adecuado para el crecimiento de MRSA, se procedió a realizar una caracterización espectroscópica de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en este medio de cultivo. Para ello, se tomaron espectros de absorción, emisión y excitación; además se midió el $\overline{D}_H$ de ambos tipos de partículas. No se observaron diferencias en los espectros o el $\overline{D}_H$ de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN medidos en soluciones de glucosa al 10 % o en agua. Estos resultados indican que la solución de glucosa al 10 % es un medio óptimo para la realización de ensayos de PDI con NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN.

4.1.4.3. Caracterización de NPC:PSMA+PtOEP@PFN

La última etapa de caracterización de estas partículas se realizó con NPC:PSMA+PtOEP@PFN, las cuales están dopadas volumétricamente con 10 % de PtOEP. El dopaje de las partículas con la porfirina es esencial porque la presencia de PtOEP aumenta la capacidad de producción de ROS, y en consecuencia serán las NPC:PSMA+PtOEP@PFN las que se utilizarán en los ensayos de PDI.

En la figura 30 se presentan espectros de absorción de NPC:PSMA+PtOEP (curva rosa) y NPC:PSMA+PtOEP@PFN (curva verde), donde se observa la aparición de dos transiciones a ~ 384 y ~ 537 nm las cuales corresponden a las bandas de la porfirina Soret y Q respectivamente.

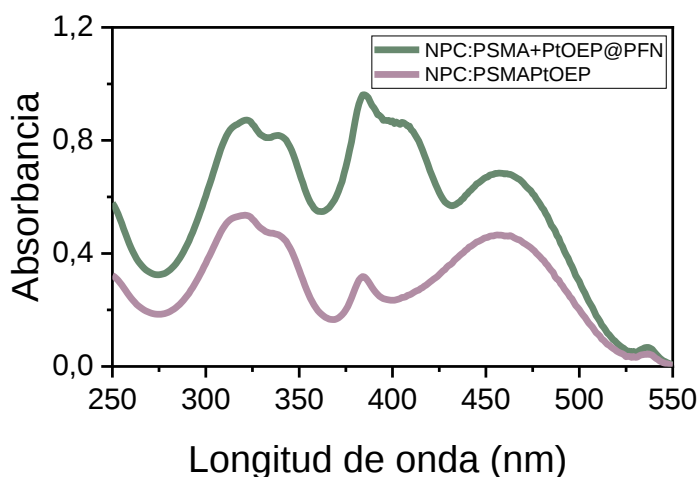


Figura 30. Comparación de espectros de absorción de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN en glucosa al 10 %. Rosa: NPC:PSMA+PtOEP (11,1 mg/L). Verde: NPC:PSMA+PtOEP@PFN (16,2 mg/L).

No se realizó la caracterización de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN mediante espectroscopía de fluorescencia debido a que la presencia de la porfirina desactiva prácticamente toda la emisión del F8BT, resultados que se ha reportado previamente en un trabajo del grupo de investigación.²⁷

Se midió el $\overline{D_H}$ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN en glucosa al 10 %. En la figura 31 se presentan los histogramas de distribución de tamaño de

NPC:PSMA+PtOEP (barras color rosa) y NPC:PSMA+PtOEP@PFN (barras color verde). Se realizó un ajuste gaussiano sobre ambos histogramas (curva negra) y los $\overline{D_H}$ obtenidos fueron de ~ 17 nm y ~ 19 nm para NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN respectivamente. Se observa que la distribución de tamaños es homogénea y los $\overline{D_H}$ en glucosa al 10 % son muy similares a los obtenidos en agua (ver figura 27) a pesar del agregado de la porfirina a la matriz de las partículas.

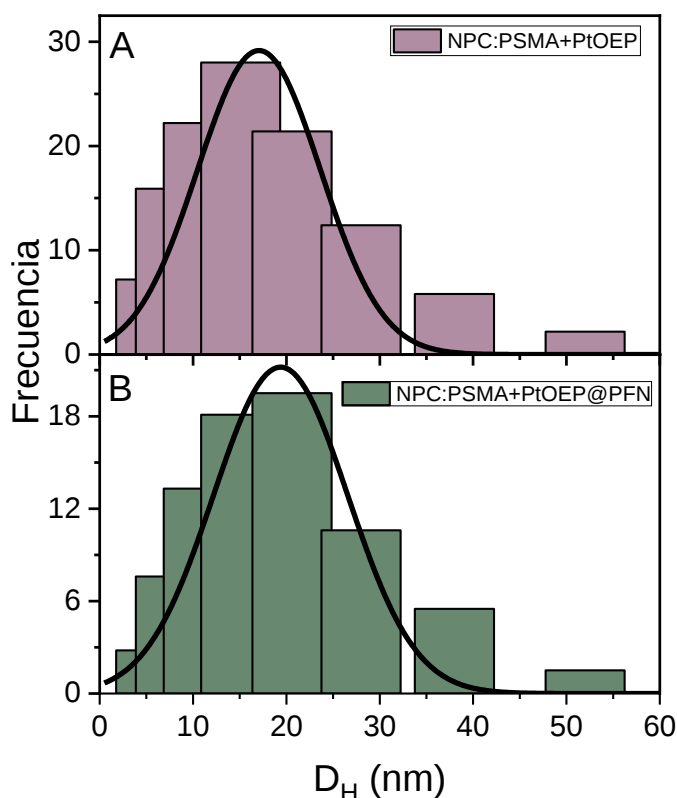


Figura 31. Distribución de tamaños de NPC:PSMA+PtOEP y

NPC:PSMA+PtOEP@PFN obtenida mediante DLS. Los datos de cada muestra fueron ajustados a una función gaussiana (línea continua negra). (A) NPC:PSMA+PtOEP en color rosa. (B) NPC:PSMA+PtOEP@PFN en color verde. Concentración de partículas utilizada 10 mg/L.

Adicionalmente, se tomaron imágenes de TEM de NPC:PSMA+PtOEP@PFN disueltas en glucosa al 10 %, las cuales se muestran en la figura 32. En dicha figura pueden observarse NPC:PSMA+PtOEP@PFN a distintas escalas: 200 (figura 32A), 100 (figura 32B) y 50 (figura 32C) nm. Se observa claramente que las partículas presentan forma

cuasiesférica y que su tamaño es bastante homogéneo. Luego se determinaron los diámetros de estas partículas a partir del análisis de imágenes con distintas magnificaciones, y con dichos datos se construyó el histograma correspondiente (barras) que se muestra en la figura 32D. Un ajuste gaussiano (línea continua negra) al histograma arroja en un diámetro promedio y SD de 23 nm, consistente con las medidas obtenidas mediante DLS (~ 20 nm).

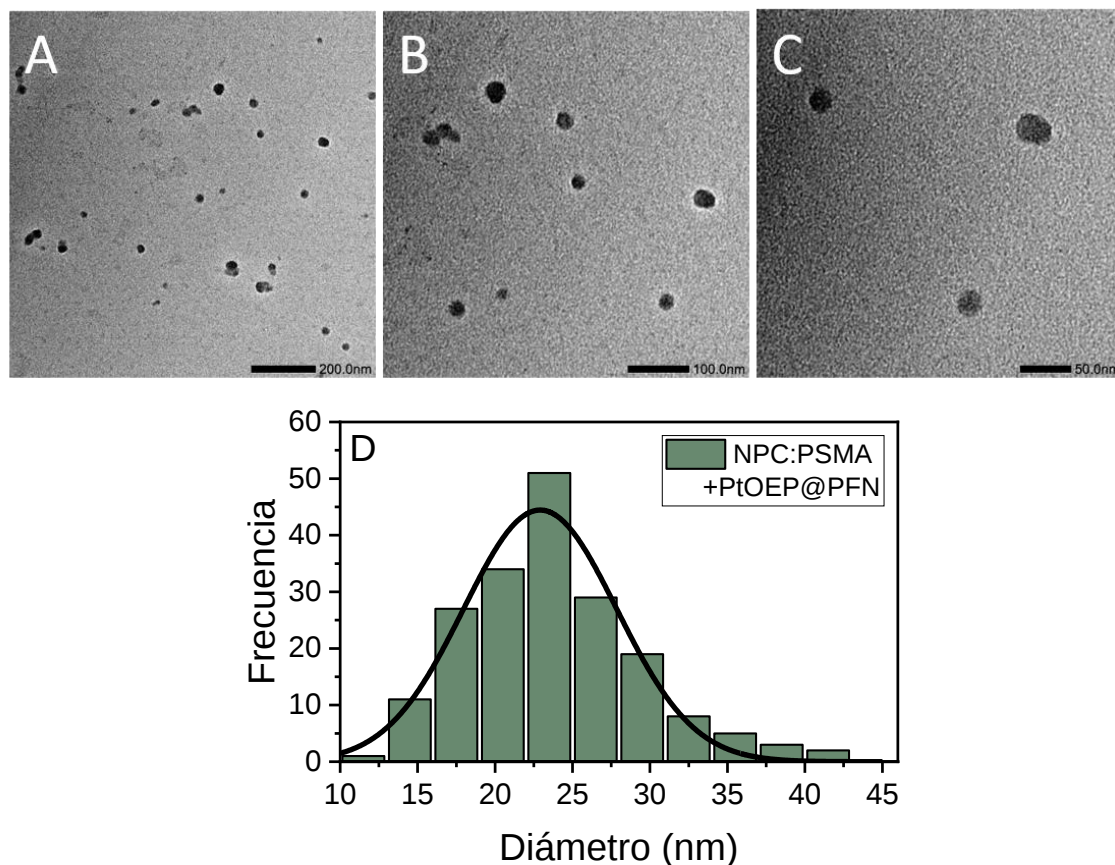


Figura 32. imágenes de TEM de NPC:PSMA+PtOEP@PFN Magnificaciones de cada imagen: 200 nm (A), 100 nm (B) y 50 nm (C). (D) Distribución de tamaños (barras) de NPC:PSMA+PtOEP@PFN medidos a partir de las imágenes de TEM y función gaussiana (línea continua negra) ajustada a los correspondientes datos. Concentración de partículas utilizada: 10 mg/L.

4.1.5. Medición del ζ de NPC:PSMA y NPC:PSMA+PtOEP@PFN

Un paso crucial en la caracterización de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN consistió en medir el ζ de cada partícula, como se describió en

la sección 3.3.4. El resultado de estas mediciones es importante porque permitiría confirmar si se ha logrado la inversión de cargas planteada en las hipótesis de esta tesis. Debido a la diferencia de cargas entre el PC catiónico PFN y la NPC:PSMA+PtOEP aniónica, se lograría adsorber el PFN en la superficie de las mismas originando a las NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Este proceso debería invertir la carga superficial de las partículas.

Los resultados de las medidas de ζ se muestran en la figura 33, así mismo, los correspondientes ζ promedio y su DE se encuentran resumidos en la tabla 5. Se observa que el ζ promedio de NPC:PSMA+PtOEP (diagrama de cajas rosa) es de $-27 \pm 2,3$ nm, mientras que aquel correspondiente a las NPC:PSMA+PtOEP@PFN (diagrama de cajas verde) es de $16,8 \pm 1,5$ nm. Este resultado confirma que el agregado de PFN produce la inversión de cargas eléctricas de la partícula y por lo tanto termina de confirmar que el PFN se adsorbe a las NPC:PSMA+PtOEP. De no haberse unido PFN a las NPC:PSMA+PtOEP, sería esperable que los resultados de esta muestra hubiesen mostrado dos poblaciones de partículas con diferentes tamaños y cargas opuestas.

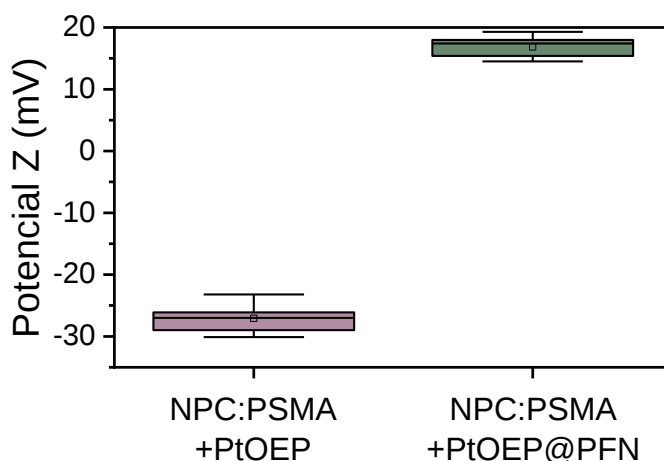


Figura 33. ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Las medidas se realizaron en glucosa al 10 %. Concentración de partículas utilizada: 6 mg/L. Color rosa: NPC:PSMA+PtOEP y color verde oscuro: NPC:PSMA+PtOEP@PFN.

En conjunto, las mediciones de ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN aportan evidencia directa y consistente de la formación de las partículas *core/shell*. El valor negativo registrado para NPC:PSMA+PtOEP confirma el carácter aniónico inicial de las mismas, mientras que la inversión hacia valores positivos tras

el autoensamblado con PFN demuestra de manera inequívoca la modificación de la superficie coloidal. Esta inversión de carga es indicativa de la adsorción efectiva del PC catiónico, validando así la formación de la arquitectura *core/shell* postulada inicialmente.

4.1.6. Cálculo del Φ_{Δ} de NPC:PSMA+PtOEP@PFN

Otra etapa decisiva en la caracterización de NPC:PSMA+PtOEP@PFN consistió en medir el Φ_{Δ} debido a que este parámetro cuantifica la eficiencia fotofísica que tienen estas partículas como PS para la PDI. la eficiencia de producción de $^1\text{O}_2$ está directamente relacionado con la eficiencia en las fototerapias.

Se midió el Φ_{Δ} de NPC:PSMA+PtOEP@PFN, utilizando el colorante Eosina Y como referencia, los detalles experimentales se describen en la sección 3.3.6. En la Figura 34 muestra el espectro de emisión NIR en estado estacionario característico de $^1\text{O}_2$ obtenido tras la excitación de NPC:PSMA+PtOEP@PFN (curva verde) y eosina Y (curva fucsia) en soluciones de D_2O con excitación a 486 nm (absorbancia igualada en ambas muestras a dicha longitud de onda). Estos experimentos arrojaron un valor de $\Phi_{\Delta} \sim 0,23$ para dichas partículas, que es esencialmente idéntico al valor medido previamente del grupo de investigación^{27,142} para las nanopartículas NPC:PSMA@PFN ($\Phi_{\Delta} \sim 0,24$). El significativo Φ_{Δ} que presentan las NPC:PSMA+PtOEP@PFN las hace muy adecuadas para la inactivación fotodinámica.

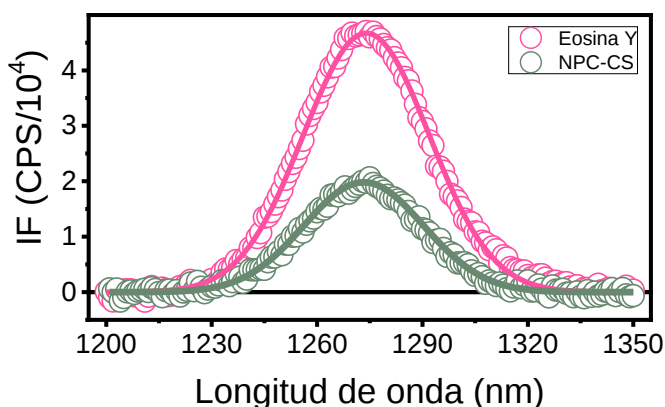


Figura 34. Espectros de luminiscencia NIR de $^1\text{O}_2$ utilizados para la determinación del Φ_{Δ} de NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Los círculos abiertos corresponden a los espectros de emisión y la línea continua al ajuste gaussiano realizado. Ambos espectros fueron en D_2O utilizando como fotosensibilizadores eosina Y (referencia, fucsia) y

NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde), respectivamente. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 486$ nm slit 29,4, $\lambda_{\text{emi}} = 1200\text{-}1350$ nm slit 30, señal S1c, $\text{abs}_{486} = 0,05$.

4.1.7. Interacción entre bacterias y NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN

Conociendo que las NPC:PSMA+PtOEP@PFN presentan carga superficial positiva, y, a partir de las hipótesis planteadas inicialmente, se esperaría que presenten una interacción electrostática significativamente mayor con las envolturas bacterianas en comparación a NPC:PSMA+PtOEP, las cuales poseen carga negativa. A partir de estudios previos dentro del grupo de investigación⁹³⁻⁹⁵, se sabe que las NPC:PSMA+PtOEP, a pesar de su naturaleza aniónica, son capaces de interaccionar significativamente con las superficies bacterianas e incluso se han registrado efectos citotóxicos considerables con el tratamiento de PDI usando dichas partículas. En consecuencia, una mejora en la interacción entre bacterias y NPC:PSMA+PtOEP@PFN debería traducirse en una mayor eficiencia terapéutica como se explicará en detalle más adelante. La interacción entre bacterias y NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, se estudió mediante tres técnicas independientes: citometría de flujo, ζ y visualización por TEM.

4.1.7.1. Citometría de flujo

El primer ensayo realizado consistió en monitorear la fluorescencia las bacterias que previamente fueron incubadas con NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN. Para ello se utilizó la técnica de citometría de flujo, cuyo fundamento y metodología se detalla en la sección 3.4.2.1. Se midieron suspensiones de MRSA incubadas con NPC:PSMA o NPC:PSMA@PFN) a dos concentraciones (5 y 10 mg/L) y utilizando dos tiempos de incubación (1 y 24 h), con el objetivo de estudiar como la naturaleza de las partículas, su concentración y el tiempo de incubación afectan su adsorción a bacterias. Se utilizaron NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN sin dopado volumétrico con PtOEP debido a que, como se ha mencionado anteriormente, la porfirina inactiva fuertemente la emisión del F8BT contenido en ambos tipos de partículas.

Una vez delimitadas las poblaciones de eventos relevantes (la selección de dichos eventos se detalla en el anexo), se procedió a estudiar la distribución de I_F de bacterias individuales para cada una de las muestras (control de bacteria sola, bacteria incubada con NPC:PSMA y bacteria incubada con NPC:PSMA@PFN). Estos datos se presentan en la figura 35. Los paneles 35A y 35B muestran histogramas correspondientes a bacterias incubadas durante 1 h y 24 h, respectivamente, con 5 mg/L de partículas. Mientras que los paneles 35C y 35D muestran histogramas correspondientes a bacterias incubadas durante 1 h y 24 h, respectivamente, con 10 mg/L de partículas. En todas las figuras se ve (de izquierda a derecha) primero el histograma que corresponde a la autofluorescencia de las bacterias (curva gris plata), en segundo lugar, se ve el histograma de I_F de bacterias incubadas con NPC:PSMA (curva rosa) y por último, se observa el histograma de I_F de bacterias incubadas con NPC:PSMA@PFN (curva verde). Comparando concentraciones (5 vs 10 mg/L, imágenes izquierdas y derechas respectivamente) se observa un leve corrimiento de los histogramas hacia mayores valores de I_F cuando el tiempo de incubación es de 1h, mientras que para 24 h no se observan diferencias a simple vista (imágenes superiores vs imágenes inferiores). Esto posiblemente se deba a que luego de 24 h de incubación, se saturó con partículas toda la superficie disponible de las bacterias (más adelante se detallarán los cálculos realizados para estimar la cantidad de partículas que hay por unidad de bacteria, lo que permitirá corroborar esa teoría). Entre estos resultados el hallazgo más relevante se debe a que, a pesar de las diferentes concentraciones y tiempos de incubación evaluados, en todos los casos se registró una mayor I_F cuando las bacterias fueron incubadas con NPC:PSMA@PFN. Este resultado se debe a la carga positiva de las partículas NPC:PSMA@PFN promueve una eficiente interacción electrostática con las envolturas bacterianas, que son negativas. Dicho comportamiento indica que la modificación superficial de las NPC:PSMA con PFN produce un cambio funcional determinante en la interacción entre bacterias y partículas, lo que potencialmente podría optimizar la eficiencia terapéutica de la PDI.

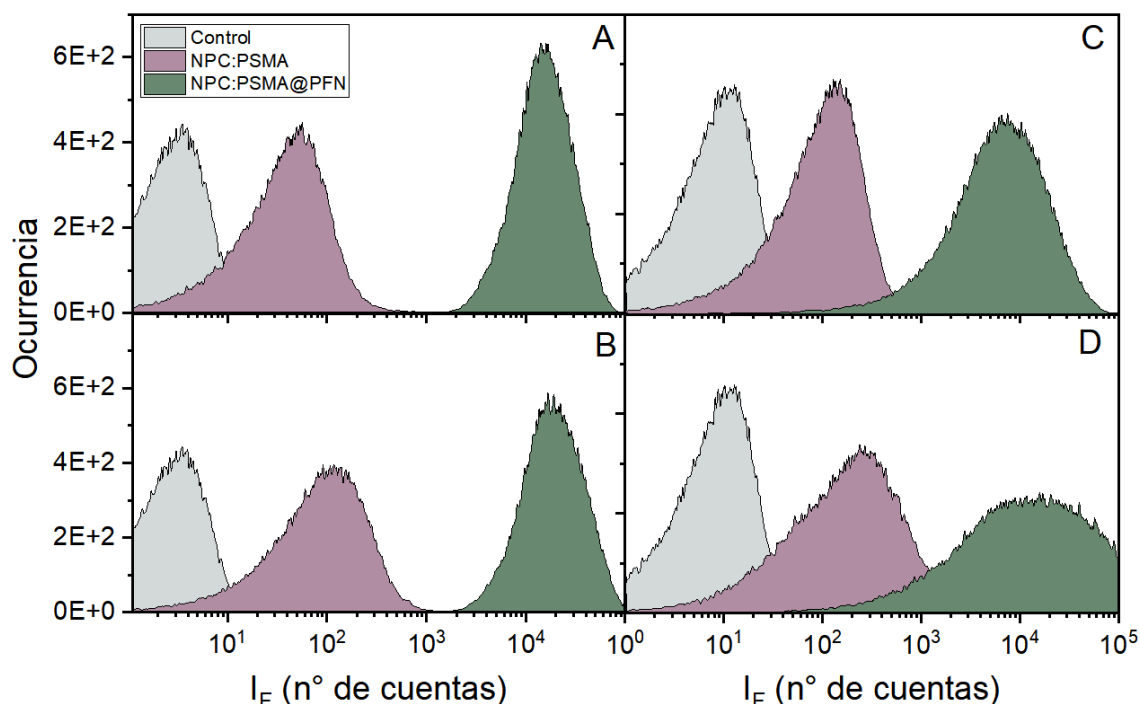


Figura 35. Histogramas de emisión de células individuales de cada muestra recogidos en el canal verde. Bacterias solas (gris plata), bacterias incubadas con NPC:PSMA (rosa) y bacterias incubadas con NPC:PSMA@PFN (verde oscuro). (A) 5 mg/L 1 h de incubación. (B) 5 mg/L 24 h de incubación. (C) 10 mg/L 1 h de incubación. (D) 10 mg/L 24 h de incubación. Condiciones de medición: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{emi} = 510 - 540 \text{ nm}$, 10^4 eventos.

En la figura 36 se presentan gráficos de barra los cuales cuantifican la I_F media de cada muestra, permitiendo una comparación más directa. La figura 36A corresponde a tiempos de incubación de 1 h y la figura 36B a 24 h de incubación. Las concentraciones de 5 y 10 mg/L se encuentran en el lado izquierdo y derecho respectivamente para cada tiempo de incubación. Se observa un aumento en la I_F de varios órdenes de magnitud cuando las bacterias son tratadas con NPC:PSMA@PFN (barra gris verde) en comparación con las bacterias sin tratar (barra gris plata) y bacterias incubadas con NPC:PSMA (barra rosa). Incluso este efecto se observa claramente en las dos concentraciones utilizadas y los dos tiempos de incubación. Con la excepción de las bacterias que fueron incubadas con 5 y 10 mg/L de NPC:PSMA@PFN durante 24 h, donde la I_F no llegó a aumentar el doble como en los casos anteriores.

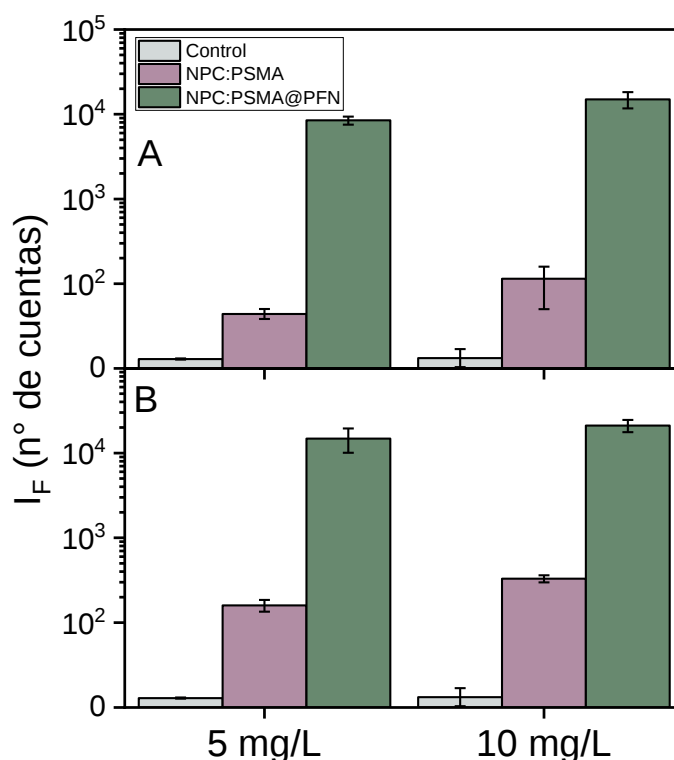


Figura 36. Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales recogidos en el canal verde. (A) 1h de incubación. (B) 24 hs de incubación.

Autofluorescencia de las bacterias solas (gris plata), I_F de bacterias incubadas con NPC:PSMA (rosa) e I_F de bacterias incubadas con NPC:PSMA@PFN (verde oscuro).

Condiciones de medición: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{emi} = 510 - 540 \text{ nm}$, 10^4 eventos.

Dentro del grupo de trabajo se ha estudiado previamente la interacción entre NPC y bacterias. En el trabajo de Martínez y colaboradores⁹³, donde se utilizaron NPC (de F8BT + PtOEP + el PE copolímero de poliestireno y polietilenglicol funcionalizado con grupo carboxilo (PS-PEG-COOH)) para realizar PDI sobre varias cepas de bacterias, entre ellas cepas de MRSA; se observó como aumenta la I_F de baterías individuales en función de la concentración de nanopartículas. También en un trabajo posterior de Martínez⁹⁵ se observó como aumenta la I_F de bacterias individuales cuando aumentó el tiempo de incubación con NPC:PSMA; este efecto se vio reflejado en distintas cepas bacterianas: MRSA, *K. pneumoniae* y *C. tropicalis*. En el trabajo de Chen y colaboradores se observa un comportamiento muy similar al descrito en el presente informe; donde estudia mediante

citometría de flujo la interacción entre *S. aureus* y liposomas fotodinámicos. Cuando el liposoma es catiónico, se ve un corrimiento de la fluorescencia hacia mayores valores de intensidad, lo que indica que la carga positiva favorece la interacción con las membranas celulares¹⁶⁵.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo demuestran que la interacción entre las nanopartículas y las bacterias depende de manera determinante de la carga superficial de las partículas. Si bien se observó un aumento de la I_F al incrementar la concentración de partículas, el efecto más significativo estuvo asociado a la carga positiva de las NPC:PSMA@PFN. En todas las condiciones evaluadas, las bacterias incubadas con NPC:PSMA@PFN exhibieron valores de I_F considerablemente superiores respecto al control y a las bacterias incubadas con NPC:PSMA, alcanzando incrementos de varios órdenes de magnitud. Este comportamiento confirma que la carga positiva de las NPC:PSMA@PFN favorece de manera sustancial su adsorción sobre la superficie bacteriana, predominantemente negativa, a través de interacciones electrostáticas. En definitiva, estos resultados permiten confirmar una de las hipótesis planteadas inicialmente, donde la carga positiva de las NPC:PSMA@PFN favorece la interacción con las envolturas bacterianas.

4.1.7.2. Cálculo del ζ de bacterias, bacterias + nanopartículas

El segundo estudio realizado para evaluar la interacción entre partículas y bacterias consistió en la medición del ζ de muestras de bacterias sin tratar, bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP y bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 37 y se describen a continuación.

En primer lugar, se midió la carga superficial de bacterias sin tratar (diagrama de caja gris plata), las cuales presentan un ζ de ~ -23 mV. Este valor era esperable, porque se conoce que todas las bacterias en general poseen una carga superficial negativa debido a la composición de su membrana plasmática y pared celular. Cuando las bacterias fueron incubadas con NPC:PSMA+PtOEP (diagrama de caja rosa), se observa una leve disminución del ζ (es decir que se vuelve más negativo) al compararlo con el control de bacterias (de ~ -23 a ~ -26 mV). Esta disminución del ζ se debe a que si bien tanto bacterias como NPC:PSMA+PtOEP presentan cargas negativas, las partículas logran adsorberse a la

superficie celular. Este efecto podría atribuirse a interacciones no electrostáticas como fuerzas de Van Der Waals, interacciones hidrofóbicas o puentes iónicos locales. Este efecto se ha reportado previamente en trabajos publicados dentro del grupo de investigación⁹³⁻⁹⁵. Un ejemplo de ello es el trabajo de Martínez y colaboradores⁹⁵, donde se observó un comportamiento similar al incubar *S. aureus* (-18,6 mV) con NPC de F8BT + PS-PEG-COOH. En este caso, el ζ disminuye levemente (-20,5 mV) a causa de la carga negativa de dichas partículas (-28,2 mV), indicando la adsorción de las mismas sobre la superficie bacteriana. Cabe aclarar que la cepa de *S. aureus* utilizada en dicho trabajo es diferente a la usada en esta tesis.

Por otro lado, cuando las bacterias fueron incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN (diagrama de caja verde), se registró una disminución significativa en el ζ de la suspensión, pasando de ~ -23 mV (bacterias sin tratar) a ~ -13 mV. Este resultado indica que, debido a su carga positiva, las NPC:PSMA+PtOEP@PFN se adsorben eficazmente neutralizando en cierta medida la carga negativa intrínseca de las bacterias. Este resultado se condice claramente con los ensayos realizados mediante citometría de flujo.

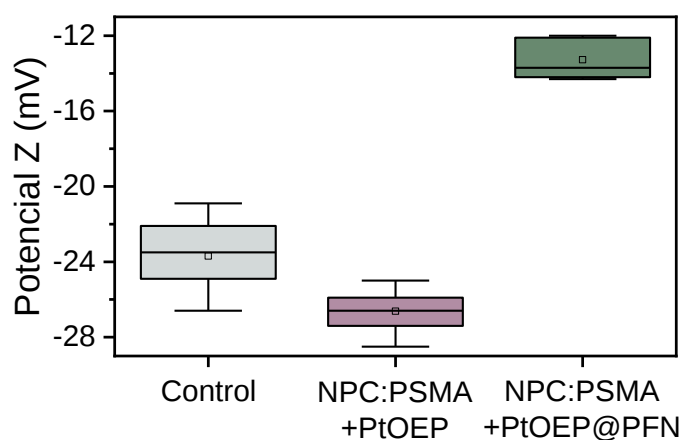


Figura 37. Medición de ζ promedio de bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Bacterias sin tratar (gris plata), bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentración utilizada 10 mg/L de partículas.

En conjunto, las variaciones observadas en el ζ de la suspensión de bacterias, bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP y bacterias incubadas con

NPC:PSMA+PtOEP@PFN constituyen una evidencia directa de la fuerte interacción electrostática que hay entre las NPCs *core/shell* y las superficies bacterianas. Por lo tanto, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que, debido a su carga positiva, las NPC:PSMA+PtOEP@PFN interaccionarían en mayor medida con las superficies bacterianas que las previamente desarrolladas (NPC:PSMA+PtOEP). Esta mejora, se debería a la interacción electrostática producida por la diferencia de carga entre la envoltura bacteriana aniónica y la NPC:PSMA+PtOEP@PFN catiónica.

4.1.7.3. Imágenes de TEM de bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN

La última etapa en el estudio de la interacción entre NPC:PSMA+PtOEP@PFN y bacterias consistió en tomar imágenes de TEM de una suspensión de bacterias incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN, tal como se describió en la sección 3.4.2.3. En la figura 38 se muestran imágenes de TEM de bacterias + NPC:PSMA+PtOEP@PFN a distintas magnificaciones. Las bacterias se marcan con una X en color amarillo, y se encuentran como células individuales (figuras 38B y 38D) o en forma de racimo (figuras 38A y 38B), que es la forma de crecimiento característica de *S. aureus*. Por otro lado, se muestran las NPC:PSMA+PtOEP@PFN las cuales se marcan con flechas verdes. Las partículas poseen una morfología cuasiesférica con diámetros ~20 nm, al igual que como se detalló previamente en la figura 32. Además, se observa como las NPC:PSMA+PtOEP@PFN se encuentran rodeando la superficie bacteriana e incluso se ven algunas partículas directamente depositadas sobre la superficie de las bacterias.

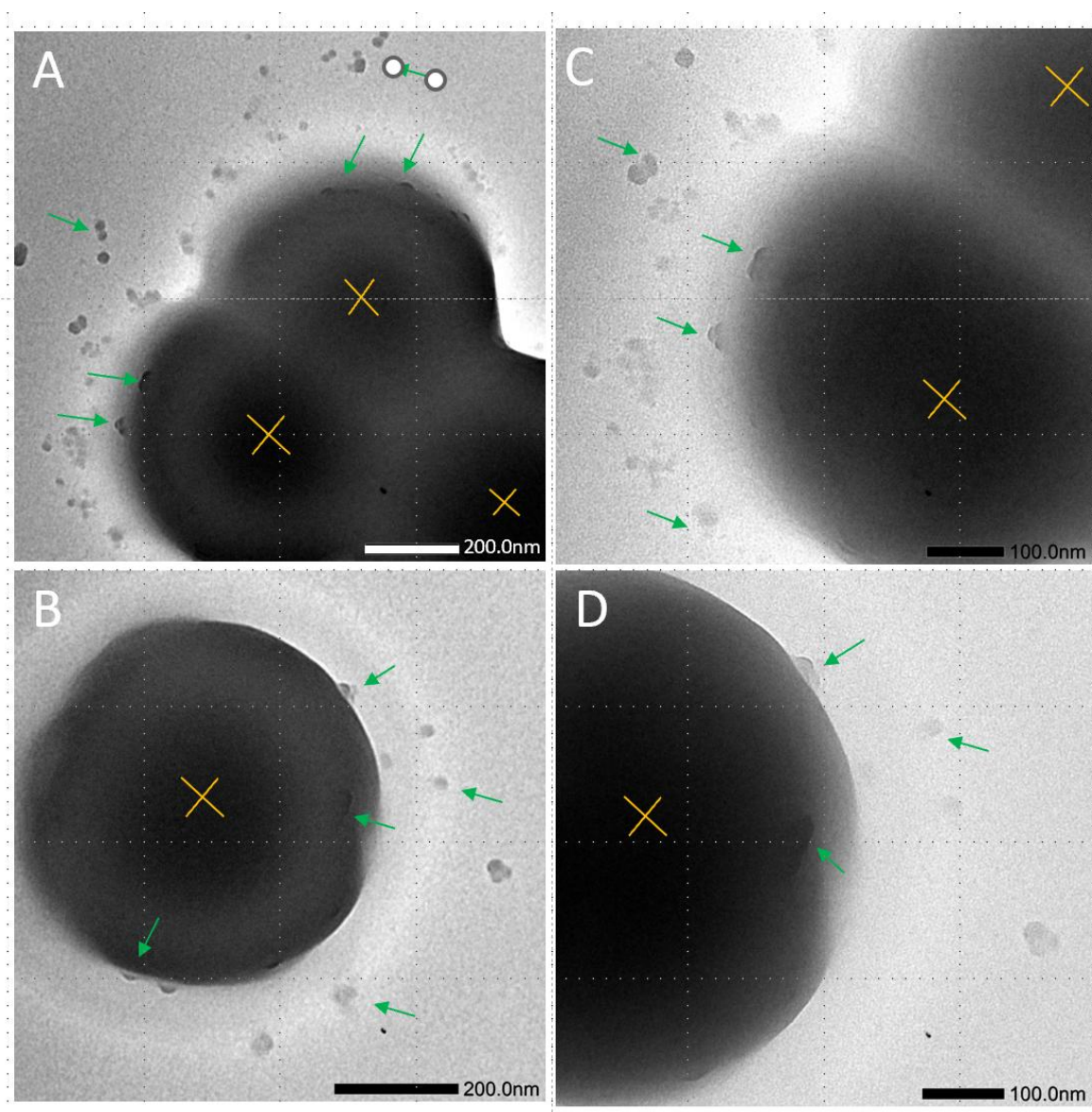


Figura 38. Imágenes de TEM de MRSA incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN.

Barra de escala: 200 nm (A-B) y 100 nm (C-D). Concentración de NPC:PSMA+PtOEP@PFN utilizada: 10 mg/L. Potencia utilizada para la visualización 100 mV.

A partir del análisis de imágenes obtenidas en TEM con distintas magnificaciones, se construyó un histograma de distribución de diámetros de las bacterias de la cepa de MRSA utilizada, el cual se presenta en la figura 39. Un ajuste gaussiano (línea continua negra) al histograma arroja en un diámetro promedio 591 nm, consistente con los datos reportados en

bibliografía, donde el tamaño de *S. aureus* varía entre 500 y 1500 nm según la cepa y el estadio del ciclo celular en el que se encuentre.^{189,190}

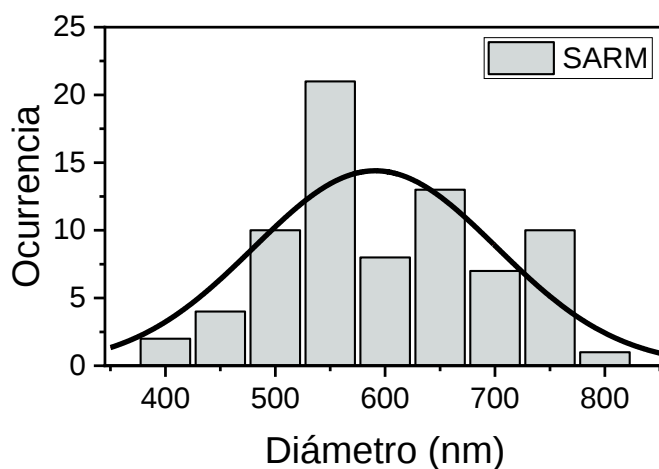


Figura 39. Diámetro de MRSA a partir de imágenes de TEM. Distribución de tamaños (gris plata) de MRSA y función gaussiana (continua negra) ajustada a los correspondientes datos.

A partir del diámetro de las NPC obtenido luego del análisis de las imágenes de TEM (22,9 nm) y del diámetro de la cepa de MRSA utilizada (591 nm) se determinó el número de NPC:PSMA+PtOEP@PFN necesarias para formar una monocapa sobre cada bacteria individual. Los detalles de este cálculo se tomaron de trabajos previos publicados por integrantes del grupo de investigación^{93,167} y describen en la sección 3.4.2.3. A partir de los cálculos realizados, se necesitarían ~ 2400 partículas individuales de NPC:PSMA+PtOEP@PFN para formar una monocapa sobre la superficie de MRSA.

Por otro lado, se hizo una estimación muy simple de la concentración molar de NPC:PSMA+PtOEP@PFN siguiendo dos trabajos previos del grupo^{27,167}. Esta estimación considera entre otras cosas la masa total de material (F8BT+PSMA), la densidad del material nanoparticulado y el diámetro medio de las partículas. A partir de dicha estimación, una solución de 10 mg/L (que es la concentración utilizada en todos los ensayos donde se estudió la interacción entre bacterias y partículas) de NPC:PSMA+PtOEP@PFN tiene una concentración molar de $\sim 1,9 \times 10^{-8}$ M. Mientras que la concentración de bacterias es 1×10^6 UFC/mL, lo que equivale a $1,7 \times 10^{-15}$ M. Luego, dividiendo la concentración de partículas por la concentración de bacterias se obtiene la cantidad de NPC:PSMA+PtOEP@PFN

disponibles por cada bacteria individual. A partir de esta última cuenta, se determina que la cantidad de NPC:PSMA+PtOEP@PFN que hay presentes por cada bacteria individual es de $\sim 1,1 \times 10^7$. Es decir que, en las suspensiones utilizadas en estos ensayos, hay ~ 4600 más NPC:PSMA+PtOEP@PFN de las que se necesita para formar una monocapa sobre cada bacteria individual. Estos resultados explicarían porque luego de 24 hs de incubación de NPC:PSMA+PtOEP@PFN y bacterias no se produjo una diferencia significativa en la I_F registrada, sugiriendo que el proceso de adsorción de las partículas sobre la superficie bacteriana es relativamente rápido; y que dichas membranas se saturan pronto. En consecuencia, no serían necesarios elevados tiempos de incubación entre bacterias y partículas para obtener la eficiencia fotodinámica deseada.

En el trabajo de Wang y colaboradores¹⁹¹ estudian la interacción entre NPCs catiónicas (estabilizadas con bromuro de cetiltrimetilamonio) y bacterias midiendo ζ . La bacteria *E. coli* tiene un ζ de ~ -49 mV y luego de ser incubada con la NPCs catiónica dicho potencial disminuye a ~ -20 mV (se torna menos negativo). El ζ de las NPCs catiónicas estudiadas está en ~ 30 mV. El aumento del ζ , luego de incubar bacterias + NPC, fue significativo, lo cual es entendible porque estas NPCs catiónicas tienen un ζ casi el doble de positivo en comparación con las NPC:PSMA+PtOEP@PFN que se han obtenido en esta tesis (figura 34). A pesar de la significancia lograda en el trabajo de Wang y colaboradores, es importante destacar que no mencionan la concentración de NPCs utilizada para dicho ensayo. En el trabajo de Liu y colaboradores⁴⁴, se observa el mismo comportamiento que en el caso anterior: utilizan NPC de un copolímero de poli(porfirina)-b-poli(floureno) (PPF), las cuales presentan un ζ 24,9 mV y observan que, al incubar dichas partículas con *S. aureus* y *E. coli*, logran invertir la carga de la suspensión de bacterias + NPC, aunque no especifican la concentración de NPC y de bacteria utilizada para el ensayo.

