

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Interacción de Nanovarillas de Oro-Quitosano-PVA en una
Monocapa de DPPC**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

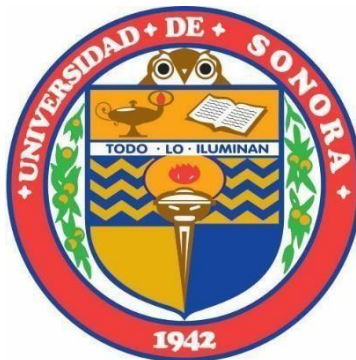
Presenta:

Samara Cecilia Solorio Bojórquez

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2017

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Samara Cecilia Solorio Bojórquez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico Biólogo Clínico**

Dr. Josué Juárez Elías Onofre

Director de Tesis

Dra. Viviana Reyes Márquez

Secretario

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Vocal

Dra. Aned de León Flores

Suplente



Este trabajo fue patrocinado y apoyado por CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología)

Convocatoria de CB-2014-1 con número de proyecto 236185

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por aceptarme en su plan de estudios permitiéndome obtener el grado de licenciatura como Químico Biólogo Clínico.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Nanotecnología que me brindaron conocimientos y apoyo en el proceso de desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Josué Juárez Elías Onofre, quien realizo un papel muy importante en la elaboración de este trabajo como director de tesis y me otorgo la oportunidad de explorar nuevas áreas de investigación.

Un profundo agradecimiento a Dr. Reynaldo, Mario, Gloria y Pedro quienes de manera desinteresada, me brindaron su tiempo y conocimiento durante la elaboración de este trabajo.

Un muy Profundo y especial agradecimiento a mi Familia quienes siempre me brindaron su apoyo y día con día me enseñan lo importante que es tener a las personas que quieres cerca.

Y finalmente, pero no por eso menos importante, un especial agradecimiento a mis amigos Iván, Roció, Nadia, Martha, Emma, Ireri, Rosa a la bola de Frikis y no frikis, Claudia, Encinas, Machuy, Brisa, Isabell, Alejandra, Itzel, Erlin, Lilian. A todos mis amigos y compañeros, gracias por todos sus consejos y apoyo, aparte de compartir tantos momentos divertidos.

DEDICATORIA

A mis padres Humberto Solorio y Norma Elizabeth quienes siempre me apoyan y están conmigo en cada paso que doy en mi vida. Enseñándome la importancia de ser una persona responsable, perseverante y humilde para lograr el éxito personal.

A Karla y Siria, quienes no solo son mis hermanas, sino también mis mejores amigas, ellas siempre me guían y me animan a atreverme a hacer lo que parece imposible.

A mi sobrino René, gracias por recordarme lo importante que es jugar para aprender.

A toda mi familia, mi tía Chayo, quien le estaré eternamente agradecida por acogerme durante una temporada de mis estudios y mostrándome que la lectura es fundamental en nuestra vida, mi tía Olga por enseñarme a disfrutar la vida a través de la música diciéndome que no olvide practicar con el violín, mirando la fuerza y su experiencia de ambas, sigo aprendiendo mucho de ellas.

A mis primos, Cristian, Cristobal †, Sebastián, Jaime, en especial a mis primos Rubi que es prácticamente es mi otra hermana mayor que siempre me enseña cosas nuevas, mostrando que sin importar la adversidad la determinación te hace salir adelante, Alma que nos cuida a todos y nos enseña que la perseverancia y amabilidad son buenos aliados y Diego que me ha brindado su apoyo incondicionalmente de manera desinteresada, sus saludos por las mañanas me hacen el día.

A mi abuela Manuela †, siempre me enseñaste la importancia de compartir un dulce con las personas que quieres, para construir momentos memorables.

Gracias a todos!

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivo particulares	15
ANTECEDENTES	16
Nanotecnología.....	16
Nanopartículas.....	17
Nanopartículas de Oro.....	17
Plasmón de Resonancia Superficial (RPS).....	18
Nanovarillas de Oro.....	19
Polímeros Biodegradables	21
Quitosano.....	22
Polivinil alcohol (PVA).....	26
Técnicas de Caracterización de Nanopartículas de Oro.....	27
Dispersión de luz dinámica (DLS).....	27
Potencial Zeta (ζ).....	27
Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).....	29
Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	31
Espectrofotómetro de UV-Vis	31
Balanza de Langmuir	32
Isoterma Π vs A	33
Fosfolípidos	35
HIPÓTESIS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Obtención de Materia Prima.....	38

Síntesis de Nanovarillas de Oro.....	38
Síntesis de Quitosano Tiolado.....	39
Modulación de Carga Superficial de las Nanovarillas Oro–Quitosano con PVA.....	40
Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	40
Potencial ζ	41
Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	42
Obtención del Espectro de Absorción mediante el Espectrofotómetro UV-Vis	42
Balanza de Langmuir	42
Preparación del modelo de membrana celular usando el fosfolípido 1,2- dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
Síntesis de Nanovarillas de Oro con Quitosano.....	44
Espectro de absorbancia de las nanovarillas de oro	45
Caracterización Morfológica de las Nanovarillas de Oro por Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM).....	46
Modulación de Carga Superficial de Nanovarillas de Oro–Quitosano con PVA	47
Morfología de Nanovarillas por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	50
Isotermas Π vs A	51
CONCLUSIÓN	55
RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Comparaciones de tamaños a escala nanométrica [19].....	16
Figura 2. Representación del desplazamiento oscilatorio del plasmón de resonancia superficial de nanoesferas y nanovarillas de oro (R. Álvarez, 2016)	18
Figura 3. Esquema representativo del espectro típico de absorción de las nanovarillas de oro [26]	20
Figura 4. Estructura de la Quitina. [32].....	23
Figura 5. Esquema representativa de la estructura y los grupos funcionales activos en molécula del quitosano	24
Figura 6. Estructuras de varios compuestos que proporcionan el grupo tiol al quitosano [34].	25
<i>Figura 7. Estructura representativa del polivinil alcohol (PVA). Fuente:</i>	26
Figura 8. Potencial ζ y la doble capa eléctrica.[42].....	28
Figura 9. Componentes del AFM [45].	30
Figura 10. Esquema general de una balanza de Langmuir-Blodgett.	32
Figura 11. Esquema representativo de las fases se la Isoterma de Π -A	35
Figura 12. Representación de la luz dispersa detectada por el detector [42]	41
Figura 13. Esquema representativo de los enlaces sulfuro entre las nanovarillas de oro y el quitosano.	45
Figura 14. Espectro de absorción de las nanovarillas de oro con quitosano a una concentración de 4.4×10^{-11} M, obtenidas por el UV-Vis.....	46
Figura 15. Imágenes TEM de nanovarillas de oro con quitosano y su frecuencia en tamaño transversal y longitudinal (Almada 2016).	47
Figura 16. Interacción de Quitosano con PVA.....	49
Figura 17. Imágenes en 2D y 3D de las nanovarillas de oro con quitosano-PVA, obtenida en el microscopio de fuerza atómica (AFM) a 300nm	50
Figura 18. Imágenes en 2D y 3D de las nanovarillas de oro con quitosano-PVA, obtenida en el microscopio de fuerza atómica (AFM) a 100nm.	50
Figura 19. Isoterma típica de DPPC en la interfase agua-aire a 25 °C.....	52
Figura 20. Comparación de concentraciones (M) de GNR-Ch	53
Figura 21. Comparación de Isotermas de GNR-Ch vs GNR-Ch-PVA a 1.36×10^{-14} M.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos de la solución de semillas.....	38
Tabla 2. Reactivos de la solución de Crecimiento.....	39
Tabla 3. Tamaño de partículas y potencial ζ (mV) obtenidas por el Zetasizer Nano-25.	44
Tabla 4. Comparación de diferentes concentraciones de PVA en las nanovarillas de oro con Qitosano obtenidas por el Zetasizer Nano-25.	48
Tabla 5. Comparación de Tamaño de partículas y potencial ζ entre GNR-CTAB, GNR-CH y GNR-CH-PVA obtenidas por Zetasizer Nano-25.....	49

RESUMEN

En los últimos años, el estudio de las nanopartículas ha sido de gran importancia para el área de biomedica, permitiendo un desarrollo tecnológico y científico excepcional. Por ejemplo, el desarrollo de nanosistemas para la carga y liberación de fármacos, en adición a las propiedades fototérmicas que presentan ciertas nanopartículas en la escala nanométrica, ha sido fundamental para hacer frente a problemas de salud pública como el cáncer. En particular, el uso de nanovarillas de oro ha sido propuesto para implementar una terapia fototérmica debido a sus excepcionales propiedades fototérmicas. Estos nanomateriales presentan un plasmón de resonancia transversal y un plasmón de resonancia longitudinal, los cuales se pueden observar en la región visible e infrarrojo cercano del espectro electromagnético. La primera parte de este trabajo consiste en sintetizar nanovarillas de oro y posteriormente estabilizarlas con quitosano tiolado y polivinil alcohol (PVA). La caracterización de las nanopartículas se realizó mediante el microscopio de fuerza atómica (AFM) y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y potencial ζ . Las aplicaciones potenciales en el área médica de estos nanomateriales están relacionado con su capacidad de sobre pasar diferentes barreras biológicas. Una de las principales barreras biológicas a las que se enfrentan estos nanosistemas son las membranas celulares. La segunda parte de nuestro trabajo consiste en estudiar las interacciones no específicas que se originan durante el proceso de adsorción de las nanovarillas de oro con un modelo de membrana celular, obtenida en la interface aire-agua mediante la deposición del fosfolípido 1,2-Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología aplicada ha generado gran interés en un gran número de las investigaciones que se desarrollan en diversos campos de la ciencia y tecnología. Estas investigaciones principalmente se han enfocado al desarrollo de nanopartículas, nanodispositivos y nanoplataformas funcionales. De manera general, la construcción de estos nanosistemas se realiza mediante el ensamblaje de materiales inorgánicos y orgánicos o combinando ambos materiales. Este interés por parte de la comunidad científica se debe a las excepcionales propiedades físicas, químicas, ópticas, magnéticas, entre otras, que presentan los materiales a escala nanométrica [1].

Las nanopartículas de metales nobles, especialmente de oro, recientemente han atraído un interés sustancial debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, las cuales dependen de su tamaño y forma. La fuerte absorción y la dispersión de la luz por las nanopartículas de oro, así como su estabilidad, han hecho de estos nanocristales inorgánicos populares en diversas aplicaciones [2]. Por ejemplo, las propiedades ópticas de una o de un conjunto nanopartículas; con un tamaño de aproximado de 1 a 1000 nm [3], los hacen candidatos prometedores para la construcción de materiales ópticos que pueden explotarse en el desarrollo de sistemas de detección biológica [4]. Por ejemplo, por medio de la espectroscopia de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis), las nanopartículas de oro suelen presentar una fuerte banda de absorción denominado como plasmon de resonancia superficial, el cual se produce cuando los electrones presentes en la superficie de la nanopartícula (electrones de la banda de conducción) interactúa y entran en resonancia con la frecuencia de la radiación electromagnética incidente [5]. En las nanovarillas de oro se presenta dos plasmones de resonancia que corresponden a los modos transversal y longitudinal [6]. Donde, la banda transversal se podrá encontrar en un rango aproximado de 520 nm longitud de onda, mientras que la banda longitudinal tendrá un rango oscilando entre 700 nm. a 1200 nm [7]. La sensibilidad del modo longitudinal del plasmón en la anisotropía de la partícula facilita oportunidades para una amplia gama de aplicaciones tecnológicas en las nanovarillas de oro tales como formación de imágenes o terapia fototérmica que han sido investigados recientemente [6].

En la actualidad existen diversos métodos para la obtención de nanovarillas, pero el más popular es el método de síntesis de nanovarillas de oro a partir del crecimiento de semillas de oro en presencia de un tensioactivo. Uno de los tensioactivos más utilizados para la obtención de nanovarillas es el Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El CTAB se utiliza para dar estabilidad a las nanopartículas en solución acuosa [8]. Este tensioactivo desempeña una función importante

tanto de la dirección del crecimiento de la varilla, así como mantener la estabilidad coloidal, a través de repulsión electrostática [4]; [9]. Sin embargo, las nanovarillas de oro obtenidas por este método no pueden ser administradas a un organismo vivo debido a que el CTAB es tóxico para las células. Con el fin de disminuir el efecto citotóxico de estas nanovarillas es necesario eliminar el remanente del tensoactivo adsorbido en la superficie de las nanovarillas de oro y en el exceso de CTAB en el medio acuoso, sin afectar la estructura y forma de las nanovarillas de oro. Para este fin, se puede utilizar polímeros biocompatibles, como quitosano y PVA, para reemplazar el CTAB y recubrir la superficie de la nanovarilla de oro proporcionándole biocompatibilidad a estos nanosistemas y evitando su agregación en el medio acuoso.

El proceso de recubrimiento se realiza en dos etapas. La primera etapa consiste en la absorción de una capa de quitosano tiolado sobre la superficie de la nanovarilla de oro. Es importante mencionar que el quitosano se presenta como un polisacárido lineal poli- β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosamina [10]. Como tal, el quitosano es uno de los principales polímeros catiónicos naturales, biocompatible [11] y es ampliamente utilizado debido a su propiedad de mucoadhesión [12]. La modificación química del quitosano con moléculas tioladas facilita la adsorción del quitosano sobre superficies de oro debido a la alta afinidad del azufre por estas. Además, se ha documentado que la adición de grupos tiolados en la estructura de quitosano aumenta su capacidad de mucoadhesión de este biopolímero. Por otra parte el PVA se utiliza ampliamente como agente estabilizante, desempeñando una función importante en la modulación de la carga superficial de las nanopartículas. La excelente resistencia química y propiedades físicas del PVA han dado lugar a una amplia gama de aplicaciones en diferentes industrias, entre las cuales están las aplicaciones médicas y alimentarias [13].

La biocompatibilidad y degradabilidad del quitosano tiolado y el PVA permite construir un nanosistema con aplicaciones potenciales en el área biomédica [14], [15]. Para evaluar dicho potencial se ha estudiado el efecto de las nanovarillas sobre las propiedades mecánicas de modelos de membranas celulares. La obtención de estos modelos de membrana celular se obtiene en la interface aire-agua, mediante la deposición de moléculas fosfolípicas sobre la superficie de una subfase acuosa contenida en una balanza de Langmuir-Blodgett. Las monocapas, considerándolas la mitad de una membrana, son un sistema plano bien definido para estudiar las interacciones entre fosfolípidos o bien entre fosfolípidos y proteínas. El proceso de adsorción de las nanopartículas puede monitorizarse mediante el análisis de las isothermas Presión superficial (Π) vs área [16]. La técnica de la balanza de Langmuir-Blodgett consiste básicamente en la obtención de una isoterma de adsorción Π -A para un fosfolípido o una mezcla de fosfolípido determinada. El DPPC se utiliza generalmente para mimetizar el exterior de una

membrana celular y estudiar el efecto de las partículas sobre la integridad de la monocapa [17]; [18].

