

**Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Química**

**Desarrollo de nanocompuestos
magnéticos de CoFe_2O_4 -Au para terapia
híbrida
magnética y fotodinámica**

Para obtener el título de

Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

M.N.M. Jesús Alberto Lozano López

Comité tutorial

Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez (Tutora)

Dr. Mario Eduardo Cano González (Cotutor)

Dr. Javier Ventura Juárez (Asesor)

CARTA DE VOTO APROBATORIO

Decano del Centro de Ciencias Básicas
M. en C. Guillermo Domínguez Aguilar

PRESENTE

Por medio del presente como **ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ** designado del estudiante **JESÚS ALBERTO LOZANO LÓPEZ** con ID 123244 quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS DE COFe₂O₄-AU PARA TERAPIA HÍBRIDA MAGNÉTICA Y FOTODINÁMICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de 01 de 2026.



Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Decano del Centro de Ciencias Básicas
M. en C. Guillermo Dominguez Aguilar

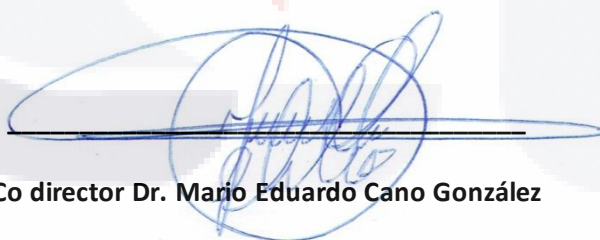
PRESENTE

Por medio del presente como **MARIO EDUARDO CANO GONZÁLEZ** designado del estudiante **JESÚS ALBERTO LOZANO LÓPEZ** con ID 123244 quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS DE COFe₂O₄-AU PARA TERAPIA HÍBRIDA MAGNÉTICA Y FOTODINÁMICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de 01 de 2026.



Co director Dr. Mario Eduardo Cano González

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

CARTA DE VOTO APROBATORIO

Decano del Centro de Ciencias Básicas
M. en C. Guillermo Dominguez Aguilar

PRESENTE

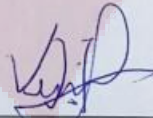
Por medio del presente como **JAVIER VENTURA JUÁREZ** designado del estudiante **JESÚS ALBERTO LOZANO LÓPEZ** con ID 123244 quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE NANOCOMPÓSITOS MAGNÉTICOS DE COFe₂O₄-AU PARA TERAPIA HÍBRIDA MAGNÉTICA Y FOTODINÁMICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de 01 de 2026.



Asesor de tesis Dr. Javier Ventura Juárez

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Dictamen de liberación académica



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA
PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación (dd/mm/aaaa): 03/03/2026

NOMBRE: Jesús Alberto Lozano López ID 123244

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional LGAC (del posgrado): Química y Biorremediación

MODALIDAD DEL PROYECTO DE GRADO: Tesis (X) *Tesis por artículos científicos () **Tesis por Patente () Trabajo Práctico ()

TÍTULO: Desarrollo de nanocompuestos magnéticos de COFE2O4-AU para terapia híbrida magnética y fotodinámica

Se desarrollaron nanocompuestos magnéticos, diseñados para generar una terapia combinada contra el cáncer basada en hipertermia magnética y terapia fotodinámica. Este trabajo presenta un carácter novedoso ya que hasta la fecha de redacción de esta carta no se encontraron reportes similares al material diseñado, así como de la aplicación en conjunto de ambas terapias propuestas. Esto resulta de gran importancia, ya que se presentan alternativas, con evidencias científicas, de tratamientos al cáncer coadyuvantes a la quimioterapia y radioterapia. El desarrollo y avance de estos tratamientos permitirá combatir la enfermedad en el paciente, así como mejorar la calidad de vida evitando los efectos secundarios que las terapias clásicas suelen presentar.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SEGÚN CORRESPONDA: SI, NO, NA (No Aplica)

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Posgrados
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial
NA	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario (En caso de que corresponda)
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU de la SECHTI actualizado
SI	Tiene el o los artículos aceptados o publicados y cumple con los requisitos institucionales (en caso de que proceda)
*En caso de Tesis por artículos científicos publicados (completar solo si la tesis fue por artículos)	
	Aceptación o Publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto según el nivel del programa
	El (la) estudiante es el primer autor(a)
	El (la) autor(a) de correspondencia es el Director (a) del Núcleo Académico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
**En caso de Tesis por Patente	
	Cuenta con la evidencia de solicitud de patente en el Departamento de Investigación (anexarla al presente formato)

Con base en estos criterios, se autoriza continuar con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI ☒ No ☐

FIRMAS

Elaboró:

*NOMBRE Y FIRMA DEL(LA) CONSEJERO(A) SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dr. Gilberto Alejandro Ocasio Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NA de la LGAC correspondiente distinto al director o miembro del comité tutorial, aprobado por el Decano.

NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE POSGRADO: Dr. Gilberto Alejandro Ocasio Acosta

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Iliana Ernestina Medina Ramírez

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: Mtro. Guillermo Domínguez Aguilar

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 24 fracción V del Reglamento General de Posgrado, que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Proponer criterios y mecanismos de selección, permanencia, ingreso y titulación de estudiantes para asegurar la eficiencia terminal y la titulación y el Art. 28 fracción IX, atender, asesorar y dar el seguimiento del estudiante desde su ingreso hasta su titulación.

Elaborado por: D. Apoyo al Posgrado
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SE-FO-15
Actualización: 02
Emisión: 12/08/25

Comprobante de la publicación

18/3/26, 20:06

Gmail - [IJMS] Manuscript ID: ijms-3776898 - Accepted for Publication



Alberto Lozano <albertolozano93@gmail.com>

[IJMS] Manuscript ID: ijms-3776898 - Accepted for Publication

1 mensaje

IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>

4 de agosto de 2025 a las 2:18

Responder a: Bob Liu <bob.liu@mdpi.com>, IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>

Para: "Iliana E. Medina-Ramirez" <iemedina@correo.uaa.mx>

Cc: Alberto Lozano-Lopez <albertolozano93@gmail.com>, Mario Eduardo Cano-González <mario.cano@academicos.udg.mx>, Javier Ventura-Juarez <javier.ventura@edu.uaa.mx>, Martín Humberto Muñoz-Ortega <martinenol@hotmail.com>, Israel Betancourt <sraelb@unam.mx>, Juan Antonio Zapien <apjazzs@cityu.edu.hk>, IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>, Bob Liu <bob.liu@mdpi.com>

Dear Professor Medina-Ramirez,

Congratulations on the acceptance of your manuscript, and thank you for submitting your work to IJMS. Please see the relevant manuscript details below:

Manuscript ID: ijms-3776898

Type of manuscript: Article

Title: Evaluation of CoFe₂O₄-L-Au (L: Citrate, glycine) as superparamagnetic-plasmonic nanocomposites for enhanced cytotoxic activity towards oncogenic (A549) cells.

Authors: Alberto Lozano-Lopez, Mario Eduardo Cano-González, Javier Ventura-Juarez, Martín Humberto Muñoz-Ortega, Israel Betancourt, Juan Antonio Zapien, Iliana E. Medina-Ramirez *

Received: 9 Jul 2025

E-mails: albertolozano93@gmail.com, mario.cano@academicos.udg.mx, javier.ventura@edu.uaa.mx, martinenol@hotmail.com, sraelb@unam.mx, apjazzs@cityu.edu.hk, iemedina@correo.uaa.mx Molecular Nanoscience

https://www.mdpi.com/journal/ijms/sections/molecular_nanoscience Toxicity of Nanoparticles: Second Edition

https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/6JC7EZMAJ7

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/0e8755a11b9a1c0d88937eae2bc32e78

We will now edit your paper; once complete, we will return it to you for your review and approval. Within the next few days, an invoice for the article processing charge (APC), required for publication, will be sent by email from the Editorial Office in Basel, Switzerland.

If, however, your manuscript requires extensive English language and grammar revisions, we will need to return the paper and request that such changes are made.

We encourage you to set up a profile on SciProfiles.com, MDPI's researcher network platform. Articles you publish with MDPI will be linked to your SciProfiles page, where your colleagues and peers will be able to see all of your publications, citations, and other academic contributions.

Lastly, MDPI is pleased to announce the launch of our Academic Video Service, which aims to enhance the visibility of our journals' manuscripts. This comprehensive service includes professional scriptwriting, animation design, and strategic promotion. To celebrate the launch of this service, we would like to offer you a limited-time promotional discount. For further information and to see examples of Academic Videos we have created, please visit https://encyclopedia.pub/video_service.

Kind regards,

Maurizio Battino Editor-in-Chief [https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=9f82ecf1ef&view=pt&search=all&permthid=thread-](https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=9f82ecf1ef&view=pt&search=all&permthid=thread-f1839512170733166205&siml=msg-f:1839512170733166205)



Evaluation of CoFe₂O₄-L-Au (L: Citrate, Glycine) as Superparamagnetic–Plasmonic Nanocomposites for Enhanced Cytotoxic Activity Towards Oncogenic (A549) Cells

Alberto Lozano-López; Mario E. Cano-González; J. Ventura-Juárez; Martín H. Muñoz-Ortega; Israel Betancourt; Juan Antonio Zapien; Iliana E. Medina-Ramírez

Int. J. Mol. Sci. **2025**, Volume 26, Issue 16, 7732



Article

Evaluation of CoFe₂O₄-L-Au (L: Citrate, Glycine) as Superparamagnetic–Plasmonic Nanocomposites for Enhanced Cytotoxic Activity Towards Oncogenic (A549) Cells

Alberto Lozano-López ¹, Mario E. Cano-González ², J. Ventura-Juárez ³, Martín H. Muñoz-Ortega ¹, Israel Betancourt ⁴, Juan Antonio Zapien ^{5,*} and Iliana E. Medina-Ramírez ^{1,*}

¹ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av.

Universidad # 940, Aguascalientes C.P. 20100, Aguascalientes, Mexico; albertolozano93@gmail.com (A.L.-L.); martinol@hotmail.com (M.H.M.-O.)

² Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad #1115, Col. Linda Vista, Ocotlán C.P. 47810, Jalisco, Mexico; mario.cano@academicos.udg.mx

³ Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad #940, Aguascalientes C.P. 20100, Aguascalientes, Mexico; javier.ventura@edu.uaa.mx

⁴ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City C.P. 04510, Mexico; israelb@unam.mx

⁵ Department of Materials Science and Engineering, City University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China

* Correspondence: apjazz@cityu.edu.hk (J.A.Z.); imedina@correo.uaa.mx (I.E.M.-R.)

Abstract

We investigated the influence of gold deposition on the magnetic behavior, biocompatibility, and bioactivity of CoFe₂O₄ (MCF) nanomaterials (NMs) functionalized with sodium citrate (Cit) or glycine (Gly). The resulting multifunctional plasmonic nanostructured materials (MCF-Au-L, where L is Cit, Gly) exhibit superparamagnetic behavior with magnetic saturation of 59 emu/g, 55 emu/g, and 60 emu/g, and blocking temperatures of 259 K, 311 K, and 322 K for pristine MCF, MCF-Au-Gly, and MCF-Au-Cit, respectively. The MCF NMs exhibit a small uniform size (with a mean size of 7.1 nm) and an atomic ratio of Fe:Co (2:1). The gold nanoparticles (AuNPs) show high heterogeneity as determined by high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The UV-Vis spectroscopy of the composites reveals two localized surface plasmons (LSPs) at 530 nm and 705 nm, while Fourier Transformed-Infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) confirm the presence of Cit and Gly on their surface. Subsequent biocompatibility tests confirm that MCF-Au-L NMs do not exert hemolytic activity (hemolysis < 5%). In addition, the CCK-8 viability assay tests indicate the higher sensitivity of cancerous cells (A549) to the photoactivity of MCF-Au compared to healthy Detroit 548 (D548) cell lines. We use advanced microscopy techniques, namely atomic force, fluorescence, and holotomography microscopies (AFM, FM, and HTM, respectively) to provide further insights into the nature of the observed photoactivity of MCF-Au-L NMs. In addition, in situ radiation, using a modified HTM microscope with an IR laser accessory, demonstrates the photoactivity of the MCF-Au NMs and their suitability for destroying cancerous cells through photodynamic therapy. The combined imaging capabilities demonstrate clear morphological changes, NMs internalization, and oxidative damage. Our results confirm that the fabricated multifunctional NMs exhibit high stability in aqueous solution, chemical solidity, superparamagnetic behavior, and effective IR responses, making them promising precursors for hybrid cancer therapy.

Academic Editor: Antonella Piozzi

Received: 9 July 2025

Revised: 30 July 2025

Accepted: 4 August 2025

Published: 10 August 2025

Citation: Lozano-López, A.; Cano-González, M.; Ventura-Juárez, J.; Muñoz-Ortega, M.H.; Betancourt, I.; Zapien, J.A.; Medina-Ramírez, I.E. Evaluation of CoFe₂O₄-L-Au (L: Citrate, Glycine) as Superparamagnetic–Plasmonic Nanocomposites for Enhanced Cytotoxic Activity Towards Oncogenic (A549) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7732. <https://doi.org/10.3390/ijms26167732>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Créditos Institucionales

Agradezco a los mexicanos en general que con sus impuestos se generaron los recursos para financiar este proyecto mediante el organismo CONACYT. Así mismo, reconozco el apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de Aguascalientes para la realización de este proyecto.



Agradecimientos

A todas las personas involucradas en este proyecto, a todas las que se cruzaron en mi camino y me tendieron la mano, mil gracias por su ayuda



Dedicatorias

Esto quiero dedicarlo a mi esposa Khiabet, quien siempre se mantuvo a mi lado en todo momento y en cada dolor y obstáculo que se ha presentado. También quiero dedicarme este pequeño verso para recordarme de vez en cuando, cree en ti...



ÍNDICE

Listado de tablas e imágenes	3
Listado de abreviaciones	7
Resumen	9
Abstract	10
Hipótesis y objetivos	11
Capítulo 1. Marco teórico	12
1.1 El cáncer	12
1.2 Las terapias contra el cáncer	14
1.3 Los nanomateriales como herramientas contra el cáncer	15
1.3.1 Los nanocompuestos: composición, propiedades y funciones	15
1.4 Diseño del nanocompuesto magnético	16
1.4.1 CoFe_2O_4 (Superparamagnético) como componente del NCM	16
1.4.2 Nanopartículas de Au como componente del NCM	19
1.4.3 CoFe_2O_4 y las AuNP como nanocompuesto magnético	21
Capítulo 2. Antecedentes	24
2.1 Terapia hipotérmica magnética	24
2.1.1 Estado actual de su implementación	27
2.2 Terapia fotodinámica	28
2.2.1 Estado actual de su implementación	29
2.3 Terapia híbrida: hipertermia y fotodinámica en conjunto	30
Capítulo 3. Metodología	31
3.1 Síntesis de CoFe_2O_4	31
3.2 Funcionalización de las nanopartículas de CoFe_2O_4	32
3.3 Síntesis de nanopartículas de Au	32
3.4 Síntesis de CoFe_2O_4 -Cit-Au y CoFe_2O_4 -Gly-Au	33
3.5 Caracterización de materiales	33
3.6 Prueba de hemólisis	34
3.6.1 Hemólisis con luz infrarroja	35
3.7 Líneas celulares	36
3.8 Pruebas de viabilidad CCK-8	36
3.9 Pruebas de generación de ROS	37
3.10 Microscopía de fuerza atómica	38
3.11 Microscopía holotomográfica	39
3.12 Parámetros estadísticos	39
Capítulo 4. Resultados y discusiones	40
4.1 Síntesis de materiales	40
4.2 Caracterización de los materiales	43
4.2.1 Microscopía de transmisión de alta resolución /Espectroscopía de difracción de electrones/ Espectroscopía de difracción de electrones por rayos X	43

4.2.2 Difracción de rayos X	50
4.2.3 Espectrofotometría UV-Vis	51
4.2.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier	53
4.2.5 Análisis termogravimétrico	55
4.2.6 Magnetometría vibracional de la muestra	57
4.2.7 Pruebas de calorimetría magnética	60
4.2.8 Análisis de dispersión dinámica de la luz	62
4.3 Pruebas biológicas	64
4.3.1 Pruebas de hemólisis	64
4.3.2 Producción de ROS	66
4.3.3 Análisis de viabilidad CCK-8	73
4.4 Análisis por técnicas de microscopía avanzada	76
4.4.1 Microscopía de fuerza atómica	76
4.4.2 Microscopía holotomográfica	80
4.5 Protocolos para hipertermia magnética y fotodinámica	87
Capítulo 5. Conclusiones	89
Bibliografía	90
Capítulo 6. Anexos	100
6.1 Metodología de respuesta de superficie	100
6.2 Síntesis de nanobarras de Au	105
6.3 Cálculos demostrativos	109
6.4 Pruebas de estabilidad coloidal	112
6.5 Pruebas de fototerapia inducida por luz IR	115

Listado de tablas e imágenes

Tabla 1. Características diferenciales de una neoplasia maligna y benigna	12
Tabla 2. Clasificación de los nanomateriales magnéticos	17
Tabla 3. Cantidades y concentraciones a las que se realizó la prueba de hemólisis	34
Tabla 4. Distancias interplanares calculadas de la CoFe_2O_4 a partir del análisis SAED de la Imagen 50	48
Tabla 5. Distancias interplanares calculadas de la CoFe_2O_4 -Cit-Au a partir del análisis SAED de la Imagen 51	49
Tabla 6. Distancias interplanares calculadas de la CoFe_2O_4 -Gly-Au a partir del análisis SAED de la Imagen 52	49
Tabla 7. Posición de las reflexiones obtenidas por DRX para la CoFe_2O_4 y de la carta cristalográfica JCPDS No. 20-1086	50
Tabla 8. Resultados de la prueba TGA para cada nanomaterial sintetizado	56
Tabla 9. Resultados de la prueba de calorimetría a campo magnético variable	60
Tabla 10. Resultados del análisis DLS para la CoFe_2O_4 en ferrufluido de GA 3%	62
Tabla 11. Resultados del análisis DLS para la CoFe_2O_4 -Gly-Au en ferrufluido de GA 3%	65
Tabla 12. Resultados del análisis DLS para la CoFe_2O_4 -Cit-Au en ferrufluido de GA 3%	75
Tabla 13. Promedio de los porcentajes de hemólisis de las concentraciones usadas	82
Tabla 14. Resultados de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y ambas líneas celulares	86
Imagen 1. Proceso de evolución de las neoplasias hasta convertirse en cáncer	12
Imagen 2. Estadísticas de incidencia de los tipos de cáncer en México de acuerdo con GLOBOCAN basadas en el sexo del individuo.	13
Imagen 3. Ejemplos de tipos de cáncer.	13
Imagen 4. Ejemplos de los tipos de terapias para combatir el cáncer	14
Imagen 5. Ejemplos de nanomateriales.	15
Imagen 6. Estructura cristalina de la espinela.	16
Imagen 7. Ejemplos de clasificación de los nanomateriales magnéticos en función del momento magnético.	17
Imagen 8. Ejemplos de aplicaciones en el campo biomédico de las nanopartículas magnéticas.	18
Imagen 9. Ejemplificación del comportamiento dinámico de la hipertermia.	19
Imagen 10. Estructura cristalina ccc del Au y esquema de distintas nanopartículas de Au.	19
Imagen 11. Representación de las excitaciones de los electrones de la banda de conducción en nanomateriales plasmónicos	20
Imagen 12. Representación de distintas maneras de diseño de la conjunción de CoFe_2O_4 con AuNP	21
Imagen 13. Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.	22
Imagen 14. Funcionamiento del microscopio holotomográfico.	22
Imagen 15. Desarrollo de los distintos modos de funcionamiento a lo largo del tiempo de la microscopía de fuerza atómica.	23
Imagen 16. Distintas modalidades de inducción de la hipertermia a través del tiempo.	24
Imagen 17. Esquema de la hipertermia basada en nanopartículas magnéticas.	24
Imagen 18. Efectos de la hipertermia en las membranas celulares y organelos membranosos.	25
Imagen 19. Esquema representativo de la hipertermia a nivel celular cuando las proteínas se desnaturalizan y pierden su función llevando a la muerte celular.	25
Imagen 20. Efecto de la hipertermia en las células cancerígenas en conjunto de la quimioterapia, se mencionan las diferentes maneras en que se generan las ROS y con esto, la apoptosis.	26
Imagen 21. Ejemplos de tipos de terapia de hipertermia.	27
Imagen 22. Productos y equipos diseñados por la compañía MagForce	27

Imagen 23. Representación de la metodología general de la TFD.	28
Imagen 24. Representación de la actividad de los ROS en función de su concentración	28
Imagen 25. Representación de una célula cancerígena con capacidad regulatoria de los ROS	29
Imagen 26. Representación de las múltiples terapias y tratamientos que pueden ejercer los nanomateriales de manera conjunta a las terapias clásicas.	30
Imagen 27. Diagrama general de la síntesis solvotérmica de nanopartículas de CoFe_2O_4 activada por microondas	31
Imagen 28. Funcionalización de las NP de CoFe_2O_4 con citrato	32
Imagen 29. Representación de la ruta de síntesis de las AuNP	32
Imagen 30. Representación de la metodología de síntesis de CoFe_2O_4 -Cit-Au	33
Imagen 31. Representación de la prueba de hemólisis.	34
Imagen 32. Esquema de la metodología de hemólisis con luz IR para determinar el aumento de la citotoxicidad	35
Imagen 33. Esquema de la metodología de la prueba de viabilidad celular con CCK-8 y TFD	36
Imagen 34. Representación del protocolo de detección de ROS usando la sonda fluorescente MitoSOX Green	37
Imagen 35. Representación de la metodología de preparación de cultivos celulares para ser observados por medio del microscopio de fuerza atómica	38
Imagen 36. Imágenes del microscopio de fuerza atómica <i>Bruker, Dimension Edge</i> usado para los análisis microscópicos.	38
Imagen 37. Representación de la metodología de preparación de muestras en <i>tomodishes</i> para el microscopio holotomográfico	39
Imagen 38. Imágenes de la instrumentación para microscopía holotomográfica.	39
Imagen 39. CoFe_2O_4 sintetizado por la ruta solvotérmica activada por microondas	40
Imagen 40. CoFe_2O_4 funcionalizado con las moléculas orgánicas	41
Imagen 41. Síntesis de AuNP usando Cit y H_2O_2	42
Imagen 42. Micrografías obtenidas por MTAR en campo claro de la CoFe_2O_4	43
Imagen 43. Histograma de distribución de tamaño de partícula de la CoFe_2O_4	43
Imagen 44. Espectro EDX obtenido de la CoFe_2O_4 .	44
Imagen 45. Micrografías obtenidas por MTAR en campo claro de NCMCit	45
Imagen 46. Histograma de distribución del tamaño de partícula de las AuNP de la imagen 46A	45
Imagen 47. Análisis EDX de la zona referida en la imagen 45A como “eds 1”	46
Imagen 48. Análisis EDX de la zona referida en la imagen 45 como “eds 2”	46
Imagen 49. Micrografías obtenidas por MTAR en campo claro de NCMGly	47
Imagen 50. Análisis EDX del material nanoestructurado CoFe_2O_4 -Gly-Au	47
Imagen 51. Espectro de anillos obtenido por la técnica de difracción de electrones de: a) CoFe_2O_4 b) CoFe_2O_4 -Cit-Au c) CoFe_2O_4 -Gly-Au	48
Imagen 52. Espectro de difracción de rayos X	50
Imagen 53. Espectros obtenidos por la técnica de UV-Vis	52
Imagen 54. Espectro EITF de CoFe_2O_4	53
Imagen 55. Espectro EITF de las NP de CoFe_2O_4 -Cit	54
Imagen 56. Espectro EITF de las NP de CoFe_2O_4 -Gly	54
Imagen 57. Curva termogravimétrica (ATG) y la respectiva derivada (DATG) de los materiales sintetizados.	55
Imagen 58. Curvas de histéresis magnética	57
Imagen 59. Curva de magnetización en función de la temperatura con enfriamiento a campo cero (ECC) y enfriamiento con campo aplicado (CA)	57
Imagen 60. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de la CoFe_2O_4 pristina	58
Imagen 61. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de NCMCit	59

Imagen 62. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de NCMGly	59
Imagen 63. Imagen de los resultados de la prueba de calorimetría magnética.	61
Imagen 64. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para CoFe_2O_4	63
Imagen 65. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-GlyAu}$	63
Imagen 66. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-GlyAu}$	63
Imagen 67. Fotografías del experimento de hemólisis.	64
Imagen 68. Resultados de la prueba de hemólisis con irradiación de luz IR (Rad) y sin irradiación de luz IR (NR)	65
Imagen 69. CoFe_2O_4 prístino irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG	67
Imagen 70. NCMCit irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG	67
Imagen 71. NCMGly irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG	67
Imagen 72. Micrografías de los controles de la línea D548 irradiados por 10 min con luz IR	68
Imagen 73. Micrografías de los controles de la línea A549 irradiados por 10 min con luz IR	68
Imagen 74. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea D548 con NCMGly por irradiación de luz IR.	69
Imagen 75. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea D548 con NCMCit por irradiación de luz IR.	70
Imagen 76. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea A549 con NCMGly por irradiación de luz IR.	71
Imagen 77. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea A549 con NCMCit por irradiación de luz IR.	72
Imagen 78. Fotografía de la irradiación de luz IR en el ensayo de citotoxicidad CCK-8.	73
Imagen 79. Resultados de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y la línea A549	74
Imagen 80. Resultados de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y la línea Detroit 548	74
Imagen 81. Célula control A549 obtenida por MFA	77
Imagen 82. Células A549 sometidas a interacción con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$.	77
Imagen 83. Célula control D548 obtenida por MFA.	78
Imagen 84. Células D548 sometidas a interacción con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$.	79
Imagen 85. Células D548 sometidas a interacción con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$.	79
Imagen 86. Escala de los IR de los organelos celulares eucariontes.	80
Imagen 87. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 control.	81
Imagen 88. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 control.	81
Imagen 89. A) Micrografía en campo claro de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$	83
Imagen 90. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$.	83
Imagen 91. A) Micrografía en campo claro de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$	84
Imagen 92. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$.	84
Imagen 93. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR	84
Imagen 94. Micrografía holotomográfica tridimensional (de la imagen 93) de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR	85
Imagen 95. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR y daño celular.	85
Imagen 96. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR y daño celular.	86
Imagen 97. Metodología propuesta por Duval K. et al. (2020) para cultivos celulares e hipertermia magnética a microescala.	88

Tabla A1. Condiciones experimentales generadas por el software Minitab junto con los resultados obtenidos del segundo plasmón superficial de cada corrida	101
Tabla A2. Resumen de las condiciones experimentales generadas por Minitab para la síntesis de las AuNP	101
Tabla A3. Imágenes de la prueba de estabilidad coloidal respecto al tiempo.	113
Tabla A4. Resultados en grados Celsius de las pruebas fototérmicas.	115
Imagen A1. Esquema representativo del modelo de DCC y cálculo del grado de confianza α	101
Imagen A2. Gráfico de los espectros UV-Vis de las distintas corridas generadas por Minitab®	102
Imagen A3. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de las variables usadas en MSR	103
Imagen A4. Gráfica de contorno bidimensional de MSR	104
Imagen A5. Gráfico de superficie de respuesta de la síntesis de las AuNP	104
Imagen A6. Representación de los modos en los que se presenta el PRS en función de la morfología.	105
Imagen A7. Esquema de la metodología principal propuesta por J. Murphy (2004)	105
Imagen A8. Esquema de la síntesis de AuNB por Sunghoo Yoo et al. (2002)	106
Imagen A9. Espectro UV-Vis de las nanobarras usando la síntesis de Sunghoon Yoo et al. (2022) sin modificaciones	106
Imagen A10. Espectro UV-Vis de las nanobarras usando la síntesis de Sunghoon Yoo et al. (2022) modificada	107
Imagen A11. Espectro UV-vis de las nanobarras en condiciones de temperatura distintas.	107
Imagen A12. Espectro UV-vis de las nanobarras sintetizadas, después de 3 ciclos de lavado y 24 h de reposo	108
Imagen A13. Resultados de la prueba de hemólisis con y sin aplicación de la TFD.	108
Imagen A14. Imágenes del diseño usado para los experimentos de fototermia.	115

Listado de abreviaciones

μ momento magnético

A549 Línea celular A549

Abs Absorbancia

acac Co Acetilacetato de Cobalto

acac Fe Acetilacetato de Hierro

ATG Análisis termogravimétrico

AuNB Nanobarras de Oro

AuNP Nanopartículas de Oro

CA Campo aplicado

CC Campo claro

ccc Cúbica centrada en las caras

CCK-8 Kit de conteo celular

Cit Citrato de sodio

CoFe₂O₄-Cit CoFe₂O₄ funcionalizado con Citrato de sodio

CoFe₂O₄-Gly CoFe₂O₄ funcionalizado con Glicina

CTAB Bromuro de cetiltrimetilamonio

D548 Línea celular Detroit 548

DATG Derivada del análisis termogravimétrico

DCC Diseño de Compósito Central

DRX Difracción de rayos X

ECC Enfriamiento a campo cero

EDE *Espectroscopía de difracción de electrones*

EDX *Espectroscopía de difracción de electrones por rayos X*

EITF Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier

FL Fluorescencia

Gly Glicina

HTM Terapia de hipertermia magnética

IR Luz infrarroja

k_B Constante de Boltzmann

MEB Microscopía electrónica de barrido

MFA Microscopía de fuerza atómica

MRS Metodología de Respuesta de Superficie

MHT Microscopía holotomográfica

M_s Saturación magnética

MSG Sonda fluorescente MitoSOX Green

MTAR Microscopía de transmisión de alta resolución

NCM Nanocompuestos magnéticos

NCMCit Nanocompuesto magnético de CoFe₂O₄-Citrato-Au

NCMGly Nanocompuesto magnético de CoFe₂O₄-Glicina-Au

NP Nanopartícula

NR No irradiación con luz infrarroja

PRS Plasmón de resonancia superficial

PZ Valor promedio Z

Rad Irradiación con luz infrarroja
ROS Especies reactivas de oxígeno
SFB Suero fetal bovino
SODS Súper óxido dismutasa
SSF Solución salina fisiológica
TAE Tasa de absorción térmica
T_c Temperatura de Curie
TFD Terapia fotodinámica
U.A. Unidades adimensionales
UV-Vis Espectrofotometría por luz UV y visible
V_{MNP} Volumen de la nanopartícula magnética
VSM Magnetometría vibracional de la muestra
η Viscosidad del medio
τ_o Tiempo aproximado de cambio angular de μ

RESUMEN

Este trabajo propone el desarrollo de nanocompuestos magnéticos híbridos compuestos por CoFe_2O_4 y nanopartículas de oro (AuNP), diseñados para generar una terapia combinada contra el cáncer: hipertermia magnética (THM) y terapia fotodinámica (TFD). El marco teórico parte de una revisión crítica sobre el cáncer como enfermedad multifactorial, las limitaciones de las terapias convencionales (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, cirugía) y el potencial de los nanomateriales como herramientas más específicas, menos invasivas y con menor toxicidad sistémica.

Se profundiza en las propiedades fisicoquímicas del CoFe_2O_4 como óxido metálico superparamagnético y de las AuNP como materiales plasmónicos capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante excitación por luz infrarroja. La sinergia entre ambos componentes busca inducir daño celular localizado en células cancerígenas, aprovechando tanto el calentamiento por campos magnéticos como la generación de ROS por activación óptica.

La metodología incluyó la síntesis de nanopartículas de CoFe_2O_4 mediante ruta solvotérmica activada por microondas, su funcionalización con citrato o glicina para mejorar la estabilidad coloidal, y la incorporación de AuNP mediante protocolos controlados. Se caracterizaron los materiales con técnicas avanzadas como DRX, TEM, VSM, UV-Vis, FTIR y TGA. Posteriormente se evaluó su biocompatibilidad mediante pruebas de hemólisis, producción de ROS, viabilidad celular (CCK-8), y se aplicaron microscopía de fuerza atómica y holotomografía para observar interacciones subcelulares.

Los resultados demostraron que: los nanocompuestos mostraron propiedades superparamagnéticas y plasmónicas activas en la primera ventana biológica (700–1000 nm), alta estabilidad coloidal, y capacidad de generar ROS al ser irradiados con luz IR. Se observó una clara disminución en la viabilidad celular en líneas A549 (cáncer de pulmón) y D548 (fibroblastos), especialmente cuando se aplicó la terapia fotodinámica. Las imágenes microscópicas revelaron internalización segura de los nanomateriales y signos morfológicos de apoptosis y necroptosis inducidas por el tratamiento.

Las conclusiones más relevantes son: (1) los nanocompuestos diseñados son seguros y eficientes para inducir muerte celular en modelos cancerígenos; (2) la terapia fotodinámica mejora significativamente la citotoxicidad sin afectar células sanas; (3) se establecieron protocolos in vitro que podrían escalarse a modelos clínicos; y (4) se abre la posibilidad de usar estos materiales como plataforma base para tratamientos antineoplásicos más dirigidos y menos invasivo

ABSTRACT

This study presents the development of hybrid magnetic nanocomposites composed of cobalt ferrite (CoFe_2O_4) and gold nanoparticles (AuNPs), designed to enable a dual cancer therapy approach: magnetic hyperthermia (MHT) and photodynamic therapy (PDT). The theoretical framework critically examines cancer as a multifactorial disease and highlights the limitations of conventional treatments—chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, and surgery—while emphasizing the promise of nanomaterials as targeted, minimally invasive, and systemically safer alternatives.

The work explores the physicochemical properties of CoFe_2O_4 , a superparamagnetic metal oxide, and AuNPs, known for their plasmonic behavior and ability to generate reactive oxygen species (ROS) upon near-infrared (NIR) light excitation. The synergy between these components aims to induce localized cytotoxicity in cancer cells through both thermal and oxidative stress mechanisms.

Nanoparticles were synthesized via a microwave-assisted solvothermal route, followed by surface functionalization with citrate and glycine to enhance colloidal stability. AuNPs were subsequently incorporated using controlled protocols. Comprehensive characterization was performed using XRD, TEM, VSM, UV-Vis, FTIR, and TGA. Biocompatibility and therapeutic potential were assessed through hemolysis assays, ROS generation, cell viability (CCK-8), and advanced imaging techniques, including atomic force microscopy and holotomography.

Results demonstrated that the nanocomposites exhibit superparamagnetic behavior and plasmonic activity within the first biological window (700–1000 nm), with high colloidal stability and efficient ROS generation under NIR irradiation. Significant reductions in cell viability were observed in A549 (lung cancer) and D548 (fibroblast) lines, particularly under photodynamic therapy conditions. Microscopy revealed safe internalization of the nanomaterials and morphological indicators of apoptosis and necroptosis.

Key conclusions include: (1) the nanocomposites are safe and effective in inducing cancer cell death; (2) the hybrid therapy significantly enhances cytotoxicity while sparing healthy cells; (3) robust in vitro protocols were established with potential for clinical translation; and (4) the materials offer a promising platform for targeted, non-invasive anticancer therapies.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Los nanocompuestos magnéticos de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Au}$ propuestos poseen carácter superparamagnético y plasmónico, lo que les proporciona la habilidad de responder a un estímulo magnético para liberar calor al medio y a un estímulo luminoso para generar especies reactivas de oxígeno. Además, estos nanocompuestos son seguros y eficientes para ser propuestos como plataformas para tratamientos adyuvantes a las terapias antineoplásicas actuales con la finalidad de reducir los tiempos de tratamiento y con ello, los efectos secundarios que estos suelen conllevar.

Objetivo

Sintetizar, caracterizar y evaluar mediante pruebas toxicidad celular la actividad de los nanomateriales magnéticos para la aplicación de terapia hipertérmica magnética y fotodinámica, como complemento a los tratamientos contra el cáncer.

Objetivos particulares

1. Sintetizar las nanopartículas (NP) de CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ empleando una ruta solvotérmica activada por microondas
2. Caracterizar los nanomateriales mediante técnicas de SEM, TEM, DRX, VSM, EITF, TGA y DLS
3. Evaluar el índice de absorción específico (SAR) de los NMMs
4. Evaluar la bioactividad de nanocompuestos empleando células A549 como modelo biológico.
5. Crear protocolos para optimizar variables de terapias i) magnética, ii) fotodinámica, iii) híbrida en células A549.

Capítulo 1. Marco teórico

1.1 El cáncer

El cáncer es una patología conocida y estudiada en el ámbito clínico y médico desde los inicios formales de la medicina. Se describe como la formación de neoplasias (tejidos autónomos con capacidad reproductiva exacerbada) a partir de células mutadas con capacidad de reproducirse de manera descontrolada e invadir otros tejidos dentro del individuo para continuar su ciclo (Imagen 1)¹. Esta enfermedad está ligada directamente a fenómenos como la hiperplasia y/o baja apoptosis, generando un crecimiento exacerbado de una región específica o de un tejido. Eventualmente, cuando las condiciones son óptimas, una o algunas células pertenecientes al tumor tratarán de migrar a distintas regiones u órganos para después formar nuevas neoplasias malignas (Tabla 1).

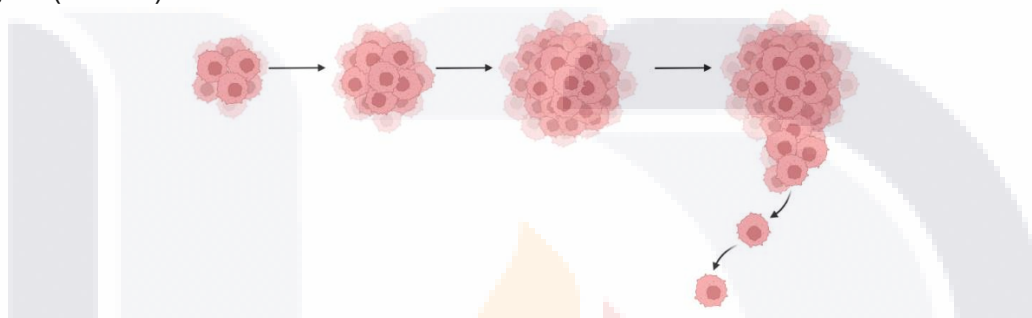


Imagen 1. Proceso de evolución de las neoplasias hasta convertirse en cáncer

Tabla 1. Características diferenciales de una neoplasia maligna y benigna. Para estudiar a las neoplasias se les ha clasificado en dos tipos; en función de sus características morfofisiológicas y biomoleculares

Características de neoplasias benignas	Características de neoplasias malignas
Usualmente encapsulado y no invasivo	No encapsulado e invasivo
Altamente diferenciado	Poco diferenciado
Poca mitosis	Mitosis relativamente común
Lento crecimiento	Crecimiento rápido
Poco o nula anaplasia	Con cierto nivel de anaplasias
No metástasis	Metástasis

Se han identificado distintos factores que influyen en la aparición de estas masas tumorales, pero no es posible atribuir a una sola razón la proliferación de las células neoplásicas. Sin embargo, de acuerdo con datos del 2022 del sitio web de GLOBOCAN, entre las principales causas ligadas al cáncer se encuentran el consumo de alcohol, obesidad, constante exposición a la luz UV y en menor medida, algunas infecciones. Además de esto, también se registra que es una enfermedad con altos índices de prevalencia mundial y elevada incidencia en México. Anualmente se registró un incremento de 207,154 nuevos casos (Imagen 2) de los cuales se pronostica una tasa de supervivencia menor al 50%, lo que hace a esta una enfermedad de alto riesgo. Por lo tanto, es una enfermedad de importancia para el país por sus niveles de mortalidad y reincidencia, además del gasto público que esto genera en el sector salud por los elevados costos de las terapias actuales y en las familias de los pacientes.

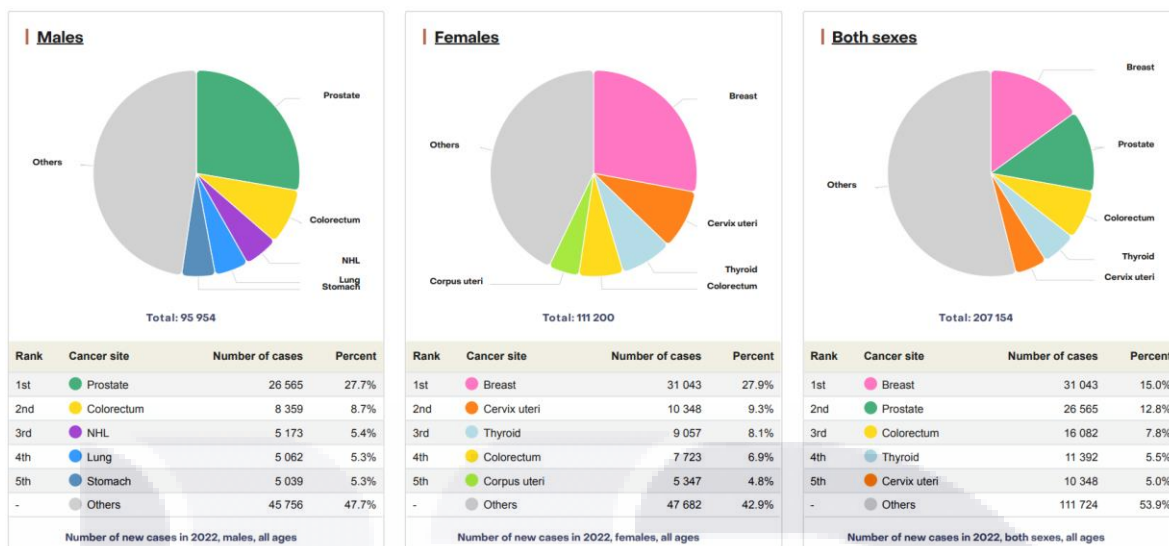


Imagen 2. Estadísticas de incidencia de los tipos de cáncer en México de acuerdo con GLOBOCAN basadas en el sexo del individuo. Imagen tomada de <https://gco.iarc.who.int>. De izquierda a derecha se muestran: estadísticas de machos, hembras y estadísticas en conjunto; asimismo, debajo se muestra en orden descendente el número de casos presentados de cada tipo de cáncer hasta 2022.

Por lo tanto, se deduce que el cáncer puede formarse en todos los órganos humanos, cambiando según la histología circundante (Imagen 3). Las neoplasias malignas se clasifican en epiteliales (como en epidermis, estómago, corteza adrenal, adenoma adrenocortical), hematopoyéticos y del sistema inmune (linfoma, sarcoma osteogénico, condrosarcoma) o en el sistema nervioso (glioblastoma multiforme, sarcoma meningeal)¹.

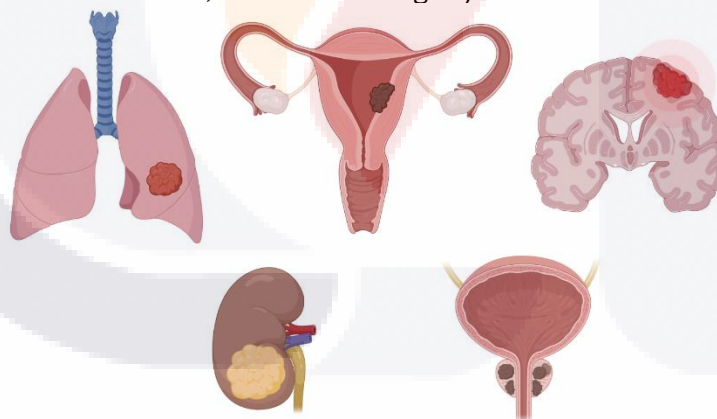


Imagen 3. Ejemplos de tipos y ubicaciones de cáncer. De izquierda a derecha; cáncer de pulmón, uterino, cerebral, renal y prostático

Un problema generalizado es que la sintomatología de los pacientes con cáncer inicialmente no es específica hasta que se agudiza en el órgano donde se ubica la neoplasia maligna y suele ser de síntomas muy generalizados. En algunos casos, ya en etapas avanzadas, surgen protuberancias visibles, por lo que su diagnóstico y combate son fundamentales en etapas iniciales.

1.2 Las terapias contra el cáncer

Actualmente hay variedad de técnicas empleadas para combatir o erradicar el cáncer. Sin embargo, cada una presenta complejidades en su aplicación, costos y/o efectos secundarios. Entre las más importantes a mencionar están (Imagen 4):

- **Quimioterapia:** Se describe como el uso de fármacos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer. La meta general es matar a las células tumorales o inhibir su proliferación y metástasis, sin embargo, en la mayoría de los casos estas terapias están limitadas por la incapacidad química de las moléculas usadas de distinguir entre el tejido sano y el tejido tumoral².
- **Radioterapia:** En esta modalidad se aplica radiación ionizante al paciente (Rayos X o rayos γ) para destruir masas tumorales, dañando el ADN o las moléculas importantes para las células³. Así también las radioterapias cargan con el mismo problema⁴, a pesar de haberse demostrado que los tumores disminuyen su volumen, logran generar efectos colaterales como daño agudo a la piel, dolores leves o agudos generalizados, fatiga, entre otros.
- **Inmunoterapia:** Esta terapia tiene como objetivo activar el sistema inmunológico del paciente para combatir las células cancerosas mediante la administración de fármacos inmunoestimulantes. No obstante, se pueden presentar efectos de resistencia a los fármacos, así como efectos secundarios sistémicos (desde pruritos e irritaciones hasta afectación grave de otros tejidos u órganos)⁵.
- **Cirugía:** Comúnmente considerada como la opción última para la remoción, la cirugía oncológica está enfocada en la extirpación del tumor y/o del tejido circundante. Sin embargo, existe un alto riesgo en estos procedimientos, ya que pueden causar que los tumores aceleren su crecimiento o la metástasis de células pertenecientes a este⁶.