En varios trabajos se ha registrado que la presencia de grupos amino en la superficie de las NPCs favorece la interacción con las membranas bacterianas, lo cual permite una mejor adherencia (principalmente por el efecto electrostático) sobre las mismas. Y en muchos casos, esta mayor adherencia produce una mejora en la terapia fotodinámica¹⁴. Una mejora en dichos procesos (acumulación e inactivación) podría deberse a que las NPCs que contienen grupos amino en su superficie tienden a interaccionar con mayor facilidad, favoreciendo la interacción con las membranas celulares¹²⁸.

Esta interacción mejorada entre bacterias y NPC:PSMA+PtOEP@PFN debería traducirse necesariamente en una mejora en la eficiencia de la PDI con respecto a la utilización de NPC:PSMA+PtOEP. Dicho efecto podría deberse a que, al estar en contacto estrecho con las bacterias, la producción de ROS durante la irradiación ocurrirá de forma localizada en el mismo espacio físico donde se encuentran las estructuras biológicas. Esto subsana la gran limitante que tienen estas especies, especialmente el $^1\text{O}_2$, que es su corto tiempo de vida en medios biológicos. Este tiempo limitado deriva en la desactivación de las especies a distancias de difusión muy cortas ($< 100 \text{ nm}$) lo que impide que reacciones con las dianas bacterianas cuando ambas estructuras (partículas y bacterias) están difundiendo libremente en solución.

4.1.8. Estudios de PDI

4.1.8.1. Citotoxicidad fotoinducida sobre cultivos planctónicos

Los primeros ensayos para estudiar la citotoxicidad generada por la PDI usando partículas se realizaron sobre cultivos planctónicos. Estudiar el daño fotoinducido sobre esta forma de crecimiento bacteriano permite determinar el efecto producido sobre la población total, el cual puede ser bacteriostático o bactericida. La caracterización del efecto citotóxico producido es de gran relevancia para asegurar la eliminación completa de la infección. Además, permite conocer el tiempo de recuperación bacteriana, si es que ocurre, de las bacterias que sobrevivieron a la PDI.

4.1.8.1.1. Curva de muerte

El primer ensayo consistió en realizar una curva de muerte, para el cual se cuantificó la carga bacteriana (mediante recuento de colonias) en función del tiempo de irradiación y la concentración de partículas (los detalles del ensayo se encuentran especificados en la sección 3.5.3.1.). Se probaron dos concentraciones de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN: 1 y 5 mg/L + un control de bacterias sin partículas.

En la figura 40 se observa como disminuye la carga bacteriana a medida que aumenta el tiempo de irradiación. El grupo control (curva gris plata) consistió en bacterias en ausencia

de partículas que fueron irradiadas en iguales condiciones que los tratamientos con partículas. En dicho control no se observa una disminución en la carga bacteriana durante los 30 min de irradiación. Lo cual indica que la dosis de luz utilizada no tiene efecto citotóxico por sí misma. Cuando las bacterias fueron tratadas con NPC:PSMA+PtOEP (curva color rosa) y luz, se observa una leve disminución de la carga bacteriana a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Luego de 30 min, se logró una disminución de 2,03 y 1,54 log en UFC/mL para las dosis de NPC:PSMA+PtOEP de 5 y 1 mg/L respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP genera un efecto bacteriostático (este efecto indica que se produjo la inactivación del 99 % de la población bacteriana¹⁹²). En cambio, cuando las bacterias fueron tratadas con 5 mg/L NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro) y luz se logró una disminución de 4,11 log en UFC/mL a partir de los 25 min de irradiación. Cuando la dosis de NPC:PSMA+PtOEP@PFN fue de 1 mg/L se obtuvo una disminución de 3,01 log en UFC/mL luego de 30 min de irradiación. Los resultados del tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz indican que el efecto producido en la población es bactericida para las dos concentraciones de NPC:PSMA+PtOEP@PFN. El efecto bactericida indica que se produjo la inactivación del 99,9 % y 99,99 % de la población bacteriana para las concentraciones de 1 mg/L y 5 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN respectivamente¹⁹².

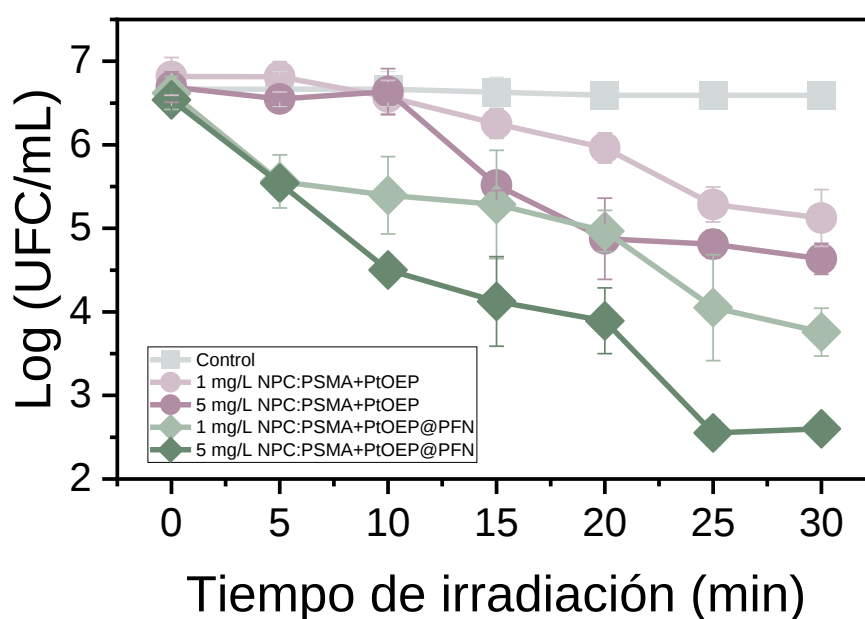


Figura 40. Curva de muerte de MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Disminución de la carga bacteriana en función del tiempo de

irradiación y la concentración de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Se irradió la muestra cada 5 min (dosis de luz cada 5 min = 4,8 J/cm²) y se cuantificó la carga bacteriana luego de cada ciclo de irradiación. Grupo control, MRSA sin partículas (gris plata), MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP (verde oscuro). Los colores más oscuros corresponden a las dosis más altas (5 mg/L) y los más claros a las dosis más bajas (1 mg/L).

Se ha reportado previamente, dentro del grupo de trabajo, la gran capacidad que tienen las NPCs de inactivar bacterias cuando éstas son irradiadas con luz. En un trabajo publicado en el año 2020⁹³, se han tratado distintas especies bacterianas como *E. coli*, *S. aureus* y diferentes cepas de MRSA con NPCs compuestas por F8BT + PtOEP + PS-PEG-COOH (como PE) usando un panel LED (420 ± 17 nm, dosis de luz: 4,8 J/cm² cada 5 minutos). En un trabajo posterior de la misma autora⁹⁵, se utilizaron NPC:PSMA+PtOEP (10 mg/L) y las mismas dosis de luz, para ensayos de PDI sobre distintos patógenos asociados a mastitis bovina, entre ellos *S. aureus*. A pesar de la carga superficial negativa que presentaron estas partículas, ejercen un efecto significativo en la PDI.

Además, en bibliografía se ha reportado ampliamente el efecto mejorado en la PDI cuando las bacterias son tratadas con partículas catiónicas en comparación a partículas aniónicas. Un ejemplo de ello, son los trabajos de Mou⁶² y Wang¹⁹³, donde se compara la actividad antibacteriana de partículas de BODIPY con carga positiva y negativa frente a *S. aureus*. En ambos casos, reportaron una mayor eficiencia terapéutica cuando las partículas son positivas con respecto a sus contrapartes negativas. Los resultados de estos dos trabajos se condicen con los presentados en esta tesis, donde el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP aniónicas genera un efecto bacteriostático mientras que el tratamiento en iguales condiciones, de dosis de luz y partículas, con NPC:PSMA+PtOEP@PFN catiónicas genera un efecto bactericida.

4.1.8.1.2. Curva de crecimiento post PDI

Con el fin de evaluar si el efecto observado en la curva de muerte corresponde a una inhibición reversible del crecimiento para el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y luz, o a

un daño irreversible para el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Se realizó una curva de crecimiento post PDI. En dicho ensayo, se tomaron las suspensiones bacterianas luego de 30 minutos de irradiación (dosis de luz 28,8 J/cm²), se pasaron a un medio de cultivo fresco y se midió la OD₆₀₀ cada 1 h, durante 8 h posteriores al tratamiento. Las concentraciones de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN usadas en este ensayo fueron 1 y 5 mg/L.

Los resultados de recuento de UFC/mL muestran que ambos tratamientos tienen un efecto significativo. La distinción entre ambos es más cuantitativa más que cualitativa, reflejando diferencias en la eficacia del daño oxidativo inducido y la capacidad de regeneración de las bacterias que sobrevivieron a la terapia. Como la disminución de la población bacteriana no es del 100 %, se realizaron curvas de crecimiento con el objetivo de conocer el efecto citotóxico a largo plazo que ejerce el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Para ello se midió la OD₆₀₀ cada 1 h, durante 8 h posteriores al tratamiento. Los detalles experimentales se encuentran en la sección 3.5.3.2.

En la figura 41 se muestran las curvas de crecimiento post tratamiento de MRSA en ausencia de partículas (curvas color gris plata) , MRSA tratadas con NPC:PSMA+PtOEP (curvas color rosa) y bacterias tratadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN (curvas color verde). Las figuras 41A y 41C corresponden a los controles en oscuridad, y las figuras 41B y 41D a los tratamientos con luz. Del lado izquierdo se muestran los resultados correspondientes al tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y del lado derecho el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN. En oscuridad, se observó un crecimiento normal (comparado con el control, gris plata) de MRSA + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y MRSA + NPC:PSMA+PtOEP (verde oscuro) a las 2 concentraciones estudiadas. Esto confirma nuevamente la baja toxicidad intrínseca (en ausencia de fotoexcitación) de las dos formulaciones de partículas. Al analizar los tratamientos realizados NPC:PSMA+PtOEP + luz y NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz, se evidencia en primer lugar, un crecimiento celular adecuado de los controles que no tienen partículas, pero la diferencia entre los tratamientos es significativa. Cuando las bacterias fueron tratadas con NPC:PSMA+PtOEP + luz (figura 41C), se observó crecimiento celular para las dos concentraciones evaluadas durante las 8 h de incubación. Esto indica que algunas células sobrevivieron al tratamiento de PDI, lograron recuperarse y comenzaron a replicarse. Este resultado se condice con los obtenidos previamente para la curva de muerte, donde determinó que el efecto producido por este tipo

de partículas es bacteriostático. Como la disminución de la viabilidad celular no fue completa luego del tratamiento, queda una cantidad considerable de células capaces de desarrollarse cuando se encuentran en un entorno adecuado. Mientras que las bacterias que fueron tratadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz (figura 41D) tuvieron dos efectos diferentes: cuando la concentración fue de 1 mg/L si se registró crecimiento bacteriano a lo largo de las 8 h; esto podría deberse a que la OD utilizada en este ensayo fue mucho mayor que la utilizada en la curva de muerte entonces, la concentración de NPC:PSMA+PtOEP@PFN fue insuficiente para eliminar la elevada carga bacteriana total. La mayor densidad de carga bacteriana utilizada en este ensayo con respecto al anterior obedece a la necesidad de poder seguir el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría UV-vis. En cambio, cuando el tratamiento se realizó con 5 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN, no se registró crecimiento bacteriano a lo largo de las 8 h. Esto se condice claramente con los resultados de la curva de muerte, donde la acción producida por este tratamiento es bactericida. La disminución de la viabilidad celular luego del tratamiento fue tan grande que no quedaron suficientes bacterias viables para crecer y generar una población apreciable en el tiempo estudiado.

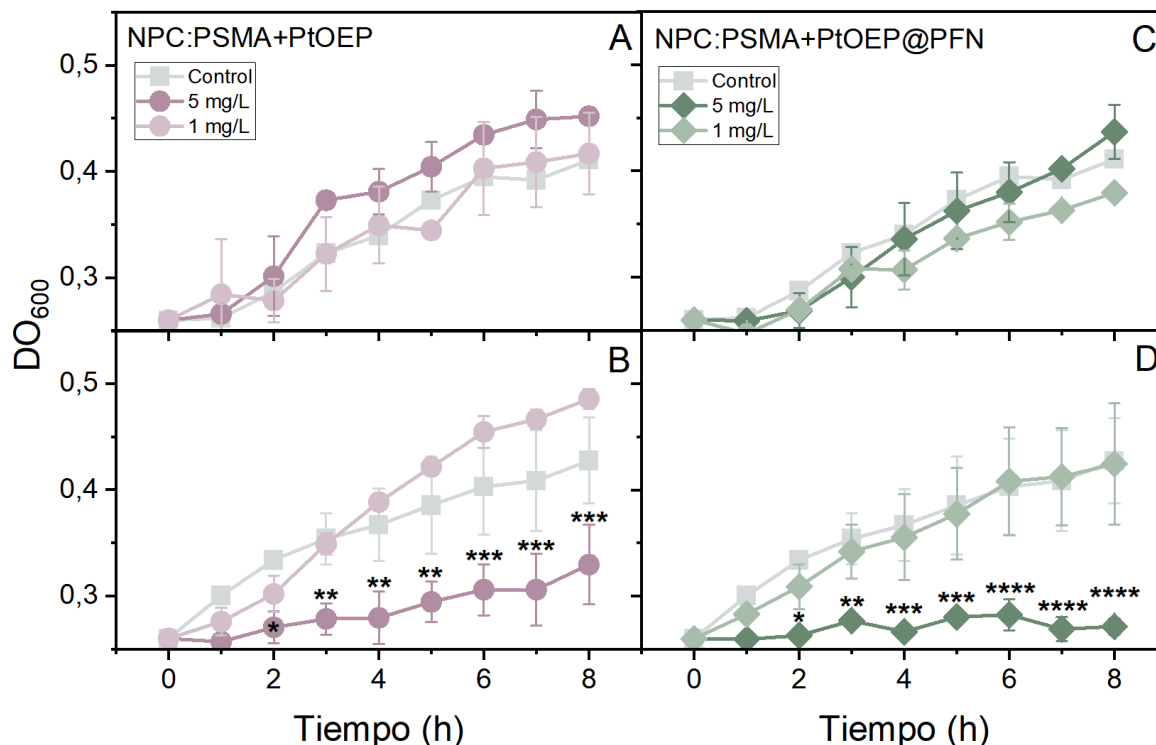


Figura 41. Curvas de crecimiento post PDI para MRSA tratado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. (A-C) controles en oscuridad. (B-D)

tratamiento con luz. Gris plata: control, rosa: tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y verde oscuro tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Colores más claros y más oscuros corresponden a 1 y 5 mg/L respectivamente de partículas. Dosis de luz usada: 28,8 J/cm².

En un estudio previo realizado por el grupo de trabajo⁹³, en el que se implementaron protocolos PDI sobre distintos tipos de bacterias resistentes a antibióticos (utilizando NPC de F8BT + PS-PEG-COOH + PtOEP), también se determinaron curvas de crecimiento del mismo tipo en una cepa de *S. aureus* ($10^7 - 10^8$ UFC/mL) incubada sin partículas y con 6,5 mg/L de NPC. A partir de las 4 h de incubación post irradiación, comenzó a observarse un detenimiento notable sobre el crecimiento celular del grupo tratado con NPC + luz, aunque hubo un leve crecimiento transcurridas las 8 h de tratamiento. Además, se aprecia una leve disminución de la carga bacteriana en los controles de bacteria + luz y bacteria + NPC sin luz. Comparando los resultados de dicho trabajo con los mostrados de este informe, se logra un efecto citotóxico similar en las curvas de crecimiento, lo cual es bastante lógico debido a que las formulaciones, condiciones de síntesis y tratamiento son muy similares entre sí. Pero, al analizar los resultados obtenidos a partir del tratamiento de las NPC:PSMA+PtOEP@PFN, se observa que las mismas generan un efecto citotóxico mucho más marcado. Esto indica que la presencia del *shell* de PFN sobre la partícula está favoreciendo de la interacción entre bacteria y NPC:PSMA+PtOEP@PFN aumentando la efectividad del tratamiento PDI, incluso a menores concentraciones que las previamente estudiadas. En el trabajo de Liu y colaboradores⁴⁴ donde utilizaron NPCs de PPF para PDI frente a *S. aureus*, los autores observaron un efecto similar a partir de 16 mg/L de estas partículas, una concentración 3 veces mayor que en lo mostrado en esta tesis y con una dosis de luz significativamente mayor (600 mW durante 10 min). Cabe recalcar que no se especifica la carga bacteriana utilizada para este ensayo.

4.1.8.1.3. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos

El último ensayo realizado para estudiar el daño fotoinducido sobre cultivos planctónicos consistió en tomar imágenes de SEM de cultivos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Esta técnica permite evaluar el daño

estructural bacteriano (cambios en la forma y tamaño) producido por el tratamiento. Los detalles experimentales se describen en la sección 3.5.3.3.

En la figura 42 se presentan imágenes de SEM tomadas a bajas magnificaciones. Las imágenes superiores corresponden al grupo control de bacterias sin partículas e irradiadas (figuras 42A y 42B), las imágenes centrales presentan a bacterias tratadas con NPC:PSMA+PtOEP y luz (figuras 42C y 42D) y las inferiores muestran a bacterias tratadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz (figuras 42E y 42F). En términos generales, se observa una disminución en la carga bacteriana en las imágenes de los tratamientos con respecto al control. Dicha reducción es más pronunciada cuando la bacteria ha sido tratada con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz. La menor cantidad de células detectadas podría atribuirse a que dicho tratamiento desencadena muerte celular por lisis, lo que implica la pérdida de la integridad estructural bacteriana. En consecuencia, gran parte de la biomasa bacteriana se ha perdido durante los pasos de centrifugación y lavados requeridos para la preparación de la muestra. Por ello, es probable que las bacterias observadas correspondan únicamente a aquellas que conservaron suficiente integridad estructural tras el tratamiento previo a la toma de imágenes. Si bien hubiera sido deseable minimizar los pasos de lavado y centrifugación para evitar la posible pérdida de biomasa, los múltiples pasos de lavado y deshidratación son indispensables para garantizar una adecuada preparación y visualización de las muestras de acuerdo con el protocolo puesto a punto previamente.

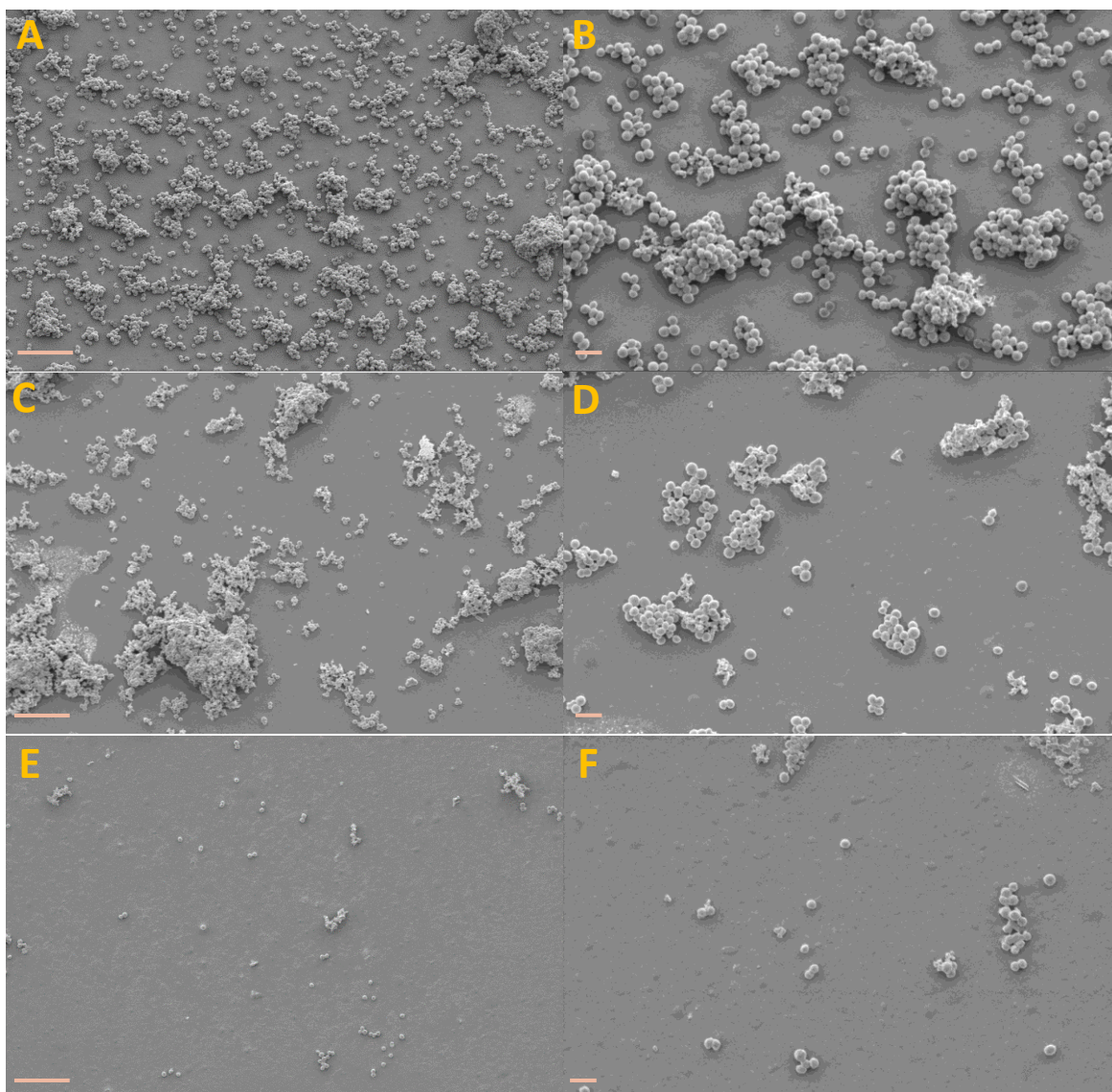


Figura 42. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 3 y 7 KX. (A-B) control de bacteria MRSA sola irradiada. (C-D) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP y luz. (E-F) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Barra de escalas de 10 μm (lado izquierdo) y 2 μm (lado derecho).

En la figura 43 se muestran imágenes de SEM organizadas de la misma manera que para la figura 43, pero con magnificaciones mayores. En estas figuras comienza a verse con mayor detalle cada muestra. En el grupo control (bacterias sin partículas) irradiado se observa claramente la estructura de “coco” característica de *S. aureus*, bacterias esféricas y turgentes. Mientras que en los tratamientos con NPC:PSMA+PtOEP y luz (figuras 43C y

43D) y NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz (figuras 43E y 43F) comienzan a aparecer detritos celulares, los cuales están marcados con círculos amarillos. Teniendo en cuenta la relación detritos/bacterias, esta es mayor cuando el tratamiento se realizó con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz, lo cual se condice con los resultados de los ensayos anteriores. Además, se observa que las bacterias que recibieron este tratamiento no tienen una estructura normalmente esférica y turgente como si lo presentan las bacterias del grupo control, indicando también un posible daño a nivel de envoltura (pared bacteriana). En las imágenes del tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y luz, se observa un puntillado brillante en el soporte de vidrio donde se ha colocado la muestra (marcado con rectángulos color rojo), dicho puntillado podría asociarse a la presencia de NPC:PSMA+PtOEP adheridas al sustrato ya que el polímero PEI que recubre el vidrio presenta carga positiva.

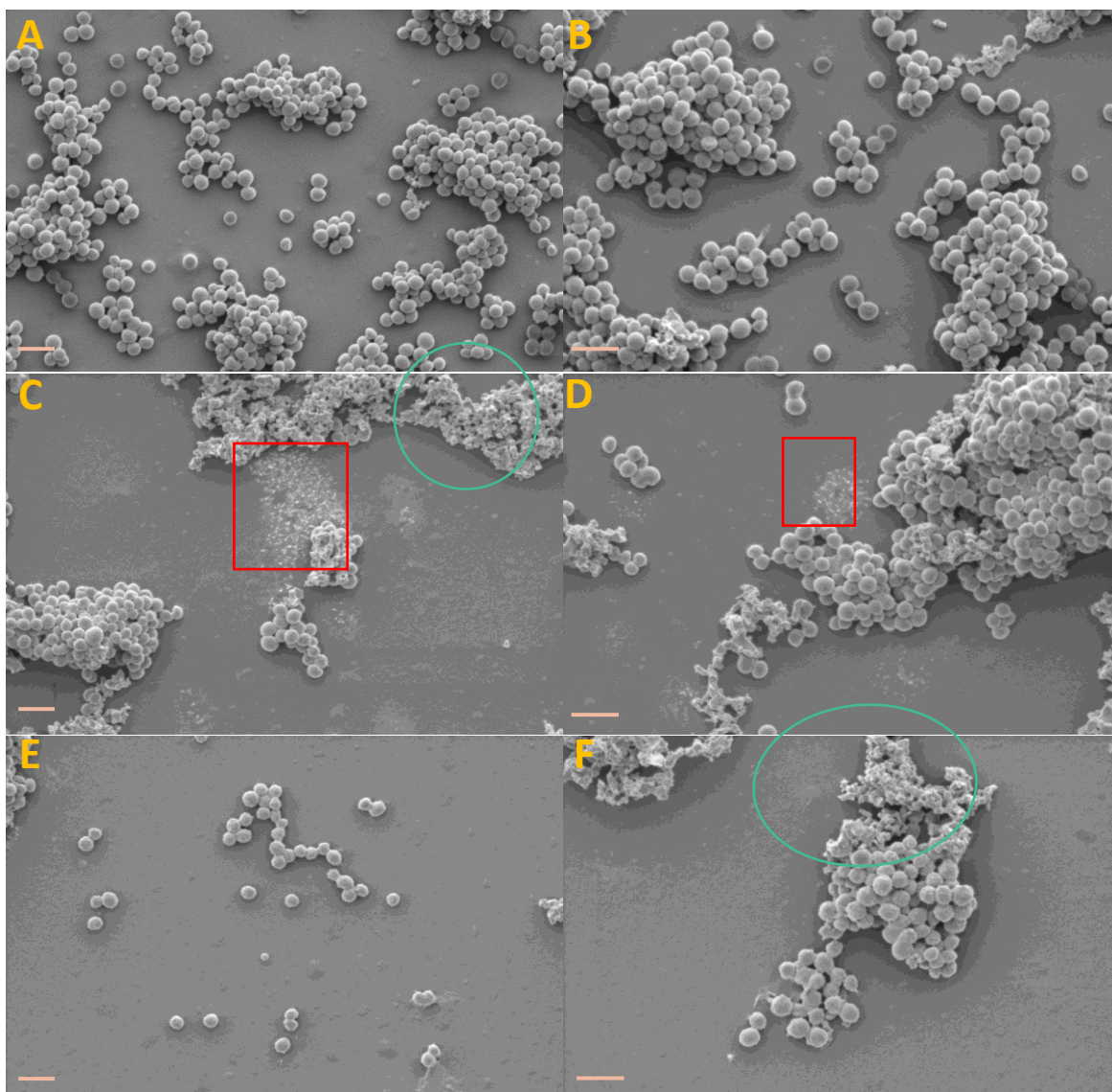


Figura 43. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 10 y 13 KX (A-B) control de bacteria MRSA sola irradiada. (C-D) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP y luz. (E-F) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Barra de escalas de 2 μ m en ambos lados.

En la figura 44 se muestran imágenes de SEM organizadas de la misma manera que para la figura 44, pero ahora con magnificaciones de 15 y 20 KX, estas son las mayores magnificaciones que permite el equipo obteniendo una buena calidad de imagen (para este tipo de muestras). En las imágenes de la muestra control (bacterias sin partículas) irradiada (figuras 44A y 44B) se observa la estructura normal de las bacterias ahora con mayor detalle,

donde las células se ven redondeadas y turgentes y casi no se observan detritos celulares. Cuando las células fueron tratadas con NPC:PSMA+PtOEP y luz (44C y 44D) se observa nuevamente el puntillado en el vidrio soporte de la muestra marcado con cuadrados rojos; es importante destacar que dicha estructura sólo se observa con este tratamiento. Al igual que en las figuras anteriores, se observa presencia de detritos celulares producto de la PDI, marcados con círculos amarillos. Pero en esta magnificación el cambio más notable se evidencia en el tratamiento realizado con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz, donde la presencia de detritos celulares es mucho más notoria (marcados con círculos amarillos). También se observa que la superficie típica “coco” pierde turgencia y se deforma un poco su estructura redondeada, sumado a que las bacterias presentan pequeñas protuberancias en lo que sería su envoltura (marcadas con estrellas verdes).

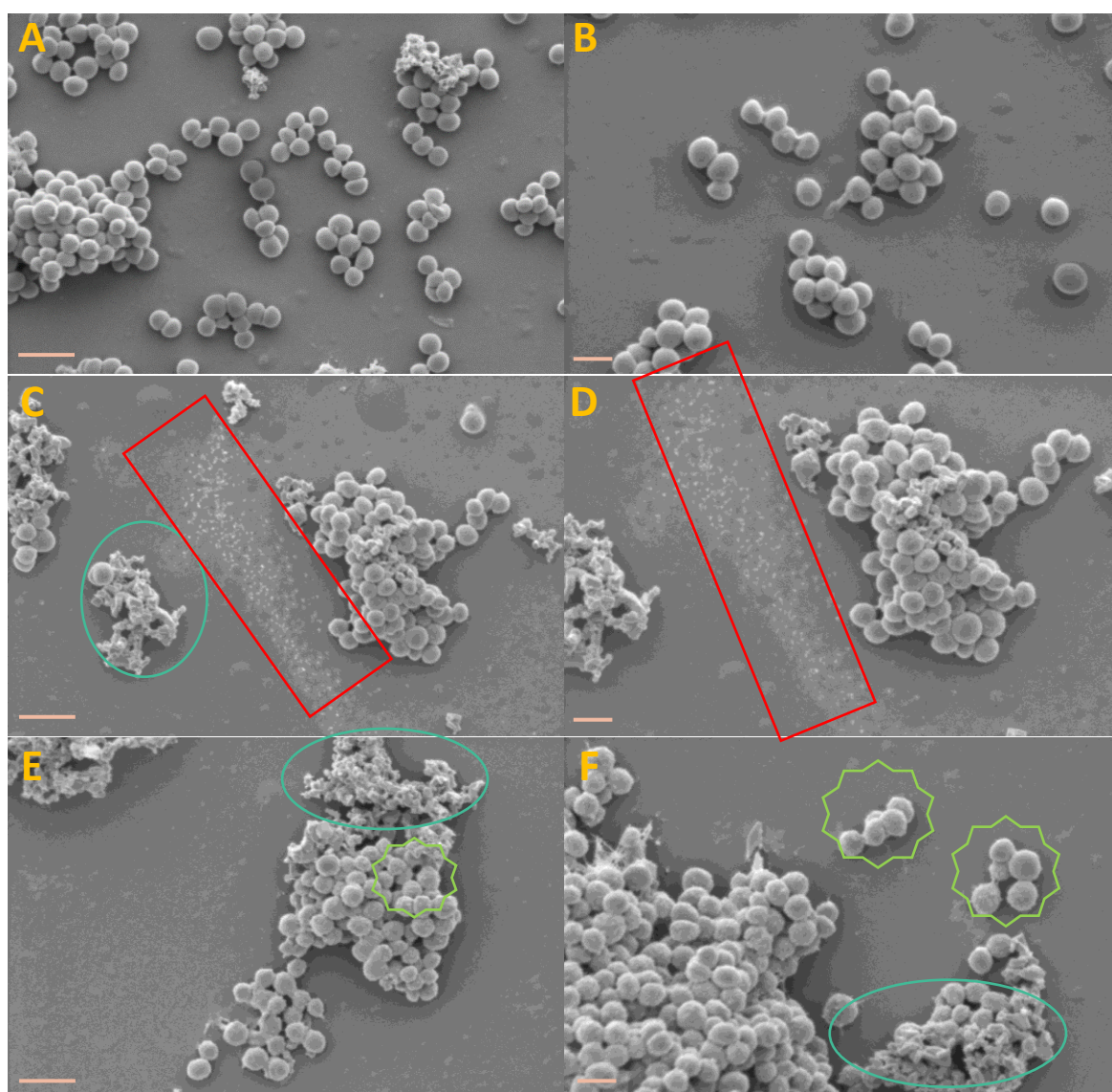


Figura 44. Imágenes de SEM de cultivos planctónicos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN, magnificaciones 15 y 20 KX. (A-B) control de bacteria MRSA sola irradiada. (C-D) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP y luz. (E-F) bacteria tratada con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Barra de escalas de 2 μm (lado izquierdo) y 1 μm (lado derecho).

A partir de lo observado se puede deducir que el daño generado a nivel celular, produce por un lado la lisis de las bacterias, indicado por la menor carga bacteriana observada en los tratamientos junto con el aumento de detritos celulares en estas muestras. Por otro lado, se observa también una cierta alteración en la pared celular cuando las bacterias reciben el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN+ luz. Dicha alteración no podría indicar que hay NPC:PSMA+PtOEP@PFN depositadas en la superficie debido a que el pequeño tamaño que estas presentan, haciendo que no se logre obtener una visualización clara, que permita distinguir las partículas de morfología propia de las bacterias, debido a la resolución que presenta el equipo utilizado. Esta alteración en la estructura celular podría deberse al daño fotooxidativo generado por la PDI.

En bibliografía se ha reportado extensivamente cómo el daño fotooxidativo altera la estructura de las paredes bacterianas de *S. aureus*, y en algunos de ellos se muestra como este daño se debe a la combinación de nanopartículas y luz y no de partículas solas. Por ejemplo, en el trabajo de Li y colaboradores¹¹⁹, se tomaron imágenes de muestras preparadas a partir de cultivos planctónicos de *S. aureus* con un SEM de emisión de campo (el cual presenta una resolución mayor que un SEM normal), luego de los tratamientos con NP catiónicas (de PEG + porfirina TPPNH₂) + luz. Para el control, se observó que, tanto en ausencia como en presencia de luz, la estructura esférica típica de esta bacteria se mantenía intacta. Cuando las bacterias fueron incubadas con las NP en oscuridad se observó un leve cambio de morfología de las mismas, pero al ser tratadas con NP + luz se evidencia un “arrugamiento” de la pared bacteriana, esto indica que el estrés oxidativo generado durante el tratamiento altera la integridad de la membrana. En el trabajo de Wang y colaboradores¹⁹³ se observa un comportamiento similar cuando se trata a *S. aureus* con nanopartículas de BODIPY (catiónicas y aniónicas) + luz. En este caso, el control de bacterias no irradiadas mantuvo su estructura esférica intacta, pero luego del tratamiento con nanopartículas y luz comienzan a verse alteradas las paredes celulares y se evidencian detritos celulares; siendo

este efecto evidentemente más marcado cuando la nanopartícula es catiónica. También en el trabajo de Jinghan y colaboradores¹⁴, se muestra el mismo tipo de alteración de la estructura de *S. aureus* cuando es tratado con NPCs catiónicas y luz. Dicha alteración en la estructura no se evidencia en las imágenes tomadas de *S. aureus* y NPCs catiónicas en oscuridad. Estos resultados demuestran que la utilización de NPCs catiónicas en la PDI produce un marcado efecto sobre la envoltura bacteriana producto de una interacción mejorada con la superficie de las mismas.

4.1.8.2. Estudios de citotoxicidad fotoinducida en biofilms

Como se detalló en la introducción, actualmente se estima que más del 90 % de los microorganismos crecen en forma de biofilms y la mayoría de las infecciones crónicas y recurrentes están asociadas a este tipo de crecimiento. La presencia de la matriz de EPS presente en estas comunidades microbianas les confiere un mecanismo adicional de resistencia en comparación con cultivos planctónicos. En consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas debe dirigirse contra este tipo de comunidades caracterizadas por su alta resistencia a los tratamientos actuales.

Tras estudiar el daño fotinducido causado por NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN en combinación con luz sobre cultivos planctónicos, se planteó el estudio del efecto de la PDI de partículas sobre biofilms maduros de MRSA. Como los biofilms son estructuras naturalmente más resistentes que las células individuales, se aumentaron las dosis de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN (20 y 10 mg/L) y también la dosis de luz (1h, irradiancia 57,6 mW/cm²). Para estudiar el efecto fotoinducido sobre biofilms se tuvieron en cuenta dos aspectos del mismo: el daño ejercido a nivel celular y el daño producido sobre la matriz de EPS. Por lo tanto, se diseñaron varios ensayos que permitan abarcar estos dos aspectos a tratar en el biofilm.

4.1.8.2.1. Cuantificación de la biomasa total

El primer ensayo realizado para estudiar el daño generado por PDI sobre biofilms fue el ensayo de CV, que es una metodología colorimétrica comúnmente utilizada para la

cuantificación de la biomasa total de un biofilm. Se utiliza el ensayo de CV como estudio preliminar, para conocer el daño que ejerce la PDI sobre biofilm en general y en base a los resultados obtenidos se eligió la mejor concentración de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN para los siguientes ensayos. Los detalles experimentales se describen en la sección 3.5.2.1.

En la figura 45 se presenta el % de biomasa total luego de la PDI, del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad y del derecho el tratamiento con luz. A partir de los controles en oscuridad se observa que en presencia de NPC:PSMA+PtOEP@PFN la biomasa disminuye alrededor de un 30 % para las dos concentraciones probadas (20 y 10 mg/L), mientras que en el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP la biomasa disminuyó alrededor de un 20 % también para ambas concentraciones. Pero cuando se le aplica luz, la diferencia entre ambos tratamientos se vuelve mucho más significativa: cuando los biofilms fueron tratados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz la biomasa disminuyó un 70 y 80 % con 10 y 20 mg/L de partículas respectivamente. En cambio, para el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP + luz la biomasa solamente disminuyó ~ 50 % para ambas concentraciones. Debido a que la disminución de biomasa fue más significativa al usar 20 mg/L de partículas, los siguientes ensayos sobre biofilms se realizaron únicamente con esta concentración para PDI.

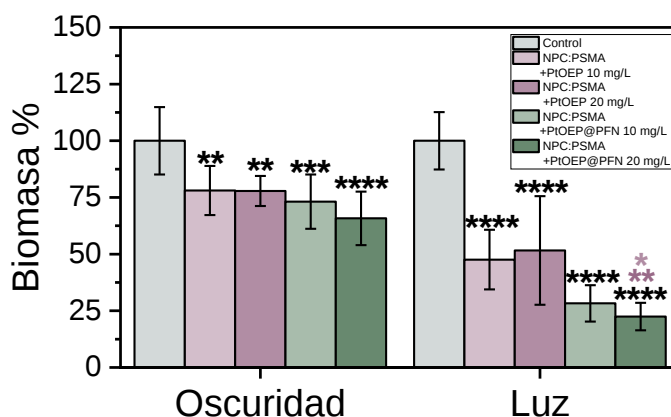


Figura 45. Cuantificación de la biomasa total de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Izquierda: Control en oscuridad y derecha: tratamientos con luz. Control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas: *p = 0,0311, **p = 0,0042, ***p = 0,0010 y ****p

<0,0001. Los colores más oscuros corresponden a las dosis más altas (20 mg/L) y los más claros a las dosis más bajas (10 mg/L). Dosis de luz: 57,6 J/cm².

En el trabajo de Martínez y colaboradores⁹³ se observa que PDI con 6,5 y 16,5 mg/L NPC (de F8BT + PtOEP + PS-PEG-COOH) sobre MRSA no induce una disminución significativa en la cantidad del biofilm, mediante la técnica de CV, a pesar de lograr una eliminación efectiva del mismo mediante otras técnicas. Un efecto muy similar se muestra en esta tesis, donde la reducción de la biomasa con los tratamientos con NPC + luz y NPC-CS + luz no es completa, pero si significativamente diferente con respecto al control y los controles en oscuridad. En el trabajo de Wang y colaboradores¹⁹³, donde se trataron biofilms de *S. aureus* con NP catiónicas de BODIPY + luz, también se realizó un ensayo de CV para estudiar el % de reducción de la biomasa posterior a la PDI y se observó una disminución significativa de la misma. Al igual que en el trabajo de Wang, en el trabajo de Li y colaboradores¹¹² se observa una disminución significativa en la biomasa (medida con el ensayo de CV), luego de tratar biofilms de *S. aureus* con NPCs catiónicas + luz. En el trabajo de Li y colaboradores⁴⁴ donde utilizan NPCs catiónicas de PPF sobre biofilms de *S. aureus* tampoco logra una erradicación significativa de la biomasa medida mediante CV, a pesar de obtener muy buenos resultados con otras técnicas. Estos trabajos indican, al igual que en lo observado en la figura 45, que la carga positiva de la nanopartícula favorece la interacción con los biofilms mejorando la efectividad de la PDI.

4.1.8.2.2. Ensayo de actividad metabólica

El ensayo de MTT se utiliza comúnmente para estimar la viabilidad celular asumiendo que, a mayor actividad metabólica, mayor será la viabilidad celular de la suspensión bacteriana. En la figura 46 se observan los resultados del ensayo de MTT sobre biofilms previamente tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz del lado derecho, mientras que del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad. Como se discutió anteriormente, se utilizó únicamente la concentración de 20 mg/L de ambas partículas. En cuanto a los controles en oscuridad, se puede observar que la actividad metabólica disminuyó ~ 16% cuando los biofilms fueron tratados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN (barra verde oscuro) aunque no se registraron diferencias

significativas con respecto al control (barra gris plata). En cambio, cuando el biofilm fue tratado con luz, hubo una disminución significativa en la actividad celular. En el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP + luz (barra rosa) la actividad metabólica se redujo ~70 %. Mientras que con el tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz la actividad metabólica se redujo más del 80 % indicando una diferencia más significativa con respecto al grupo control. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por el método CV demostrando que el mejor tratamiento PDI contra biofilms se obtiene utilizando las NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz.