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años las aplicaciones potenciales de nanopartículas en el área de Salud han generado gran interés. Los resultados de estos trabajos están enfocados en el diseño y construcción de dispositivos útiles para el diagnóstico y tratamientos para tratar enfermedades de salud pública tan importantes como el cáncer. El uso y aplicación de las nanopartículas en el área médica dependerán de las propiedades físicas y químicas con las que se han diseñado. Para que estas nanoplateformas multicomponentes desempeñen la función biológica para la cual son diseñadas, como agentes de diagnóstico y/o con acción terapéutica, primero deben de hacer frente a barreras biológicas para alcanzar el tejido blanco, además sobrepasar las membranas celulares (mediante interacciones específicas como en los anticuerpos y no específicas como en las células asesinas (NK), según sea el caso), con el fin de internalizarse al interior de la célula y llevar a cabo su acción biológica. En este trabajo se realizará un estudio *in vitro* que simule las interacciones no específicas que ocurren en el proceso de adsorción de nanovarillas de oro-Quitosano-PVA (NO-Q-PVA), con una monocapa del fosfolípido 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), simulando una membrana celular. La interacción de las nanopartículas, estabilizadas con quitosano y PVA, con el modelo de membrana celular se analizará mediante la balanza de Langmuir-Blodgett, con el fin de estudiar el proceso de adsorción de las nanovarillas de oro en el modelo de membrana celular.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la interacción de las nanovarillas de Oro-Quitosano y Oro-Quitosano-PVA (NO-Q-PVA) en una monocapa del fosfolípido DPPC.

Objetivo particulares

- Caracterizar las propiedades físicas y fisicoquímicas de las Nanovarillas de Oro, mediante el potencial Z, imágenes TEM, Dispersión de luz dinámica (DLS), UV-Vis.
-
- Estabilizar las nanovarillas de Oro con Quitosano tiolado en presencia de Polivinil alcohol (PVA
- Evaluar la adsorción de las nanopartículas analizadas mediante la isoterma presión superficial vs área de la 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), en interfase aire-agua.

ANTECEDENTES

Nanotecnología

El significado de la palabra “nano” es un prefijo proveniente del vocablo griego νανος que significa diminuto, enano, pequeño. Este prefijo se utiliza en el sistema internacional (S.I.) de unidades para indicar un factor de 10^{-9} [19] Cuando se aplica a mediciones lineales a escala nanométrica [20] un nanómetro equivale en escala a la mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$) [21]

La nanotecnología es definida como el estudio, diseño, síntesis, manipulación y aplicación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia a escala nanométrica cerca de la escala atómica, y el uso de las nuevas propiedades en esa escala.[20] [21] Como se muestra en la figura 1, donde se compara el tamaño de algunos objetos.

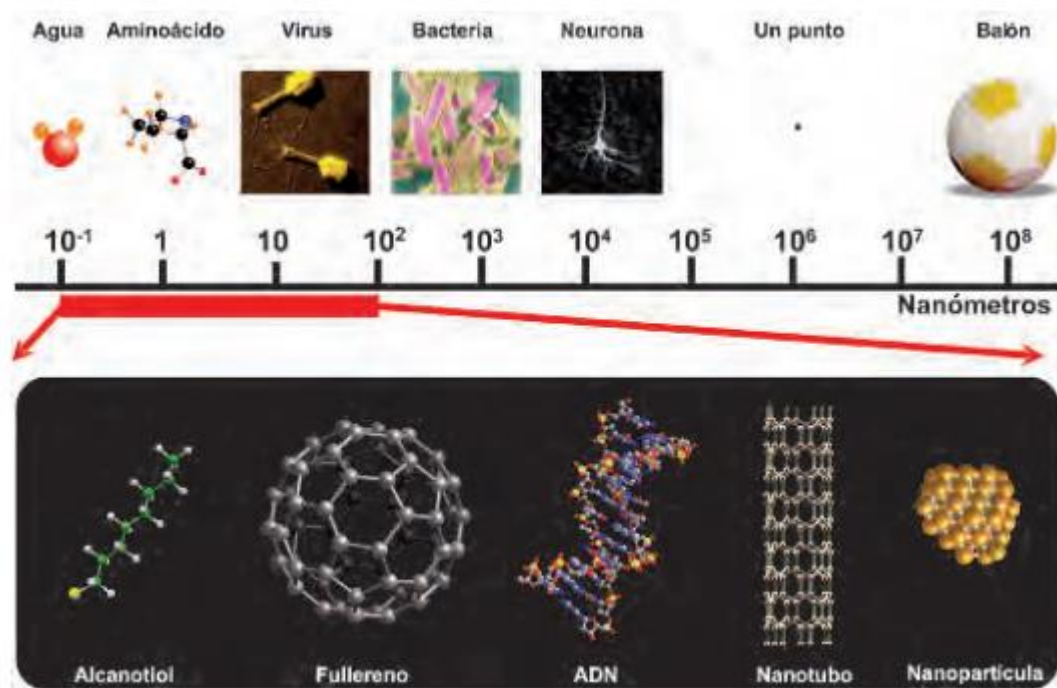


Figura 1 Comparaciones de tamaños a escala nanométrica [19]

El interés hacia la nanotecnología, se debe a las estupendas propiedades químicas, físicas, ópticas, magnéticas, son dependiente del tamaño [1] que presenta la materia en la escala nanométrica. El desarrollo de esta disciplina surge de las ideas expuestas por Richard Feynman,

(considerado como el padre de la "nanociencia" y premio Nóbel de Física), quién en 1959 proponía fabricar productos mediante la manipulación de átomos y moléculas. [21] En la actualidad el desarrollo de productos elaborados a partir de nanomateriales ha ido en ascenso en los últimos años. Se han descrito numerosas aplicaciones de nanopartículas metálicas en la elaboración de productos de consumo masivo como filtros UV en cremas solares o telas "antiolor" para vestimenta, baterías de litio, paneles solares, así como también para uso en medicina, como terapias anti-tumorales

Nanopartículas

Como su propio nombre indica, el término "nanopartícula" designa una agrupación de átomos o moléculas que dan lugar a una partícula de dimensiones comprendida entre 1 a 1000 nm [19]. Las nanopartículas pueden clasificarse en dos tipos: nanopartículas con contenido molecular principalmente orgánico (nanopartículas orgánicas) y las que se obtienen a partir de elementos inorgánicos (nanopartículas inorgánicas).[3]. Dependiendo de cuáles sean los átomos que se utilizan para la síntesis de las nanopartículas inorgánicas se obtendrán diferentes tipos de nanopartículas. Por otra parte, es posible obtener nanopartículas híbridas compuestas por los átomos de Fe o Cu, por ejemplo nanopartículas TiO₂-Fe₃O₄ [22] o SiO₂/Cu. Su tamaño particularmente pequeño, hace que estas estructuras tengan propiedades únicas y esencialmente distintas a las que presenta el material en volumen [19].

Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de metales nobles y, en particular, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben excelentes propiedades físico-químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico [56]. Las AuNPs poseen dos propiedades físico-químicas que las hacen especialmente interesantes desde el punto de vista terapéutico. La primera de ellas es la alta reactividad química de su superficie la cual se puede modificar fácilmente con moléculas biológicamente activas. La segunda propiedad está basada en las peculiares características fototérmicas y ópticas las cuales dependen del tamaño y forma de la nanopartícula [7]

La terapia fototérmica consiste básicamente en aprovechar el calor que liberan las nanopartículas durante el proceso de relajación una vez que estas han sido excitadas con un haz

de energía electromagnética definida [56]. Esta estrategia terapéutica tiene como ventaja de no precisar la presencia de oxígeno para desarrollar sus efectos. La producción de calor causa un aumento de temperatura [23] durante la exposición a los rayos UV y/o del infrarrojo cercano, por lo que ofrecen la posibilidad de destrucción de las células cancerosas a través de la ablación térmica [24]. Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos [56], en los últimos años se han realizado notables esfuerzos en la investigación y en la aplicación de las AuNPs para la detección precoz, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Plasmón de Resonancia Superficial (RPS).

Cuando una nanopartícula metálica interactúa con una radiación electromagnética, el campo eléctrico oscilante puede provocar que los electrones de conducción se desplacen con respecto a los núcleos. A este desplazamiento de carga se le opone la atracción la fuerza de atracción electrostática, entre los electrones y los núcleos, los cuales actúan como una fuerza restauradora generando así oscilaciones de la nube electrónica alrededor de los núcleos como se muestra en la Figura 2 [4]. A la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de metales excitados con radiación electromagnética es conocida como plasmon de resonancia superficial (RPS)[25].

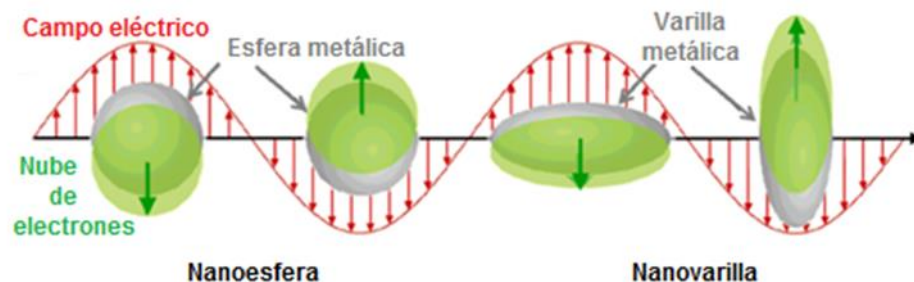


Figura 2. Representación del desplazamiento oscilatorio del plasmón de resonancia superficial de nanoesferas y nanovarillas de oro (R. Álvarez, 2016)

Los RPSs muestran una fuerte banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético. El origen de esta banda es atribuida a la resonancia entre las oscilaciones

colectivas de los electrones de las bandas de conducción y la frecuencia de oscilación de la radiación incidente [25]. Algunos metales como el oro o la plata, muestran intensas bandas de absorción características en la región visible del espectro electromagnético (380-780 nm) [55].

Nanovarillas de Oro

Las nanovarillas de oro presentan dos bandas de absorción características en el espectro electromagnético como consecuencia de su evolución de esferas a varillas. La primera banda de absorción corresponde a la oscilación colectiva de los electrones superficiales del eje transversal de la nanovarilla (plasmos de resonancia transversal) [7] [26]. Se encuentra en la región visible, a una longitud de onda de unos 520 nm. La segunda banda de absorción corresponde a la oscilación colectiva de los electrones localizados en la superficie del eje longitudinal de nanovarilla (plasmon de resonancia longitudinal) [7]. La longitud de onda donde se centra este pico y su amplitud, dependen de la relación entre el ancho y el largo de la nanovarilla [26], y se encuentra en la región de Infrarrojo cercano (NIR) [7]. Esto es bien representado en el siguiente esquema (figura 3).

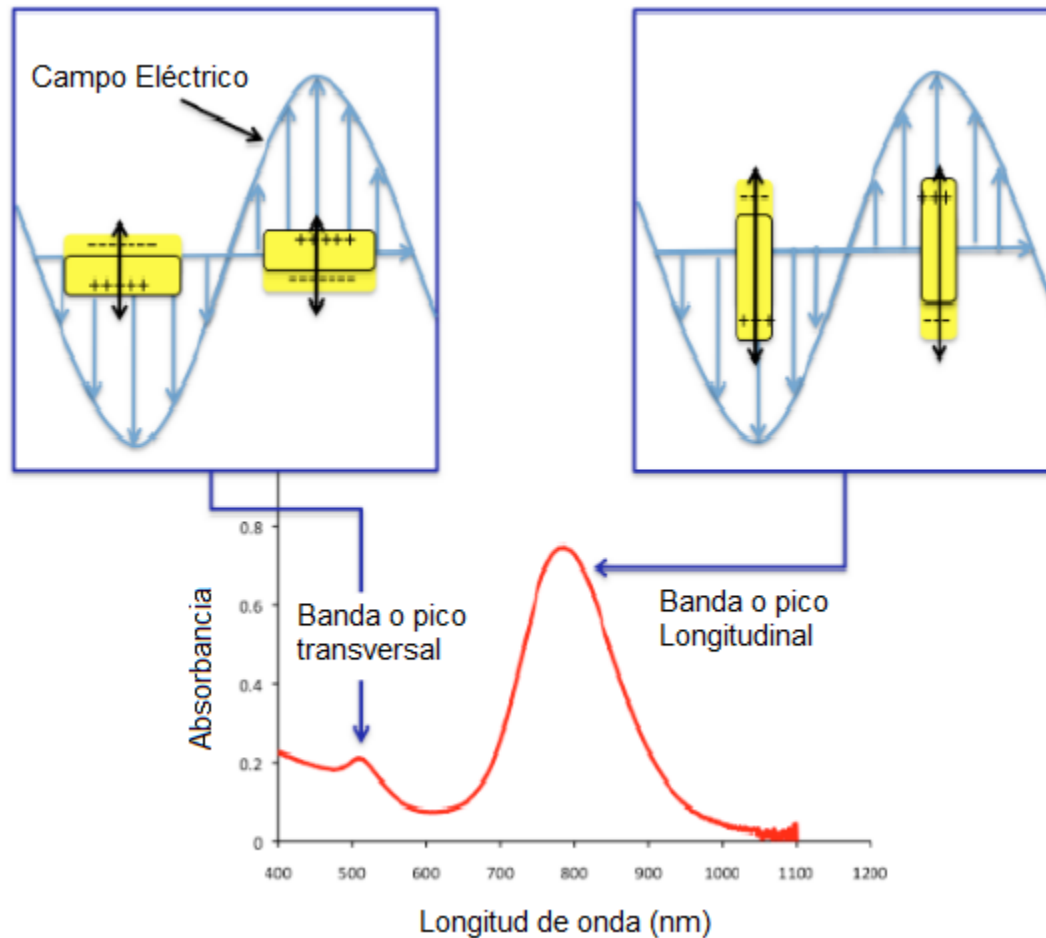


Figura 3. Esquema representativo del espectro típico de absorción de las nanovarillas de oro [26]

La morfología de las nanovarillas puede afectar directamente a su espectro de absorción al aumentar la relación de aspecto (longitud/anchura), pudiéndose desplazar la banda de absorción longitudinal dentro de la región NIR del espectro. En comparación con otros tipos de NIR-nanopartículas (partículas esféricas). Esto permite que la conversión de la energía absorbida a calor sea más eficiente, siendo así capaces de producir altos gradientes térmicos en medios con baja conductividad térmica [7]

La manipulación de estas propiedades ha permitido optimizar las aplicaciones biomédicas estas nanoestructuras de oro mediante el control del tamaño y forma durante el proceso de síntesis y posterior modificación de su superficie [7]. En donde se pueden obtener fácilmente sistemas coloidales estables con un tamaño de entre 10 a 150 nm [24].