Queda claro que los efectos colaterales son los principales problemas que presenta el diseño de estos tratamientos y es necesario recurrir a tecnologías o procesos alternativos para mitigarlos o intentar evitarlos.

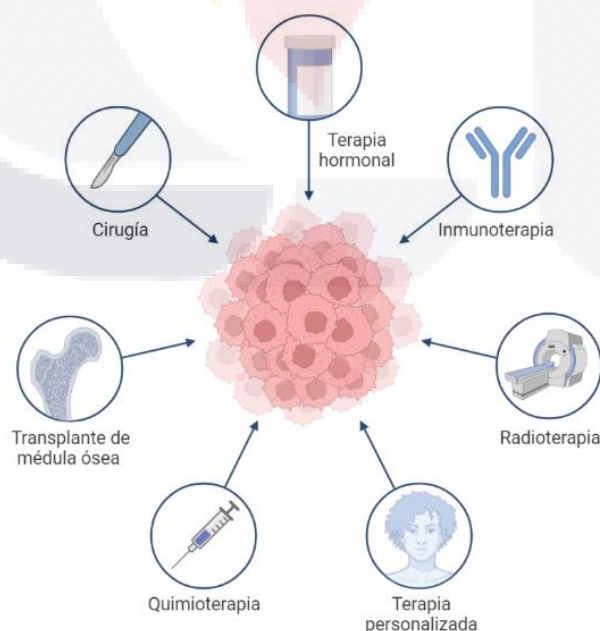


Imagen 4. Ejemplos de los tipos de terapias para combatir el cáncer

1.3 Los nanomateriales como herramientas contra el cáncer

La ciencia de los materiales define a los nanomateriales como aquellos en los que *por lo menos una de sus dimensiones se ubica en el rango de 1 a 100 nm aproximadamente*⁷. Debido a su tamaño, forma y composición estos materiales exhiben propiedades únicas y novedosas que pueden ser empleadas en distintos campos⁸. Con base en su composición química, se les clasifica como orgánicos (Dendrimeros, nanotubos de C, micelas, liposomas), inorgánicos (nanopartículas de Au, Ag, Cu, óxidos metálicos, ferritas y puntos cuánticos) o una mezcla de ambos (nanocompuestos y materiales nanoestructurados) (Imagen 5). Por lo tanto, se pueden encontrar nanomateriales en distintos campos como la electrónica⁹, los productos cosméticos¹⁰, la agricultura¹¹, la medicina¹² y otros.

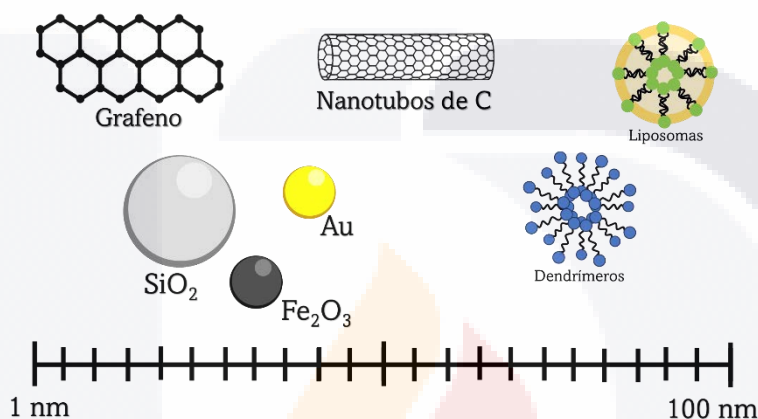


Imagen 5. Ejemplos de nanomateriales.

1.3.1 Los nanocompuestos: composición, propiedades y funciones

Los nanocompuestos son nanomateriales conformados de por lo menos dos materiales (y por lo menos uno de ellos está en la escala nanométrica), los cuales no están químicamente enlazados y son diferenciables entre sí. Como resultado de esta conformación, suelen mejorar alguna propiedad anterior o, en otros casos, exhiben alguna nueva propiedad. Y cuando uno de los componentes posee características de naturaleza magnética, se les denomina nanocompuestos magnéticos (NCM)¹³. Recientemente los NCM son investigados por sus propiedades aplicables en el área biomédica, por su capacidad de ser usados como formas de diagnosticar y/o tratar enfermedades aplicando sus nuevas propiedades¹⁴. Estos nanomateriales pueden responder al pH para liberar fármacos^{15,16}, es posible adherirles polímeros para cambiar sus cargas iónicas¹⁷ o estabilidad en los medios acuosos, los fármacos pueden ser adsorbidos dentro y/o fuera de los materiales^{18,19} o es posible agregarles moléculas que tengan afinidad a receptores sobreexpresados en células cancerígenas²⁰. Existen evidencias de la capacidad de generar terapias menos invasivas, más específicas y controladas para problemas como la eliminación de los tumores, como en el caso de la hipertermia²¹⁻²⁴ y la terapia fotodinámica²⁵⁻²⁷, que han demostrado ser una alternativa complementaria a la quimioterapia para mejorar sus efectos de manera sinérgica^{24,28}.

En este proyecto de investigación se propone la implementación de un NCM compuesto de dos nanomateriales, nanopartículas de CoFe₂O₄ y de Au. Se espera que la conjunción de estos dos permita el desarrollo de una terapia híbrida a raíz de las características de cada uno

1.4 Diseño del NCM

1.4.1 CoFe_2O_4 (Superparamagnético) como componente del NCM

Las nanopartículas de CoFe_2O_4 superparamagnéticas son un material clasificado como óxido metálico superparamagnético²⁹ de color negro, insoluble en agua y conductor de la electricidad. Posee alta coercitividad magnética con alta estabilidad física y química³⁰, elevada anisotropía magnetocristalina, elevada temperatura de Curie (T_c) y elevada saturación magnética (M_s)³¹. Este tiene estructura cristalina cúbica centrada en las caras (ccc) de espinela (también llamada Ferro-espinela), perteneciente al grupo espacial Fd-3m (ancho de celda $a = 8.39 \text{ \AA}$)³² y está compuesta por 56 iones por celda unitaria. Como se muestra en la imagen 6, los O están acomodados en estructura tetraédrica y octaédrica, en la cual los átomos de Fe y Co se ubican en la mitad de los sitios octaédricos respectivamente y el Co en 1/8 de los sitios tetraédricos de coordinación y sus momentos magnéticos (Fe y Co) están alineados en antiparalelo³³. Se reporta que es biocompatible con algunas líneas celulares humanas (Por ejemplo, en HepG2 existe tolerancia hasta concentraciones de 1.0 mg/mL) y es capaz de generar hipertermia magnética³⁴. Sin embargo, la mayor limitante de estos materiales radica en su ineficiente dinámica coloidal lo que genera que aglomeren rápidamente, y se formen efectos de bioacumulación que puedan desencadenar efectos citotóxicos a concentraciones relativamente bajas^{29,35}. Para este problema se han agregado moléculas orgánicas mucho más biocompatibles a la superficie de estos materiales³⁶ logrando resultados favorables.

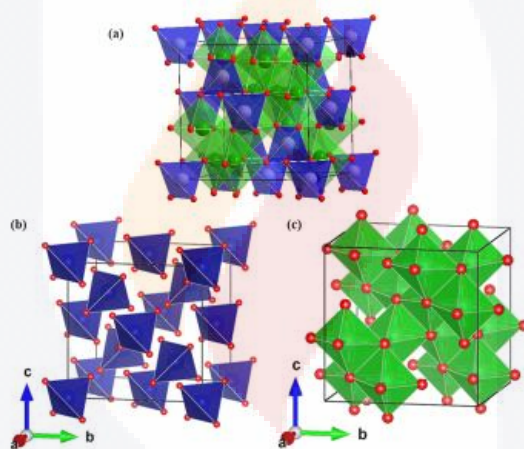


Imagen 6. Estructura cristalina de la espinela. Imagen tomada de Sundaresan A., et al. (2021). a) Se muestran los tetraedros y octaedros con sus respectivos sitios tetraédricos y octaédricos ocupados b) Tetraedros formados por el O (rojo) con sus vacancias ocupadas en el centro por Fe c) Octaedros formados por el O (rojo) con sus vacancias ocupadas en el centro por Fe o Co

Generalmente, en la escala macrométrica, los óxidos metálicos (más específicamente, las ferritas) muestran propiedades magnéticas intrínsecas (como su propio campo magnético). Sin embargo, en los nanomateriales el fenómeno del magnetismo se manifiesta de distintas maneras y puede variar en función del campo magnético aplicado al material, la susceptibilidad magnética, la temperatura y la remanencia en el momento magnético (μ) de los átomos que lo componen. Con base en lo anterior, los nanomateriales se pueden clasificar considerando el conjunto de los momentos magnéticos de sus átomos y su respuesta a un campo magnético aplicado³⁷ (Imagen 7 y tabla 2).

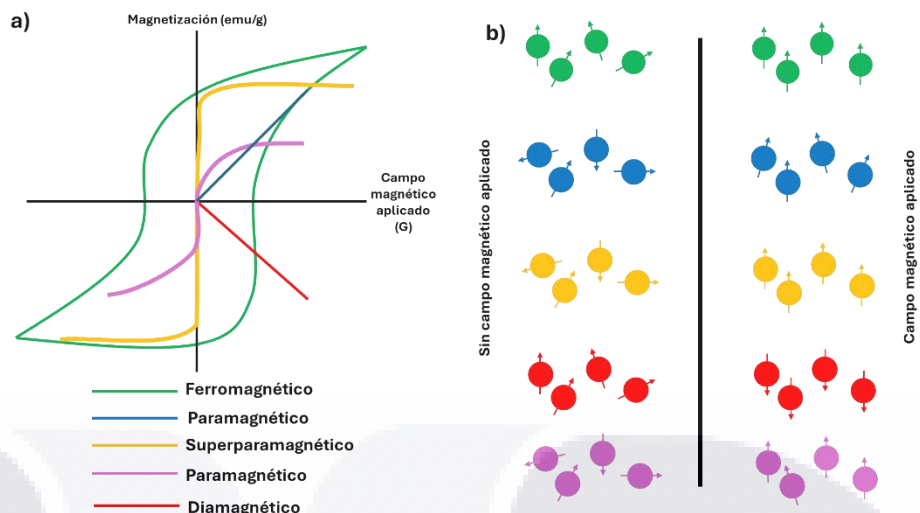


Imagen 7. Ejemplos de clasificación de los nanomateriales magnéticos en función del momento magnético. a) Clasificación con base en los momentos magnéticos en función del campo aplicado b) Representación de los momentos magnéticos sin y con un campo magnético aplicado

Tabla 2. Clasificación de los nanomateriales magnéticos

Clasificación	Característica de los momentos magnéticos
Ferromagnético	Los momentos magnéticos se alinean fuertemente con el campo magnético y permanecen en esta dirección aun cuando el campo ha sido retirado. Existe remanencia magnética
Ferrimagnético	Debajo de la T_C sus momentos magnéticos están alineados en antiparalelo, pero no se cancelan totalmente
Diamagnético	Los momentos magnéticos se alinean en antiparalelo cuando un campo magnético se le aplica al material
Paramagnético	Los momentos magnéticos están alineados aleatoriamente y se alinean cuando se aplica un campo magnético, pero sin remanencia magnética
Superparamagnético	Los átomos de estos materiales se comportan como un solo momento magnético y al aplicar un campo magnético se alinea con este de forma exponencial

Desde hace varias décadas, los nanomateriales magnéticos han empezado a captar la atención de muchos grupos de investigación por sus aplicaciones biomédicas^{22,28,38-44}. Se han tratado de usar y aplicar en tratamientos para inhibir bacterias y/o infecciones⁴⁵, en la detección de enfermedades y como coadyuvantes o terapias alternas⁴⁶ y/o complementarias a otras ya existentes⁴⁷. En el caso de las nanopartículas de CoFe_2O_4 , se han empezado a aplicar en tratamientos de *hipertermia magnética* (HTM) (Imagen 8) como terapia complementaria a las quimioterapias obteniendo resultados positivos^{34,48}. Esta consiste en el aumento de la temperatura ($>37^\circ\text{C}$) usando nanomateriales y campos magnéticos como tratamiento terapéutico para algunas patologías.

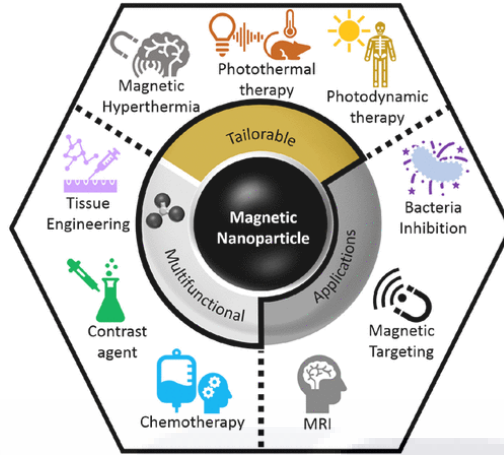


Imagen 8. Ejemplos de aplicaciones en el campo de la biomédica de las nanopartículas magnéticas. Imagen tomada de Martins et al. (2021)⁴⁷

El origen del aumento de la temperatura surge de dos mecanismos, la relajación de Néel y la relajación de Brown (Imagen 9a). En la relajación de Néel, se asume que los momentos magnéticos de los átomos de una nanopartícula superparamagnética pueden ser considerados como uno solo y que por la susceptibilidad magnética del material responderá fuertemente a los campos magnéticos aplicados en él. Cuando una nanopartícula es incapaz de rotar (ya sea por la viscosidad del medio donde se encuentra o por su incapacidad energética), sucede que la energía térmica ($k_B T$) de ésta es mucho menor que la barrera energética anisotrópica y, por lo tanto, el μ oscilará entre los estados basal y excitado (Imagen 9c). El tiempo en el que sucede la oscilación de estos dos estados se le denomina relajación de Néel (τ_N) y el tiempo de relajación en campo cero está representado por:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_{MNP}}{k_B T}\right) \quad (1)$$

Donde T es la temperatura absoluta, V_{MNP} es el volumen de la nanopartícula magnética, k_B es la constante de Boltzmann y τ_0 es la escala tiempo de cambio angular de μ ^{49,50}. En las mediciones magnéticas, se denomina τ_m al lapso en el cual se mide la oscilación de μ . Cuando $\tau_m \gg \tau_N$ el cambio de μ sucederá de manera que su magnetización promedio será cero, generando el estado superparamagnético del material. Así cuando se apliquen campos magnéticos oscilantes, cambiará en la dirección de este causando que el diferencial de energía entre ambas direcciones sea liberado como energía térmica al medio⁵¹ (Imagen 9b).

En el caso de la relajación browniana, cuando las nanopartículas están suspendidas en un medio y logran vencer la resistencia viscosa de este, μ puede girar junto con la nanopartícula. Una vez retirado el campo, estas se moverán a su posición inicial y al lapso en el que sucede se le denomina relajación browniana (τ_B), la cual está representada por:

$$\tau_B \sim \frac{3\eta V_{HD}}{k_B T} \quad (2)$$

Donde η es la viscosidad del medio y V_{HD} es el volumen hidrodinámico de la nanopartícula. Al moverse junto con el campo magnético (es decir, su eje central se moverá con el campo) se

genera fricción entre ellas y con el medio, convirtiendo la energía magnética en energía cinética y por consecuencia elevar la temperatura de la zona donde se ubiquen⁵² (Imagen 8d).

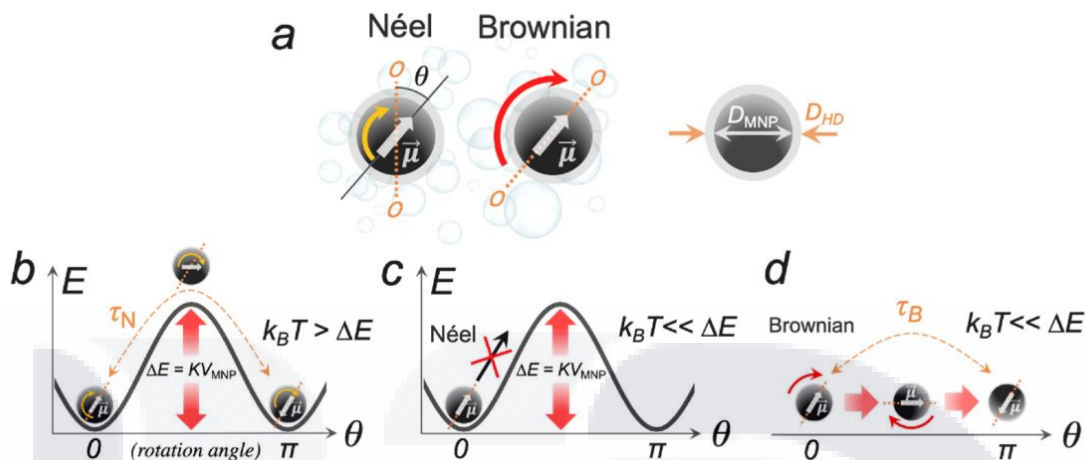


Imagen 9. Ejemplificación del comportamiento dinámico de la hipertermia. a) Diferencia entre los mecanismos de la relajación de Néels (movimiento del momento magnético respecto al eje) y Brown (Movimiento mecánico de la partícula); θ es el ángulo entre el momento magnético y el eje de magnetización, D_{MNP} diámetro de la nanopartícula y D_{HD} es el diámetro hidrodinámico. b) Relajación de Néel en campo cero cuando $k_B T \gg KV_{MNP}$ c) La relajación de Néels no es permitida si la nanopartícula es incapaz de moverse físicamente y $k_B T \ll KV_{MNP}$ d) Relajación de Browniana cuando la nanopartícula está suspendida en un medio. Imagen tomada de Nikitin et al. (2022)⁴⁹

1.4.2. Nanopartículas de Au como componente del NCM

El Au es un elemento de la familia 1B de los metales de transición, con número atómico 79. Es buen conductor de la electricidad y del calor, de alto valor comercial y apreciado por sus características físicas y químicas, como la alta estabilidad y poca reactividad con el oxígeno⁵³. Su configuración electrónica es $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$ con un radio atómico de 174 pm, su estructura cristalina es ccc y cada celda unitaria está formada de 4 átomos (Imagen 10) con un parámetro de red de $a=4.078 \text{ \AA}$ y pertenece al grupo espacial $Fm_{\bar{3}m}$ ⁵⁴. Una característica relevante de las nanopartículas de Au (AuNP) es que pueden ser sintetizadas mediante diversas rutas químicas a partir de sales precursoras de Au (generalmente $HAuCl_4$)⁵⁵, lo que ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de morfologías en las nanopartículas como esferas, barras, estrellas, cubos, hexaedros, por mencionar algunas^{56,57}. Existen varios reportes de la alta biocompatibilidad de este material y su aplicación biomédica en varias modalidades, principalmente como material plasmónico⁵⁸⁻⁶³.

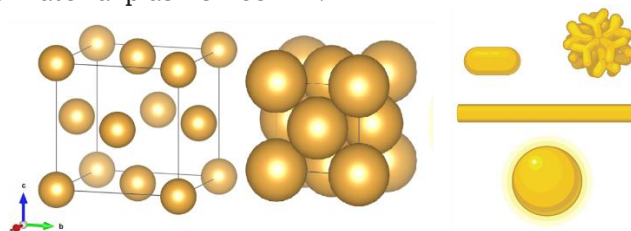


Imagen 10. Estructura cristalina ccc del Au y esquema de distintas nanopartículas de oro

Adicionalmente, a las AuNP también se les considera como *nanomateriales plasmónicos* debido a que se presenta un fenómeno cuántico al interactuar con ondas electromagnéticas resonantes con este llamado, *plasmón de resonancia superficial*⁶⁴(PRS). Cuando una onda electromagnética colisiona con una nanopartícula plasmónica (y su longitud de onda es coherente con esta, Imagen 11a) los electrones de la banda de conducción se polarizarán, actuarán como dipolos y serán perturbados por la onda moviéndose en resonancia con esta. Así, los electrones pasarán de un estado basal a un metaestado excitado migrando de manera coherente a la superficie de la nanopartícula (Imagen 11b). Después tratarán de regresar a su estado basal liberando el diferencial de energía de dos maneras (esto, dependiendo del tamaño y forma implementados): como fotones (dispersión con radiación energética) o como energía no radiante mediante efectos fotodinámicos (dispersión sin radiación energética o dispersión fotoquímica, Imagen 11b). En el caso de la dispersión fotoquímica, es posible generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como el O_2^- a partir de tripletes de oxígeno (3O_2) provenientes de singletes de oxígeno (1O_2)⁶⁵⁻⁶⁷.

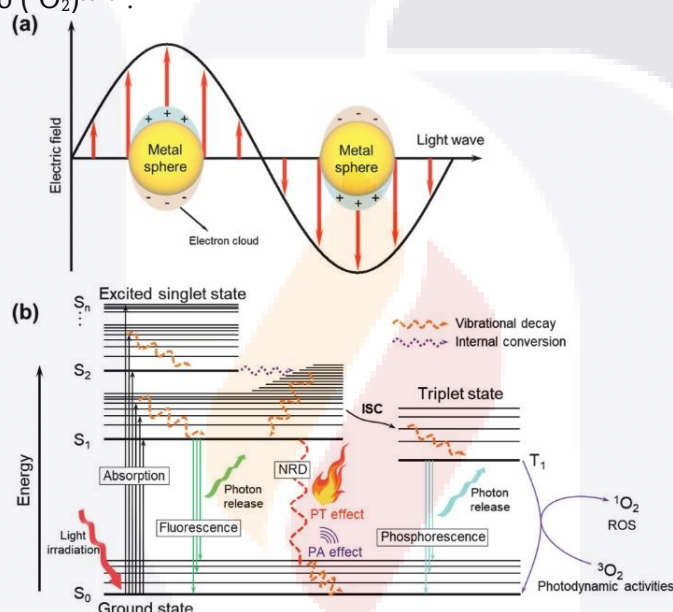


Imagen 11. Representación de las excitaciones de los electrones de la banda de conducción en nanomateriales plasmónicos. a) Onda electromagnética interactuando con una nanopartícula metálica esférica, en la que sus electrones oscilan de forma coherente con la onda. b) Energía electromagnética interactuando con los electrones en estado basal (S_0) y llevándolos a estados excitados (S_1 , S_2 ... S_n). Dependiendo de la energía irradiada, será cómo el material se desprenda de esta; Fluorescencia (Fluorescence), Fosforescencia (Phosphorescence), Dispersión sin radiación energética (NRD): Efecto fototérmico (PT effect), Efecto fotoacústico (PA effect). Imagen tomada de H. Kim et al. (2021)⁶⁶

1.4.3. CoFe_2O_4 y las AuNP como nanocompósito magnético

Los nanomateriales magnéticos y las AuNP son investigados por las atractivas propiedades que muestran de manera individual, sin embargo, la conjunción de estos como material nanoestructurado también es de interés por la sinergia que forman. Investigaciones recientes muestran la versatilidad de este material dependiendo del diseño usado en el proceso (Imagen 12); ya sea como agregados⁶⁸, de forma de núcleo/coraza⁶⁹ o nanocompósitos⁷⁰. En este proyecto se proponen dos alternativas de NCM; CoFe_2O_4 -Citrato-Au (NCMCit) y CoFe_2O_4 -Glicina-Au (NCMGly). La adición de las moléculas orgánicas al NCM se debe a que se desea aumentar la estabilidad coloidal, factor fundamental para el propósito buscado. Como consecuencia de lo anterior, se espera mejorar la eficiencia de la THM y TFD en fluidos y cultivos celulares, evitar la agregación e inactivación del material⁶⁸, así como efficientar la disipación del calor y con ello sensibilizar a las células cancerígenas. Por lo tanto, utilizando el efecto de la THM en conjunción con la TFD como terapias adyuvantes, se busca mejorar la eficiencia de los tratamientos antineoplásicos^{22,44,47,50,59,71}.

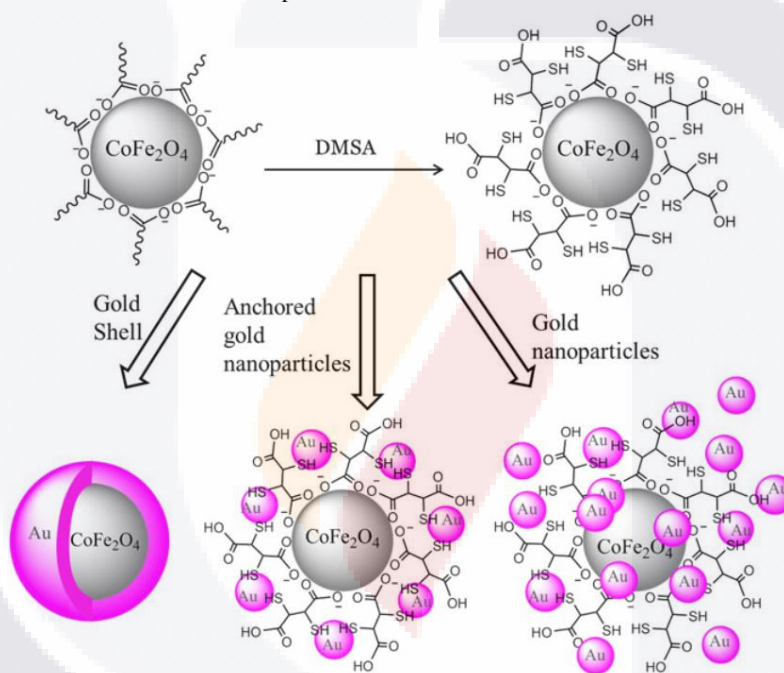


Imagen 12. Representación de distintas maneras de diseño de la conjunción de CoFe_2O_4 con AuNP. Imagen tomada de Carla F. et al. (2013)⁶⁹

Debido al tamaño de las células y los nanomateriales, las técnicas clásicas de microscopía no son capaces de observar las interacciones que puedan suceder entre ellos. En este proyecto, se propone la implementación de técnicas avanzadas de microscopía para observar los fenómenos de interés. Una de las técnicas aplicadas es la microscopía de epifluorescencia (Imagen 13), la cual posee la particularidad de poder filtrar la luz mediante el uso de espejos dicróicos y filtros monocromáticos para eliminar aberraciones y obtener imágenes en alta resolución de los objetos estudiados ya que esta permite obtener imágenes usando sondas fluorescentes. A partir de esto, la microscopía holotomográfica (MHT) surge como una herramienta de frontera, la cual es capaz de generar imágenes en tres dimensiones sumando distintos planos para recrear la forma tridimensional. Esta técnica se basa en los índices de refracción de cada uno de los componentes de la célula (Imagen 14), lo que le permite resolver las imágenes con alta precisión y claridad, revelando las interacciones tanto dentro como fuera de la célula con el nanomaterial.

Complementario a esta técnica la microscopía de fuerza atómica (MFA) puede analizar las muestras con gran precisión ya que no está basada en interacciones de luz-materia sino de un contacto directo con esta mediante el uso de un cantiléver (Imagen 15) el cual va registrando la topografía real de la muestra lo que permite generar no solamente imágenes bidimensionales sino crear imágenes tridimensionales de las muestras, lo que permita no sólo analizar su forma y tamaño, sino que además entender la reología e interacción de las muestras analizadas.

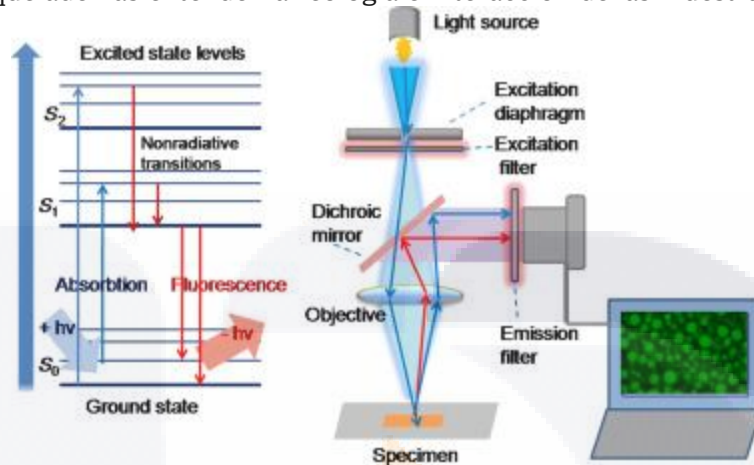


Imagen 13. Funcionamiento del microscopio de epifluorescencia. A la izquierda, se muestra el diagrama de bandas para los niveles de energía basal (S_0) y excitados ($S_{1,2}$) de manera que cuando un electrón es excitado por un fotón coherente con este ($+h\nu$), migra a un orbital de mayor energía y cuando regresa a este el diferencial de energía es emitido como un fotón de menor energía ($-h\nu$). A la derecha, se muestra el esquema general del funcionamiento interno de un microscopio de epifluorescencia. Imagen tomada de Dima et al. (2020)⁷²

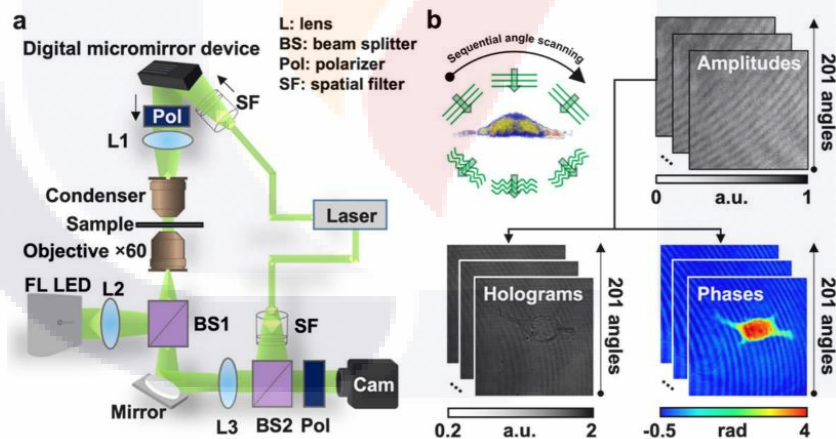


Imagen 14. Funcionamiento del microscopio holotomográfico. a) Representación esquemática de la composición del microscopio holotomográfico. b) Tipos de imágenes que pueden obtenerse de una muestra. Imagen tomada de Medina et al. (2024)⁷³

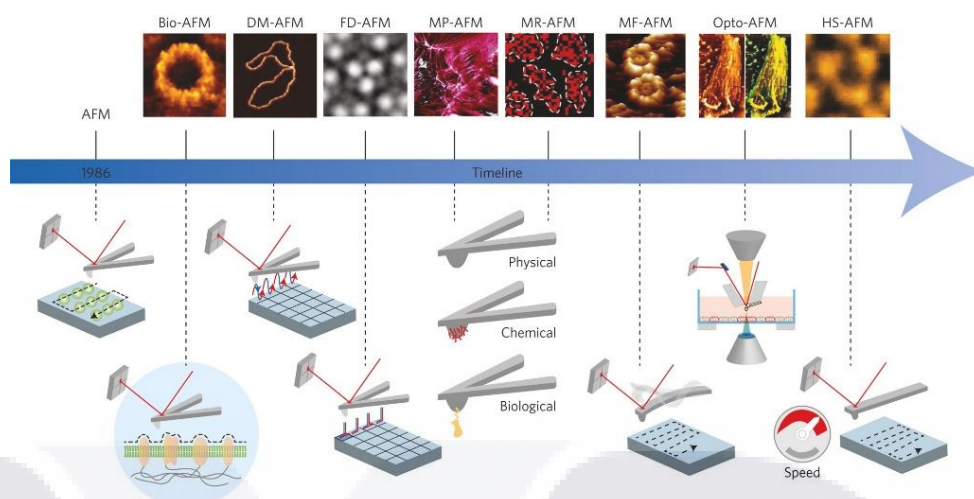


Imagen 15. Desarrollo de los distintos modos de funcionamiento a lo largo del tiempo de la microscopía de fuerza atómica. En esta se muestran las modificaciones de los cantilévares para ser usados en las variantes de esta técnica. Imagen tomada de Dufrene F. et al. (2017)⁷⁴

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Terapia hipertérmica magnética

La hipertermia es una técnica aplicada en la medicina desde hace varios siglos. Los médicos en la antigüedad la usaban induciendo fiebres artificiales para remediar o combatir algunas enfermedades (Imagen 16). Existen registros desde los griegos⁷⁵ en los cuales se usaban fiebres inducidas para tratar de curar enfermedades como el cáncer; incluso Hipócrates clamaba que este sería un gran recurso para curarlas. Sin embargo, hasta los años 1900's empezó a estudiarse como una técnica médica formal. Inclusive, la compañía Siemens diseñó un aparato llamado "*Pomp-Siemens*"⁷⁶ enfocado en esta terapia para mejorar los tratamientos en pacientes oncológicos integrando microondas, aire caliente y radiofrecuencias. Actualmente, la hipertermia se define como la elevación de la temperatura en un rango de 39 a 45 °C del tejido cancerígeno para su destrucción por necrosis o apoptosis (siendo este último el mecanismo de preferencia).

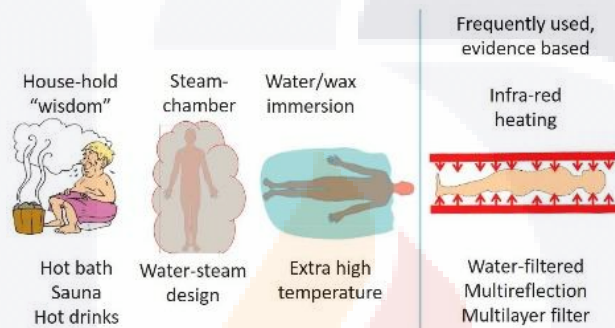


Imagen 16. Distintas modalidades de inducción de la hipertermia a través del tiempo. Imagen tomada de Lee et al. (2020) ²⁴

Existen reportes de mejorías de pacientes en los cuales además de su terapia de rutina se complementaba con la hipertermia^{23,24,77,78}. Estudios clínicos demuestran que al aplicar la hipertermia como adyuvante en la quimioterapia, existe un aumento de la reducción de la masa cancerígena mejorando la probabilidad de sobrevivencia en pacientes pediátricos⁷⁸. Actualmente se busca que esta técnica sea lo más localizada posible para reducir daños colaterales al tejido sano y aumentar la eficiencia de las terapias básicas (Imagen 17).

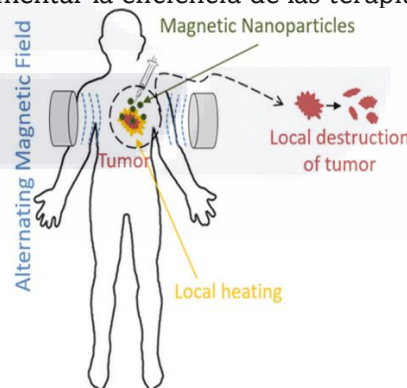


Imagen 17. Esquema de la hipertermia basada en nanopartículas magnéticas. Imagen tomada de Benos L. et al. (2022)⁷⁹

Estudios demuestran que la hipertermia ayuda a mejorar la cinética de los fármacos usados en las quimioterapias debido a que el calor aumenta el flujo de partículas en las membranas celulares causando daño en ellas y generando un aumento de la concentración del fármaco dentro de las células y aumento de la sensibilidad de la célula hacia este (Imagen 18)^{21,22,39,40,50,52,76}. Se ha reportado que la modificación de la fluidez y permeabilidad en las membranas celulares promueve la internalización activa de sustancias en la célula y con esto, se logró mejorar la eficacia de las quimioterapias⁸⁰.

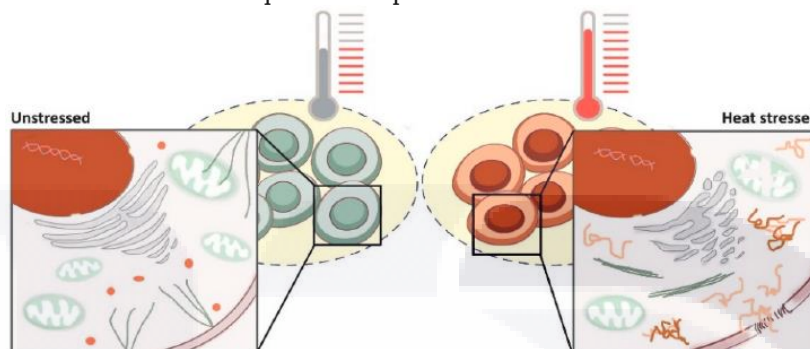


Imagen 18. Efectos de la hipertermia en las membranas celulares y organelos membranosos. Se muestra cómo las estructuras celulares pierden su forma y función cuando existe un aumento de temperatura considerable. Imagen tomada de Scutigliani E. et al. (2021).

Otras evidencias sugieren que la hipertermia causa desnaturalización de las proteínas por la elevación de la temperatura. Se reporta que las proteínas transmembrales (como en el caso de la bomba Na^+/K^+) pierden actividad o su completa función (Imagen 19) modificando el transporte activo de las membranas alterando así el metabolismo celular, sus gradientes iónicos y el potencial de membrana causando la muerte celular²⁴.

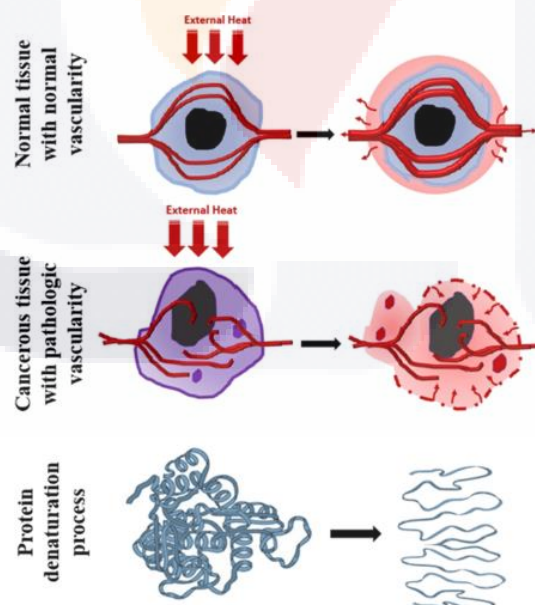


Imagen 19. Esquema representativo de la hipertermia a nivel celular cuando las proteínas se desnaturalizan y pierden su función, llevando a la muerte celular. Imagen tomada de Noraida A. et al. (2023)⁸¹

También se reporta que la hipertermia genera el aumento en la creación de ROS, causando estrés en la célula y acelerando el proceso de la apoptosis⁸⁰. En la imagen 20 se muestran distintas rutas de daño celular causadas por la hipertermia; investigaciones demuestran que el aumento de ROS se relaciona directamente con el aumento de la actividad en la mitocondria por el estrés generado por el calor, así como el aumento en la producción y activación de proteínas como la caspasa-3 para inducir apoptosis⁸².

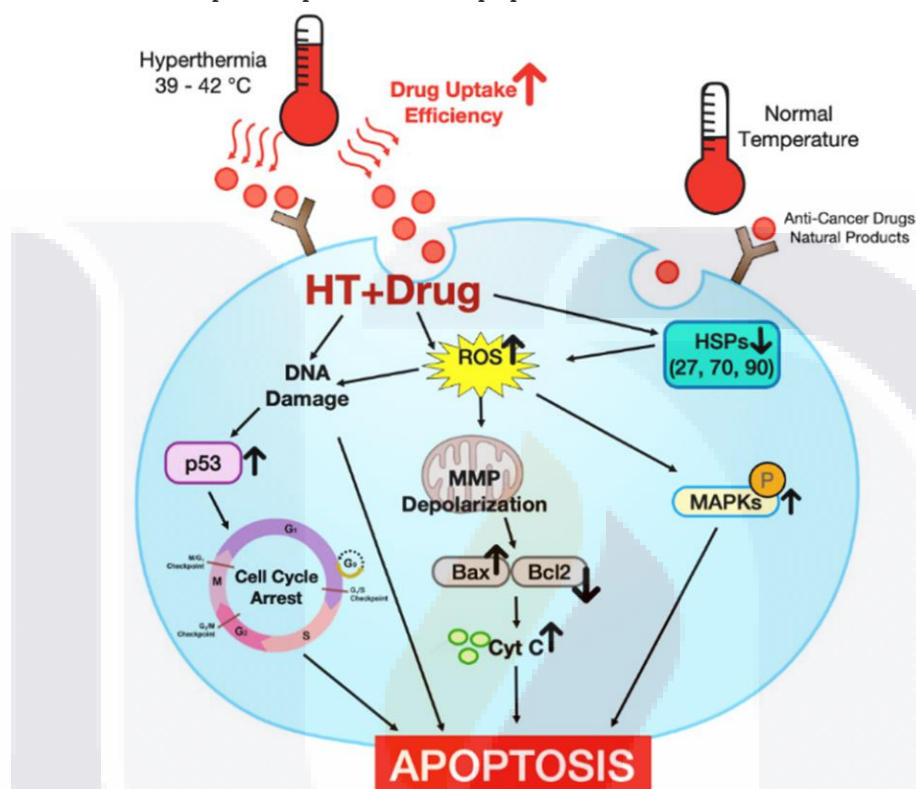


Imagen 20. Efecto de la hipertermia en las células cancerígenas en conjunto de la quimioterapia, se mencionan las diferentes maneras en que se generan las ROS y con esto, la apoptosis. Imagen tomada de Ga Y. et al. (2022)⁸³

2.1.1 Estado actual de su implementación

Con ayuda de la nanotecnología, la terapia de hipertermia ha evolucionado en una forma más localizada, controlada y eficiente mediante los nanomateriales magnéticos (Imagen 21). En conjunto, crean la hipertermia magnética, la cual se puede definir como *la técnica de aumento de temperatura en un rango de 39 a 45 °C originada por nanopartículas influenciadas por un campo magnético*. Uno de los principales objetivos buscados en las más recientes investigaciones es que este efecto sea lo más localizado y controlado posible. Gracias a la nanotecnología se han desarrollado metodologías que logren estos objetivos⁸⁴.

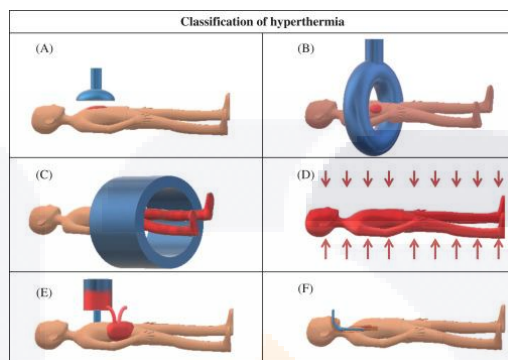


Imagen 21. Ejemplos de tipos de terapia de hipertermia. A) Hipertermia local superficial B) Hipertermia regional profunda en un tumor profundo C) Hipertermia en una parte específica del cuerpo D) Hipertermia general E) Hipertermia sanguínea de perfusión F) Hipertermia interna usando un dispositivo intracorporal. Imagen tomada de Deb et al. (2019)²¹

Como se muestran en las investigaciones de Cervantes O. et al. (2020)⁴⁸ los tumores tratados en animales de laboratorio mostraron resultados favorables. Usando Fe_3O_4 funcionalizada con dopamina, se detuvo el crecimiento exponencial de las células cancerígenas y, además, en algunos especímenes se mostró una reducción de la masa tumoral casi en su totalidad después de un tratamiento de cuatro semanas. También existen compañías dedicadas a la fabricación y uso de nanopartículas superparamagnéticas para combatir el cáncer mediante esta técnica. NanoTherm® es un producto desarrollado por la compañía Magforce el cual está compuesto por una suspensión de nanopartículas superparamagnéticas de ferrita (Fe_3O_4) y mediante un aparato diseñado por ellos (NanoActivator®) crean los campos magnéticos para inducir la hipertermia⁸⁵ (Imagen 22). Estudios⁴⁴ han probado la efectividad de este producto en ensayos clínicos, demostrando la reducción de las masas tumorales y alargando la expectativa de los pacientes a los cuales se les administró este tratamiento como medida complementaria a los tratamientos clásicos.



Imagen 22. Tecnología de la compañía MagForce. A la izquierda se muestra el ferrofluido patentado por la compañía MagForce (NanoTherm®) y a la derecha, el NanoActivator®, equipo diseñado para crear los campos magnéticos que generarán la hipertermia magnética.