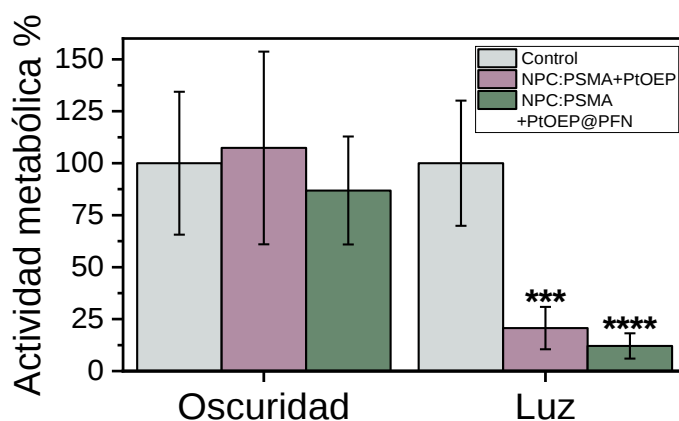


Figura 46. Ensayo de actividad metabólica sobre biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Izquierda: Control en oscuridad y derecha: tratamientos con luz. Control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

En el trabajo previo del grupo⁹³, como se viene mencionando en párrafos anteriores, el tratamiento con NPC (F8BT + PS-PEG-COOH + PtOEP) + luz sobre biofilms de *S. aureus* produce una disminución significativa de la viabilidad celular (obtenida mediante el ensayo de MTT) de un poco más del 50 %. Dicho resultado es menor a lo obtenido en esta tesis con NPC:PSMA+PtOEP+ luz, a pesar de ser partículas bastante similares. En el trabajo de Wang y colaboradores¹⁹⁴, donde trataron biofilms de MRSA con PS catiónicos compuestos por complejos de rutenio (II) mediante PDI, también lograron una disminución significativa de la viabilidad celular usando la técnica de MTT. Estos resultados se condicen con lo expuesto anteriormente, donde se logró una disminución de más del 80 % cuando los biofilms de

MRSA fueron tratados con 20 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz. Esto refuerza la conclusión que el uso de NPC catiónicas aumenta el efecto terapéutico con respecto a NPC aniónicas.

Es importante aclarar que el ensayo de MTT presenta la limitación de no ser una técnica que mida de manera directa la viabilidad celular, si no que se limita a cuantificar la actividad metabólica de un cultivo bacteriano. En consecuencia, esta técnica no diferencia entre cultivos que tienen un bajo número de bacterias con elevada actividad metabólica de aquellos que tienen un mayor número de bacterias con actividad metabólica reducida.

4.1.8.2.3. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante de biofilms

La cuantificación de proteínas liberadas al sobrenadante luego de la PDI se utiliza como parámetro indicativo del daño producido a la matriz de EPS y a las células que conforman al biofilm. Para la realización de dicho ensayo se utilizó el ensayo colorimétrico de Bradford, los detalles experimentales se describen en la sección 3.5.2.4.

En la figura 47 se presentan la concentración de proteínas liberadas al sobrenadante, del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad y del derecho los tratamientos con luz. A partir de los controles en oscuridad, se observa que el tratamiento de biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (barra verde oscuro) mostró una mayor concentración de proteínas en el sobrenadante que no se observa para el control (biofilm sin partículas, barra gris plata) y para biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (barra rosa), indicando que aún en oscuridad se produce un leve daño a las bacterias. Este resultado es consistente con los resultados de las secciones anteriores e indica un efecto citotóxico intrínseco. Luego de la PDI se observa un aumento considerable en la concentración de proteínas liberadas al sobrenadante, dicho aumento fue significativamente mayor cuando los biofilms fueron tratados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz. Este aumento fue ~ 3 veces mayor que lo observado para el control de biofilm sin partículas y luz y biofilm tratado con NPC:PSMA+PtOEP y luz, indicando que la proporción de proteínas liberadas al sobrenadante luego de la PDI fue mayor cuando se utilizaron partículas catiónicas. Esto indica que, a pesar de la protección ejercida por la matriz del biofilm, la PDI con NPC:PSMA+PtOEP@PFN estaría produciendo daño importante tanto en la integridad de las membranas bacterianas como a nivel de la matriz de EPS.

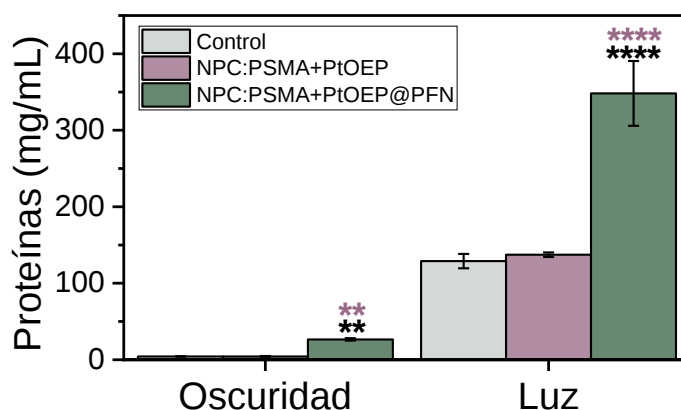


Figura 47. Cuantificación de proteínas liberadas al sobrenadante de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Izquierda: Control en oscuridad y derecha: tratamientos con luz. Control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

4.1.8.2.4. Tinción de la matriz de EPS

Como se mencionó anteriormente, es clave estudiar el daño que produce la PDI sobre la matriz de EPS debido al efecto de protección que este último ejerce sobre las bacterias que contenidas. Para estudiar el daño ejercido sobre la matriz, se utilizó el colorante fluorescente CW, el cual se une de manera específica a los enlaces $\beta_{(1-3)}$ y $\beta_{(1-4)}$ de los EPS. Los detalles experimentales de este ensayo se describen en la sección 3.5.2.5.

En la figura 48 se presentan los resultados obtenidos de biofilms teñidos con CW luego de la PDI. Del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad, donde no se observan cambios significativos en la I_F en ninguno de los tratamientos con respecto al control; y del lado derecho los tratamientos con partículas y luz. Luego del de la PDI, se observa una disminución significativa de la I_F para los tratamientos con partículas. Dicha disminución es considerablemente mayor cuando el biofilm fue tratado con NPC:PSMA+PtOEP@PFN y luz (barra verde oscuro) que al ser tratado con NPC:PSMA+PtOEP y luz (barra rosa). En cuanto al control de bacteria sin partículas irradiada (barra gris plata), no se registra una disminución en la I_F indicando que la dosis de luz utilizada no ejerce un daño intrínseco en la matriz de EPS. Los resultados obtenidos

mediante esta técnica son similares a los descriptos anteriormente confirmando nuevamente la mayor eficiencia fototerapéutica que presentan las NPC:PSMA+PtOEP@PFN.

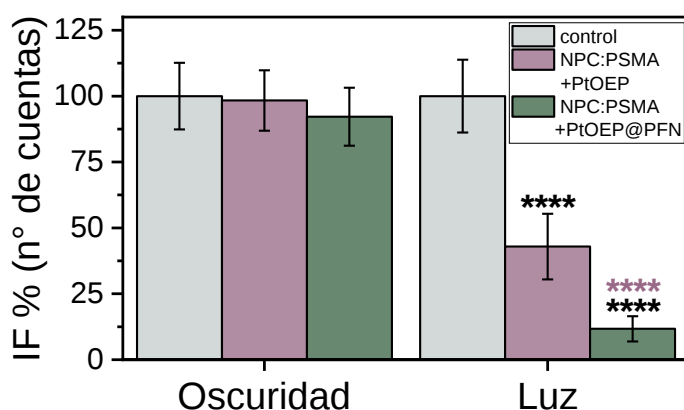


Figura 48. tinción de la matriz de EPS de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Izquierda: Control en oscuridad y derecha: tratamientos con luz. Control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

En el trabajo de Martínez y colaboradores⁹³, donde se tiñeron biofilms de *S. aureus* y *E. coli* con CW y se analizaron mediante un microscopio de fluorescencia confocal, también se observó que, luego del tratamiento con NPCs (de F8BT + PS-PEG-COOH + PtOEP) + luz, la intensidad de fluorescencia del CW disminuyó considerablemente, indicando un buen grado de afectación de la matriz de EPS por parte de la PDI. Esto indica que si bien las NPCs + luz presentan cierto efecto citotóxico, como se viene mencionando, pero cuando se utilizan NPC:PSMA+PtOEP@PFN (como en esta tesis) aumenta la efectividad de la PDI debido a su carga positiva.

4.1.8.2.5. Imágenes de SEM de biofilms

El último ensayo para estudiar el efecto post fotodinámico sobre biofilms está orientado al análisis del daño producido principalmente a nivel de la matriz de EPS. En dicho ensayo, se tomaron imágenes de SEM para estudiar la topografía de los biofilms sin tratar y tratados con partículas + luz.

En la figura 49 se muestran las imágenes tomadas para los controles de biofilm en oscuridad (figuras 49A y 49B) y biofilm irradiado (figuras 49C y 49D) y los tratamientos con NPC:PSMA+PtOEP + luz (figuras 49E y 49F) y NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz (figuras 49G y 49H). Del lado izquierdo se encuentran las imágenes con una magnificación de 3KX y del lado derecho las que tienen 20KX. Es importante aclarar que no se visualizaron por SEM los controles de oscuridad de biofilm + NPC:PSMA+PtOEP y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN debido a que en ensayos anteriores no se registraban diferencias significativas con respecto al control en oscuridad. En primer lugar, se observa claramente la matriz de EPS del biofilm sin irradiar y, cuando el biofilm es irradiado, se produce una leve disminución de dicha matriz, pero el número de bacterias pareciera no verse afectado. Esto indica que la luz ejerce cierto efecto citotóxico por sí misma, tal vez debido al tiempo de irradiación prolongado. Cuando el biofilm es tratado con NPC:PSMA+PtOEP + luz, ya se registra una leve disminución en el número de bacterias, mientras la densidad de la matriz disminuyó aún más con respecto a los controles mencionados anteriormente. Pero la mayor diferencia entre controles y tratamientos se observa cuando el biofilm fue tratado con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz. Al observar el campo amplio de la muestra (imagen izquierda), prácticamente no se evidencian bacterias en el mismo; mientras que al aumentar la magnificación también se muestran muy pocas bacterias y no se evidencian indicios de matriz extracelular (imagen derecha).

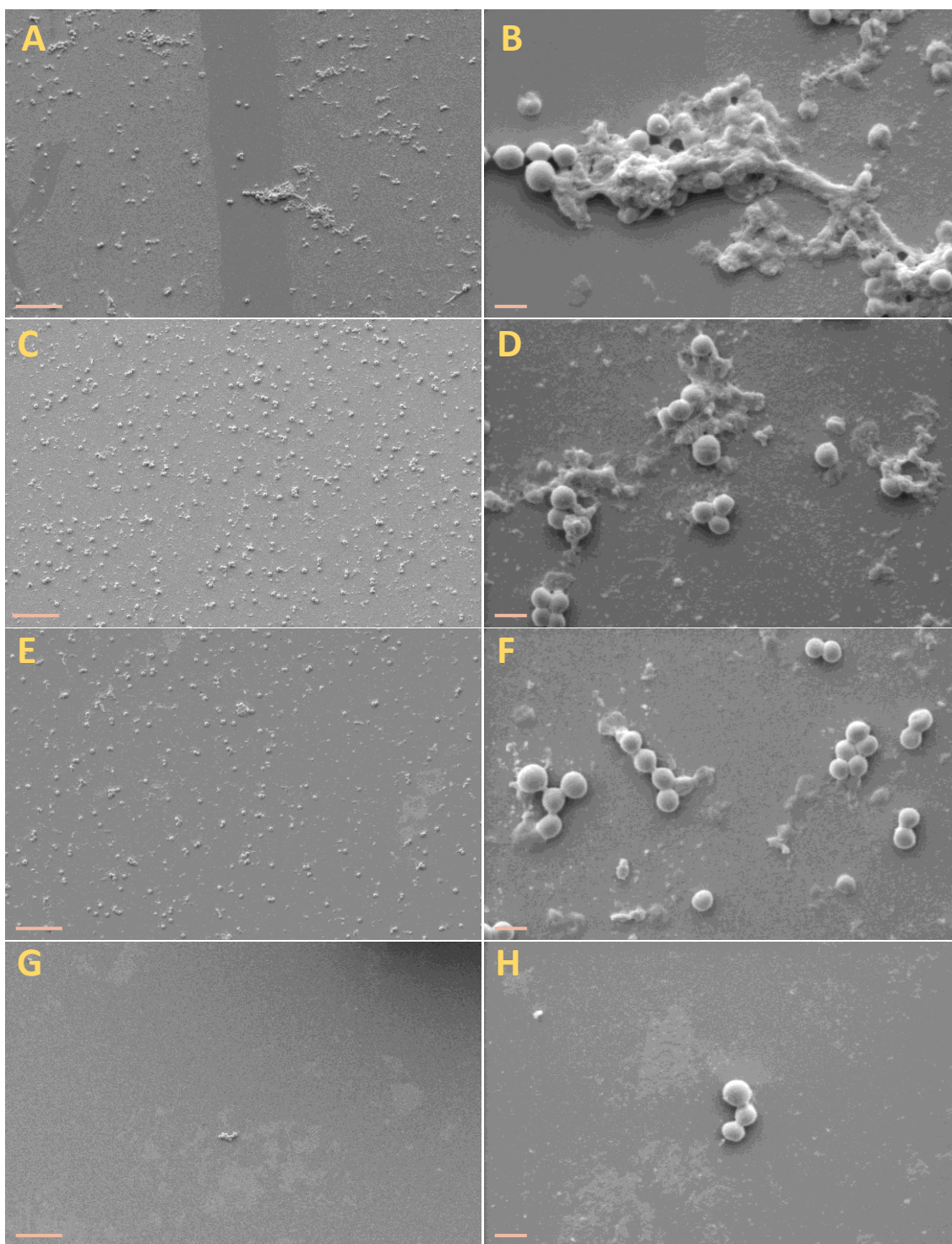


Figura 49. imágenes de SEM de biofilms maduros sin tratar y tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. (A-B) biofilm sin irradiar. (C-D) biofilm irradiado. (E-F) biofilm tratado con NPC:PSMA+PtOEP + luz. (G-H) biofilm tratado con NPC:PSMA+PtOEP@PFN + luz. Magnificaciones utilizadas: 3 KX del lado izquierdo y 20 KX del lado derecho. Barra de escala: 10 μm (lado izquierdo) y 1 μm (lado derecho).

En el trabajo de Wang y colaboradores, donde trataron biofilms de MRSA con PS de rutenio (II) mediante PDI, también se toman imágenes de SEM de los biofilms tratados y sin tratar y el resultado que obtienen es muy similar a lo observado anteriormente: donde el tratamiento con partículas catiónicas + luz produce un daño considerable tanto sobre la matriz como a las células contenidas en ella¹⁹⁴. Este resultado termina de confirmar que el uso de nanopartículas catiónicas mejora la efectividad de la PDI con respecto a las aniónicas.

4.1.9. Ensayos de viabilidad en eucariotas

Cuando se desarrolla un PS para ser utilizado en PDI es importante estudiar la biocompatibilidad intrínseca del mismo. Esto se hace para evaluar la seguridad del material proyectando una posterior utilización en entornos biológicos como, por ejemplo, en una infección bacteriana sobre piel. Para ello se realizaron dos ensayos: uno para estudiar la citocompatibilidad celular y el otro para estudiar la hemocompatibilidad sistémica.

4.1.9.1. Actividad metabólica en fibroblastos

Se eligieron fibroblastos porque estas células forman parte del tejido conectivo, por lo tanto, su utilización se considera como un modelo estándar para estudiar la compatibilidad de este nanomaterial. La biocompatibilidad de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN sobre fibroblastos se evaluó usando un ensayo de MTT con el objetivo de medir la actividad metabólica a distintas concentraciones de partículas (1, 5 y 20 mg/L) en oscuridad. Los detalles experimentales se describen en la sección 3.6.2.

En la figura 50 se muestra la viabilidad celular % de fibroblastos en función de la concentración de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. La viabilidad celular se mantiene prácticamente constante a las tres concentraciones estudiadas. Esto indica que estas partículas tienen la potencialidad de ser altamente biocompatibles.

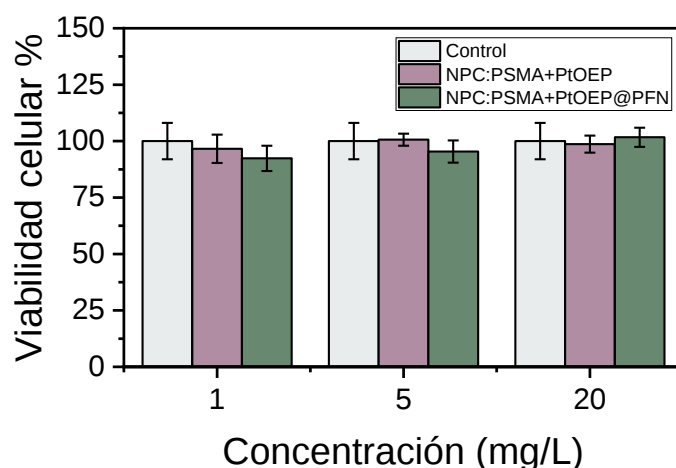


Figura 50. Ensayo de MTT con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN sobre fibroblastos. Control (hueso), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentraciones de partículas utilizadas: 1, 5 y 20 mg/L.

Para evaluar con mayor detalle la citocompatibilidad de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN con fibroblastos, se tomaron imágenes con un microscopio confocal de las suspensiones de células incubadas con NPC:PSMA+PtOEP@PFN previo a la realización del ensayo de MTT. En la figura 51A se presenta una micrografía representativa de campo claro de fibroblastos tras la incubación en la oscuridad con nanopartículas NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Las células muestran una morfología típica asociada a las células vivas normales. En la figura 51B se muestra la imagen de fluorescencia del mismo campo de visión (que para la imagen del campo claro), donde se observa un fuerte color verde que corresponde a la emisión de las NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Por último, en la figura 51C muestra la imagen fusionada de las figuras 51A y 51B. Esta última imagen confirma un proceso efectivo de adsorción/incorporación de las NPC:PSMA+PtOEP@PFN en los fibroblastos

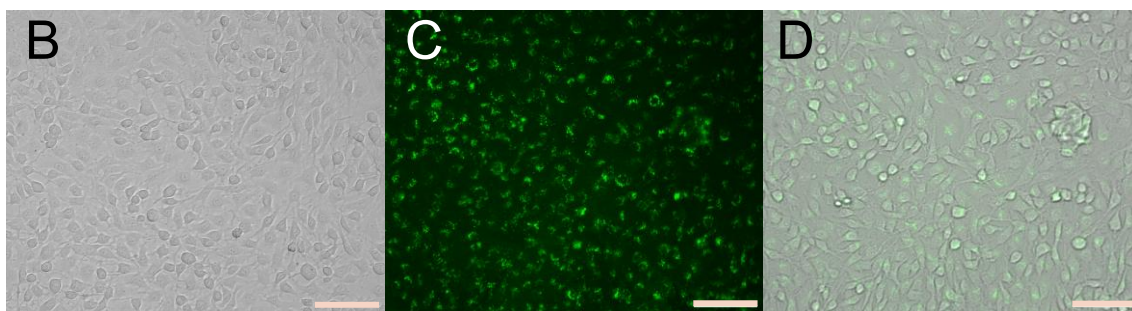


Figura 51. Microscopía de fluorescencia confocal de fibroblastos incubados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Imágenes representativas de microscopía óptica de MCR-5 incubadas durante 1 h con 10 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN. (A) micrografía de campo claro. (B) micrografía de fluorescencia de canal verde Y (C) imágenes fusionadas. Barra de escala: 100 μm .

Los resultados combinados de estos dos ensayos indican que las NPC:PSMA+PtOEP@PFN no muestran citotoxicidad intrínseca sobre esta línea celular y, por lo tanto, podrían considerarse como excelentes candidatos de materiales fotoactivos para fototerapias realizadas en modelos *in vivo*.

4.1.9.2. Hemólisis de eritrocitos

El segundo ensayo realizado para estudiar la biocompatibilidad de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN consistió en realizar un ensayo de hemólisis de eritrocitos humanos que evalúa la viabilidad sistémica. Los detalles experimentales se describen en la sección 3.6.3.

En la figura 52 se muestran los % de hemólisis de eritrocitos tratados con 1, 5, 10 y 20 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Se observa que a medida que aumenta la concentración de ambas partículas aumenta el porcentaje de hemólisis. Este efecto es más notorio cuando los eritrocitos fueron incubados con NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Solamente a las concentraciones de 1 mg/L y 5 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP@PFN la hemólisis estuvo por debajo del $\sim 5\%$ que es el valor aceptado para un material para aplicaciones biomedicas¹⁸⁵; esto indica que, a concentraciones mayores, estas nanopartículas se consideran citotóxicas. Esto no sucede cuando los eritrocitos son incubados con NPC:PSMA+PtOEP, ya que a todas las concentraciones evaluadas el % de hemólisis siempre estuvo por debajo del 5 %. Esto podría indicar que los

grupos amonios cuaternarios que le confieren la carga positiva a las NPC:PSMA+PtOEP@PFN estarían afectando la integridad de los eritrocitos.

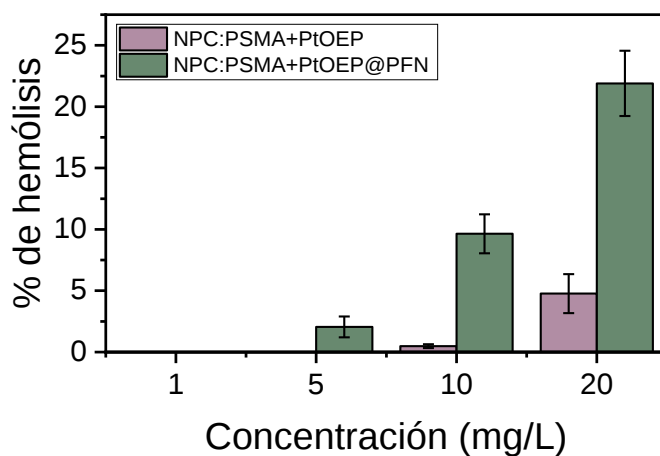
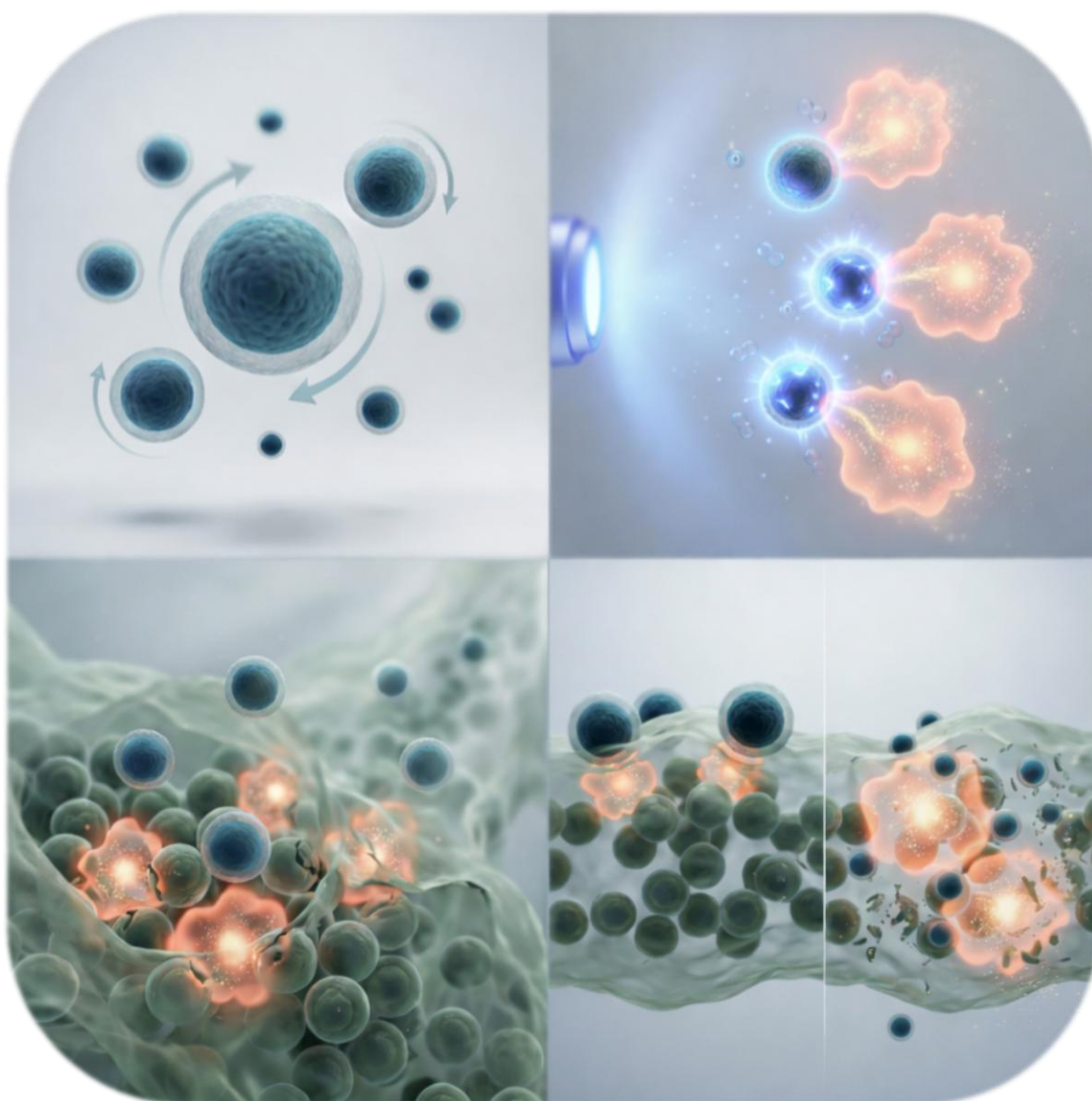


Figura 52. Hemólisis de eritrocitos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN. Biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP@PFN (verde oscuro). Concentraciones de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP@PFN utilizadas: 1, 5, 10 y 20 mg/L.

Los ensayos realizados revelaron un creciente % de hemólisis dependiente de la concentración, particularmente marcado para NPC:PSMA+PtOEP@PFN, donde solamente las concentraciones de 1 y 5 mg/L se mantuvieron dentro del rango aceptable para este tipo de biomaterial. Mientras que las partículas NPC:PSMA+PtOEP mantuvieron porcentajes de hemólisis adecuados en todas las condiciones estudiadas. Este comportamiento sugiere que la carga positiva superficial y la concentración de partículas podría comprometer en cierta manera la integridad de la membrana de los eritrocitos.

Capítulo 4:

RESULTADOS PARTE II



4.2. RESULTADOS – PARTE II

En la parte II de este capítulo se describen los resultados obtenidos para el siguiente objetivo específico: **Sintetizar y caracterizar NPCs fotoactivas con distintas modificaciones superficiales que tengan un impacto en el direccionamiento (vectorización) contra células cancerígenas o bacterianas.** Este objetivo se divide en dos partes: la primera que trata del direccionamiento de las partículas desarrolladas hacia dianas bacterianas y la segunda parte consta del direccionamiento de nuevas partículas hacia células cancerígenas. La primera parte de este objetivo se desarrolló en la Parte I del capítulo de resultados. La segunda parte del mismo se desarrollará en las siguientes páginas donde se abordará un desarrollo de NPCs con el objetivo de mejorar su direccionamiento hacia células tumorales. Para ello se utilizará una línea celular tumoral de GBM, en particular T98G, la cual presenta una sobreexpresión de GLUT 1 y GLUT 3.^{78–80,195} Estos ensayos se hicieron en colaboración con el Dr. Luis Ibarra y la Lic. Lucía Beagué, los cuales tienen experiencia con el manejo de esta línea celular^{107,122,145}.

Se planteó la utilización de los polímeros T-1107 prístino y T-GLU (que consiste en un Tetronic®1107 funcionalizado con residuos de glucosa), los cuales fueron provistos por el Dr. Alejandro Sosnik en el marco de una colaboración científica. Su grupo de investigación posee amplia experiencia en la modificación de este tipo de polímeros, los cuales son utilizados principalmente para el desarrollo de micelas poliméricas vectorizadas hacia dianas cancerígenas específicas, en particular hacia transportadores GLUT.^{81–85,196–198}

En esta tesis el polímero T-GLU, se utilizó como PE para la formulación de NPCs (NPC:T-GLU) con el objetivo de estudiar si los grupos funcionales glicosilados del T-GLU se localizan en (o cerca de) la superficie de las NPC:T-GLU y por lo tanto quedan disponibles para interactuar con los GLUT. Como PEs de referencia, se utilizaron T-1107 y PSMA y se obtuvieron NPC:T-1107 y NPC:PSMA respectivamente. La utilización del PSMA obedece a que el grupo de investigación donde se desarrolla la tesis posee amplia experiencia en terapia TFD utilizando NPC de F8BT:PSMA contra glioblastomas^{122,145}. En la figura 13 (en materiales y métodos) se mostraron las estructuras de T-1107 y T-GLU.

Desde un punto de vista fisicoquímico, se hipotetiza que, durante el autoensamblado de las nanopartículas, los residuos glicosilados del PE T-GLU se orientarán preferentemente en la superficie de la NPC:T-GLU, de manera análoga al comportamiento de grupos -COOH

de los PEs PSMA y PS-PEG-COOH.^{93,142,199} Esta hipótesis se basa en el carácter hidrofílico de los grupos funcionales glicosilados en contraste con el carácter hidrofóbico del PC F8BT. La presencia de residuos glicosilados en la superficie de las NPC:T-GLU favorecería la interacción ente partícula y GLUTs permitiendo un direccionamiento activo hacia células que sobreexpresan este tipo de transportadores.

La figura 53 presenta un esquema simplificado de una membrana plasmática conteniendo el receptor GLUT y de la interacción diferencial propuesta entre dicho receptor y las NPC:T-GLU y NPC:PSMA. En los extremos de la figura se muestra la interacción inespecífica de ambas partículas con la membrana plasmática. En el centro se muestra la interacción específica de NPC:T-GLU con el receptor GLUT. Y debido a la suma de interacciones específicas e inespecíficas de NPC:T-GLU, se favorecería la internalización de esta partícula con respecto a la internalización de NPC:PSMA.

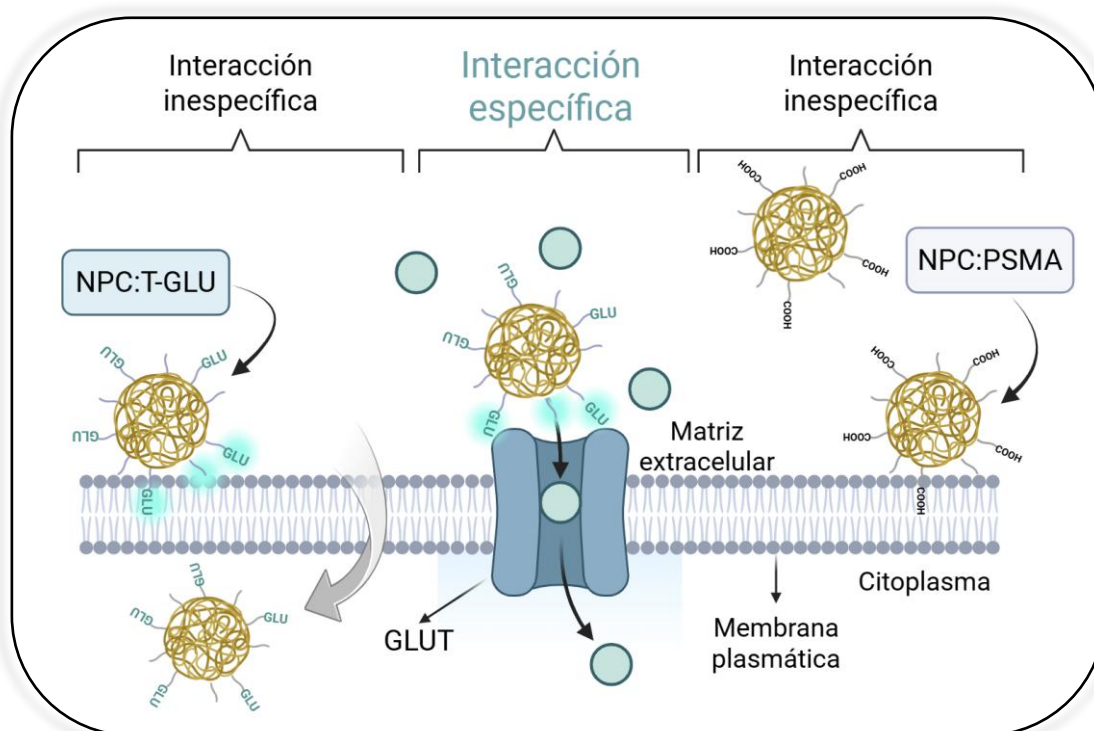


Figura 53. Esquema de membra conteniendo el receptor GLUT e interacciones posibles con NPC:PSMA y NPC:T-GLU

4.2.1. Caracterización de NPC.T-1107, NPC:T-GLU y NPC:PSMA

Se sintetizaron las distintas partículas según la metodología descrita en la sección 3.2.1.5. Estas tienen la particularidad de que fueron sintetizadas utilizando tres distintos PE: PSMA, T-1107 y T-1107-GLU originando a las NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n respectivamente. En primer lugar, se sintetizaron dos tipos de NPCs con cada uno de los PE en una proporción de 20 y 40 % p/p.

En la figura 54, se muestran los espectros de absorción de las NPC que contienen 20 % (colores claros) y 40 % (colores oscuros) de PSMA (curva beige), T-1107 (curva violeta) y T-GLU (curva verde agua). En la figura 54A, se muestran los espectros sin normalizar, donde se observa que para NPC:T-1107₄₀ y NPC:T-GLU₄₀ los valores de absorbancia son menores que para NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-GLU₂₀, esto se debe a que, durante el proceso de síntesis, parte de la solución de NPC:T-1107₄₀ y NPC:T-GLU₄₀ se adsorbe al agitador magnético. Esto no se observó para NPC:PSMA₄₀. Cuando los espectros se normalizaron (figura 54B), no se observaron diferencias significativas entre ellos indicando que los distintos PE esencialmente no afectan a plegamiento de las cadenas de F8BT y por ende sus transiciones ópticas desde el estado fundamental.

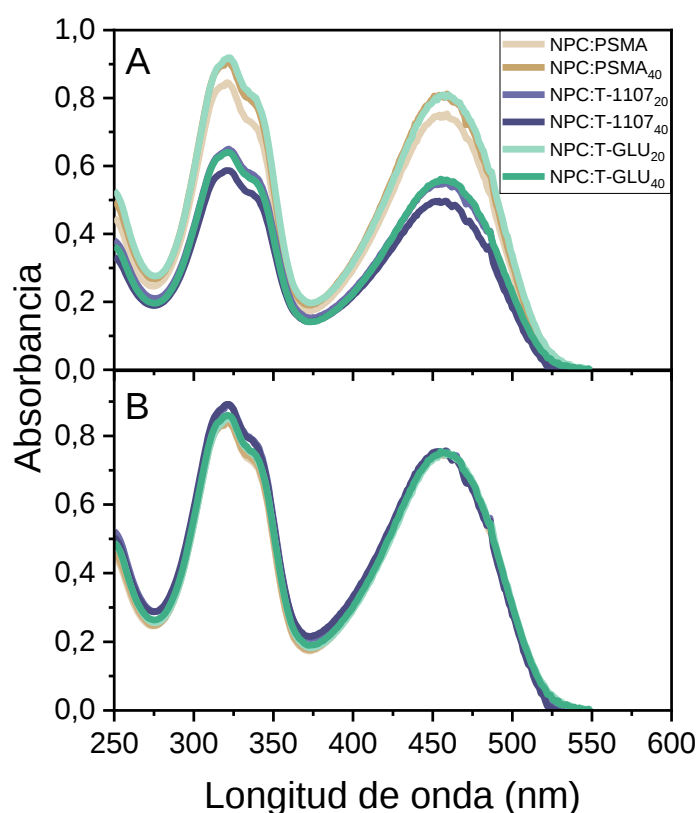


Figura 54. Espectros de absorción de NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n. (A) espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. NPC:PSMA_n (beige), NPC:T-1107_n

(violeta) y NPC:T-GLU_n (verde agua). Los colores más claros corresponden a 20 % de PE y los más oscuros a 40 %. Concentraciones de partículas: NPC:PSMA 17,7 mg/L, NPC:PSMA₄₀ 19,3 mg/L, NPC:T-1107₂₀ 13,2 mg/L, NPC:T-1107₄₀ 11,5 mg/L, NPC:T-GLU₂₀ 19,3 mg/L y NPC:T-GLU₄₀ 13,2 mg/L.

El segundo paso en la caracterización de las diferentes partículas, consistió en medir sus espectros de fluorescencia, con el objetivo de estudiar cómo la presencia de los distintos PE afecta a la emisión del F8BT. Cabe recalcar que el F8BT es el único componente de las partículas con fluorescencia apreciable en el visible, por lo tanto, se monitoreó la emisión del mismo. Para tomar los espectros de excitación y emisión se igualaron las absorbancias de todas las suspensiones de partículas a $\lambda_{456} = 0,1$ y las mediciones se realizaron todas en las mismas condiciones instrumentales.

En la figura 55 se presentan los espectros de emisión de todas las formulaciones de partículas. Cuando los espectros no están normalizados (figura 55A), se observa un aumento en la I_F al aumentar el % de PE tanto para NPC:PSMA₄₀ (curva beige) como para y NPC:T-GLU₄₀ (curva verde agua) en comparación a la I_F de NPC:PSMA y NPC:T-GLU₂₀ respectivamente. Mientras que la I_F se mantiene prácticamente constante en NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-1107₄₀ (curva violeta). Además, se evidencia un aumento significativo de la I_F en las NPC:T-GLU₂₀, NPC:T-GLU₄₀, NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-1107₄₀ con respecto a NPC:PSMA y NPC:PSMA₄₀. Cuando los espectros se encuentran normalizados (figura 55B), no se observan cambios en la forma característica del espectro de F8BT, indicando que la presencia de los PE T-1107 y T-GLU no modifican el estado excitado del F8BT.

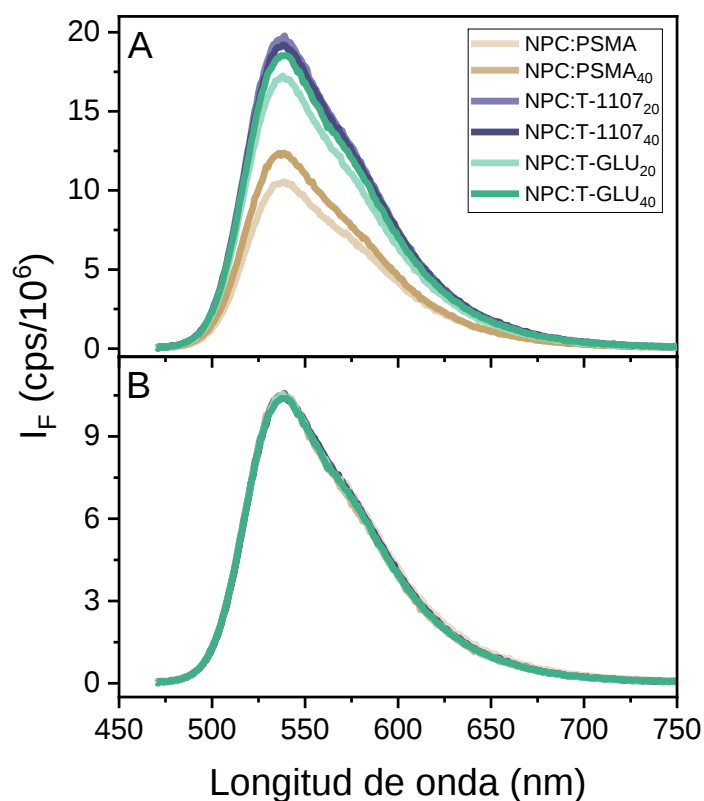


Figura 55. Espectros de emisión de NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n. (A) espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. NPC:PSMA_n (beige), NPC:T-1107_n (violeta) y NPC:T-GLU_n (verde agua). Los colores más claros corresponden a 20 % de PE y los más oscuros a 40 %. Condiciones de medición: $\lambda_{exc} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 470-750$ nm slit 1, señal S1c, 2,4 mg/L.

En la figura 56, se presentan los espectros de excitación normalizados para las para NPC:PSMA_n (curva beige), NPC:T-1107_n (curva violeta) y NPC:T-GLU_n (curva verde agua). La estructura de los espectros de excitación es igual en todas las partículas, permitiendo confirmar lo observado en los espectros de emisión, indicando que el estado excitado no se modifica con la presencia de estos PE.

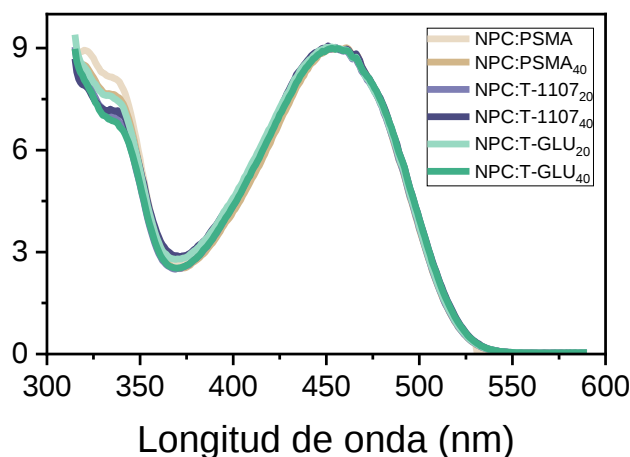


Figura 56. Espectros de excitación normalizados de NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n. NPC:PSMA_n (beige), NPC:T-1107_n (violeta) y NPC:T-GLU_n (verde agua). Los colores más claros corresponden a 20 % de PE y los más oscuros a 40 %. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{emi}} = 600 \text{ nm}$ slit 1, $\lambda_{\text{exc}} = 325\text{-}590 \text{ nm}$ slit 2, señal S1/R1c, 2,4 mg/L.

Se midió el $\overline{D_H}$ de todas las formulaciones de NPC para evaluar como la naturaleza y concentración de los diferentes PE afectan el tamaño de las partículas. Los valores de $\overline{D_H}$ y I Poly se muestran en la figura 57. Para NPC:PSMA_n (barras color beige), se registra una disminución del $\overline{D_H}$ cuando se aumenta la concentración del PE. Mientras que para las NPC:T-1107_n (barras color violeta), su $\overline{D_H}$ aumenta levemente cuando la cantidad de PE es mayor. Para las NPC:T-GLU_n (barras color verde agua), se registra un aumento significativo del $\overline{D_H}$ al aumentar el % de PE. Que se produzca un aumento en el $\overline{D_H}$ cuando se utilizan los PE tetronics® podría deberse a que estos polímeros son significativamente más grandes que el PSMA, lo cual afecte en cierta medida al plegamiento de las cadenas poliméricas del F8BT. En el caso del PE T-GLU, posiblemente los grupos funcionales glicosilados ejerzan un efecto más significativo en el proceso de nanoprecipitación.