Para la síntesis de nanovarillas de oro a partir del método de semillas se preparan dos soluciones: la solución de crecimiento y solución de semillas. Ambas soluciones utilizando HAuCl_4 (ácido tetracloroáurico) en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) empleado como surfactante [27]. La solución de semillas se obtiene al reducir el Au^{+3} empleando un agente reductor fuerte, el NaBH_4 , [27];[28], obteniéndose nanoesferas de en un rango de 2-4 nm, aproximadamente. Por otra parte, en la solución de crecimiento, el ion de Au^{+3} se reduce a Au^{+1} en presencia de un reductor débil, como el ácido ascórbico (AA) [28]. Esta reacción se realiza en presencia de CTAB, nitrato de plata (AgNO_3) y HCl. El crecimiento de la nanovarilla se debe a la deposición de oro metálico (Au^0) a partir de la reducción del ión Au^{+1} a Au^0 catalizada por las semillas de oro. Así las semillas de oro contenidas en la primer solución (las nanoesferas de oro), crecen y se alargan formando las nanovarillas de oro [28], [27]. Sin embargo, este método se ha sufrido ligeras modificaciones con el propósito de mejorar el rendimiento de las nanovarillas en contraste con los subproductos generados durante la reacción química. Además, con las modificaciones realizadas en el protocolo de síntesis de nanovarillas se busca modular el plasmón de resonancia superficial localizada controlando el crecimiento longitudinal de las nanovarillas. Por ejemplo, Sau y col., mejoró el rendimiento de producción de nanovarillas de oro cortos mediante la variación de la concentración añadida de semillas de oro y el ácido ascórbico a la solución de crecimiento [29].

Estudios similares desarrollados por Ward y Xu establecieron que el aumento de la concentración de oro o de la temperatura de reacción en la etapa de producción de semillas, resulta en la disminución de la relación de aspecto de nanovarillas de oro. Además, describieron la importancia de la relación molar entre el ácido ascórbico (AA) y el contenido de oro añadido en la solución de crecimiento en la relación de aspecto de las barras producidas. Por otra parte, la relación de aspecto de GNRs puede ser controlado como una función del tiempo de reacción y cantidades variables de iones de plata, HCl, y CTAB [29].

Polímeros Biodegradables

Los polímeros biodegradables se pueden obtener de a partir de sistemas biológicos o pueden ser sintetizados químicamente a partir de monómeros más simples [30]. Dependiendo del modo de degradación los polímeros biodegradables pueden clasificarse en polímeros degradables hidrolíticamente o polímeros degradables enzimáticamente. Los polímeros naturales pueden ser considerados como los primeros biomateriales biodegradables utilizados clínicamente [31]

Para aplicaciones biomédicas, los requisitos que debe reunir un polímero biodegradable son las siguientes:

- No debe provocar una respuesta inflamatoria, es decir no presentar un efecto tóxico después de la administración en el cuerpo.
- Debe tener un tiempo aceptable de vida útil, permeabilidad y procesabilidad adecuada para la aplicación prevista.
- Los productos degradados no deben ser tóxicos, además deben tener la capacidad de ser metabolizados y eliminados por el cuerpo [31].

Algunos de los polímeros naturales que de interés médico son proteínas (colágeno, queratina, gelatina, gluten de maíz o de trigo, proteínas de leche o soya) y polisacáridos (almidón, derivados de celulosa, **quitosano**, alginatos, carragenatos y pectinas). Mientras que los materiales sintéticos son ácido poliláctico (PLA), Polivinil alcohol (PVA), así como algunos poliésteres, principalmente [30].

Quitosano

La quitina es un componente polimérico de los exoesqueletos de invertebrados y las paredes celulares de algunos hongos y algas. Esta macromolécula es definida como un polisacárido lineal, poli- β - (1,4) -N-acetil-D-glucosamina [32] su estructura se muestra en la figura 4.

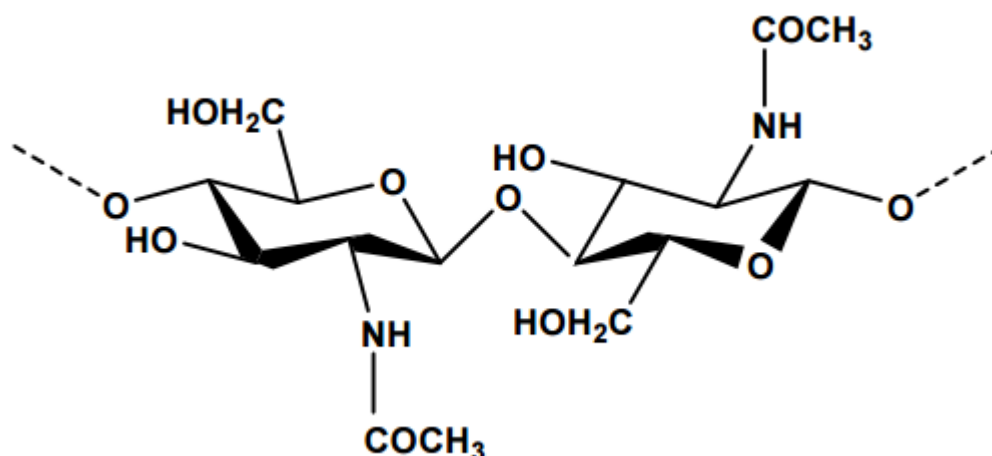


Figura 4. Estructura de la Quitina. [32].

Rouget descubrió en 1859 que el tratamiento de la quitina con una solución concentrada de hidróxido potásico a ebullición la modificaba transformándola en un compuesto soluble en soluciones de ácidos diluidos, más tarde en 1870, fue designado como quitosano por Hoppe-Seiler [33]

El quitosano es un polímero mucoadhesivo natural que tiene el nombre IUPAC [34], (β -1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa. Se obtiene por la desacetilación alcalina de la quitina [35]. Como tal, es uno de los principales polímeros catiónicos [11]. Algunas de las propiedades funcionales del quitosano, tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, promotor de absorción [36], [37]. Este polisacárido es biocompatible y actualmente su uso está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) [31].

La biocompatibilidad del quitosano se debe principalmente a la composición química de la estructura del quitosano consta de unidades de N-acetilglucosamina y glucosamina, las monómeros que están presentes en la estructura de la mayoría de las biomoléculas que conforman los tejidos del cuerpo humano [32]. Mientras que sus propiedades mucoadhesivas son debidas a la interacción con las glicoproteínas de la mucosa, que se basa principalmente en enlaces no covalentes, tales como interacciones iónicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals [34] Las reacciones químicas en el quitosano tienen lugar a partir de sus tres grupos funcionales activos: los grupos hidroxilo primario y secundario, y el grupo amina primaria [32], [38]; [11]. El grupo hidroxilo primario en la posición C6 y un grupo hidroxilo secundario en la posición C3, como se muestra en la figura 5, haciendo de éste un polímero muy versátil [38].

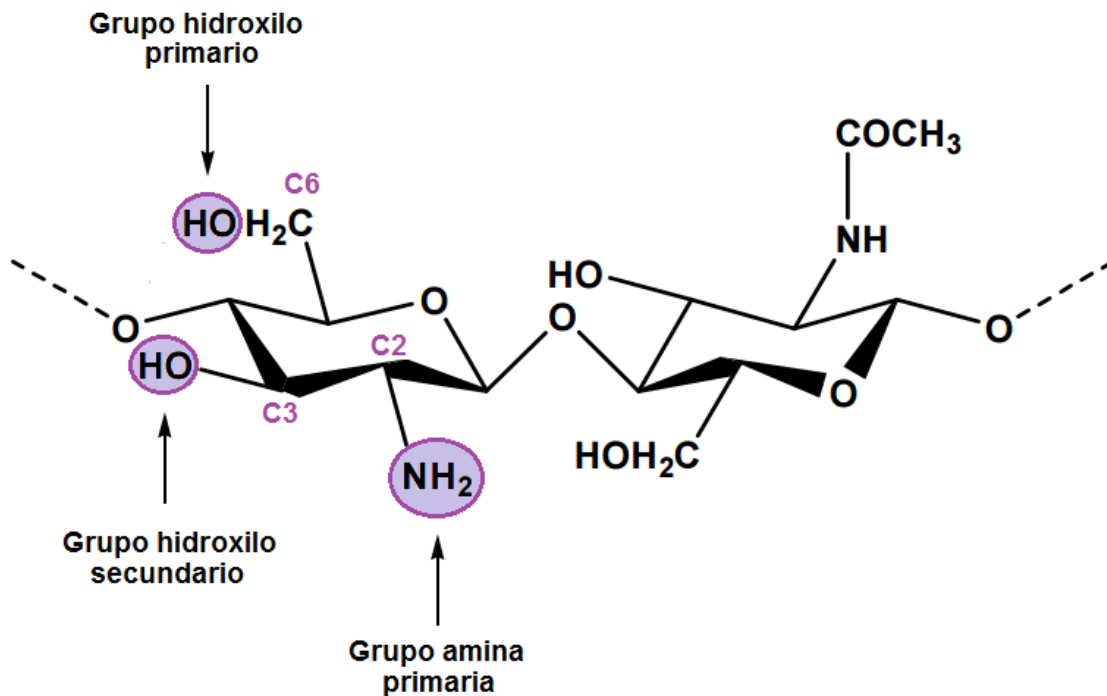


Figura 5. Esquema representativa de la estructura y los grupos funcionales activos en molécula del quitosano

De este modo, los grupos hidroxilo pueden modificarse mediante reacciones de eterificación y esterificación/sulfatación, mientras que el grupo amino puede modificarse por reacciones específicas como la N-carboxialquilación. Por lo que el quitosano puede modificarse mediante la introducción de diversos grupos funcionales para diseñar un derivado de quitosano para una determinada aplicación ya sea en el campo biomédico o industrial [38].

Por otra parte, las propiedades mucoadesivas del quitosano pueden modularse mediante la unión química de algunos compuestos tiolados como cisteína, 2-Imino tiol, ácido tioglicólico, glutatión [34], ácido mercaptoundecanoico y el **ác. mercaptopropionico** (figura 6). Este último compuesto es un ácido carboxílico con una fórmula general HS-CH₂-CH₂-COOH.

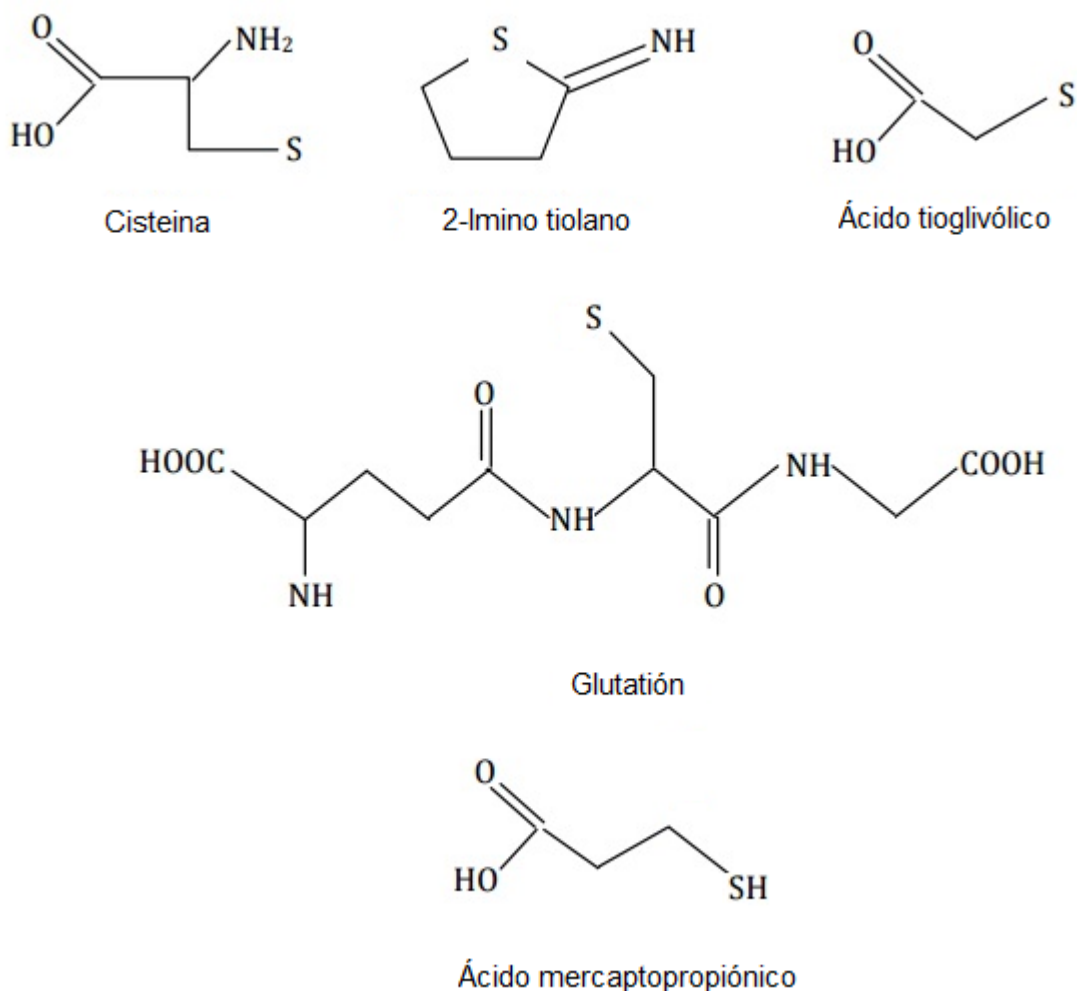


Figura 6. Estructuras de varios compuestos que proporcionan el grupo tiol al quitosano [34].

El quitosano tiolado entra en la categoría de polímero de segunda generación [36]. La modificación de quitosano se realiza para mejorar la solubilidad de este polímero y/o para mejorar sus propiedades mucoadhesivas y de permeación [34]. La unión a moléculas tioladas en polímeros es una estrategia ampliamente utilizada para estabilizar nanopartículas de oro (GNPs). La unión química de polímeros tiolados sobre la superficie de estas nanopartículas permite modular la carga superficial de las nanoestructuras, lo cual es relevante ya que este parámetro puede tener un efecto determinante en la biodistribución y en la captación celular de las nanopartículas [7]; [2], [39].

En el caso de tener una superficie de oro, las moléculas tioladas son adsorbidas espontáneamente. El mecanismo o proceso en que se produce la adsorción hace que se pierda el átomo de hidrogeno del grupo sulfhidrilo –SH. Esto hace que se adquiera una carga negativa y se adhiere a la superficie de oro al orientar el átomo terminal S hacia la depresión entre un triplete de átomos de oro ($R-S^-(Au^{3+})$) así bien el anión tiolado termina ($-S^-$) formando un enlace con el catión oro (Au^{3+}) estableciendo el enlace azufre-oro, el cual, retiene al grupo tiol y al ser bastante fuerte, por lo que la adhesión es estable.(P Charles & OJ Poole jr ., 2003). Sin embargo al tener una carga de Au^0 el enlace se presenta como un enlace covalente coordinado de esta manera el azufre cumple con la ley de los octetos.