2.2 Terapia fotodinámica

Como complemento de la THM, se propone la aplicar la TFD. Esta se define como *la implementación de materiales plasmónicos para generar ROS*⁸⁶. Esta técnica empezó a desarrollarse a principios de los 1900's y desde entonces se han tenido avances significativos. Se parte de un agente fotorreactivo (Imagen 23), el cual interacciona con el espectro electromagnético y produce ROS mediante el intercambio de e^- con especies de oxígeno en el medio. Esta técnica ha empezado a llamar la atención por su alta tasa de éxito, así como por la toxicidad localizada que puede causar. Se ha demostrado la efectividad de este proceso mediante ensayos con tumores de esófago, cabeza, cuello y piel⁸⁷. Sin embargo, aún es necesario desarrollar esta técnica por las limitaciones que esta puede tener, como en el caso de la dosimetría, así como en la planeación del tratamiento.

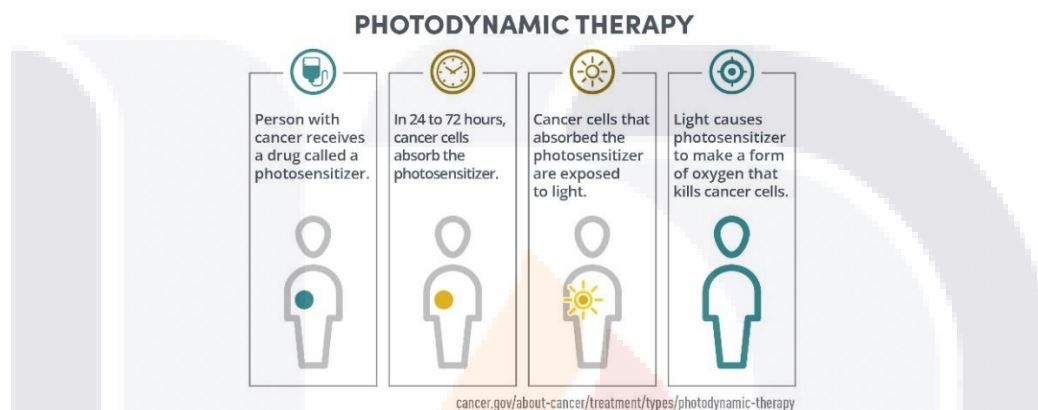


Imagen 23. Representación general de la metodología de la TFD. Imagen tomada de www.cancer.gov⁸⁸

Dentro de los considerados ROS se clasifican moléculas tales como los radicales $OH^\cdot$, $O_2^\cdot$, $HOCl$, O^{2-} y H_2O_2 los cuales se ha demostrado que a concentraciones moderadas funcionan como intermediarios en procesos celulares metabólicos normales de las células cancerígenas tales como la proliferación, migración e invasión⁸⁹. Sin embargo, como se muestra en la imagen 24, cuando su concentración aumenta se realizan potenciales efectos toxicológicos que pueden inducir apoptosis y/o daño celular⁸⁹.

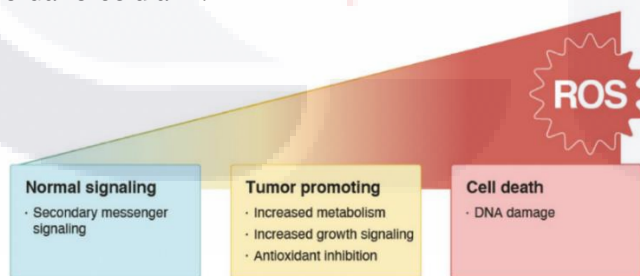


Imagen 24. Representación de la actividad de los ROS en función de su concentración dentro de la célula cancerígena, cuando estos se encuentran a bajas concentraciones funcionan como mensajeros secundarios y cuando su concentración aumenta, comienza a realizar daño celular. Imagen tomada de Nakamura H. et al. (2021)⁸⁹

Como se muestra en la imagen 25, los mecanismos de acción de los ROS se pueden clasificar de tres maneras: inducción de la apoptosis (mediada por caspasas), muerte celular por autofagia e inducción de la muerte celular por necroptosis⁹⁰. En el caso de la inducción de la apoptosis, cuando los ROS aumentan su concentración dentro de la célula, la mitocondria comienza a liberar un exceso de citocromo c al citosol lo cual induce la producción de apoptosomas y con ello también la producción de las caspasas, proteínas encargadas de la destrucción de otras biomoléculas de manera indiscriminada^{89,90}. En el caso de la autofagia, la célula cancerígena realiza una autodigestión con la finalidad de reciclar componentes celulares u organelos dañados en respuesta a diversas condiciones de estrés en las que se pueda encontrar^{89,90}. Las ROS suprimirán la actividad de las proteínas reguladoras de la autofagia (proteínas de la familia ATG), lo que provocará un aumento de este proceso y, con ello, a la muerte de la célula. Por último, está la muerte por necroptosis que consiste en una muerte programada por daño en los organelos y de la célula en general por medio de la hinchazón y posterior descomposición de esta, también se caracteriza por no estar mediada por las caspasas^{89,91}.

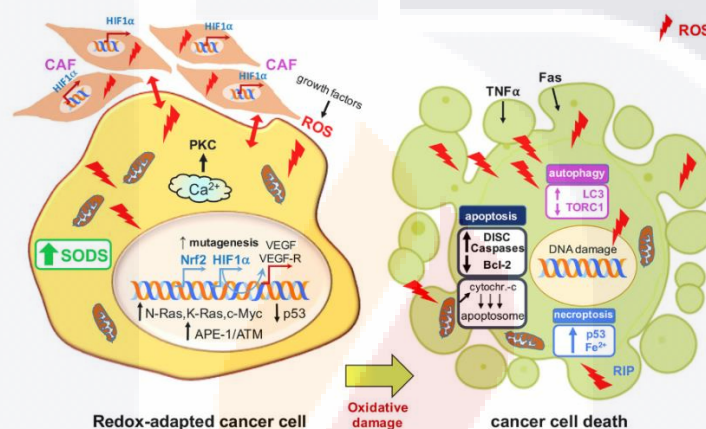


Imagen 25. Representación de una célula cancerígena con capacidad regulatoria de los ROS mediante las enzimas superóxido dismutasa (SODS) (izquierda) y posteriormente los mecanismos de daño celular causados por el exceso de ROS dentro de la célula (derecha). Imagen tomada de Perillo et al. 2020⁹⁰

2.2.1 Estado actual de su implementación

Investigaciones recientes han demostrado la efectividad de esta terapia para el combate y reducción de tumores (incluyendo cáncer de cuello, cabeza, esófago y estómago) en modelos biológicos^{92,93}. Estudios clínicos actuales han revelado resultados favorables utilizando fármacos específicos para la TFD, estos tienen la capacidad de ser absorbidos en gran cantidad por las células cancerígenas y posteriormente producir una considerable cantidad de ROS dentro de las mismas^{87,90}. Sin embargo, la implementación de NP para la TFD aún está en pleno desarrollo, ya que inicialmente estas sólo habían sido utilizadas como acarreadores de fármacos fotosensibilizantes mostrando resultados positivos sin embargo la nueva generación de fotosensibilizantes considera a las NP plasmónicas como una alternativa para la TFD⁸⁷. Estudios *in vitro* han demostrado la efectividad de las AuNP como fuente de ROS en medios biológicos para combatir células HeLa. En estos, se observa una eficiencia del 57% de muerte celular⁹⁴. De acuerdo con diferentes estudios de laboratorio la efectividad de este material estará en función de su morfología, tamaño y eficiencia de producción de ROS, por lo que el diseño y modificación de estos factores resultarán fundamentales para su implementación en estudios clínicos⁸⁷.

2.3 Terapia híbrida: hipertermia y fotodinámica en conjunto

Existen múltiples estudios y reportes acerca de las capacidades de la terapia de hipertermia aplicada como terapia contra el cáncer. Como se describió anteriormente, los mecanismos que esta ejerce pueden eliminar masas tumorales, así como ayudar a mejorar otras terapias (como el caso de la quimioterapia y radioterapia)^{23,50,75}. Del mismo modo, se han logrado describir las capacidades y oportunidades de la TFD en el campo de la oncología, sin embargo, hasta este momento no existen abundantes reportes o estudios que combinen ambas terapias para combatir el cáncer.

Estudios recientes proponen la implementación de múltiples terapias o *terapias híbridas* en los pacientes para mejorar los resultados en el combate contra el cáncer^{71,95}. Mediante la combinación de diferentes efectos es posible eliminar efectos secundarios de los fármacos o disminuir su actividad sistémica evitando su actividad en lugares no deseados (Imagen 26). También es posible mejorar la permeabilidad de los tumores y al mismo tiempo destruirlos desde dentro mediante distintas terapias

En este proyecto se propone el diseño de un nanomaterial capaz de generar terapia híbrida conjuntando los efectos de la hipertermia con la fotodinámica, de manera que la sensibilización y daño de la hipertermia pueda potenciar la entrada y efectividad de los ROS para así, aumentar el daño celular en los modelos aplicados y con ello demostrar el potencial terapéutico del material en condiciones de laboratorio e *in vitro*.

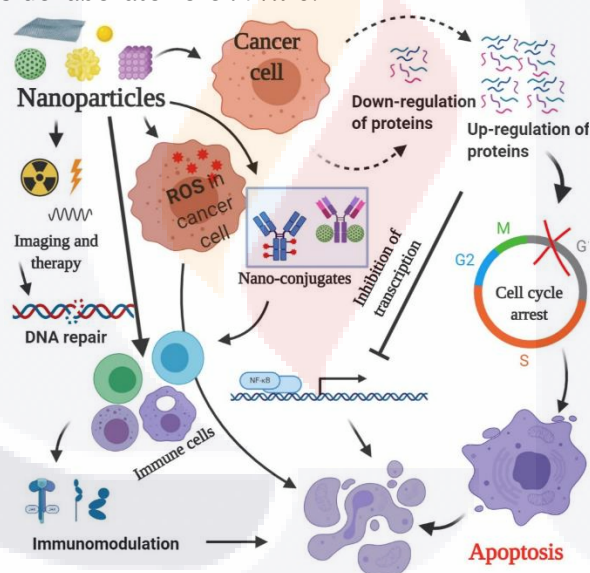


Imagen 26. Representación de las múltiples terapias y tratamientos que pueden ejercer los nanomateriales de manera conjunta a las terapias clásicas. Imagen tomada de Jadhav V. et al. (2025)⁹⁶

Capítulo 3. Metodología

3.1 Síntesis de CoFe_2O_4

Para la síntesis de las nanopartículas de CoFe_2O_4 se utilizó una metodología propuesta por I. Medina et al. (2020) (Imagen 27). En ésta, se utiliza una ruta por microondas para inducir la reacción entre los precursores acetilacetonato de Co (II) (Aldrich, Francia) (ACAC Co) y acetilacetonato de Fe(III) (Aldrich, E.U.A) (acac Fe). Se parte de una solución al 0.66 mmol de acac Fe y 0.33 mmol de acac Co en 5 mL de alcohol bencílico (Karal, México) y después, se lleva al equipo de microondas (CEM Discover System 908005) para inducir la reacción. Se hace un primer ciclo a 40 W de potencia, 60 °C por 2 min y posteriormente un segundo ciclo a 300 W, 200 °C por 5 min. Terminado el tiempo, se resuspenden las nanopartículas en éter con la finalidad de solubilizar los sobrantes de la reacción y limpiar las nanopartículas. Se realizan 5 lavados con éter y posterior a esto se dejan secando en estufa por 10 min a 60 °C para obtener un polvo fino de color negro brillante.

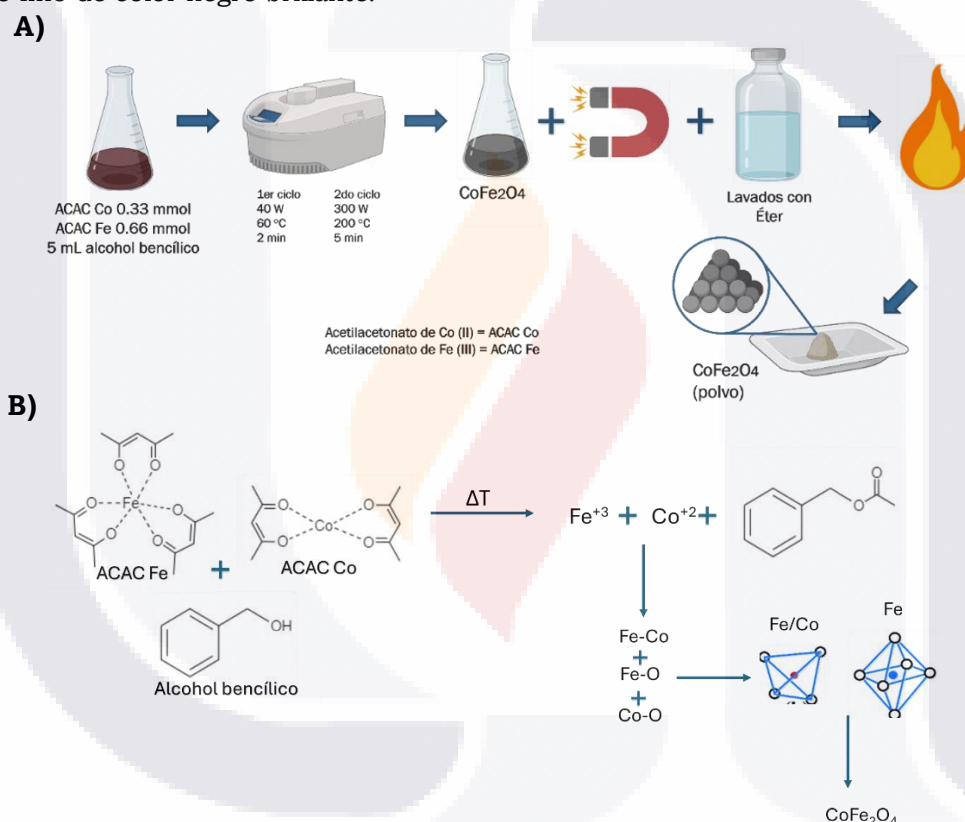


Imagen 27. A) Diagrama general de la síntesis solvotérmica de nanopartículas de CoFe_2O_4 activada por microondas B) Reacción de formación de CoFe_2O_4 usando los precursores acac Fe y acac Co. En la primera etapa se aumenta la temperatura del sistema para disolver los precursores y posteriormente llevar los metales a estado coloidal; Luego estos forman enlaces entre ellos y el oxígeno para formar los octaedros y tetraedros que darán paso a la estructura de la ferroespina y formación de las nanopartículas

3.2 Funcionalización de las nanopartículas de CoFe_2O_4

Para el proceso de la funcionalización se partirá de una solución de 80 mL de agua desionizada y se disolverán 2.15×10^{-4} mmol de Citrato de sodio dihidratado (J.T. Baker, E.U.A.) (Imagen 28). Posteriormente agregar las nanopartículas de CoFe_2O_4 para alcanzar una concentración de 4.30×10^{-4} mmol en la solución y se lleva a baño ultrasónico por 30 min. Pasado este tiempo, llevar la solución en baño maría por 2 h a 60°C en agitación, con tubo refrigerante y dejar en reacción. Terminada la síntesis, refrigerar durante al menos 12 h para favorecer la precipitación y posteriormente centrifugar (OHAUS FC 5816) a 4500 rpm por 10 min y retirar el sobrenadante. Repetir el proceso hasta obtener un sobrenadante claro y posteriormente secar el material en estufa hasta obtener unos polvos finos y secos. Para el caso de la Gly (J.T. Baker, E.U.A.), la metodología será la misma, pero se disolverán 2.156×10^{-4} moles de Gly en 80 mL de alcohol etílico.

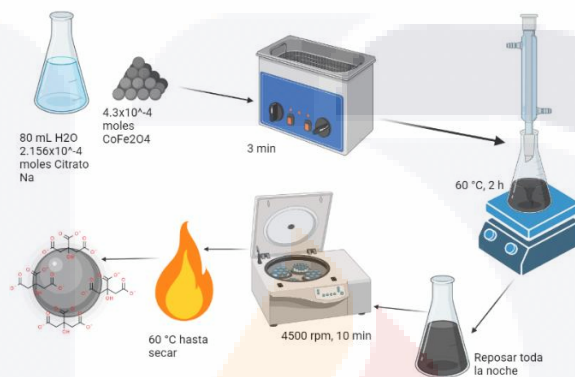


Imagen 28. Funcionalización de las NP de CoFe_2O_4 con citrato

3.3 Síntesis de nanopartículas de Au (AuNP)

Para la síntesis de las nanopartículas de Au se propone una ruta (Imagen 29) basada en los reportes de Carreón-Álvarez et al. (2020)⁹⁷ y Min H. et al. (2018)⁹⁸ para obtener las nanopartículas debido a sus atractivas propiedades de plasmón superficial localizado. Se parte de una solución de 20 mL de agua desionizada a la cual se le añadirán 40 μL de una solución 50 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, USA) y 0.5 mL de una solución al 0.1% p/v de citrato de sodio dihidratado (J.T. Baker, Canadá) en constante agitación. Posteriormente se agregan 0.1 mL de H_2O_2 al 30% (REASOL, México), la solución deberá cambiar a una tonalidad rosa indicando la formación de las nanopartículas, y se deja reaccionar por 30 min para su posterior uso para la síntesis de los NCM.

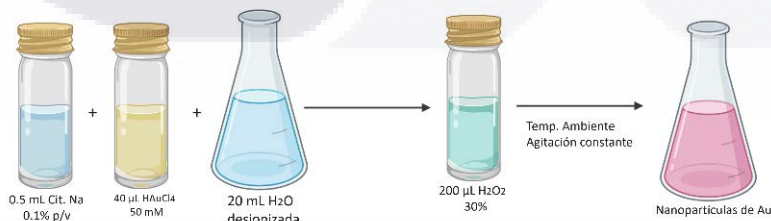


Imagen 29. Representación de la ruta de síntesis de las AuNP

3.4 Síntesis de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$

A partir del coloide de Au NP sintetizado, se agregarán 10 mg de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}/\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly}$ por cada 1 mL del coloide (Imagen 30). Tomando toda la solución sintetizada de NP de Au y adicionándole la cantidad respectiva del material, se lleva al baño ultrasónico por 30 min para dispersar lo más posible la $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$. Posteriormente se deja en agitación vigorosa por 24 h. Pasado el tiempo de reacción, se recupera el material ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit/Gly-Au}$) por centrifugación por 10 min a 4500 rpm hasta obtener un sobrenadante lo más claro posible. Se separa la parte líquida de la sólida y se lleva a la estufa a 60°C hasta secar por completo el material.

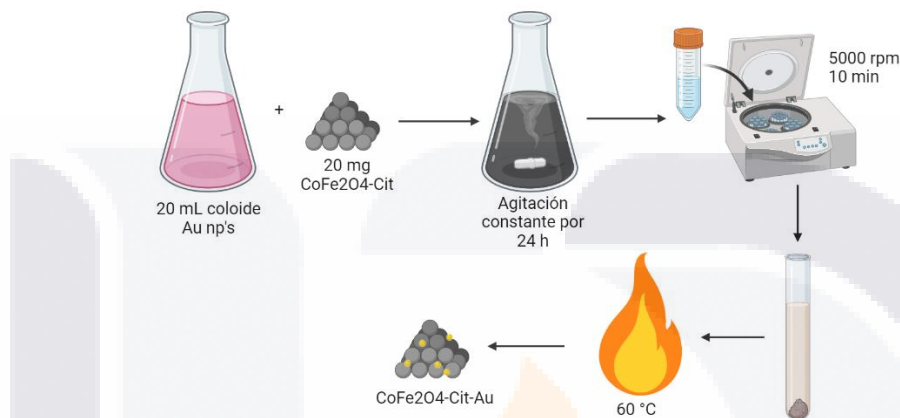


Imagen 30. Representación de la metodología de síntesis de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$

3.5 Caracterización de materiales

Los análisis DRX fueron realizados en un equipo Siemens D500 con una fuente de electrones de $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda=1.541874 \text{ \AA}$) en un rango de 20° a $80^\circ 2\theta$ en intervalos de 0.02° . Para la técnica de microscopía de transmisión de electrones se utilizó un equipo Jeol Arm 200F (Tokyo, Japón) con una fuente de electrones del tipo Cold FEG a una potencia de 200 kV y un detector tipo Schottky con corrección de aberración esférica CESCOR a una resolución de 80 pm y un detector de campo obscuro de ángulo amplio y contraste Z junto con un detector EDS Oxford AZtecTEM para los análisis elementales químicos. Los análisis de VSM se realizaron en un equipo Quantum Design, Versa-Lab (California, USA). Los análisis de espectrofotometría infrarroja fueron realizados en un equipo JASCO FT/IR-4100 y los análisis UV-Vis en un equipo Thermo Scientific Helios Omega UV-Vis. En el caso de los análisis TGA se realizaron en un equipo TGA-1000 ISI (Wioming, USA) de 0° a 1000°C a una velocidad de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Para las pruebas de calorimetría magnética se utilizó un equipo patentado por el grupo de investigación de Cano et al. (Patente 65340 MX). Este se operó en un rango de $0 < H < 366$ para los campos magnéticos y las mediciones se realizaron en campos magnéticos alternantes a una frecuencia de 530 kHz por 5 min de 15 a 30 Oe; la temperatura de las muestras fue registrada usando un sensor fluoróptico Luxtron One (California, USA) usando ferrofluidos (3% goma arábiga) a una concentración de 1mg/mL.

3.6 Prueba de hemólisis

Es fundamental determinar la biocompatibilidad de todos los materiales que se deseen implementar para funciones biomédicas, por ello, la prueba de hemólisis se utiliza como ensayo estándar para medir este parámetro. Como la sangre es un tejido que se encuentra en todas las partes del cuerpo y se transporta en él toda clase de sustancias, resulta el modelo ideal para medir la capacidad de compatibilidad de los materiales.

Se obtiene la muestra por punción venosa y se recolecta en tubo verde (sistema Vacutainer®) para evitar su coagulación. En un tubo de ensayo se agregan 50 µL de tejido sanguíneo, 10 mL de solución salina fisiológica (SSF) y se adicionan las cantidades correspondientes de nanopartículas para tener las distintas concentraciones (Tabla 3)

Tabla 3. Cantidades y concentraciones a las que se realizó la prueba de hemólisis

Cant. Material/tubo	1	2	3	4	5	Control +	Control -
mg CoFe ₂ O ₄	2	4	6	8	10	50 µL eritrocitos	50 µL eritrocitos
[CoFe ₂ O ₄ µg/mL]	10	15	20	25	30	10 mL agua	10 mL SSF

Una vez preparados los tubos, se dejarán en agitación en el termobañó a 37 °C por 3 h en obscuridad. Pasado el tiempo, centrifugar a 3500 rpm por 5 min. Usando un equipo de la marca Thermo Scientific, modelo Helios Omega UV-Vis, se hace una lectura de los tubos por espectrofotometría UV-Vis a $\lambda=525$ nm para determinar la absorbancia de cada uno. Para determinar el porcentaje de hemólisis se usa la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hemólisis} = \left(\frac{\text{Abs de la muestra} - \text{Abs control } (-)}{\text{Abs control } (+) - \text{Abs control } (-)} \right) * 100 \quad (3)$$

Porcentajes mayores al 5% se consideran como no aceptables para considerar al material biocompatible a esa concentración^{34,99}.

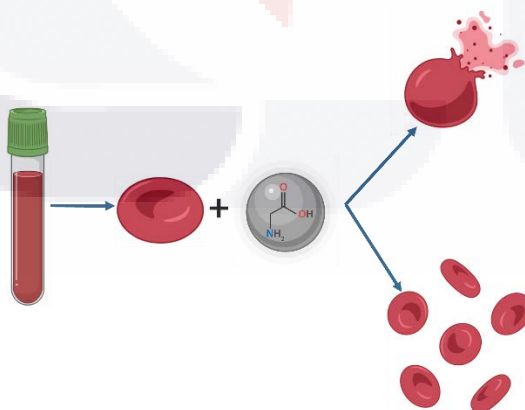


Imagen 31. Representación de la prueba de hemólisis. En la parte superior se representa la hemólisis y debajo los eritrocitos sanos.

3.6.1 Hemólisis con luz infrarroja

Una vez determinada la biocompatibilidad de los materiales, se aplicó la misma metodología que en la prueba de hemólisis (Imagen 32) usando 50 μL de tejido sanguíneo, 10 mL de SSF y 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada material ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$). Se usaron 6 tubos con la misma concentración de material y se mantuvieron en agitación en el termobañó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se comenzó a irradiar los tubos con la lámpara de luz IR (850 nm) durante 10 min y luego se cubrieron con papel de aluminio para evitar la entrada de luz. Terminada la irradiación, se retiró la lámpara y se mantuvieron las muestras en incubación durante 2 h más para luego ser analizadas por espectrofotometría UV-Vis. Los ensayos se realizaron usando los materiales en su forma particular y en suspensión de GA (Ferrofluido).

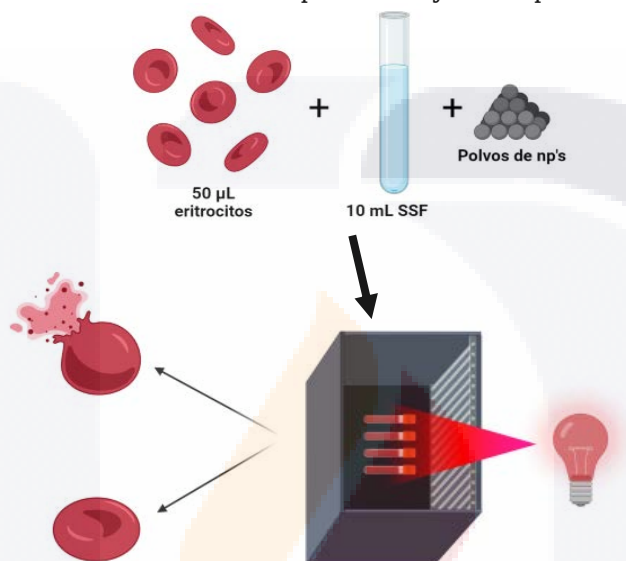


Imagen 32. Esquema de la metodología de hemólisis con luz IR para determinar el aumento de la citotoxicidad

3.7 Líneas celulares

Los estudios de citotoxicidad se realizaron utilizando las líneas celulares A549 (carcinoma epitelial de pulmón) de la American Type Culture Collection (ATCC, donada por el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes) y Detroit 548 (fibroblastos de piel) (ATCC, donada por el Laboratorio de Patología Molecular de la Universidad Autónoma de Aguascalientes).

3.8 Pruebas de viabilidad CCK-8

Previo a realizar los análisis, es necesario sintetizar el ferrofluido en condiciones estériles para su aplicación. Para ello se creó una matriz acuosa de goma arábica (GA) al 3% de p/v y se llevó a la autoclave para su esterilización, luego, se le agregó suficiente nanomaterial para obtener una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ y se sometió a baño ultrasónico por 5 min. Se utiliza una placa de crecimiento celular de 96 pozos (Imagen 33), se agrega la cantidad suficiente de cultivo para obtener una concentración de 50,000 cel/ cm^2 junto con 200 μL de medio DMEM SFB 1% y se deja en incubación por 18 h. Se prepara una serie de diluciones de las partículas en el medio específico de crecimiento. Se retira el medio de crecimiento y se agrega el medio con los materiales y se deja incubar durante 12 h. Pasado el tiempo, se retiran las células de la cámara de crecimiento y, en la campana de flujo laminar, se retira la cubierta de la placa de crecimiento. Se irradia por 10 min a las células con luz IR (850 nm) para posteriormente llevar a incubación por 12 h. Pasado el tiempo de exposición con los materiales, se retira el medio de crecimiento anterior y se agrega medio DMEM-HAMS sin rojo fenol a una proporción de 90 μL de medio y 10 μL del kit CCK-8 para cada pozo. Incubar por 1 h y leer la placa en espectrofotómetro UV-Vis a 450 nm.

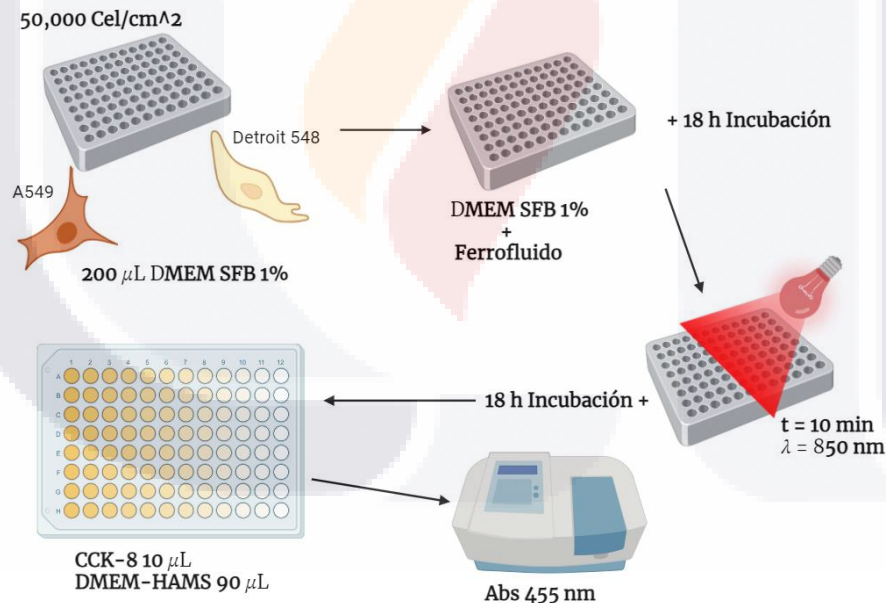


Imagen 33. Esquema de la metodología de la prueba de viabilidad celular con CCK-8 y TFD

3.9 Pruebas de generación de ROS

Para probar la generación de ROS mediante la TFD se usó la sonda fluorescente MitoSOX Green (Thermo Fisher, USA) (MSG) que es altamente reactiva a los ROS (más específicamente al $O_2^{\cdot-}$). La sonda absorbe luz de $\lambda=488$ nm y emite su señal a $\lambda=510$ nm. La sonda está compuesta por una sal de hidroetidio y diseñada funcionar como colorante mitocondrial, por lo que posee alta afinidad por estas estructuras y su principal detección principal será por este medio.

En una placa de 24 pozos (Imagen 34) se agregan suficientes células (de cada línea celular por separado) hasta tener una concentración de 95,000 células/cm². Se dejan en incubación con 200 μ L de medio de cultivo DMEM al 10% de suero fetal bovino (DMEM SFB 10%) por 24 h. Luego se retira el medio y se hacen dos lavados con PBS para posteriormente agregar suficiente cantidad de ferrofluido para tener la concentración deseada del material (10 μ g/mL) y se completa el volumen a 200 μ L de DMEM SFB 1% para dejar en incubación por 18 h. Una vez expuestas al material, se agregarán 200 μ L de una solución stock de MSG 2.5 μ M en dimetilformamida y se incubarán durante 3 h. Luego de la incubación, se retira la sonda, se realiza un lavado con PBS y se deja con 200 μ L de PBS para ser irradiada con una lámpara de luz IR de 850 nm por el tiempo designado (1, 5 y 10 min) para posteriormente obtener las imágenes en campo claro y de fluorescencia.

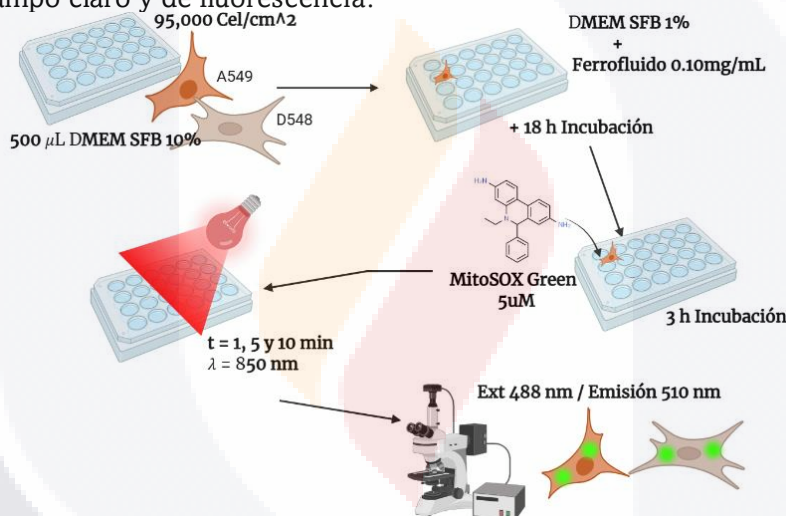


Imagen 34. Representación del protocolo de detección de ROS usando la sonda fluorescente MitoSOX green

3.10 Microscopía de fuerza atómica

Utilizando una caja de cultivo de 24 pocillos, se coloca un cubreobjetos redondo ($\varnothing=13\text{mm}$) (previamente esterilizado con etanol 70% filtrado y luz UV por 10 min) en el fondo de cada pocillo a utilizar (Imagen 35). Posteriormente se sembraron las células (A549 y D548) con medio DMEM SFB 10% por 24 h hasta obtener una confluencia de $40,000\text{ cels/cm}^2$. Luego, se retira el medio y se realizan 3 lavados con PBS para posteriormente agregar el ferrofluido hasta obtener una concentración de $10\mu\text{g/mL}$ y se completa el volumen a $200\mu\text{L}$ de DMEM SFB 1% y se deja en contacto por 18 h. Terminado el tiempo de exposición, se llevó la caja de cultivo a la campana de flujo laminar, se retiró la tapa y se expuso por 10 min a la luz IR (850 nm) y se llevó a incubación por 24 h. Luego, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS para posteriormente agregar $500\mu\text{L}$ de formalina al 10% en cada pozo durante 2 h. Una vez fijadas las células al cubreobjetos, se retiró la formalina y se agregaron $500\mu\text{L}$ de etanol a distintas concentraciones hasta alcanzar el 100% (se inició con etanol al 40% y se siguió con 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) durante 10 min. Concluidos los pasos de deshidratación, las muestras están listas para ser analizadas por el microscopio de fuerza atómica.

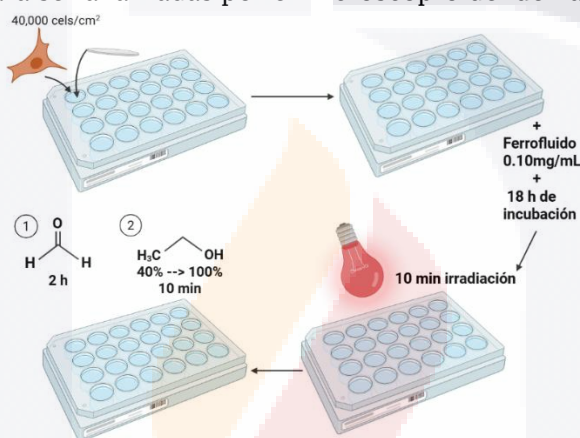


Imagen 35. Representación de la metodología de preparación de cultivos celulares para ser observados por medio del microscopio de fuerza atómica

Las muestras fueron analizadas con un equipo de la marca Bruker (Alemania) modelo *Dimension Edge* (Imagen 36) utilizando un cantiléver del tipo OTESPA-R3 en el modo *tapping* (f_0 : 300 kHz), *phase contrast* y *autoscan en* atmósfera de aire para obtener las imágenes. Las muestras fueron analizadas a una velocidad de $30\mu\text{m/s}$ en escaneos de 50 y $25\mu\text{m}$ de tamaño a un total de 512 líneas por muestra

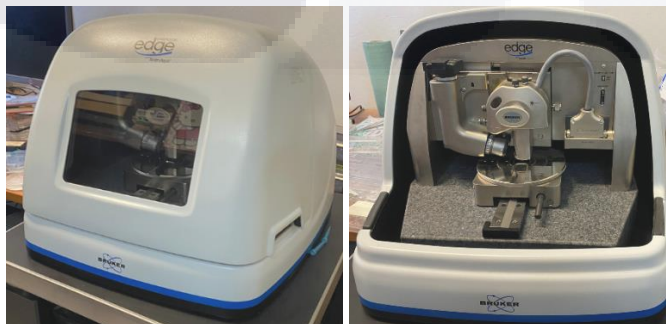


Imagen 36. Imágenes del microscopio de fuerza atómica Bruker, *Dimension Edge* usado para los análisis microscópicos. Se muestran los componentes internos, platina y láser del cantiléver

3.11 Microscopía holotomográfica

Para esta técnica se utilizaron *tomodishes* previamente esterilizados en autoclave y con luz UV por 10 min. Luego, se sembraron las células hasta obtener una confluencia de 20,000 cels/cm² usando 3 mL de medio DMEM SFB 10% (Imagen 37). Terminado el tiempo de crecimiento, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS para posteriormente agregar el ferrofluido junto con el medio DMEM SFB 1% hasta obtener una concentración de 10 µg/mL en un volumen total de 3 mL y se dejó en incubación por 18 h. Terminado el tiempo de incubación, se retiraron los *tomodishes* de la cámara de incubación, se cubrieron con papel de aluminio y se llevaron al microscopio holotomográfico para su análisis.



Imagen 37. Representación de la metodología de preparación de muestras en *tomodishes* para el microscopio holotomográfico

Para obtener las imágenes se utilizó un equipo de la marca Tomocube modelo HT-2H (Imagen 38) acoplado a un láser rojo (850 nm). Las células fueron irradiadas por 5 min con el láser y las imágenes holotomográficas fueron reconstruidas con el software del fabricante. Para la interpretación de las imágenes, tomogramas 3D y componentes celulares se utilizó el índice de refracción.

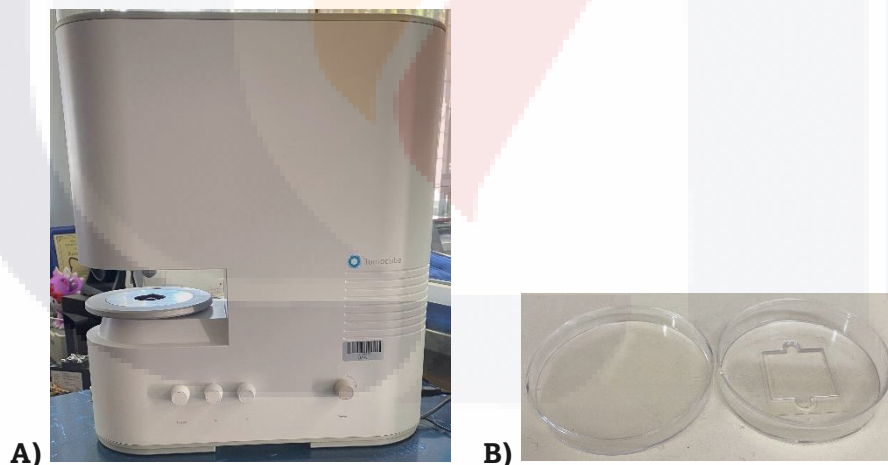


Imagen 38. Imágenes de la instrumentación para microscopía holotomográfica. A) Microscopio holotomográfico Tomocube HT-2H B) *Tomodishes* usados para la preparación y observación de las muestras

3.12 Parámetros estadísticos

Para todos los experimentos se realizaron (por lo menos) ensayos por triplicado con tres réplicas por independiente ($N \geq 9$) y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para demostrar la influencia de los tratamientos fotodinámicos en los análisis de viabilidad y hemólisis. Para las comparativas de las desviaciones estándar se determinan los promedios y se compara la media aritmética como punto de referencia para demostrar la reproducibilidad de los ensayos.

Capítulo 4. Resultados y discusiones

4.1 Síntesis de materiales

El uso de equipos y técnicas avanzados ha permitido la fabricación de nanomateriales con alta precisión y reproducibilidad. La aplicación de una ruta solvotérmica implica la solvatación de precursores metálicos (u organometálicos) al elevar la temperatura por encima del punto de ebullición a altas presiones, lo que permite una total disolución de los precursores y una mayor homogeneidad de los productos sintetizados. Como complemento a lo anterior, la asistencia por microondas genera un aumento significativo de los productos sintetizados ya que este equipo permite aumentar la temperatura y presión de una manera muy homogénea en todo el reactor de reacción a grandes potencias, lo que disminuye considerablemente los tiempos de síntesis, evitando la producción de productos secundarios no deseados¹⁰⁰. Como resultado de nuestra síntesis, se obtuvo un nanomaterial particulado fino y homogéneo con características superparamagnéticas (Imagen 39).

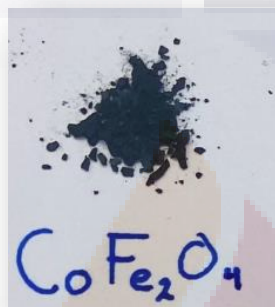


Imagen 39. CoFe_2O_4 sintetizado por la ruta solvotérmica activada por microondas

Gracias al proceso de síntesis, se obtuvieron altos rendimientos de producción ($85 \pm 6 \%$). De acuerdo con Bilecka et al. (2008)¹⁰¹ la implementación de dos etapas en el proceso de síntesis permite una correcta nucleación y crecimiento de las nanopartículas. La primera etapa ocurre a 60°C con una potencia relativamente baja en un tiempo corto (2 min). Esto permite que los precursores se solvaten en su totalidad en la matriz líquida y, con esto, se genera la etapa inicial de nucleación de las nanopartículas. La segunda etapa se genera a 200°C y a mayor potencia, además de tiempos más largos (5 min) y es aquí cuando inician los mecanismos de formación de las nanopartículas. Al aumentar la temperatura, las partes orgánicas de los precursores (acac Co y acac Fe) se descomponen hasta llegar al grado de formar CO_2 y iones metálicos en solución (Fe^{+2} y Co^{+3})¹⁰⁰. Posteriormente, los iones metálicos reaccionarán con el O del medio y comenzarán la formación inicial de la espinela. En este punto, el tiempo de reacción, la cantidad de precursores y el solvente serán los factores que regularán el tamaño y forma de nanopartícula¹⁰⁰⁻¹⁰³.

Entonces, al generarse las nanopartículas, se vuelven insolubles en el medio y empiezan a separarse de este, pero se mantienen en suspensión, lo que permite su simple separación y purificación mediante lavados con solventes y posteriormente un secado a bajas temperaturas (60°C) para eliminar rastros de solventes orgánicos. Por lo tanto, resulta una técnica adecuada para generar el material de interés con altos rendimientos y reproducibilidad.

Partiendo de los protocolos realizados en el grupo de investigación³⁴ se modificó la superficie de los nanomateriales mediante el proceso de funcionalización utilizando dos moléculas distintas (Citrato y Glicina). Con esto, se modificará la carga superficial del material y se aumentará la estabilidad coloidal de las nanopartículas, lo que les permitirá mantenerlas más tiempo en suspensión y separadas, lo que, a su vez, optimizará la absorción de energía para los tratamientos deseados. Con base en los resultados de las caracterizaciones, se confirmó la adición de las moléculas orgánicas en la superficie de los nanomateriales, por lo que podemos asegurar que la metodología resulta adecuada y no altera las características físicas y químicas del material (Imagen 40).

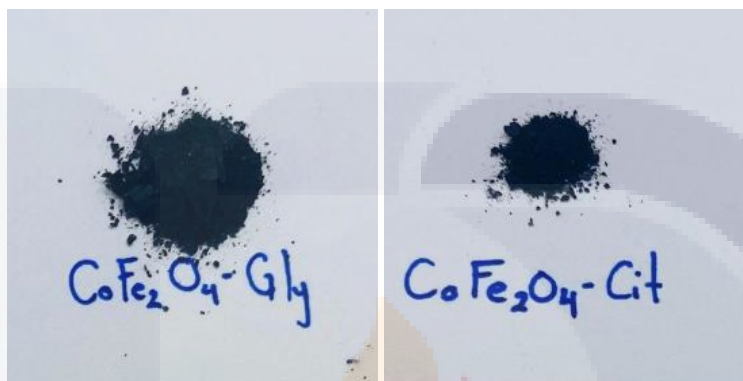


Imagen 40. CoFe_2O_4 funcionalizado con las moléculas orgánicas

La ruta de síntesis usada se basa en los protocolos de Min H. et al. (2018), con algunas modificaciones, con la finalidad de sintetizar nanopartículas de Au con morfologías esféricas con ramificaciones. Esta característica es deseada para que el nanomaterial pueda interaccionar con ondas electromagnéticas en el rango de la primera ventana biológica (700-1000nm)¹⁰⁴, lo que le permitirá crear su PRS de manera eficiente y así la luz no tendrá interacción con los componentes celulares y el agua, evitando la disminución de la energía disponible.

La síntesis de las AuNP se realiza en dos etapas principales. De acuerdo con las propiedades de los precursores usados, el H_2O_2 actuará como el agente reductor y el citrato fungirá como estabilizante en la reacción. Durante el primer paso de la reacción, se agrega el precursor de Au directamente a la matriz acuosa, lo que genera una ligera coloración amarilla y al adicionar el H_2O_2 , desaparece. Lo anterior sucede por la reacción **(3)** de reducción del H_2O_2 en el Au^{+3} hacia Au^0 formando los núcleos de las AuNP. En el caso del citrato, a causa de su polaridad y su bajo potencial reductor, este tiene una alta afinidad por los átomos de Au, por lo que empezará a unirse por puentes de H en la superficie.