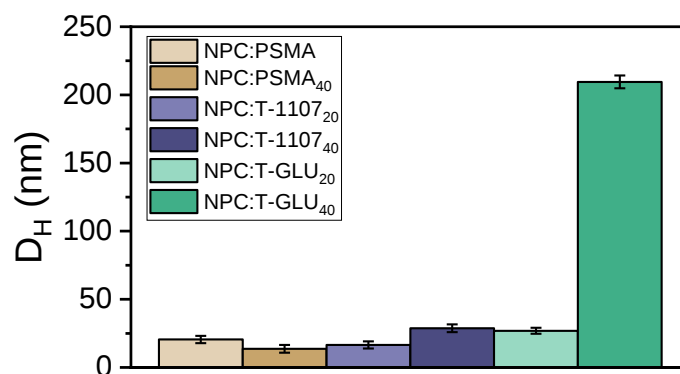


Figura 57. $\overline{D}_H$ de NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n. PE PSMA (beige), T-1107 (violeta) y T-GLU (verde agua). Los colores más claros corresponden a 20 % de PE y los más oscuros a 40 %. Concentración de partículas utilizadas: 10 mg/L.

Debido a que las NPC:T-GLU₄₀ poseen un $\overline{D}_H$ mucho más grande (~200 nm) que el del resto de las preparaciones (> 29 nm) se decidió utilizar solamente la serie de partículas con 20 % de PE para estudiar la interacción entre partículas y células tumorales.

El último paso en la caracterización de las partículas, consistió en medir el ζ para estudiar como la presencia de los distintos PE afecta la carga superficial de las mismas. Los resultados se resumen en la figura 58. Se observa que las NPC:T-1107₂₀ (diagrama de cajas violeta) presentan prácticamente el mismo ζ que las NPC:PSMA (~ -27 mV, diagrama de cajas beige), mientras que las NPC:T-GLU₂₀, son levemente menos negativas que las otras dos formulaciones (~ -23 mV, diagrama de cajas verde agua). Estos resultados indican que la presencia de los distintos PE no modifica en gran medida a la carga superficial de las partículas.

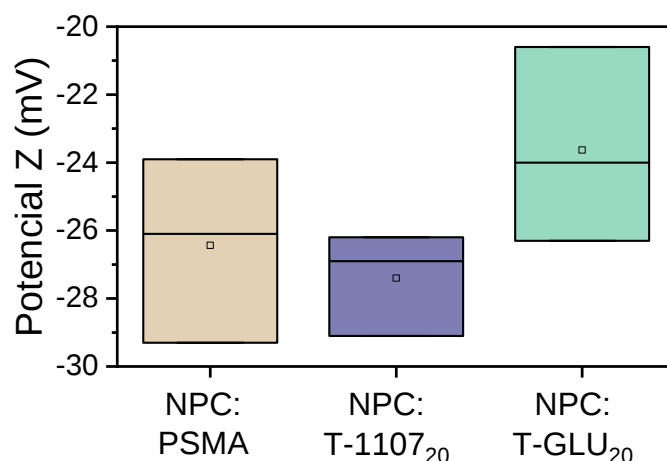


Figura 58. ζ para NPC:PSMA_n, NPC:T-1107_n y NPC:T-GLU_n. PSMA (beige), T-1107 (violeta) y T-GLU (verde agua). Concentración de partículas: 6 mg/L.

4.2.2. Ensayos de incorporación de NPC con distintos PE

Con el objetivo de comprobar la hipótesis desarrollada al inicio (sección 4.2.), donde la utilización de partículas funcionalizadas con un PE que tuviese residuos glicosilados favorecería su interacción con células tumorales que sobreexpresan transportadores GLUT, se realizaron medidas de citometría de flujo. Al igual que en los ensayos realizados con la técnica de citometría de flujo mencionados en la parte I de este objetivo para cultivos bacterianos, en los experimentos de esta sección se mide la I_F en el canal verde para detectar la emisión característica del F8BT de las partículas que están interaccionando (ya sea por adsorción o incorporación) sobre las células tumorales. Cabe aclarar que fuera del F8BT, los demás componentes de las partículas no florecen en el rango visible. Los detalles experimentales se describen en la sección 3.4.2.1.

El primer ensayo de citometría de flujo se realizó incubando las células T98G con las distintas partículas utilizando como medio de cultivo DMEM de elevada glucosa. En la figura 59 se presenta la media geométrica de I_F de todas las muestras analizadas. Se observa la autofluorescencia de T98G solas (barras color blanco), T98G incubadas con NPC:PSMA (barras color beige), T98G incubadas con NPC:T-1107₂₀ (barras color violeta) y T98G incubado con NPC:T-GLU₂₀ (barras color verde agua). Se analizaron tres tiempos de incubación (0,5; 1 y 4 h) para estudiar si se produce una incorporación de partículas, en las

células, en función del tiempo. Cuando el medio utilizado es DMEM de elevada glucosa, no se observan diferencias en la incorporación entre NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-GLU₂₀, en ninguno de los tiempos de incubación estudiados. Esto sugiere que la presencia de los residuos de glucosa en NPC:T-GLU lograría interaccionar específicamente con los diferentes GLUT, pero no se estaría produciendo una internalización efectiva quedando la NPC:T-GLU anclada en la superficie de la célula. Indicando así, que no se estaría produciendo la incorporación de NPC:T-GLU al interior celular. Para el caso de NPC:T1107, también se esperaría que dicha partícula quede anclada en la superficie celular, esta vez por interacciones no específicas. En contraste, la I_F de NPC:PSMA aumenta significativamente en función del tiempo, sugiriendo que dichas partículas se internalizan efectivamente en las células sin alcanzar un valor límite en el rango temporal estudiado. Este último resultado era esperable debido a que en estudios previos se ha reportado este mismo comportamiento.

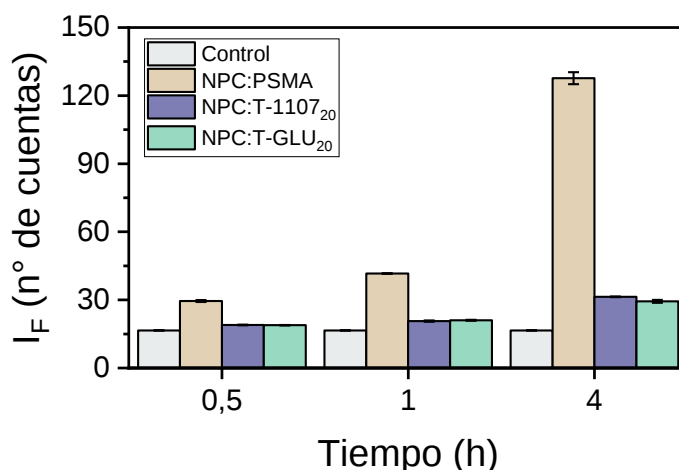


Figura 59. Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales

T98G recogidos en el canal verde, incubadas en DMEM. Autofluorescencia de T98G (blanco), T98G incubadas con NPC:PSMA (beige), T98G incubadas con NPC:T-1107₂₀ (violeta) y T98G incubadas con NPC:T-GLU₂₀ (verde agua). Tiempo de incubación: 0,5; 1 y 4 h. Condiciones de medición: $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{emi} = 510 - 540 \text{ nm}$, 10^4 eventos, concentración de partículas 10 mg/L.

Los resultados obtenidos de este primer ensayo pueden estar fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo. La glucosa es una molécula pequeña y se encuentra en concentraciones muy elevadas (4,5 g/L) en el medio de cultivo DMEM

utilizado en comparación a la concentración de las distintas partículas (10 mg/L) utilizadas en este ensayo. A su vez, solamente un 20 % de esos 10 mg/L corresponde a los polímeros T-1107 y T-GLU; por lo que es muy probable que en estas condiciones experimentales todos los transportadores GLUT estén saturados con moléculas de glucosa. Bajo estas condiciones las NPC:T-GLU₂₀ compiten desfavorablemente con las moléculas de glucosa del medio por los transportadores GLUT; otro factor a tener en cuenta (además de la elevada concentración de glucosa en el medio de cultivo) el tamaño de las partículas, donde podrían producirse impedimentos estéricos cercanos a los transportadores GLUT.

Para intentar subsanar esta limitante, se realizó un segundo ensayo de citometría de flujo, utilizando como medio de cultivo PBS en lugar de DMEM. Los resultados se resumen en la figura 60, donde se presentan las medias geométricas de I_F del control de la línea celular T98G sin partículas (barras color blanco), T98G incubadas con NPC:PSMA (barras color beige), T98G incubadas con NPC:T-1107₂₀ (barras color violeta) y T98G incubadas con NPC:T-GLU₂₀ (barras color verde agua). En este caso solamente se presentan los resultados obtenidos luego de 30 minutos y 1 h de incubación, porque PBS no es un buen medio de cultivo; luego de 4 h de incubación no se lograron obtener células viables para evaluar por citometría. En términos generales, la I_F aumentó varios órdenes de magnitud con respecto al ensayo anterior (figura 60), lo que indica que la ausencia de glucosa en el medio de cultivo favorece la incorporación de las diferentes partículas a las células. Pero a pesar de esta mejora en la incorporación de partículas, no se observó una mayor incorporación de NPC:T-GLU₂₀ en comparación con la NPC:T-1107₂₀. Por otro lado, nuevamente se registra mayor incorporación de NPC:PSMA con respecto a las demás partículas.

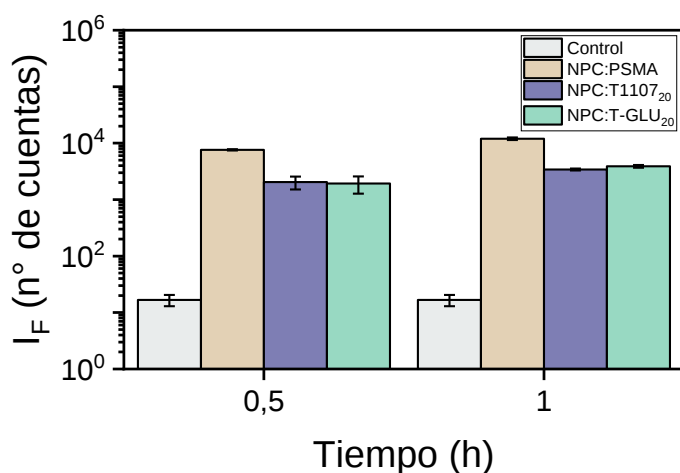


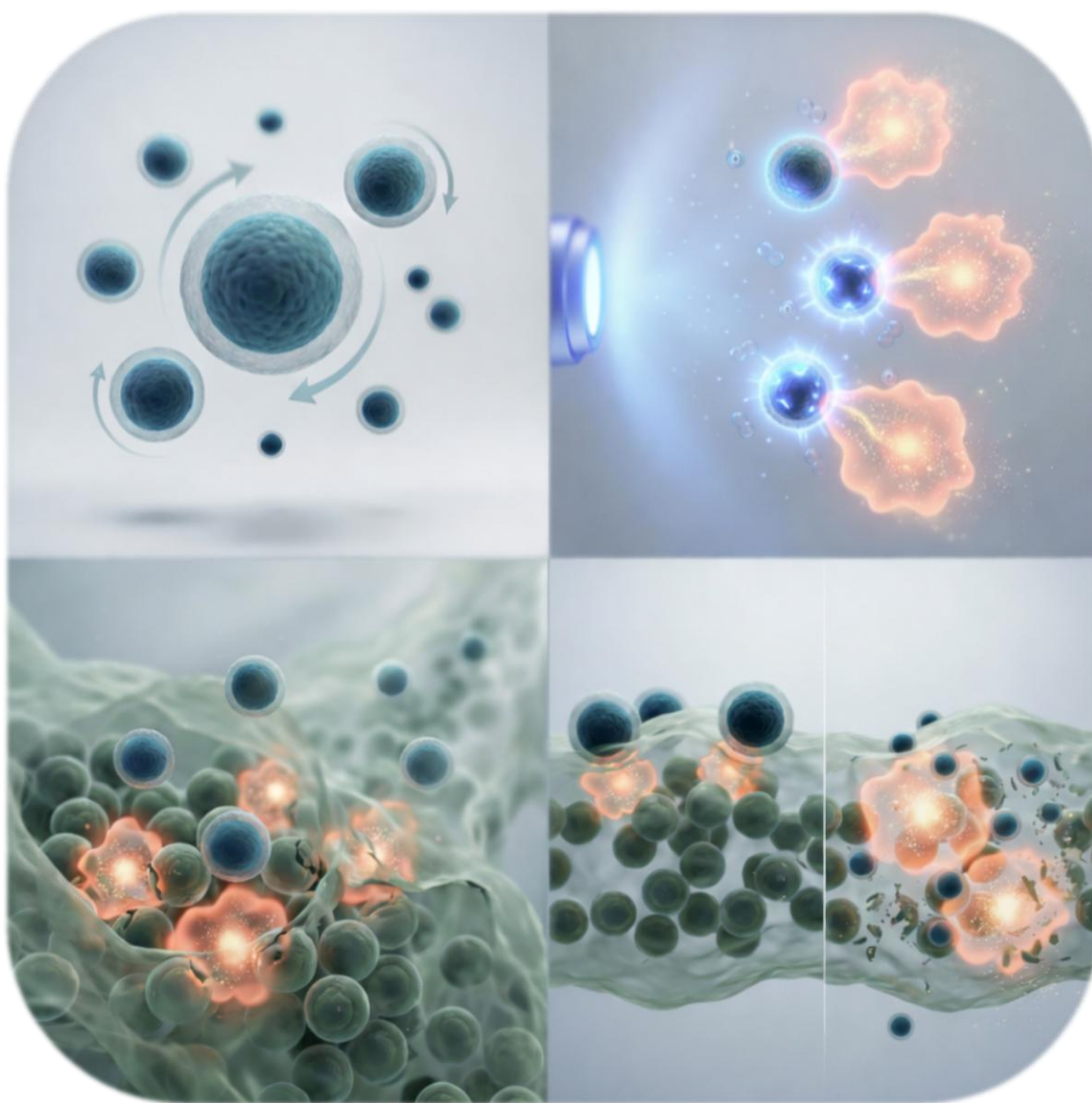
Figura 60: Medias geométricas de los histogramas de emisión de células individuales

T98G recogidos en el canal verde, incubadas en PBS. Autofluorescencia de T98G (blanco), T98G incubadas con NPC:PSMA (beige), T98G incubadas con NPC:T-1107₂₀ (violeta) y T98G incubadas con NPC:T-GLU₂₀ (verde agua). Tiempo de incubación: 0,5; 1 y 4 h. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emi}} = 510 - 540 \text{ nm}$, 10^4 eventos, concentración de partículas 10 mg/L.

A partir de estos resultados, se concluye que la funcionalización de NPC:T-GLU₂₀ con el PE T-GLU no presentan un efecto de incorporación celular superadora con respecto a las NPC:PSMA. La excelente capacidad de internalización observada para las NPC:PSMA es consistente con los excelentes resultados obtenidos previamente en la TDF contra glioblastoma utilizando estas partículas^{107,145}. Los resultados obtenidos con las partículas NPC:T-1107₂₀ y NPC:T-GLU₂₀, podrían deberse a que las concentraciones de los PE utilizados fueron muy bajas, particularmente del PE T-GLU. Entonces tal vez, la NPC:T-GLU₂₀ no presenta suficiente cantidad de moléculas de glucosa en la superficie de las partículas como para que se produzca un reconocimiento significativo por parte de los transportadores GLUT. En trabajos donde se ha reportado la utilización estos dos polímeros Tetronic® para el reconocimiento por parte de los GLUT, la concentración de los mismos era mucho mayor debido a que fueron utilizados para hacer micelas poliméricas. Por ejemplo, en el trabajo de Bukchin y colaboradores⁸², donde se reporta la obtención de T-1107 y T-GLU, determinan que la CMC de estos componentes es de 0,53 y 0,05 % p/v respectivamente. Expresados en mg/L sería 5300 mg/L y 500 mg/L para T-1107 y T-GLU respectivamente para la formación de micelas, mientras que para las NPC se utilizaron 20 mg/L. En consecuencia, la concentración óptima para su utilización como PE en NPCs es baja para lograr el redireccionamiento de NPC:T-1107 y NPV:T-GLU.

Capítulo 4:

RESULTADOS PARTE III



4.3. Resultados parte III

En la parte III de este capítulo se describen los resultados obtenidos para el siguiente objetivo específico: **Síntesis y caracterización de nanopartículas fotoactivas con diámetros comprendidos entre 5 y 10 nm.** Como se detalló en la introducción uno de los principales inconvenientes para la erradicación de biofilms se debe a la complejidad de la matriz que recubre a las células y su dificultad para llegar hasta ellas. Por lo tanto, el desarrollo de este objetivo se basa en la hipótesis de que una reducción en el diámetro de las partículas podría favorecer la penetración de las mismas hacia zonas más profundas dentro de la estructura del biofilm y en consecuencia mejorar la eficiencia fotodinámica de la PDI.

Adicionalmente se sabe que este tipo de partículas han demostrado ser nanomateriales efectivos para el tratamiento de TFD sobre células tumorales tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.^{122,141–143,145,199}; las cuales presentan un tamaño entre 20 y 40 nm. A su vez, en modelos *in vivo*, cuando las NPCs son administradas por vía intravenosa estas circulan en el torrente sanguíneo hasta ser eliminadas vía dos mecanismos principales: (i) eliminación renal y (ii) eliminación hepatobiliar. Si bien diversos factores operan en estos procesos, es conocido que el tamaño de las nanopartículas juega un rol primordial en los mecanismos de biodistribución y aclaramiento por órganos depuradores de xenobióticos.^{120,200,201}. Además, se ha reportado ampliamente que un menor tamaño de partículas favorece dichos procesos de aclaramiento.^{202–206} En base a estos antecedentes sería muy interesante que se utilizara el desarrollo de este tipo de partículas para conocer su proceso de farmacocinética.

4.3.1. Síntesis de NPC, modificación del diámetro

Primeramente, se evaluaron distintas estrategias para la obtención de NPC con un diámetro menor a 10 nm. Luego se eligió la metodología de síntesis más eficiente y se realizaron ensayos de PDI sobre cultivos planctónicos y biofilms para evaluar el desempeño de estas nuevas partículas de diámetro reducido.

4.3.1.1. Variación de la Temperatura

La primera estrategia para modificar el diámetro de las NPCs consistió en modificar la temperatura del medio acuoso donde se realiza la síntesis y simultáneamente la concentración del PC utilizado. Por lo tanto, se sintetizaron NPCs compuestas solamente F8BT (denominadas como NPC_n) sobre agua destilada a 0 °C y 50 °C utilizando como control, a la síntesis realizada a temperatura ambiente (25 °C). Y se utilizaron 3 concentraciones de F8BT: 100, 50 y 20 mg/L. Una vez obtenidas las NPC_n se midió su $\overline{D}_H$ cada muestra se realizó por triplicado.

En la figura 61, se observa que a mayor concentración de F8BT en las NPC_s mayor es el diámetro de las mismas. Así mismo, al variar la temperatura del medio acuoso, se obtiene mayor diámetro a 25 °C comparado con 0 °C y 50 °C para NPC₅₀ (barra naranja oscuro) Y NPC (barra gris). Para las partículas NPC₂₀ (barra naranja claro) los $\overline{D}_H$ son muy similares en todo el rango de temperaturas estudiadas.

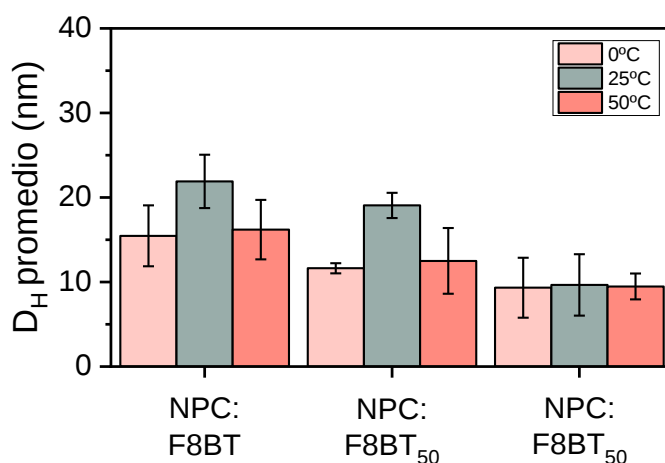


Figura 61. Síntesis de NPC_n, modificación de la temperatura del medio acuoso. Se sintetizaron NPC_n sobre un baño de agua a 0 °C (naranja claro), 25 °C (gris) y 50 °C (naranja oscuro). Concentración de partículas: 10 mg/L.

En el trabajo de Wu y colaboradores¹⁵⁷, donde se sintetizaron NPC_n de F8BT obtenidas mediante el mismo método de síntesis (nanoprecipitación), también se logró una disminución del tamaño de las partículas cuando se partía de una menor concentración del PC en el stock de inyección. Como el proceso de síntesis involucra un equilibrio entre

agregación y colapso de cadenas, al pasar de un “buen” solvente a uno “malo” dicho equilibrio se desplazaría hacia el colapso de cadenas cuando se disminuye la concentración del PC¹⁵⁷. En el trabajo de Li y colaboradores²⁰⁷, donde sintetizaron NPCs de F8BT y el PE PS-PEG-COOH (ambos polímeros a iguales concentraciones). Variando la concentración del PC, la temperatura del medio acuoso y su volumen, los autores observaron también que al aumentar la concentración del PC aumentaba el $\overline{D}_H$. En cuanto al efecto de la temperatura del medio acuoso, en este trabajo observaron que aumentaba el $\overline{D}_H$ cuando la temperatura superaba los 60 °C²⁰⁷. Estos últimos resultados no necesariamente se condicen con los aquí expresados, debido a que no se estudió la variación del $\overline{D}_H$ a temperaturas por encima de los 50 °C. Además, las concentraciones de los dos polímeros fueron diferentes, lo que afecta inevitablemente al diámetro de las NPC.

4.3.1.2. Variación del pH y la fuerza iónica

En este caso se estudió como la modificación de la composición del medio acuoso afectó al diámetro de las NPC_n. Para ello, la síntesis de estas partículas se realizó en solución buffer a distintos pH: 4, 7 y 10 con una concentración de 6×10^{-4} M en todos los casos. Además, se utilizó una solución de NaCl 6×10^{-4} M como control de fuerza iónica, lo que permitió estudiar no sólo el efecto del pH sino también la presencia de iones en solución.

En la figura 62 se presenta el $\overline{D}_H$ de las NPC_n obtenidas a distintos pH. En estos ensayos, no se produce una variación significativa del tamaño de las partículas en función de la concentración del F8BT. En este caso la variación del $\overline{D}_H$ se vio afectada principalmente por el pH de la solución. De todos los pH estudiados, el óptimo para la síntesis de NPC_n fue pH = 7 (barras color marrón intermedio), ya que con esta variable se registraron en general un $\overline{D}_H$ de menor tamaño que para el resto; con excepción de NPC donde el menor $\overline{D}_H$ se registró a pH = 10 (barras color marrón oscuro). En cuanto a la síntesis de NPC_n sobre soluciones de NaCl, los $\overline{D}_H$ obtenidos son bastante similares a los obtenidos en agua pura (barras color gris claro); esto indica que la presencia de iones, a esa concentración, no estaría afectando significativamente al proceso de obtención de las distintas partículas. Empíricamente se ha visto que en presencia de soluciones buffer (~ 0,1 M) la estabilidad de las NPCs disminuye y tienden a agregarse en función del tiempo.

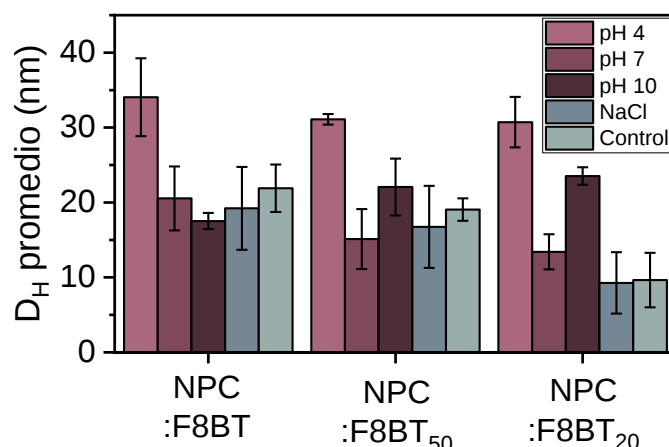


Figura 62. Síntesis de NPC_n, variación del pH y la fuerza iónica. Se sintetizaron NPC_n sobre soluciones buffer como medio acuoso a: pH = 4 (marrón claro), pH = 7 (marrón intermedio) y pH = 10 (marrón oscuro). Además, se utilizaron dos controles del medio acuoso: NaCl, que contenía fuerza iónica pero no modifica el pH (gris oscuro) y agua (gris claro). Concentración de partículas: 10 mg/L.

4.3.1.3. Agregado de un surfactante

Otra metodología de síntesis utilizada para intentar modificar el diámetro de las NPC_n consistió en el agregado de un surfactante en el medio acuoso donde se realizó la síntesis. Para ello se utilizó una solución que contenía 9×10^{-5} M del surfactante T X-100. Esta concentración está por debajo de su CMC (ver sección 3.2.1.3.).

A partir de los datos obtenidos, los cuales se presentan en la figura 63, se observó que cuando las NPC_n se sintetizaron en presencia de T X-100, las mismas mostraron un comportamiento diferente al resto de las metodologías evaluadas con respecto a las NPC control, las cuales se sintetizaron solamente en agua (barras color gris). En este caso, el $\overline{D}_H$ más pequeño se obtuvo con la NPC₅₀ (color ceniza, barra del medio), seguido por la de NPC (primera barra color ceniza). Un resultado interesante se observa cuando se sintetizaron NPC₂₀ en T X-100 (última barra color ceniza), esta combinación de variables indujo un mayor $\overline{D}_H$ que el resto. En contraposición vemos al grupo control, donde se observa claramente como al disminuir la concentración del PC, se reduce el $\overline{D}_H$ de las NPC (barras color gris), como se ha descrito en los experimentos anteriores.

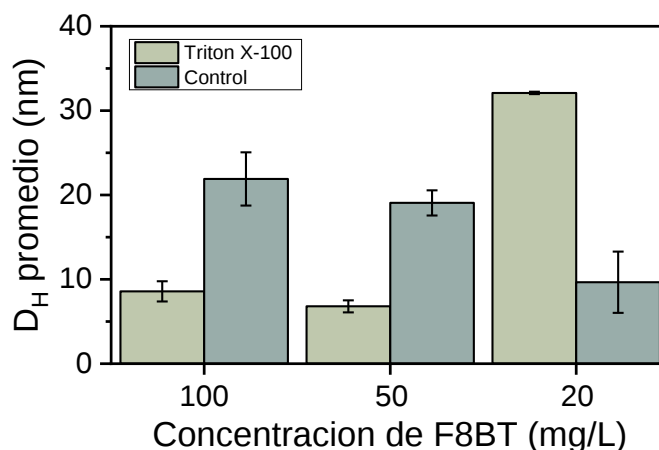


Figura 63. Síntesis de NPC_n, agregado de un surfactante $\overline{D_H}$ de las NPC sintetizadas en presencia de T X-100 (ceniza) y un control en agua (gris) a temperatura ambiente.

Concentración de partículas: 10 mg/L.

Esta disminución en el $\overline{D_H}$ cuando las NPC fueron sintetizadas en T X-100 se condice con lo publicado por Men y colaboradores²⁰¹, que sintetizaron NPCs utilizando el PC DPP-BTzTD y PSMA (25 % en peso del PC) sobre una solución de T X-100. En dicho trabajo, lograron disminuir el $\overline{D_H}$ desde 25 a 4 nm sintetizándolas también por el método de reprecipitación controlada. Y si bien, la concentración de T X-100 del trabajo de Men fue significativamente mayor (0,25 % en peso), la tendencia fue la misma. La disminución en el $\overline{D_H}$ se vería influida por la presencia del surfactante, impidiendo la formación de “grandes” agregados de PC durante el proceso de síntesis. En consonancia con lo observado en esta tesis, están los estudios realizados por Caires y colaboradores, donde utilizan el surfactante Tween 20® para la síntesis de NPCs (compuestas por el PC poli(2,5-di(hexiloxi)cianotereftalilideno), CN-PPV); en este trabajo observan también que en presencia del surfactante se obtienen NPCs con un diámetro más pequeño (de 220 a 110 nm)²⁰⁸.

4.3.1.4. Modificando la concentración del polímero estabilizante

Como se mencionó en materiales y métodos, la segunda estrategia para modificar el $\overline{D}_H$ de las NPCs consistió en mantener fija la concentración del F8BT y modificar la concentración del PE PSMA. Esta estrategia obedece a dos consideraciones:

- † Por un lado, empíricamente se ha visto que el agregado de un 20 % de PSMA disminuye el $\overline{D}_H$ de las NPC con respecto a aquellas que no tienen dicho PE.
- † Además, en bibliografía se ha reportado que el agregado de PSMA disminuye el D_H de las nanopartículas en comparación a aquellas que no lo tienen^{201,209}. En estos dos trabajos se obtuvieron NPCs con distintos PC y una sola concentración de PSMA; además, en general los $\overline{D}_H$ son mayores a los que se desean obtener en esta tesis.

En base a estos antecedentes se planteó estudiar cómo se modifica el $\overline{D}_H$ cuando aumenta la concentración del PE. Con esto en mente, y considerando a la masa del F8BT como el 100 % p/p, se sintetizaron NPC de F8BT + un 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 o 500 % p/p de PSMA (denominadas como NPC:PSMA_n). Se consideraron a las NPC:PSMA (con 20 % de PSMA) como el “grupo control” a partir del cual se compararon el resto de las partículas obtenidas; esta elección se debe a que las NPC:PSMA están bastante estudiadas. El método de síntesis se encuentra descripto en la sección 3.2.1.3.

Los $\overline{D}_H$ obtenidos para las distintas partículas de NPC:PSMA_n, se presentan en la figura 64. Se observa que con el aumento de PSMA disminuyó el tamaño de las partículas, logrando efectivamente la disminución del $\overline{D}_H$ que se pretendía obtener. Partiendo de un diámetro de 18 nm (NPC:PSMA, primera barra, color beige claro), se logró disminuir el mismo hasta 5 nm (NPC:PSMA₅₀₀, última barra, color marrón). Además, se pudo observar a simple vista que todos los banchs de NPC:PSMA_n se mantuvieron estables coloidalmente por un período aproximado de 2 meses (datos no mostrados).

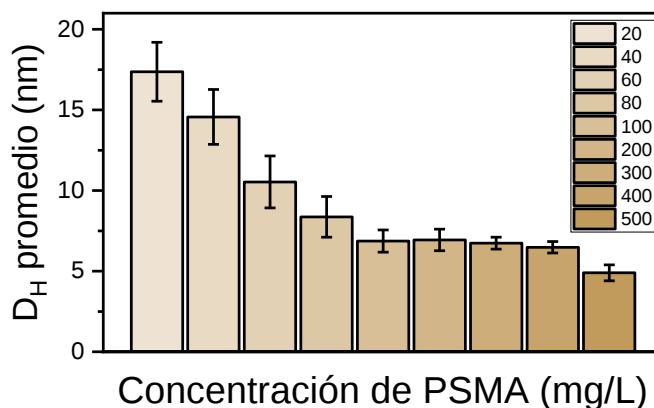


Figura 64. Síntesis de NPC:PSMA_n, modificando la concentración de PE. $\overline{D}_H$ de las NPC:PSMA_n. La escala de colores va desde beige hacia al marrón a medida que aumenta el % de PSMA. Concentración de partículas utilizadas; 10 mg/L.

En trabajos previos publicados por el grupo de investigación se ha reportado que los valores de $\overline{D}_H$ van desde ~ 40 nm para NPC de F8BT²⁷ a ~ 20 nm cuando las NPCs de F8BT contienen un 20 % de PSMA¹⁴¹. En trabajos publicados por otros autores también se ha reportado una disminución considerable del $\overline{D}_H$ de las NPCs con el agregado de PSMA. Un ejemplo es el trabajo de Nakamura y colaboradores²⁰⁹, donde sintetizaron NPCs compuestas por F8BT + PSMA (25 % p/p) se observó una disminución en el $\overline{D}_H$ a medida que aumentaba el pH y en NPCs sin PSMA, pero siempre a la misma concentración de PC. Este efecto en el $\overline{D}_H$, podría deberse a un aceleramiento de la hidrólisis del PSMA, a medida que aumenta el pH de la solución acuosa. En el artículo de revisión de Kang y colaboradores se explica que el agregado de mayores cantidades PE genera NPC de menor tamaño, porque un aumento de este tipo de polímeros tiene un efecto sobre la superficie de la NPCs, donde no sólo favorece la disminución del tamaño si no que aumenta su estabilidad coloidal²¹⁰.

De todas las concentraciones de PSMA probadas, fueron las NPC:PSMA₅₀₀ aquellas que presentaron un menor $\overline{D}_H$. Además de su menor diámetro, las NPC:PSMA₅₀₀, fueron igual de estables, en el tiempo, que las NPC:PSMA las cuales son consideradas como de referencia.

Por lo tanto y debido a su fácil método de obtención y elevada estabilidad coloidal, se eligieron a las NPC:PSMA₅₀₀ para continuar con los ensayos de caracterización y posterior prueba de concepto, donde se evalúa si el diámetro reducido de estas favorece la inactivación del biofilm debido a una mayor penetración hacia el interior de su estructura. Para la realización de estos ensayos también se utilizaron NPC:PSMA como referencia de una partícula de mayor diámetro.

4.3.2. Caracterización extendida de NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀

Una vez seleccionadas las nanopartículas que se van a utilizar, se procedió a realizar la caracterización de las mismas. La primera etapa de caracterización consistió en tomar espectros de absorción, excitación y emisión para estudiar si el agregado de PSMA modifica las propiedades de fluorescencia intrínsecas del F8BT contenido en las NPC. Es importante aclarar que esta etapa de caracterización se realizó con NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀ sin el agregado de la porfirina PtOEP, ya que, como se mencionó anteriormente, el dopado con la misma inactiva la fluorescencia del F8BT de manera significativa²⁷.

En la figura 65 se presentan los espectros de absorción de NPC:PSMA (curva beige) y NPC:PSMA₅₀₀ (curva marrón). En la figura 65A se observan los espectros sin normalizar y, en la figura 65B se observan los espectros normalizados utilizando como referencia el valor de absorbancia a 456 de las NPC:PSMA. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de PSMA se produce un leve desplazamiento batocrómico de ~ 5 nm. Además, con el aumento del % de PSMA, se observa una leve disminución en la absorción del primer pico (alrededor de 325 nm) que normalmente tiene el espectro de absorción de las NPC:PSMA y que se corresponde a la absorción de F8BT.

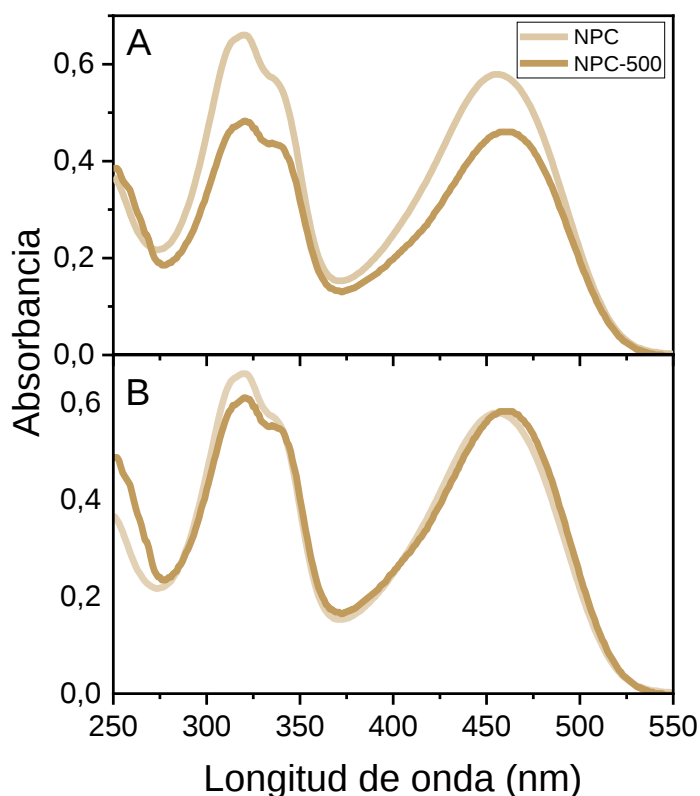


Figura 65. Espectros de absorción de NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀. (A) espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. Color beige para NPC:PSMA y marrón para

NPC:PSMA₅₀₀ Concentración de partículas usadas: 13,3 mg/L y 10,9 mg/L de NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀ respectivamente.

En la figura 66 se muestran los espectros de emisión de las NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀. Para tomar estos espectros (y también para los de excitación) se igualaron las absorbancias de las dos partículas a $\lambda_{456} = 0,1$ y se tomaron todos los espectros utilizando las mismas condiciones instrumentales. Cuando los espectros no están normalizados (figura 66A), se observa un leve aumento de la emisión de las NPC:PSMA₅₀₀ (curva marrón) con respecto a las NPC:PSMA (curva beige) y cuando los mismos se normalizan (figura 66B) prácticamente no se observan cambios en la estructura de los espectros. Eso indica que la presencia de mayores concentraciones de PSMA no estaría afectando significativamente a las propiedades fotofísicas del PC F8BT.

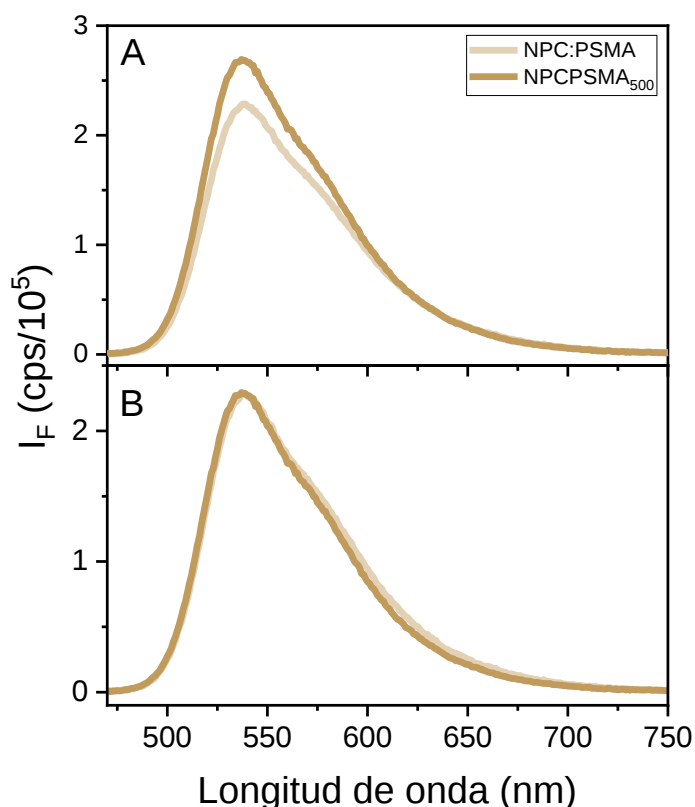


Figura 66. Espectros de emisión de NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀. (A) espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. Color beige para NPC:PSMA y marrón para NPC:PSMA₅₀₀. Condiciones de medición para todas las muestras: $\lambda_{\text{exc}} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750$ nm slit 1, señal S1c, 2,4 mg/L.

El leve aumento en la intensidad de emisión del F8BT cuando aumenta la concentración de PSMA, puede interpretarse considerando que las cadenas poliméricas del PSMA sirven como “espaciador” entre los cromóforos del F8BT. De esta manera, disminuyen la eficiencia de los eventos de homo-ET del tipo Förster que ocurren entre los “cuasi-cromóforos” de las cadenas del PC, los cuales pueden, eventualmente, conducir la energía de excitación a sitios Q, los cuales fueron descritos previamente. En el trabajo de Zhao y colaboradores se hace una revisión sobre el efecto que generan los PE sobre las distintas propiedades de las NPC. Un efecto notable del agregado del PE a la NPC es el aumento de los rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia⁶⁰. Al igual que en el trabajo Zhao y colaboradores en esta tesis se registra un aumento en la emisión de fluorescencia con el agregado de mayores cantidades de PSMA, lo que podría estar modificando el ϕ_F de las NPCs.

En la figura 67 se presentan los espectros de excitación normalizados de NPC:PSMA (curva beige) y NPC:PSMA₅₀₀ (curva marrón), donde no se registran cambios en la forma del mismo en ninguna de las partículas. Este resultado confirma nuevamente que la presencia de mayores concentraciones de PSMA no afectan apreciablemente a las propiedades fotofísicas del PC F8BT.

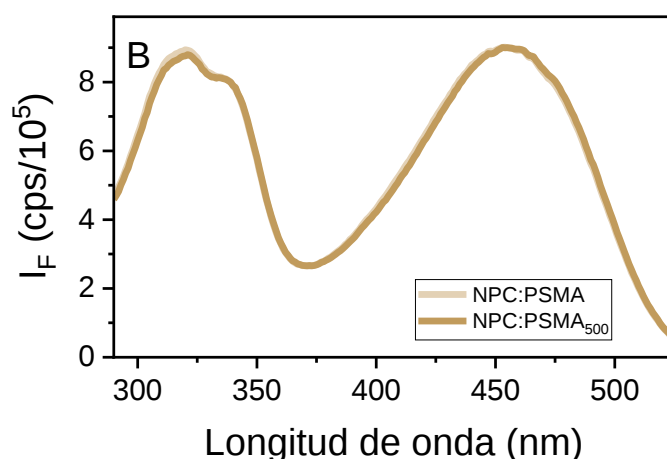


Figura 67. Espectros de excitación normalizados de NPC:PSMA y NPC:PSMA₅₀₀.

Color beige para NPC:PSMA y marrón para NPC:PSMA₅₀₀. Condiciones de medición: λ_{emi} = 600 nm slit 1, λ_{exc} = 325-590 nm slit 2, señal S1/R1c. Concentración de partículas 2,4 mg/L.

4.3.2.1. Caracterización de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP

La segunda etapa de caracterización se realizó con ambas nanopartículas dopadas volumétricamente con 10 % p/p de PtOEP (denominadas como NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP), ya que el dopado con dicha porfirina les confiere la capacidad para producir eficientemente $^1\text{O}_2$ ²⁷ como se ha mencionado anteriormente. Y es dicha capacidad amplificada de producción de $^1\text{O}_2$ lo que permite utilizarlas como PS en la PDI. En esta etapa de caracterización se volvieron a tomar espectros de absorción, para confirmar la presencia de la porfirina en ambas nanopartículas, se midió el $\overline{D}_H$ para ver si la presencia de PtOEP aumenta el tamaño de las nanopartículas, se midió el ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y se tomaron imágenes de TEM de una solución de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP.