En años recientes, la mezcla de polímeros se ha hecho uno de los métodos eficaces para proveer nuevos materiales poliméricos deseables para usos prácticos. Se ha reportado que el quitosano mezclado con PVA, tiene buenas propiedades mecánicas y químicas [37].

Esta combinación de polímeros quitosano-PVA se caracteriza por la interacción del grupo amino del quitosano interactúa con el grupo hoxidrilo del PVA, mostrando estabilidad mediada por la formación de puentes de hidrógeno [40].

Polivinil alcohol (PVA)

El nombre químico de PVA es alcohol de polivinilo o polivinil alcohol, fue el primer coloide sintético preparado por Herrmann y Haehnel en el año 1924. Su producción consiste básicamente en la polimerización del monómero de acetato de vinilo en acetato de polivinilo (PVAc), después se hidrolizan los grupos acetato de PVAc a PVA [13]. LA fórmula molecular del PVA es: $(C_2H_4OH)_x$, su estructura se puede observar en la Figura 7.

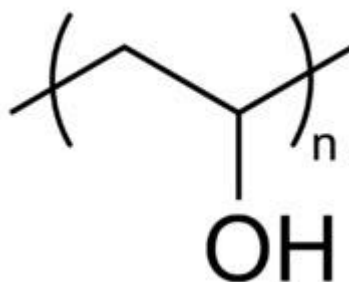


Figura 7. Estructura representativa del polivinil alcohol (PVA). Fuente:

La FDA así como la comisión de plásticos de las autoridades sanitarias de Alemania, presenta al PVA como adyuvante alimentario. Al ser este un biopolímero hidrofílico, biodegradable [41]; [37], no tóxico, soluble en agua, biocompatible y biodegradable, que ofrece buena resistencia límite a la tensión, flexibilidad y propiedades de barrera al oxígeno y aroma. Como un tema de gran interés, el PVA ha sido usado extensamente en la biomedicina [37].

Técnicas de Caracterización de Nanopartículas de Oro

Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) o también llamada Espectroscopia de correlación de Fotones (PSC) determina el tamaño a partir del movimiento browniano de las partículas en una muestra. El movimiento browniano se define como: "El movimiento aleatorio de las partículas en un líquido es debido al choque al azar con las moléculas del líquido que rodean a la partícula"; [42]

Las partículas suspendidas en un líquido no son estacionarias, estas partículas se mueven constantemente debido al movimiento browniano. Una característica importante del movimiento browniano para DLS es que las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad debido al movimiento browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein. [42]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Donde D es el coeficiente de difusión (también conocida como velocidad de difusión) y se relaciona al radio hidrodinámico R_h de las partículas, mientras que k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin y η es la viscosidad dinámica.

Potencial Zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) es determinado por la movilidad electroforética, es decir, por la velocidad con que una partícula se mueve en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico. La movilidad electroforética se obtiene mediante la realización de un experimento de electroforesis sobre la muestra y la medición de la velocidad de las partículas utilizando Velocimetría de Laser Doppler

(LDV) [42]. Cuando se aplica un campo eléctrico a través de un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta.

El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que la rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de iones contrarios cerca de la superficie, por lo tanto, se forma una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula y la divide en dos partes; una zona interior, llamada la capa de Stern, en el que los iones están fuertemente unidos a la superficie; y una capa exterior o difusa. Sin embargo, dentro de la capa difusa hay un límite teórico, donde los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando la partícula se mueve, los iones dentro de los límites se moverá con esta, no obstante, ninguno de los iones que este más allá del límite no viajará con la partícula [42]; así como se muestra en la Figura 8. A este límite se le conoce como "plano de corte" y al potencial eléctrico que existe en este límite se le conoce como Potencial ζ .

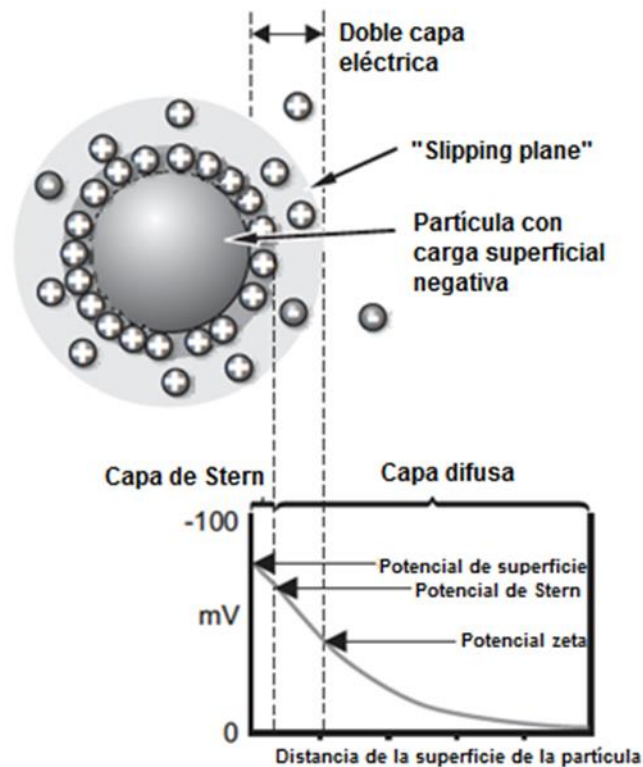


Figura 8. Potencial ζ y la doble capa eléctrica.[42]

Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta negativo o positivo, entonces tienden a repelerse entre sí y no hay tendencia a flocular. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial zeta baja, entonces no hay fuerza para impedir que las partículas que se unen y floculante. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables se toma generalmente en cualquiera + 30mV o -30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivas a + 30mV o más negativos de -30 mV se consideran normalmente estable.[42].

Una vez que se conoce la movilidad electroforética y el campo eléctrico aplicado [42], podemos calcular el valor del potencial ζ usando la ecuación de Smoluchowski.

$$V_{elf} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{1,5 \eta} f(\chi a)$$

Donde, V_{elf} , ϵ , ζ , η y $f(\chi a)$ son la movilidad electroforética, permiviabilidad del medio, potencial zeta de las partículas, viscosidad del medio y longitud de debay [43]. Donde $f(\chi a)$ varía entre 0 y 1 para valores bajos $f(\chi a)$ y para valores altos de 1 a 5, sabiendo que “a” es el inverso de $f(\chi a)$ se dice entonces que si $f(\chi a)$ es pequeña entonces “a” es grande[44].

Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

El AFM es parte de una gran familia de instrumentos denominados como microscopios de sonda de barrido (SPM) [10]. La técnica de los SPM proporciona imágenes tridimensionales en tiempo real, permitiendo monitorear un área localizada para obtener las propiedades físicas de los materiales simultáneamente. Todos los SPMs tienen 5 elementos fundamentales: la punta, el escáner, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración sin embargo al AFM se le añade el fotodiodo con sus cuatro cuadrantes (A,B,C,D) como se muestra en la Figura 9 con la finalidad de detectar la señal y definir si es una medida de flexión (A+B)-(C+D) o una de torsión (A+C)-(B+D) de la micropalanca.[45]

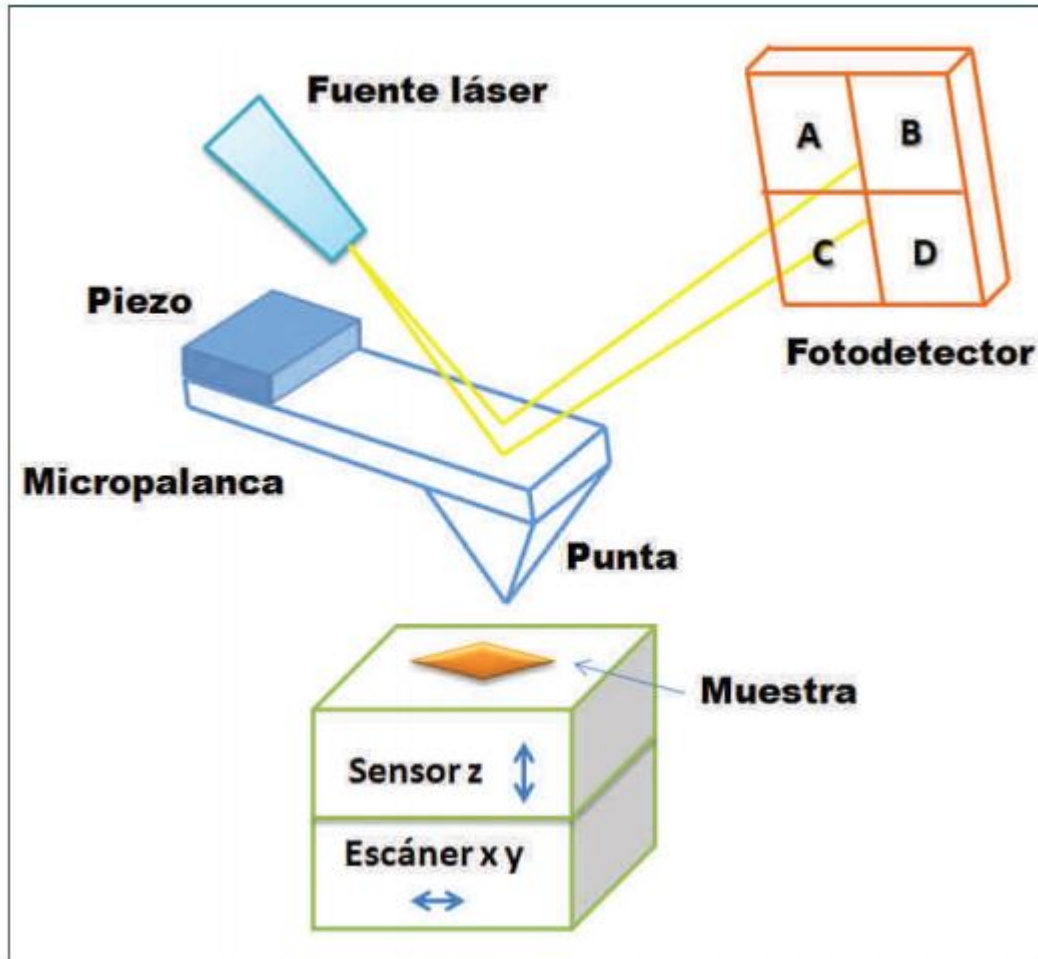


Figura 9. Componentes del AFM [45].

Siendo el AFM uno de los SPM con alta sensibilidad debido al “resorte” utilizado por el AFM, el cual es una micropalanca (cantiléver) flexible de una rigidez de 0.01 N/m a 50 N/m, donde si una punta muy afilada (con una curvatura de unos nanómetros de diámetro) se adjunta a la micropalanca, es posible medir la fuerza de interacción entre la punta y la muestra a través de la flexión de dicha micropalanca. Cuenta con un sistema de flexión de haz de láser con el que es posible medir flexiones de la micropalanca generando señales de topografía de superficie en el rango de 0.1 Angstrom a unos pocos micrómetros. Esto corresponde a una sensibilidad de fuerza de 10^{-13} N a 10^{-5} N. El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), ha sido un equipo importante para la elucidación de la microestructura de materiales, permitiendo la obtención de imágenes de muestras poliméricas y biológicos en sus estados nativos [46]

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopia de Transmisión electrónica (TEM) es un dispositivo que permite obtener imágenes con resoluciones mayores a las accesibles con un microscopio óptico. Los electrones de un filamento metálico se someten a una diferencial de potencial que desprende los electrones y los acelera a lo largo de una columna vertical sometida a alto vacío. Los electrones acelerados alcanzan energías suficientemente altas (80-200KV) que produce una longitud de onda por debajo del límite óptico incrementando la resolución. El TEM alcanza una resolución del orden de 1.4 Å [54].

Espectrofotómetro de UV-Vis

La base de la espectroscopia de absorción UV-Visible y su uso en el análisis cuantitativo están dados por la ley de Lambert–Beer, que establece que la absorbancia de un analito en solución es directamente proporcional a la concentración del analito. Por lo tanto, puede emplearse para determinar la concentración de un compuesto en una solución.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una solución que contiene un analito absorbente, la intensidad (I) que atraviesa la muestra es menor que la del haz incidente (I_0). La fracción de radiación que ha traspasado la muestra se denomina transmitancia ($T=I/I_0$). La transmitancia (T) está relacionada con la absorbancia (A) de acuerdo a la siguiente expresión [47]:

$$A = -\log T = -\log (I/I_0).$$

Para las mediciones se usa la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia (T), ya que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la sustancia absorbente, lo cual hace que esta técnica sea atractiva para mediciones cuantitativas. Los fotones ultravioletas y visibles son suficientemente energéticos para promover electrones a estados de alta energía en moléculas y materiales. Por lo tanto, la espectroscopia UV-Vis es útil para la exploración de las propiedades electrónicas de los materiales [47].

$$A = \log I/I_0 = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Donde A es la absorbancia medida, I la intensidad de la luz transmitida, I_0 la intensidad de la luz incidente, ε es coeficiente de extinción molar; l longitud de la celda y c la concentración de la sustancia absorbente. Como la Absorbancia es adimensional, las dimensiones del coeficiente de extinción molar son $M^{-1}cm^{-1}$. La longitud se expresa siempre en cm mientras que la concentración en M [47].

Balanza de Langmuir

La balanza de Langmuir-Blodgett consiste en una tina rectangular de teflón con barreras móviles para delimitar con ellas el área de superficie. La presión superficial es monitoreada por una lámina (papel filtro) suspendida en el agua denominada Placa de Wihelmy, como se observa en la figura 10.

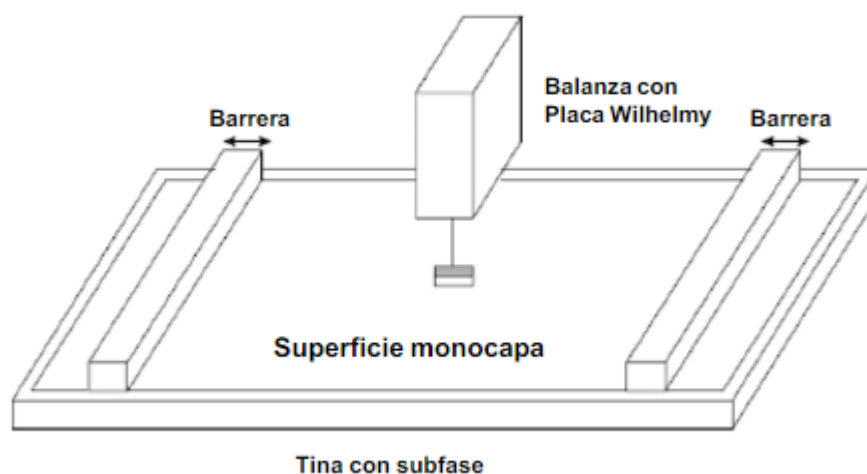


Figura 10. Esquema general de una balanza de Langmuir-Blodgett.