En esta etapa (Imagen 41a) se empiezan a formar las ramificaciones de las AuNP debido a zonas no cubiertas de citrato, permitiendo así el crecimiento de las extensiones en zonas aleatorias de los núcleos. Este fenómeno está en total dependencia de la cantidad de Cit usada en la reacción. De acuerdo con los resultados de los análisis espectrofotométricos, cuando la concentración de Cit excede el 0.1% los núcleos se cubren casi en su totalidad de Cit eliminando las zonas desnudas causando la aglomeración de los átomos de Au y con esto generando morfologías esféricas en lugar de las ramificaciones deseadas^{98,105,106} (Imagen 41b).

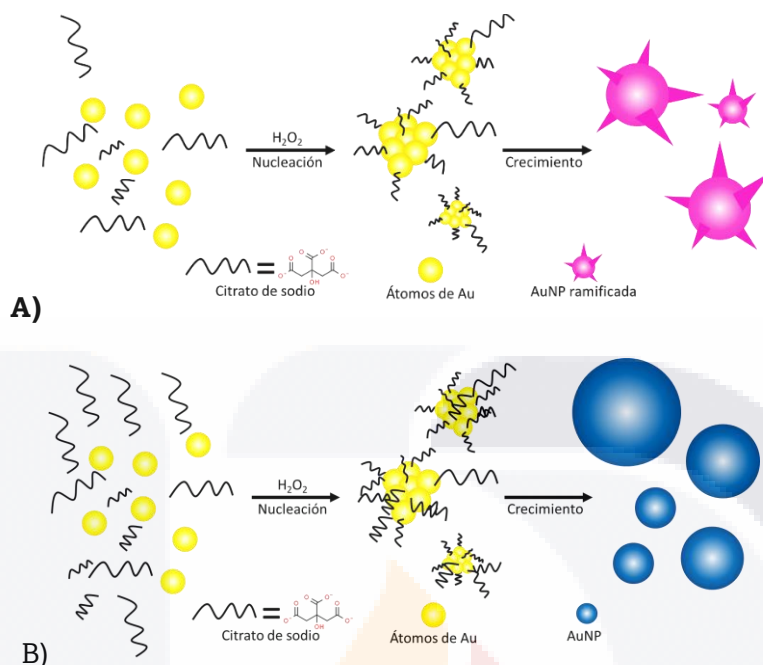
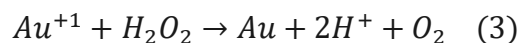


Imagen 41. A) Síntesis de las AuNP ramificadas usando Cit 0.1%, se representa el proceso de nucleación y crecimiento de los materiales plasmónicos B) Síntesis de AuNP esféricas usando Cit>0.1%, debido a esta concentración los núcleos crecen de manera radial aumentando del diámetro final de las AuNP

Sin embargo, la morfología multiramificada resulta ser inestable por la alta entropía de sus átomos, por lo que después de sintetizarse comienza a agregarse, aumentando su tamaño y cambiando a formas esféricas y en algunos casos, pierden la capacidad de manifestar el segundo PRS¹⁰⁷. Por lo tanto, la síntesis de NCM se realizó de forma *in situ*. Una vez sintetizado el coloide de las AuNP, se tomaba cantidad suficiente para realizar el procedimiento, evitando así la agregación y los cambios en las propiedades de interés. Esto resultó adecuado para el NCM, ya que, como se mostrará en las caracterizaciones y evaluaciones biológicas, ambos NCM conservan tanto sus propiedades magnéticas como plasmónicas.

4.2 Caracterización de los materiales

4.2.1 Microscopía de transmisión de alta resolución (MTAR) /Espectroscopía de difracción de electrones (EDE)/ Espectroscopía de difracción de electrones por rayos X (EDX)

En la imagen 42A se muestran nanopartículas de CoFe_2O_4 con un tamaño promedio de 7.13 ± 1.42 nm y una distancia interplanar (Imagen 42B) de 0.265 nm (plano 311) de acuerdo con las mediciones realizadas. Debido al tipo de síntesis utilizada, es posible obtener nanopartículas con alta cristalinidad y una distribución de tamaño homogénea (Imagen 43). Con base en lo anterior, es posible asegurar la obtención de nanomateriales con las mismas características debido a la alta reproducibilidad de la ruta de síntesis utilizada.

Asimismo, mediante el análisis de EDX se corroboró la identidad química del material, caracterizando principalmente los elementos Fe y Co (Imagen 44) en una proporción atómica 2:1 del Fe respecto al Co (66.3% Fe y 33.7% Co), lo que corresponde a la identidad química del material.

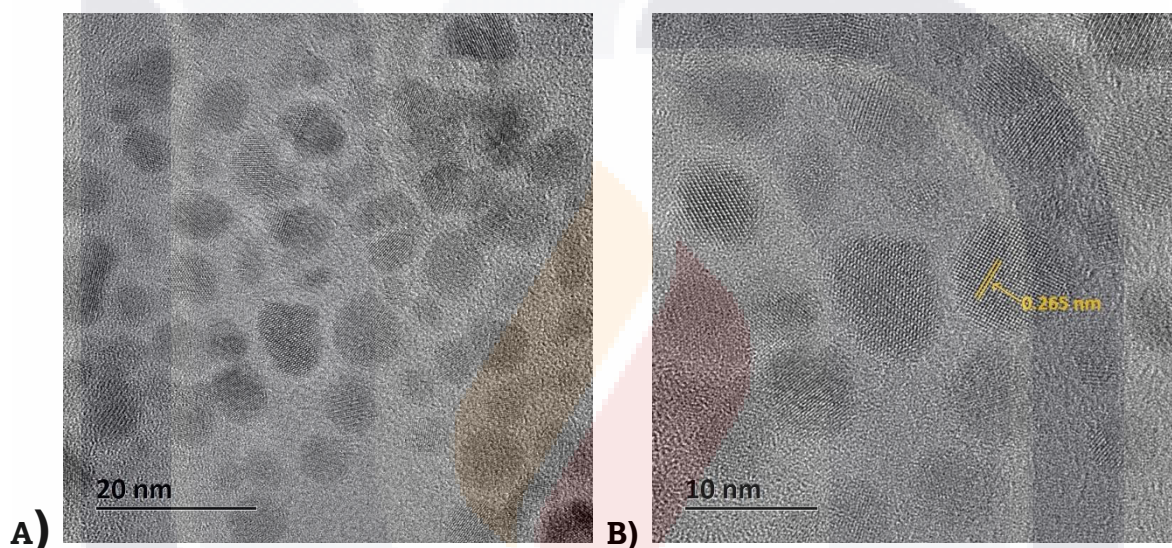


Imagen 42. Micrográficas obtenidas por MTAR en campo claro de la CoFe_2O_4 A) Nanopartículas distribuidas, se observa la distribución de tamaños B) Distancia interplanar del plano identificado como (311)

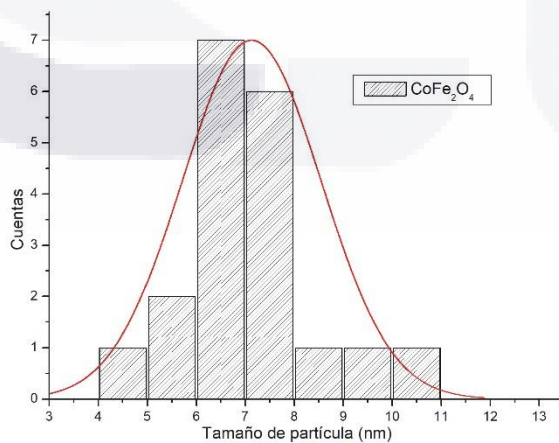


Imagen 43. Histograma de distribución de tamaño de partícula de la CoFe_2O_4

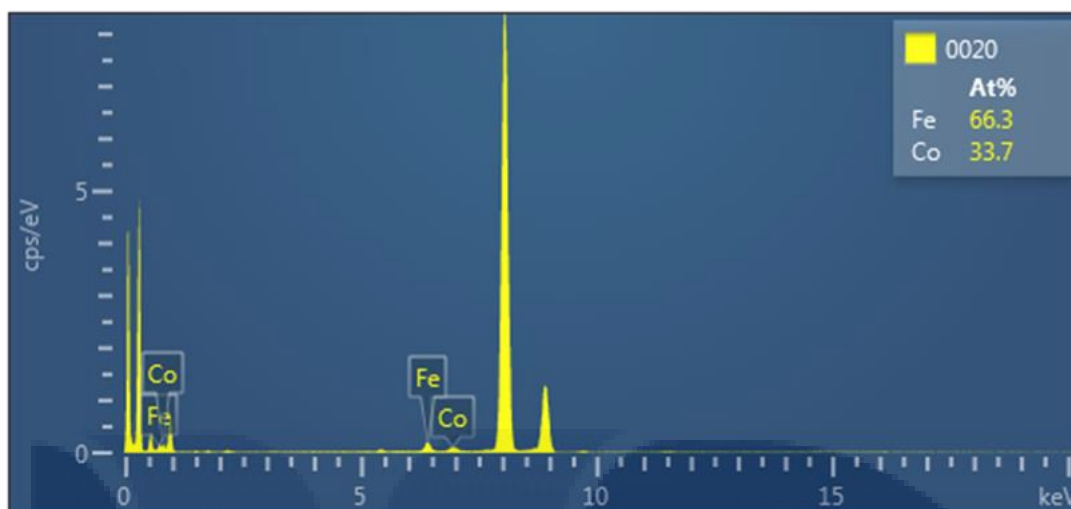


Imagen 44. Espectro EDX obtenido de la CoFe_2O_4 . Se identifica principalmente a los elementos Fe y Co, así como los porcentajes atómicos respectivos.

A partir de la ruta de síntesis diseñada, se puede observar que en NCMCit existe una distribución muy heterogénea en cuanto a los tamaños y morfologías observables de las AuNP (Imagen 45 A-D). Estas demuestran formas esféricas con un diámetro promedio de 59.61 ± 35.84 nm (Imagen 46), lo que representa una distribución muy amplia en los tamaños de cada nanopartícula; además, se observan estructuras con ramificaciones heterogéneas. Debido a la diferencia de los núcleos atómicos de cada elemento del NCMCit, se observan zonas de alto contraste, las cuales representan al Au. Sin embargo, junto con los análisis EDX (Imágenes 47 y 48) se puede determinar que el Au está presente de forma general en el NCM, pero con zonas de mayor acumulación.

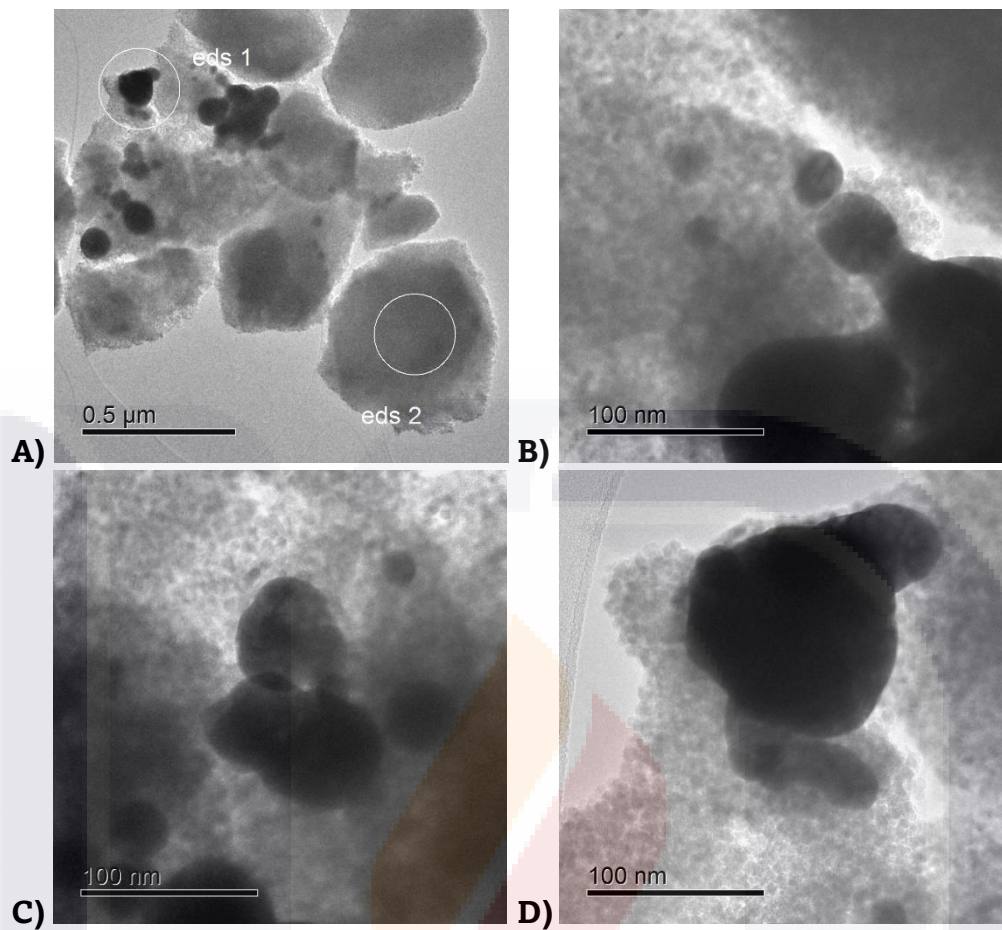


Imagen 45. Micrografías obtenidas por MTAR en campo claro de NCMCit

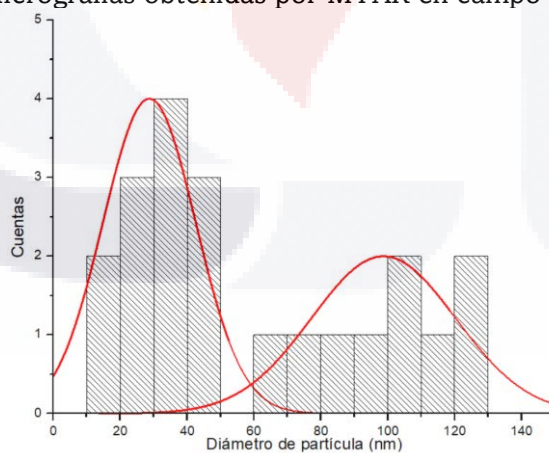


Imagen 46. Histograma de distribución del tamaño de partícula de las AuNP de la imagen 45A

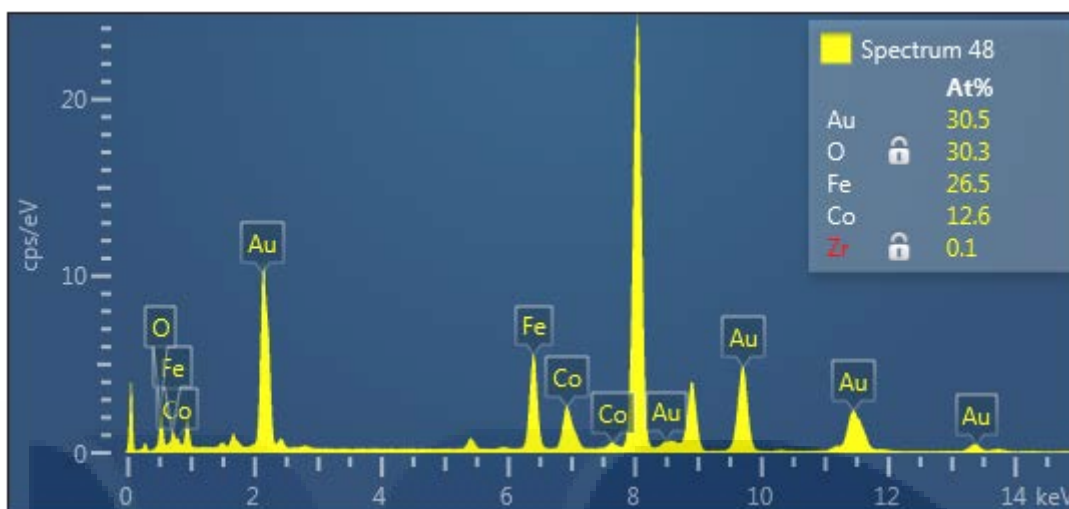


Imagen 47. Análisis EDX de la zona referida en la imagen 45A como “eds 1”

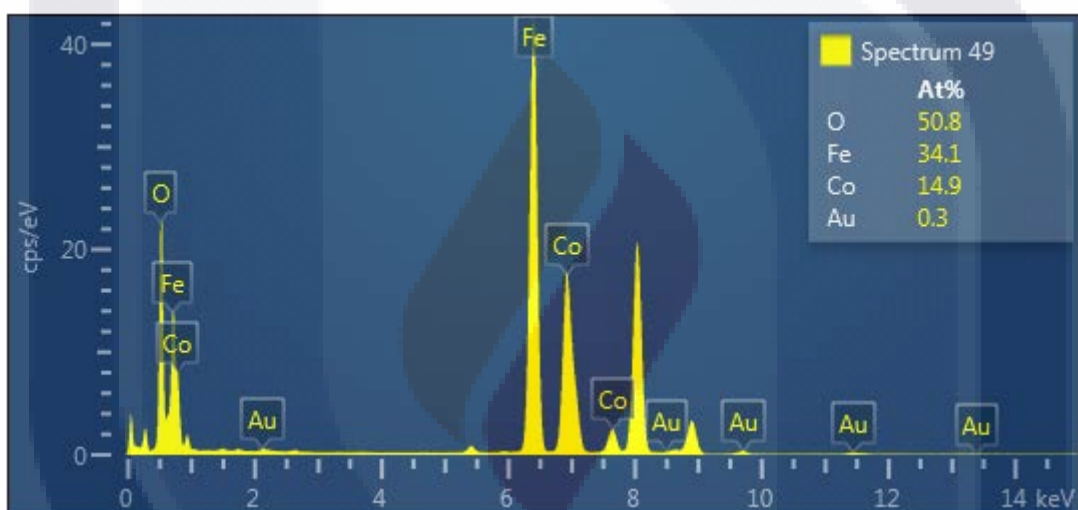


Imagen 48. Análisis EDX de la zona referida en la imagen 45 como “eds 2”

A diferencia de NCMCit, en el caso de NCMGly no fue posible encontrar estructuras multiramificadas de Au. Pero, como se muestra en las imágenes 49 A-B, existen zonas de alto contraste oscuro, lo que pareciera ser concentraciones mayores de Au. En los análisis de EDX (Imagen 50) se confirma la presencia de Au en el NCM; sin embargo, demuestra una concentración considerablemente baja en el material.

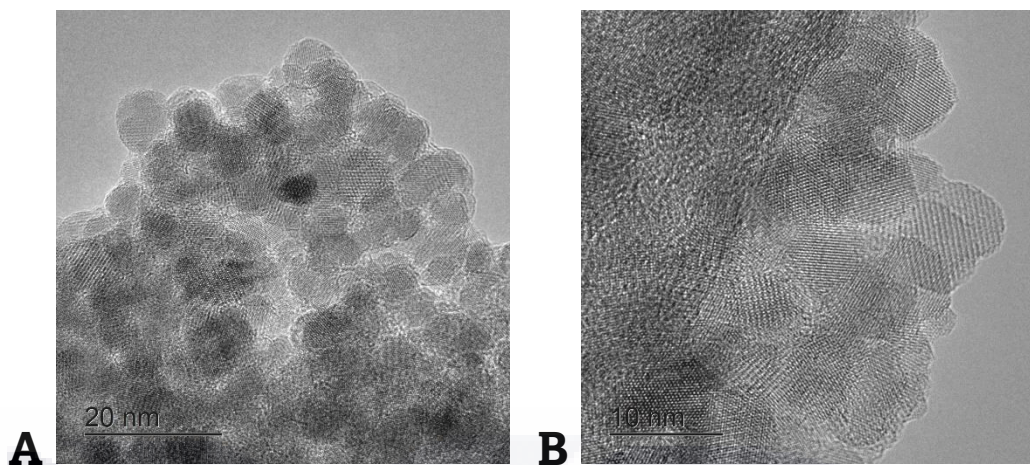


Imagen 49. Micrografías obtenidas por MTAR en campo claro de NCMGly

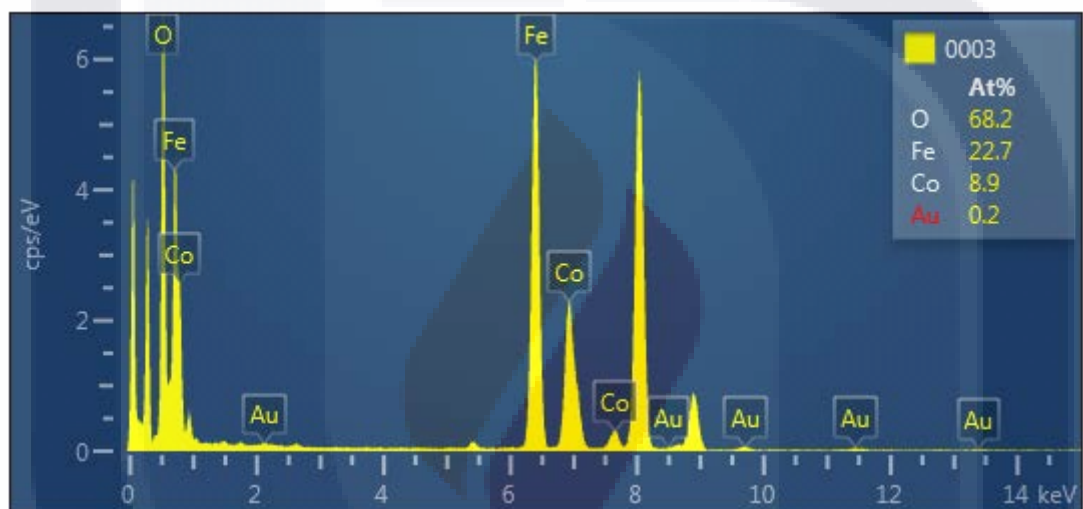


Imagen 50. Análisis EDX del material nanoestructurado $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$

En la imagen 51a se muestra el patrón de anillos obtenidos por medio de la técnica de difracción de electrones el cual corresponde a la identidad cristalina de la CoFe_2O_4 ¹⁰⁸. A partir de este análisis, es posible determinar la distancia interplanar de cada plano revelado usando el recíproco de la distancia del centro hacia el anillo correspondiente al plano (Usando la carta JCPDS No. 20-1086). Los resultados se muestran en la tabla 4, en la cual a partir de la determinación de la distancia interplanar se puede deducir que el plano mostrado en la imagen 51, corresponde a la familia de planos (311)¹⁰⁸. Posteriormente se realizó el mismo análisis en CoFe_2O_4 -Cit-Au y CoFe_2O_4 -Gly-Au para determinar si surgieron cambios en la CoFe_2O_4 , así como determinar la presencia de la fase cristalina de las AuNP. Sin embargo, en ninguno de los análisis EDE (Imágenes 51b y 51c) fue posible determinar la presencia de alguna fase cristalina de Au.

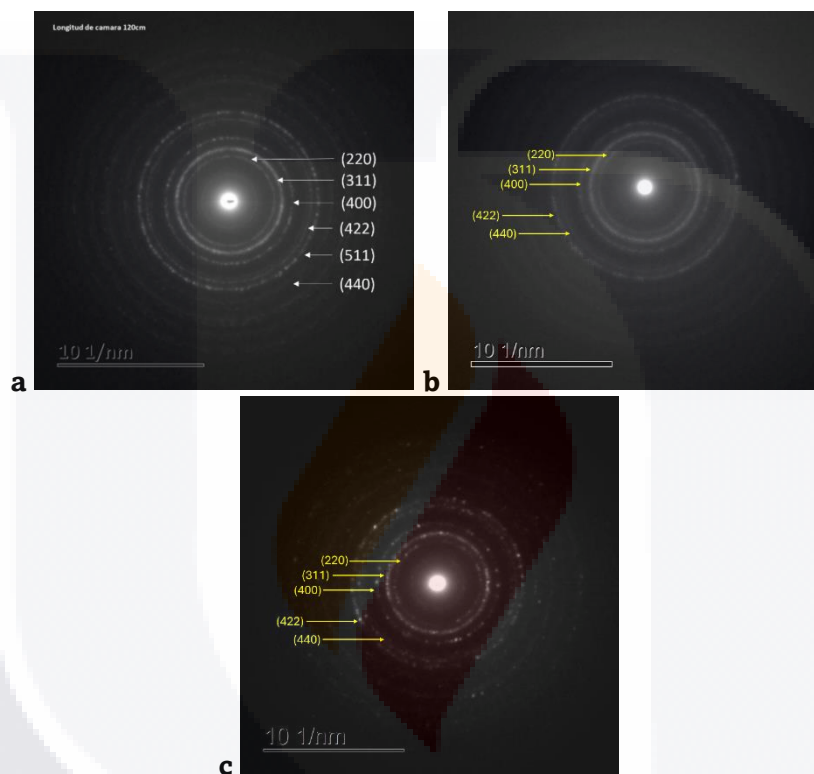


Imagen 51. Espectro de anillos obtenido por la técnica de difracción de electrones de: a) CoFe_2O_4 b) CoFe_2O_4 -Cit-Au c) CoFe_2O_4 -Gly-Au

Tabla 4. Distancias interplanares calculadas de la CoFe_2O_4 a partir del análisis SAED de la Imagen 50

Plano	d (1/nm)	1/d (nm)	1/d (Å)
220	3	0.333	3.33
311	3.619	0.276	2.76
400	4.333	0.231	2.31
422	5.32	0.188	1.88
511	5.657	0.177	1.77
440	6	0.167	1.67

Tabla 5. Distancias interplanares calculadas de la $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ a partir del análisis SAED de la Imagen 51

Plano	d (1/nm)	1/d (nm)	1/d (Å)
220	3.316	0.302	3.02
311	3.868	0.259	2.59
400	4.605	0.217	2.17
422	5.974	0.167	1.67
440	6.579	0.152	1.52

Tabla 6. Distancias interplanares calculadas de la $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$ a partir del análisis SAED de la Imagen 52

Plano	d (1/nm)	1/d (nm)	1/d (Å)
220	3.087	0.324	3.24
311	3.562	0.281	2.81
222	4.327	0.231	2.31
422	5.594	0.179	1.79
511	6.095	0.164	1.64
440	7.124	0.140	1.40

4.2.2 Difracción de rayos X (DRX)

En la imagen 52A se muestra el espectro de difracción de rayos X de la CoFe_2O_4 prístina, así como la carta cristalográfica correspondiente. Como se muestra en la tabla 7, las reflexiones de cada plano identificado coinciden con la carta cristalográfica JCPDS No. 22-1086 correspondiente a CoFe_2O_4 , por lo que se confirma la identidad cristalográfica de espinela del material sintetizado. Luego, aplicando la ecuación de Scherrer (4) y la reflexión del plano (311) se determinó el tamaño de cristal promedio

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (4)$$

Donde K es el factor de forma, λ es la longitud de onda de la radiación en nanómetros, β es la anchura media de la banda de mayor intensidad y θ es el ángulo de la mayor reflexión presentada (plano 311). Similar a los reportado por la técnica de TEM, el resultado arroja un tamaño promedio de cristal de 6.3 nm. Luego, al sintetizar los NCM (CoFe_2O_4 -Cit-Au y CoFe_2O_4 -Gly-Au) se buscó la fase cristalina del Au. Sin embargo, no fue posible detectarlo por esta técnica, ya que no se presentó ninguna de las reflexiones características del material (Imagen 52B) probablemente por la baja concentración de Au en la muestra.

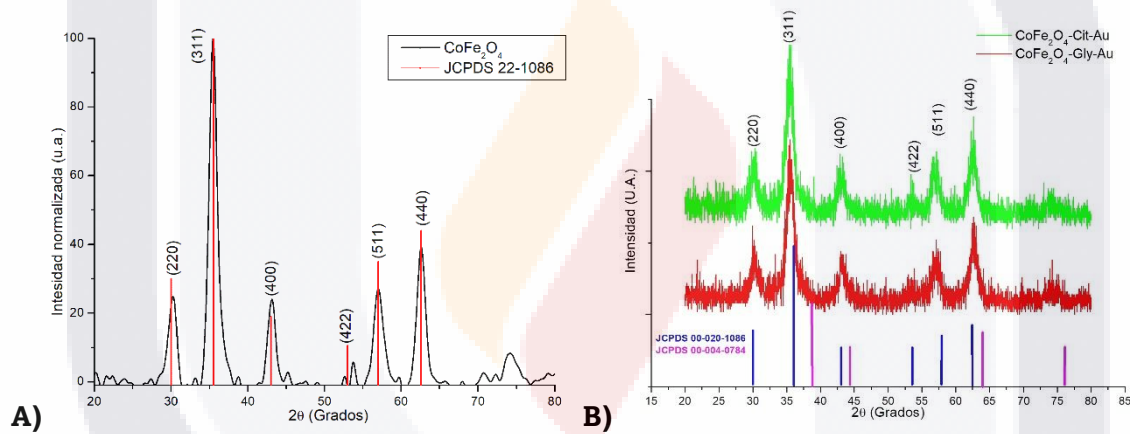


Imagen 52. Espectro de difracción de rayos X de **A)** CoFe_2O_4 **B)** NCMCit y NCMGly

Tabla 7. Posición de las reflexiones obtenidas por DRX para la CoFe_2O_4 y de la carta cristalográfica JCPDS No. 20-1086

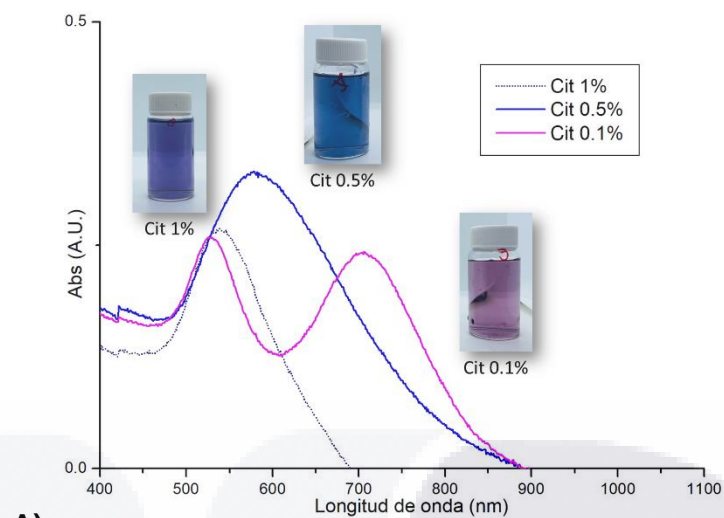
Plano (hkl)	Posición (2θ)	JCPDS No. 20-1086 (2θ)
220	30	30
311	35.5	35.5
400	43	43
422	52	53
511	57	57
440	62	62

4.2.3 Espectrofotometría UV-Vis

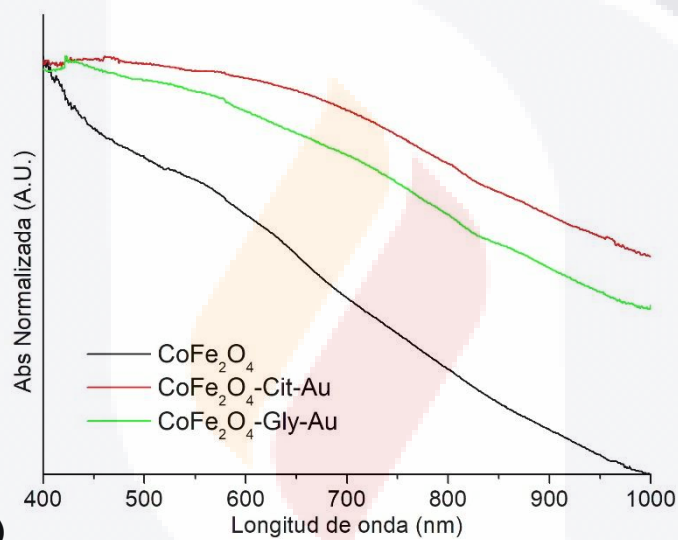
Una vez sintetizadas las AuNP, se caracterizaron por la técnica espectrofotométrica de UV-Vis para registrar en qué región del espectro electromagnético manifestarían el PRS. Como se observa en la imagen 53A, las AuNP sintetizadas muestran dos máximos de absorbancia aproximadamente en los 530 nm y 705 nm, lo que corresponde a la porción del espectro visible e infrarrojo de la luz respectivamente. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Min H. et al. (2018)⁹⁸ donde describen cómo las nanopartículas sintetizadas por esta ruta tendrán absorbancia, aproximadamente, entre la región de los 600 a 1000 nm en función de su tamaño y morfología^{56,109}. La aparición de un segundo plasmón superficial se debe a la formación de las ramificaciones a partir de los núcleos creados en la primera fase de la síntesis¹¹⁰(Imagen 41). Conforme el crecimiento longitudinal de estas estructuras aumenta, la segunda banda de absorción empieza a ensancharse, permitiendo que la respuesta plasmónica del material se extienda a un rango mucho mayor. La formación de estas estructuras secundarias depende de la cantidad de citrato utilizado en la síntesis de las AuNP. Como se muestra en la imagen 53A, cuando la concentración de citrato excede el 0.1% el segundo PRS desaparece y en su lugar el primer PRS aumenta su rango de respuesta óptima (de un rango de 100 nm a 200 nm aproximadamente) sin llegar hasta la zona de IR. Por lo tanto, el protocolo propuesto para la síntesis permite el diseño de diferentes morfologías en función de dos parámetros (Véase anexo, 6.1 análisis de respuesta de superficie), la cantidad (y potencial) del agente reductor usado y el agente estabilizante empleado (así como su concentración).

En comparación con otras metodologías esta síntesis resulta ser más eficiente para aplicaciones biomédicas¹¹¹⁻¹¹⁴. Existen rutas en donde se utilizan agentes surfactantes (comúnmente, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)) que logran generar morfologías de nanobarras con alta respuesta en el espectro IR (Véase anexo, Síntesis de nanobarras de Au). Sin embargo, a pesar de la alta estabilidad que otorga el CTAB a las nanobarras, conlleva un alto costo citotóxico. Por su composición, el CTAB actúa fuertemente como surfactante catiónico, lo que genera una lisis exacerbada de las células que entran en contacto con este (Imagen A13). Asimismo, resulta complicado remover el CTAB de la superficie de las nanobarras sin que estas cambien su morfología y, en consecuencia, se modifique su PRS. Por lo tanto, es necesario el empleo de este tipo de síntesis para generar estructuras plasmónicas reactivas en el rango IR y a la par, sean altamente biocompatibles.

En el caso de los NCM (imagen 53B), generan una respuesta en el intervalo del espectro visible e infrarrojo (de 500 nm hasta 800 nm), en contraste con la CoFe_2O_4 , que no muestra un aumento en su absorbancia, lo cual es indicativo de que las AuNP mantienen su actividad plasmónica aun cuando han sido depositadas en la superficie de la CoFe_2O_4 . En comparación con los resultados de Alves T. et al. (2022)¹¹⁵ en este proyecto se ha logrado generar una respuesta plasmónica en el rango IR, usando una morfología distinta del material. En comparación, el NCM sintetizado posee una estructura de material nanoestructurado a diferencia del diseño de núcleo-coraza. Con base en lo anterior, podemos concluir que el diseño y la ruta usados en este proyecto resultan más eficientes para crear estructuras plasmónicas con respuesta más allá del espectro visible. Esta característica es muy relevante en los NCM, ya que demuestran ser activos en la 1er ventana biológica (700-1000 nm), parámetro fundamental para materiales que requerían ser activados por luz en tejidos biológicos, ya que en este rango no existirá interacción entre la energía electromagnética y el agua y los componentes bioquímicos de los tejidos evitando pérdidas energéticas y asegurando la generación de los plasmones superficiales dentro de las células¹⁰⁴.



A)



B)

Imagen 53. Espectros obtenidos por la técnica de UV-Vis a) PRS de los coloides de AuNP sintetizados a diferentes concentraciones de citrato (Se agregan las imágenes de los coloides sintetizados) b) Espectro de CoFe_2O_4 y ambos NCM

4.2.4 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF)

Para el análisis del CoFe_2O_4 se identificaron las vibraciones más características del material. En la región de 500 a 2000 cm^{-1} se ubican las vibraciones de los materiales metálicos, por la rigidez de estos enlaces es necesario usar energías más elevadas para su excitación. En la imagen 54, en los 526 cm^{-1} se registra la vibración correspondiente de estiramiento en $\text{Fe(III)-O}^{(2)}$, en 694 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de $\text{Co(II)-O}^{(2)}$, en los 909 cm^{-1} se registra la vibración de estiramiento de Fe-Co , en 1019 cm^{-1} , en 1196 y 1081 cm^{-1} se ubica vibraciones características de las ferritas por el enlace Fe-O , en el caso de las vibraciones en las bandas ubicadas en 2911 y 3314 cm^{-1} se registran vibraciones de los enlaces O-H de moléculas de agua remanentes en el material así como vibraciones originadas por los grupos $\text{Fe-OH}^{116-118}$.

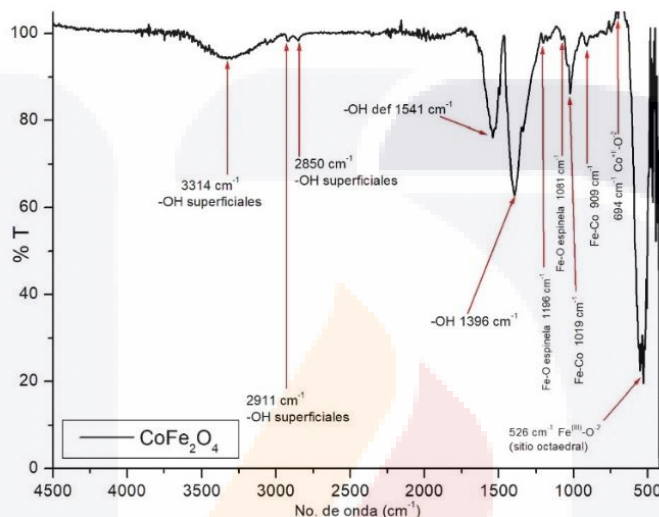


Imagen 54. Espectro EITF de CoFe_2O_4

Una vez funcionalizadas las NP de CoFe_2O_4 se buscó identificar las bandas características de ambos materiales precursores y con ello, corroborar la presencia de ambos (Gly y Cit) una vez sometidos a la reacción. Como se muestra en la imagen 55, en la región de 3500 a 300 cm^{-1} se registra una banda amplia con un máximo aproximadamente en los 3304 cm^{-1} originado por las vibraciones de estiramiento en los enlaces de los grupos -OH provenientes de H_2O , -COOH y que están siendo deformadas por interacciones del tipo puente de hidrógeno¹¹⁸. En los 1556 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente a la vibración de estiramiento asimétrico del grupo CO_2^- perteneciente a la sal de citrato. En los 2360 cm^{-1} se ubica la banda correspondiente a la vibración del grupo CO_2 (ya sea atmosférico o del material), en 1213 cm^{-1} , 1039 cm^{-1} , 917 cm^{-1} y 549 cm^{-1} se encuentran las bandas principales de las vibraciones de los enlaces de los metales con el oxígeno (Fe-O y Co-O) correspondientes a la $\text{CoFe}_2\text{O}_4^{116-118}$.

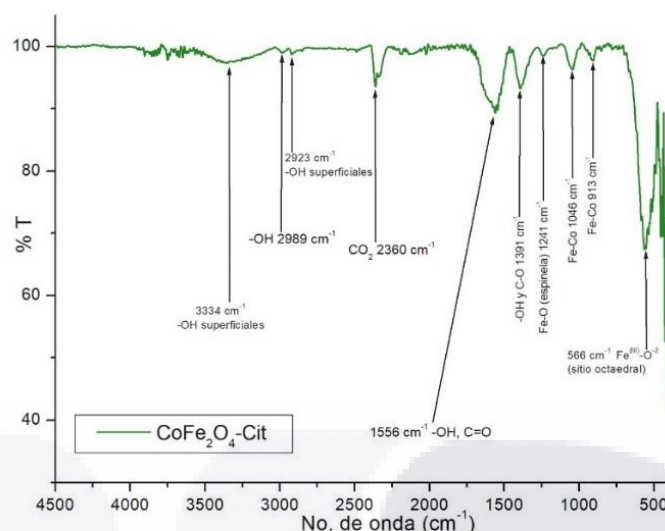


Imagen 55. Espectro EITF de las NP de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$

En la imagen 56, en la región de 3500 a 3000 cm^{-1} se registra una banda amplia con un máximo aproximadamente en los 3120 cm^{-1} originado por interacciones del tipo puente de H, causando que las vibraciones en los enlaces de los grupos -OH (provenientes de H_2O y -COOH) y NH_2 estén siendo deformadas¹¹⁸. Lo anterior demuestra la presencia de la Gly interaccionando con la superficie de la CoFe_2O_4 y su depósito en ésta¹¹⁹. En los 1573 cm^{-1} se registra la vibración de deformación de los enlaces en el grupo - NH_2 , en 1213 cm^{-1} , 1039 cm^{-1} , 917 cm^{-1} y 549 cm^{-1} se encuentra las bandas principales de las vibraciones de Fe-Co, los sitios octaedrales (Fe-O) y los tetraedrales (Co-O) correspondientes a la CoFe_2O_4 ¹¹⁶⁻¹¹⁸; en 772 cm^{-1} se ubica la vibración de aleteo de los enlaces en el grupo - NH_2 ¹¹⁸.

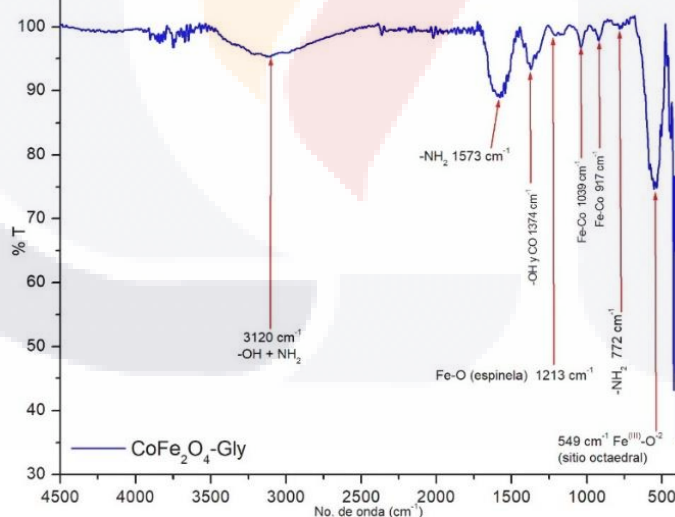


Imagen 56. Espectro EITF de las NP de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly}$

4.2.5 Análisis termogravimétrico (ATG)

Una vez corroborada la presencia de las moléculas orgánicas en la superficie de los NCM, se realizó el análisis ATG para determinar de manera cuantitativa la cantidad de éstas en cada material. Para dicho análisis se utilizaron 10 mg de muestra y se realizó en atmósfera de N_2 . Con esto, se logró obtener los termogramas correspondientes y se realizó la primera derivada (DATG) de cada uno para obtener el gráfico correspondiente y con ello visualizar de manera más precisa las zonas donde las cinéticas reflejan mayor pérdida de masa¹²⁰. En todos los casos para este análisis, es posible atribuir la primera pérdida (hasta los 100 °C) a la desorción y evaporación del agua presente en cada una de las muestras. Para el caso de los NCM funcionalizados con citrato (Imágenes 57 A-B), la mayor pérdida de masa inicia a partir de los 300 °C, lo cual coincide con el punto de fusión reportado para esta molécula. A partir de esta temperatura es notoria la descomposición de los componentes orgánicos hasta el punto de oxidarlos a su grado máximo (CO_2) y posteriormente (< 600 °C) se denotan dos pérdidas posteriores de masa las cuales corresponden al punto de autoignición de los restos de materia orgánica¹²¹. En el caso de los NCM funcionalizados con Gly (Imágenes 57 C-D), se pueden observar fenómenos similares a los mostrados en los materiales con citrato. Los puntos donde se muestra mayor pérdida de masa comienzan a partir de la temperatura correspondiente a la temperatura de fusión de la glicina (250 °C) y terminan de igual manera a partir de los 600 °C con la autoignición de la materia orgánica remanente. Finalizado el análisis, se determinó la cantidad de masa orgánica en cada muestra (Tabla 8). Por lo tanto, se establece que las metodologías de funcionalización y síntesis de los NCM resultan eficientes para la creación de estos, sin efectuar pérdidas considerables de las moléculas orgánicas y, con ello, preservar las cualidades de biocompatibilidad y estabilidad coloidal de los NCM.