En la figura 68 se muestran en color rosa y coral las curvas correspondientes a los espectros de absorción de las NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP respectivamente sin normalizar (figura 68A) y normalizados (figura 68B). En ambas preparaciones se observan claramente los picos de absorción característicos del F8BT ($\lambda \sim 325$ y 456 nm) y de la PtOEP ($\lambda \sim 400$ y 530 nm). Al igual que en la figura 65, se observa un muy leve desplazamiento batocrómico en las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP de ~ 5 nm.

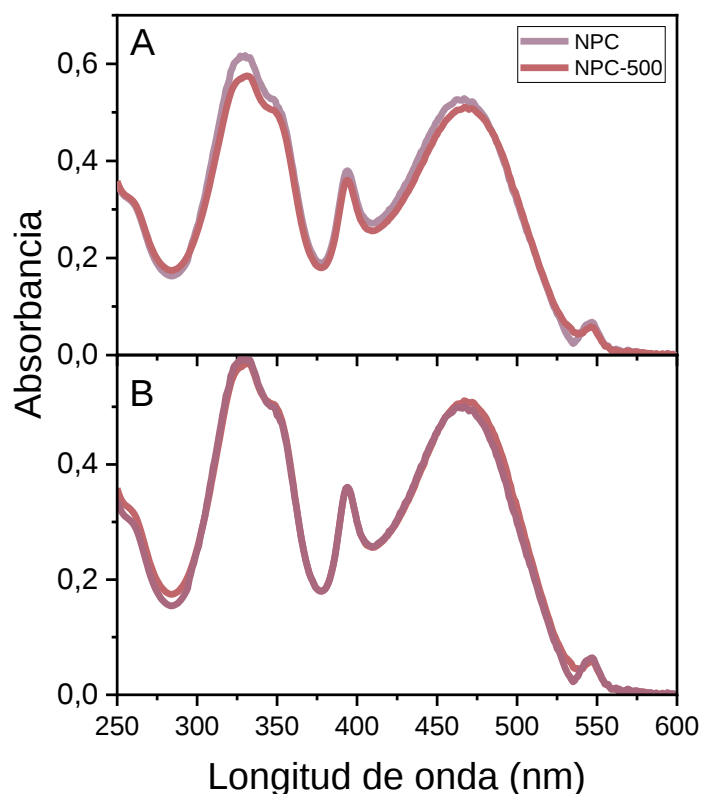


Figura 68. Espectros de absorción de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP.

(A) espectros sin normalizar. (B) espectros normalizados. Color rosa para NPC:PSMA+PtOEP y coral para NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Concentración de partículas: 10,3 mg/L y 11,7 mg/L para NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP respectivamente.

Se midió el $\overline{D}_H$ de ambas nanopartículas y en la figura 69 se presentan los histogramas de distribución de $\overline{D}_H$ de NPC:PSMA+PtOEP (figura 69A) y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (figura 69B). El $\overline{D}_H$ se determinó a partir de un ajuste gaussiano (línea continua negrada) realizado para el histograma de cada muestra. Los cuales fueron de $19,7 \pm 0,4$ nm para NPC:PSMA+PtOEP y de $6,06 \pm 0,1$ nm para NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Se observa que la presencia de la porfirina aumenta levemente el tamaño de las dos partículas (ver figura 64 donde se muestran los diámetros de ambas partículas sin PtOEP). Aun así, las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP se encuentran dentro del rango de tamaños que se esperaba conseguir (entre 5 y 10 nm). Además, las poblaciones de las dos partículas son bastante homogéneas, especialmente para NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP donde se evidencia una distribución de tamaños estrecha y la ausencia de agregados significativos.

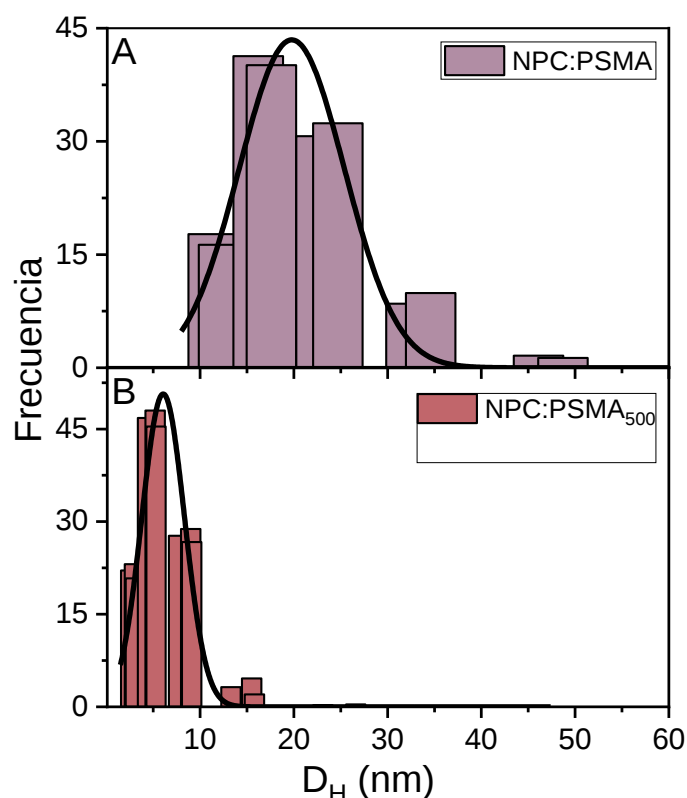


Figura 69. Distribución de tamaño de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP mediante DLS. Los datos de cada muestra fueron ajustados a una función gaussiana (línea continua negra). (A) histogramas de distribución del tamaño de NPC:PSMA+PtOEP. (B) distribución de tamaños de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Concentración de partículas 10 mg/L.

Mientras que en la figura 70 se muestran los resultados obtenidos a partir de las mediciones del tamaño de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP obtenidas a partir de imágenes de TEM. Primero se muestra la distribución de tamaños de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (figura 70A). Mientras que en las figuras 70B, 70C y 70D se muestran las imágenes de TEM a distintas magnificaciones, con sus barras de escala de 200, 100 y 50 nm respectivamente. La distribución de tamaños de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP se obtuvo a partir de la medición de los diámetros de las partículas en diferentes imágenes y a diferentes magnificaciones, posteriormente la distribución de diámetros obtenida fue ajustada a una función gaussiana (línea continua negra). Se obtuvo que el diámetro de las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP obtenido mediante esta técnica fue de $8,09 \pm 0,1$ nm, levemente mayor que el $\overline{D_H}$ obtenido mediante DLS.

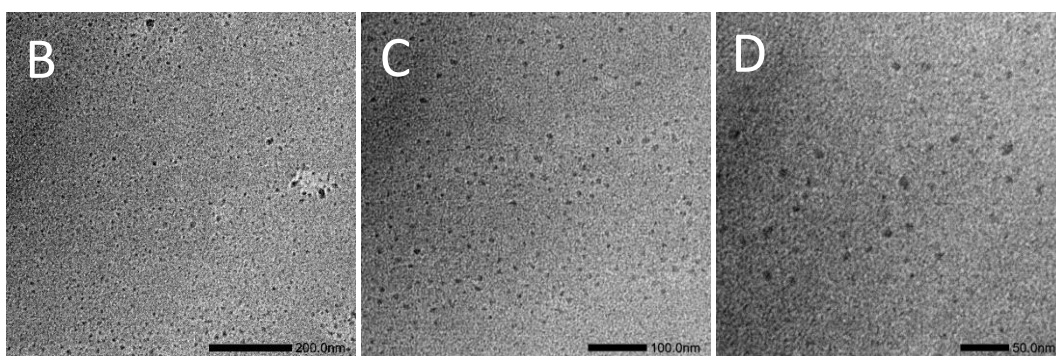
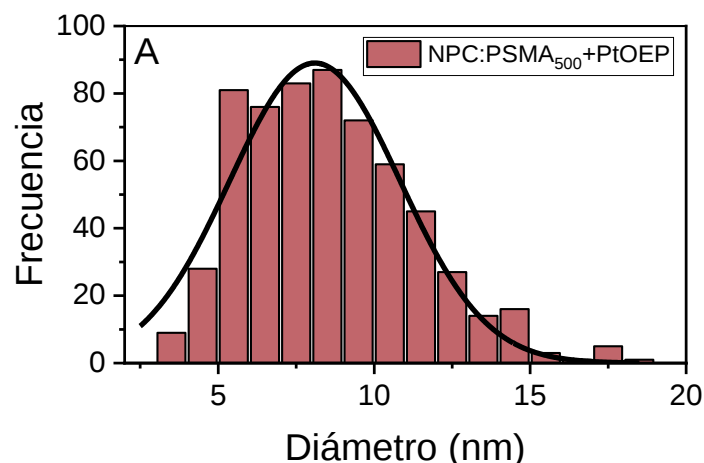


Figura 70. Mediciones del diámetro de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP mediante TEM. (A) distribución de tamaños obtenido a partir de las imágenes de TEM. (B-D) imágenes de TEM de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Escala de magnificación de las imágenes 200 (B), 100 (C) y 50 (D) nm.

Las dos técnicas empleadas para determinar el tamaño de las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP presentan diferencias metodológicas sustanciales. Por un lado, TEM permite medir partículas en estado seco, adheridas a un sustrato (grilla) y bajo condiciones de alto vacío, lo que podría inducir una leve deformación o contracción estructural de las partículas. En contraste, la técnica de DLS determina el $\overline{D_H}$ de las partículas en suspensión, asumiendo una morfología esférica para el análisis matemático de los datos. A pesar de las diferencias entre ambas técnicas, los valores obtenidos por ambas técnicas resultan consistentes entre sí, observándose una diferencia de ~2 nm.

Por último, se midió el ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP para conocer si la presencia de mayores cantidades de PSMA afecta a la carga superficial que

tienen estas últimas. Se conoce que las NPC:PSMA+PtOEP tienen un ζ negativo y con respecto a las que contienen un mayor porcentaje de PSMA, se esperaría que fuesen todavía más negativas debido a que el PE presenta carga negativa en solución (la reacción de hidrólisis del PSMA en medios acuosos se muestra en la figura 10). En la figura 71 se presentan los resultados de las mediciones de ζ , donde las NPC:PSMA+PtOEP tienen un ζ promedio de $-35,7 \pm 0,6$ mV (diagrama de cajas rosa); mientras que las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP son levemente más positivas, con un ζ promedio de $-32,2 \pm 2,3$ mV (diagrama de cajas coral).

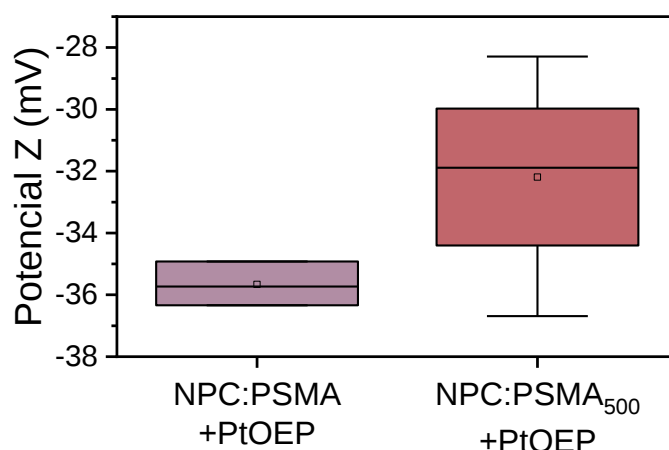


Figura 71. ζ de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. El color rosa y coral corresponden a los diagramas de cajas de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP respectivamente. Concentración de partículas usada: 10 mg/L.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que las NPC:PSMA+PtOEP presentan una densidad de carga mucho más negativa que cuando el PE PSMA no está presente (NPC)^{141,175}; como se mencionó previamente se debe a la hidrólisis del PSMA en entornos acuosos. Siguiendo este razonamiento se esperaba que las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP fuesen más negativas que las NPC:PSMA+PtOEP y contrariamente a lo esperado, las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP tienen un ζ levemente menor que las NPC:PSMA+PtOEP. Si bien dicho ζ es menor, no difiere significativamente del ζ de las NPC:PSMA+PtOEP.

Para tratar de entender estos resultados, se hizo una estimación muy simple de la concentración molar de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP siguiendo dos trabajos previos del grupo^{27,167}; y los detalles de este cálculo se describen en la sección

3.4.2.3. Esta estimación considera entre otras cosas la masa total de material (F8BT+PSMA+PtOEP), la densidad del material nanoparticulado y el diámetro medio de las partículas. A partir de dicha estimación, una solución de 10 mg/L (que es la concentración utilizada para las medidas de DLS) de NPC:PSMA+PtOEP tiene una concentración molar de $\sim 1,9 \times 10^{-8}$ M, mientras que una solución de 10 mg/L de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP tiene una concentración molar de $\sim 3,7 \times 10^{-7}$ M; es decir que la solución de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP tiene ~ 20 veces más de partículas que la de NPC.

Por otro lado, también se estimó la cantidad de moléculas de PSMA que hay por cada partícula de NPC:PSMA+PtOEP y de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Para ello, se consideró que una solución de 10 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP tiene 10 mg/L de F8BT y 2 mg/L de PSMA; esos 2 mg/L de PSMA se dividen por su PM (1700g/mol) para obtener su concentración molar, y a ese resultado se lo divide a su vez por la concentración molar de NPC:PSMA+PtOEP. Para el caso de las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP la solución de 10 mg/L contiene 10 mg/L de F8BT y 50 mg/L de PSMA. Estos resultados indican que hay $\sim 6,2 \times 10^4$ moléculas de PSMA por cada partícula de NPC:PSMA+PtOEP y $\sim 8 \times 10^4$ moléculas de PSMA por cada partícula de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Por lo tanto, estas estimaciones sugieren que no hay grandes diferencias en la cantidad de moléculas de PSMA por unidad de nanopartícula, lo que explicaría la poca diferencia observada en los potenciales zeta de ambas partículas.

4.3.3. Ensayos de PDI con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP

4.3.3.1. Estudio del efecto post fotodinámico en cultivos planctónicos

El primer ensayo para evaluar la citotoxicidad de las partículas desarrolladas sobre cultivos planctónicos consistió en realizar una curva de muerte, donde se cuantificó la carga bacteriana (mediante recuento de colonias) en función del tiempo de irradiación (los detalles del ensayo se encuentran especificados en el apartado 3.5.3.1).

En la figura 72, se observa como disminuye la carga bacteriana al aumentar el tiempo de irradiación. El grupo control (curva gris plata) consistió en bacterias en ausencia de partículas que fueron irradiadas en iguales condiciones que los tratamientos con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP; en este caso no se observa una disminución en la carga bacteriana durante los 30 min de irradiación. Lo cual indica que la dosis de luz

utilizada no tiene efecto citotóxico intrínseco (irradiancia 28,8 J/cm²). Para los tratamientos, se evaluaron dos concentraciones de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP de 1 y 5 mg/L. Cuando las bacterias fueron tratadas con NPC:PSMA+PtOEP + luz (curva rosa), se observa una disminución de 1,95 y 1,24 log para las concentraciones de 5 y 1 mg/L de NPC:PSMA+PtOEP respectivamente. Estos valores son muy similares a los mostrados en la parte I de resultados, resultado que era esperable ya que se utilizaron las mismas partículas y condiciones experimentales (figura 39). Mientras que en el tratamiento con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP + luz (curva coral), indujo un brusco descenso de la carga bacteriana durante los primeros 10 minutos de irradiación, pero luego se mantuvo relativamente constante durante el resto del tiempo de irradiación. En este tratamiento se logró la reducción de 2,05 y 1,94 log para 5 y 1 mg/L de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Esta disminución indica que el tratamiento producido con estas partículas también ejerce un efecto bacteriostático, donde se inhibe el crecimiento bacteriano.

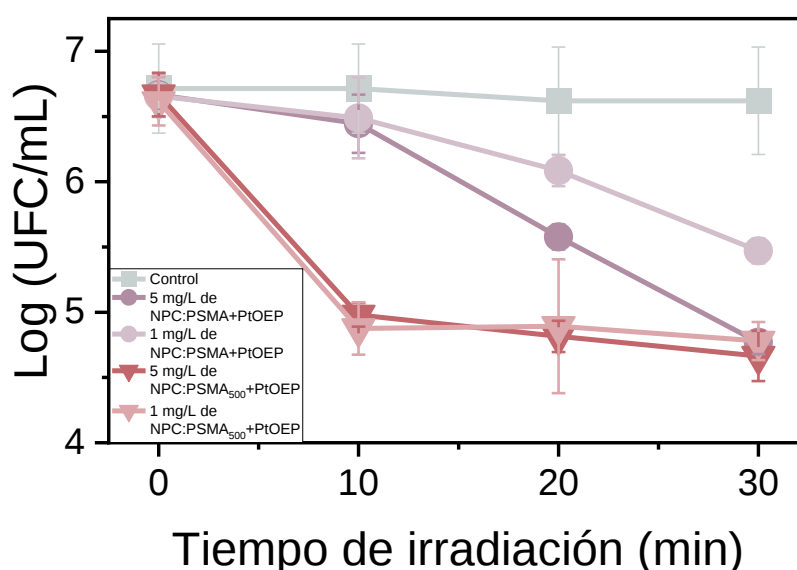


Figura 72. Citotoxicidad fotoinducida en cultivos planctónicos de MRSA con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Disminución de la carga bacteriana en función del tiempo de irradiación y la concentración de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Se irradió la muestra cada 5 min (dosis de luz cada 10 min = 9,6 J/cm²) y cuantificó la carga bacteriana luego de cada ciclo de irradiación. Grupo control (gris plata), MRSA tratadas con NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y MRSA incubadas con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Los colores más oscuros corresponden a las dosis más altas (5 mg/L) y los más claros a las dosis más bajas (1 mg/L).

4.3.3.2. Estudio del efecto post fotodinámico sobre biofilms maduros

Como se discutió anteriormente, la importancia de utilizar partículas de diámetro reducido radica en la posibilidad que estas tengan de migrar hacia zonas más profundas de la matriz del biofilm y, cuando se realiza la PDI, poder ejercer un efecto generalizado hacia toda la estructura. Por lo tanto, el estudio del daño fotoinducido sobre biofilms se centró en los dos aspectos característicos de dicha estructura: matriz de EPS y bacterias.

4.3.3.2.1. Cuantificación de la biomasa total

En la figura 73 se observa la disminución de la biomasa total del biofilm luego de la PDI con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Del lado izquierdo, se encuentran los controles en oscuridad, donde se registra una disminución del ~ 25 % de la biomasa del biofilm que recibió NPC:PSMA+PtOEP (barra color rosa) y del ~ 30 % cuando se incubó con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (barra color coral). Estos resultados indican que ambas nanopartículas presentan un moderado efecto citotóxico intrínseco; y dicho efecto es más marcado para NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Del lado derecho de la figura se encuentran los tratamientos de NPC:PSMA+PtOEP y luz y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz. En este caso la disminución de la biomasa es significativamente mayor debido al efecto de la luz, donde el tratamiento realizado con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz redujo la biomasa en un ~ 40 % y el tratamiento de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz la redujo más del 50 %.

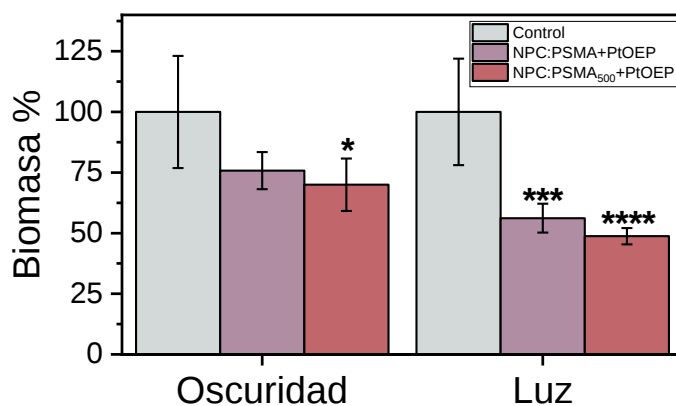


Figura 73. Cuantificación de la biomasa total de biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Izquierda controles de oscuridad y

derecha tratamientos con luz. Biofilm control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y Biofilm + NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

4.3.3.2.2. Ensayo de actividad metabólica

Para estudiar la viabilidad celular, se utilizó el ensayo de la resazurina, que mide actividad metabólica celular debido a que las enzimas respiratorias reducen la sal de resazurina (de color azul y no fluorescente) a resorufina (de color rosa y fluorescente). Esta técnica tiene la particularidad de que se puede seguir mediante espectroscopía UV-vis y espectroscopía de fluorescencia, los detalles experimentales se describen en la sección 3.5.2.3. Al igual que MTT, el ensayo de la resazurina solo mide actividad metabólica, por lo que se puede asumir que a mayor actividad metabólica mayor será la viabilidad celular.

En la figura 74 se presentan los resultados del ensayo de viabilidad celular. Del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad y del lado derecho los tratamientos con luz. En oscuridad, observa que la actividad metabólica disminuye un ~ 50 % y ~ 40 % cuando el biofilm se incubó con NPC:PSMA+PtOEP (barra rosa) y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (barra coral) respectivamente. Esto confirma nuevamente que ambas nanopartículas presentan un cierto efecto citotóxico intrínseco. Cuando los biofilms fueron tratados con partículas y luz, la disminución de la actividad metabólica es mucho más significativa. El tratamiento de biofilm tratado con NPC:PSMA+PtOEP y luz, provocó una disminución en la actividad metabólica de ~ 70 %. Mientras que el tratamiento con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP + luz, se logró una disminución en la actividad metabólica de biofilm del ~ 90 %. La disminución de la actividad metabólica cuando el biofilm fue tratado con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz fue significativamente menor con respecto al grupo control, esto indica que el menor tamaño de las partículas induce un mayor efecto citotóxico.

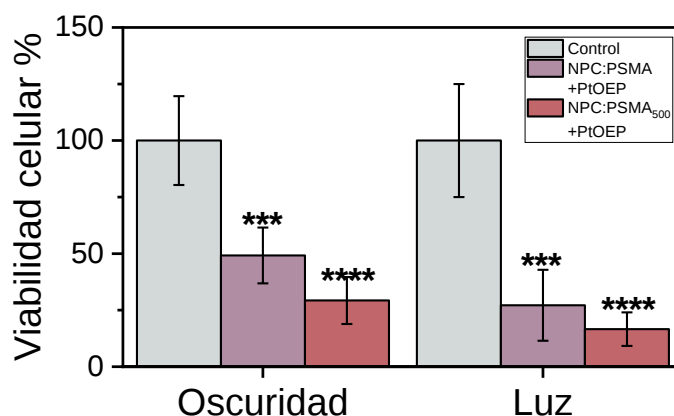


Figura 74. Ensayo de actividad metabólica sobre biofilms maduros con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Izquierda controles de oscuridad y derecha tratamientos con luz. Biofilm control (gris plata), biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y Biofilm + NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

4.3.3.2.3. Cuantificación de proteínas libres en el sobrenadante del biofilm

Como se mencionó anteriormente, el ensayo de Bradford permite cuantificar proteínas en solución, por lo que en esta tesis se lo utiliza como un indicador del daño doblemente fotoinducido por la PDI: a la matriz de EPS y a las bacterias que lo conforman. Dado que el tratamiento compromete tanto la integridad celular como la matriz de EPS, se espera poder cuantificar proteínas que se liberen al sobrenadante luego del tratamiento con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz.

En la figura 75 se encuentran los resultados obtenidos para la cuantificación de las proteínas del sobrenadante de biofilms maduros tratados previamente con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP, del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad y del lado derecho los tratamientos con luz. Para los controles en oscuridad, solo se registra un aumento en la concentración de proteínas cuando los biofilms fueron tratados con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (barra coral). Dicho resultado es significativamente mayor que para el control (barra gris plata) y biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (barra rosa). Los resultados obtenidos en oscuridad resultado indican nuevamente un cierto efecto citotóxico intrínseco de las partículas. Cuando se realizó el tratamiento de PDI, todas las muestras liberaron una mayor cantidad de proteínas al sobrenadante del biofilm, pero la

concentración significativamente mayor se obtuvo cuando los biofilms fueron tratados con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz. Este resultado estaría indicando que, según lo esperado, un menor tamaño de partícula (~ 6 nm) favorecería el ingreso de las mismas hacia el interior del biofilm aumentando la eficiencia de la PDI con respecto a las NPC:PSMA+PtOEP (~ 20 nm).

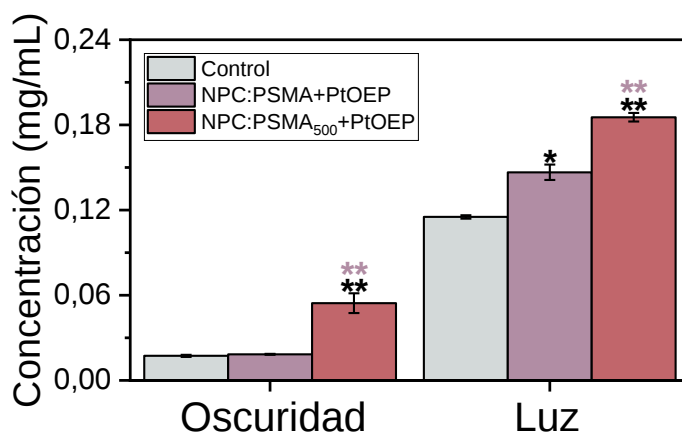


Figura 75. Cuantificación de proteínas en el sobrenadante de biofilms tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Izquierda controles de oscuridad y derecha tratamientos con luz. Biofilm control (gris plata), biofilm tratado con NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y biofilm tratado con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L. Dosis de luz: 57,6 J/cm².

4.3.3.2.4. Tinción de la matriz de EPS

El último ensayo realizado para estudiar el efecto fotoinducido de las partículas de diámetro reducido sobre biofilms consistió en teñir la matriz de EPS luego de la PDI. Para ello, se utilizó el colorante fluorescente CW que se une a los componentes de la misma. En la figura 76, se muestran los resultados de este ensayo. Del lado izquierdo se encuentran los controles en oscuridad y del derecho los tratamientos con luz. En oscuridad, no se observan cambios en la intensidad de fluorescencia de la matriz teñida ni para el control ni para ninguno de los tratamientos. En cambio, cuando el biofilm fue tratado con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz (barras rosa y coral respectivamente), se produjo una disminución significativa de la I_F con respecto al control (barra gris plata), lo que indica una menor cantidad de matriz de EPS. Esta disminución fue más notoria cuando

el biofilm fue tratado con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz, lo que indica que el menor tamaño de las partículas favorece la erradicación de estas estructuras multirresistentes.

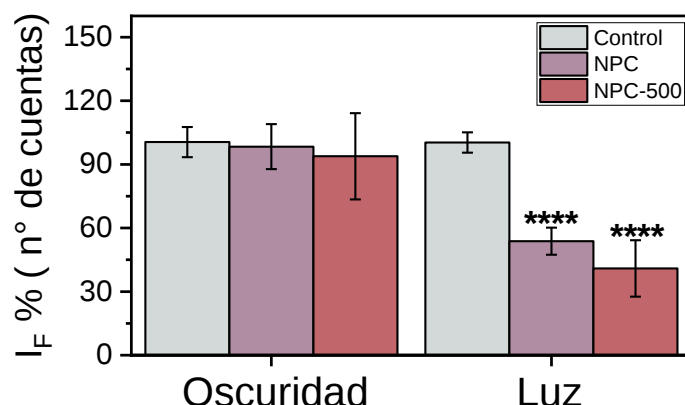


Figura 76. Tinción de la matriz de EPS de biofilms tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP. Izquierda controles de oscuridad y derecha tratamientos con luz. Biofilm control (gris plata), biofilm tratados NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y Biofilm tratados con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentración de partículas utilizadas: 20 mg/L.

En líneas generales, los tratamientos con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP y luz presentan una mejora en la eficiencia de la PDI con respecto a las NPC:PSMA+PtOEP. Esto podría interpretarse como una consecuencia del menor diámetro que presentan las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP, lo que favorece su distribución a lo largo de toda la estructura del biofilm, pudiendo llegar hacia zonas más profundas del mismo. Esta mejora en la eliminación de biofilms, cuando se reduce el tamaño de las nanopartículas está descrito en algunos trabajos^{1,49,50,170}. Un claro ejemplo de esto se encuentra en el trabajo de Tang y colaboradores²¹¹, donde se sintetizaron nanopartículas de diferente tamaño para la PDI sobre biofilms de *Cándida albicans*. Ellos observaron que las partículas de menor tamaño (15 nm), fueron las que mejor eficiencia antibiofilm presentaron, lo cual fue atribuido a su tamaño y a la capacidad de ingresar hacia capas más profundas del biofilm. Esto habla de que la capacidad que tiene una nanopartícula de generar ROS es tan importante como el lugar donde se posicionan, porque al ingresar en zonas más profundas del biofilm, se maximiza el efecto producido por las ROS. En el trabajo de Ali y colaboradores²¹² se obtuvieron nanopartículas de plata de 12 y 45 nm, y observaron que las propiedades

antibacterianas y antibiofilm estaban relacionadas de manera inversa con su tamaño. Y determinaron que el daño producido está relacionado con su tamaño reducido. Si bien en el trabajo de Ali, no se utilizan NPCs ni fototerapias, sus resultados demuestran que la mayor efectividad terapéutica está relacionada directamente con el tamaño de las partículas que con su mecanismo de acción antibacteriana.

4.3.4. Ensayos de viabilidad celular en células eucariotas

Como se mencionó en la primera parte del capítulo de resultados, el estudio de la biocompatibilidad del material es una etapa crucial para evaluar su posible aplicabilidad en sistemas vivos. Tal como se describió anteriormente, se siguieron los lineamientos descriptos en la norma ISO 10993-4¹⁸⁵ para realizar los ensayos de actividad metabólica en fibroblastos y hemólisis de eritrocitos.

4.3.4.1. Actividad metabólica en fibroblastos

Para estudiar la biocompatibilidad de las NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP sobre fibroblastos midió la actividad metabólica mediante un ensayo de MTT luego de 1 h de incubación con distintas concentraciones de las dos partículas en oscuridad (1, 5, 10 y 20 mg/L). Los detalles experimentales se describen en la sección 3.6.1. En la figura 77 se observa que a medida que aumenta la concentración de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP disminuye la actividad metabólica. Dicha disminución se hace más significativa cuando las concentraciones de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP son de 10 y 20 mg/L, lo que indica que a partir de estas concentraciones las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP producen un fuerte efecto citotóxico de fibroblastos. Este efecto no se observa para los fibroblastos tratados con NPC:PSMA+PtOEP, lo que estaría indicando que la toxicidad depende principalmente del tamaño que presentan las NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP.

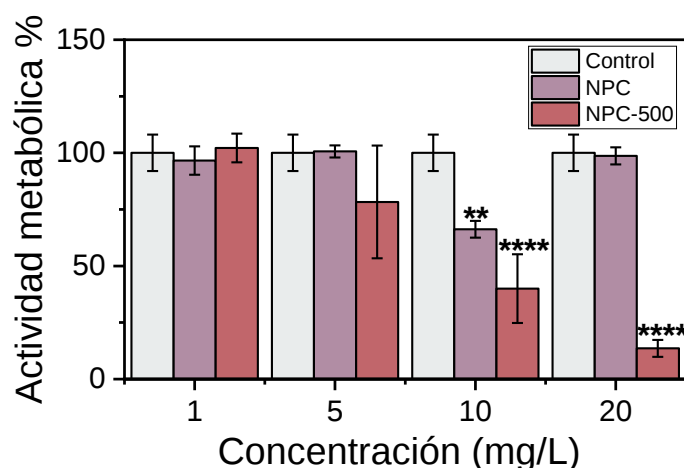


Figura 77. Ensayo de actividad metabólica con NPC:PSMA+PtOEP y

NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP sobre fibroblastos. Izquierda controles de oscuridad y derecha tratamientos con luz. Biofilm control (blanco), biofilm tratados con NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y Biofilm tratados con NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentraciones de NPC y NPC-500 utilizadas: 1, 5, 10 y 20 mg/L.

4.3.4.2. Hemólisis de eritrocitos

El segundo ensayo realizado para estudiar la biocompatibilidad de NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP consistió en realizar un ensayo de hemólisis de eritrocitos humanos. Los resultados se encuentran en la figura 78, donde se observa que a medida que aumenta la concentración de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (barra coral) aumenta el porcentaje de hemólisis en función de la concentración. Solamente para la concentración de 1 mg/L de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP la hemólisis es del ~ 5% que es el valor aceptado para este tipo de biomateriales¹⁸⁵; esto indica que a concentraciones mayores a 1 mg/L, estas partículas se consideran altamente citotóxicas. Esto no sucede con las NPC:PSMA+PtOEP, ya que a todas las concentraciones evaluadas el % de hemólisis siempre estuvo por debajo del 5 %. Esto confirma nuevamente que el mayor efecto citotóxico estaría relacionado con el menor diámetro de las partículas.

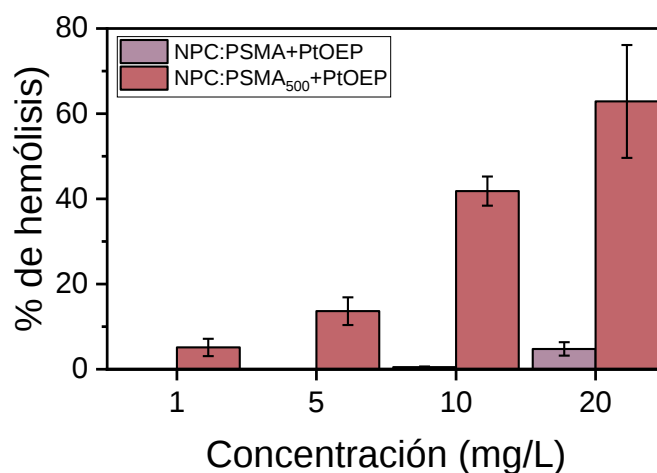
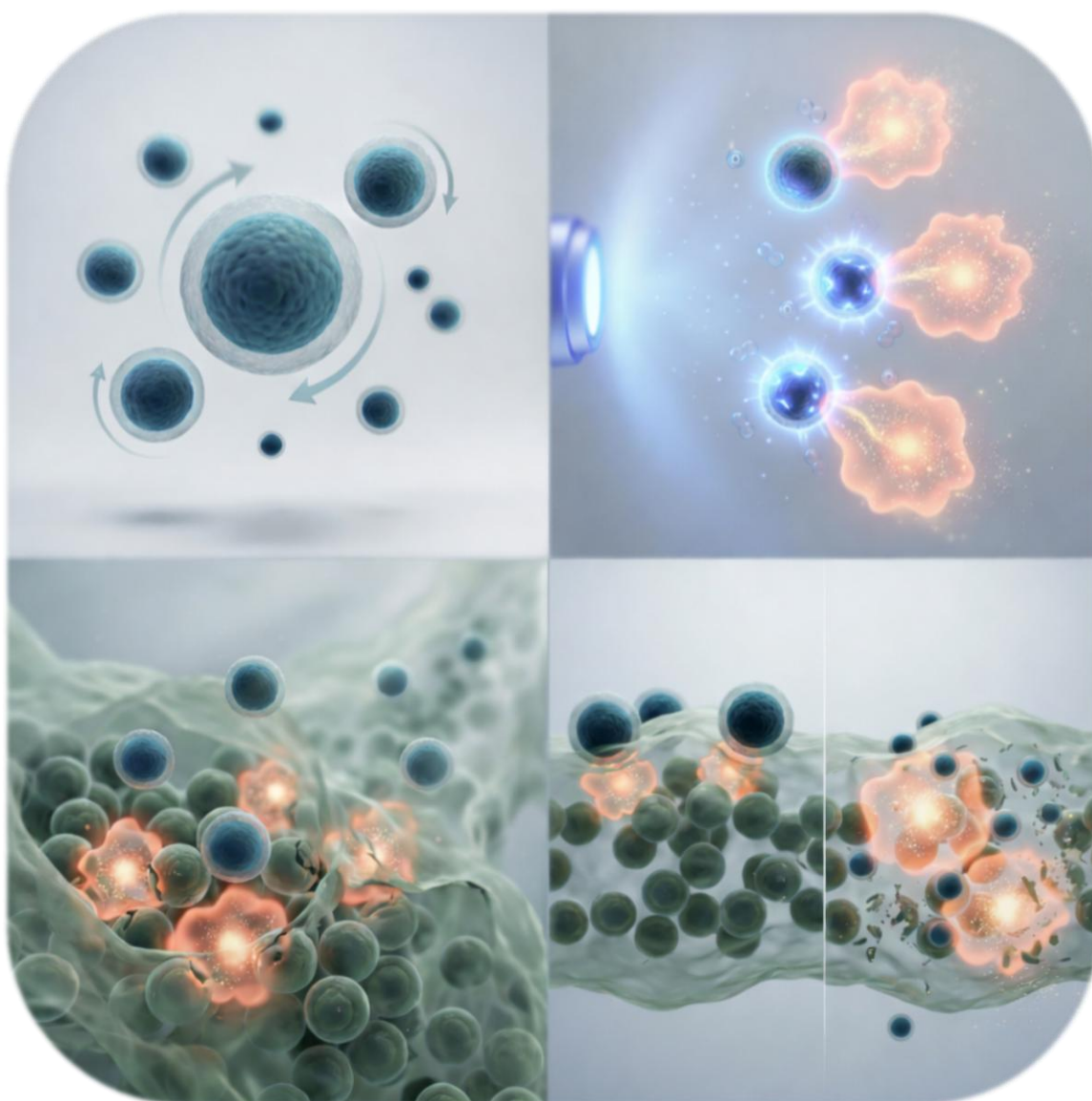


Figura 78. Hemólisis de eritrocitos tratados con NPC:PSMA+PtOEP y NPC:PSMA+PtOEP sobre fibroblastos. Biofilm + NPC:PSMA+PtOEP (rosa) y Biofilm + NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP (coral). Concentraciones de partículas utilizadas: 1, 5, 10 y 20 mg/L.

Los dos ensayos de biocompatibilidad presentan resultados similares: solamente la concentración de 1 mg/L de NPC:PSMA₅₀₀+PtOEP se considera biocompatible con sistemas biológicos, mientras que a mayores concentraciones la toxicidad aumenta considerablemente. Estos resultados indican que a concentraciones efectivas para la erradicación de biofilms (20 mg/L), este nanomaterial no es adecuado para su utilización en organismos vivos, por lo que debería ser utilizado para tratar biofilms sobre superficies abióticas como la desinfección de superficies.

Capítulo 4:

RESULTADOS PARTE IV



4.4. RESULTADOS – PARTE IV

En la parte IV de este capítulo se describen los resultados correspondientes al siguiente objetivo específico: **Sintetizar y caracterizar NPC capaces de generar por irradiación especies ROS (en particular, $^1\text{O}_2$) de forma más eficiente que las previamente desarrolladas por nuestro grupo.** En este objetivo, se planteó el desarrollo de una NPC dopada superficialmente con la porfirina Pt-TCPP, cuya estructura se encuentra esquematizada en la figura 6.

La utilización de la porfirina Pt-TCPP se hipotetiza en la posibilidad de localizar a la misma en la interfaz entre partícula y medio, a diferencia del sistema de dopado volumétricamente con la porfirina PtOEP utilizado previamente. Este cambio en la arquitectura de las partículas tiene como objetivo modular el acoplamiento electrónico entre el PC F8BT y la porfirina de manera tal que pueda evitarse el proceso de ET-TT desde el $^3\text{PtOEP}^*$ hacia el triplete del $^3\text{F8BT}^*$, observado para el sistema de NPCs dopadas volumétricamente con PtOEP. Como se discutió en el marco teórico (sección 2.7.1.), en este sistema, la TE-TT entre PtOEP y F8BT resulta energéticamente favorable, lo que conduce a que el estado $^3\text{F8BT}^*$ actúe como aceptor final de la energía y, en consecuencia, limite el rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$.

El dopado superficial con la porfirina Pt-TCPP constituye entonces una estrategia de control cinético, orientada a restringir la interacción electrónica de corto alcance responsable de la TE-TT, sin afectar significativamente al proceso de TE-SS desde el $^1\text{F8BT}^*$ hacia la porfirina. En este sentido, se espera que el estado triplete excitado de la porfirina Pt-TCPP ($^3\text{Pt-TCPP}^*$) sea el principal sensibilizador de $^1\text{O}_2$. Adicionalmente, la disposición superficial del fotosensibilizador favorece la difusión del $^1\text{O}_2$ generado, lo que podría aumentar la eficiencia fotodinámica.

Es importante destacar que la porfirina Pt-TCPP presenta una similitud estructural con la porfirina PtOEP, con la diferencia que PT-TCPP presenta 4 grupos carboxilos unidos al anillo tetrapirrólico. Estos grupos carboxilos le confieren una capacidad moderada de solubilizarse en medios acuosos^{213–215}, además de hacerlo en solventes orgánicos como el THF. La similitud estructural entre ambas porfirinas es una característica clave para maximizar hipotéticamente el Φ_{Δ} obtenido para el sistema de NPC dopada con 10 % de PtOEP.

4.4.1. Caracterización de los componentes

Primeramente, se tomaron espectros de absorción de las partículas utilizadas, las cuales están compuestas solamente por F8BT (NPC), además se tomaron espectros de absorción de la porfirina Pt-TCPP. En la figura 79 se presentan los espectros de absorción correspondientes a NPC en agua (curva gris) y Pt-TCPP en tres solventes distintos: THF (curva discontinua), buffer fosfato a pH = 8 (curva continua) y agua (pH ~ 5, 6) (curva punteada), representados en diferentes tonos de rojo. Cuando la Pt-TCPP se disuelve en agua tiende a formar agregados cuyo espectro de absorción difiere significativamente de aquel correspondiente al material disuelto. Este comportamiento está reportado en el trabajo de Vasil'ev y colaboradores donde explican que la baja solubilidad en agua de esta porfirina se debe a que la ionización de los grupos carboxilos comienza a $\text{pH} < 5$ ²¹³. También, se calculó el ϵ a 401 nm de Pt-TCPP en buffer fosfato a pH = 8, 0,05 M y se obtuvo un $\epsilon_{401} = 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, el cual es consistente con el reportado en bibliografía ($\epsilon_{405} = 2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en buffer fosfato a pH = 8, 0,05 M)²¹⁵.