Este equipo es ampliamente utilizado para la construcción de monocapas de moléculas anfipáticas, como los lípidos, en la interfase aire-agua estudio de superficies. Las primeras experiencias relacionadas con la formación de monocapas de moléculas anfifílicas en la interfase aire-agua siguiendo un método científico se remontan a los estudios realizados por Benjamin Franklin (1706-1790). Hacia fines del siglo XIX, una joven alemana ama de casa, Agnes Pockels, interesada en la física diseñó la primera balanza de LB y describe un método simple para aumentar o disminuir la superficie de un líquido en cualquier proporción, con el cual se puede alterar su pureza a voluntad. Estos trabajos estimularon a posteriores científicos a investigar de manera más profunda en este nuevo campo [48].

Sin embargo el definitivo desarrollo de la técnica de Langmuir Blodgett fue dado por Irving Langmuir, merecedor del Premio Nobel de química en 1932 por su trabajo dentro de la química superficies. Langmuir confirmó que las películas de moléculas anfifílicas esparcidas sobre

superficies acuosas, poseían el espesor de una capa monomolecular y que las moléculas se orientaban en la superficie acuosa con el grupo polar de la misma y las cadenas no polares dirigidas casi verticalmente fuera de la superficie [49]

Isoterma Π vs A

La tensión superficial se puede definir como “el trabajo requerido para expandir isotérmicamente la superficie de una sustancia dada por la unidad del área”. Las moléculas con actividad superficial tienden a acumularse en interface, favoreciendo la expansión de la interface y por lo tanto, aumentando la presión superficial. La presión de superficie Π (N/m) es una variable termodinámica que refleja el cambio en la energía libre de la superficie cuando se aumenta el área. Para medir la presión de una monocapa de moléculas anfifílicas en la interfase agua-aire se utiliza como referencia la tensión superficial del agua pura: $\gamma_0 = 72 \text{ mJ m}^{-2}$ y γ la tensión superficial en presencia de la monocapa a un área determinada.

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma$$

Una isoterma Π vs A es un método que nos permite obtener información sobre el estado termodinámico que presenta una monocapa a una temperatura determinada, ya que a través de ella se pueden identificar transiciones de fase que nos indican cambios termodinámicos que ocurren en la monocapa de Langmuir y a la vez obtener información sobre el área aproximada que ocupan las moléculas. Estos cambios son casi análogos a los estados más comunes que son el gas, líquido y sólido. Los cambios de fase se pueden identificar fácilmente mediante el control de la presión superficial Π como una función de la zona ocupada por la película (área de superficie de presión-isoterma). Cuando una monocapa se comprime sobre la superficie del agua, las moléculas anfifílicas comienzan a ordenarse incrementando de esta manera la presión superficial dando como resultado estas transformaciones mencionadas anteriormente. La forma de la presión de superficie de la isoterma depende de las interacciones laterales entre moléculas. Esta, a su vez, depende del empaquetamiento molecular, que está influenciado por factores tales como el tamaño del grupo hidrofílico, la presencia de grupos polares, la longitud y el número de cadenas de hidrocarburos, y su conformación. Típicamente en el estado gaseoso (G) las moléculas están lo suficientemente separados en la superficie del agua que la fuerza de atracción entre las moléculas anfifílicas prácticamente es despreciable. Conforme se reduce el área de

superficie en donde se encuentran confinadas las moléculas anfifílicas, las interacciones intermoleculares se hacen más importantes, las cadenas hidrófobas de las moléculas interactúan alcanzando la fase de líquida. En esta etapa, las moléculas en la superficie del agua se encuentran en una orientación aleatoria en lugar de en una orientación regular, con sus grupos polares en contacto con la subfase. Al seguir reduciendo el área de la superficie, se puede alcanzar la fase condensada (C). En el estado monocapa de fase condensada las moléculas están estrechamente empaquetados y están orientados con los grupos hidrófobos hacia fuera de la superficie del agua, esta representación puede observarse en el esquema de la figura 11.

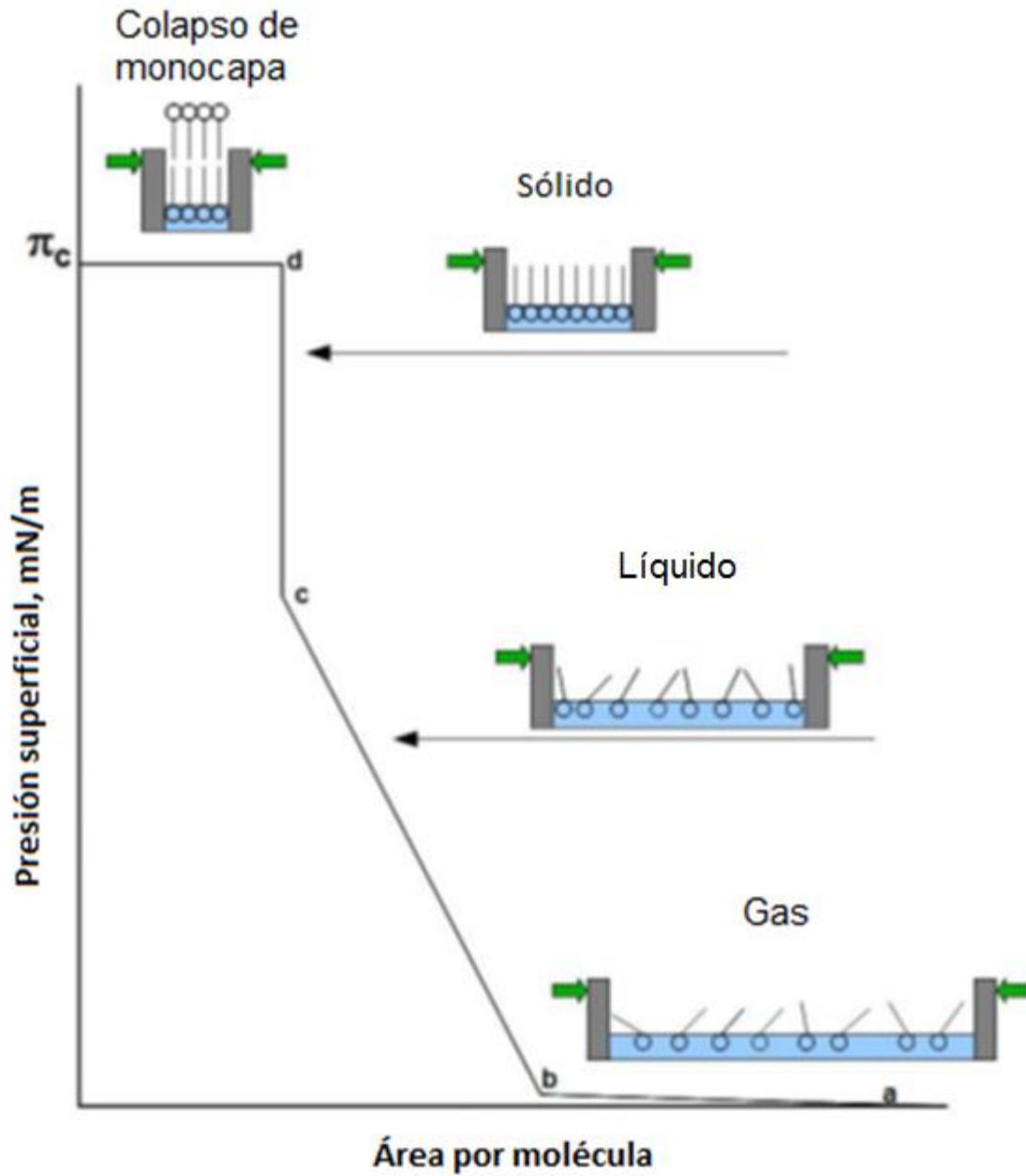


Figura 11. Esquema representativo de las fases se la Isotherma de Π -A

Fosfolípidos

Los fosfolípidos son sustancias anfífilicos, que se encuentran en todas las membranas celulares, disponiéndose como bicapas lipídicas [50]. Los fosfolípidos están compuestos por una molécula

de glicerol a la que se unen 2 ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2, estos ácidos grasos pueden presentar distinto largo de cadena hidrocarbonada, y variar en el grado de saturación según su procedencia. Sin embargo, se diferencian de los triglicéridos ya que en la posición sn-3 está ligada una molécula de ácido orto-fosfórico, en lugar de un tercer ácido graso. Estos grupos fosfato están siempre unidos a diferentes tipos de moléculas, de esta forma, cuando esta molécula corresponde a colina, se forma la fosfatidilcolina o Lecitina, así cuando se une a un aminoácido como serina, se forma la fosfatidilserina; cuando la unión es con etanolamina, se forma la fosfatidiletanolamina o Cefalina; y cuando se une al polialcohol cíclico inositol, se forma el fosfatidil inositol, entre otros [50]. De los fosfolípidos, la dipalmitoilfosfatidilcolina (Figura 13) es de los más abundantes, representando entre los dos, el 30 a 40% (en peso) de todos los lípidos de la membrana plasmática, y hasta el 75% en algunas membranas internas [51].

HIPÓTESIS

Los polímeros, quitosano y PVA, utilizados en la estabilización de la nanovarilla de oro mediarán de manera favorable la adsorción de la nanoplataforma en un modelo de membrana celular constituido por DPPC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Materia Prima

Se utilizara quitosano de bajo peso molecular, CTAB, Polivinil alcohol (PVA) y el fosfolípido DPPC, todos obtenidos de la casa comercial SIGMA-AIDRICH.

Síntesis de Nanovarillas de Oro

Las nanovarillas de oro (GNRs) se prepararon mediante el método de crecimiento mediado por semilla de acuerdo a los reportes publicados por El-Sayed y col. En una síntesis típica de nanovarillas, en donde, se realizó una solución de semillas y una solución de crecimiento [52].

Inicialmente se prepara una solución de semillas mezclando CTAB, agua ultra pura, y Ác. Tetracloroáurico (III) trihidratado en el orden dado (Tabla. 1). Bajo una agitación vigorosa, se añade recién preparado, una solución de borohidruro de sodio acuoso enfriado en un baño de hielo y, tras permanecer en agitación, la solución se tornará de un amarillo a un naranja-marrón.

Tabla 1. Reactivos de la solución de semillas.

Reactivos	Concentración (moles)
CTAB	0.1M
HAuCl ₄	0.025M
NaBH ₄	0.01M

Nota: (CTAB) Bromuro de cetiltrimetilamonio; (HAuCl₄) Ácido Tetracloroáurico (III) trihidratado; (NaBH₄) Borohidruro de sodio).

La solución de crecimiento se preparó mezclando nitrato de plata acuoso, CTAB, agua ultra pura, de ác. tetracloroáurico (III) trihidratado [6]; [10] y HCl [29] con las concentraciones que

se observan en la Tabla 2. Después se agita a temperatura ambiente, donde, la solución de crecimiento con pigmentación amarilla se volverá incolora tras la adición de solución de ácido ascórbico acuoso [6], esto debido a que el complejo del ion Au^{3+} sufre un proceso de reducción, dando como resultado un complejo de Au^{1+} .

Tabla 2. Reactivos de la solución de Crecimiento.

Reactivos	Concentración (moles)
CTAB	0.1M
HAuCl ₄	0.5mM
AgNO ₃	0.08mM
HCl	0.08M
C ₆ H ₈ O ₆	1mM

Nota: (CTAB) Bromuro de cetiltrimetilamonio; (HAuCl₄) Ácido Tetracloroáurico (III) trihidratado; (AgNO₃) Nitrato de plata; (HCl) Ácido clorhídrico; (C₆H₈O₆) Ácido Ascórbico (acuoso).

Finalmente se adicionan una alícuota definida de semillas de oro a la solución de crecimiento produciendo un rojizo el cual es ocasionado por la reducción del ion Au^{1+} a Au^0 .

Después de 2.5 h de tiempo de reacción, la solución de nanovarillas se centrifuga a 11 000 rpm durante 30 min., retirando el sobrenadante y resuspendiendo con quitosano tiolado. Después de la dilución del concentrado, la centrifugación se repite para eliminar el exceso de tensioactivo de la solución [6].

Síntesis de Quitosano Tiolado

El quitosano tiolado se obtuvo de acuerdo con el protocolo descrito por Zhu y col., (2012). La unión covalente se consiguió mediante la formación de enlaces amida entre los grupos amino de quitosano y los grupos carboxilato del ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) mediados por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida NHS en dos etapas de una reacción. En primer lugar, se activaron los grupos carboxilato del ácido 3-mercaptopropiónico, mezclando 21 mg de MPA, 13 mg de EDC y 15 mg de NHS en 2 ml de Dimetilformamida (DMF)

y a continuación se añadió esta solución a 40 ml de quitosano al 2,5% En HCl 0,1 M (pH 5,5). Esta solución se agitó durante 5 h y luego se lavó 3 veces con etanol, finalmente, el producto se liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente.[29].

Modulación de Carga Superficial de las Nanovarillas Oro–Quitosano con PVA

Se realizaron diluciones seriadas con PVA con las siguientes concentraciones: 0.01 %, 0.005 %, 0.0025 % y 0.0075 %, cada solución se llevó a un volumen de 1 mL. La solución madre utilizada de PVA fue al 0.01% (10mg/mL) en un volumen de 100 mL.

Durante la realización de estas diluciones se debe hacer por goteo utilizando un agitador magnético y un imán durante 10 min., después se centrifugara a 1000 RMP a una temperatura de 25° C, durante 20 min. Una vez centrifugado se elimina el sobrenadante y se resuspende en agua ultra pura a un volumen de 1 mL. Todas las soluciones se sonica por aproximadamente 30 min. En caso de ser necesario se agitó rigurosamente con ayuda del Vortex, esto con el fin de tener una solución homogénea de las nanopartículas en el medio acuoso.

Después se procedió a medir el potencial zeta y se siguió una etapa de selección y descarte de las cantidades de PVA con las que se trabajara en este proyecto.

Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El tamaño se mide utilizando un Nano ZS (Serie Nano, Malvern Instruments, UK). El cual, determina el tamaño de una suspensión coloidal mediante dispersión de luz dinámica (DLS) [42]. Para determinar el tamaño de las nanopartículas el equipo ilumina las partículas con un láser y analiza las fluctaciones de intensidad en la luz dispersada.

Cuando una partícula pequeña es irradiada por un láser, la partícula dispersará el haz de luz en todas direcciones. Si una pantalla se coloca cerca de la partícula, la pantalla será iluminada por la luz dispersada. Si en lugar de una partícula hubiera miles de ellas, la pantalla mostraría un diseño moteado (consistente de áreas iluminadas y áreas oscuras). Un área brillante es donde la luz dispersada por las partículas llega a la pantalla con la misma fase e interfiere constructivamente con la formación de zonas iluminadas. Un área oscura es donde las adiciones de fase son mutuamente destructivas y se cancelan una a la otra, como podemos observar a continuación, en la figura 12 (*Garay Ramirez 2013 Tesis*).