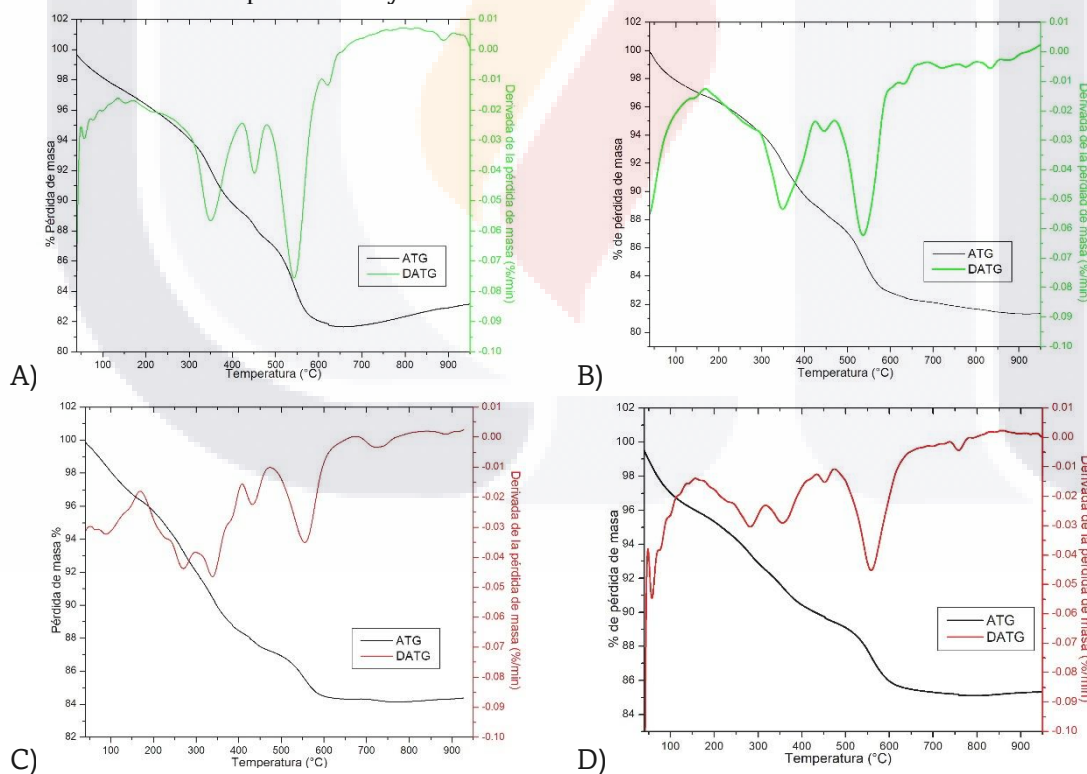


Imagen 57. Curva termogravimétrica (ATG) y la respectiva derivada (DATG) de los materiales sintetizados. **A)** $CoFe_2O_4$ -Cit **B)** $CoFe_2O_4$ -Cit-Au **C)** $CoFe_2O_4$ -Gly **D)** $CoFe_2O_4$ -Cit-Au

Tabla 8. Resultados de la prueba TGA para cada nanomaterial sintetizado

Muestra	Cantidad de Cit/Gly (mg) por cada 10 mg CoFe ₂ O ₄
CoFe ₂ O ₄ -Cit	1.8
CoFe ₂ O ₄ -Cit-Au	1.7
CoFe ₂ O ₄ -Gly	1.6
CoFe ₂ O ₄ -Gly-Au	1.5

De acuerdo con las investigaciones de Cholic F. et al. (2022)¹²², usando los resultados obtenidos en el análisis TGA es posible determinar el grosor de la capa orgánica (Δ) que recubre a las nanopartículas a partir de la fracción másica del núcleo (η_c) y la fracción másica del recubrimiento (η_s) aplicada en (5)

$$\Delta = \frac{\sigma_c}{2} \left(\left[\frac{\eta_c \rho_s}{\eta_c \rho_s + \eta_s \rho_c} \right]^{-\frac{1}{3}} - 1 \right) \quad (5)$$

Donde ρ_s y ρ_c son la densidad del material orgánico y la densidad del núcleo metálico respectivamente ($\rho_{s-Cit}=0.6\text{g/cm}^3$, $\rho_{s-Gly}=1.161\text{g/cm}^3$ y $\rho_c=5.29\text{g/cm}^3$). Sustituyendo los valores obtenidos en (6) obtenemos que los valores de Δ calculados fueron 0.20 nm, 0.23 nm, 0.82 nm y 0.77 nm para CoFe₂O₄-Cit, CoFe₂O₄-Cit-Au, CoFe₂O₄-Gly, CoFe₂O₄-Gly-Au respectivamente. Luego, con estos resultados aplicados en (6), junto con el diámetro promedio de CoFe₂O₄ (σ_c), es posible determinar el diámetro promedio de una nanopartícula junto con el recubrimiento orgánico (σ_{cs}).

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta \quad (6)$$

Como resultado, se obtiene que el σ_{cs} es CoFe₂O₄-Gly=8.74 nm, CoFe₂O₄-Gly-Au=8.64 nm, CoFe₂O₄-Cit=7.49 nm y CoFe₂O₄-Cit-Au=7.55 nm. Los resultados demuestran correlación con lo observado en los análisis VSM, donde la Ms de CoFe₂O₄-Gly-Au desciende de 60 emu/g a 55 emu/g en comparación con CoFe₂O₄-Cit-Au donde no hay disminución. Por lo tanto, el grosor de la capa orgánica al realizar la funcionalización no genera interferencia de manera no significativa para el caso de CoFe₂O₄-Cit mientras que en los casos de Gly parece tener una ligera influencia.

4.2.6 Magnetometría vibracional de la muestra VSM

En la imagen 58A se muestra la curva de histéresis de la CoFe_2O_4 prístina. Por la forma, la ausencia de remanencia y coercitividad magnética (Imagen 58B) indica la presencia de un material superparamagnético^{34,123}, con una magnetización de saturación (M_s) de 59 emu/g lo que es mayor que en materiales similares reportados³⁴. Asimismo, es notorio cómo el carácter superparamagnético de la CoFe_2O_4 se mantiene aun después de la síntesis de los NCM. Como se muestra en la imagen 60, la curva de magnetización se conserva sin aumento de histéresis y los valores de M_s son 55 emu/g para $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$ y 60 emu/g para $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$. Por lo tanto, la ruta de síntesis propuesta no muestra modificaciones en las características físicas de los nanomateriales componentes del NCM. Sin embargo, la temperatura de bloqueo (T_b) (Imagen 59) muestra un aumento significativo en los valores registrados. Los resultados fueron 297 K, 322 K y 311 K para CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ respectivamente. Esto determina que una vez formado el NCM la respuesta magnética de los materiales seguirá presente en temperaturas mayores a 37 °C, lo cual determina que los materiales son indicados para ejercer la THM²⁹.

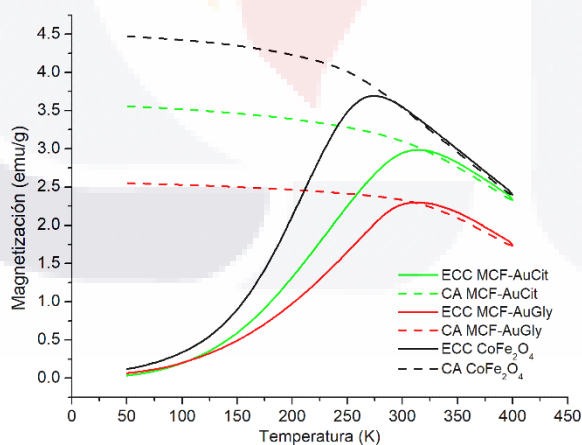
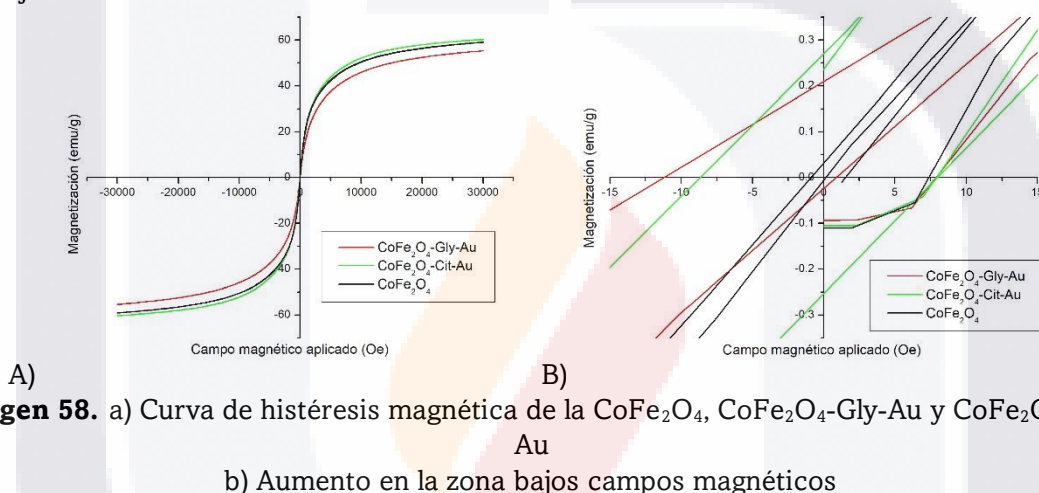


Imagen 59. Curva de magnetización en función de la temperatura con enfriamiento a campo cero y enfriamiento con campo aplicado (100 Oe)

A partir del análisis VSM es posible determinar si el comportamiento del material es del tipo paramagnético o superparamagnético observando la forma de la curva de histéresis M/H . Sin embargo, es necesario analizar los datos de manera precisa para cuantificar cómo es que el comportamiento del material se ajusta a un comportamiento paramagnético o

superparamagnético con referencia a un modelo teórico calculado. Con base en las características nanométricas del material, se puede asumir que cada una de las nanopartículas actúa como un monodominio y, por lo tanto, posee un solo momento magnético por partícula¹²⁴. Asimismo, con base en las curvas de histéresis es posible despreciar la influencia de la anisotropía de las nanopartículas por la susceptibilidad que muestran ante los campos magnéticos aplicados. Con lo anterior como base del análisis, es posible aplicar el modelo Langevin (7) para analizar el ajuste del material al comportamiento superparamagnético; donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura a la cual se realizó el análisis VSM, H es el campo magnético aplicado y μ es el momento magnético promedio por partícula medido en magnetones de Bohr¹²⁵.

$$L(\mu, H) = Ms * [\cot h(\frac{\mu H}{k_B T}) - (\frac{k_B T}{\mu H})] \quad (7)$$

Usando el software Originlab y los datos de las curvas M/H , se aplicó el ajuste, obteniendo resultados aceptables (imágenes 60-62) basados en la correlación del valor de R^2 mostrado en los respectivos gráficos. En todos los casos, la discrepancia entre el ajuste de Langevin y los datos experimentales puede ser atribuida a la distribución de tamaño de los NCM¹²⁵. Una de las bases del modelo de Langevin, es que se asume que los tamaños de nanopartícula siguen una distribución logarítmica y, a partir de esto, se realiza la distribución de los momentos magnéticos. Sin embargo, la CoFe_2O_4 prístina sigue una distribución normal en la dispersión de los tamaños de partícula, por lo que la discrepancia entre el ajuste de Langevin y los datos experimentales puede ser atribuida a este factor¹²⁶. Usando el ajuste de Langevin y los datos de cada muestra, se calculó el valor promedio de magnetización por partícula $\langle \mu \rangle$ utilizando el valor $P1$ indicado en las curvas de magnetización calculadas. Los resultados obtenidos son de $5001 \mu_B$, $4510 \mu_B$ y $3617 \mu_B$ para CoFe_2O_4 prístina, NCMCit y NCMGly respectivamente, lo cual es consistente con los resultados obtenidos por VSM, ya que estos describen una elevada susceptibilidad magnética de cada NCM respecto al campo magnético aplicado.

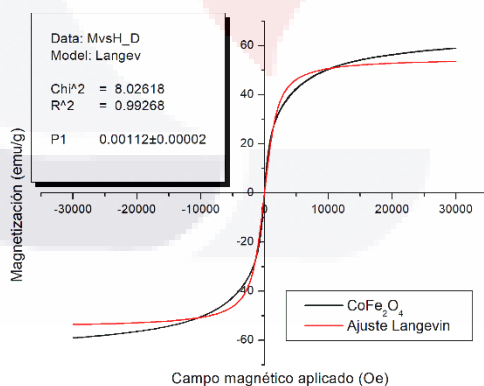


Imagen 60. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de la CoFe_2O_4 prístina

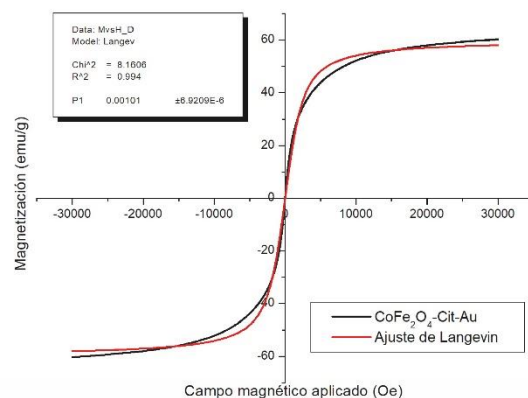


Imagen 61. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de NCMCit

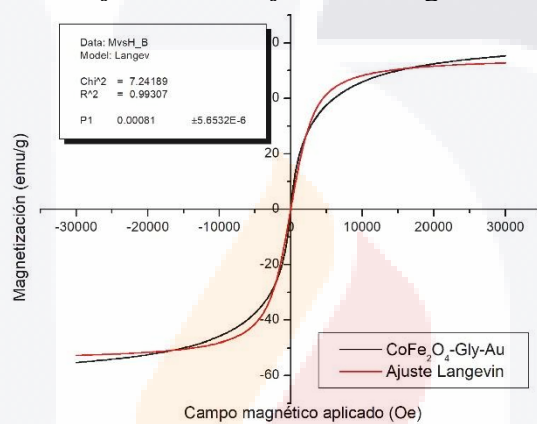


Imagen 62. Curva MvH junto con el ajuste de Langevin calculado de NCMGly

4.2.7 Pruebas de calorimetría magnética

Se realizaron pruebas de calorimetría magnética para determinar la capacidad de los materiales de convertir los campos magnéticos en energía térmica mediante la Tasa de Absorción Específica (TAE). En la tabla 9 se muestran los resultados de la prueba junto con la desviación estándar (σ) asociada a ellos. Estos ensayos se realizaron por triplicado, a una frecuencia de 530 kHz durante 5 min. En la imagen 63 se muestran gráficamente los resultados en términos de la TAE, en estos se puede apreciar mayor eficiencia de la CoFe_2O_4 prístina en comparación con los nanomateriales modificados, lo que quiere decir que la adición de moléculas orgánicas en la superficie de las nanopartículas crea una capa intermedia (Véase el análisis TGA) que disminuye la interacción con los campos magnéticos reduciendo la conversión energética. Sin embargo, cuando los materiales han sido funcionalizados, las barras de error en los resultados disminuyen considerablemente, lo que demuestra un comportamiento más estable a lo largo del tiempo a causa de una menor agregación de los coloides sintetizados.

Lo anterior se refleja en la σ promedio de cada nanomaterial (Tabla 9), por lo que se determina que los efectos de la Gly difieren de los del Cit debido a sus propiedades químicas distintas. A diferencia de la Gly, aminoácido simple de un solo ácido carboxílico, el Cit genera mayor carga electrostática superficial en el material debido a su característica de poseer tres grupos carboxílicos. Por lo tanto, se genera mayor repulsión electrostática entre las partículas con Cit, lo que aumenta su estabilidad coloidal y evita fenómenos de agregación con el paso del tiempo^{34,127,128}. Este fenómeno se observa claramente en los resultados obtenidos por la técnica de DLS, donde los materiales funcionalizados con Cit demuestran tener un menor índice de agregación y por consecuencia, mejor estabilidad coloidal (Tabla 10). En estos, también se describe una mejor dinámica coloidal a comparación de los materiales con Gly, lo cual se observa consistentemente en distintas caracterizaciones.

En comparación con los resultados de Sabale S. et al. (2019)¹²⁹ nuestros materiales resultan más eficientes para absorber la energía de los campos magnéticos; en sus resultados se demuestra cómo, usando concentraciones 5 veces mayores a las aplicadas en nuestra investigación y campos magnéticos 10 veces mayores a los de este análisis, se genera una TAE similar o menor en comparación con los resultados obtenidos. Por lo tanto, es posible demostrar la eficiencia de nuestros materiales con base en lo reportado en investigaciones similares.

Tabla 9. Resultados de la prueba de calorimetría a campo magnético variable. Se presenta el resultado de cada material junto con el error estándar asociado a estos

Campo magnético (mT)	CoFe_2O_4	σ	CoFe_2O_4 -Gly	σ	CoFe_2O_4 -GlyAu	σ	CoFe_2O_4 -Cit	σ	CoFe_2O_4 -CitAu	σ
15	16.0742	5.1648	10.5512	3.5735	7.9115	2.8756	6.8339	1.9330	9.6278	1.5907
20	22.1719	5.0851	12.5052	3.4273	12.9208	4.3293	12.0360	1.5986	9.7813	1.3631
25	32.2741	12.1185	12.4633	4.8779	16.0882	6.6129	18.4375	1.0926	14.6929	2.3742
30	33.3206	1.6169	14.8220	4.5175	22.1021	4.8101	18.4514	0.5191	19.6463	1.6354
Promedio	N/A	5.9963	N/A	4.0990	N/A	4.6570	N/A	1.2858	N/A	1.7409

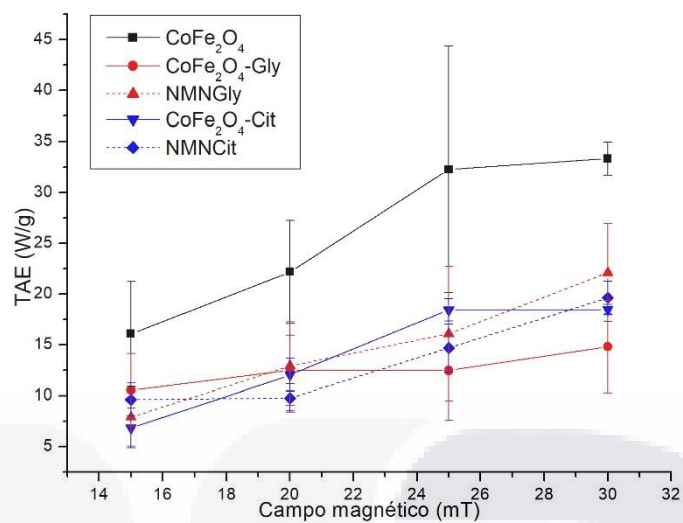


Imagen 63. Imagen de los resultados de la prueba de calorimetría magnética.

4.2.8 Análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS)

Una vez determinado el tamaño promedio de partícula, se procedió a analizar el comportamiento de los materiales cuando se encuentran suspendidos en la GA al formar el ferrofluido. Mediante la técnica de DLS fue posible determinar la dinámica de los materiales y cómo estos podrían agregarse durante el tiempo. En las imágenes 64, 65 y 66 se muestran los resultados obtenidos mediante esta técnica de cada uno de la CoFe_2O_4 y de los NCM, para cada análisis se tomaron tres lecturas que establecen distintos tamaños registrados durante el análisis y el promedio establecido por el equipo como valor *Promedio Z* (PZ) y el índice de polidispersión que describe el grado de agregación de los materiales analizados (Cuanto más se acerque al valor de 1, mayor es la tendencia a la agregación).

Como se puede apreciar en todos los casos (Tabla 10) los materiales presentan un amplio rango de dispersión en los datos, además los datos corresponden a materiales que forman microagregados (Lecturas $>> 100$ nm) y en otros casos como nanoagregados (Lectura < 100 nm). Este efecto ha sido descrito previamente para esta clase de materiales, debido a su carácter magnético y por sus cargas superficiales tienden a formar grandes agregados en suspensiones¹³⁰. Sin embargo, cada molécula orgánica usada para funcionalizar a la CoFe_2O_4 agrega un carácter distinto al NCM, siendo el Cit quien demuestra mejores características para efectos de dispersión ya que su valor PZ se encuentra dentro del rango nanométrico (PZ < 100 nm) lo que quiere decir que la dispersión coloidal es adecuada en este caso. Estos mismos resultados son concordantes con lo observado en los análisis de estabilidad coloidal (Véase anexo 6.4 Pruebas de estabilidad coloidal) donde los materiales funcionalizados con Cit demuestran mayor tiempo en suspensión en comparación con los demás materiales. Este mismo efecto parece tener influencia en los resultados obtenidos en las caracterizaciones biológicas (Pruebas de hemólisis, CCK-8 y producción de ROS)¹³¹.

Tabla 10. Resultados del análisis DLS para la CoFe_2O_4 en ferrofluido de GA 3%

Lectura	CoFe_2O_4		$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Gly-Au}$		$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$	
	diam. (nm)	Desv. Std.	diam. (nm)	Desv. Std.	diam. (nm)	Desv. Std.
Lectura 1	320.8	125.5	343.7	146.7	11.21	6.55
Lectura 2	38.03	12.15	51.66	14.41	526.4	206.6
Lectura 3	10.28	2.418	14.36	3.625	5177	766.6
Promedio Z	145.9	-	215	-	83.18	-
Polidispertion index	0.464	-	0.608	-	0.603	-

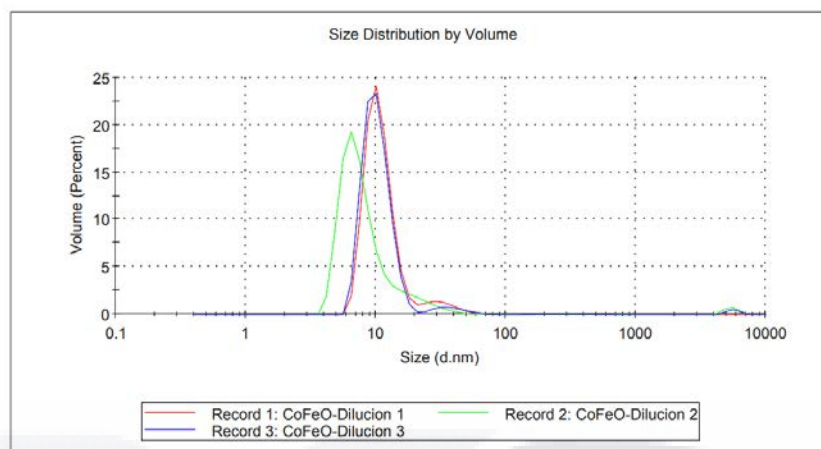


Imagen 64. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para CoFe₂O₄

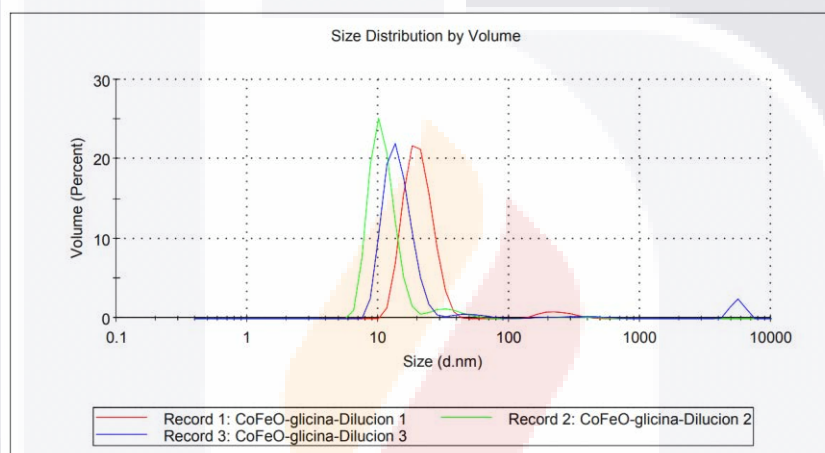


Imagen 65. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para CoFe₂O₄-Gly-Au

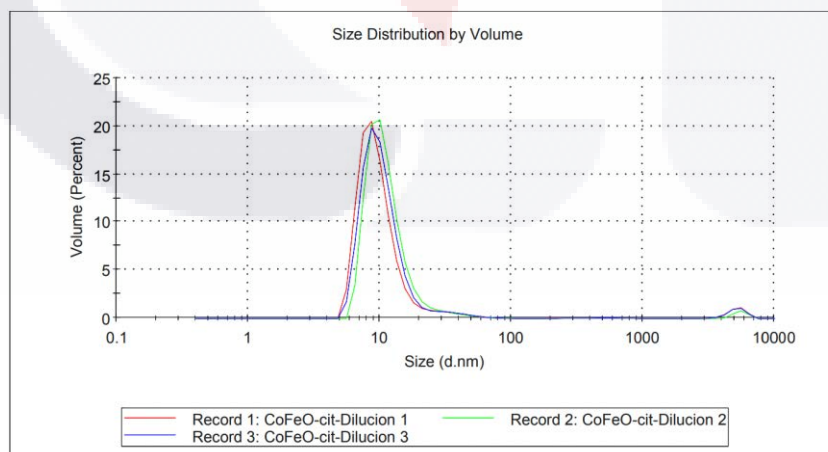


Imagen 66. Gráfico de los resultados registrados en la prueba de DLS para CoFe₂O₄-Cit-Au

4.3 Pruebas biológicas

4.3.1 Prueba de hemólisis

Es importante conocer las propiedades de biocompatibilidad de cualquier material que planea ser aplicado en el área biomédica y, con esto, su potencial citotóxico. Debido al tamaño de estos materiales, las interacciones que se generan en un ambiente biológico y fisiológico serán más complejas a las de materiales en su forma macrométrica¹³². A partir de esto, la prueba de hemólisis se utiliza como prueba preliminar para determinar los anteriores parámetros de manera rápida y sin altos costos. Cuando los materiales entran en contacto con las células, inicialmente interaccionarán con las membranas celulares de estos, y en función de su composición, forma y tamaño los nanomateriales pueden generar inestabilidad en las membranas causando su ruptura¹³³.

En la tabla 11 se muestran los resultados del porcentaje de hemólisis de los materiales durante 3 h de interacción en obscuridad (NR) y aquellos que interaccionaron por 3 h con 10 min de irradiación de luz IR de 850 nm (Rad) (Imagen 67a). Como es posible observar (Imagen 67b), todos los materiales resultan biocompatibles y no hemolíticos (hemólisis < 5%) hasta una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Imagen 68). Sin embargo, es notorio que los NCM, al ser irradiados, elevan su porcentaje de hemólisis, lo que demuestra un aumento de la citotoxicidad, la cual no se presenta en el caso de CoFe_2O_4 . Por lo tanto, podemos concluir que existe activación de la TFD mediante el uso de luz IR de 850 nm, evidencia relevante para demostrar la generación de ROS como modelo de daño celular.

A partir de estos análisis se usará la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en posteriores análisis para determinar la capacidad del material de demostrar un aumento de la toxicidad sin llegar a concentraciones elevadas que puedan causar daños secundarios por bioacumulación o daño mecánico por agregación de las nanopartículas.

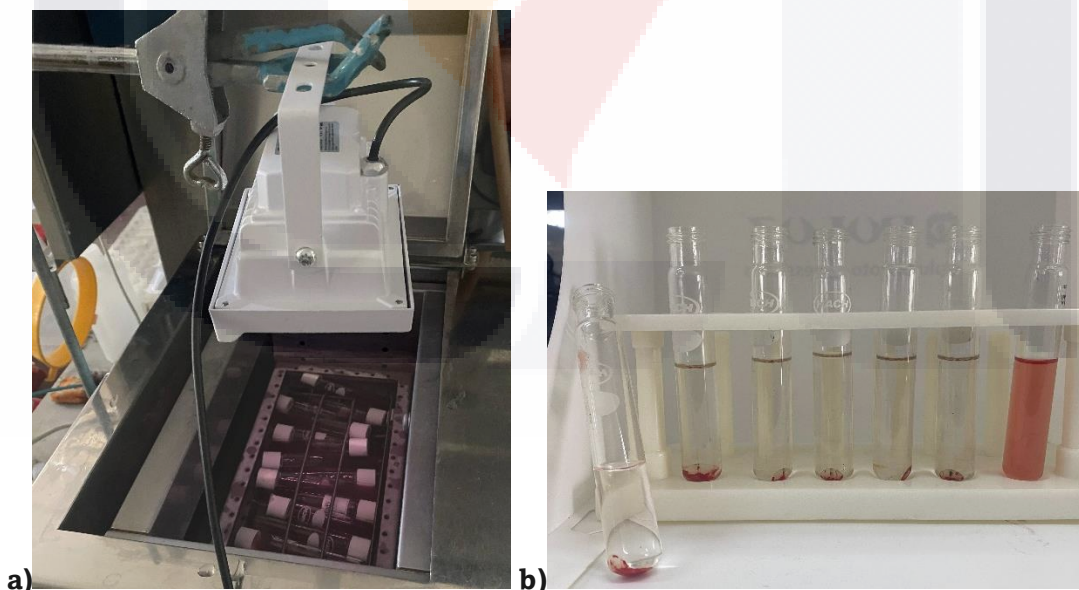


Imagen 67. Fotografías del experimento de hemólisis. a) Lámpara de luz IR irradiando a los tubos b) Resultado final del ensayo en donde se aprecia la ausencia de hemólisis significativa, de izquierda a derecha se muestra: control negativo, concentración 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ y control positivo. Los resultados para todos los ensayos mencionados en la tabla 10 lucen de manera igual a los mostrados sin diferencias significativas

Tabla 11. Promedio de los porcentajes de hemólisis de las concentraciones usadas

Material	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	25 µg/mL	30 µg/mL
CoFe2O4 Rad	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CoFe2O4 NR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NCMCit Rad	0.00	0.00	1.72	1.96	2.03
NCMCit NR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NCMGly Rad	0.00	0.00	3.66	1.19	1.01
NCMGly NR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

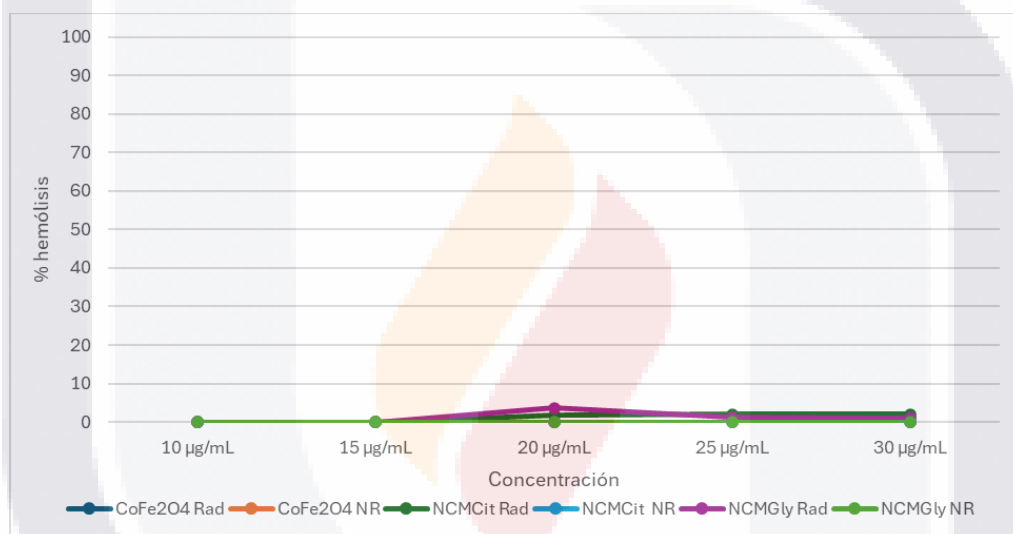


Imagen 68. Resultados de la prueba de hemólisis con irradiación de luz IR (Rad) y sin irradiación de luz IR (NR)

4.3.2 Producción de ROS

Los ROS son moléculas de muy bajo peso molecular y tamaño, además de que se encuentran en estado gaseoso a temperatura ambiente. Esto hace que su detección deba ser pronta al emitirse y de la manera más específica posible. La sonda MSG reacciona fácilmente con los ROS con los que entra en contacto y está diseñada para tener afinidad por las mitocondrias y sus estructuras internas.

Para determinar la capacidad de creación de ROS de los NCM, se realizaron ensayos de control agregando MSG a CoFe_2O_4 prístina (Imagen 69), NCMGly (Imagen 70) y NCMCit (Imagen 71) y se les irradió con luz IR por 10 min. Se observa que en ambos NCM se generó fluorescencia como respuesta al estímulo luminoso, lo que confirma la creación de ROS mediante la irradiación IR. Sin embargo, la distribución de la señal es distinta en ambos NCM; en NCMCit existe una fuerte y localizada señal de fluorescencia, mientras que en NCMGly las señales están distribuidas en todo el campo, pero con menor intensidad. Con esto, se puede correlacionar la disminución de la viabilidad de la TFD a causa de la generación de ROS. Asimismo, se realizaron los controles de D548 (Imagen 72) y A549 (Imagen 73) después de ser irradiados con luz IR por 10 min para corroborar que el daño generado era por la exposición a los ROS y no por estrés celular a causa de la luz IR.

Como es visible, existe una muy leve respuesta fluorescente que es generada por el metabolismo intrínseco de las células; estas, requieren de la producción endógena de ROS para su correcto metabolismo a cantidades muy bajas¹³⁴. En las imágenes 74-77 se presentan las micrografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia en campo claro y por fluorescencia cuando las células fueron irradiadas por 1, 5 y 10 min. Así, cuando el tiempo aumentó, las señales fluorescentes empezaron a aparecer con mayor frecuencia y en más células. En las imágenes de campo claro, tanto en la línea D548 (Imágenes 74 y 75) como en A549 (Imágenes 76 y 77), se puede apreciar la morfología conservada de las células aun después de los 10 min de irradiación. Por lo tanto, se puede deducir que el daño que los NMNs generan es por la TFD que produce ROS y no por algún daño mecánico que pueda generar los nanomateriales por efectos de agregación o similares^{88,135-140}.

De forma complementaria, la cantidad de células con forma esférica empieza a aumentar. En estas células, cuando empiezan a adoptar la morfología esférica, aumenta la fluorescencia, lo que indica una mayor concentración de ROS. En estas células, se puede notar el abultamiento, disminución de tamaño y formación esférica y condensación de la cromatina; todas estas características de apoptosis¹⁴¹⁻¹⁴⁴. En conclusión, queda demostrada la producción de ROS mediante el TFD y este fenómeno en consecuencia aumenta la muerte celular

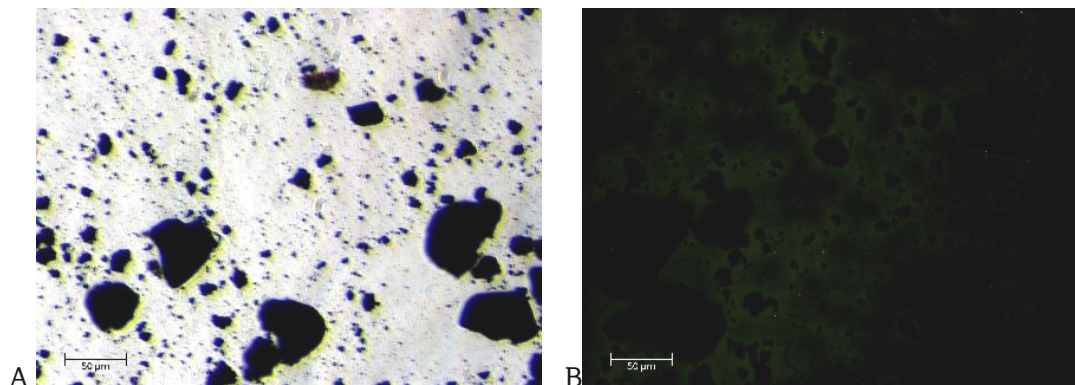


Imagen 69. CoFe_2O_4 pristino irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG A) Micrografía en campo claro B) Micrografía de fluorescencia. Ambas imágenes poseen un aumento de 400x

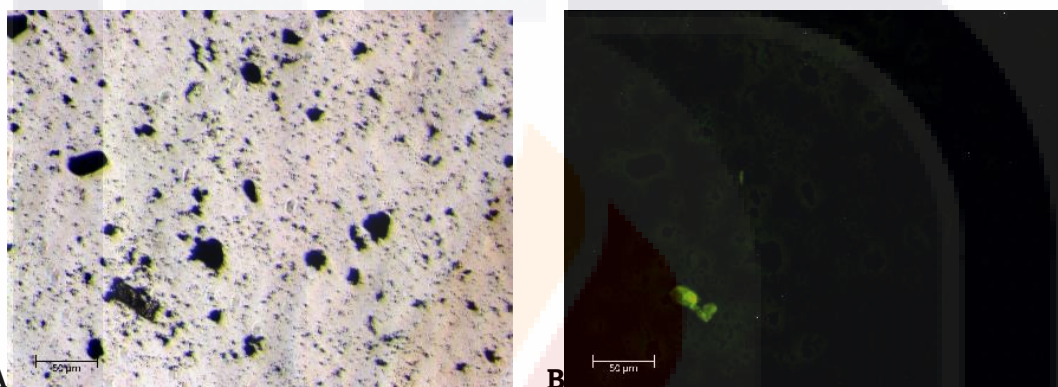


Imagen 70. NCMCit irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG A) Micrografía en campo claro B) Micrografía de fluorescencia. Ambas imágenes poseen un aumento de 400x

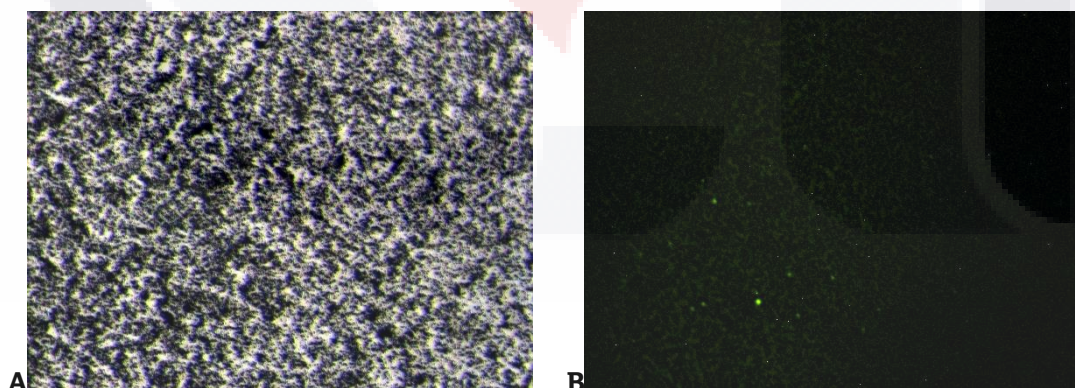


Imagen 71. NCMGly irradiado con luz IR por 10 min en conjunto con la sonda MSG A) Micrografía en campo claro B) Micrografía de fluorescencia. Ambas imágenes poseen un aumento de 400x

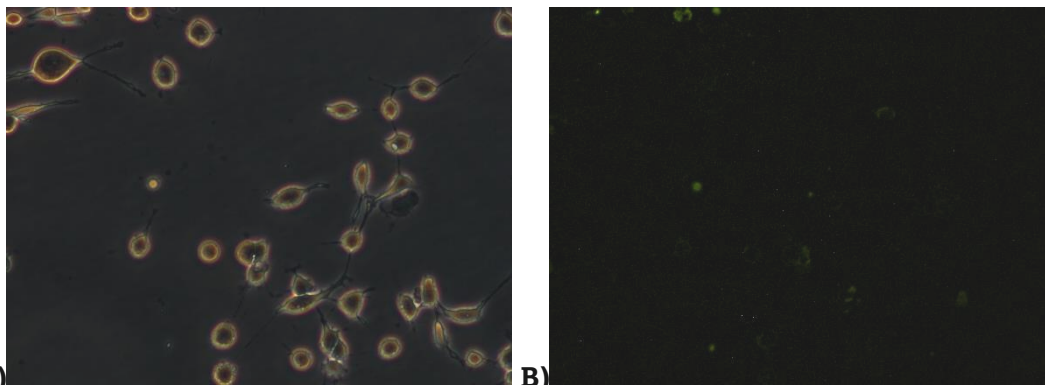


Imagen 72. Micrografías de los controles de la línea D548 irradiados por 10 min con luz IR A) Campo claro B) fluorescencia. Ambas imágenes poseen un aumento de 400x

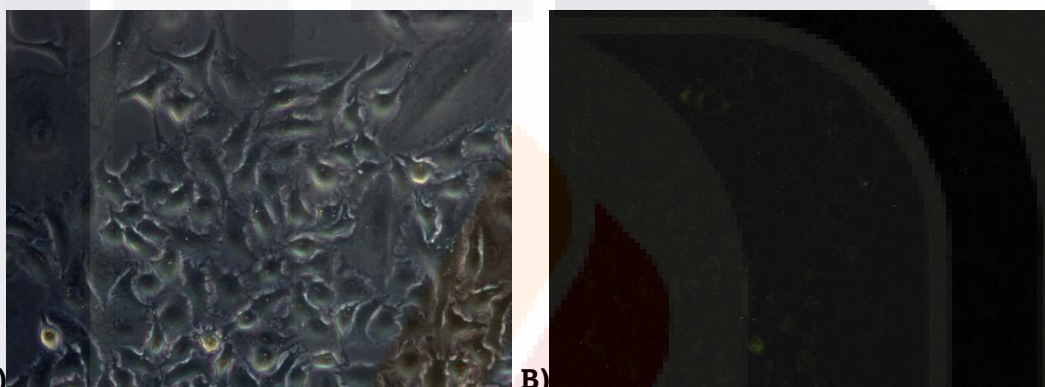


Imagen 73. Micrografías de los controles de la línea A549 irradiados por 10 min con luz IR A) Campo claro B) fluorescencia. Ambas imágenes poseen un aumento de 400x

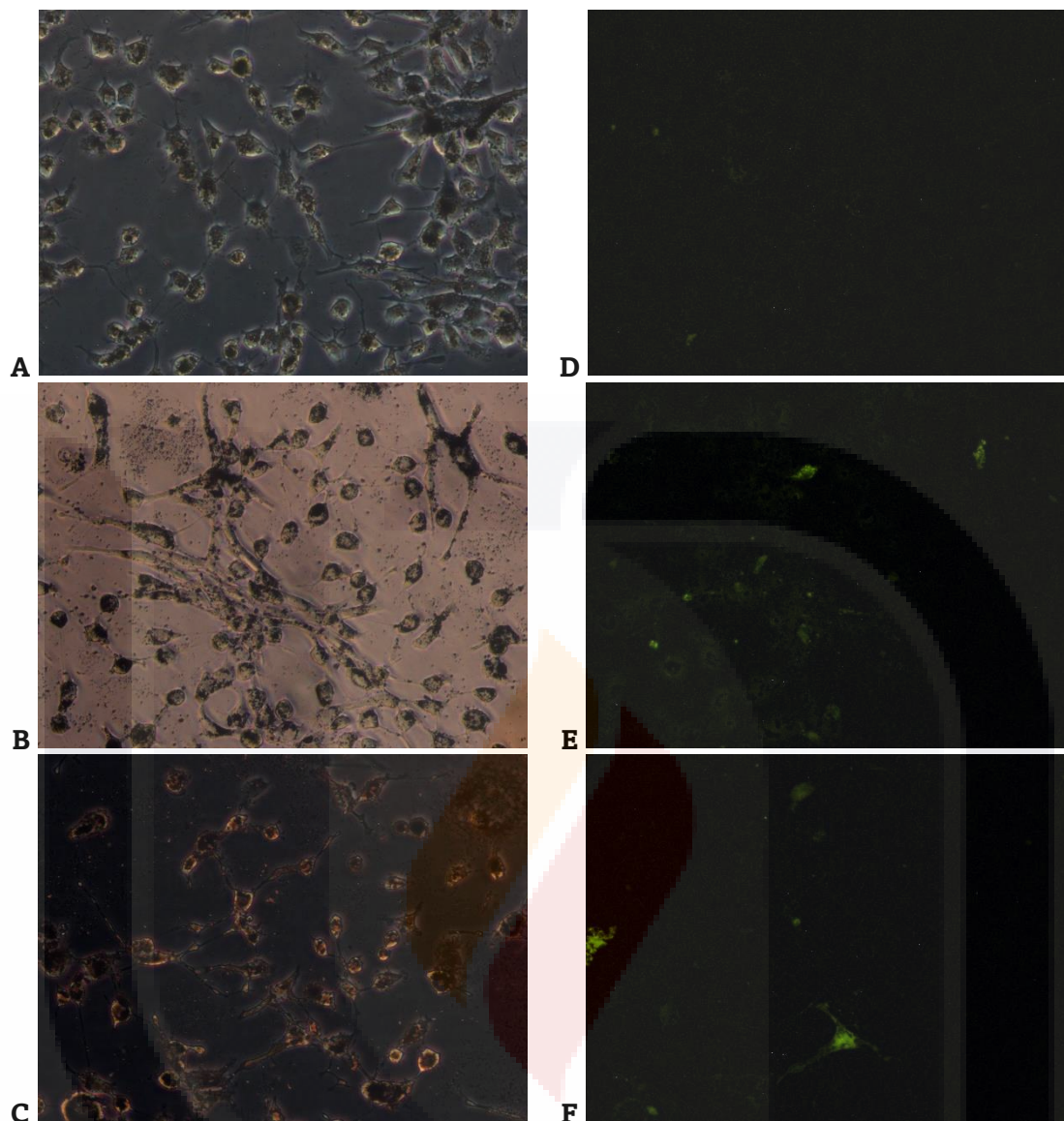


Imagen 74. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea D548 con NCMGly por irradiación de luz IR. Micrografías en campo claro (A) y fluorescencia (D) después de 1 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (B) y fluorescencia (E) después de 5 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (C) y fluorescencia (F) después de 10 min de irradiación IR. Todas las imágenes poseen un aumento de 400x