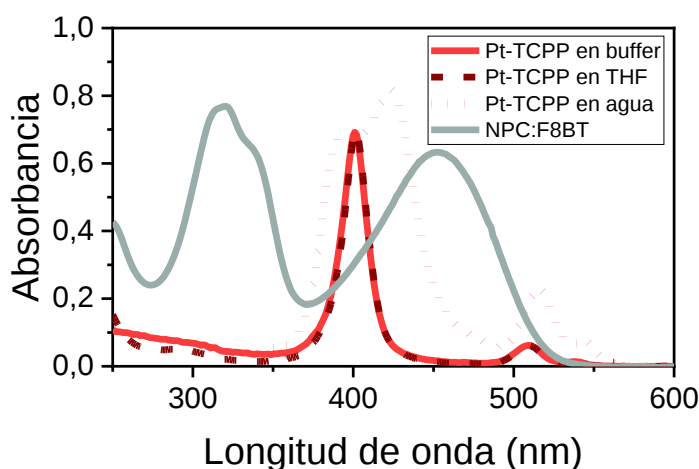


Figura 79. Espectros de absorción de NPC y Pt-TCPP. NPC (15 mg/L) en buffer a pH = 8 (gris) y Pt-TCPP (2,62 mg/L) en THF (discontinua), agua ultra pura (discontinua) y buffer a pH = 8 (continua) en distintos tonos de rojo.

Se tomaron espectros de emisión de: NPC, Pt-TCPP en THF donde se utilizaron las condiciones experimentales empleadas para monitorear la emisión del F8BT ($\lambda_{exc} = 456$ nm) con el fin de verificar que, en dicho rango espectral, la porfirina Pt-TCPP no presenta emisión detectable; lo cual es importante para los siguientes ensayos. Y, por último, se tomó un segundo espectro de emisión de Pt-TCPP (bordo línea discontinua) donde se monitoreó la emisión de la misma excitándola a su máximo de absorción ($\lambda_{exc} = 401$ nm). Cabe aclarar que, para tomar estos espectros, se igualaron las absorbancias de NPC y Pt-TCPP a $\lambda_{456} = 0,1$ por un lado, y de Pt-TCPP a $\lambda_{401} = 0,1$ por el otro.

Dichos espectros de emisión se presentan en la figura 80, donde se observa la emisión característica del F8BT (curva gris) contenido en la NPC; en cuanto al espectro de Pt-TCPP excitada a 456 nm (curva bordo continuo), no se registra I_F como se esperaba y para Pt-TCPP excitada a 401 nm (curva bordo discontinua), se observa claramente el espectro de emisión característico de esta porfirina.

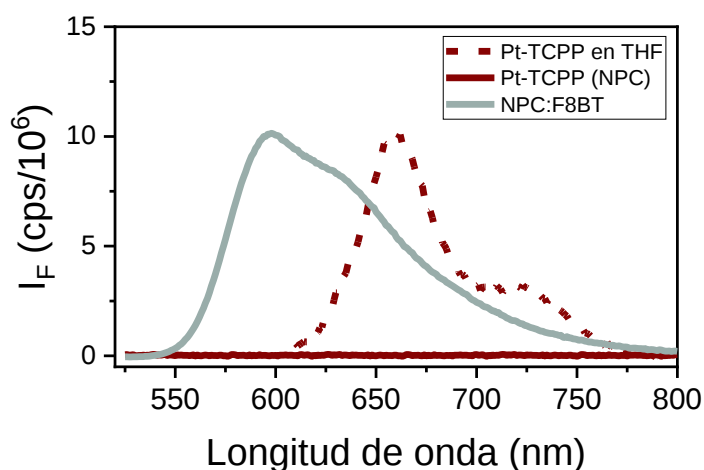


Figura 80. Espectros de emisión de NPC y Pt-TCPP. NPC (2,4 mg/L) en buffer a pH = 8 (gris) y Pt-TCPP (0,47 mg/L) en THF excitándola a 456 nm (bordo continuo) y a 401 nm (bordo discontinua). Condiciones de medición a 456 nm: : $\lambda_{exc} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 470$ -750 nm slit 1, señal S1c, $abs_{456} = 0,1$. Condiciones de medición a 401 nm: : $\lambda_{exc} = 401$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 410$ -790 nm slit 1, señal S1c.

4.4.2. Adsorción de Pt-TCPP sobre la superficie de NPC

El primer ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre la superficie de las NPC se detalló en la sección de materiales y métodos (sección 3.2.1.6.). Primeramente, se sintetizaron NPC, una vez obtenidas, estas se diluyeron en buffer pH = 8 (0,05 M) a una concentración de 2,4 mg/L. Por otro lado, se preparó una solución de Pt-TCPP en THF de $1,1 \times 10^{-3}$ M, la cual fue agregada a la solución de NPC en buffer en pequeños volúmenes sucesivos de a 0,5 μ L.

Luego de cada agregado de Pt-TCPP se homogeneizó la muestra y se tomaron espectros de absorción y emisión. Para los espectros de emisión se excitó de manera exclusiva al F8BT como se describió en la sección anterior. En la figura 81 se muestran todos los espectros de absorción tomados luego de cada agregado de Pt-TCPP, donde se observa cómo va creciendo la intensidad de los picos a 397 y 508 nm, que corresponden a las bandas Soret y Q de la porfirina respectivamente (figura 81A). Con respecto a la NPC, la absorción de la suspensión de 2,4 mg/L es relativamente baja ($abs_{456} = \sim 0,1$), por lo que en la figura 81B se muestra ampliada la sección de la figura 81A donde absorbe la partícula

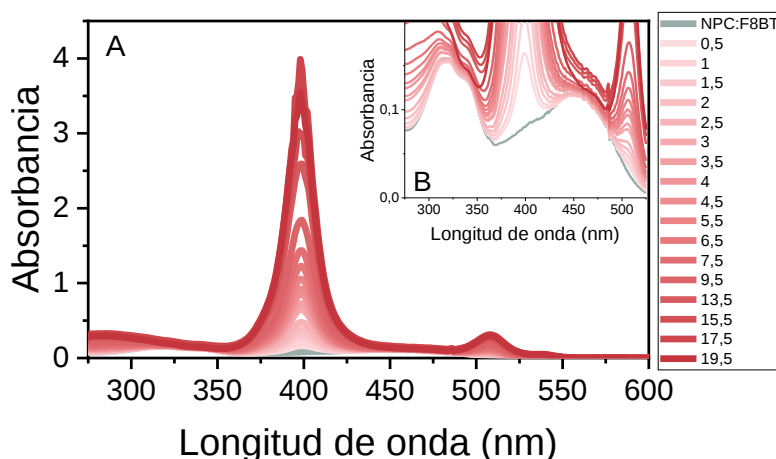


Figura 81. 1° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de absorción. (A)

absorción de NPC y los agregados de Pt-TCPP. (B) sección ampliada de la figura A. El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC con distintas concentraciones de Pt-TCPP se produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Concentración de partículas 2,4 mg/L.

En la figura 82 se encuentran los espectros de emisión de la NPC y NPC con distintas concentraciones de Pt-TCPP, dichos espectros fueron adquiridos con excitación selectiva del

PC ($\lambda_{\text{exc}} = 456 \text{ nm}$). Se observa una disminución de la I_F a medida que se agregaron los primeros volúmenes de Pt-TCPP (hasta $3,5 \mu\text{L}$). Pero a partir de los $4 \mu\text{L}$ la emisión de NPC fue aumentando con los sucesivos agregados de la porfirina. Con estos datos se hizo una gráfica de tipo Stern – Volmer de todos los puntos, donde se graficó I_{F0}/I_F (siendo I_{F0} la intensidad de emisión inicial) versus la concentración de Pt-TCPP (figura 82B). A partir de esta gráfica se observa una desactivación inicial de la fluorescencia de F8BT, pero luego un gran aumento de la misma. Luego el último agregado de Pt-TCPP, se eliminó el O_2 disuelto burbujando con N_2 durante 20 min y se adquirió nuevamente un espectro de emisión (línea negra) con el objetivo de observar si se producía emisión de la porfirina. Efectivamente, bajo estas condiciones se observa en el espectro un pico adicional a $\sim 640 \text{ nm}$ que se asigna a la emisión de Pt-TCPP. Debido a que el espectro fue adquirido excitando exclusivamente al F8BT la aparición de la emisión de porfirina demuestra claramente que existe ET desde F8BT a la porfirina. El aumento de emisión de F8BT luego del agregado de Pt-TCPP es contrario a lo supuesto inicialmente, ya que se esperaba que a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP en la solución de NPC, más moléculas de Pt-TCPP se adsorberían a la superficie de las mismas desactivando su emisión por ET. Las posibles razones de esta inconsistencia se discutirán más adelante. Sin embargo, es importante destacar que los resultados de este experimento inicial demostraron que la hipótesis descrita inicialmente se cumple bajo condiciones adecuadas.

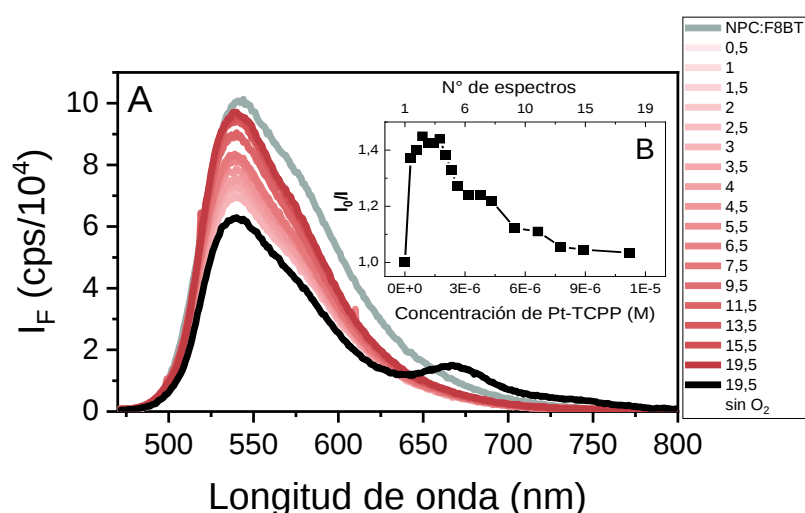


Figura 82. 1° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión. (A) espectros de emisión (B) I_0/I de emisión vs concentración molar de Pt-TCPP. El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC + distintas concentraciones de Pt-TCPP se

produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Condiciones de medición: $\lambda_{exc} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{emi} = 470-750$ nm slit 1, señal S1c, Concentración de partículas 2,4 mg/L.

Con el objetivo de mejorar el proceso de ET desde el F8BT hacia la Pt-TCPP, se realizó un segundo ensayo de adsorción de la porfirina Pt-TCPP sobre la superficie de las NPC con las siguientes modificaciones: se aumentó la concentración de NPC a 15 mg/L y la concentración de Pt-TCPP usada en este caso fue de 1×10^{-5} M. En este caso, no se disolvió la porfirina en THF si no que se preparó una solución de NPC (15 mg/L) + 1×10^{-5} M de Pt-TCPP. De esta manera se evita que la solución inicial de NPC se vaya diluyendo durante el ensayo al agregar la solución con porfirina. A la solución de NPC se le fueron agregando alícuotas de 10 μ L de la solución de NPC + Pt-TCPP, después de cada agregado se homogeneizó la suspensión y se tomaron espectros de absorción y emisión.

En la figura 83, se muestran los espectros de absorción de cada punto, donde se observa como aumenta el pico a ~ 400 nm a medida que aumenta la concentración de la porfirina. En este caso, se observa claramente el espectro correspondiente a las NPC debido a la mayor concentración de partículas y menor concentración de Pt-TCPP respecto al experimento anterior.

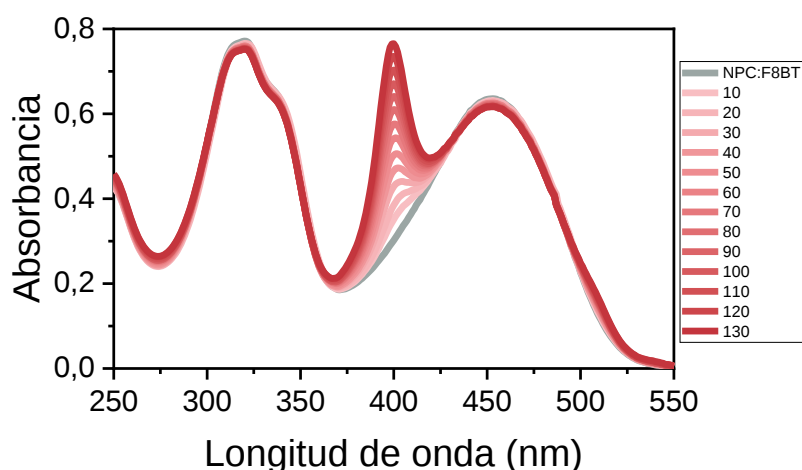


Figura 83. 2º ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de absorción. El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC + distintas concentraciones de Pt-TCPP (expresados en μ L) se produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Concentración de partículas 15 mg/L.

En la figura 84A, se muestran los espectros de emisión de cada punto. Al igual que en el ensayo anterior, luego de los primeros agregados de la solución de Pt-TCPP + NPC, la emisión del F8BT disminuyó, pero con los siguientes agregados fue aumentando, superando incluso la emisión inicial del PC F8BT (en ausencia de porfirina), resultado que se ve más claramente en la curva de Stern-Volmer (figura 84B). Cuando se eliminó el O₂ de la solución, se observa nuevamente la aparición de la señal correspondiente a la porfirina en el espectro de emisión, Sin embargo, la intensidad de esta señal del tetrapirrol es menor comparada con la del experimento anterior (Figura 82), resultado esperable debido a la menor concentración de Pt-TCPP en este último experimento.

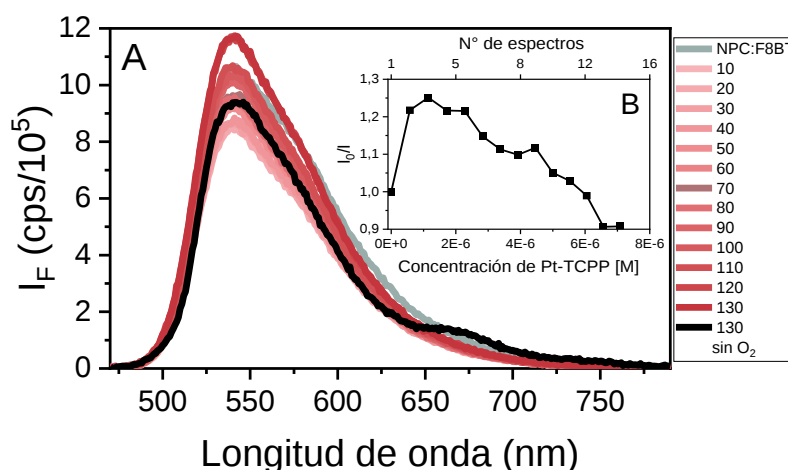


Figura 84. 2° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión. (A) espectros de emisión con el agregado de Pt-TCPP (expresados en μL). (B) I_0/I de emisión vs concentración molar de Pt-TCPP. El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC + distintas concentraciones de Pt-TCPP se produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 456 \text{ nm}$ slit 0,5; $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750 \text{ nm}$ slit 0,5; señal S1c, Concentración de partículas 15 mg/L.

Buscando una posible explicación al comportamiento anómalo en el gráfico Stern – Volmer de los dos experimentos anteriores, se tomaron sucesivos espectros de emisión (50 en total) de una solución de NPC sola con (Figura 85B) y sin agitación (Figura 85A). Además, se muestran las correspondientes gráficas tipo Stern-Volmer para ambos

experimentos (figuras 85C y 85D respectivamente). Cuando se tomaron espectros de emisión de NPC sin agitación se observa que a medida que aumenta el n° de espectros aumenta la emisión del PC. La situación cambia completamente cuando los espectros se toman mientras la solución de NPC es agitada vigorosamente (85B). En este caso, se observa como a medida que aumenta el n° de espectros tomados, la emisión del polímero disminuye levemente(85D). Esta pequeña disminución es normal y debida al fotoblanqueo propio del PC. Estos resultados podrían indicar que con la sucesiva irradiación de la suspensión de partícula podrían estar desactivando los sitios Q, los cuales se encuentran en la superficie de la NPC.¹⁶⁷ En ausencia de agitación, la difusión de las NPC no es lo suficientemente rápida como para evitar que la luz llegue a la misma población de partículas durante los distintos ciclos de irradiación desactivándose ,con cada ciclo, las trampas de dicha población. Este efecto se evita con una agitación vigorosa, en donde cada ciclo de irradiación se realiza sobre una población diferente de NPC.

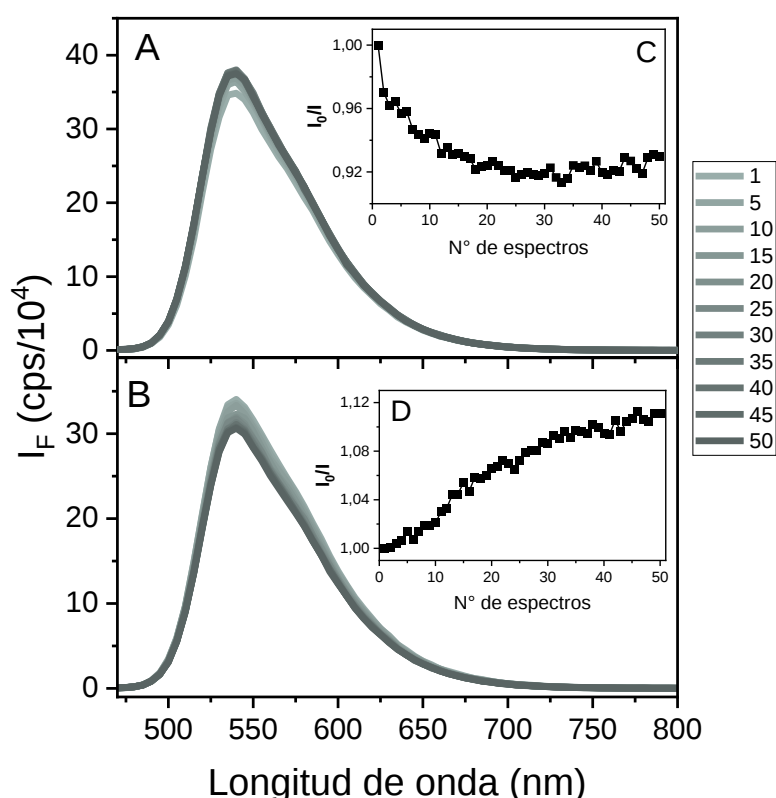


Figura 85. Espectros de emisión sucesivos de NPC. (A) espectros de emisión sin agitación. (B) espectros de emisión en agitación vigorosa. (C) curva de I_0/I vs n° de espectros sin agitación. (D) curva de I_0/I vs n° de espectros con agitación vigorosa. La

paleta de colores va desde el gris claro hacia un gris oscuro a medida que aumenta el n° de espectro. Concentración de partículas 2,4 mg/L.

En la figura 86 se encuentra el tercer ensayo donde se evalúa la posible adsorción de Pt-TCPP sobre NPC en agitación vigorosa. En este caso se repitieron las condiciones del primer ensayo (figuras 81 y 82), porque en este ensayo se observó la mayor cantidad emisión de Pt-TCPP (en ausencia de O₂). La única diferencia es que en este caso se disminuyó la concentración del buffer fosfato pH = 8 de 0,05 a 0,01 M. En la figura 86A se muestran los espectros de emisión de la solución de NPC en ausencia de porfirina (curva gris) y luego de sucesivos agregados de una solución de Pt-TCPP, $1,1 \times 10^{-3}$ M, en THF (86A). Cuando se agita vigorosamente la solución de NPC, la I_F disminuye rápidamente con el agregado de Pt-TCPP, pero luego de haber adicionado 9 μ L se llega a un *plateau* de I_F que se mantiene relativamente constante durante todos los agregados posteriores de Pt-TCPP. Mientras que en la figura 86B se encuentra la curva de Stern – Volmer (línea negra) y I₀/I versus n° de espectros de NPC (línea gris). Si se comparan estas dos curvas, puede deducirse que la desactivación de la I_F de la NPC es prácticamente despreciable; en consecuencia, la desactivación de la I_F observada en la figura 88A se debe exclusivamente a la presencia de la Pt-TCPP. Cuando se eliminó el O₂ de la solución no observo la señal a ~ 650 nm asociada con la porfirina. Este resultado se contradice con lo mostrado en la figura 86 sobre todo teniendo en cuenta que las condiciones experimentales son iguales exceptuando la agitación de este último ensayo. Estos resultados estarían indicando que este sistema no es reproducible.

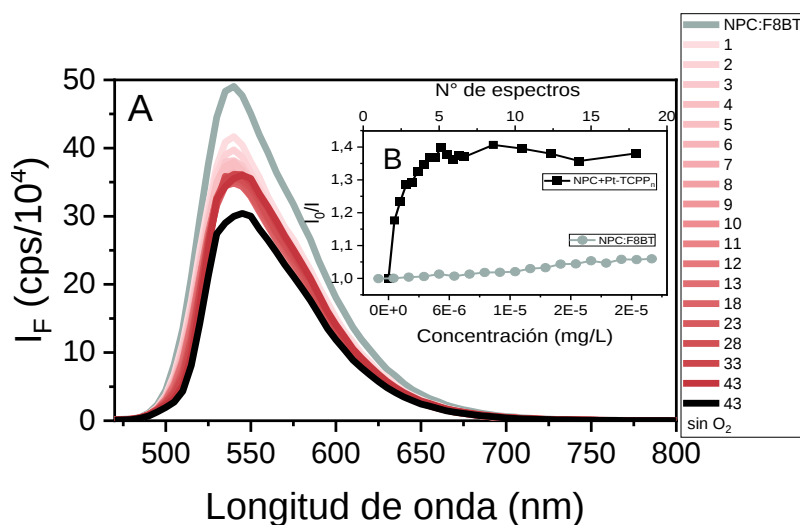


Figura 86. 3° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión. (A)

espectros de emisión con el agregado de Pt-TCPP (expresados en μL) a partir de una solución de $1,16 \times 10^{-3}$ M. (B) I_0/I de emisión vs concentración molar de Pt-TCPP (negro) y vs n° de espectros de NPC (gris). El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC + distintas concentraciones de Pt-TCPP se produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750$ nm slit 1, señal S1c, concentración de partículas 2,4 mg/L.

Se repitió el ensayo de adsorción anterior, pero ahora disminuyendo nuevamente la concentración de Pt-TCPP con el objetivo de tratar de observar la emisión de la misma. Para ello se utilizó una solución de una concentración 4 veces menor ($2,2 \times 10^{-4}$ M) que para el ensayo anterior. Los resultados del cuarto ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC se muestran en la figura 87. En este caso, prácticamente con el primer agregado de porfirina se logró la disminución total de la I_F de las NPC. Y cuando se eliminó el O_2 del medio, tampoco se registró emisión de Pt-TCPP.

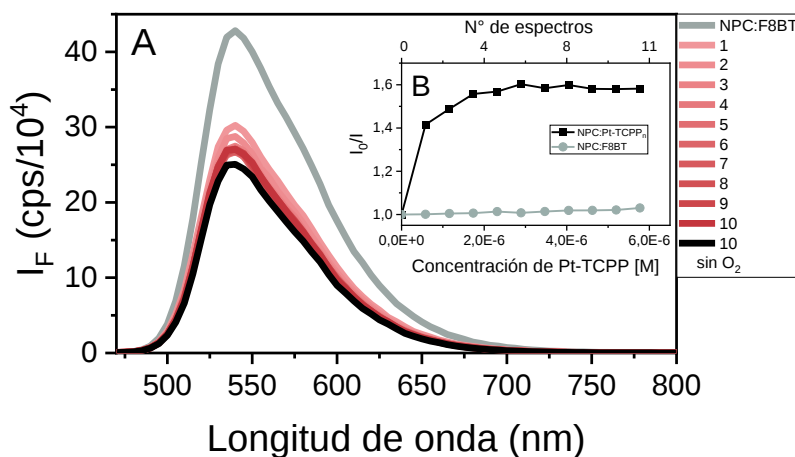


Figura 87. 4° ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC, espectros de emisión. (A)

espectros de emisión con el agregado de Pt-TCPP (expresados en μL) a partir de una solución de $2,20 \times 10^{-4}$ M. (B) I_0/I de emisión vs concentración molar de Pt-TCPP (negro) y vs n° de espectros de NPC (gris). El color gris corresponde a las NPC solas y para las NPC con distintas concentraciones de Pt-TCPP se produce un gradiente de colores va desde rojo claro a oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP. Condiciones de

medición: $\lambda_{\text{exc}} = 456 \text{ nm}$ slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750 \text{ nm}$ slit 1, señal S1c, concentración de partículas 2,4 mg/L.

Cuando el experimento se realiza en constante agitación, no se registran aumentos en la intensidad de fluorescencia del F8BT luego de los sucesivos agregados de Pt-TCPP. En el experimento de la fig. 86 (3° experimento) se observó una clara disminución de la intensidad de fluorescencia del F8BT cuando se realizaron los primeros agregados de Pt-TCPP. Se decidió repetir este mismo experimento, pero utilizando una solución más diluida de Pt-TCPP para que la disminución de la emisión del F8BT sea más escalonada (figura 87, experimento n°4). En ambos se observó el mismo comportamiento: con los primeros agregados de porfirina la disminución de la emisión de las NPC fue grande y rápidamente se estancó. Cuando se calculó el % de desactivación de la emisión del F8BT en los ensayos n°3 y n°4 en ambos casos fue de $\sim 30 \%$.

Estos resultados permiten confirmar que efectivamente se logra adsorber la porfirina Pt-TCPP en la superficie de la NPC, pero la cantidad de moléculas que se lograron adsorber no fueron lo suficiente como para desactivar por completo (o casi) la emisión del F8BT contenido en la NPC. Este resultado podría deberse a que la porfirina a $\text{pH} = 8$ presenta cargas negativas²¹⁵, lo que podría estar generando un efecto de repulsión electrostática debido a que las NPC también poseen cargas negativas. Consecuentemente, es posible que solo una baja fracción de las moléculas de Pt-TCPP presentes en la solución logran adsorberse en la superficie en las NPC y por lo tanto estar lo suficiente cerca para que ocurra la TE. Es importante destacar que la desactivación de la emisión de la NPC es un indicio de que se está produciendo un proceso de ET desde el F8BT hacia la Pt-TCPP. Incluso, se logró observar la emisión de dicha porfirina en algunos experimentos, lo que es una prueba irrefutable del proceso de ET mencionado. Que no se haya logrado la desactivación de emisión deseada podría ocurrir por varias causas: que la cantidad de moléculas de Pt-TCPP absorbidas en la NPC no sea suficiente, que se estén formando dímeros de Pt-TCPP o que la eliminación del O_2 del medio no haya sido totalmente eficiente.

Como la porfirina presenta carga negativa en solución acuosa, una posible solución sería la utilización de NPC:PSMA@PFN ya que estas presentan carga positiva. Entonces la diferencia de cargas entre NPC:PSMA@PFN y Pt-TCPP favorecería la adsorción de la

porfirina a la superficie de la partícula, de manera similar a lo que ocurre con el agregado del polímero catiónico PFN a la superficie de la NPC:PSMA aniónica. Una gran limitante de este sistema es que las NPC:PSMA@PFN no suelen mantenerse estables en soluciones que contienen iones (aun en baja concentraciones) como se ha demostrado previamente.

Para tratar de resolver esta limitante, se intentaron preparar soluciones de NPC:PSMA@PFN en distintas concentraciones del buffer fosfato a pH = 8 utilizado para disolver la Pt-TCPP; se probaron 2 concentraciones de buffer: 5×10^{-2} M y 1×10^{-2} M y en todos los casos se produjo la precipitación de las NPC:PSMA@PFN en cuestión de minutos. Además, se decidió utilizar un buffer mucho más diluido (1×10^{-4} M), donde no se observó la agregación de partículas a simple vista. Por esa razón, se tomaron espectros de emisión sucesivos (50 en total) de estas NPC:PSMA@PFN disueltas en buffer diluido, los mismos se presentan en la figura 88. Allí se observa que la I_F (figura 88A) disminuye significativamente a medida que se toman los espectros, lo cual evidencia claramente la agregación de las NPC:PSMA@PFN en el tiempo, a pesar de que dicha agregación aún no se observaba a simple vista. Este comportamiento se refleja claramente cuando se grafica I_0/I vs n° de espectros (figura 88B). Estos resultados indican que aun utilizando una solución buffer muy diluida, las NPC:PSMA@PFN precipitan.

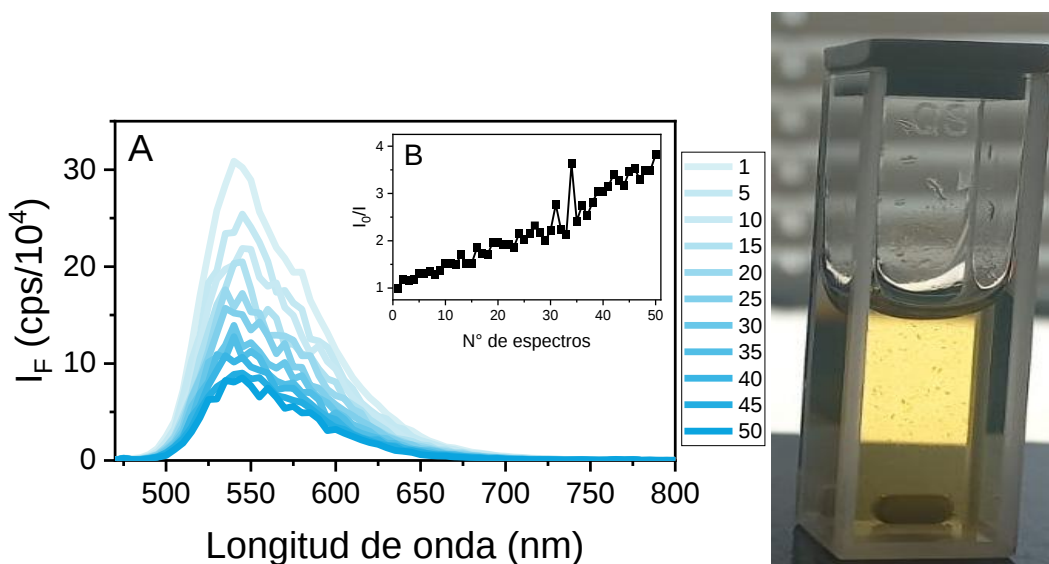


Figura 88. Espectros de emisión de NPC:PSMA@PFN en buffer fosfato a pH = 8, 1×10^{-4} M. Los colores van desde el celeste claro al celeste oscuro a medida que aumenta el n° de espectros tomados. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750$ nm slit 1, señal S1c, concentración de partículas 2,4 mg/L.

Como la gran limitante en la utilización de NPC:PSMA@PFN, para realizar el ensayo de adsorción con Pt-TCPP, es la presencia de soluciones iónicas, se realizó el ensayo de adsorción utilizando agua como solvente. Acá surge una segunda limitante, ya que el agua pura impide la correcta solubilización de la porfirina Pt-TCPP, y esta tiende a formar agregados en este medio (figura 79). Se espera subsanar esta segunda limitante gracias a la diferencia de cargas entre Pt-TCPP y NPC:PSMA@PFN, donde dicha diferencia de carga entre ambas favorecería la adsorción de la Pt-TCPP en la superficie de la NPC:PSMA@PFN favorecida por interacciones electrostáticas.

Los resultados de este ensayo se presentan en la figura 89. En la figura 89A se muestran las I_F de las NPC:PSMA@PFN con los sucesivos agregados de Pt-TCPP, y en la figura 89B se muestra la gráfica de Stern – Volmer. Se observa que a medida que se agrega porfirina la I_F de las NPC:PSMA@PFN va disminuyendo como se esperaría. Pero lamentablemente en este caso dicha disminución corresponde a la formación de agregados de NPC:PSMA@PFN por un lado y Pt-TCPP por el otro, los cuales se evidencian en las figuras 89C y 89D respectivamente.

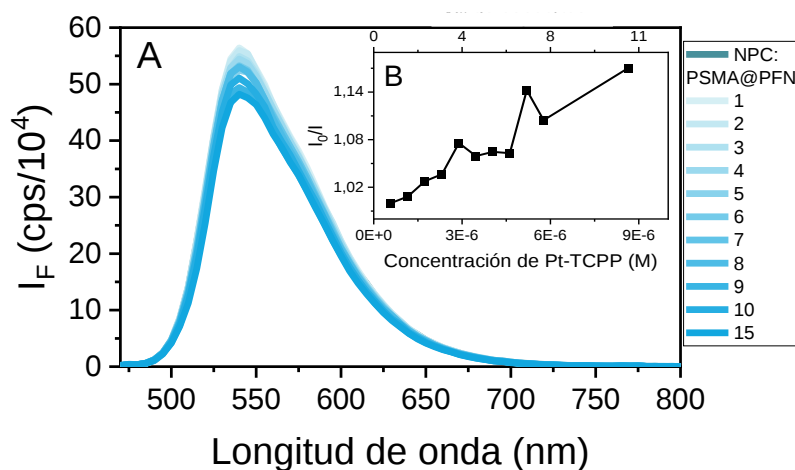


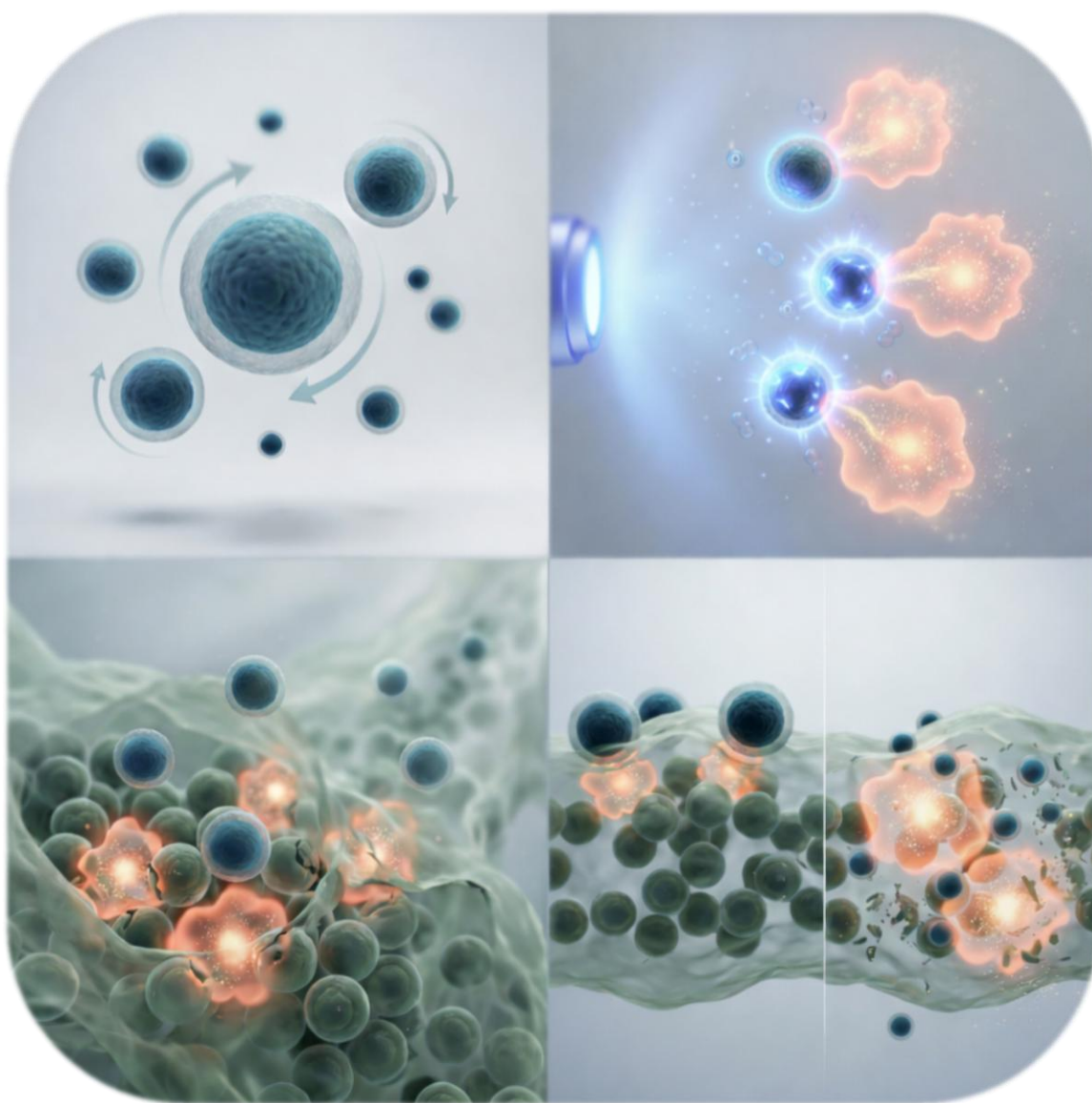
Figura 89. Ensayo de adsorción de Pt-TCPP sobre NPC:PSMA@PFN. (A) espectros de emisión con el agregado de Pt-TCPP (expresados en μL) a partir de una solución de $1,16 \times 10^{-3}$ M. Condiciones de medición: $\lambda_{\text{exc}} = 456$ nm slit 1, $\lambda_{\text{emi}} = 470\text{-}750$ nm slit 1, señal S1c, $\text{abs}_{456} = 0,1$. (B) I_0/I de emisión vs concentración molar de Pt-TCPP. (C) foto tomada de una suspensión precipitada de NPC:PSMA@PFN + Pt-TCPP. El azul corresponde a las NPC:PSMA@PFN solas y para las NPC:PSMA@PFN con distintos agregados de Pt-TCPP

se produce un gradiente de colores va desde celeste claro a celeste oscuro a medida que aumenta la concentración de Pt-TCPP.

En base a estos resultados, se puede inferir que en el sistema de NPC dopada superficialmente con Pt-TCPP se logra el proceso de ET desde el F8BT hacia la Pt-TCPP como se planteó en la hipótesis inicial. Pero dicho sistema presentó dos limitantes importantes: las estrategias exploradas no son reproducibles y por el otro, dicho sistema no es compatible con los medios biológicos necesarios para la posterior aplicación de la fototerapia.

Capítulo 5:

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis se organizan en función de cada uno de los objetivos específicos.

Objetivo 1: Sintetizar y caracterizar NPC fotoactivas de diámetros medios entre 5-10 nm para facilitar su biodistribución en tratamientos TFD o para mejorar la penetración hacia el interior de un biofilm.

Se abordaron distintas estrategias para reducir el diámetro de las NPC y se lograron obtener NPC:PSMA₅₀₀ con un diámetro de ~ 5 nm. La metodología de obtención resultó sencilla, reproducible y las partículas obtenidas presentaron una elevada estabilidad coloidal en el tiempo. Se realizaron ensayos de PDI donde se comparó como el tamaño de las partículas afecta a la eficiencia fototerapéutica en cultivos planctónicos y biofilms. A partir de los resultados de la PDI se concluye que las NPC:PSMA₅₀₀ ejercen un daño fotooxidativo significativo sobre biofilms maduros de SARM con respecto al efecto producido por NPC:PSMA. Estos resultados demuestran que el tamaño de las partículas es un parámetro crítico a considerar en estructuras complejas como son los biofilms. El menor diámetro de las partículas favorece su difusión a través de la estructura del biofilm ejerciendo un doble efecto citotóxico: daño directo significativo a las células bacterianas y alteración considerable de los componentes que conforman a la matriz de EPS.

Objetivo 2: Sintetizar y caracterizar NPC fotoactivas con distintas modificaciones superficiales que tengan un impacto en el direccionamiento (vectorización) sobre la superficie de bacterias.

Se diseñaron nanopartículas con una arquitectura *core/shell*, las cuales están compuestas por un *core* de F8BT:PSMA y un *shell* de PFN adsorbido en la superficie de las partículas. Dicha arquitectura afectó significativamente a la fotofísica de las partículas, donde la presencia de PFN en las NPCs *core/shell* induce un proceso de FRET hacia el F8BT. Dicho proceso se logró amplificar significativamente con el agregado de un 20 % del PE PSMA; además de favorecer su estabilidad coloidal. Desde el punto de vista fisicoquímico, con el agregado de PFN se logró invertir la carga superficial inicial de las NPC:PSMA de -27 a 16 mV. Desde el punto de vista funcional, se produjo una mejora significativa en la

interacción entre bacterias que fueron incubadas con NPC:PSMA@PFN y bacterias incubadas con NPC:PSMA; este efecto se confirmó por varias técnicas diferentes y se constató la mejora en la interacción se debe a la carga positiva que poseen las partículas NPC:PSMA@PFN, favoreciendo la interacción electrostática con las envolturas bacterianas. La interacción mejorada entre NPC:PSMA@PFN y bacterias condujo a una mejora considerable en la eficiencia de la PDI. Cuando la fototerapia se realizó con NPC:PSMA@PFN sobre cultivos planctónicos, se logró un efecto bactericida en la población bacteriana el cual no tuvo capacidad de recuperación luego de ser incubado en óptimas condiciones. La carga positiva que presentan estas partículas ejerció además un daño significativo sobre biofilms maduros de SARM, logrando la erradicación casi total de las células y los componentes estructurales del mismo. Estos resultados indican que la modificación superficial de la arquitectura de las NPCs puede ser una excelente estrategia para la vectorización de las mismas hacia una diana en particular.

Por otro lado, se planteó una modificación volumétrica de las NPCs con el agregado de un PE que presenta grupos funcionales glicosilados. Esta nueva arquitectura de NPCs se planteó con el objetivo de redirigir a las mismas hacia dianas celulares cancerígenas, que sobreexpresan GLUTs en su superficie; lo que favorecería una internalización más específica de las partículas. No se logró una incorporación efectiva de NPC:T-GLU₂₀ sobre la línea celular T98G en comparación a la NPC:PSMA desarrollada previamente. A partir de los resultados obtenidos, se concluye que las estrategias desarrolladas en esta tesis no fueron suficiente para lograr una incorporación específica de partículas hacia el interior de la célula cancerígena, pero si permitieron una incorporación del tipo inespecífica.

Objetivo 3: Sintetizar y caracterizar NPC capaces de generar por irradiación especies ROS (en particular, $^1\text{O}_2$) en forma más eficiente que las previamente desarrolladas por nuestro grupo y otros.