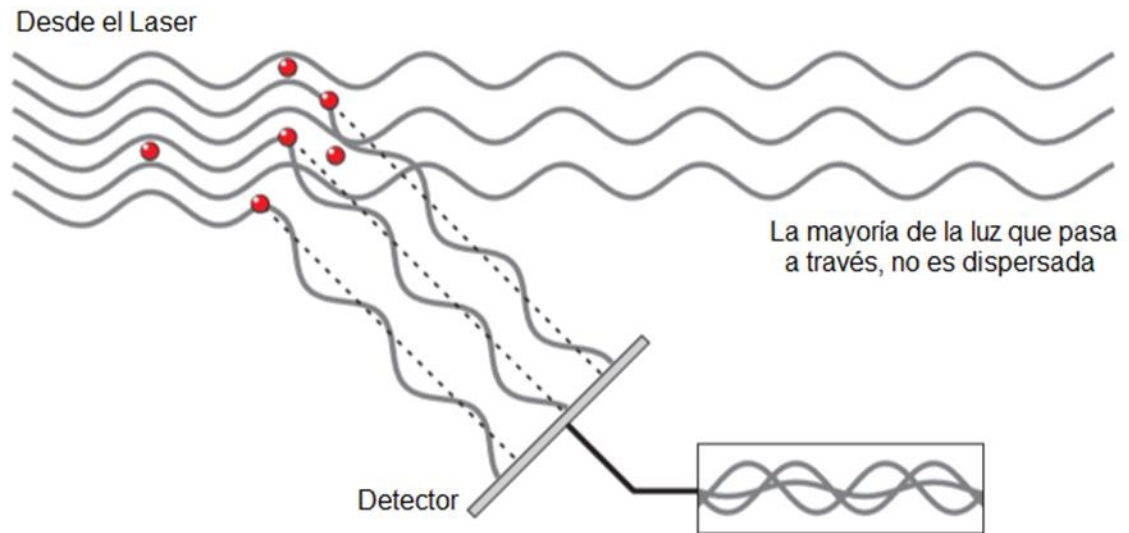


Figura 12. Representación de la luz dispersa detectada por el detector [42]

Puesto que las partículas están en constante movimiento el diseño moteado también da la apariencia de moverse. A medida que las partículas se mueven, las adiciones de fases constructivas y destructivas de la luz dispersada causaran que la intensidad de las zonas brillantes y oscuras crecen y disminuyen en intensidad, es decir, que fluctúe (*Garay Ramirez 2013 Tesis*)

Potencial ζ

El potencial zeta de las nanopartículas se mide utilizando un Nano ZS (Serie Nano, Malvern Instruments, UK). El instrumento mide la movilidad electroforética de las partículas y lo convierte a la potencial ζ usando la ecuación usando la expresión clásica de Smoluchowski (ecuación que relaciona el potencial z con la movilidad electroforética [44]) previamente mencionada.

La movilidad electroforética se mide mediante velocimetría de dispersión dopler (LDV) que chocan entre las mismas nanopartículas de la muestra colocada en la celda.

Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Para la obtención de las imágenes de las nanovarillas de Oro y las monocapas transferidas a la superficie de una mica, se utilizara el microscopio de fuerza atómica (AFM) en modo “no Contacto” del modelo JSPM-4210 (Scanning Probe Microscope de JEOL) [52].

Obtención del Espectro de Absorción mediante el Espectrofotómetro UV-Vis

Los espectros de absorción fueron adquiridos usando un espectrofotómetro Agilent 8453 [29] donde se tomara aproximadamente 3.5 mL de GNRs diluidos con la cantidad de PVA establecida y se ajustara a una absorbancia aproximadamente a 0.1.

Balanza de Langmuir

Se realizara Isotermas en la balanza con el modelo Langmuir-Blodgett (Nima Technologies, Ltd., Coventry, Inglaterra, a través de Langmuir-Blodgett, Modelo Tipo 611). La presión en la superficie y los datos de área molecular se introducen en un ordenador y son grabados, usando una velocidad de la barrera de 20 cm² / min. Todos los experimentos se llevaran a cabo dentro de una caja de cristal libre de polvo. La temperatura se mantiene a 25 ° C utilizando un baño de recirculación de agua (Cole-Palmer, 1268-1224, EE.UU.). El proceso de deposición de película en la interface aire / agua se lleva a cabo usando una microjeringa de Hamilton. 20 µL se deja caer superficialmente de una solución de 1 mg / ml de cloroformo DPPC en una subfase. 15 minutos después el DPPC se expande, la barrera se comprime [52]

Previamente se deberá realizar la limpieza de la balanza de Langmuir-Blodgett con Cloroformo, después de que este se volatice la balanza será llenada con agua ultra pura y seguiremos con el proceso de limpieza de la superficie de la balanza hasta que la presión sea menor de 0.5 Nm/m, esto se realizara con el fin de saber si la balanza está realmente limpia. Antes de empezar a trabajar con la muestra se deberá hacer una curva de calibración de las soluciones: PVA, DPPC y nanovarillas de oro para verificar que la balanza este trabajando en óptimas condiciones.

Preparación del modelo de membrana celular usando el fosfolípido 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

Se elaborara una solución de 1 mg / ml de DPPC diluido en cloroformo con un volumen total de 5 mL. Para el mantenimiento de esta solución es recomendable almacenarlo en un congelador a una temperatura aproximada de 4°C.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Síntesis de Nanovarillas de Oro con Quitosano

Las nanopartículas recubiertas de quitosano presentan un tamaño promedio de nanopartículas 123 nm con una carga superficial positiva de 36.8 mV (Tabla 3), proporcionada por la carga del quitosano (Hernández Montoto, 2014; Roblero & Ramón, 2015). La carga superficial positiva de las nanopartículas GNR-CH confirma la adsorción del quitosano tiolado en la superficie de las nanopartículas de oro.

Tabla 3. Tamaño de partículas y potencial ζ (mV) obtenidas por el Zetasizer Nano-25.

Muestra	Tamaño de Partículas (nm)	Potencial ζ (mV)
GNR-CTAB	$57 \pm 3.2 \times 15 \pm 0.5$	41 ± 3.9
GNR-CH	123.1 ± 5.9	36.8 ± 2.0

Nota: (GNR-CTAB) Nanovarillas de Oro con Bromuro de Cetiltrimetilamonio; (GNR-CH) Nanovarillas de Oro con Quitosano; (nm) Nanometros; (mV) mili Volts.

En la Figura 13 mostramos un esquema de la unión del grupo tiol del quitosano funcionalizado al 5% sobre la superficie de la de nanovarillas de oro, formando un enlace covalente.

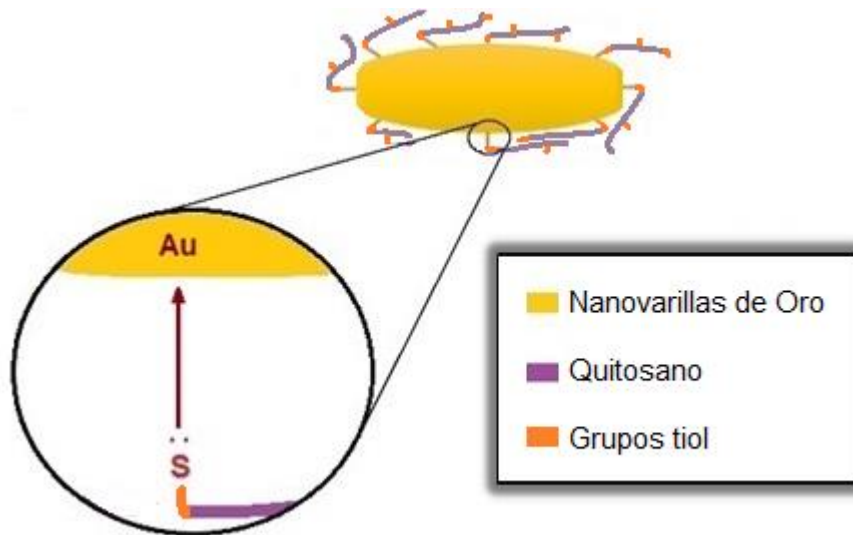


Figura 13. Esquema representativo de los enlaces sulfuro entre las nanovarillas de oro y el quitosano.

Espectro de absorbancia de las nanovarillas de oro.

En la figura 14 se muestran las dos bandas características de los plasmones de resonancia superficial de las nanovarillas de oro obtenidas por el equipo de Espectroscopia UV-Vis. La banda del plasmón de resonancia transversal se observa a una longitud de onda aproximada de 520 nm. Mientras que el plasmón de resonancia longitudinal se localiza a una longitud de onda de 800 nm aproximadamente. La concentración de las nanovarillas de oro fue determinada utilizando el plasmón de resonancia longitudinal utilizando la ley de Beer. El coeficiente de extinción molar del plasmón de resonancia longitudinal se calculó en base a estudios teóricos y experimentales previamente reportado (D. Near y col., 2013–; Cebrián, 2012). En base a estos estudios, el valor del coeficiente de extinción molar de una nanovarilla de oro con una relación de aspecto de 3.8 es de aproximadamente $2.5 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

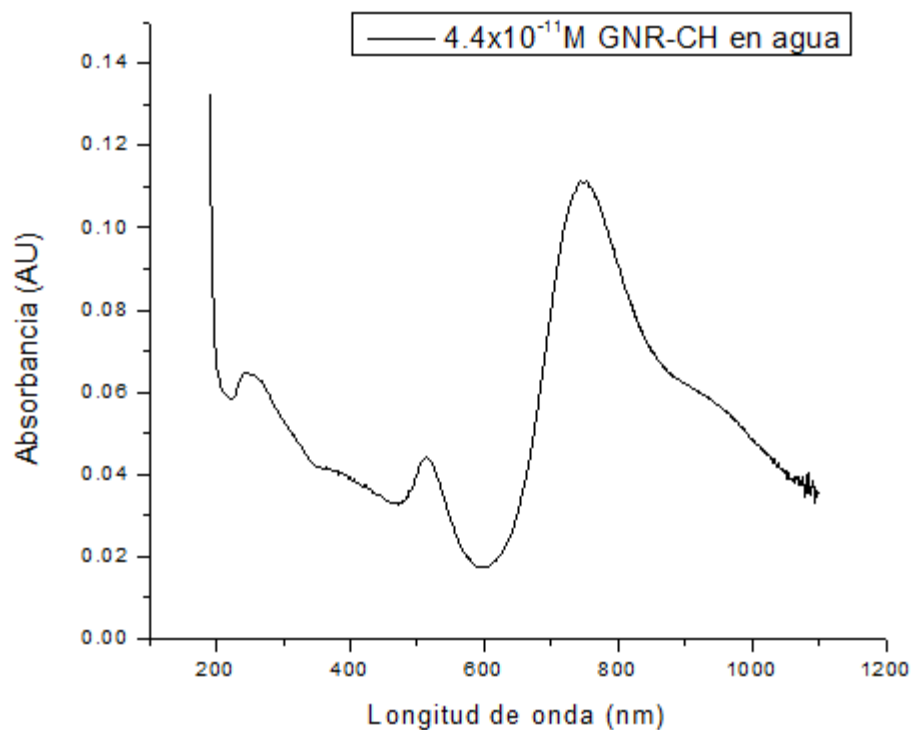


Figura 14. Espectro de absorción de las nanovarillas de oro con quitosano a una concentración de 4.4×10^{-11} M, obtenidas por el UV-Vis.

Caracterización Morfológica de las Nanovarillas de Oro por Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM).

Con la ayuda de las imágenes obtenidas por el microscopio de transmisión electrónica (TEM) se determinaron las longitudes de los ejes de las nanovarillas. La relación de aspecto se determina de acuerdo a la fórmula

$$AR = \text{longitud} / \text{anchura}$$

En donde obtuvimos a partir del conteo de 100 nanopartículas, una medición con mayor frecuencia en las mediciones del eje longitudinal el cual fue de 57 nm., mientras que en el eje transversal se obtiene un total de 15 nm., obteniendo así una relación de aspecto (AR) de 3.8; Donde en la figura 15, representa las imágenes seleccionadas para el conteo de nanopartículas y en la gráfica, la frecuencia con que se presenta la medición seleccionada.

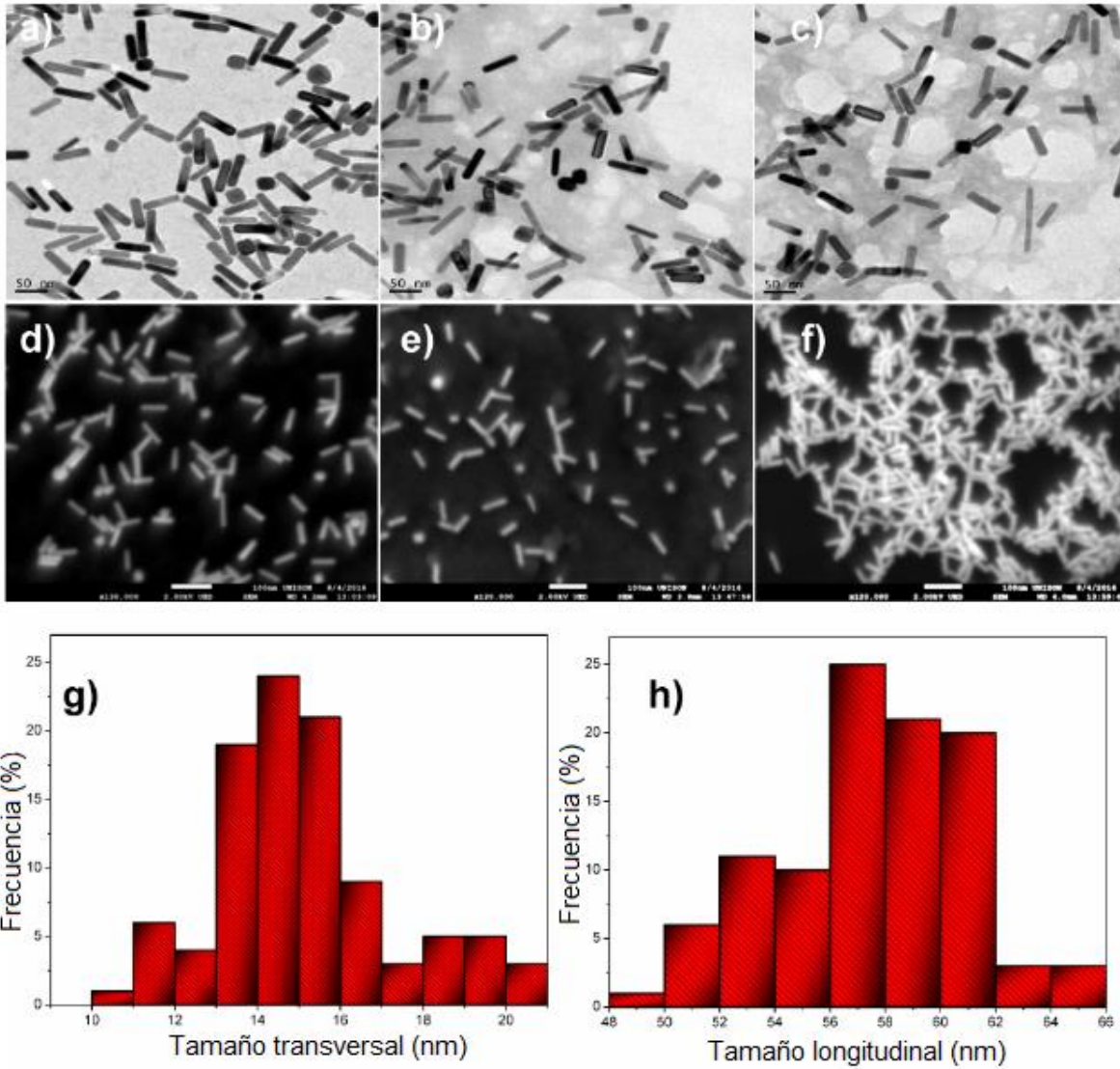


Figura 15. Imágenes TEM de nanovarillas de oro con quitosano y su frecuencia en tamaño transversal y longitudinal (Almada 2016).