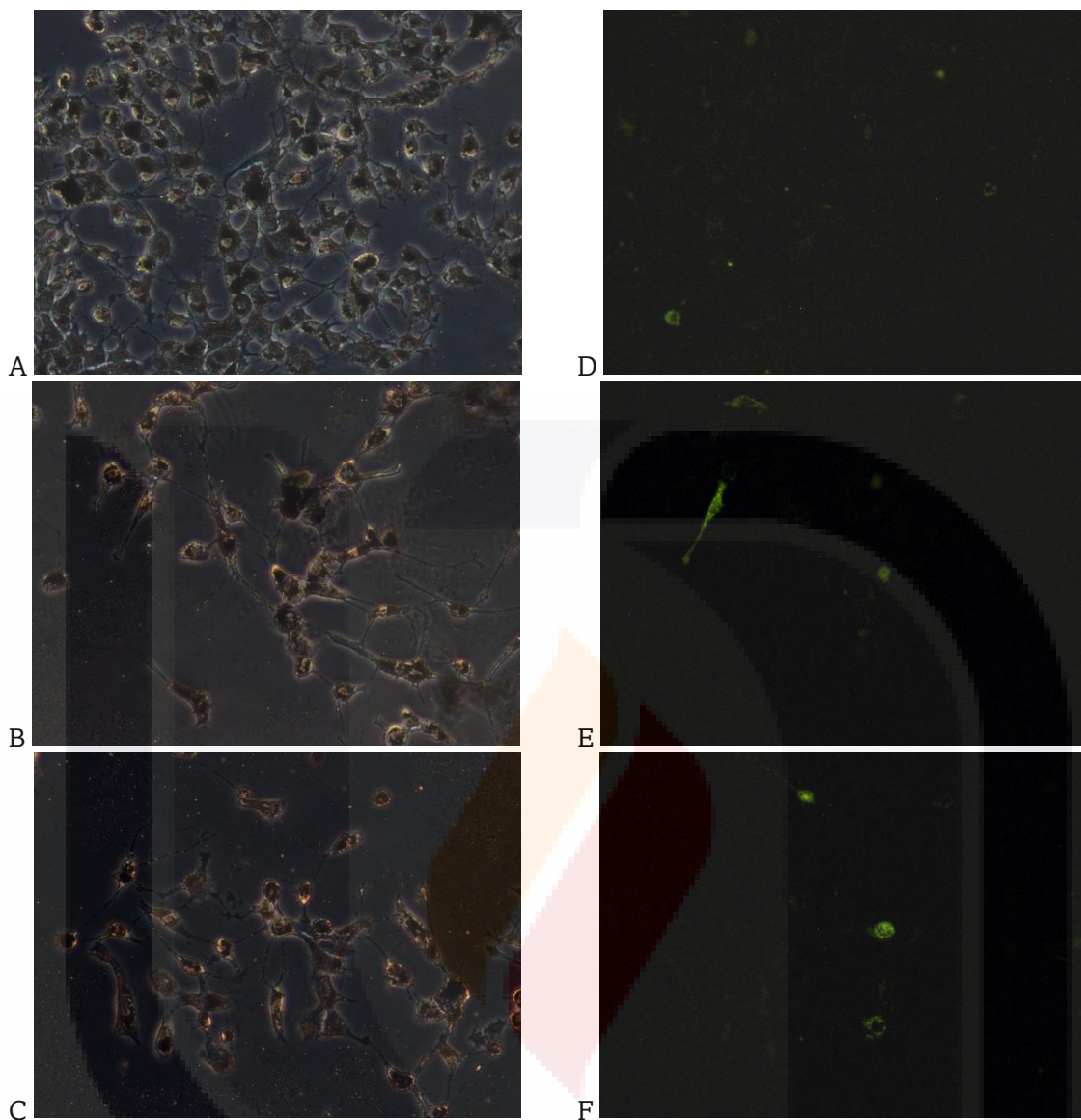


Imagen 75. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea D548 con NCMCit por irradiación de luz IR. Micrografías en campo claro (A) y fluorescencia (D) después de 1 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (B) y fluorescencia (E) después de 5 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (C) y fluorescencia (F) después de 10 min de irradiación IR. Todas las imágenes poseen un aumento de 400x

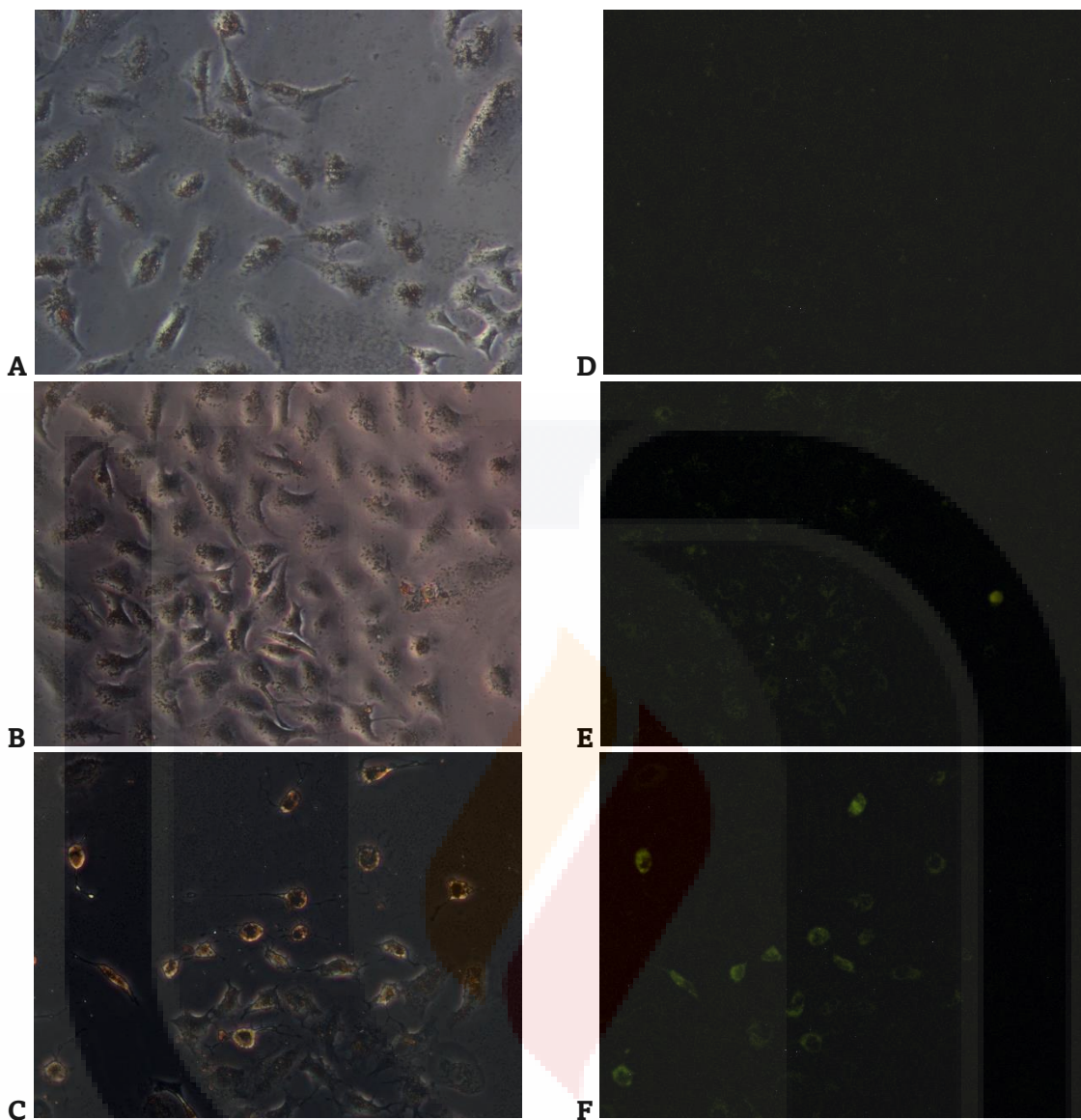


Imagen 76. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea A549 con NCMGly por irradiación de luz IR. Micrografías en campo claro (A) y fluorescencia (D) después de 1 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (B) y fluorescencia (E) después de 5 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (C) y fluorescencia (F) después de 10 min de irradiación IR. Todas las imágenes poseen un aumento de 400x

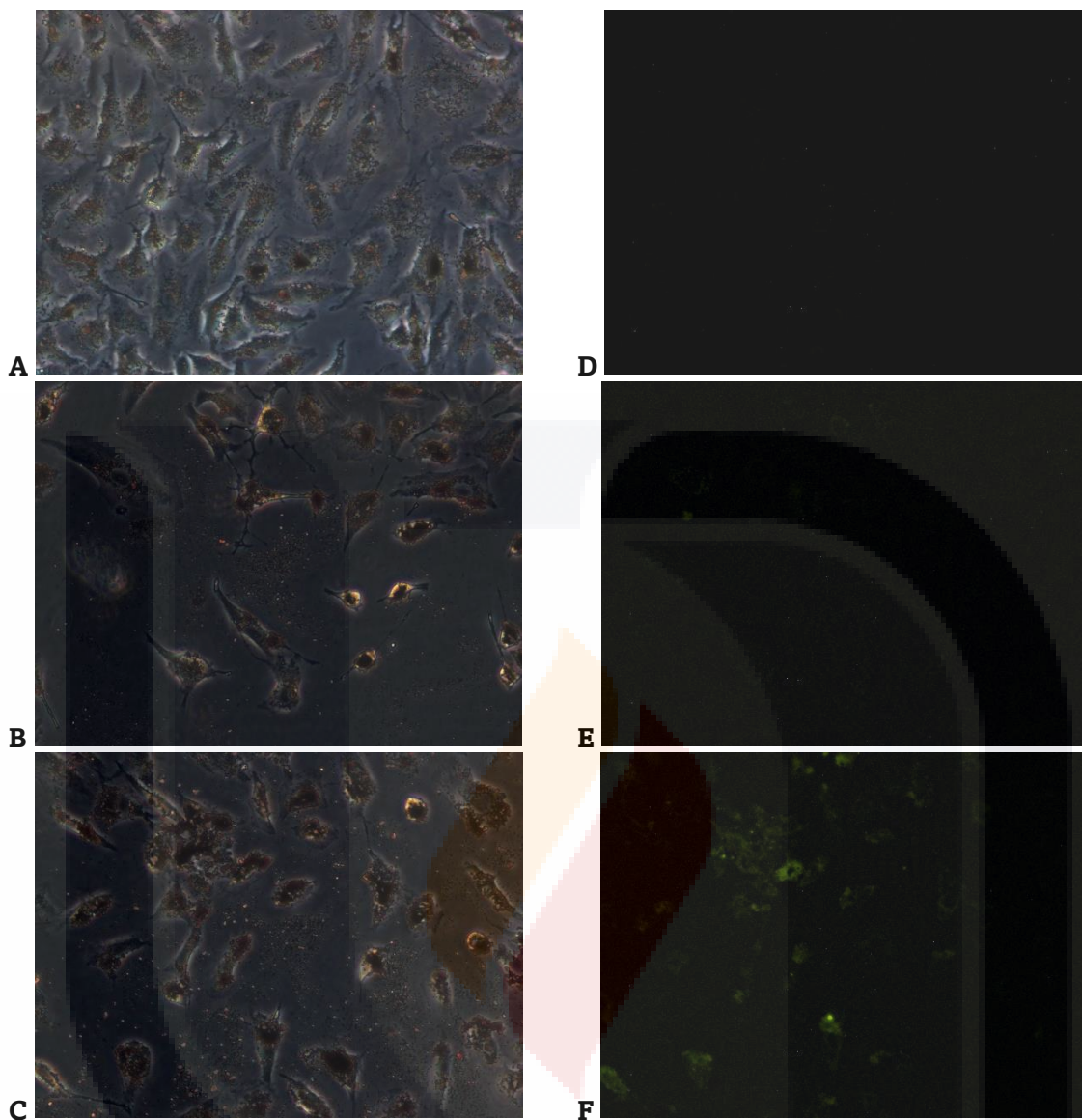


Imagen 77. Resultados de la prueba de producción de ROS para la línea A549 con NCMCit por irradiación de luz IR. Micrografías en campo claro (A) y fluorescencia (D) después de 1 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (B) y fluorescencia (E) después de 5 min de irradiación IR. Micrografías en campo claro (C) y fluorescencia (F) después de 10 min de irradiación IR. Todas las imágenes poseen un aumento de 400x

4.3.3 Análisis de viabilidad CCK8

Un parámetro fundamental para la aplicación de los nanomateriales es la biocompatibilidad y la citotoxicidad, ya que esto determinará la forma de aplicación y las limitantes de sus usos. Para ello, se utilizó el kit CCK-8 que permite relacionar la absorbancia de la muestra con la viabilidad de las células, ya que contiene una sal de formazán que será reducida en presencia de enzimas reductoras, lo cual se correlaciona directamente con la cantidad de células viables. En ambas líneas celulares es notoria la disminución de la viabilidad una vez que los materiales fueron irradiados con la luz IR (Imagen 78), lo que es indicativo de que el efecto fotodinámico se está llevando a cabo y es capaz de aumentar significativamente la citotoxicidad de los materiales (Imágenes 79 y 80)^{87,88,145-147}.

Los resultados son similares al trabajo de Jiayong D, et al. (2019)¹⁴⁶ donde de manera conjunta evalúan la terapia fotodinámica con distintas líneas celulares (incluyendo A549) y demuestran la efectividad de este fenómeno, estableciendo así evidencia para su implementación biológica, por lo que los resultados son consistentes con lo reportado. En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para cada línea celular con y sin la aplicación de la TFD. A partir de esto, es posible establecer la dosis letal 50 (DL₅₀) de los materiales junto con la aplicación de la TFD (TFD-DL₅₀). Para el caso de la línea D548 únicamente se determinó una PDT-DL₅₀=10 min TFD + 25 µg/mL, sin embargo, se observa mayor sensibilidad de la línea A549 ya que en esta se establece un DL₅₀=15 µg/mL y una TFD-DL₅₀=10 min + 10 µg/mL, demostrando así el potencial citotóxico de la TFD. Lo anterior demuestra la efectividad del material y la TFD en conjunto, ya que al ser activada la DL₅₀ se reduce significativamente, lo que puede ayudar a evitar efectos secundarios no deseados en el paciente, como la bioacumulación del material en las células.

En ambos casos se aprecia que el NCMCit demuestra mayor eficiencia para disminuir la viabilidad en ambas líneas celulares, además de que al aplicar la TFD se reduce aún más la viabilidad en comparación con NCMGly, lo cual se relaciona con distintas características del material, siendo una de estas la estabilidad coloidal. Debido a las cargas polares que aporta el citrato en la superficie de las nanopartículas, estas se repelen entre sí, aumentando la estabilidad por las repulsiones esteáricas que se presentan. Al aumentar la estabilidad coloidal, se aumenta el tiempo de contacto entre la célula y el material, permitiendo una mejor interacción entre estos, eficientando la capacidad citotóxica de este.



Imagen 78. Fotografía de la irradiación de luz IR en el ensayo de citotoxicidad CCK-8. La irradiación sucede dentro de la campana de flujo laminar para conservar las condiciones de esterilidad

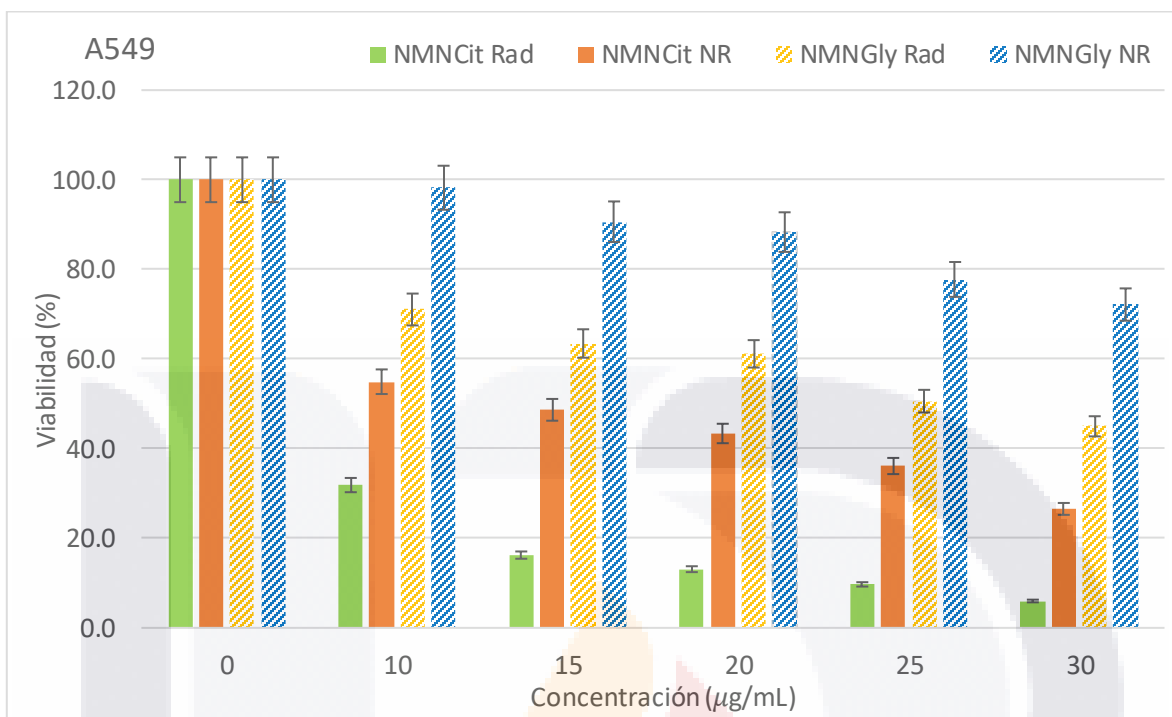


Imagen 79. Resultados de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y la línea A549 (Rad=radiados con luz IR, NR=No radiados con luz IR).

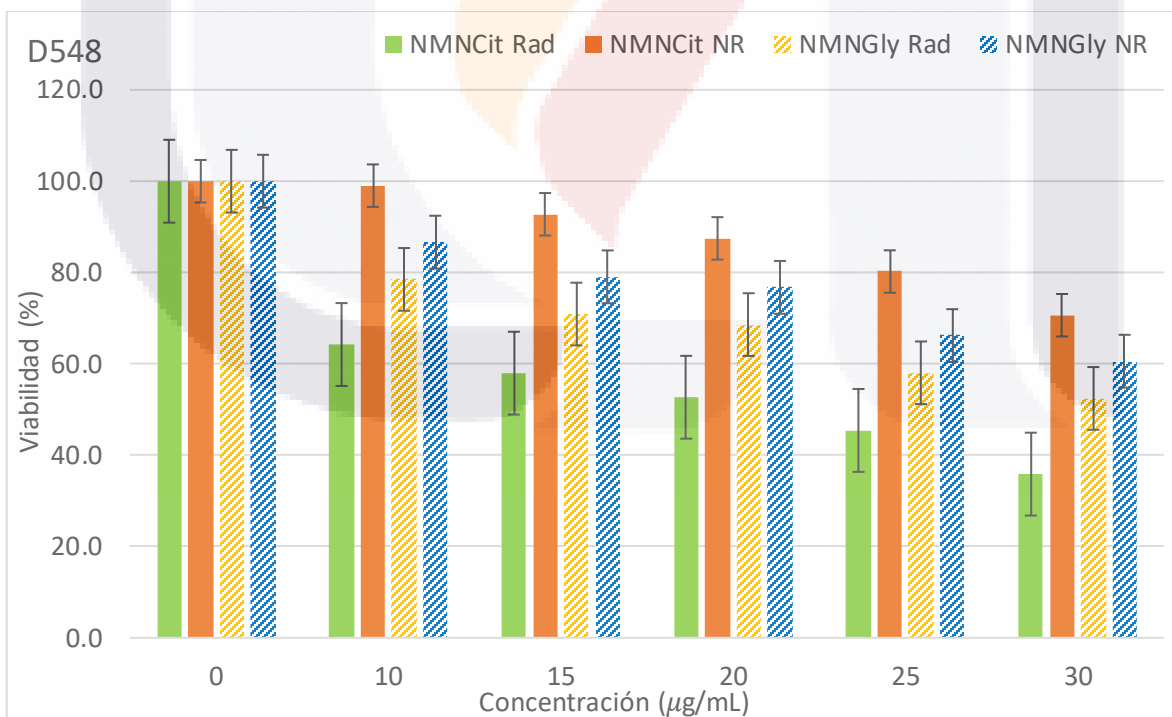


Imagen 80. Resultados de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y la línea Detroit 548 (Rad=radiados con luz IR, NR=No radiados con luz IR).

Tabla 12. Resultados (en porcentajes) de la prueba de viabilidad usando el kit CCK-8 junto con los NCM y ambas líneas celulares (Rad=irradiados con luz IR, NR=No irradiados con luz IR).

Línea + Material + IR	10µg/mL	15µg/mL	20µg/mL	25µg/mL	30µg/mL
A549 NCMCit Rad	31.9	16.2	13.1	9.7	6.0
A549 NCMCit NR	54.9	48.7	43.4	36.1	26.5
A549 NCMGly Rad	71.1	63.5	61.2	50.6	45.0
A549 NCMGly NR	98.2	90.6	88.3	77.8	72.2
D548 NCMCit Rad	64.2	58.0	52.7	45.4	35.9
D548 NCMCit NR	99.0	92.8	87.5	80.2	70.6
D548 NCMGly Rad	78.5	70.9	68.6	58.0	52.4
D548 NCMGly NR	86.7	79.1	76.7	66.2	60.6

4.4 Análisis por técnicas de microscopía avanzada

4.4.1 Microscopía de fuerza atómica

A diferencia de las microscopías clásicas, la microscopía de fuerza atómica permite obtener imágenes con grandes aumentos y en alta resolución para determinar características superficiales de las muestras en estudio y, con ello, determinar los cambios que estas puedan sufrir a lo largo del tiempo y/o de los experimentos a los que se sometan. Para el análisis de las células con los materiales se utilizaron el modo de contacto y el dinámico.

En las imágenes 81 y 83 se muestran las células de control, en las cuales la morfología está conservada, sus membranas y tanto el núcleo como el nucléolo bien definidos y empaquetados, además de que su textura parece ser uniforme en la superficie. De acuerdo con He J. et al. (2018)¹⁴⁸ los cambios morfológicos son indicativos de daños a la célula o a su metabolismo; en su investigación describe mediante un modelo computacional entrenado cómo los cambios en el núcleo y el nucléolo son cambios que se correlacionan con el estrés celular y se ven reflejados en el metabolismo de ésta.

Similar al trabajo anteriormente citado, en las imágenes (Imágenes 82, 83, 84 y 85) se observa la presencia de los NCM (señalados con flechas blancas) en contacto directo con las células sin mostrar señales de daño mecánico aparente (por ejemplo, disrupción de membranas). Las nanopartículas están dentro de la célula uniformemente distribuidas, por lo que no parece haber bioacumulación preferencial del nanomaterial en ninguna parte de la célula. Lo que quiere decir es que, posterior a las 18 h de interacción, no existe daño mecánico. Sin embargo, existen señales que sugieren la inducción de estrés en la célula por el cambio en la rugosidad de las células después de estar en contacto. En las imágenes 74C y 74D, se aprecia un cambio en la textura de las células; la rugosidad de estas parece aumentar, lo cual puede estar ligado a la presencia de los NCM. Principalmente NCMCit (Imágenes 82 y 85), genera de forma más visible este fenómeno posiblemente por su estabilidad coloidal (Véase anexo: pruebas de estabilidad coloidal), ya que al estar mayor tiempo en suspensión las células pueden captar más eficientemente a los materiales y retenerlos dentro de sí mismas¹⁴⁹. Lo anterior, se puede correlacionar con los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad, donde los resultados de NCMCit (en ambas modalidades, Rad y NR) suelen mostrar mayor citotoxicidad que NCMGly.

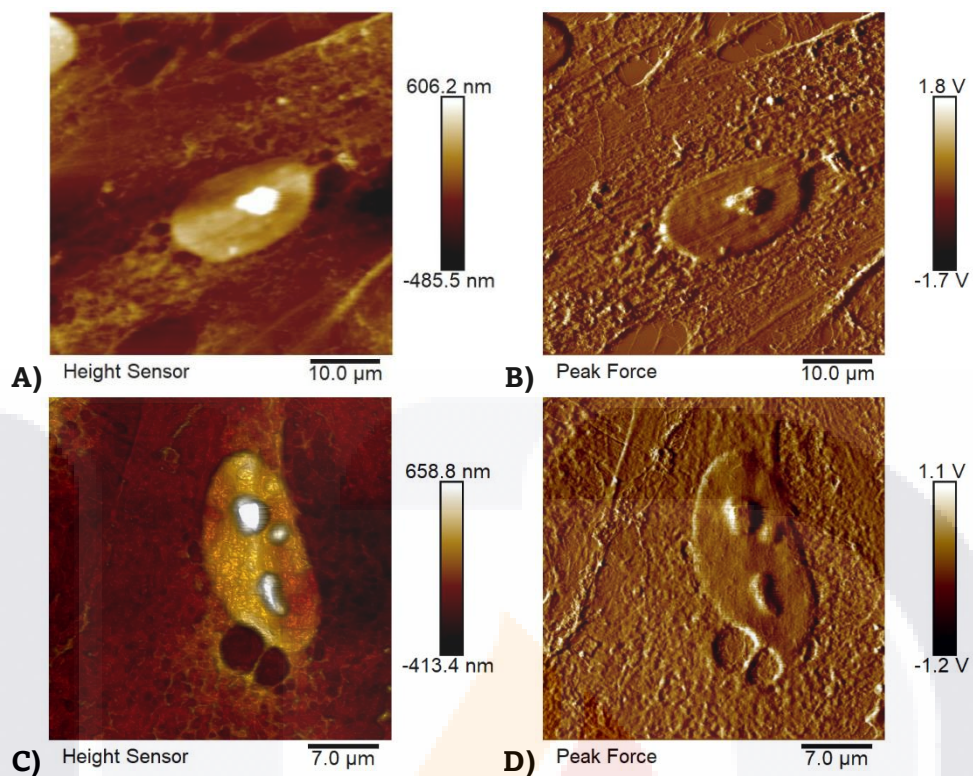


Imagen 81. Célula control A549 obtenida por MFA

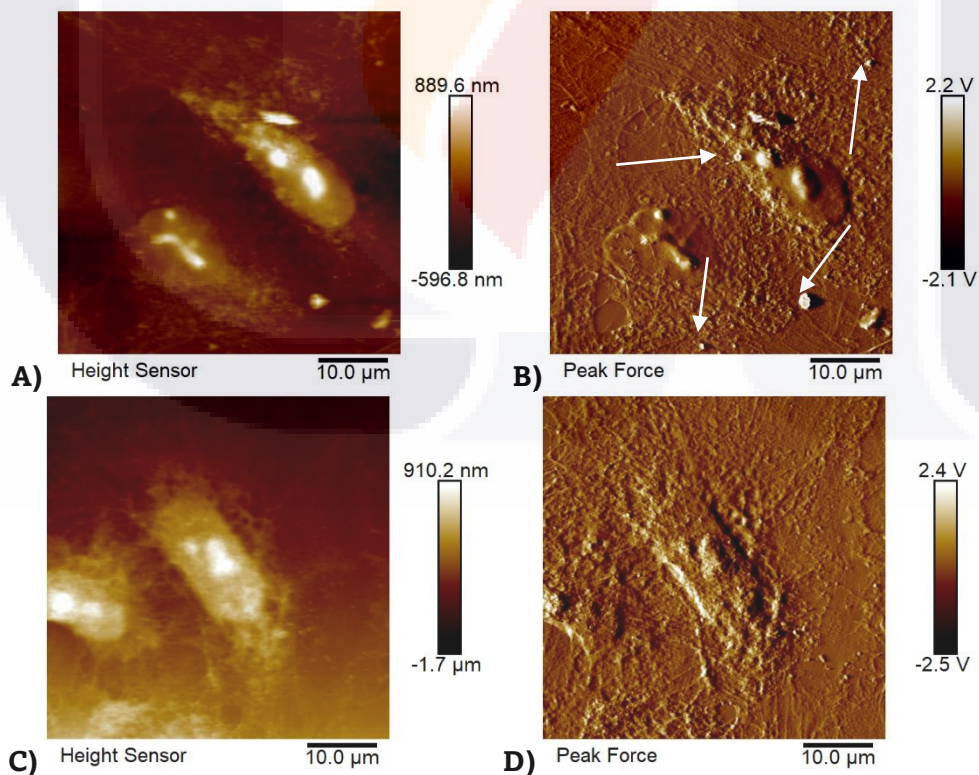


Imagen 82. Células A549 sometidas a interacción con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit -Au}$. A-C) Imagen obtenida en modo de contacto. B-D) imagen obtenida en modo *dinámico*

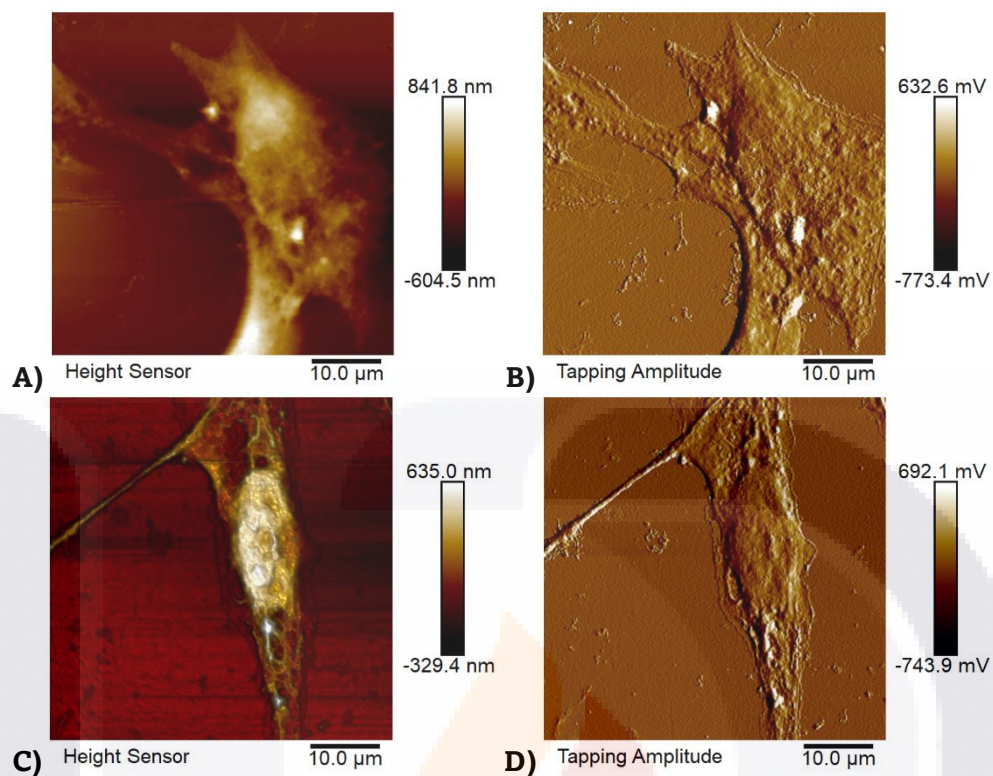


Imagen 83. Célula control D548 obtenida por MFA. A-C) Imagen obtenida en modo de contacto. B-D) imagen obtenida en modo *dinámico*

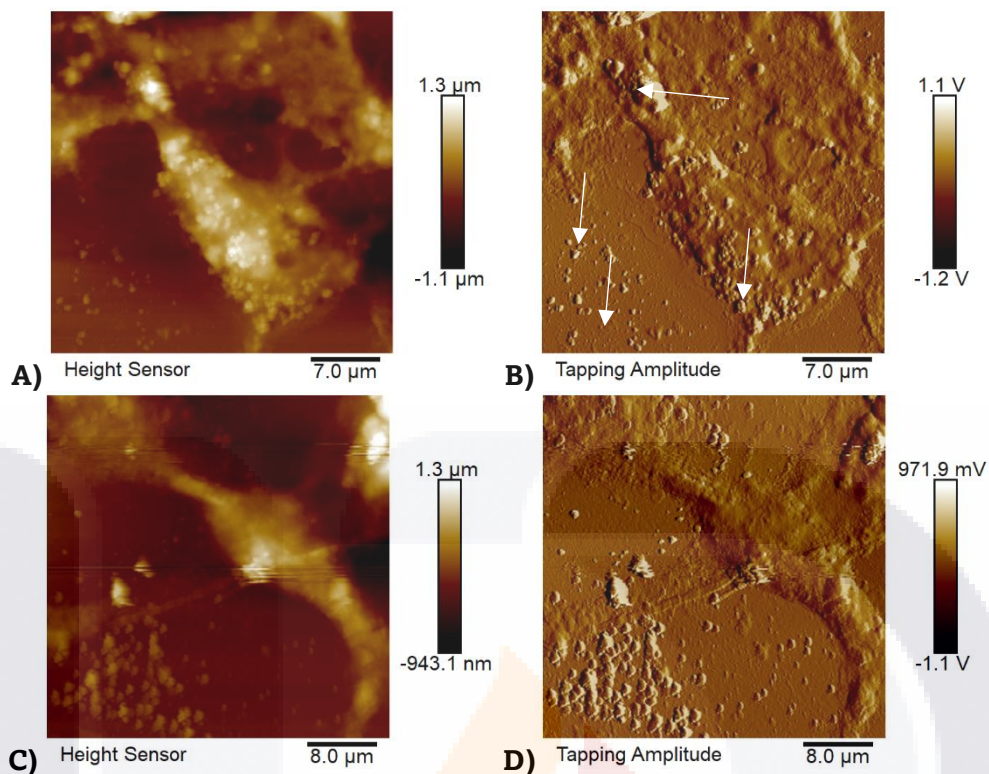


Imagen 84. Células D548 sometidas a interacción con CoFe₂O₄-Cit-Au. A-C) Imagen obtenida en modo de contacto. B-D) imagen obtenida en modo *dinámico*

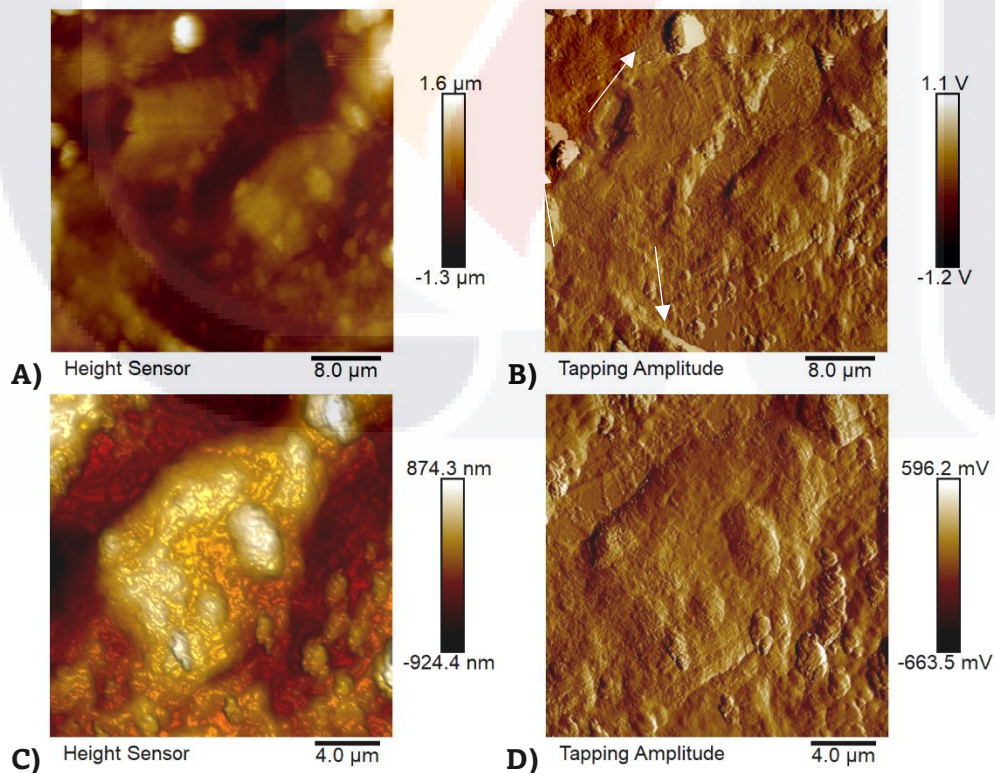


Imagen 85. Células D548 sometidas a interacción con CoFe₂O₄-Gly-Au. A-C) Imagen obtenida en modo de contacto. B-D) imagen obtenida en modo *dinámico*

4.4.2 Microscopía Holotomográfica (MHT)

Como complemento a la MFA, se aplicó la MHT para corroborar si los NCM se encontraban fuera y/o dentro de las células, lo que permitirá entender a profundidad los mecanismos de interacción y citotoxicidad de los materiales. Basados en los resultados de viabilidad y citotoxicidad, nos enfocamos en entender los mecanismos e interacciones entre los nanomateriales y las células cancerígenas. Esto es relevante para modificar y optimizar los tratamientos aplicados, ya que al conocer cómo se induce la muerte celular se podrán aprovechar esas características para evitar daños secundarios en el paciente y mejorar las terapias actuales. A partir de las investigaciones de Medina I. et al. (2024)⁷³ se logró identificar las estructuras observadas en las imágenes holotomográficas. Se propone que, a partir del Índice de Refracción (IR) generado por cada estructura biológica, se diferenciará entre ellas (Imagen 86). En la imagen 88, se muestra una célula A549 con la anatomía característica de esta, donde se observan las prolongaciones de la membrana celular o lamelipodio, el núcleo y, en el centro, un nucléolo abundante. En la imagen 88, se muestra una holotomografía tridimensional de la misma célula de la imagen 87. En esta se resaltan los índices de refracción de los componentes mediante distintos colores, diferenciando así cada estructura. En la tabla 15 se muestran los resultados comparativos de los controles no radiados e irradiados con luz IR (láser de 850 nm). Como se demuestra, la aplicación de luz IR no interacciona con las células, por lo que no posee efectos citotóxicos. Tanto la masa seca, la esfericidad, así como el volumen, no presentan variaciones significativas, lo que quiere decir que el estado de las células permanece igual aun siendo irradiadas con luz IR.

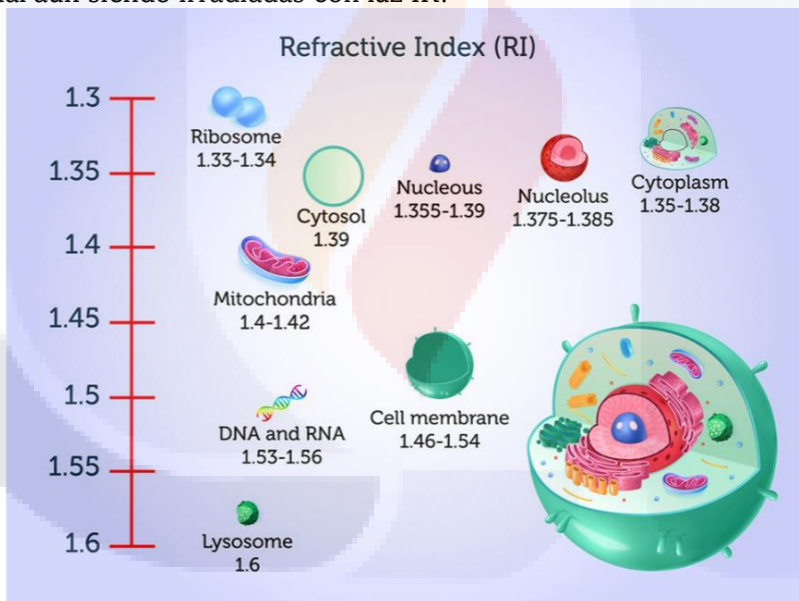


Imagen 86. Escala de los IR de los organelos celulares eucariontes. Imagen tomada de Medina I. et al. (2024)

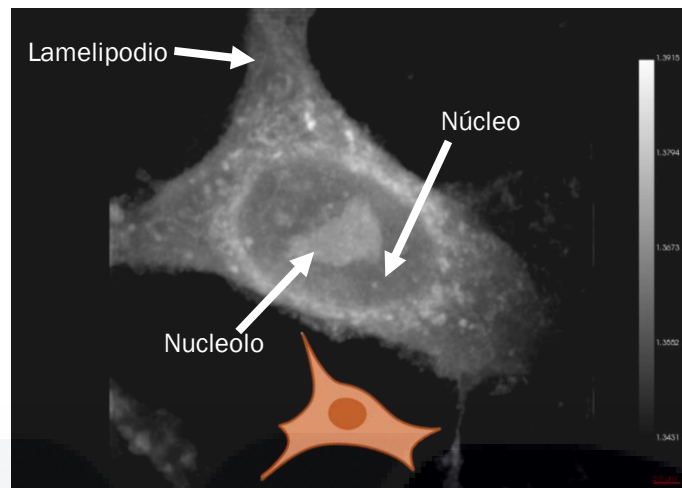


Imagen 87. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 control. También se muestra una caricatura de una célula A549 típica.

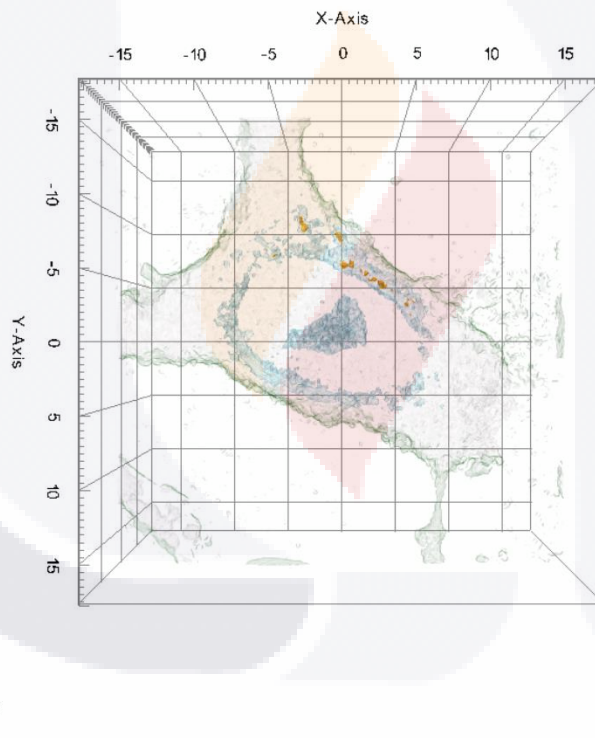


Imagen 88. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 control.

Tabla 13. Información proporcionada por el equipo holotomográfico respecto a la masa, forma y volumen de las células control analizadas (Desv. Std. = Desviación estándar)

Característica	Control		Radiadas	
	Promedio	Desv. Std.	Promedio	Desv. Std.
Volumen (μm^3)	2321.0540	530.7138	3264.5434	1927.6543
Área superficial (μm^2)	1541.1480	254.5818	2181.4540	1396.0314
Área proyectada (μm^2)	377.8290	71.0838	490.5342	214.6654
Índice de refracción medio	1.3609	0.0028	1.3574	0.0075
Concentración ($\text{pg}/\mu\text{m}^3$)	0.1257	0.0147	0.1076	0.0396
Masa seca (pg)	291.1080	67.6579	287.5863	67.9998
Esfericidad	0.5488	0.0172	0.5114	0.0819
Umbral del IR	1.3493	0.0014	1.3476	0.0038

Posteriormente se puso a los modelos A549 en contacto con los nanomateriales para observar si la interacción entre estos podría causar algún cambio morfológico visible en las células. Así como reporta Ralf P. et al. (2020)¹⁵⁰, basados en los diferentes IR fue posible localizar a los nanomateriales en interacción con las células. En las imágenes 86A-B, obtenidas por MHT, se muestra una célula A549 en contacto con NCMCit el cual parece estar dentro de la célula posterior a las 18 h de interacción. En las imágenes 89 (CoFe₂O₄-Cit) y 91 (CoFe₂O₄-Cit -Au), es posible diferenciar la posición planar de los distintos componentes de las células, así como la del nanomaterial, mediante IR. Es posible afirmar la internalización de CoFe₂O₄-Cit en la célula a causa de las posiciones que se muestran en las imágenes 86 y 87, por lo que el tamaño del material es adecuado para pasar a través de la membrana de la célula y permanecer dentro de ella. Asimismo, este fenómeno también es visible en los resultados mostrados en la tabla 13, en donde se aprecia el aumento de la masa seca en promedio de las células por la cantidad de NCM dentro de éstas, por lo que se puede asegurar la entrada de los nanomateriales a las células.