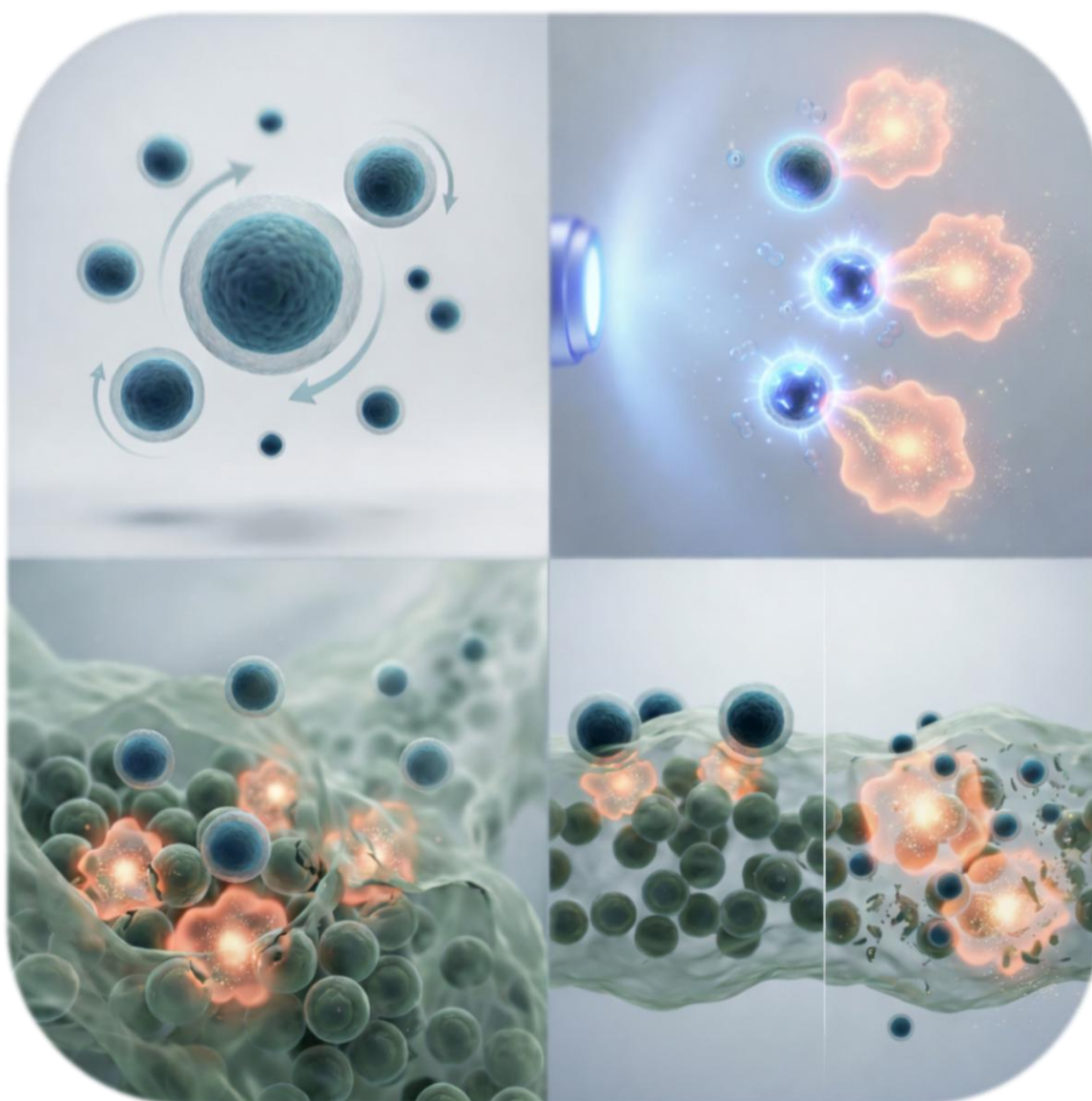
Se propuso la utilización de una nueva porfirina, Pt-TCPP, para realizar un dopado superficial de las NPC con el objetivo de favorecer el proceso de ET desde el $^3\text{Pt-TCPP}^*$ hacia el O_2 con el consecuente aumento del Φ_Δ . Se logró dopar la NPC superficialmente con la Pt-TCPP y se demostró un proceso de FRET desde el F8BT hacia la porfirina, el cual se confirmó mediante espectroscopía de fluorescencia. A pesar de los resultados obtenidos se

consideró que en función las condiciones experimentales planteadas, el sistema de NPC dopado superficialmente con Pt-TCPP no presentó la efectividad deseada para las aplicaciones biológicas de PDI.

En términos generales, esta tesis aporta principios para el diseño arquitectónico y funcional en el desarrollo de NPC fotoactivas optimizadas para su aplicación en fototerapias.

Capítulo 6:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Liu, Y. Nanotechnology-Based Antimicrobials and Delivery Systems for Biofilm-Infection Control. *Chem Soc Rev* **2019**.
- (2) Khan, J.; Tarar, S. M.; Gul, I.; Nawaz, U.; Arshad, M. Challenges of Antibiotic Resistance Biofilms and Potential Combating Strategies: A Review. *3 Biotech* **2021**, *11* (4), 169. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02707-w>.
- (3) Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31* (4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.
- (4) Li, J.; Cheng, F.; Wei, X.; Bai, Y.; Wang, Q.; Li, B.; Zhou, Y.; Zhai, B.; Zhou, X.; Wang, W.; Zhang, J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA): Resistance, Prevalence, and Coping Strategies. *Antibiotics* **2025**, *14* (8), 771. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080771>.
- (5) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis.
- (6) Guo, L.; Wang, H.; Wang, Y.; Feng, L. Facile Core–Shell Nanoparticles with Controllable Antibacterial Activity Assembled by Chemical and Biological Molecules. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (12), 5528–5534. <https://doi.org/10.1039/C9BM01367A>.
- (7) Li, Z.; Lu, W.; Jia, S.; Yuan, H.; Gao, L.-H. Design and Application of Conjugated Polymer Nanomaterials for Detection and Inactivation of Pathogenic Microbes. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (1), 370–386. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01395>.
- (8) Li, L.; Wang, Y.; Huang, T.; He, X.; Zhang, K.; Kang, E.-T.; Xu, L. Cationic Porphyrin-Based Nanoparticles for Photodynamic Inactivation and Identification of Bacteria Strains. *Biomater. Sci.* **2022**, *10* (11), 3006–3016. <https://doi.org/10.1039/D2BM00265E>.
- (9) *WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance*, 1st ed.; World Health Organization: Geneva, 2024.
- (10) Li, J.; Pan, G.; Zyryanov, G. V.; Peng, Y.; Zhang, G.; Ma, L.; Li, S.; Chen, P.; Wang, Z. Positively Charged Semiconductor Conjugated Polymer Nanomaterials with Photothermal Activity for Antibacterial and Antibiofilm Activities *In Vitro* and *In Vivo*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (34), 40864–40876. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c00556>.
- (11) Almatroudi, A. Biofilm Resilience: Molecular Mechanisms Driving Antibiotic Resistance in Clinical Contexts. *Biology* **2025**, *14* (2), 165. <https://doi.org/10.3390/biology14020165>.

- (12) Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy – What We Know and What We Don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44* (5), 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
- (13) Lan, J.; Zou, J.; Xin, H.; Sun, J.; Han, T.; Sun, M.; Niu, M. Nanomedicines as Disruptors or Inhibitors of Biofilms: Opportunities in Addressing Antimicrobial Resistance. *J. Controlled Release* **2025**, *381*, 113589. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113589>.
- (14) Jinghan, R.; Zhanshuo, C.; Minghui, W.; Dong, G.; Chengfen, X. Side Chain Engineering of Amphiphilic Conjugated Polymer Nanoparticles for Biofilm Ablation. *Macromol. Chem. Phys.* **2023**, *224* (24), 2300105. <https://doi.org/10.1002/macp.202300105>.
- (15) Hall, C. W.; Mah, T.-F. Molecular Mechanisms of Biofilm-Based Antibiotic Resistance and Tolerance in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41* (3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>.
- (16) Thakkar, J. P.; Dolecek, T. A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q. T.; Lightner, D. D.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Villano, J. L. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2014**, *23* (10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>.
- (17) Królikowska, K.; Błaszczak, K.; Ławicki, S.; Zajkowska, M.; Gudowska-Sawczuk, M. Glioblastoma—A Contemporary Overview of Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: A Review Article. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (24), 12162. <https://doi.org/10.3390/ijms262412162>.
- (18) Ostrom, Q. T.; Gittleman, H.; Truitt, G.; Boscia, A.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncol.* **2018**, *20* (suppl_4), iv1–iv86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>.
- (19) Stoyanov, G. S.; Lyutfi, E.; Georgieva, R.; Georgiev, R.; Dzhenkov, D. L.; Petkova, L.; Ivanov, B. D.; Kaprelyan, A.; Ghenev, P. Reclassification of Glioblastoma Multiforme According to the 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: A Single Institution Report and Practical Significance. *Cureus* **2022**, *14* (2), e21822. <https://doi.org/10.7759/cureus.21822>.
- (20) Delgado-López, P. D.; Corrales-García, E. M. Survival in Glioblastoma: A Review on the Impact of Treatment Modalities. *Clin. Transl. Oncol.* **2016**, *18* (11), 1062–1071. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>.
- (21) Oronsky, B.; Reid, T. R.; Oronsky, A.; Sandhu, N.; Knox, S. J. A Review of Newly Diagnosed Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, 574012. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574012>.
- (22) Santos, A. F.; Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L. Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2019**. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.

- (23) Isaac-Lam, M. F.; Nguyen, T. Photodynamic Therapy Applications in Cancer, Infections and Cardiovascular Diseases. *TTU J. Biomed. Sci.* **2023**, 2 (1), 9–28. <https://doi.org/10.53901/tjbs.2023.08.art02>.
- (24) Maisch, T. Resistance in Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14, 1518–1526. <https://doi.org/10.1039/c5pp00037h>.
- (25) Songca, S. P.; Adjei, Y. Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23 (6), 3209. <https://doi.org/10.3390/ijms23063209>.
- (26) Vinagreiro, C. S.; Zangirolami, A.; Schaberle, F. A.; Nunes, S. C. C.; Blanco, K. C.; Inada, N. M.; Da Silva, G. J.; Pais, A. A. C. C.; Bagnato, V. S.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M. Antibacterial Photodynamic Inactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria and Biofilms with Nanomolar Photosensitizer Concentrations. *ACS Infect. Dis.* **2020**, 6 (6), 1517–1526. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00379>.
- (27) Spada, R. M.; Macor, L. P.; Hernández, L. I.; Ponzio, R. A.; Ibarra, L. E.; Lorente, C.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E. Amplified Singlet Oxygen Generation in Metallated-Porphyrin Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *Dyes Pigments* **2018**, 149, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.09.044>.
- (28) MacLean, R. C.; Millan, A. S. The Evolution of Antibiotic Resistance.
- (29) Tarín-Pelló, A.; Suay-García, B.; Pérez-Gracia, M.-T. Antibiotic Resistant Bacteria: Current Situation and Treatment Options to Accelerate the Development of a New Antimicrobial Arsenal. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2022**, 20 (8), 1095–1108. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2078308>.
- (30) Naghavi, M.; Vollset, S. E.; Ikuta, K. S.; Swetschinski, L. R.; Gray, A. P.; Wool, E. E.; Robles Aguilar, G.; *et al.* Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance 1990–2021: A Systematic Analysis with Forecasts to 2050. *The Lancet* **2024**, 404 (10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1).
- (31) Gozzer, E.; Becerra-Chauca, N.; Abba-Aji, M.; Wirtz, V. J.; Cordoba, G.; Canchihuamán, F.; Nagassar, R. P.; Yañez-Díaz, S.; Brou, P. S.; Delgado-Flores, C. J.; Fazaludeen Koya, S. Antimicrobial Resistance Interventions in Latin America and the Caribbean: A Scoping Review of Reported Interventions between 2018–2024. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2025**, 14 (1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13756-025-01629-z>.
- (32) Mmbando, G. S.; Ally, O.; Misinzo, G. Current Approaches and Tools for Combating Antibiotic Resistance. *Discov. Appl. Sci.* **2025**, 7 (9), 958. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07108-9>.
- (33) Adefisoye, M. A.; Olaniran, A. O. Antimicrobial Resistance Expansion in Pathogens: A Review of Current Mitigation Strategies and Advances towards Innovative Therapy. *JAC-Antimicrob. Resist.* **2023**, 5 (6), dlad127. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad127>.

- (34) Reza, N.; Dubey, V.; Sharland, M.; Hope, W. Antimicrobial Use and Resistance. **2026**.
- (35) Michael, C. A.; Dominey-Howes, D.; Labbate, M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Front. Public Health* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>.
- (36) Luyt, C.-E.; Bréchet, N.; Trouillet, J.-L.; Chastre, J. Antibiotic Stewardship in the Intensive Care Unit.
- (37) Frieri, M.; Kumar, K.; Boutin, A. Antibiotic Resistance. *J. Infect. Public Health* **2017**, *10* (4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>.
- (38) Nikolic, P.; Mudgil, P. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus Aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **2023**, *11* (2), 259. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020259>.
- (39) Wang, M.; Buist, G.; van Dijl, J. M. *Staphylococcus Aureus* Cell Wall Maintenance – the Multifaceted Roles of Peptidoglycan Hydrolases in Bacterial Growth, Fitness, and Virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **2022**, *46* (5), fuac025. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac025>.
- (40) Liu, F.; Rajabi, S.; Shi, C.; Afifirad, G.; Omid, N.; Kouhsari, E.; Khoshnood, S.; Azizian, K. Antibacterial Activity of Recently Approved Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Strains: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2022**, *21* (1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00529-z>.
- (41) Kumar, G.; Engle, K. Natural Products Acting against *S. Aureus* through Membrane and Cell Wall Disruption. *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40* (10), 1608–1646. <https://doi.org/10.1039/D2NP00084A>.
- (42) Chapot-Chartier, M.-P.; Kulakauskas, S. Cell Wall Structure and Function in Lactic Acid Bacteria. *Microb. Cell Factories* **2014**, *13* (Suppl 1), S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>.
- (43) Peschel, A. How Do Bacteria Resist Human Antimicrobial Peptides? *Trends Microbiol.* **2002**, *10* (4), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02333-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02333-8).
- (44) Liu, Y.; Liu, C.; Xue, Y.; Han, J.; Tang, J.; Wu, D.; Liu, J. Hydrophilic Porphyrin-Cationic Fluorene Conjugated Polymer Enhances Antibacterial Photodynamic Therapy for Bacterial Biofilm Destruction. *Chem. Mater.* **2025**, *37* (15), 5946–5959. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5c01224>.
- (45) Costerton, J. W.; Geesey, G. G.; Cheng, K. J. How Bacteria Stick. *Sci. Am.* **1978**, *238* (1), 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>.
- (46) Neu, T. R.; Lawrence, J. R. Innovative Techniques, Sensors, and Approaches for Imaging Biofilms at Different Scales. *Trends Microbiol.* **2015**, *23* (4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.010>.
- (47) Azeredo, J.; Azevedo, N. F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A. R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hébraud, M.; Jaglic, Z.; Kačaniová, M.; Knöchel,

- S.; Lourenço, A.; Mergulhão, F.; Meyer, R. L.; Nychas, G.; Simões, M.; Tresse, O.; Sternberg, C. Critical Review on Biofilm Methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43* (3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- (48) Li, X.; Chen, D.; Xie, S. Current Progress and Prospects of Organic Nanoparticles against Bacterial Biofilm. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *294*, 102475. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102475>.
- (49) Rodríguez-Suárez, J. M.; Butler, C. S.; Gershenson, A.; Lau, B. L. T. Heterogeneous Diffusion of Polystyrene Nanoparticles through an Alginate Matrix: The Role of Cross-Linking and Particle Size. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (8), 5159–5166. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06113>.
- (50) Farooq, A. J. Peaks, Pores, and Dragon Eggs: Uncovering and Quantifying the Heterogeneity of Treatment Wetland Biofilm Matrices. *Sci. Total Environ.* **2023**.
- (51) Liu, Y.; Shi, L.; Su, L.; Van Der Mei, H. C.; Jutte, P. C.; Ren, Y.; Busscher, H. J. Nanotechnology-Based Antimicrobials and Delivery Systems for Biofilm-Infection Control. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (2), 428–446. <https://doi.org/10.1039/C7CS00807D>.
- (52) Martins Antunes De Melo, W. D. C.; Celiešiūtė-Germanienė, R.; Šimonis, P.; Stirkė, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) for Biofilm Treatments. Possible Synergy between aPDT and Pulsed Electric Fields. *Virulence* **2021**, *12* (1), 2247–2272. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1960105>.
- (53) Xiu, W.; Wan, L.; Yang, K.; Li, X.; Yuwen, L.; Dong, H.; Mou, Y.; Yang, D.; Wang, L. Potentiating Hypoxic Microenvironment for Antibiotic Activation by Photodynamic Therapy to Combat Bacterial Biofilm Infections. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 3875. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31479-x>.
- (54) Verderosa, A. D.; Totsika, M.; Fairfull-Smith, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
- (55) Jia, Q.; Song, Q.; Li, P.; Huang, W. Rejuvenated Photodynamic Therapy for Bacterial Infections. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (14), 1900608. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900608>.
- (56) Duah, I. K.; Khaligh, A.; Koç, A.; Başaran, D. D. A.; Tuncel, D. Porphyrin Cross-linked Conjugated Polymer Nanoparticles-based Photosensitizer for Antimicrobial and Anticancer Photodynamic Therapies. *J. Appl. Polym. Sci.* **2022**, *139* (11), 51777. <https://doi.org/10.1002/app.51777>.
- (57) St. Denis, T. G.; Dai, T.; Izikson, L.; Astrakas, C.; Anderson, R. R.; Hamblin, M. R.; Tegos, G. P. All You Need Is Light: La Fotoinactivación Antimicrobiana Como Estrategia de Descubrimiento Emergente y En Evolución Contra Las Enfermedades Infecciosas. *Virulence* **2011**, *2* (6), 509–520. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17889>.
- (58) Larsson, D. G. J.; Flach, C.-F. Antibiotic Resistance in the Environment. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20* (5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.

- (59) Li, S.; Chang, K.; Sun, K.; Tang, Y.; Cui, N.; Wang, Y.; Qin, W.; Xu, H.; Wu, C. Amplified Singlet Oxygen Generation in Semiconductor Polymer Dots for Photodynamic Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (6), 3624–3634. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07995>.
- (60) Zhao, M.; Uzunoff, A.; Green, M.; Rakovich, A. The Role of Stabilizing Copolymer in Determining the Physicochemical Properties of Conjugated Polymer Nanoparticles and Their Nanomedical Applications. *Nanomaterials* **2023**, *13* (9), 1543. <https://doi.org/10.3390/nano13091543>.
- (61) Qian, Y.; Cui, H.; Shi, R.; Guo, J.; Wang, B.; Xu, Y.; Ding, Y.; Mao, H.; Yan, F. Antimicrobial Anionic Polymers: The Effect of Cations. *Eur. Polym. J.* **2018**, *107*, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.07.044>.
- (62) Mou, C.; Wang, X.; Liu, Y.; Xie, Z.; Zheng, M. Positively Charged BODIPY@carbon Dot Nanocomposites for Enhanced Photomicrobicidal Efficacy and Wound Healing. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10* (39), 8094–8099. <https://doi.org/10.1039/D2TB01539K>.
- (63) Gwynne, P. J.; Gallagher, M. P. Light as a Broad-Spectrum Antimicrobial. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00119>.
- (64) Poon, M. T. C.; Sudlow, C. L. M.; Figueroa, J. D.; Brennan, P. M. Longer-Term (≥ 2 Years) Survival in Patients with Glioblastoma in Population-Based Studies Pre- and Post-2005: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 11622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>.
- (65) Schaff, L. R.; Mellinghoff, I. K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA* **2023**, *329* (7), 574–587. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>.
- (66) Siegel, R. L.; Kratzer, T. B.; Giaquinto, A. N.; Sung, H.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2025. *CA. Cancer J. Clin.* **2025**, *75* (1), 10–45. <https://doi.org/10.3322/caac.21871>.
- (67) Lenting, K.; Verhaak, R.; ter Laan, M.; Wesseling, P.; Leenders, W. Glioma: Experimental Models and Reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2017**, *133* (2), 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1671-4>.
- (68) Stupp, R.; Hegi, M. E.; Mason, W. P.; Bent, M. J. van den; Taphoorn, M. J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; Hau, P.; Brandes, A. A.; Gijtenbeek, J.; Marosi, C.; Vecht, C. J.; Mokhtari, K.; Wesseling, P.; Villa, S.; Eisenhauer, E.; Gorlia, T.; Weller, M.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Mirimanoff, R.-O. Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-Year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10* (5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7).
- (69) Wick, W.; Platten, M.; Meisner, C.; Felsberg, J.; Tabatabai, G.; Simon, M.; Nikkhah, G.; Papsdorf, K.; Steinbach, J. P.; Sabel, M.; Combs, S. E.; Vesper, J.; Braun, C.; Meixensberger, J.; Ketter, R.; Mayer-Steinacker, R.; Reifenberger, G.; Weller, M. Temozolomide Chemotherapy Alone versus Radiotherapy Alone for Malignant

Astrocytoma in the Elderly: The NOA-08 Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13* (7), 707–715. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70164-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70164-X).

- (70) Ärzteblatt, D. Ä. G., Redaktion Deutsches. *The Treatment of Gliomas in Adulthood* (21.05.2018). Deutsches Ärzteblatt. <https://www.aerzteblatt.de/int/archive/article?id=198001> (accessed 2026-02-09).
- (71) Aldape, K.; Brindle, K. M.; Chesler, L.; Chopra, R.; Gajjar, A.; Gilbert, M. R.; Gottardo, N.; Gutmann, D. H.; Hargrave, D.; Holland, E. C.; Jones, D. T. W.; Joyce, J. A.; Kearns, P.; Kieran, M. W.; Mellinghoff, I. K.; Merchant, M.; Pfister, S. M.; Pollard, S. M.; Ramaswamy, V.; Rich, J. N.; Robinson, G. W.; Rowitch, D. H.; Sampson, J. H.; Taylor, M. D.; Workman, P.; Gilbertson, R. J. Challenges to Curing Primary Brain Tumours. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16* (8), 509–520. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5>.
- (72) Sarkaria, J. N.; Hu, L. S.; Parney, I. F.; Pafundi, D. H.; Brinkmann, D. H.; Laack, N. N.; Giannini, C.; Burns, T. C.; Kizilbash, S. H.; Laramy, J. K.; Swanson, K. R.; Kaufmann, T. J.; Brown, P. D.; Agar, N. Y. R.; Galanis, E.; Buckner, J. C.; Elmquist, W. F. Is the Blood–Brain Barrier Really Disrupted in All Glioblastomas? A Critical Assessment of Existing Clinical Data. *Neuro-Oncol.* **2018**, *20* (2), 184–191. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox175>.
- (73) de Robles, P.; Fiest, K. M.; Frolikis, A. D.; Pringsheim, T.; Atta, C.; St. Germaine-Smith, C.; Day, L.; Lam, D.; Jette, N. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncol.* **2015**, *17* (6), 776–783. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou283>.
- (74) Pliszka, M.; Szablewski, L. Glucose Transporters as a Target for Anticancer Therapy. *Cancers* **2021**, *13* (16), 4184. <https://doi.org/10.3390/cancers13164184>.
- (75) Barron, C. C.; Bilan, P. J.; Tsakiridis, T.; Tsiani, E. Facilitative Glucose Transporters: Implications for Cancer Detection, Prognosis and Treatment. *Metabolism* **2016**, *65* (2), 124–139. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.007>.
- (76) Ancey, P.-B.; Contat, C.; Meylan, E. Glucose Transporters in Cancer – from Tumor Cells to the Tumor Microenvironment. *FEBS J.* **2018**, *285* (16), 2926–2943. <https://doi.org/10.1111/febs.14577>.
- (77) Yuan, Q.; Liu, H.; Song, C.; Tian, Y.; Hassan, W.; Shabbir, R.; Wenjuan, C.; Han, L. Prevalence of GLUT1 Overexpression in Human Cancers a Systematic Review and Meta Analysis. *Discov. Oncol.* **2025**, *16* (1), 1761. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-03473-4>.
- (78) Ruchika, F. N. U.; Suvarnapathaki, S.; Serrano-Farias, A.; Bettegowda, C.; Rincon-Torroella, J. GLUT1 as a Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Brain Sci.* **2025**, *15* (6), 585. <https://doi.org/10.3390/brainsci15060585>.
- (79) Chamorthy, S.; Mekala, J. R. Functional Importance of Glucose Transporters and Chromatin Epigenetic Factors in Glioblastoma Multiforme (GBM): Possible Therapeutics. *Metab. Brain Dis.* **2023**, *38* (5), 1441–1469. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01207-5>.

- (80) Labak, C.; Wang, P.; Arora, R.; Guda, M. R.; Asuthkar, S.; Tsung, A.; Velpula, K. Glucose Transport: Meeting the Metabolic Demands of Cancer, and Applications in Glioblastoma Treatment. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1599–1608.
- (81) Bukchin, A.; Kuplennik, N.; Carcaboso, Á. M.; Sosnik, A. Effect of Growing Glycosylation Extents on the Self-Assembly and Active Targeting in Vitro of Branched Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide) Block Copolymers. *Appl. Mater. Today* **2018**, *11*, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.01.003>.
- (82) Bukchin, A.; Pascual-Pasto, G.; Cuadrado-Vilanova, M.; Castillo-Ecija, H.; Monterrubio, C.; Olaciregui, N. G.; Vila-Ubach, M.; Ordeix, L.; Mora, J.; Carcaboso, A. M.; Sosnik, A. Glucosylated Nanomicelles Target Glucose-Avid Pediatric Patient-Derived Sarcomas. *J. Controlled Release* **2018**, *276*, 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.034>.
- (83) Lecot, N.; Glisoni, R.; Oddone, N.; Benech, J.; Fernández, M.; Gambini, J. P.; Cabral, P.; Sosnik, A. Glucosylated Polymeric Micelles Actively Target a Breast Cancer Model. *Adv. Ther.* **2021**, *4* (1), 2000010. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000010>.
- (84) Zlotver, I.; Shechtman, N.; Sosnik, A. Hybrid Amorphous Titanium Dioxide/Polymeric Nano-Sonosensitizers towards the Actively Targeted Sonodynamic Therapy of Brain Cancer. *J. Colloid Interface Sci.* **2025**, *694*, 137702. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2025.137702>.
- (85) Zlotver, I.; Sosnik, A. Glucosylated Hybrid TiO₂/Polymer Nanomaterials for Actively Targeted Sonodynamic Therapy of Cancer. *Small* **2024**, *20* (4), 2305475. <https://doi.org/10.1002/smll.202305475>.
- (86) Allamyradov, Y.; ben Yosef, J.; Annamuradov, B.; Ateyeh, M.; Street, C.; Whipple, H.; Er, A. O. Photodynamic Therapy Review: Past, Present, Future, Opportunities and Challenges. *Photochem* **2024**, *4* (4), 434–461. <https://doi.org/10.3390/photochem4040027>.
- (87) Akhtar, F.; Misba, L.; Khan, A. U. The Dual Role of Photodynamic Therapy to Treat Cancer and Microbial Infection. *Drug Discov. Today* **2024**, *29* (8), 104099. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104099>.
- (88) Kolarikova, M.; Hosikova, B.; Dilenko, H.; Barton-Tomankova, K.; Valkova, L.; Bajgar, R.; Malina, L.; Kolarova, H. Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments. <https://doi.org/10.1002/med.21935>.
- (89) Nivedita; Sharma, S.; Krisnawati, D. I.; Cheng, T.-M.; Kuo, T.-R. Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Antibacterial Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (22), 10949. <https://doi.org/10.3390/ijms262210949>.
- (90) Badran, Z.; Rahman, B.; De Bonfils, P.; Nun, P.; Coeffard, V.; Verron, E. Antibacterial Nanophotosensitizers in Photodynamic Therapy: An Update. *Drug Discov. Today* **2023**, *28* (4), 103493. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103493>.
- (91) Fabio, G. B.; Martin, B. A.; Dalmolin, L. F.; Lopez, R. F. V. Antimicrobial Photodynamic Therapy and the Advances Impacted by the Association with

Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, *80*, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104147>.

- (92) Przygoda, M.; Bartusik-Aebisher, D.; Dynarowicz, K.; Cieřlar, G.; Kawczyk-Krupka, A.; Aebisher, D. Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (23), 16890. <https://doi.org/10.3390/ijms242316890>.
- (93) Martínez, S. R.; Ibarra, L. E.; Ponzio, R. A.; Forcone, M. V.; Wendel, A. B.; Chesta, C. A.; Spesia, M. B.; Palacios, R. E. Photodynamic Inactivation of ESKAPE Group Bacterial Pathogens in Planktonic and Biofilm Cultures Using Metallated Porphyrin-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (8), 2202–2213. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00268>.
- (94) Ponzio, R. A.; Ibarra, L. E.; Achilli, E. E.; Odella, E.; Chesta, C. A.; Martínez, S. R.; Palacios, R. E. Sweet Light o' Mine: Photothermal and Photodynamic Inactivation of Tenacious Pathogens Using Conjugated Polymers. *J. Photochem. Photobiol. B* **2022**, *234*, 112510. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112510>.
- (95) Martínez, S. R.; Caverzan, M.; Ibarra, L. E.; Aiassa, V.; Bohl, L.; Porporatto, C.; Gómez, M. L.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E. Light-Activated Conjugated Polymer Nanoparticles to Defeat Pathogens Associated with Bovine Mastitis. *J. Photochem. Photobiol. B* **2024**, *257*, 112971. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112971>.
- (96) Elian, C.; Méallet, R.; Versace, D. Photoactive Dye-Loaded Polymer Materials: A New Cutting Edge for Antibacterial Photodynamic Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2024**, *34* (44), 2407228. <https://doi.org/10.1002/adfm.202407228>.
- (97) Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemercier, G.; Montier, T.; Le Gall, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (12), 1995. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121995>.
- (98) Van Straten, D.; Mashayekhi, V.; De Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* **2017**, *9* (2), 19. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>.
- (99) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (100) Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- (101) Mokoena, D. R.; George, B. P.; Abrahamse, H. Photodynamic Therapy Induced Cell Death Mechanisms in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (19), 10506. <https://doi.org/10.3390/ijms221910506>.

- (102) Mishchenko, T.; Balalaeva, I.; Gorokhova, A.; Vedunova, M.; Krysko, D. V. Which Cell Death Modality Wins the Contest for Photodynamic Therapy of Cancer? *Cell Death Dis.* **2022**, *13* (5), 455. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>.
- (103) Chen, H.; Li, H.; Li, H.-J.; Zhang, Z. Umbrella Review of Photodynamic Therapy for Cancer: Efficacy, Safety, and Clinical Applications. *Front. Oncol.* **2025**, *15*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1528314>.
- (104) Hu, X.; Zhang, H.; Wang, Y.; Shiu, B.-C.; Lin, J.-H.; Zhang, S.; Lou, C.-W.; Li, T.-T. Synergistic Antibacterial Strategy Based on Photodynamic Therapy: Progress and Perspectives. *Chem. Eng. J.* **2022**, *450*, 138129. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138129>.
- (105) Bekmukhametova, A.; Ruprai, H.; Hook, J. M.; Mawad, D.; Houang, J.; Lauto, A. Photodynamic Therapy with Nanoparticles to Combat Microbial Infection and Resistance. *Nanoscale* **2020**, *12* (41), 21034–21059. <https://doi.org/10.1039/D0NR04540C>.
- (106) Casas, A.; Di Venosa, G.; Hasan, T.; Batlle, A. Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (16), 2486–2515. <https://doi.org/10.2174/092986711795843272>.
- (107) Cesca, B. A.; Pellicer San Martin, K.; Caverzan, M. D.; Oliveda, P. M.; Ibarra, L. E. State-of-the-Art Photodynamic Therapy for Malignant Gliomas: Innovations in Photosensitizers and Combined Therapeutic Approaches. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* **2025**, 1002303. <https://doi.org/10.37349/etat.2025.1002303>.
- (108) Edge, R.; Truscott, T. G. The Reactive Oxygen Species Singlet Oxygen, Hydroxy Radicals, and the Superoxide Radical Anion—Examples of Their Roles in Biology and Medicine. *Oxygen* **2021**, *1* (2), 77–95. <https://doi.org/10.3390/oxygen1020009>.
- (109) Juan, C. A.; Pérez De La Lastra, J. M.; Plou, F. J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>.
- (110) Davies, M. J. Protein Oxidation and Peroxidation. *Biochem. J.* **2016**, *473* (7), 805–825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>.
- (111) Yuan, H.; Li, Z.; Wang, X.; Qi, R. Photodynamic Antimicrobial Therapy Based on Conjugated Polymers. *Polymers* **2022**, *14* (17), 3657. <https://doi.org/10.3390/polym14173657>.
- (112) Li, Y.; Sun, G.; Xie, J.; Xiao, S.; Lin, C. Antimicrobial Photodynamic Therapy against Oral Biofilm: Influencing Factors, Mechanisms, and Combined Actions with Other Strategies. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1192955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192955>.
- (113) Hatz, S.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R. Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen

- Diffusion and Oxygen Concentration. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84* (5), 1284–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00359.x>.
- (114) Spirescu, V. A.; Chircov, C.; Grumezescu, A. M.; Andronescu, E. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-Date Overview. *Polymers* **2021**, *13* (5), 724. <https://doi.org/10.3390/polym13050724>.
- (115) Gnanasekar, S.; Kasi, G.; He, X.; Zhang, K.; Xu, L.; Kang, E.-T. Recent Advances in Engineered Polymeric Materials for Efficient Photodynamic Inactivation of Bacterial Pathogens. *Bioact. Mater.* **2023**, *21*, 157–174. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.08.011>.
- (116) Mfouo-Tynga; Dias; Inada; Kurachi. Features of Third Generation Photosensitizers Used in Anticancer Photodynamic Therapy: Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102091>.
- (117) Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.
- (118) Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Carmen Castillejos, M.; Romero-Ben, E.; Rosales-Barrios, C.; Khiar, N. Photodynamic Therapy: Photosensitizers and Nanostructures. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5* (10), 3788–3812. <https://doi.org/10.1039/D0QM00922A>.
- (119) Li, L.; Wang, Y.; Huang, T.; He, X.; Zhang, K.; Kang, E.-T.; Xu, L. Cationic Porphyrin-Based Nanoparticles for Photodynamic Inactivation and Identification of Bacteria Strains. *Biomater. Sci.* **2022**, *10* (11), 3006–3016. <https://doi.org/10.1039/D2BM00265E>.
- (120) Meng, Z.; Hou, W.; Zhou, H.; Zhou, L.; Chen, H.; Wu, C. Therapeutic Considerations and Conjugated Polymer-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39* (5), 1700614. <https://doi.org/10.1002/marc.201700614>.
- (121) Fernandez, J. M.; Bilgin, M. D.; Grossweiner, L. I. Singlet Oxygen Generation by Photodynamic Agents. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *37* (1), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07349-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07349-6).
- (122) Caverzan, M. D.; Morales Vasconsuelo, A. B.; Cerchia, L.; Palacios, R. E.; Chesta, C. A.; Ibarra, L. E. Preclinical Toxicological Characterization of Porphyrin-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2025**, *17* (5), 593. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17050593>.
- (123) Morin, P.-O.; Bura, T.; Leclerc, M. Realizing the Full Potential of Conjugated Polymers: Innovation in Polymer Synthesis. *Mater. Horiz.* **2016**, *3* (1), 11–20. <https://doi.org/10.1039/C5MH00164A>.
- (124) Jiang, Y.; McNeill, J. Light-Harvesting and Amplified Energy Transfer in Conjugated Polymer Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (2), 838–859. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00419>.

- (125) Feng, L.; Zhu, C.; Yuan, H.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. Conjugated Polymer Nanoparticles: Preparation, Properties, Functionalization and Biological Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6620. <https://doi.org/10.1039/c3cs60036j>.
- (126) Cheng, Z.; Ye, Q.; Lao, J.; Liu, X.; Wu, P. Conjugated Polymer-Photosensitizers for Cancer Photodynamic Therapy and Their Multimodal Treatment Strategies. *Polymers* **2025**, *17* (9), 1258. <https://doi.org/10.3390/polym17091258>.
- (127) Yuan, H.; Wang, B.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. Conjugated-Polymer-Based Energy-Transfer Systems for Antimicrobial and Anticancer Applications. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (40), 6978–6982. <https://doi.org/10.1002/adma.201400379>.
- (128) Guo, W.; Chen, M.; Yang, Y.; Ge, G.; Tang, L.; He, S.; Zeng, Z.; Li, X.; Li, G.; Xiong, W.; Wu, S. Biocompatibility and Biological Effects of Surface-Modified Conjugated Polymer Nanoparticles. *Molecules* **2023**, *28* (5), 2034. <https://doi.org/10.3390/molecules28052034>.
- (129) Liu, L.; Wang, X.; Zhu, S.; Li, L. Different Surface Interactions between Fluorescent Conjugated Polymers and Biological Targets. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (2), 1211–1220. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01567>.
- (130) Lupton, J. M. Chromophores in Conjugated Polymers—All Straight? *ChemPhysChem* **2012**, *13* (4), 901–907. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100770>.
- (131) Liang, Z.; Nardes, A.; Wang, D.; Berry, J. J.; Gregg, B. A. Defect Engineering in π -Conjugated Polymers. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (20), 4914–4919. <https://doi.org/10.1021/cm902031n>.
- (132) Lupton, J. M. Single-Molecule Spectroscopy for Plastic Electronics: Materials Analysis from the Bottom-Up. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (15), 1689–1721. <https://doi.org/10.1002/adma.200902306>.
- (133) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109* (Suppl 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>.
- (134) Hu, D.; Yu, J.; Wong, K.; Bagchi, B.; Rossky, P. J.; Barbara, P. F. Collapse of Stiff Conjugated Polymers with Chemical Defects into Ordered, Cylindrical Conformations. *Nature* **2000**, *405* (6790), 1030–1033. <https://doi.org/10.1038/35016520>.
- (135) Li, J.; Sun, W.; Yang, Z.; Gao, G.; Ran, H.-H.; Xu, K.-F.; Duan, Q.-Y.; Liu, X.; Wu, F.-G. Rational Design of Self-Assembled Cationic Porphyrin-Based Nanoparticles for Efficient Photodynamic Inactivation of Bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (49), 54378–54386. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15244>.
- (136) Elgiddawy, N.; Elnagar, N.; Korri-Yousseufi, H.; Yassar, A. π -Conjugated Polymer Nanoparticles from Design, Synthesis to Biomedical Applications: Sensing, Imaging, and Therapy. *Microorganisms* **2023**, *11* (8), 2006. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082006>.

- (137) Lakowicz, J. R.; Masters, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13* (2), 029901. <https://doi.org/10.1117/1.2904580>.
- (138) Al-Bati, S.; Jumali, M. H. H.; Ibtehaj, K.; Al-Asbahi, B. A.; Yap, C. C. Förster Energy Transfer Mechanism and Color Tunability in Three Binary Conjugated Polymer Blends. *Opt. Mater.* **2021**, *116*, 111085. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2021.111085>.
- (139) Hwang, I.; Scholes, G. D. Electronic Energy Transfer and Quantum-Coherence in π -Conjugated Polymers. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (3), 610–620. <https://doi.org/10.1021/cm102360x>.
- (140) Bolinger, J. C.; Traub, M. C.; Brazard, J.; Adachi, T.; Barbara, P. F.; Vanden Bout, D. A. Conformation and Energy Transfer in Single Conjugated Polymers. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (11), 1992–2001. <https://doi.org/10.1021/ar300012k>.
- (141) Ibarra, L. E.; Camorani, S.; Agnello, L.; Pedone, E.; Pirone, L.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E.; Fedele, M.; Cerchia, L. Selective Photo-Assisted Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells through Aptamer Decoration of Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (3), 626. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030626>.
- (142) Ibarra, L. E.; Porcal, G. V.; Macor, L. P.; Ponzio, R. A.; Spada, R. M.; Lorente, C.; Chesta, C. A.; Rivarola, V. A.; Palacios, R. E. Metallated Porphyrin-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles for Efficient Photodynamic Therapy of Brain and Colorectal Tumor Cells. *Nanomed.* **2018**, *13* (6), 605–624. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0292>.
- (143) Ibarra, L. E.; Beaugé, L.; Arias-Ramos, N.; Rivarola, V. A.; Chesta, C. A.; López-Larrubia, P.; Palacios, R. E. Trojan Horse Monocyte-Mediated Delivery of Conjugated Polymer Nanoparticles for Improved Photodynamic Therapy of Glioblastoma. *Nanomed.* **2020**, *15* (17), 1687–1707. <https://doi.org/10.2217/nmm-2020-0106>.
- (144) Caverzán, M. D.; Beaugé, L.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E.; Ibarra, L. E. Photodynamic Therapy of Glioblastoma Cells Using Doped Conjugated Polymer Nanoparticles: An in Vitro Comparative Study Based on Redox Status. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *212*, 112045. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112045>.
- (145) Caverzán, M. D.; Oliveda, P. M.; Beaugé, L.; Palacios, R. E.; Chesta, C. A.; Ibarra, L. E. Metronomic Photodynamic Therapy with Conjugated Polymer Nanoparticles in Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Cells* **2023**, *12* (11), 1541. <https://doi.org/10.3390/cells12111541>.
- (146) Cagnetta, G. E.; Martínez, S. R.; Ibarra, L. E.; Gallastegui, A.; Martucci, J. F.; Palacios, R. E.; Chesta, C. A.; Gómez, M. L. Reusable Antimicrobial Antibiotic-Free Dressings Obtained by Photopolymerization. *Biomater. Adv.* **2023**, *149*, 213399. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213399>.
- (147) Cagnetta, G. E.; Gallastegui, A.; Martínez, S. R.; Mantione, D.; Criado-Gonzalez, M.; Regato-Herbella, M.; Lezama, L.; Palacios, R. E.; Gómez, M. L.; Mecerreyes, D.; Chesta, C. A. Conjugated Polymer Nanoparticles as Visible Light Panchromatic

Photoinitiators for 3D Printing of Acrylic Hydrogels. *Macromolecules* **2024**, *57* (1), 78–87. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.3c02026>.