Modulación de Carga Superficial de Nanovarillas de Oro–Quitosano con PVA

Para regular la carga superficial de las nanopartículas se utilizó el Polivinil alcohol (PVA), que es un polímero neutro e hidrofílico. Esto con el motivo principal de reducir la carga de las nanopartículas y controlar la interacción de la nanopartícula con un modelo de membrana.

Adicionalmente, la utilización de este polímero ayuda a estabilizar a las nanovarillas en suspensiones acuosas Garcia y col., 2010 & Lu y col. 2005.

En la tabla 4 se presenta los resultados de cuatro muestras que contienen diferentes concentraciones de PVA, las cuales se realizaron con el motivo de observar la concentración con la cual se obtendrá una mejor estabilidad en los GNR-CH; mediante la medición del potencial ζ y DLS, observando la carga de las nanopartículas y tamaño para dichos estudios.

En las muestras 1 y 2, las nanopartículas precipitaron en el proceso de dilución, lo cual indico que las nanopartículas no obtuvieron las condiciones de estabilidad que se necesita. Por lo tanto, se descartó la utilización de estas dos concentraciones de PVA, ya que no cumple con algunas de las funciones por las que se utiliza este polímero. Por otra parte se obtuvieron resultados favorables en el Potencial ζ de las muestras 3 y 4 de las nanopartículas, en donde resalta el resultado obtenido por la muestra 4.

Tabla 4. Comparación de diferentes concentraciones de PVA en las nanovarillas de oro con Quitosano obtenidas por el Zetasizer Nano-25.

Muestra	GNR-CH-PVA)	Tamaño de partículas (nm)	Potencial ζ (mV)
1	PVA 0.0025%	N/D	N/D
2	PVA 0.005%	N/D	N/D
3	PVA 0.0075%	143.3 \pm 10.1	7.87 \pm 0.5
4	PVA 0.01%	196.0 \pm 13.4	3.33 \pm 0.5

Nota: (GNR-CH-PVA) Nanovarillas de oro con Quitosano y Polivinil Alcohol, (PVA) Polivinil Alcohol; (N/D) no detectado.

Se seleccionó la muestra 4 como la concentración adecuada debido a que el tamaño y el valor del potencial ζ nos indican una estabilidad adecuada de las nanopartículas, además el valor de la carga superficial de este sistema de nanopartículas es adecuada para realizar los experiemntos de interacción de las nanovarillas con un modelo de membrana. Por otra parte, podemos observar un aumento en el tamaño de las GNR-CH-PVA respecto al tamaño observado para GNR-CH (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de Tamaño de partículas y potencial ζ entre GNR-CTAB, GNR-CH y GNR-CH-PVA obtenidas por Zetasizer Nano-25.

Muestra	Tamaño de Partículas (nm)	Potencial ζ (mV)
GNR-CTAB	$57 \pm 3.2 \times 15 \pm 0.5$	41 ± 3.9
GNR-CH	123.1 ± 5.9	36.8 ± 2.0
GNR-CH + PVA 0.01%	196.0 ± 13.4	3.33 ± 0.5

Nota: (GNR-CTAB) Nanovarillas de Oro con Bromuro de Cetiltrimetilamonio; (GNR-CH) Nanovarillas de Oro con Quitosano; (GNR-CH + PVA) Nanovarillas de oro con Quitosano y Polivinil Alcohol; (nm) Nanometros; (mV) mili Volts.

En base a los resultados obtenidos del Zetasizer y a lo mencionado en el trabajo realizado por Lu y col. 2005 la interacción intermolecular entre los polímeros quitosano y PVA (figura 16) sucede mediante los grupos funcionales hidroxilos del PVA con el grupo amino e hidroxilo del quitosano tiolado, formando puentes de hidrogeno.

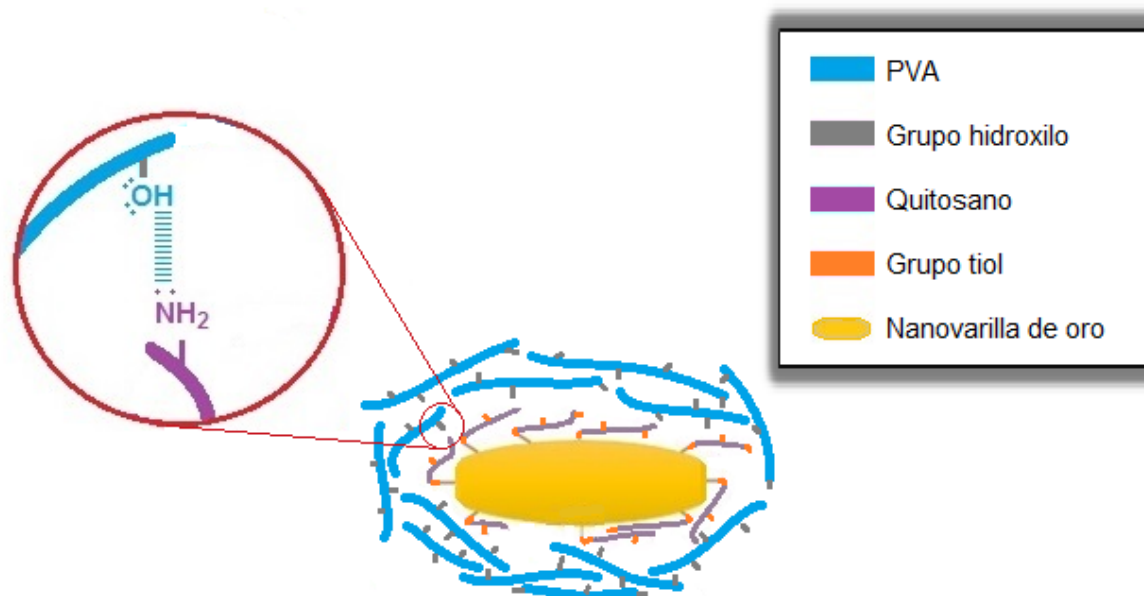


Figura 16. Interacción de Quitosano con PVA.

Morfología de Nanovarillas por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Con la ayuda de la microscopia de fuerza atómica (AFM) se logró observar la morfología de las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano y PVA, las cuales se presentan en forma de varilla (figuras. 17 y 18.)

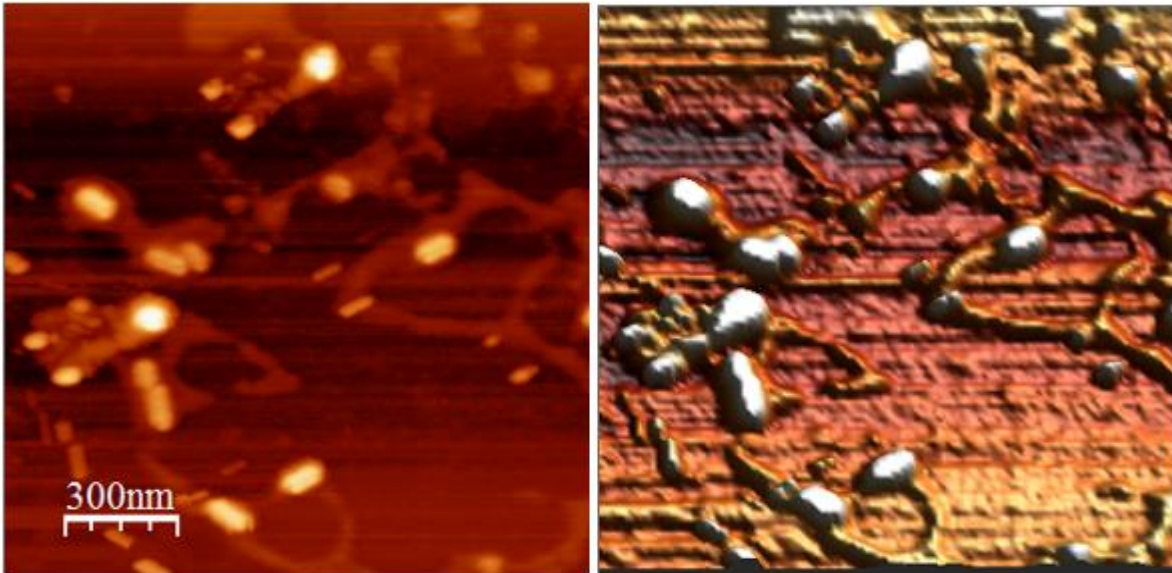


Figura 17. Imágenes en 2D y 3D de las nanovarillas de oro con quitosano-PVA, obtenida en el microscopio de fuerza atómica (AFM) a 300nm

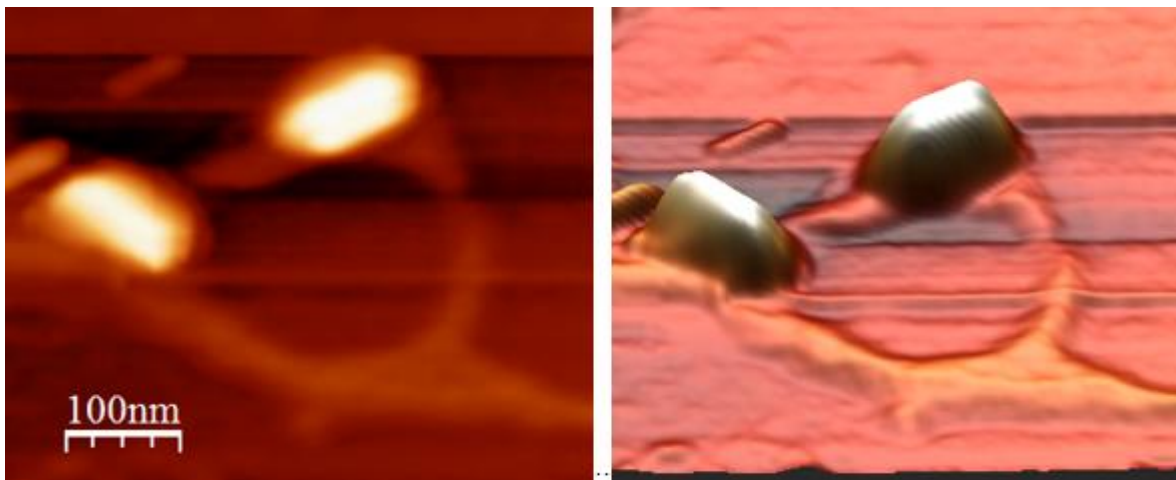


Figura 18. Imágenes en 2D y 3D de las nanovarillas de oro con quitosano-PVA, obtenida en el microscopio de fuerza atómica (AFM) a 100nm.

Isotermas Π vs A

La adsorción de las nanovarillas de oro en un modelo de membrana se realizó a partir de la construcción y análisis de diferentes isotermas Π vs A, obtenidas en la interfase aire-agua. En este estudio se varió la concentración de nanovarillas de oro de 9.77×10^{-15} M y 1.36×10^{-14} M adicionada en el seno de la solución antes de la deposición de DPPC en la superficie de la subfase acuosa.

La figura 19 muestra la isoterma Π vs A característica del DPPC, sin la adición de GNR-CH. La isoterma Π vs A de DPPC fue adquirida sobre una subfase de agua pura a una temperatura de 25 °C. Ellen M. Adams y col. [53], a reportado un comportamiento similar en la interfase aire-agua característico que presenta este fosfolípido. A grandes áreas de superficie podemos observar una fase gaseosa. En esta fase la presión superficial prácticamente permanece constante con un valor próximo a 0 mN/m, indicando que en esta fase las interacciones intermoleculares lípido-lípido son despreciables, debido a que el área disponible por molécula es muy grande. Conforme la concentración superficial de fosfolípido se incrementa, debido a la reducción del área superficial disponible, se observa un incremento del valor de Π indicando una transición fase de gas a líquido expandido (T_1). Al seguir reduciendo la superficie disponible, las interacciones intermoleculares fosfolípido-fosfolípido se hacen más importantes. Esto hace que las colas hidrofóbicas del DPPC se disponga una configuración inclinada en la interfase aire-agua, llegando así a la fase líquido de expansión (LE) que concluye en un área /molécula de aproximadamente 100 \AA^2 . Durante la transición fase líquido expandido-líquido condensado (T_2), la isoterma Π vs A presenta una zona plana en un rango de área aproximada de $80 - 57 \text{ \AA}^2$, donde la Π prácticamente permanece constante, 7 mN/m. Esta región de la isoterma Π vs A indica la coexistencia de líquido expandido-líquido. Por último, se observa que la isoterma Π vs A experimenta cambios importantes en los valores de Π con pequeños cambios del área superficial indicando la transición de la fase de líquido condensado, encontrándose un área por molécula de DPPC de aproximadamente 51 \AA^2 .