Sin embargo, se aprecia una leve formación de gotas lipídicas dentro de las células, lo cual puede ser un indicativo de estrés celular inducido por los nanomateriales. No obstante, este indicativo aumenta de manera exacerbada una vez que los nanomateriales han sido irradiados con luz IR, lo que confirma que los resultados anteriores en las pruebas de viabilidad y citotoxicidad son inducidos por la formación de ROS dentro de las células y, como consecuencia, daño celular e inducción de la muerte celular. Este daño es notoriamente visible en las imágenes 88-93, donde se observa claramente la pérdida de la integridad membranal y la formación de granulosidades dentro de la célula, que parecen concentrarse en la periferia de ésta. De acuerdo con Friedrich R. et al. (2020)¹⁵⁰, la formación de este organelo es consecuencia de algún daño o estrés que la célula esté recibiendo por causa, ya sea estrés en el retículo endoplásmico, estrés oxidativo o inanición de la célula. Sin embargo, también se menciona que la producción de este organelo puede estar focalizada en la reparación de membranas dañadas dentro de la célula, principalmente por su esterificación gracias a la presencia de ROS en exceso. Por lo tanto, podemos atribuir el daño celular a las ROS generadas por los NCM cuando son irradiados, por lo que se puede afirmar por las imágenes obtenidas que la TFD genera daño en las membranas celulares y, en consecuencia, se generan las gotas lipídicas para mitigar el daño sufrido por la célula. Estos cambios también son notorios en los parámetros medidos; en la tabla 14 se muestra el cambio en la esfericidad, así como en el área proyectada por las células,

lo que describe una reducción del área por parte de las células a causa del estrés sometido por la producción de ROS.

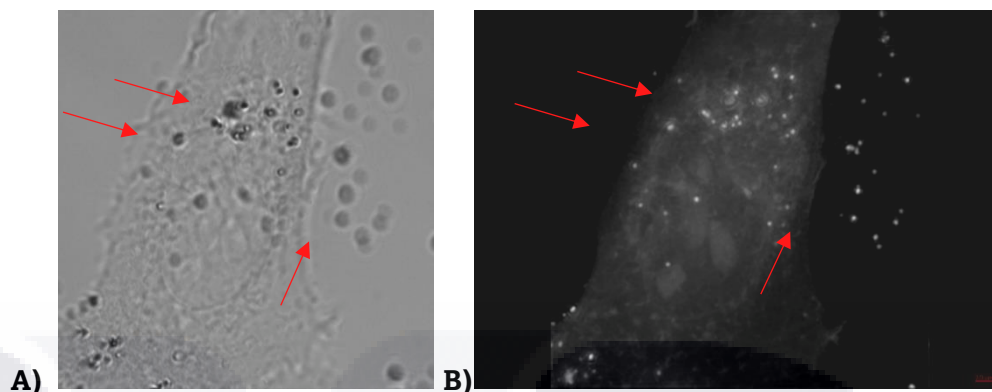


Imagen 89. **A)** Micrografía en campo claro de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$ **B)** Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$. En ambas se señala con flechas la posición de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$

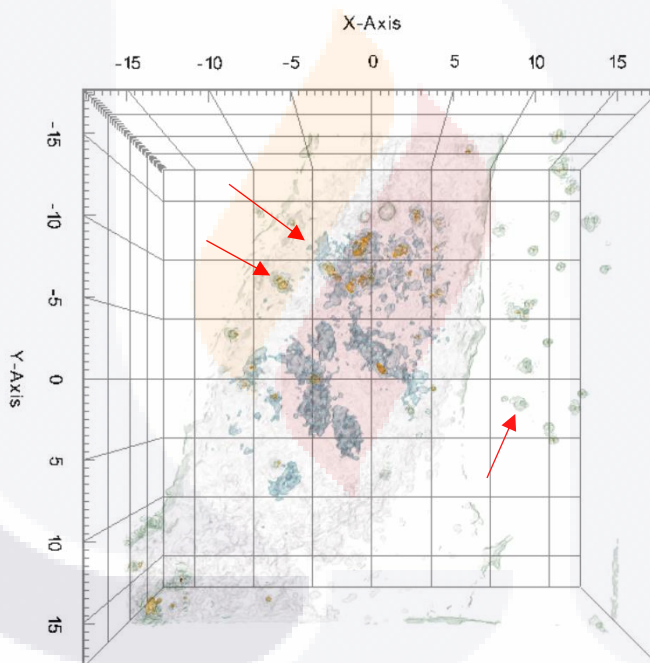


Imagen 90. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$. Se señalan con flechas la posición de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$

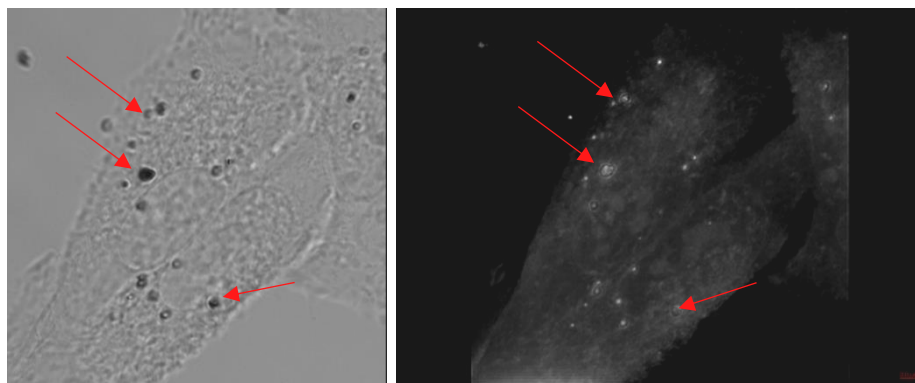


Imagen 91. A) Micrografía en campo claro de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ B) Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$. En ambas se señalan con flechas la posición de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$

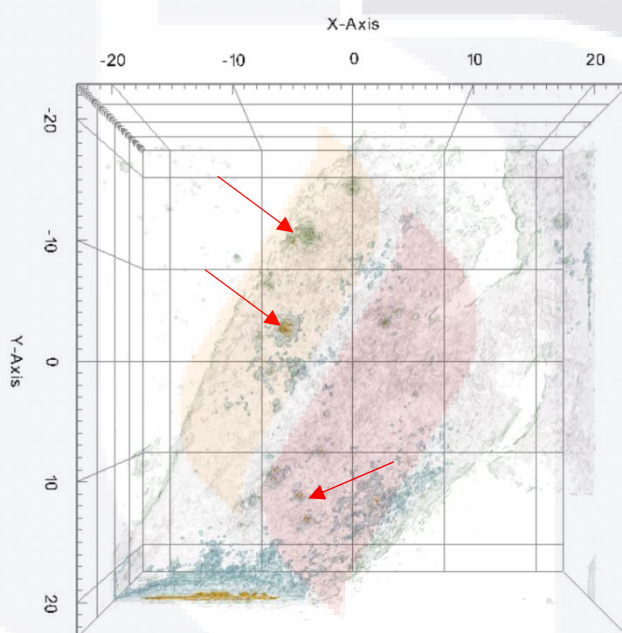


Imagen 92. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$. Se señalan con flechas la posición de NCMCit dentro de la célula

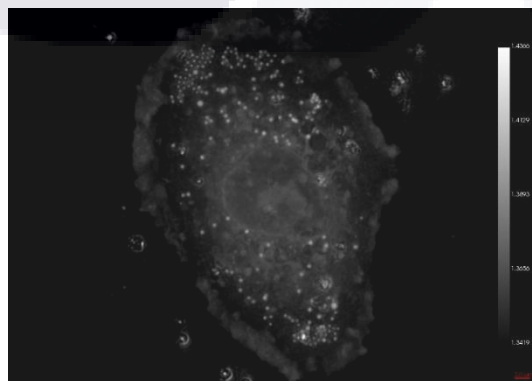


Imagen 93. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR

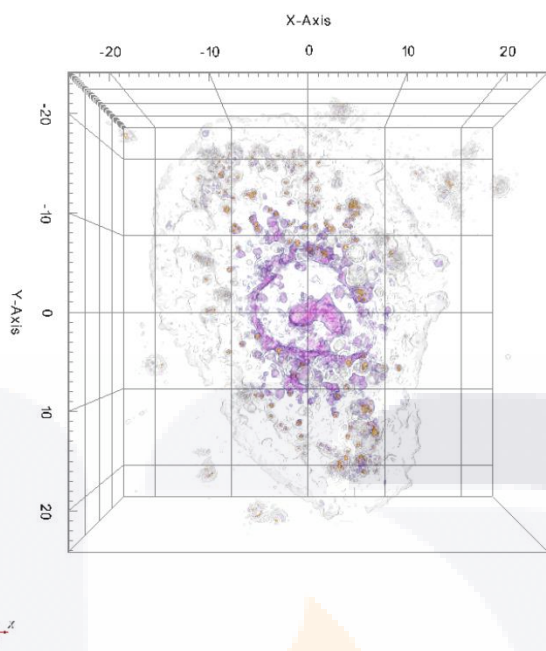


Imagen 94. Micrografía holotomográfica tridimensional (de la imagen 93) de la célula A549 con CoFe₂O₄-Cit-Au irradiada con luz IR

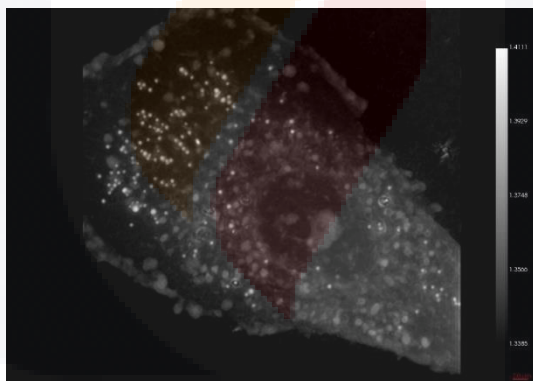


Imagen 95. Micrografía holotomográfica bidimensional de la célula A549 con CoFe₂O₄-Cit-Au irradiada con luz IR y daño celular.

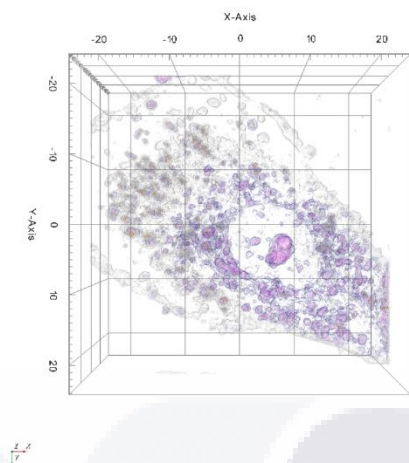


Imagen 96. Micrografía holotomográfica tridimensional de la célula A549 con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit-Au}$ irradiada con luz IR y daño celular.

Tabla 14. Información proporcionada por el equipo holotomográfico respecto a la masa, forma y volumen de las células control analizadas con interacción con los NCM (Desv. Std. = Desviación estándar)

Parameter	A549 CTRL	Desv. Std.	A549 Ctrl Rad	Desv. Std.	A549 05 $\mu\text{g/mL}$ Rad	Desv. Std.
Volume (μm^3)	6509.7974	2983.4608	7022.4851	3135.7001	6126.0909	1720.5309
Surface area (μm^2)	3151.6256	1088.6908	3737.2914	1449.9422	3203.9020	1134.7481
Projected area (μm^2)	840.3233	252.1505	898.6339	281.6399	770.4372	164.4557
Mean RI	1.3493	0.0043	1.3486	0.0035	1.3498	0.0023
Concentration ($\text{pg}/\mu\text{m}^3$)	0.0648	0.0227	0.0610	0.0186	0.0675	0.0124
Dry mass (pg)	369.7991	91.6197	387.7837	111.1467	401.3883	87.4017
Sphericity	0.5308	0.0433	0.4835	0.0635	0.5227	0.0747
Threshold RI	1.3435	0.0021	1.3433	0.0017	1.3440	0.0011

4.5 Protocolos para terapia de hipertermia y fotodinámica

Una vez demostrada la capacidad de los NCM para crear fenómenos que puedan combatir células cancerígenas, es necesario establecer metodologías de aplicación basadas en los protocolos *in vitro* partiendo de los resultados obtenidos (Véase análisis de calorimetría, producción de ROS, viabilidad y anexo: pruebas de fototerapia inducida por IR). Sin embargo, estos podrán ser usados de manera indistinta para cualquier tipo de ferrita (AB_2O_4 , A= Ag, Cu, Mn, Fe, Zn, Ni)^{29,35,151–156} superparamagnética y material fotodinámico. Debido a las condiciones usadas en los análisis de viabilidad y citotoxicidad, los protocolos planteados a continuación partirán de un escenario en condiciones controladas de laboratorio (*in vitro*) para proponer metodologías que, en un futuro, puedan ser escalables a ensayos clínicos.

Metodología para la aplicación de hipertermia magnética y fotodinámica

- 1) Utilizando una caja de 24 pocillos, se deberá crecer las células hasta obtener una concentración de 50,000 células/cm² en los espacios correspondientes (Esta metodología puede ser aplicada en una caja de 96 pocillos [ajustar la cantidad de células] para que, una vez aplicados los tratamientos se mida la viabilidad de las células usando el kit CCK-8, ensayo MTT o azul tripán y también se puede combinar con la metodología de MFA o MHT [se deberá usar tomodishes en lugar de caja] para posterior a los tratamientos, observar a las células por técnicas de microscopía)
- 2) Una vez llegada a la confluencia necesaria, retirar el medio viejo y lavar 2 veces con PBS
- 3) A partir de una solución stock del ferrofluido, agregar la cantidad suficiente de ferrofluido para obtener 10 µg/mL y completar lo restante con medio nuevo. Durante este paso, es importante usar medio enriquecido al 1% de SFB para evitar el crecimiento exacerbado de las células y disminuir la viabilidad por competición de nutrientes o espacio. Dejar en incubación por lo menos 18 h para asegurar la interacción e internalización de las nanopartículas en las células
- 4) Terminado el tiempo de incubación, se deberá retirar el medio viejo, realizar dos lavados con PBS y agregar medio de cultivo fresco para posteriormente llevar a los tratamientos.

A partir de este paso, se podrá aplicar la hipertermia magnética y la fotodinámica de manera individual o hacer una aplicación híbrida para mejorar los resultados. Por lo tanto, la metodología podrá ser aplicada de manera individual o de forma paralela.

- 5) Llevar la caja de cultivo al equipo de hipertermia y colocarla dentro del solenoide. Utilizando el equipo de hipertermia, aplicar los campos magnéticos por 5 min con 530 kHz de frecuencia a una potencia de 30 mT y monitorear la temperatura hasta llegar al punto máximo de calentamiento deseado (~43 °C). Este paso puede variar en función de la disponibilidad de los equipos, por ejemplo, basados en los protocolos propuestos por Duval K. et al. (2020)¹⁵⁷, si sólo es posible manipular un tubo Eppendorf para el control de las células, se podrá recolectar el cultivo celular y centrifugar para generar un “*pellet*” de las células, después exponerlo a la terapia magnética y resuspender para sembrar en placa de cultivo (Imagen 97). Otro punto por considerar será la frecuencia empleada de los campos magnéticos dependiendo del tipo de muestra (cultivo celular o animal con xenoinjerto). Para cultivos celulares es posible usar frecuencias bajas (aproximadamente 100 kHz) debido al grosor de las células, mientras que para modelos *in vivo* será necesario usar frecuencias más altas (> 300 kHz) para penetrar en los tejidos¹⁵⁸.

- 6) Llevar la caja de cultivo a la campana de flujo laminar, retirar la tapa y colocarla debajo de la lámpara de luz IR (aproximadamente 10 cm de distancia entre la caja y la lámpara) por 10 min. Para este paso se puede considerar modificar distintas variables en función del tipo de muestra con la que se cuenta o del tipo de instrumentación. Para este estudio, se utilizó una lámpara LED de 850 nm y 120 W de potencia, sin embargo, se puede adaptar este paso para muestras en animales o utilizando un láser. Sin embargo, se deberá tomar en cuenta la distancia entre la fuente de luz y la muestra, así como el área iluminada y la capacidad de penetración de la luz en la muestra^{88,135,136,138,139,147,159-162}.
- 7) Terminado el tiempo del tratamiento, llevar a las células a la incubadora y dejarlas 18 h en incubación
- 8) Pasado el tiempo de incubación, se podrá aplicar la metodología de CCK-8 para medir la viabilidad de las células o prepararlas para ser observadas por la técnica de MFA. De igual manera es posible modificar estos protocolos para revisar a las células por MHT

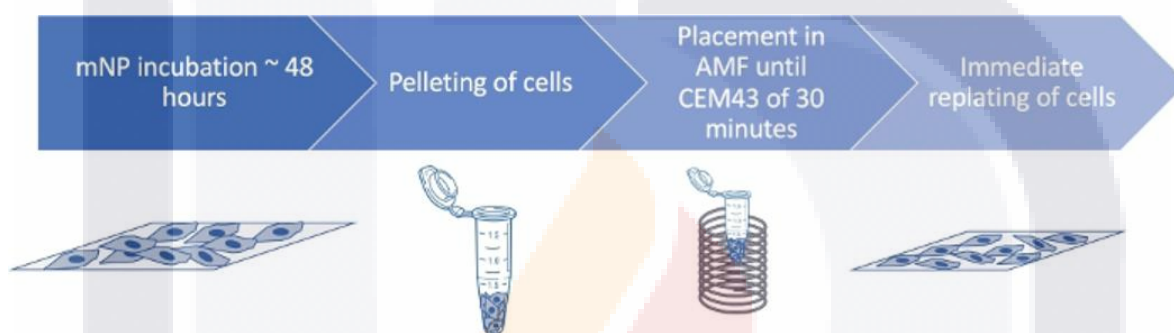


Imagen 97. Metodología propuesta por Duval K. et al. (2020) para cultivos celulares e hipertermia magnética a microescala.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se logró sintetizar las nanopartículas de CoFe_2O_4 superparamagnéticas mediante la ruta de síntesis propuesta con altos porcentajes de rendimiento e índice de cristalinidad.
- Se logró sintetizar las AuNP mediante la ruta de síntesis propuesta aplicando las modificaciones planeadas. Los resultados demostraron la formación de un segundo PRS, resultado de la estructura y el tamaño de las AuNP y la influencia del Cit como agente de recubrimiento para la formación de AuNP con un segundo PRS.
- Mediante la metodología de superficie de respuesta se demostró la influencia del agente reductor como factor principal para conducir la síntesis de las AuNP. Mediante la variación de la concentración y cantidades del agente reductor y de recubrimiento es posible modificar a las AuNP para que tomen diferentes morfologías y tamaños que se reflejen en la respuesta del PRS
- Se logró modificar la superficie de las nanopartículas de CoFe_2O_4 mediante la metodología de funcionalización propuesta y, con ello, mejorar su estabilidad coloidal en los ferrofluidos sintetizados.
- Se logró determinar las características fisicoquímicas de todos los materiales sintetizados mediante técnicas avanzadas de caracterización, obteniendo así sus propiedades conforme el proceso de síntesis avanzaba.
- Se comprobó experimentalmente la capacidad de los materiales sintetizados para generar ROS mediante la implementación de luz IR, por lo que son capaces de generar la TFD.
- Se demostró la biocompatibilidad y seguridad de los nanomateriales sintetizados con las células sanguíneas humanas hasta una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ aun cuando se aplique la TFD.
- Se determinó la capacidad calorífica de los materiales y se demostró su eficiencia para ser aplicados en protocolos de hipertermia
- Se crearon protocolos para la aplicación *in vitro* de las TFD y THM. Con ellos, se deja un precedente para que en futuras investigaciones sea posible evaluar nanomateriales similares con diferentes modelos biológicos partiendo de las evidencias registradas.
- Se demostró mediante las técnicas avanzadas de microscopía que los nanomateriales interactúan con las células de manera segura sin causar daño mecánico a las membranas para internalizarse en las células
- Se observó que mediante la aplicación de la TFD las células sufren muerte celular por medio de apoptosis y necrosis. Usando las técnicas de microscopía, se pudieron establecer los posibles mecanismos de muerte celular. Basados en los resultados de fluorescencia, se observaron fenómenos de apoptosis intrínseca y, con la MHT, se observaron indicios de muerte por necroptosis.
- Se demostró que el uso de luz IR (dentro del marco de la primera ventana biológica) no afecta a las células ni interfiere en fenómenos biológicos, por lo que es segura y óptima para ser empleada en TFD.
- Basados en los estudios de viabilidad, se demostró que las células cancerígenas son más sensibles a los tratamientos aplicados en comparación con las demás líneas celulares sanas
- Se demostró que el nanomaterial es seguro para su implementación en células humanas y tiene la capacidad y eficiencia de fungir como una plataforma base para el desarrollo de tratamientos antineoplásicos localizados en cánceres superficiales (por ejemplo, cáncer de piel o de seno).

Bibliografía

1. Pitot, H. C. & Loeb, D. D. *Fundamentals of Oncology*. (M. Dekker, New York, 2002).
2. Chabner, B. & Longo, D. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. (LWW, 2011).
3. Baba, A. I. & Câtoi, C. PRINCIPLES OF ANTICANCER THERAPY. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9546/> (2007).
4. Anand, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes and Diseases* vol. 10 1367–1401 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007> (2023).
5. Tan, S., Li, D. & Zhu, X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 124 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821> (2020).
6. Tohme, S., Simmons, R. L. & Tsung, A. Surgery for cancer: A trigger for metastases. *Cancer Research* vol. 77 1548–1552 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536> (2017).
7. Boholm, M. & Arvidsson, R. A Definition Framework for the Terms Nanomaterial and Nanoparticle. *Nanoethics* 10, 25–40 (2016).
8. Morán, J. & Rodríguez, J. *Los Materiales Nanoestructurados. Sus Propiedades y Aplicaciones En La Revolución Científica y Tecnológica Del Siglo XXI*. (Fondo de Cultura Económica, 2012).
9. Sharma, A. *et al.* Applications of green nanomaterials in electronic and electrical industries. *Green Nanomaterials for Industrial Applications* 397–421 (2022) doi:10.1016/B978-0-12-823296-5.00016-2.
10. Fytianos, G., Rahdar, A. & Kyzas, G. Z. Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates. *Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 979* 10, 979 (2020).
11. Silva, S., Dias, M. C. & Silva, A. M. S. Titanium and Zinc Based Nanomaterials in Agriculture: A Promising Approach to Deal with (A)biotic Stresses? *Toxics 2022, Vol. 10, Page 172* 10, 172 (2022).
12. Damodharan, J. Nanomaterials in medicine – An overview. *Mater. Today Proc.* 37, 383–385 (2021).
13. Behrens, S. & Appel, I. Magnetic nanocomposites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 39, 89–96 (2016).
14. Khizar, S. *et al.* Magnetic Nanoparticles: From Synthesis to Theranostic Applications. *ACS Appl. Nano Mater.* 4, 4284–4306 (2021).
15. Chen, F. & Zhu, Y. Chitosan enclosed mesoporous silica nanoparticles as drug nano-carriers: Sensitive response to the narrow pH range. *Microporous and Mesoporous Materials* 150, 83–89 (2012).
16. Gaware, S. A., Rokade, K. A. & Kale, S. N. Silica-chitosan nanocomposite mediated pH-sensitive drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 49, 345–351 (2019).
17. Ooi, Y. J., Wen, Y., Zhu, J., Song, X. & Li, J. Surface Charge Switchable Polymer/DNA Nanoparticles Responsive to Tumor Extracellular pH for Tumor-Triggered Enhanced Gene Delivery. *Biomacromolecules* 21, 1136–1148 (2020).
18. Lozano, J. “Compósito de SiO₂/Quitosano” prospecto para uso como excipiente avanzado para la administración de fármacos por vía oral. (IPICYT, San Luis Potosí, 2020).
19. Katterman, C., Pierce, C. & Larsen, J. Combining Nanoparticle Shape Modulation and Polymersome Technology in Drug Delivery. *ACS Appl. Bio Mater.* 4, 2853–2862 (2021).

20. Rampersaud, S. *et al.* The Effect of Cage Shape on Nanoparticle-Based Drug Carriers: Anticancer Drug Release and Efficacy via Receptor Blockade Using Dextran-Coated Iron Oxide Nanocages. *Nano Lett.* 16, 7357–7363 (2016).
21. Deb, P. K. *et al.* Biomaterials and Nanoparticles for Hyperthermia Therapy. in *Biomaterials and Bionanotechnology* 375–413 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814427-5.00011-1.
22. Włodarczyk, A., Gorgoń, S., Radoń, A. & Bajdak-Rusinek, K. Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives. *Nanomaterials* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nano12111807> (2022).
23. Cihoric, N. *et al.* Hyperthermia-related clinical trials on cancer treatment within the ClinicalTrials.gov registry. *International Journal of Hyperthermia* 31, 609–614 (2015).
24. Lee, S.-Y. *et al.* Quo Vadis Oncological Hyperthermia (2020)? *Front. Oncol.* 10, (2020).
25. Rastinehad, A. R. *et al.* Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 18590–18596 (2019).
26. Overchuk, M., Weersink, R. A., Wilson, B. C. & Zheng, G. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine. *ACS Nano* vol. 17 7979–8003 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00891> (2023).
27. Hirsch, L. R. *et al.* Nanoshell-Mediated near-Infrared Thermal Therapy of Tumors under Magnetic Resonance Guidance. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2232479100 (2003).
28. Gobbo, O. L., Sjaastad, K., Radomski, M. W., Volkov, Y. & Prina-Mello, A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics* 5, 1249–1263 (2015).
29. Liu, C., Zou, B., Rondinone, A. J. & Zhang, Z. J. Chemical Control of Superparamagnetic Properties of Magnesium and Cobalt Spinel Ferrite Nanoparticles through Atomic Level Magnetic Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6263–6267 (2000).
30. Dedi, Idayanti, N., Kristiantoro, T., Alam, G. F. N. & Sudrajat, N. Magnetic properties of cobalt ferrite synthesized by mechanical alloying. in *AIP Conference Proceedings* vol. 1964 (American Institute of Physics Inc., 2018).
31. Saleem, S. *et al.* Investigating the Impact of Cu²⁺ Doping on the Morphological, Structural, Optical, and Electrical Properties of CoFe₂O₄ Nanoparticles for Use in Electrical Devices. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 3502 15, 3502 (2022).
32. Sundaresan, A. & Ter-Oganessian, N. V. Magnetoelectric and multiferroic properties of spinels. *J. Appl. Phys.* 129, (2021).
33. Gorbachev, E. A. *et al.* Design of modern magnetic materials with giant coercivity. *Russian Chemical Reviews* 90, 1287–1329 (2021).
34. Medina-Ramírez, I. E. *et al.* Development and Assessment of Nano-Technologies for Cancer Treatment: Cytotoxicity and Hyperthermia Laboratory Studies. *Cancer Invest.* 38, 61–84 (2020).
35. Du, H., Akakuru, O. U., Yao, C., Yang, F. & Wu, A. Transition metal ion-doped ferrites nanoparticles for bioimaging and cancer therapy. *Transl. Oncol.* 15, (2022).
36. Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C. & Kummel, A. C. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf. Sci. Rep.* 69, 132–158 (2014).
37. Pekarsky, A. & Spadiut, O. Intrinsically Magnetic Cells: A Review on Their Natural Occurrence and Synthetic Generation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, (2020).
38. Buschow, K. & Boer, F. *Physics of Magnetism and Magnetic Materials*. (Kluwer Academic Publishers, New York, 2004).

39. Guagliano, M. *et al.* A Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics. *Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics. Front. Mater* 6, 179 (2019).
40. Beola, L. *et al.* Dual Role of Magnetic Nanoparticles as Intracellular Hotspots and Extracellular Matrix Disruptors Triggered by Magnetic Hyperthermia in 3D Cell Culture Models. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 44301–44313 (2018).
41. Kudr, J. *et al.* Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* 7, (2017).
42. Montes-Robles, R. *et al.* Tailored cancer therapy by magnetic nanoparticle hyperthermia: A virtual scenario simulation method. *Comput. Methods Programs Biomed.* 226, (2022).
43. Lan, Y. K. *et al.* Adsorption Behavior and Mechanism of Antibiotic Sulfamethoxazole on Carboxylic-Functionalized Carbon Nanofibers-Encapsulated Ni Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* 32, 9530–9539 (2016).
44. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 103, 317 (2011).
45. Allafchian, A. & Hosseini, S. S. Antibacterial magnetic nanoparticles for therapeutics: a review. *IET Nanobiotechnol.* 13, 786 (2019).
46. Xiang, Y., Hu, C., Wu, G., Xu, S. & Li, Y. Nanomaterial-based microfluidic systems for cancer biomarker detection: Recent applications and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 158, 116835 (2023).
47. Martins, P. M., Lima, A. C., Ribeiro, S., Lanceros-Mendez, S. & Martins, P. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: From the Soul of the Earth to the Deep History of Ourselves. *ACS Appl. Bio Mater.* 4, 5839–5870 (2021).
48. Cervantes, O. *et al.* An easily prepared ferrofluid with high power absorption density and low cytotoxicity for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* 245, (2020).
49. Nikitin, A. A., Ivanova, A. V., Semkina, A. S., Lazareva, P. A. & Abakumov, M. A. Magneto-Mechanical Approach in Biomedicine: Benefits, Challenges, and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11134 (2022).
50. Ribeiro, T. P., Moreira, J. A., Monteiro, F. J. & Laranjeira, M. S. Nanomaterials in cancer: Reviewing the combination of hyperthermia and triggered chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 347, 89–103 (2022).
51. Obaidat, I. M., Narayanaswamy, V., Alaabed, S., Sambasivam, S. & Muralee Gopi, C. V. V. Principles of magnetic hyperthermia: A focus on using multifunctional hybrid magnetic nanoparticles. *Magnetochemistry* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040067> (2019).
52. Baldi, G., Lorenzi, G. & Ravagli, C. Hyperthermic effect of magnetic nanoparticles under electromagnetic field. *Processing and Application of Ceramics* 3, 103–109 (2009).
53. Chang, R. & Overby, J. *Chemistry*. (Mc Graw Hill Educational, 2019).
54. Toro, M. C. G., Schlegel, J. P. & Giraldo, C. H. C. Radioactive Bimetallic Gold–Silver Nanoparticles Production in a Research Nuclear Reactor. *ChemistrySelect* 3, 8936–8941 (2018).
55. Schulz, F. *et al.* Little adjustments significantly improve the Turkevich synthesis of gold nanoparticles. *Langmuir* 30, 10779–10784 (2014).
56. Ahmed, W., Stefan Kooij, E., Van Silfhout, A. & Poelsema, B. Controlling the morphology of multi-branched gold nanoparticles. *Nanotechnology* 21, (2010).
57. Woźniak, A. *et al.* Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28, (2017).

58. Kus-liśkiewicz, M., Fickers, P. & Ben Tahar, I. Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles: Recent Advances in Methodologies and Regulations. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10952 (2021).
59. Huang, X. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* 1, 13–28 (2010).
60. Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A. & Cormode, D. P. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Molecular Pharmaceutics* vol. 10 831–847 Preprint at <https://doi.org/10.1021/mp3005885> (2013).
61. Voliani, Valerio. *Update on Gold Nanoparticles : From Cathedral Windows to Nanomedicine*. (ISmithers Rapra Pub, 2013).
62. Gu, X. *et al.* Preparation and antibacterial properties of gold nanoparticles: a review. *Environmental Chemistry Letters* vol. 19 167–187 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01071-0> (2021).
63. Hammami, I., Alabdallah, N. M., jomaa, A. Al & kamoun, M. Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *J. King Saud Univ. Sci.* 33, 101560 (2021).
64. Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M. & Iati, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics Condensed Matter* vol. 29 Preprint at <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3> (2017).
65. Ng, K. K. & Zheng, G. Molecular Interactions in Organic Nanoparticles for Phototheranostic Applications. *Chem. Rev.* 115, 11012–11042 (2015).
66. Kim, H. J., Kim, B., Auh, Y. & Kim, E. Conjugated Organic Photothermal Films for Spatiotemporal Thermal Engineering. *Advanced Materials* 33, 2005940 (2021).
67. Cui, X. *et al.* Photothermal Nanomaterials: A Powerful Light-to-Heat Converter. *Chem. Rev.* 123, 6891–6952 (2023).
68. Saire-Saire, S. *et al.* Green synthesis of Au decorated CoFe₂O₄ nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol and dimethylphenylsilane oxidation. <https://doi.org/10.1039/c9ra04222a> (2019) doi:10.1039/c9ra04222a.
69. Carlà, F. *et al.* Electrochemical characterization of core@shell CoFe₂O₄/Au composite. *Journal of Nanoparticle Research* 15, (2013).
70. Mohammadi, Z. *et al.* Optimization of cobalt ferrite magnetic nanoparticle as a theranostic agent: MRI and hyperthermia. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 1–18 (2023) doi:10.1007/S10334-023-01072-4/METRICS.
71. He, C., Lu, J. & Lin, W. Hybrid nanoparticles for combination therapy of cancer. *Journal of Controlled Release* 219, 224–236 (2015).
72. Dima, C., Assadpour, E., Dima, S. & Jafari, S. M. Characterization and analysis of nanomaterials in foods. *Handbook of Food Nanotechnology: Applications and Approaches* 577–653 (2020) doi:10.1016/B978-0-12-815866-1.00015-7.
73. Medina-Ramirez, I. E., Macias-Diaz, J. E., Masuoka-Ito, D. & Zapien, J. A. Holotomography and atomic force microscopy: a powerful combination to enhance cancer, microbiology and nanotoxicology research. *Discover Nano* 19, 64 (2024).
74. Dufrêne, Y. F. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* vol. 12 295–307 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45> (2017).
75. Datta, N. R. *et al.* Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat. Rev.* 41, 742–753 (2015).

76. van der Zee, J., van Rhoon, G. C., Wike-Hooley, J. L., Faithfull, N. S. & Reinhold, H. S. Whole-body hyperthermia in cancer therapy: a report of a phase I–II study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 1189–1200 (1983).
77. Kok, H. P. & Crezee, J. Hyperthermia treatment planning: Clinical application and ongoing developments. *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.* 5, 214–222 (2021).
78. Wessalowski, R. *et al.* Regional deep hyperthermia for salvage treatment of children and adolescents with refractory or recurrent non-testicular malignant germ-cell tumours: an open-label, non-randomised, single-institution, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 14, 843–852 (2013).
79. Benos, L., Ninos, G., Polychronopoulos, N. D., Exomanidou, M. A. & Sarris, I. Natural Convection of Blood–Magnetic Iron Oxide Bio-nanofluid in the Context of Hyperthermia Treatment. *Computation* 2022, Vol. 10, Page 190 10, 190 (2022).
80. Scutigliani, E. M., Liang, Y., Crezee, H., Kanaar, R. & Krawczyk, P. M. Modulating the Heat Stress Response to Improve Hyperthermia-Based Anticancer Treatments. *Cancers (Basel)*. 13, 1243 (2021).
81. Manaf, N. A. *et al.* Investigation of single beam ultrasound sensitivity as a monitoring tool for local hyperthermia treatment in breast cancer. *Multimed. Tools Appl.* 82, 5011–5030 (2023).
82. Hou, C. H., Lin, F. L., Hou, S. M. & Liu, J. F. Hyperthermia Induces Apoptosis through Endoplasmic Reticulum and Reactive Oxygen Species in Human Osteosarcoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 17380 (2014).
83. Yi, G. Y., Kim, M. J., Kim, H. I., Park, J. & Baek, S. H. Hyperthermia Treatment as a Promising Anti-Cancer Strategy: Therapeutic Targets, Perspective Mechanisms and Synergistic Combinations in Experimental Approaches. *Antioxidants* 11, 625 (2022).
84. Włodarczyk, A., Gorgoń, S., Radoń, A. & Bajdak-Rusinek, K. Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives. *Nanomaterials* 12, 1807 (2022).
85. Thiesen, B. & Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* 24, 467–474 (2008).
86. Carrasco, E., Stockert, J. C., Juarranz, A. & Blázquez-Castro, A. Plasmonic Hot-Electron Reactive Oxygen Species Generation: Fundamentals for Redox Biology. *Front. Chem.* 8, 591325 (2020).
87. Lucky, S. S., Soo, K. C. & Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews* vol. 115 1990–2042 Preprint at <https://doi.org/10.1021/cr5004198> (2015).
88. Photodynamic Therapy to Treat Cancer - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy>.
89. Nakamura, H. & Takada, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science* vol. 112 3945–3952 Preprint at <https://doi.org/10.1111/cas.15068> (2021).
90. Perillo, B. *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp. Mol. Med.* 52, 192–203 (2020).
91. Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 135–147 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm3737> (2014).
92. Ye, Z. *et al.* Targeted photodynamic therapy of cancer using a novel gallium (III) tris (ethoxycarbonyl) corrole conjugated-mAb directed against cancer/testis antigens 83. *Cancer Med.* 7, 3057–3065 (2018).

93. Civantos, F. J. *et al.* A Review of Photodynamic Therapy for Neoplasms of the Head and Neck. *Adv. Ther.* 35, 324–340 (2018).
94. Park, W. *et al.* Advanced Smart-photosensitizers for More Effective Cancer Treatment. *Biomater. Sci.* 6, 79 (2017).
95. Wang, B. *et al.* Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y> (2024).
96. Jadhav, V. *et al.* Bee venom loaded nanomaterials for cancer therapy: a novel approach. *Discover Materials* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s43939-025-00275-x> (2025).
97. Carreón-Álvarez, C. *et al.* Multibranched gold nanoparticles coated with serum proteins fit for photothermal tumor ablation. *AIP Adv.* 10, (2020).
98. He, M., Cao, B., Gao, X., Liu, B. & Yang, J. Synthesis of multi-branched gold nanostructures and their surface-enhanced Raman scattering properties of 4-aminothiophenol. *J. Mater. Res.* 34, 2928–2934 (2019).
99. Medina-Ramírez, I. E., Arzate-Cardenas, M. A., Mojarro-Olmos, A. & Romo-López, M. A. Synthesis, characterization, toxicological and antibacterial activity evaluation of Cu@ZnO nanocomposites. *Ceram. Int.* 45, 17476–17488 (2019).
100. Bilecka, I. & Niederberger, M. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. *Nanoscale* 2, 1358–1374 (2010).
101. Bilecka, I., Djerdj, I. & Niederberger, M. One-minute synthesis of crystalline binary and ternary metal oxide nanoparticles. *Chemical Communications* 886–888 (2008) doi:10.1039/b717334b.
102. Bilecka, I., Kubli, M., Amstad, E. & Niederberger, M. Simultaneous formation of ferrite nanocrystals and deposition of thin films via a microwave-assisted nonaqueous sol–gel process. *J. Solgel Sci. Technol.* 57, 313–322 (2011).
103. Bilecka, I., Elser, P. & Niederberger, M. Kinetic and thermodynamic aspects in the microwave-assisted synthesis of ZnO nanoparticles in benzyl alcohol. *ACS Nano* 3, 467–477 (2009).
104. Hemmer, E., Benayas, A., Légaré, F. & Vetrone, F. Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm. *Nanoscale Horiz.* 1, 168–184 (2016).
105. Panda, B. R. & Chattopadhyay, A. Synthesis of Au Nanoparticles at ‘all’ pH by H₂O₂ Reduction of H₂AuCl₄. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1911–1915 (2007).
106. Gao, Y. & Torrente-Murciano, L. Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol. *Nanoscale* 12, 2740–2751 (2020).
107. Wang, Y. *et al.* Enhanced dispersion stability of gold nanoparticles by the physisorption of cyclic poly(ethylene glycol). *Nat. Commun.* 11, (2020).
108. Suharyadi, E. *et al.* Photocatalytic activity of magnetic core-shell CoFe₂O₄@ZnO nanoparticles for purification of methylene blue. *Mater. Res. Express* 7, 085013 (2020).
109. Huynh, P. T. *et al.* Rapid and green preparation of multi-branched gold nanoparticles using surfactant-free, combined ultrasound-assisted method. *Processes* 9, 1–16 (2021).
110. Liu, X., Xu, H., Xia, H. & Wang, D. Rapid seeded growth of monodisperse, quasi-spherical, citrate-stabilized gold nanoparticles via H₂O₂ reduction. *Langmuir* 28, 13720–13726 (2012).
111. Yoo, S., Nam, D. H., Singh, T. I., Leem, G. & Lee, S. Effect of reducing agents on the synthesis of anisotropic gold nanoparticles. *Nano Conver.* 9, 5 (2022).
112. Wei, M. Z., Deng, T. S., Zhang, Q., Cheng, Z. & Li, S. Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods at Low Concentrations of CTAB. *ACS Omega* 6, 9188–9195 (2021).

113. Gole, A. & Murphy, C. J. Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed. *Chemistry of Materials* 16, 3633–3640 (2004).
114. Xia, Y. *et al.* Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template**. *Physical Chemistry of Surfaces* vol. 99 (1999).
115. Alves, T. E. P., Pessoni, H. V. S., Franco, A., Burda, C. & Samia, A. C. S. Magnetic-plasmonic properties of CoFe₂O₄@Au nanocomposite. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 164, 110630 (2022).
116. Habibi, M. H. & Parhizkar, H. J. FTIR and UV–vis diffuse reflectance spectroscopy studies of the wet chemical (WC) route synthesized nano-structure CoFe₂O₄ from CoCl₂ and FeCl₃. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 127, 102–106 (2014).
117. Rana, S., Philip, J. & Raj, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. *Mater. Chem. Phys.* 124, 264–269 (2010).
118. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. (John Wiley and Sons, Middlesex, 2001).
119. Bruno, A. J., Correa, J. R., Peláez-Abellán, E. & Urones-Garrote, E. A novel method for the functionalization of aminoacids l-glycine, l-glutamic acid and l-arginine on maghemite/magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 456, 87–91 (2018).
120. De Blasio, C. Thermogravimetric Analysis (TGA). in *Green Energy and Technology* 91–102 (Springer Verlag, 2019). doi:10.1007/978-3-030-11599-9_7.
121. Alves, T. E. P., Pessoni, H. V. S., Franco, A., Burda, C. & Samia, A. C. S. Magnetic-plasmonic properties of CoFe₂O₄@Au nanocomposite. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 164, 110630 (2022).
122. Cholicó, F. A. *et al.* Analysis of the magnetic properties of core-shell iron oxide nanoparticles. *Revista Mexicana de Física* 68, (2022).
123. Du, H., Akakuru, O. U., Yao, C., Yang, F. & Wu, A. Transition metal ion-doped ferrites nanoparticles for bioimaging and cancer therapy. *Transl. Oncol.* 15, (2022).
124. Rani, C. & Tiwari, S. D. Estimation of particle magnetic moment distribution for antiferromagnetic ferrihydrite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 385, 272–276 (2015).
125. Knobel, M. *et al.* Superparamagnetism and other magnetic features in granular materials: A review on ideal and real systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* vol. 8 2836–2857 Preprint at <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.15348> (2008).
126. Saragi, T. *et al.* Particle size and its distribution deduced from magnetic properties of magnetite nanoparticles by the modified Langevin equation. *AIP Adv.* 13, (2023).
127. Qureashi, A. *et al.* Citrate coated magnetite: A complete magneto dielectric, electrochemical and DFT study for detection and removal of heavy metal ions. *Surfaces and Interfaces* 23, (2021).
128. Pilati, V., Gomide, G., Gomes, R. C., Goya, G. F. & Depeyrot, J. Colloidal Stability and Concentration Effects on Nanoparticle Heat Delivery for Magnetic Fluid Hyperthermia. *Langmuir* 37, 1129–1140 (2021).
129. Sabale, S., Jadhav, V., Mane-Gavade, S. & Yu, X. Y. Superparamagnetic CoFe₂O₄@Au with High Specific Absorption Rate and Intrinsic Loss Power for Magnetic Fluid Hyperthermia Applications. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)* 32, 719–725 (2019).
130. Arteaga-Cardona, F. *et al.* Variations in magnetic properties caused by size dispersion and particle aggregation on CoFe₂O₄. *SN Appl. Sci.* 1, (2019).