- (148) Cagnetta, G. E.; Martínez, S. R.; Ibarra, L. E.; Wendel, A.; Palacios, R. E.; Chesta, C. A.; Gómez, M. L. Photoactive Broad-Spectrum Dressings with Antimicrobial and Antitumoral Properties. *Biomater. Adv.* **2025**, *169*, 214158. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.214158>.
- (149) Lu, Z.; Zhang, Z.; Tang, Y. Conjugated Polymers-Based Thermal-Responsive Nanoparticles for Controlled Drug Delivery, Tracking, and Synergistic Photodynamic Therapy/Chemotherapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (10), 4485–4492. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00640>.
- (150) Zhang, H.; Liang, Y.; Zhao, H.; Qi, R.; Chen, Z.; Yuan, H.; Liang, H.; Wang, L. Dual-Mode Antibacterial Conjugated Polymer Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. *Macromol. Biosci.* **2020**, *20* (2), 1900301. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900301>.
- (151) Liang, Y.; Zhang, H.; Yuan, H.; Lu, W.; Li, Z.; Wang, L.; Gao, L.-H. Conjugated Polymer and Triphenylamine Derivative Codoped Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Antimicrobial Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (6), 3494–3499. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00320>.
- (152) Feng, G.; Fang, Y.; Liu, J.; Geng, J.; Ding, D.; Liu, B. Multifunctional Conjugated Polymer Nanoparticles for Image-Guided Photodynamic and Photothermal Therapy. *Small* **2017**, *13* (3), 1602807. <https://doi.org/10.1002/smll.201602807>.
- (153) Wu, X.; DeGottardi, Q.; Wu, I.-C.; Yu, J.; Wu, L.; Ye, F.; Kuo, C.-T.; Kwok, W. W.; Chiu, D. T. Lanthanide-Coordinated Semiconducting Polymer Dots Used for Flow Cytometry and Mass Cytometry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (47), 14908–14912. <https://doi.org/10.1002/anie.201708463>.
- (154) Kuo, C.-T.; Thompson, A. M.; Gallina, M. E.; Ye, F.; Johnson, E. S.; Sun, W.; Zhao, M.; Yu, J.; Wu, I.-C.; Fujimoto, B.; DuFort, C. C.; Carlson, M. A.; Hingorani, S. R.; Paguirigan, A. L.; Radich, J. P.; Chiu, D. T. Optical Painting and Fluorescence Activated Sorting of Single Adherent Cells Labelled with Photoswitchable Pdots. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 11468. <https://doi.org/10.1038/ncomms11468>.
- (155) Wang, Y.; Li, S.; Zhang, P.; Bai, H.; Feng, L.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. Photothermal-Responsive Conjugated Polymer Nanoparticles for Remote Control of Gene Expression in Living Cells. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (8), 1705418. <https://doi.org/10.1002/adma.201705418>.
- (156) Zhao, Q.; Pan, T.; Xiang, G.; Mei, Z.; Jiang, J.; Li, G.; Zou, X.; Chen, M.; Sun, D.; Jiang, S.; Tian, Y. Highly Efficient Ratiometric Extracellular Oxygen Sensors through Physical Incorporation of a Conjugated Polymer and PtTFPP in Graft Copolymers. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *273*, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.026>.

- (157) Wang, J.; Lv, F.; Liu, L.; Ma, Y.; Wang, S. Strategies to Design Conjugated Polymer Based Materials for Biological Sensing and Imaging. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *354*, 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.023>.
- (158) Feng, L.; Liu, L.; Lv, F.; Bazan, G. C.; Wang, S. Preparation and Biofunctionalization of Multicolor Conjugated Polymer Nanoparticles for Imaging and Detection of Tumor Cells. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (23), 3926–3930. <https://doi.org/10.1002/adma.201305206>.
- (159) Li, T.; Wu, M.; Wei, Q.; Xu, D.; He, X.; Wang, J.; Wu, J.; Chen, L. Conjugated Polymer Nanoparticles for Tumor Theranostics. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (5), 1943–1979. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01446>.
- (160) Awad, M.; Thomas, N.; Barnes, T. J.; Prestidge, C. A. Nanomaterials Enabling Clinical Translation of Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Controlled Release* **2022**, *346*, 300–316. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.035>.
- (161) Tuncel, D.; Demir, H. V. Conjugated Polymer Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2* (4), 484. <https://doi.org/10.1039/b9nr00374f>.
- (162) MacFarlane, L. R.; Shaikh, H.; Garcia-Hernandez, J. D.; Vespa, M.; Fukui, T.; Manners, I. Functional Nanoparticles through π -Conjugated Polymer Self-Assembly. *Nat. Rev. Mater.* **2021**, *6* (1), 7–26. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00233-4>.
- (163) Jana, B.; Bhattacharyya, S.; Patra, A. Perspective of Dye-Encapsulated Conjugated Polymer Nanoparticles for Potential Applications. *Bull. Mater. Sci.* **2018**, *41* (5), 122. <https://doi.org/10.1007/s12034-018-1643-x>.
- (164) Martínez, S. R.; Odella, E.; Ibarra, L. E.; Sosa Lochedino, A.; Wendel, A. B.; Durantini, A. M.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E. Conjugated Polymer Nanoparticles as Sonosensitizers in Sono-Inactivation of a Broad Spectrum of Pathogens. *Ultrasonics* **2024**, *137*, 107180. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2023.107180>.
- (165) *Incorporation of Porphyrin to π -Conjugated Backbone for Polymer-Dot-Sensitized Photodynamic Therapy* | *Biomacromolecules*. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.6b00356> (accessed 2026-01-21).
- (166) Wang, S.; Thorn, A.; Redmond, G. Photophysical Probing of Dye Microenvironment, Diffusion Dynamics, and Energy Transfer. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (12), 6900–6911. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11166>.
- (167) Ponzio, R. A.; Spada, R. M.; Wendel, A. B.; Forcone, M. V.; Stefani, F. D.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E. Exciton Diffusion, Antenna Effect, and Quenching Defects in Superficially Dye-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125* (42), 23299–23312. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07208>.
- (168) Wu, C.; Zheng, Y.; Szymanski, C.; McNeill, J. Energy Transfer in a Nanoscale Multichromophoric System: Fluorescent Dye-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (6), 1772–1781. <https://doi.org/10.1021/jp074149+>.

- (169) Graves, L. S.; Goodwin, M. J.; Maricar, I. N.; Rebstock, J. A.; Harbron, E. J. Maximizing Amplified Energy Transfer: Tuning Particle Size and Dye Loading in Conjugated Polymer Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124* (48), 26474–26485. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09084>.
- (170) Malaekheh-Nikouei, B. The Role of Nanotechnology in Combating Biofilm-Based Antibiotic Resistance. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**.
- (171) Wu, C.; Jin, Y.; Schneider, T.; Burnham, D. R.; Smith, P. B.; Chiu, D. T. Ultrabright and Bioorthogonal Labeling of Cellular Targets Using Semiconducting Polymer Dots and Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49* (49), 9436–9440. <https://doi.org/10.1002/anie.201004260>.
- (172) Braeken, Y.; Cheruku, S.; Ethirajan, A.; Maes, W. Conjugated Polymer Nanoparticles for Bioimaging. *Materials* **2017**, *10* (12), 1420. <https://doi.org/10.3390/ma10121420>.
- (173) Hernández-Escalona, M.; Gómez-Hernández, Y.; Peñate-Valldeperas, P.; Hernández-Escalona, M.; Gómez-Hernández, Y.; Peñate-Valldeperas, P. Procesos de Agregación En Disoluciones Acuosas de Triton X100 y CTAB Con Alginatos de Sodio. *Rev. Cuba. Quím.* **2020**, *32* (1), 88–103.
- (174) Li, N.; Luo, H.; Liu, S. A New Method for the Determination of the Critical Micelle Concentration of Triton X-100 in the Absence and Presence of β -Cyclodextrin by Resonance Rayleigh Scattering Technology. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2004**, *60* (8–9), 1811–1815. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2003.09.018>.
- (175) Gallastegui, A.; Spada, R. M.; Cagnetta, G.; Ponzio, R. A.; Martínez, S. R.; Previtali, C. M.; Gómez, M. L.; Palacios, R. E.; Chesta, C. A. Conjugated Polymer Nanoparticles as Unique Coinitiator-Free, Water-Soluble, Visible-Light Photoinitiators of Vinyl Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41* (8), 1900601. <https://doi.org/10.1002/marc.201900601>.
- (176) Kirov, S. M.; Tassell, B. C.; Semmler, A. B. T.; O'Donovan, L. A.; Rabaan, A. A.; Shaw, J. G. Lateral Flagella and Swarming Motility in *Aeromonas* Species. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (2), 547–555. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.547-555.2002>.
- (177) Bilski, P.; Dabestani, R.; Chignell, C. F. Influence of Catlonk Surfactant on the Photoprocesses of Eosine and Rose Bengal in Aqueous Solution.
- (178) González, M. G. Determination of the Photoluminescence Quantum Yield of Diluted Dye Solutions in Highly Scattering Media by Pulsed Photoacoustic Spectroscopy. *Appl. Opt.* **2010**, *49* (36), 6850. <https://doi.org/10.1364/AO.49.006850>.
- (179) Rimal, B.; Chang, J. D.; Liu, C.; Kim, H.; Aderotoye, O.; Zechmann, B.; Kim, S. J. Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy of *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *ACS Omega* **2024**, *9* (36), 37610–37620. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c01168>.
- (180) Lee, A. MEASURING CELL-VIABILITY BY RESAZURIN (ALAMARBLUE®) ASSAY USING PHOTOPETTE®. *LIFE Sci.* **2017**.

- (181) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
- (182) Parween, S.; Nahar, P. Sensitive and Rapid Bradford and BCA Protein Assay by a Common Desktop Scanner. *Biomedicine* **2023**, *43* (01), 439–443. <https://doi.org/10.51248/v43i01.2257>.
- (183) An Assay for Detection of Uropathogenic Escherichia coli Biofilm Using Calcofluor. *Int. J. Res. Stud. Biosci.* **2016**, *4* (4). <https://doi.org/10.20431/2349-0365.0404005>.
- (184) Ponzio, R. A.; Marcato, Y. L.; Gómez, M. L.; Waiman, C. V.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E. Crosslinked Polymer Nanoparticles Containing Single Conjugated Polymer Chains. *Methods Appl. Fluoresc.* **2017**, *5* (2), 024001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aa6405>.
- (185) ISO 10993-4:2017. ISO. <https://www.iso.org/standard/63448.html> (accessed 2025-12-18).
- (186) Greca, L. G.; Lehtonen, J.; Tardy, B. L.; Guo, J.; Rojas, O. J. Biofabrication of Multifunctional Nanocellulosic 3D Structures: A Facile and Customizable Route. *Mater. Horiz.* **2018**, *5* (3), 408–415. <https://doi.org/10.1039/C7MH01139C>.
- (187) Cagnetta, G. E.; Gallastegui, A.; Martínez, S. R.; Mantione, D.; Criado-Gonzalez, M.; Regato-Herbella, M.; Lezama, L.; Palacios, R. E.; Gómez, M. L.; Mecerreyes, D.; Chesta, C. A. Conjugated Polymer Nanoparticles as Visible Light Panchromatic Photoinitiators for 3D Printing of Acrylic Hydrogels. *Macromolecules* **2024**, *57* (1), 78–87. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.3c02026>.
- (188) Clifton, S.; Beattie, D.; Mierczynska-Vasilev, A.; Acres, R.; Morgan, A.; Kee, T. Chemical Defects in the Highly Fluorescent Conjugated Polymer Dots. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2010**, *26*, 17785–17789. <https://doi.org/10.1021/la103063p>.
- (189) Monteiro, J. M.; Fernandes, P. B.; Vaz, F.; Pereira, A. R.; Tavares, A. C.; Ferreira, M. T.; Pereira, P. M.; Veiga, H.; Kuru, E.; VanNieuwenhze, M. S.; Brun, Y. V.; Filipe, S. R.; Pinho, M. G. Cell Shape Dynamics during the Staphylococcal Cell Cycle. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 8055. <https://doi.org/10.1038/ncomms9055>.
- (190) Ramos-León, F.; Ramamurthi, K. S. Staphylococcus Aureus as an Emerging Model to Study Bacterial Cell Division. *J. Biol. Chem.* **2025**, *301* (7). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110343>.
- (191) Wang, L.; Zhao, Q.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Zhao, Y.; Tang, Y. Fluorescent Conjugated Polymer/Quaternary Ammonium Salt Co-Assembly Nanoparticles: Applications in Highly Effective Antibacteria and Bioimaging. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1* (5), 1478–1486. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00422>.
- (192) Neri, V.; Huang, L.; Li, J. *Infections and Sepsis Development*; BoD – Books on Demand, 2021.
- (193) Wang, H.; Li, C.; Wu, Q.; Wen, H.; Sun, T.; Xie, Z. A Cationic BODIPY Photosensitizer Decorated with Quaternary Ammonium for High-Efficiency

Photodynamic Inhibition of Bacterial Growth. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10* (26), 4967–4973. <https://doi.org/10.1039/D2TB00778A>.

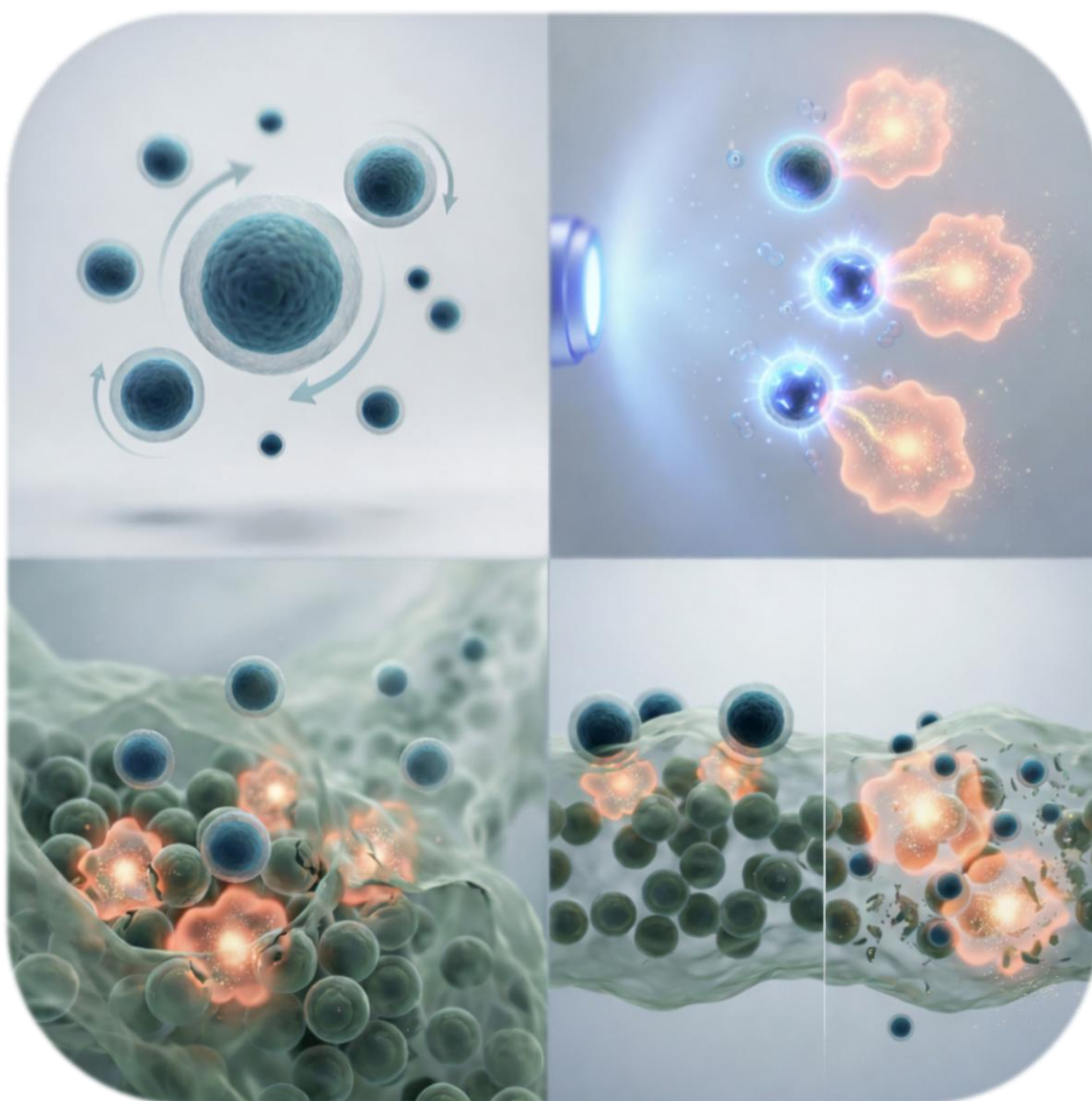
- (194) Wang, Y.; Zhou, Q.; Wang, Y.; Ren, J.; Zhao, H.; Wu, S.; Yang, J.; Zhen, J.; Luo, Y.; Wang, X.; Gu, Y. *In Vitro* Photodynamic Inactivation Effects of Ru(II) Complexes on Clinical Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* Planktonic and Biofilm Cultures. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91* (1), 124–133. <https://doi.org/10.1111/php.12378>.
- (195) Subbarayan, P. R.; Wang, P. G.; Lampidis, T. J.; Ardalan, B.; Braunschweiger, P. Differential Expression of Glut 1 mRNA and Protein Levels Correlates with Increased Sensitivity to the Glyco-Conjugated Nitric Oxide Donor (2-Glu-SNAP) in Different Tumor Cell Types. *J. Chemother.* **2008**, *20* (1), 106–111. <https://doi.org/10.1179/joc.2008.20.1.106>.
- (196) Cuestas, M. L.; Glisoni, R. J.; Mathet, V. L.; Sosnik, A. Lactosylated Poly(Ethylene Oxide)–Poly(Propylene Oxide) Block Copolymers for Potential Active Targeting: Synthesis and Physicochemical and Self-Aggregation Characterization. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15* (1), 1389. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1389-0>.
- (197) Glisoni, R. J.; Sosnik, A. Novel Poly(Ethylene Oxide)- *b* -Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone: Novel Poly(Ethylene Oxide)- *b* -Poly(Propylene Oxide) *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (11), 1639–1651. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400235>.
- (198) Pariente, A.; Peled, E.; Zlotver, I.; Sosnik, A. Los Nanomateriales Híbridos Amorfos de TiO₂ / Polímero Desencadenan La Apoptosis de Células Cancerosas Pediátricas Tras La Irradiación Con Ultrasonidos. *Mater. Today Chem.* **2021**, *22*, 100613. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100613>.
- (199) Caverzán, M. D.; Beaugé, L.; Chesta, C. A.; Palacios, R. E.; Ibarra, L. E. Photodynamic Therapy of Glioblastoma Cells Using Doped Conjugated Polymer Nanoparticles: An in Vitro Comparative Study Based on Redox Status. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *212*, 112045. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112045>.
- (200) Poon, W.; Zhang, Y.-N.; Ouyang, B.; Kingston, B. R.; Wu, J. L. Y.; Wilhelm, S.; Chan, W. C. W. Elimination Pathways of Nanoparticles. *ACS Nano* **2019**, *13* (5), 5785–5798. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01383>.
- (201) Men, X.; Wang, F.; Chen, H.; Liu, Y.; Men, X.; Yuan, Y.; Zhang, Z.; Gao, D.; Wu, C.; Yuan, Z. Ultrasmall Semiconducting Polymer Dots with Rapid Clearance for Second Near-Infrared Photoacoustic Imaging and Photothermal Cancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (24), 1909673. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909673>.
- (202) Chu, K. S.; Hasan, W.; Rawal, S.; Walsh, M. D.; Enlow, E. M.; Luft, J. C.; Bridges, A. S.; Kuijer, J. L.; Napier, M. E.; Zamboni, W. C.; DeSimone, J. M. Plasma, Tumor and Tissue Pharmacokinetics of Docetaxel Delivered via Nanoparticles of Different Sizes and Shapes in Mice Bearing SKOV-3 Human Ovarian Carcinoma Xenograft. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9* (5), 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.008>.

- (203) Ferretti; Usseglio; Mondini; Drago; Et., A. Towards Bio-Compatible Magnetic Nanoparticles: Immune-Related Effects, in-Vitro Internalization, and in-Vivo Bio-Distribution of Zwitterionic Ferrite Nanoparticles with Unexpected Renal Clearance. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.08.026>.
- (204) Goel, S.; Ferreira, C. A.; Dogra, P.; Yu, B.; Kuttyreff, C. J.; Siamof, C. M.; Engle, J. W.; Barnhart, T. E.; Cristini, V.; Wang, Z.; Cai, W. Size-Optimized Ultrasmall Porous Silica Nanoparticles Depict Vasculature-Based Differential Targeting in Triple Negative Breast Cancer. *Small* **2019**, *15* (46), 1903747. <https://doi.org/10.1002/sml.201903747>.
- (205) Hsu, J. C.; Cruz, E. D.; Lau, K. C.; Bouché, M.; Kim, J.; Maidment, A. D. A.; Cormode, D. P. Renally Excretable and Size-Tunable Silver Sulfide Nanoparticles for Dual-Energy Mammography or Computed Tomography. *Chem. Mater.* **2019**, *31* (19), 7845–7854. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b01750>.
- (206) Li, H.; Jin, K.; Luo, M.; Wang, X.; Zhu, X.; Liu, X.; Jiang, T.; Zhang, Q.; Wang, S.; Pang, Z. Size Dependency of Circulation and Biodistribution of Biomimetic Nanoparticles: Red Blood Cell Membrane-Coated Nanoparticles. *Cells* **2019**, *8* (8), 881. <https://doi.org/10.3390/cells8080881>.
- (207) Lin, Y.; Dong, C.; Cao, F.; Xiong, L.; Gu, H.; Xu, H. Size-Dependent Optical Properties of Conjugated Polymer Nanoparticles. *RSC Adv.* **2017**, *7* (88), 55957–55965. <https://doi.org/10.1039/C7RA12164D>.
- (208) Caires, A. R. L.; Lima, T. H. N.; Abelha, T. F. Conjugated Polymer Nanoparticles with Tunable Antibacterial Photodynamic Capability. *Mater. Adv.* **2023**, *4* (7), 1664–1670. <https://doi.org/10.1039/D2MA00970F>.
- (209) Nakamura, N.; Tanaka, N.; Ohta, S. Facile and Wide-Range Size Tuning of Conjugated Polymer Nanoparticles for Biomedical Applications as a Fluorescent Probe. *RSC Adv.* **2022**, *12* (19), 11606–11611. <https://doi.org/10.1039/D1RA09101H>.
- (210) Kang, S.; Yoon, T. W.; Kim, G.-Y.; Kang, B. Review of Conjugated Polymer Nanoparticles: From Formulation to Applications. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (12), 17436–17460. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c04730>.
- (211) Tang, N.; Yuan, S.; Luo, Y.; Wang, A.-J.; Sun, K.; Liu, N.-N.; Tao, K. Nanoparticle-Based Photodynamic Inhibition of Candida Albicans Biofilms with Interfering Quorum Sensing. *ACS Omega* **2023**.
- (212) Ali, A. Y.; Alani, A.-A. K.; Ahmed, B. O.; Hamid, L. L. Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticle Size on Antibacterial and Anti-Biofilm Activity against Pathogenic Multi-Drug Resistant Bacteria. *OpenNano* **2024**, *20*, 100213. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2024.100213>.
- (213) Vasil'ev, V. V.; Borisov, S. M.; Chubarova, Y. O.; Rumyantseva, V. D. Dimerization, Aggregation, and Luminescent Properties of Palladium(II) and Platinum(II) Complexes with Meso-Tetrakis(4-Carboxyphenyl)Porphyrin. **2003**, *48* (3).

- (214) Chen, H.-C. Platinum(II)–Porphyrin as a Sensitizer for Visible-Light Driven Water Oxidation in Neutral Phosphate Buffer. *Environ. Sci.* **2015**.
- (215) Odai, S.; Ito, H.; Kamachi, T. Dendrimer Porphyrins as the Oxygen Sensor for Intracellular Imaging to Suppress Interaction towards Biological Molecules. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2019**, 65 (3), 178–184. <https://doi.org/10.3164/jcfn.19-13>.

Capítulo 7:

ANEXO



7. Anexo

En la figura 90 se muestra el conjunto de gráficos utilizados para seleccionar los subconjuntos de eventos considerados como representativos de poblaciones de bacterias para las distintas muestras analizadas de citometría de flujo. Los gráficos de la primera columna (figuras 90A, 90D, 90G, 90J y 90M) muestran la selección inicial de eventos asociados a la población bacteriana dejando afuera eventos de baja intensidad de dispersión considerados residuos. En la segunda columna (figuras 90B, 90E, 90H, 90K y 90N) los eventos seleccionados en la primera columna se subseleccionan para retener únicamente la población de singletes (eventos asociados al pasaje de estructuras individuales a través del volumen de detección). En la tercera columna (figuras 90C, 90F, 90I, 90L y 90Ñ) el grupo de eventos seleccionado en la segunda columna se vuelve a presentar en un gráfico SSC vs FSC. Este es el grupo de eventos que se efectivamente consideran asociados a las poblaciones celulares de interés y se analizarán en términos de sus intensidades de fluorescencia (canal verde). La primera fila de imágenes (figuras 90A, 90B y 90C) corresponde a la muestra control conteniendo solo bacterias, la segunda (figuras 90D, 90E y 90F) a la muestra de bacterias + NPC:PSMA incubadas durante 1 h, la tercera (figuras 90G, 90H y 90I) a la muestra de bacterias + NPC:PSMA@PFN incubadas durante 1 h, la cuarta (figuras 90J, 90K, y 90L) a la muestra de bacterias + NPC:PSMA incubadas por 24 h y la quinta (figuras 90M, 90 N y 90Ñ) a la muestra de bacterias + NPC:PSMA@PFN incubadas durante 24 h.

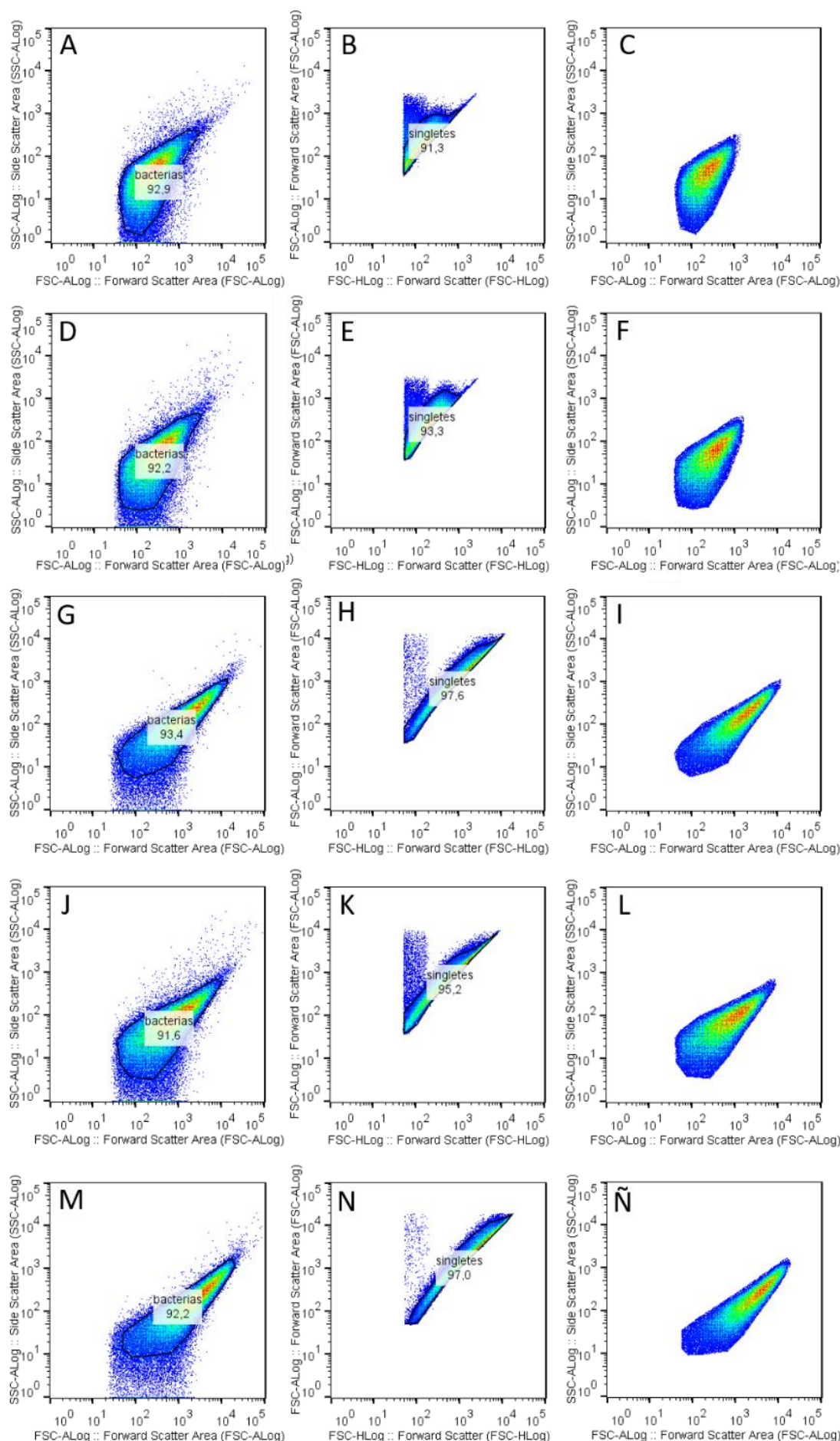


Figura 90. Diagrama de dispersión de citometría de flujo La primera columna muestra la población total, la segunda la selección de singletes y la tercera la población total de singletes. (A-C) Control de MRSA. (D-F) MRSA incubado con NPC:PSMA durante 1 h. (G-I) MRSA incubado con NPC:PSMA@PFN durante 1 h. (J-L) MRSA incubado con NPC:PSMA durante 24 h. (M-Ñ) MRSA incubado con NPC:PSMA@PFN durante 24 h. En todos los casos se utilizó una concentración de partículas de 5 mg/L. Condiciones para la detección de IF: $\lambda_{\text{emi}} = 540 - 580 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, 10^4 eventos).

En la figura 91, se muestran gráficos análogos a los descritos la figura 90, pero en este caso se utilizaron 10 mg/L de NPC:PSMA y NPC:PSMA@PFN en las muestras que lo requirieron.

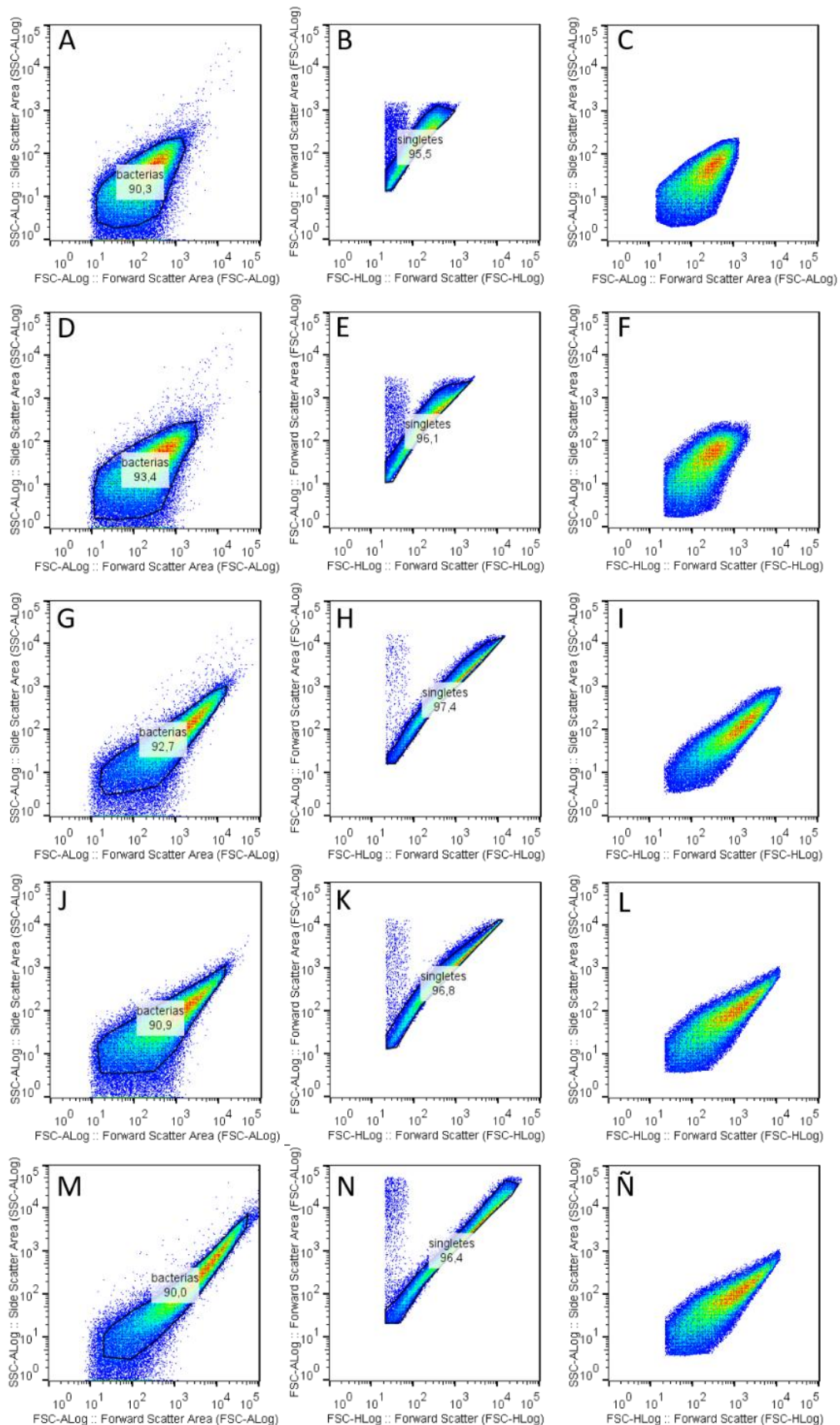
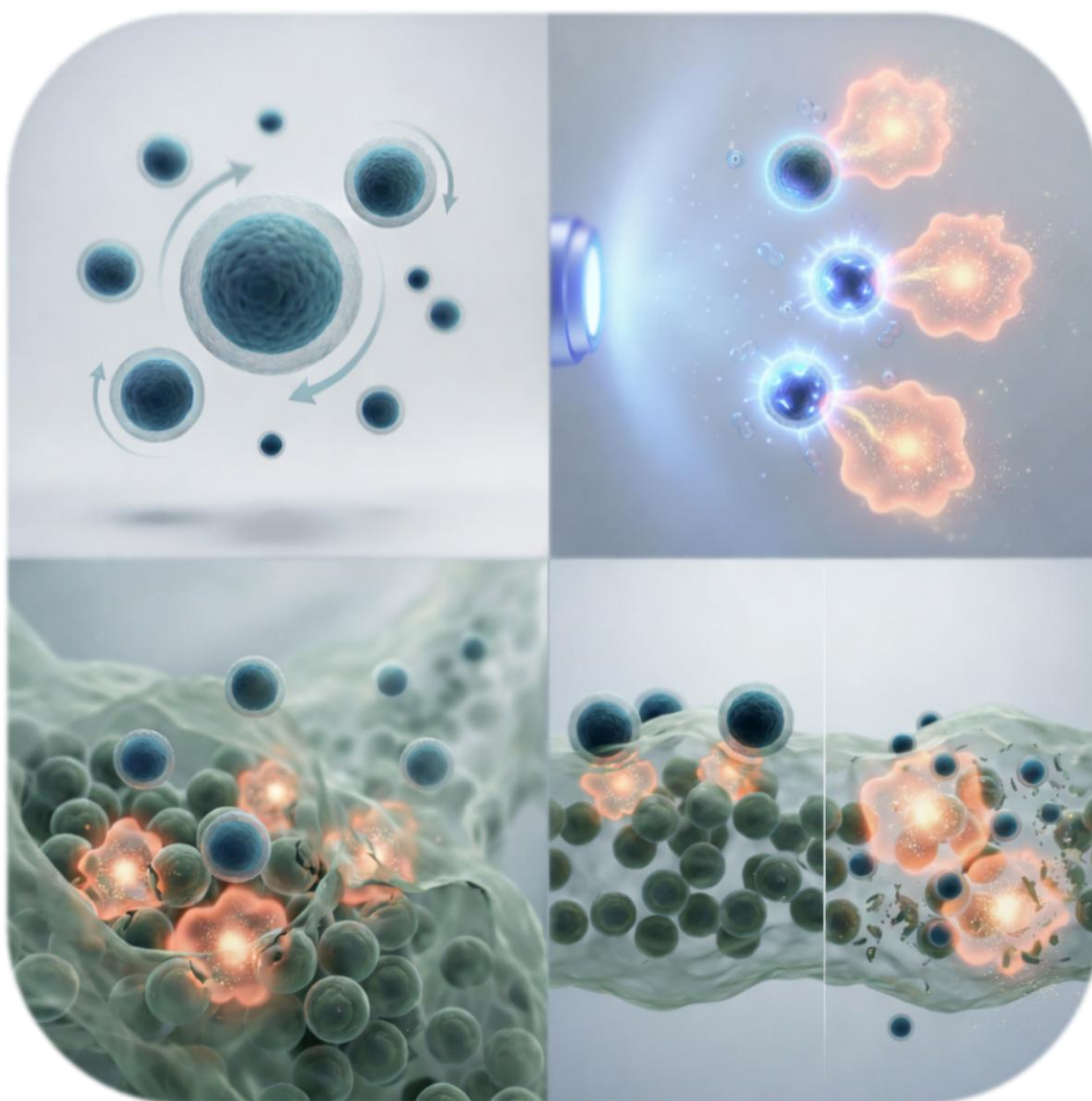


Figura 91. Diagrama de dispersión de citometría de flujo La primera columna muestra la población total, la segunda la selección de singletes y la tercera la población total de singletes. (A-C) Control de MRSA. (D-F) MRSA incubado con NPC:PSMA durante 1 h. (G-I) MRSA incubado con NPC:PSMA@PFN durante 1 h. (J-L) MRSA incubado con NPC:PSMA durante 24 h. (M-Ñ) MRSA incubado con NPC:PSMA@PFN durante 24 h. En todos los casos se utilizó una concentración de NPC/NPC-CS de 10 mg/L. Condiciones para la detección de IF: $\lambda_{\text{emi}} = 540 - 580 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, 10^4 eventos).

Capítulo 8:

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



8.1. Trabajos científicos publicados

¹ Simple Surface Charge Engineering of Conjugated Polymer ² Nanoparticles for Potent Dual-Mode Photoinactivation of Resistant ³ Bacteria and Biofilms

⁴ Arianna L. Sosa-Lochedino, Sol R. Martínez, Emmanuel Odella, Virginia Aiassa, Matías Caverzan,
⁵ Luis E. Ibarra, Carlos A. Chesta,* and Rodrigo E. Palacios*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsami.5c24929>



Read Online

View Article Online
DOI: 10.1039/D4MH01802H

COMMUNICATION

Poly(3-hexylthiophene) nanoparticles as visible-light photoinitiators and photosensitizers in 3D printable acrylic hydrogels for photodynamic therapies

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Rocío Natera Abalos,^a Ilaria Abdel Aziz,^b Matías Caverzan,^a Arianna Sosa Lochedino,^a Luis E. Ibarra,^c Antonela Gallastegui,^b Carlos A. Chesta,^a M. Lorena Gómez,^a David Mecerreyes,^{b,d} Rodrigo E. Palacios^{*a} and Miryam Criado-Gonzalez^{*b,e}

Ultrasonics 137 (2024) 107180



Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultras



Conjugated polymer nanoparticles as sonosensitizers in sono-inactivation of a broad spectrum of pathogens

Sol R. Martínez^{a,b,1,2}, Emmanuel Odella^{a,b,1}, Luis E. Ibarra^{c,d}, Arianna Sosa Lochedino^{a,b}, Ana B. Wendel^{a,e}, Andrés M. Durantini^{f,b,2}, Carlos A. Chesta^{a,b,*}, Rodrigo E. Palacios^{a,b,*}

8.2. Presentaciones a congresos

2026

Simple Surface Charge Engineering: Development of Conjugated Polymer Nanoparticles for Dual Photodynamic and Photothermal Inactivation of Bacterial Pathogens. Sosa-Lochedino, AL; Martínez, SR; Aiassa, V; Caverzan, M; Ibarra, LE; Chesta, CA; Palacios, RE. 2026 Inter-American photochemical society (I-APS) meeting. Presentación en formato póster

2025

Síntesis y caracterización de nanopartículas de polímero conjugado del tipo núcleo/capa para su aplicación en inactivación fotodinámica de biofilms de patógenos resistentes a antibióticos. Sosa-Lochedino, AL; Martínez, SR; Ibarra, LE; Aiassa, V; Chesta, CA; Palacios, RE. Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (CAFQI 2025). Presentación oral.

Enfoque multifuncional. Nanopartículas de poli(3-hexiltiofeno) como fotoiniciadores y fotosensibilizadores en impresión 3D de hidrogeles para terapias fotodinámicas. Nantera Abalos, R; Abdel Aziz, I; Caverzan, M; Sosa Lochedino, AL; Ibarra, LE. Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (CAFQI 2025). Presentación en formato póster.

2024

Síntesis Y Caracterización De Nanopartículas De Polímero Conjugado Del Tipo Núcleo/Capa Para Su Aplicación En Inactivación Fotodinámica De Patógenos Resistentes A Antibióticos. Autores: Sosa-Lochedino, AL; Martínez, SR; Ibarra, L; Aissa, V; Chesta, CA; Palacios, RE. VII Reunión de fotobiólogos moleculares argentinos (GRAFOB). Presentación oral.

2023

Síntesis Y Caracterización De Nanopartículas De Polímero Conjugado Del Tipo Núcleo/Cubierta Para Su Aplicación En Inactivación Fotodinámica De Patógenos Resistentes A Antibióticos. Autores: Sosa-Lochedino, AL; Martínez, SR; Chesta, CA;

Palacios, RE. XXII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (NANO 2023). Presentación oral.

2022

Nanopartículas De Polímeros Conjugados Como Sonosensibilizadores En La Inactivación Sonodinámica De Microorganismos. Autores: Martínez SR, Odella E, Sosa-Lochedino AL, Wendel AB, Ibarra LE, Durantini AM, Chesta CA, Palacios RE. Nanomercosur. Póster. **Síntesis Y Caracterización De Nanopartículas De Polímeros Conjugados Con Aplicaciones En Fototerapias.** Autores: Sosa Lochedino AL, Chesta CA, Palacios RE. II Jornadas de Actividades Académicas en Exactas, Universidad Nacional de Río Cuarto. Póster. **_Nanopartículas Fotoactivas Eficientes Para El Tratamiento De Patógenos Asociados A Mastitis Bovina.** Autores: Sosa-Lochedino AL, Martínez S, Ibarra LE, Caverzan M, Aiassa V, Bohl L, Porporatto C, Chesta CA, Palacios RE. XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (NANO 2022). Presentación oral. **Nanopartículas de Polímeros Conjugados como Sonosensibilizadores en la Inactivación Sonodinámica de Microorganismos.** Autores: Martinez S, Odella E, Sosa Lochedino AL, Wendel A, Ibarra LE, Durantini A, Chesta CA, Palacios RE. XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (NANO 2022). Presentación oral.