131. Massoudi, J., Smari, M., Khirouni, K., Dhahri, E. & Bessais, L. Impact of particle size on the structural and smagnetic properties of superparamagnetic Li-ferrite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 528, (2021).
132. Awashra, M. & Młynarz, P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an *in vitro* metabolomic perspective. *Nanoscale Adv.* 5, 2674–2723 (2023).
133. Yedgar, S., Barshtein, G. & Gural, A. Hemolytic Activity of Nanoparticles as a Marker of Their Hemocompatibility. *Micromachines (Basel)*. 13, 2091 (2022).
134. Pecchillo Cimmino, T., Ammendola, R., Cattaneo, F. & Esposito, G. NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2086 (2023).
135. Kim, M. M. & Darafsheh, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* vol. 96 280–294 Preprint at <https://doi.org/10.1111/php.13219> (2020).
136. Overchuk, M., Weersink, R. A., Wilson, B. C. & Zheng, G. Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine. *ACS Nano* vol. 17 7979–8003 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00891> (2023).
137. García Calavia, P., Bruce, G., Pérez-García, L. & Russell, D. A. Photosensitiser-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy of cancer. *Photochemical & Photobiological Sciences* 17, 1534–1552 (2018).
138. Bucharskaya, A. B. *et al.* Photothermal and Photodynamic Therapy of Tumors with Plasmonic Nanoparticles: Challenges and Prospects. *Materials* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ma15041606> (2022).
139. Lee, S. Y., Lee, R., Kim, E., Lee, S. & Park, Y. Il. Near-Infrared Light-Triggered Photodynamic Therapy and Apoptosis Using Upconversion Nanoparticles With Dual Photosensitizers. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, (2020).
140. Yeshchenko, O. *et al.* Third-Generation Anticancer Photodynamic Therapy Systems Based on Star-like Anionic Polyacrylamide Polymer, Gold Nanoparticles, and Temoporfin Photosensitizer. *Molecules* 29, (2024).
141. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592 (2019).
142. Elmore, S. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*.
143. Hessler, J. A. *et al.* Atomic force microscopy study of early morphological changes during apoptosis. *Langmuir* 21, 9280–9286 (2005).
144. Soriano, J. *et al.* Cell death mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. *Sci. Rep.* 7, (2017).
145. Chota, A., George, B. P. & Abrahamse, H. In Vitro Cell Death Mechanisms Induced by Dicoma anomala Root Extract in Combination with ZnPcS4 Mediated-Photodynamic Therapy in A549 Lung Cancer Cells. *Cells* 11, (2022).
146. Dai, J. *et al.* Gold Nanoparticles Decorated g-C3N4 Nanosheets for Controlled Generation of Reactive Oxygen Species upon 670 nm Illumination. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 10589–10596 (2019).
147. Dai, X., Du, T. & Han, K. Engineering Nanoparticles for Optimized Photodynamic Therapy. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5, 6342–6354 (2019).
148. He, J.-S. *et al.* High-Content Imaging Approaches to Quantitate Stress-Induced Changes in Nucleolar Morphology. *Assay Drug Dev. Technol.* 16, 320–332 (2018).
149. Miletic, M. *et al.* Combined Raman and AFM detection of changes in HeLa cervical cancer cells induced by CeO₂ nanoparticles – molecular and morphological perspectives. *Analyst* 145, 3983–3995 (2020).

150. Friedrich, R. P. *et al.* Intracellular quantification and localization of label-free iron oxide nanoparticles by holotomographic microscopy. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 13, 119–130 (2020).
151. Ghasemi, A. *Magnetic Ferrites and Related Nanocomposites. Risk-based Energy Management* (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-817491-3.00014-3.
152. Amiri, M., Salavati-Niasari, M. & Akbari, A. Magnetic nanocarriers: Evolution of spinel ferrites for medical applications. *Advances in Colloid and Interface Science* vol. 265 29–44 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.01.003> (2019).
153. Hakeem, A. *et al.* Magnetic, dielectric and structural properties of spinel ferrites synthesized by sol-gel method. *Journal of Materials Research and Technology* 11, 158–169 (2021).
154. Lozano-López, A. *et al.* Evaluation of CoFe₂O₄-L-Au (L: Citrate, Glycine) as Superparamagnetic-Plasmonic Nanocomposites for Enhanced Cytotoxic Activity Towards Oncogenic (A549) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 7732 (2025).
155. Majid, A. *et al.* Advances in multi-functional superparamagnetic iron oxide nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia for medical applications. in *Advances in Medical and Surgical Engineering* 333–345 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-819712-7.00017-6.
156. Kesse, X. *et al.* Elaboration of Superparamagnetic and Bioactive Multicore-Shell Nanoparticles (γ -Fe₂O₃@SiO₂-CaO): A Promising Material for Bone Cancer Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 12, 47820–47830 (2020).
157. Duval, K. E. A., Petryk, J. D. & Jack Hoopes, P. In vitro and in vivo delivery of magnetic nanoparticle hyperthermia using a custom-built delivery system. *Journal of Visualized Experiments* 2020, 1–15 (2020).
158. Mozhdehbakhsh Mofrad, Y., Asiaei, S., Shaygani, H. & Salehi, S. S. Investigating the effect of magnetic field and nanoparticles characteristics in the treatment of glioblastoma by magnetic hyperthermia method: An in silico study. *Results in Engineering* 23, (2024).
159. Lan, M. *et al.* Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Advanced Healthcare Materials* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132> (2019).
160. Soo Lim, H. DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A DIODE LASER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY. *Laser Ther.* 20, 195–203 (2011).
161. Di Corato, R. *et al.* Combining magnetic hyperthermia and photodynamic therapy for tumor ablation with photoresponsive magnetic liposomes. *ACS Nano* 9, 2904–2916 (2015).
162. Li, L. *et al.* A photosensitizer-conjugated magnetic iron oxide/gold hybrid nanoparticle as an activatable platform for photodynamic cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* 2, 2929–2937 (2014).
163. Khuri, A. I. & Mukhopadhyay, S. Response surface methodology. *WIREs Computational Statistics* 2, 128–149 (2010).
164. Chelladurai, S. J. S. *et al.* Optimization of process parameters using response surface methodology: A review. *Mater. Today Proc.* 37, 1301–1304 (2021).
165. Chaker, H., Ameer, N., Saidi-Bendahou, K., Djennas, M. & Fourmentin, S. Modeling and Box-Behnken design optimization of photocatalytic parameters for efficient removal of dye by lanthanum-doped mesoporous TiO₂. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, (2021).
166. Sau, T. K. & Murphy, C. J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir* 20, 6414–6420 (2004).

167. Burrows, N. D., Harvey, S., Idesis, F. A. & Murphy, C. J. Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments. *Langmuir* 33, 1891–1907 (2017).
168. Foti, A. *et al.* A simple approach for CTAB-free and biofunctionalized gold nanorods to construct photothermal active nanomedicine for potential in vivo applications in cancer cells and scar treatment. *Front. Mater.* 11, (2024).
169. He, J. *et al.* The facile removal of CTAB from the surface of gold nanorods. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 163, 140–145 (2018).



Capítulo 6. Anexos

6.1 Metodología de respuesta de superficie

Uno de los factores más importantes en el diseño de los NCM es la respuesta plasmónica que estos puedan tener al espectro electromagnético en el rango del infrarrojo. Por ello, surge la necesidad de establecer un diseño experimental donde sea posible manipular esta característica con base a las condiciones de reacción a las cuales se somete la reacción de síntesis de las AuNP (ya que estas son quienes generan el plasmón superficial). A partir de esto, se aplican una serie de técnicas matemáticas y estadísticas denominadas Metodología de Respuesta de Superficie (MRS), las cuales consisten en el desarrollo matemático del diseño experimental planteado y con ello lograr asociar una respuesta o variable (y) a una o más variables estudiadas ($x_1, x_2 \dots x_n$) de manera polinomial¹⁶³

$$y = f'(x)\beta + \epsilon \quad (A1)$$

Donde $f'(x)$ representa la función vector asociada a la síntesis de las nanopartículas, β es un vector asociado a las variables del diseño experimental y ϵ es el error humano aleatorio asociado a la síntesis. Luego, para obtener un modelo de mejor ajuste y considerando los distintos factores de influencia de cada variable podemos transformar (A1) en la siguiente ecuación donde se considere cada factor y su influencia¹⁶⁴, de tal manera que:

$$y = \sum_{n=1}^k x_n \beta_n + \epsilon \quad (A2)$$

y se asume que el modelo describe de manera adecuada las condiciones de síntesis. Por lo tanto, el propósito de este modelo radica en: **a)** Establecer las relaciones entre las variables $x_1, x_2 \dots x_n$ y con ello mejorar el control de estas. **b)** Determinar mediante la prueba de hipótesis la jerarquía de influencia de cada variable. **c)** Determinar las condiciones adecuadas para predecir el mejor ajuste de la variable dependiente a las necesidades del diseño experimental

Partiendo de la teoría anterior se utilizó la MRS aplicando el Diseño de Compósito Central (DCC) debido a la cantidad de ensayos necesarios para generarlo, y con ello disminuir los costes y tiempos del desarrollo de esta metodología¹⁶⁵. También a partir del modelo DCC se puede establecer un modelo matemático de segundo orden el cual tendrá un mejor ajuste al comportamiento del experimento (Véase síntesis de AuNP en metodología) aplicando una serie de corridas a partir de una serie de condiciones centrales (Imagen A1). En este método se analizaron dos variables independientes para la síntesis de AuNP; las cuales son $x_1 = \mu\text{L de Cit. Na agregados}$ y $x_2 = \mu\text{L de H}_2\text{O}_2 \text{ agregados}$ y como variable dependiente (y) se considerará la longitud de onda (en nanómetros) del segundo plasmón superficial generado por las AuNP con un factor de confianza de $\alpha = \pm 1.41$ (Imagen A1). Partiendo de estas condiciones se utilizó el software Minitab® al cual se le programaron las condiciones centrales del diseño y con ello generó las distintas condiciones de las corridas a aplicar (Tabla A1).

Tabla A1. Condiciones experimentales generadas por el software Minitab junto con los resultados obtenidos del segundo plasmón superficial de cada corrida

Orden Estadístico	Cit Na (μL)	H ₂ O ₂ (μL)	2do plasmón (nm)
3	400	150	646
1	400	50	681
4	600	150	632
9	500	100	629
8	500	171	0
2	600	50	0
11	500	100	618
5	359	100	585
7	500	29	645
6	641	100	604
12	500	100	680
10	500	100	662
13	500	100	651

Tabla A2. Resumen de las condiciones experimentales generadas por Minitab para la síntesis de las AuNP

Factores:	2	Réplicas:	1
Corridas base:	13	Total de corridas:	13
Bloques base:	1	Total de bloques:	1

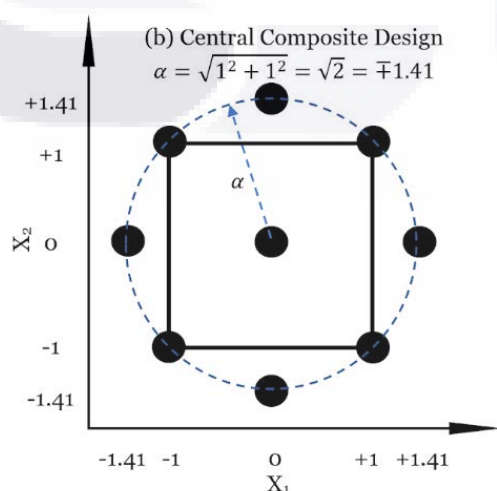


Imagen A1. Esquema representativo del modelo de DCC y cálculo del grado de confianza α

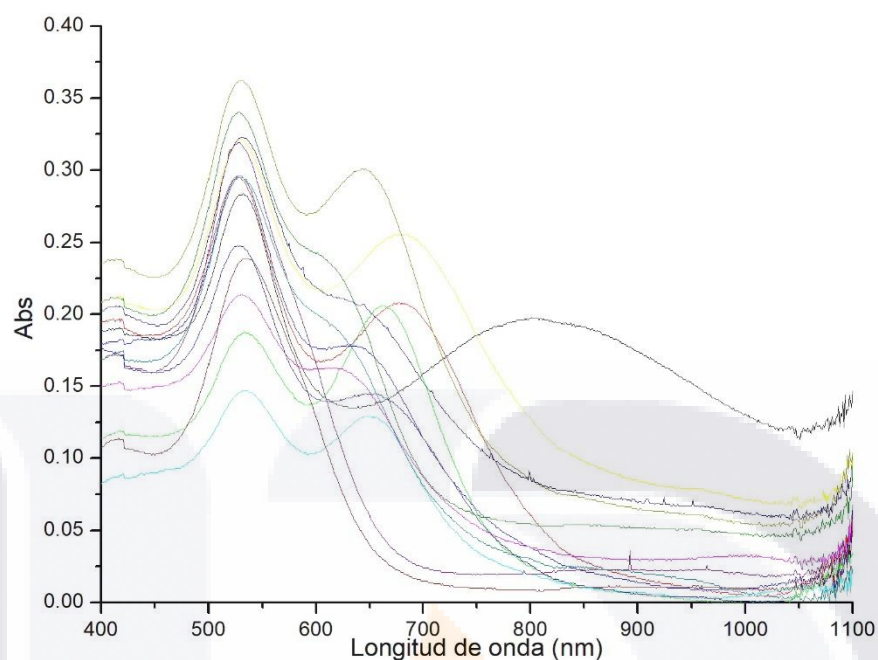


Imagen A2. Gráfico de los espectros UV-Vis de las distintas corridas generadas por Minitab®

A continuación, se muestra el resumen experimental generado por Minitab a partir de los resultados obtenidos:

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	648	101	6.44	0.000	
Cit Na (uL)	-83.5	79.5	-1.05	0.329	1.00
H2O2 (uL)	-39.4	79.5	-0.50	0.636	1.00
Cit Na (uL)*Cit Na (uL)	-18.9	85.3	-0.22	0.831	1.02
H2O2 (uL)*H2O2 (uL)	-154.9	85.3	-1.82	0.112	1.02
Cit Na (uL)*H2O2 (uL)	167	112	1.48	0.182	1.00

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
224.969	49.44%	13.33%	0.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	346445	69289	1.37	0.340
Lineal	2	68216	34108	0.67	0.540
Cit Na (uL)	1	55800	55800	1.10	0.329
H2O2 (uL)	1	12416	12416	0.25	0.636
Cuadrado	2	167007	83504	1.65	0.259
Cit Na (uL)*Cit Na (uL)	1	2495	2495	0.05	0.831
H2O2 (uL)*H2O2 (uL)	1	166996	166996	3.30	0.112
Interacción de 2 factores	1	111222	111222	2.20	0.182
Cit Na (uL)*H2O2 (uL)	1	111222	111222	2.20	0.182
Error	7	354279	50611		
Falta de ajuste	3	351789	117263	188.37	0.000
Error puro	4	2490	622		
Total	12	700724			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{2do plasm} = & 1719 - 2.28 \text{ Cit Na (uL)} - 5.1 \text{ H2O2 (uL)} - 0.00189 \text{ Cit Na (uL)*Cit Na (uL)} \\ & - 0.0620 \text{ H2O2 (uL)*H2O2 (uL)} + 0.0334 \text{ Cit Na (uL)*H2O2 (uL)} \end{aligned}$$

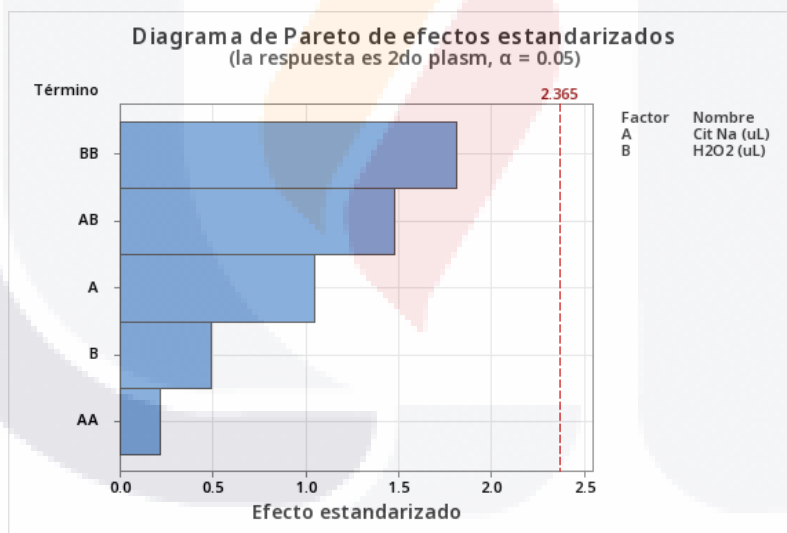


Imagen A3. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de las variables usadas en MSR

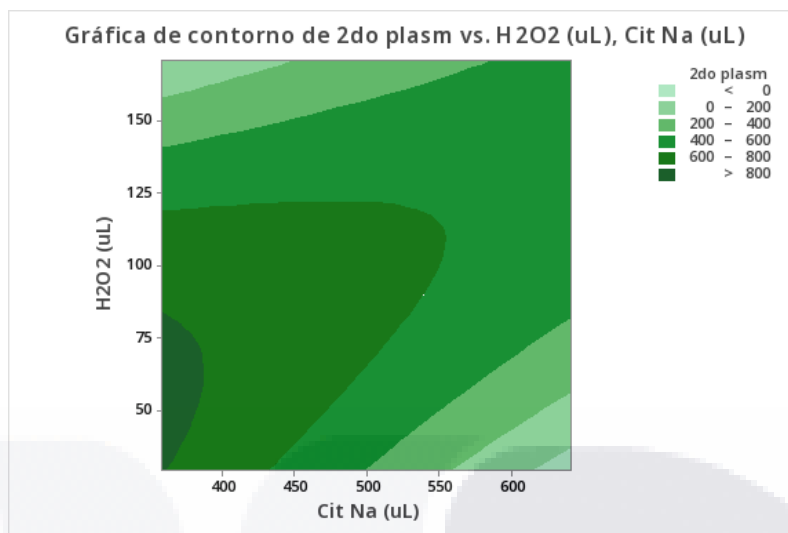


Imagen A4. Gráfica de contorno bidimensional de MSR

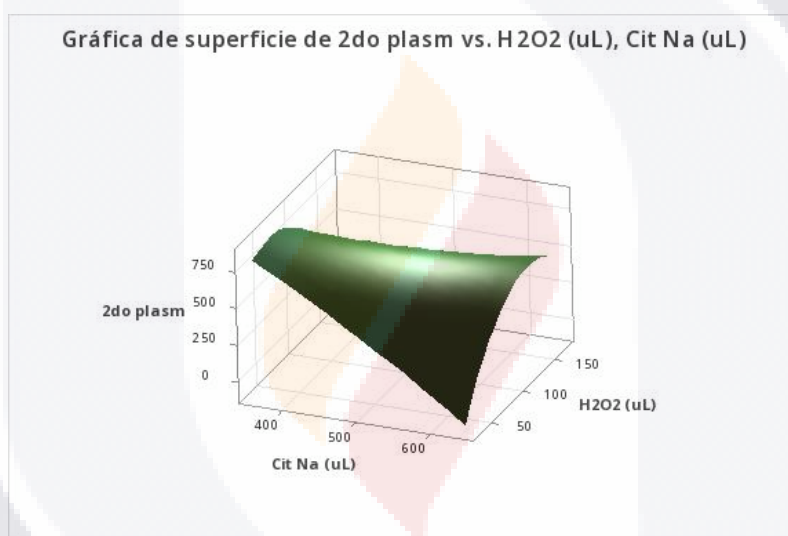


Imagen A5. Gráfico de superficie de respuesta de la síntesis de las AuNP

Los resultados obtenidos (Imagen A3 y A5) demuestran que la variable de mayor influencia en el experimento es x_2 . En la imagen A3 se describe la variable de mayor influencia dentro del modelo cuadrático, estableciendo que el H_2O_2 por sí mismo logra afectar en gran medida la aparición del segundo plasmón en la región deseada, por lo que se puede establecer que a partir de los μL usados de H_2O_2 se podrá predecir la presencia del segundo plasmón en la región de interés. Así mismo, con base al resumen generado se puede deducir que el modelo logra describir la dinámica de la síntesis no tiene un ajuste elevado, por lo tanto, se establece que pueden existir más variables (como pueden ser la temperatura o el pH de la reacción) con influencia considerable dentro del diseño. En conclusión, se establece la relevancia del H_2O_2 en la síntesis de las AuNP y cómo es que este factor puede generar el segundo plasmón en el intervalo de nuestro interés.

6.2 Síntesis de nanobarras de Au (NBAu)

Para que el fenómeno del PRS se manifieste en determinada región del espectro electromagnético, es necesario sintetizar nanoestructuras con determinadas características físicas. En el caso de las nanopartículas de Au (Imagen A6a), a partir de diámetros mayores a 50 nm no presentan PRS de manera eficiente (o en algunos casos dejan de manifestarlo), lo que no permite generar ROS en las situaciones idóneas. Debido a esto, se ha buscado morfologías alternativas que puedan conservar las dimensiones nanométricas, eviten causar daño mecánico a las células y puedan ser internalizadas sin generar respuesta inflamatoria. Con este objetivo en mente, se determinó la realización de la síntesis de nanobarras de Au. A causa de la forma alargada de estas estructuras, se generan dos respuestas plasmónicas en estos materiales (Imagen A6b). El primer plasmón se atribuye al tamaño longitudinal de la estructura (el cual se presenta en longitudes de onda cercanas al espectro visible) mientras que el segundo aparece a causa de la dimensión transversal de la nanobarra.

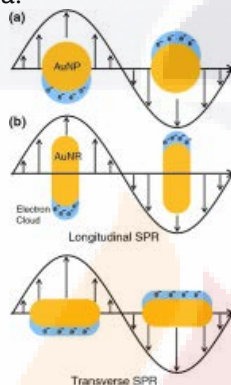


Imagen A6. Representación de los modos en los que se presenta el PRS en función de la morfología. a) nanoesfera de Au. En esta sólo existe un solo PRS a causa de que en cualquier dirección existe una misma longitud b) Nanobarras de Au. En este escenario, por la forma de la estructura es posible generar dos respuestas en diferentes longitudes de onda.

Como objetivo, se propuso la síntesis de nanobarras con un máximo de absorción en los 850 nm. Inicialmente se utilizó el protocolo diseñado por Sunghoon Yoo et al. (2022)¹¹¹ los cuales están basados en el trabajo de J. Murphy (2004)^{113,166,167} para sintetizar nanobarras en distintos pasos (Imagen A7). A la metodología propuesta por J. Murphy se le denomina “síntesis de nanobarras por semillas”. En esta metodología se parte de una matriz de sal precursora de Au junto con el CTAB y se agrega un agente reductor débil (ácido ascórbico 0.1 M) para generar las semillas. Posteriormente, se agregan las semillas a la solución de crecimiento junto con el agente reductor a temperatura ambiente.

Scheme 1. General Methodology for the Generation of Gold Nanorods

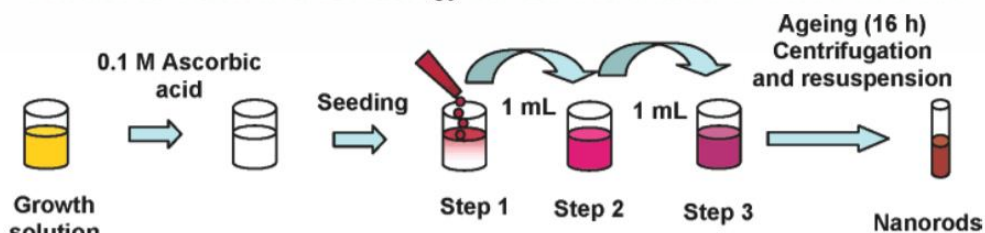


Imagen A7. Esquema de la metodología principal propuesta por J. Murphy (2004)¹¹³

En la metodología de Sunghoon Yoo et al. (2022)¹¹¹ (Imagen A8) se propone la aplicación de NaBH_4 (como formador de las semillas), Ag (proveniente de AgNO_3) para inducir y controlar la

formación de las nanobarras (Imagen A8) además de conducir la reacción a 40 °C, lo que permite aumentar la entropía de la reacción e inducir la formación de las nanoestructuras distintas.

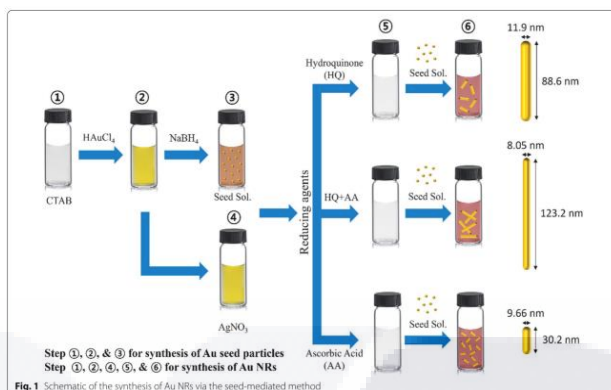


Imagen A8. Esquema de la síntesis de AuNB por Sunghoo Yoo et al. (2002)

Los primeros resultados obtenidos fueron exitosos, logrando replicar lo expuesto en el protocolo. En la imagen A9, se muestra el espectro UV-Vis de las nanobarras sintetizadas. Como es evidente, existen dos PRS que confirman la formación de la estructura buscada. Sin embargo, las condiciones de síntesis no son suficientes para generar la respuesta en la longitud de onda deseada.

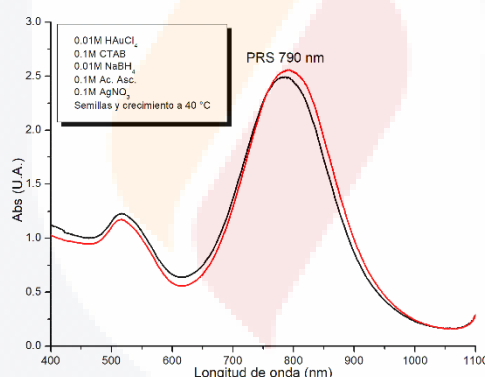


Imagen A9. Espectro UV-Vis de las nanobarras usando la síntesis de Sunghoon Yoo et al. (2022) sin modificaciones

Una vez analizados los resultados, se modificó la temperatura de síntesis para inducir la formación de nanobarras más largas y con esto generar un corrimiento hacia el rojo del segundo PRS. Como el objetivo plantea la necesidad de llegar hasta los 850 nm, implica crecer las barras en forma transversal debido a que el segundo PRS es el que puede llegar a estas longitudes de onda. Así pues, se optó por modificar la temperatura de la solución de crecimiento y mantener las condiciones originales de las semillas. Por lo tanto, se disminuyó la temperatura de síntesis de las nanobarras a la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), así la energía de reacción disminuirá en la solución de crecimiento, disminuyendo la cinética de la reacción lo que permitiría crecer el tamaño de las nanobarras antes de consumir los precursores en la matriz. Las modificaciones resultaron favorables para el objetivo planteado (Imagen A10), lo que permitió obtener una respuesta del segundo PRS en una longitud de onda mayor (840 nm). Esto representa un aumento transversal de las nanobarras.

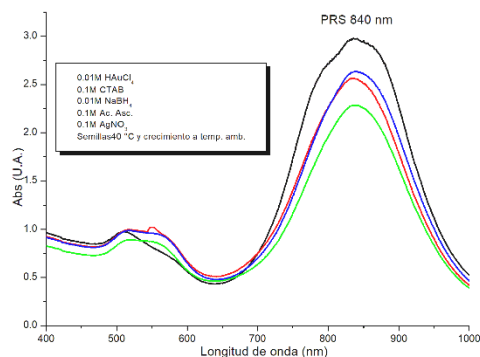


Imagen A10. Espectro UV-Vis de las nanobarras usando la síntesis de Sunghoon Yoo et al. Modificada

Luego, buscando aumentar el corrimiento hacia el rojo, se modificaron nuevamente las temperaturas de reacción. En esta etapa se propusieron dos temperaturas distintas, 15 °C y 20 °C. Por lo tanto, disminuyendo la temperatura, se disminuye la cinética de la reacción permitiendo una mayor interacción entre los átomos de Au y los núcleos metálicos, generando estructuras más alargadas y por consecuencia, una longitud de onda mayor en la respuesta del PRS. Como se muestra en la Imagen A11, las modificaciones de la síntesis resultaron positivas para el objetivo propuesto. Se generó un corrimiento hacia el rojo hasta llegar a un máximo de absorción en 847 nm, resultado aceptable respecto a los 850 nm deseados. Por lo tanto, quedan establecidas las condiciones óptimas para construir nanobarras de Au, con respuesta en la primera ventana biológica (~ 850 nm).

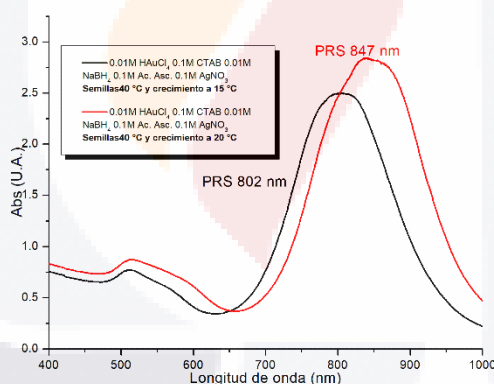


Imagen A11. Espectro UV-vis de las nanobarras en condiciones de temperatura distintas.

Una vez obtenidas las AuNB se determinó el siguiente objetivo, retirar el CTAB de la superficie de las AuNB. Este surfactante es fundamental para la generación de las AuNB en concentraciones lo suficientemente altas para ser citotóxicas (0.01 M). Este conduce el crecimiento de forma anisotrópica y en conjunto con la Ag, aportan para la formación de las AuNB. En contraste, al ser un surfactante fuertemente catiónico al entrar en contacto con las membranas celulares desestabiliza sus cargas y genera lisis celular^{57,168,169}. Para evitar el uso de algún agente que pueda interaccionar químicamente con las nanobarras, se optó por remover el CTAB por medios físicos para mantener su tamaño.

Una vez sintetizadas las AuNB, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y posteriormente se separaban de la matriz y se lavaban con 2 mL de DI. Este proceso se realizó por triplicado y se analizó nuevamente por UV-Vis para buscar algún cambio en las propiedades plasmónicas. Así mismo, para determinar la remoción de residuos de la reacción original se dejó reposar por 24 h las AuNB y se analizaron por UV-Vis.

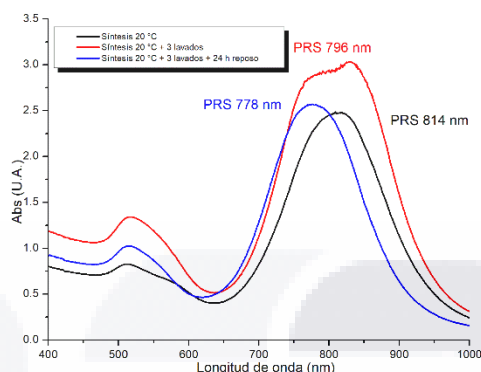


Imagen A12. Espectro UV-vis de las nanobarras sintetizadas, después de 3 ciclos de lavado y 24 h de reposo

Como es notorio, las nanobarras comienzan a perder su estabilidad conforme el CTAB disminuye su presencia, lo que por consecuencia genera cambios en la morfología de las nanoestructuras. Ambos procesos (lavados y reposo por 24 h) tienen como consecuencia cambios en las AuNB generando un corrimiento hacia el azul en el PRS alejándose de la zona de respuesta deseada. Aunado a lo anterior, se emplearon AuNB con 3 lavados para la síntesis de NCMCit y posteriormente se sometieron a una prueba de hemólisis.

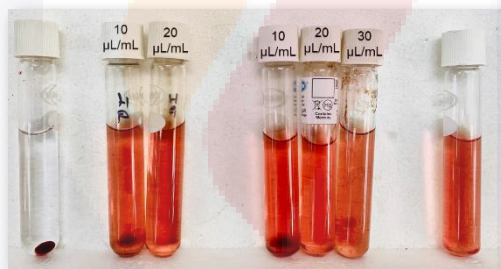


Imagen A13. Resultados de la prueba de hemólisis con y sin aplicación de la TFD. De izquierda a derecha se muestra: Control negativo, tubos no irradiados con luz IR, tubos irradiados con luz IR y control positivo.

Como se muestra en la imagen A13, tanto los materiales irradiados como no irradiados muestran una hemólisis total, por lo que el proceso de lavado no fue suficiente y aún existía suficiente cantidad de CTAB en las AuNB como para causar un elevado daño celular. Por lo tanto, es necesario investigar alguna alternativa para crear las nanobarras con menor citotoxicidad y que conserven la respuesta en la primera ventana biológica.

6.3 Cálculos demostrativos

6.3.1 Cálculo del tamaño promedio de nanopartícula (D) usando la ecuación de Scherrer para el caso de CoFe_2O_4 prístina

Para este caso $K=0.94$, $\lambda=1.541874 \text{ nm}$, $\beta=1.31582$ y $2\theta=35^\circ$ con base al plano de mayor intensidad (311)

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

$$D = \frac{(0.94 * 1.541874 \text{ nm})}{1.31582 * \cos(17.75)}$$

$$D = 6.3 \text{ nm}$$

6.3.2 Cálculo de los diámetros núcleo-coraza de los nanomateriales funcionalizados y NCM

Estos cálculos realizaron a partir de los resultados obtenidos en el análisis TGA y a partir de estos se obtienen las fracciones másicas de los componentes orgánicos y se realiza el cálculo para saber el tamaño de la coraza (5) y posteriormente el diámetro núcleo-coraza. Para todos los casos se tomará el valor de la densidad de CoFe_2O_4 como $\rho_c=5.29 \text{ g/cm}^3$

$$\Delta = \frac{\sigma_c}{2} \left(\left[\frac{\eta_c \rho_s}{\eta_c \rho_s + \eta_s \rho_c} \right]^{\frac{-1}{3}} - 1 \right) \quad (5)$$

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta \quad (6)$$

1) $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Cit}$

Para este caso $\eta_c=0.83$, $\eta_s=0.17$ y $\rho_s=6 \text{ g/cm}^3$

$$\Delta = \frac{7.1 \text{ nm}}{2} \left(\left[\frac{0.83 * 6 \text{ g/cm}^3}{(0.83 * \frac{6 \text{ g}}{\text{cm}^3}) + (0.17 * \frac{5.29 \text{ g}}{\text{cm}^3})} \right]^{\frac{-1}{3}} - 1 \right)$$

$$\Delta = 0.1991 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta$$

$$\sigma_{cs} = 7.1 \text{ nm} + 2 * 0.1991 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = 7.49 \text{ nm}$$

2) *CoFe₂O₄-Cit-Au*

Para este caso $\eta_c=0.81$, $\eta_s=0.19$ y $\rho_s=6 \text{ g/cm}^3$

$$\Delta = \frac{7.1 \text{ nm}}{2} \left(\left[\frac{0.81 * 6 \text{ g/cm}^3}{(0.81 * \frac{6 \text{ g}}{\text{cm}^3}) + (0.19 * \frac{5.29 \text{ g}}{\text{cm}^3})} \right]^{\frac{-1}{3}} - 1 \right)$$

$$\Delta = 0.2263 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta$$

$$\sigma_{cs} = 7.1 \text{ nm} + 2 * 0.2263 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = 7.55 \text{ nm}$$

3) *CoFe₂O₄-Gly*

Para este caso $\eta_c=0.84$, $\eta_s=0.16$ y $\rho_s=1.161 \text{ g/cm}^3$

$$\Delta = \frac{7.1 \text{ nm}}{2} \left(\left[\frac{0.84 * 1.161 \text{ g/cm}^3}{(0.84 * \frac{1.161 \text{ g}}{\text{cm}^3}) + (0.16 * \frac{5.29 \text{ g}}{\text{cm}^3})} \right]^{\frac{-1}{3}} - 1 \right)$$

$$\Delta = 0.8220 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta$$

$$\sigma_{cs} = 7.1 \text{ nm} + 2 * 0.8220 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = 8.74 \text{ nm}$$

4) *CoFe₂O₄-Gly-Au*

Para este caso $\eta_c=0.85$, $\eta_s=0.15$ y $\rho_s=1.161 \text{ g/cm}^3$

$$\Delta = \frac{7.1 \text{ nm}}{2} \left(\left[\frac{0.85 * 1.161 \text{ g/cm}^3}{(0.85 * \frac{1.161 \text{ g}}{\text{cm}^3}) + (0.15 * \frac{5.29 \text{ g}}{\text{cm}^3})} \right]^{\frac{-1}{3}} - 1 \right)$$

$$\Delta = 0.7716 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = \sigma_c + 2\Delta$$

$$\sigma_{cs} = 7.1 \text{ nm} + 2 * 0.7716 \text{ nm}$$

$$\sigma_{cs} = 8.64 \text{ nm}$$

6.3.3 Cálculo del ajuste Langevin para la determinación del momento magnético por partícula

Para la determinación de este valor se parte del ajuste de Langevin (7) para la determinación. Este asume una distribución logarítmica de los tamaños con una desviación estándar casi despreciable, por lo que se asume un tamaño muy uniforme, lo que influye en el resultado final.

$$L(\mu, H) = M_s * [\cot h(\frac{\mu H}{k_B T}) - (\frac{k_B T}{\mu H})] \quad (7)$$

Para este cálculo fue necesario convertir (7) a una forma en la que el software Origin 6.0 pueda realizar el cálculo. Usando los datos de los análisis VS, se sigue la siguiente ruta en la ventana activa de los datos: *Analysis* → *NON-linear curve Fit* y en la ventana desplegada se seleccionará la opción de escritura manual de la función a usar y posteriormente se asigna las variables dependientes (y) e independientes (x) relacionadas a las columnas del archivo donde se encuentran los datos y en la ventana *definition* se asignó la siguiente ecuación que corresponde al ajuste Langevin en la siguiente forma:

$$y = M_s * \left[\left(\frac{1}{\tanh\{P_1 * x\}} \right) \left(\frac{1}{\{P_1 * x\}} \right) \right] \quad (8)$$

Con la siguiente instrucción, se pasa a la ventana de cálculo y se le da la instrucción de *create curve* para empezar con la simulación. Se realizaron por lo menos 50 iteraciones para asegurar un ajuste lineal lo más alto posible y con esto se genera el gráfico. En estos gráficos generados, el software incluirá el ajuste R^2 junto con el valor de P_1 que se usará para calcular el momento magnético. Posteriormente se usó la ecuación (8) para determinar $\langle \mu \rangle$ (9)

$$\mu = P_1 * K_B * T \quad (9)$$

Donde K_B es la constante de Boltzman y T la temperatura a la cual se realizó el análisis VSM (300° K)

1) CoFe_2O_4

Para este caso $P_1 = 0.00112$

$$\begin{aligned} \mu &= 0.00112 * 1.38 \times 10^{-16} * 300 \\ \mu &= 4.64 \times 10^{-21} \frac{\text{erg}}{\text{G}} \\ \mu &= 5001 \mu\text{B} \end{aligned}$$

2) CoFe_2O_4 -Cit-Au

Para este caso $P_1 = 0.00101$

$$\begin{aligned} \mu &= 0.00101 * 1.38 \times 10^{-16} * 300 \\ \mu &= 4.18 \times 10^{-17} \frac{\text{erg}}{\text{G}} \\ \mu &= 3617 \mu\text{B} \end{aligned}$$

3) CoFe_2O_4 -Gly-Au

Para este caso $P_1 = 0.00101$

$$\begin{aligned} \mu &= 0.00081 * 1.38 \times 10^{-16} * 300 \\ \mu &= 3.55 \times 10^{-17} \frac{\text{erg}}{\text{G}} \\ \mu &= 3617 \mu\text{B} \end{aligned}$$

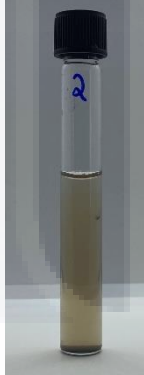
6.4 Pruebas de estabilidad coloidal

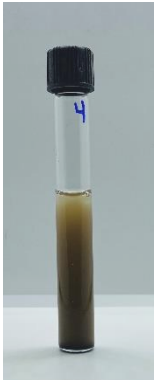
Para que los nanomateriales desarrollados puedan funcionar de manera eficiente y apropiada en las condiciones a las cuales se les desea probar, es fundamental conocer y determinar la estabilidad de estos en suspensión. De acuerdo con lo reportado por Pilati V et al. (2021)¹²⁸, este parámetro es de suma importancia en la absorción de los campos magnéticos y posterior dispersión de calor en el medio, ya que cuando las nanopartículas precipitan y se agregan, se reduce y evita las interacciones con los campos electromagnéticos y magnéticos, por lo que y decrece la eficiencia al dispersar el calor en el medio.

Para desarrollar esta prueba se sintetizaron los ferrofluidos (matriz de goma arábica al 3%) de cada material a una concentración de 1mg/mL a un volumen final de 5 mL. Se sometieron al baño ultrasónico por 5 min para dispersar lo más posible al material y eliminar agregados que puedan existir previamente. Posteriormente se dejaron en reposo y se obtuvieron fotografías de cada muestra en intervalos de 0, 8, 16 y 24 h para registrar la estabilidad coloidal con el paso del tiempo usando la turbidez como parámetro a considerar.

Los resultados se muestran en la tabla A3, en los cuales se puede apreciar el cambio en la turbidez y opacidad de las muestras conforme el tiempo avanza. También, se agregó una muestra de CoFe_2O_4 prístino en matriz acuosa para demostrar el contraste entre el uso de agua y la goma arábica cuando el material no ha sido modificado. Los resultados demuestran que la implementación de la goma mejora notoriamente la estabilidad de las nanopartículas. Debido a la composición de la GA, se crea repulsión entre sus propias moléculas y las nanopartículas lo que genera un aumento en el tiempo de suspensión de los nanomateriales. Posteriormente se puede observar el cambio en la dinámica de los materiales cuando han sido modificados y cómo interaccionan con la matriz a lo largo del tiempo. Cuando la superficie de los nanomateriales ha sido modificada, se genera un cambio en las cargas superficiales; en el caso del Cit por su carácter de ácido triprótico aporta más cargas negativas en la superficie creando una mayor repulsión entre las nanopartículas y el medio. Sin embargo, en el caso de la Gly se muestra un resultado diferente que, aunque mejore la estabilidad de la CoFe_2O_4 no sucede de la misma manera que en el Cit. Aun así, cuando los NMN están sintetizados, la estabilidad coloidal también se modifica, ya que las AuNP también aportarán cargas en la dinámica de los materiales, lo que se ve reflejado en las imágenes donde los NCM muestran una estabilidad coloidal mayor que los demás materiales, lo que demuestra que la formación del NCM mejora las propiedades físicas de los materiales anteriores.

Tabla A3. Imágenes de la prueba de estabilidad coloidal respecto al tiempo. Se muestra el avance temporal de los ferrofluidos sintetizados con GA 3% y 1 mg/mL de cada material respectivamente. La intensidad de la turbidez se relaciona directamente con la estabilidad coloidal del nanomaterial.

Material (1 mg/mL)	0 h	8 h	16 h	24 h
CoFe_2O_4 (Agua)				
CoFe_2O_4 (GA 3%)				
CoFe_2O_4 -Gly				

CoFe₂O₄-Gly-Au				
CoFe₂O₄-Cit				
CoFe₂O₄-Cit-Au				

6.5 Pruebas de fototermia inducida por luz IR

En el caso de las AuNP además de haberse reportado la capacidad fotodinámica (generación de ROS mediante ondas electromagnéticas) también se reporta la capacidad de la fototermia (aumento de la temperatura mediante la activación de ondas electromagnéticas). Estos análisis se desarrollaron para determinar si en los experimentos de viabilidad (Véase 4.3.2 *Pruebas biológicas: pruebas de generación de ROS*), los resultados pueden ser atribuidos a un solo factor (creación de ROS) o si existe la sinergia con otro fenómeno (ROS + Aumento de temperatura).

Para el desarrollo de esta prueba se siguió la siguiente metodología. Se utilizó una caja de cultivo de 24 pocillos para simular las condiciones a las cuales se realizaron los ensayos de producción de ROS la cual fue colocada dentro de una cámara para aislarla lo más posible de contaminaciones lumínicas. En un pocillo se agregó 1 mL del ferrofluido (previamente sumergido en baño ultrasónico por 1 min) y se colocó un termopar dentro de este para registrar los cambios de temperatura. Luego, se registró la temperatura inicial (0 min), después se colocó la lámpara de luz IR (850 nm) sobre la placa de cultivo y se registró la temperatura cada minuto en un lapso de 10 min (Imagen A14).



Imagen A14. Imágenes del diseño usado para los experimentos de fototermia. A la izquierda se observa el dispositivo montado y la luz IR siendo irradiada sobre la placa de cultivo. A la derecha se muestra el dispositivo montado, funcionando y tapado con papel aluminio para evitar perturbaciones exteriores.

Tabla A4. Resultados en grados Celsius de las pruebas fototérmicas. No se observa variación considerable en los resultados.

Material	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	8 min	9 min	10 min
CoFe ₂ O ₄	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
NCMCit	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
NCMGly	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26

Los resultados demuestran que no hay evidencia de efectos fototérmicos en los ferrofluidos al aplicarles luz IR. Es posible que la morfología y/o tamaño de las AuNP no sean adecuadas para generar efectos fototérmicos. Por lo que se puede concluir que la muerte celular inducida en los ensayos de viabilidad es por los ROS generados mediante el PRS.