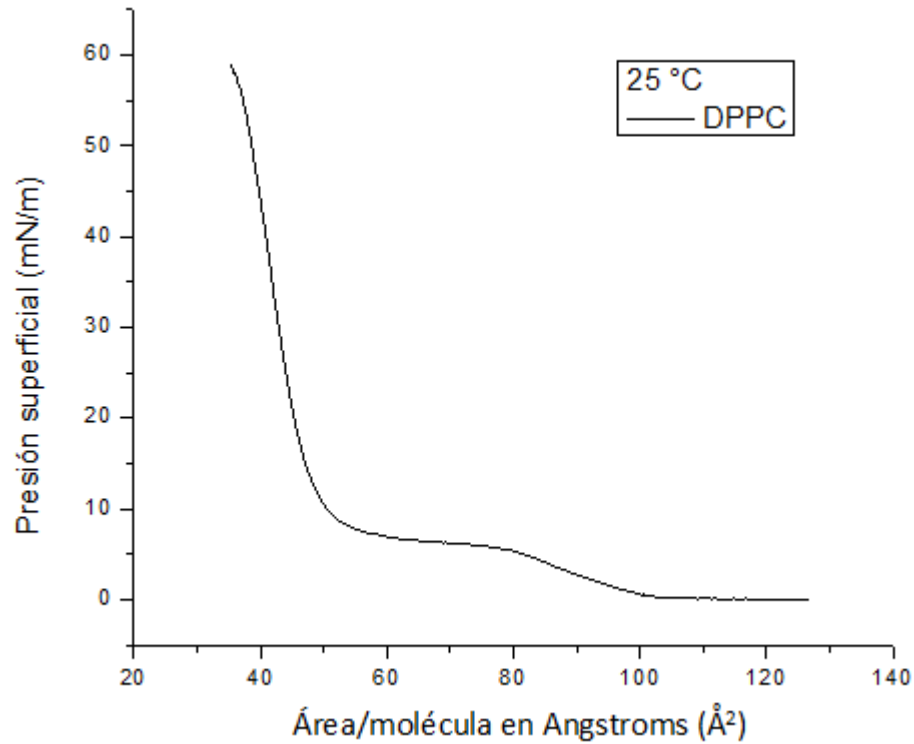


Figura 19. Isotherma típica de DPPC en la interfase agua-aire a 25 °C.

En la Figura 20. Se representa las isothermas Π vs A de DPPC obtenidas en presencia de las nanovarillas de oro con quitosano en las concentraciones de de 9.77×10^{-15} M y 1.36×10^{-14} M. Podemos observar que en presencia de las nanovarillas de oro, las isothermas Π vs A de DPPC presentan un desplazamiento hacia la derecha. Por ejemplo, a una presión de aproximadamente de 38 mN/m observamos una diferencia de área por molécula de aproximada 4.87 \AA^2 para la concentración de de 9.77×10^{-15} M y 5.00 \AA^2 para la de de 1.36×10^{-14} M. Esta diferencia de areas sugiere que las GNR-CH se encuentran intercaladas en las moléculas de la monocapa de DPPC adsorbida en la interfase aire-agua. Adicionalmente, la Figura 20 muestra un incremento aparente de la fase gaseosa, fenómeno que está relacionado con la adsorción de moléculas de DPPC a en la superficie de quitosano, disminuyendo así la concentración de fosfolípidos en la interfase aire-agua. Por otra parte, el incremento de presión en las la región plana (transición líquido expandido-líquido condensado) de la isothermas Π vs A de DPPC en presencia de nanovarillas oro comparada con la isoterma de DPPC indican que la presencia de las NGV-CH en la interface aire-agua. Podemos observar que la presión superficial incrementa conforme se aumentó la concentración de GNR-CH. En la fase condensada de las isothermas Π vs A de DPPC en presencia

de GNR-CH muestran un ligero incremento del área superficial de 0.136 \AA^2 por efecto de la concentración de las nanovarillas.

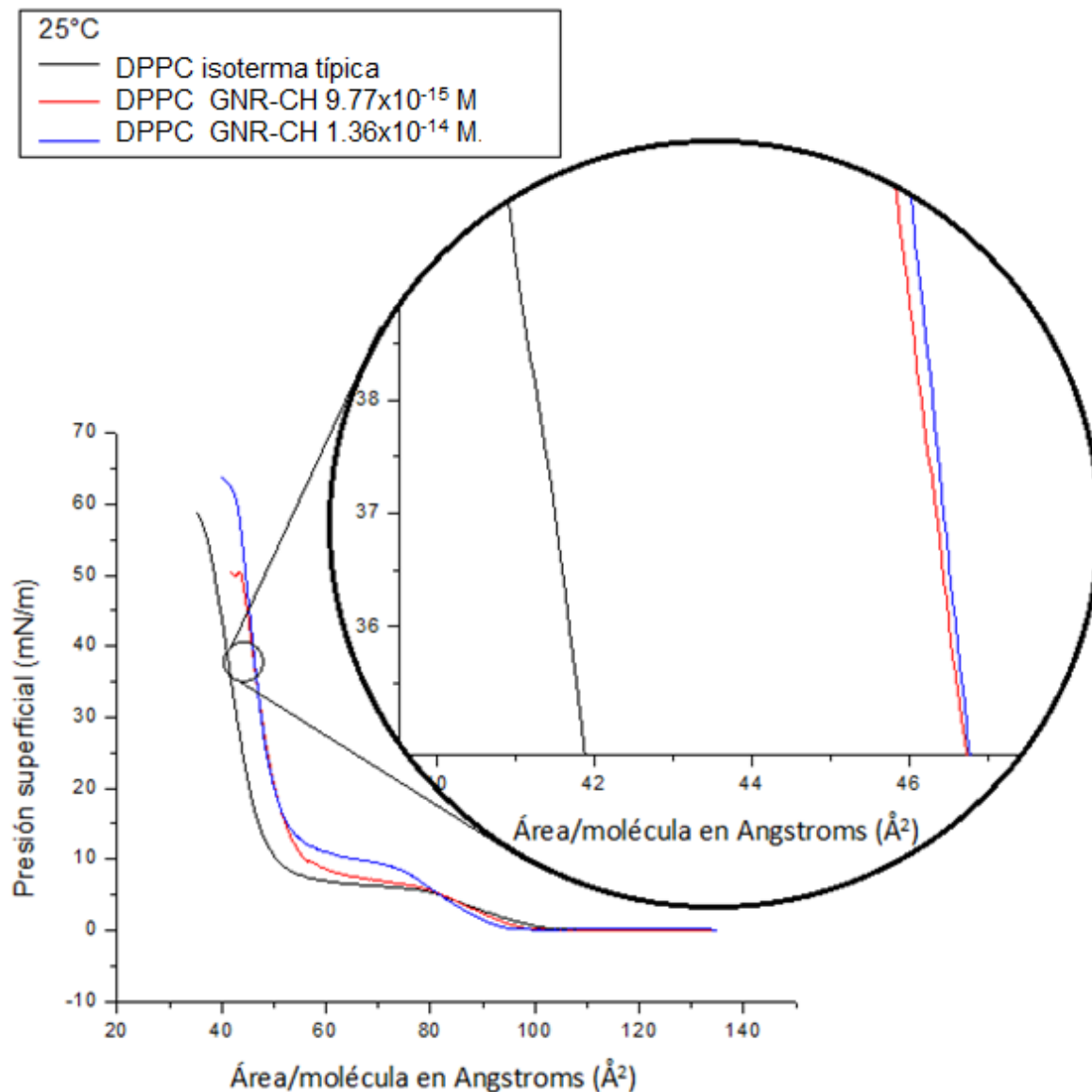


Figura 20. Comparación de concentraciones (M) de GNR-Ch

Las nanovarillas de oro-quitosano fueron estabilizadas con PVA siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Los estudios de interacción en la interfase aire-agua de GNR-CH-PVA-DPPC se realizaron utilizando una concentración de GNR-CH-PVA de $1.36 \times 10^{-14} \text{ M}$. La

Figura 21 muestra un incremento del área superficial en la isoterma Π vs A de DPPC cuando se adiciona GNR-CH-PVA, en comparación el área superficial observada para DPPC puro y en presencia de GNR-CH. El desplazamiento hacia un área superficial más grande observado indica que las nanopartículas recubiertas con PVA penetran la superficie de la monocapa, además es importante recordar que el tamaño de las GNR-CH-PVA es mayor comparado con GNR-CH.

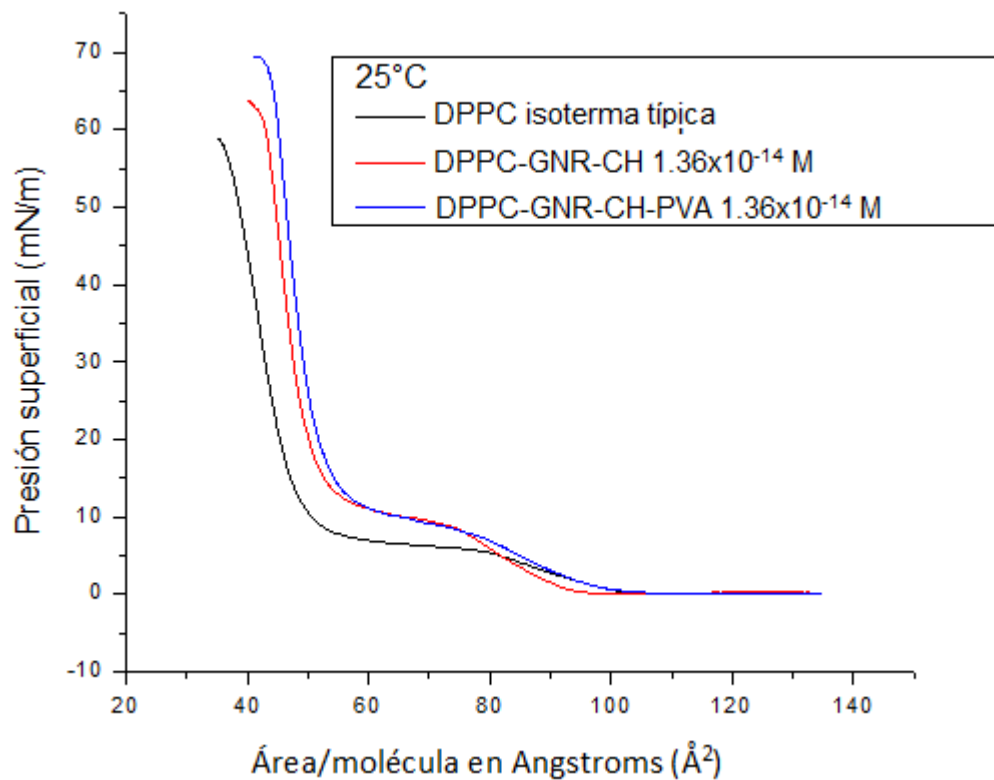


Figura 21. Comparación de Isotermas de GNR-Ch vs GNR-Ch-PVA a 1.36×10^{-14} M.

CONCLUSIÓN

La síntesis de nanovarillas de oro (GNR) se realizó por el método de crecimiento mediado por semillas de oro. Las GNRs se estabilizaron con quitosano (GNR-CH) y PVA (GNR-CH-PVA), polímeros biocompatibles y biodegradables, proporcionando una excelente estabilidad a las GNRs y una carga superficial adecuada. Es importante mencionar el quitosano tiolado adsorbido sobre la superficie de la GNR que le proporcionará una carga positiva. La morfología de las GNRs, se analizó por TEM y AFM, mostrando una geometría característica de varilla con un tamaño aproximado de 15 x 57 nm. El tamaño de las GNR-CH y GNR-CH-PVA determinado por la técnica DLS es de 123.1 y 196 nm, respectivamente. La diferencia en los tamaños de estas nanopartículas indica que el PVA se adsorbió sobre la capa de quitosano tiolado previamente depositada, reflejando una disminución del potencial ζ de 36 mV (GNR-CH) a 3.33 mV.

Las propiedades de adsorción de las nanovarillas de oro (GNR-CH y GNR-CH-PVA) sobre una monocapa de DPPC fueron determinadas mediante el análisis de isotermas de adsorción Π vs A obtenidas en la balanza de Langmuir. Los resultados muestran que los nanosistemas de varillas de oro se adsorben fuertemente a la monocapa de DPPC, aun cuando la carga superficial de las GNRs se reduce a 3.33 mV, cuando la GNR-CH se recubre con PVA. Probablemente se deba a las propiedades anfotéricas de las moléculas de DPPC.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios in vivo sobre la interacción con nanovarillas de oro con quitosano-PVA, para observar el comportamiento de las nanopartículas en un organismo vivo.

Utilizar diferentes polímeros biodegradables para mantener la estabilidad de las nanopartículas.

Utilizar diferentes concentraciones de nanovarillas de oro para así comparar mas a fondo el comportamiento de las nanopartículas al interaccionar con la monocapa.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Richards and H. Bönnemann, "Synthetic Approaches to Metallic Nanomaterials," pp. 3–32, 2005.
- [2] H. M. Chen, R. Liu, and D. P. Tsai, "Article A Versatile Route to the Controlled Synthesis of Gold Nanostructures A Versatile Route to the Controlled Synthesis of Gold 2009," vol. 9, no. March, pp. 2079–2087, 2009.
- [3] J. Allouche, *Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles : An Overview of the Preparation Methods.* .
- [4] C. Hamon, T. Bizien, F. Artzner, P. Even-hernandez, and V. Marchi, "Journal of Colloid and Interface Science Replacement of CTAB with peptidic ligands at the surface of gold nanorods and their self-assembling properties," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 424, pp. 90–97, 2014.
- [5] D. A. Cruz, M. C. Rodríguez, J. M. López, V. M. Herrera, A. G. Orive, and A. H. Creus, "Nanopartículas Metálicas Y Plasmones De Superficie : Una Relación Profunda Metallic Nanoparticles and Surface Plasmons : A Deep Relationship," vol. 3, no. 2, pp. 67–78, 2012.
- [6] H. A. Keul, M. Mo, and M. R. Bockstaller, "Structural Evolution of Gold Nanorods during Controlled Secondary Growth," no. 11, pp. 10307–10315, 2007.
- [7] Link S, El-Sayed MA. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J Phys Chem B* 1999, 103: 8410-8426.
- [8] J. A. Ramos, E. Aparecido, C. Jose, and E. G. Ramos, "Preparation and characterization of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) -stabilized Fe₃O₄ nanoparticles for electrochemistry detection of citric acid," *JEAC*, vol. 755, pp. 158–166, 2015.
- [9] N. Echevarria Garcia and F. López Arbeloa Dra Maite Insausti Peña, "Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro."
- [10] S. R. Saptarshi *et al.*, "Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle," *J. Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 1, p. 26, 2013.
- [11] C. Choi, J. Nam, and J. Nah, "Journal of Industrial and Engineering Chemistry Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials," vol. 33, pp. 1–10, 2016.
- [12] R. Kumar and V. R. Sinha, "Reactive & Functional Polymers Thiomers : A potential carrier for therapeutic delivery," *React. Funct. Polym.*, vol. 73, no. 8, pp. 1156–1166, 2013.

- [13] C. C. Thong, D. C. L. Teo, and C. K. Ng, "Application of polyvinyl alcohol (PVA) in cement-based composite materials : A review of its engineering properties and microstructure behavior," vol. 107, pp. 172–180, 2016.
- [14] E. Yan *et al.*, "Gold nanorods contained polyvinyl alcohol / chitosan nano fi ber matrix for cell imaging and drug delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 1090–1097, 2016.
- [15] W. S. Ā, Y. Fang, J. Fan, Y. He, J. Min, and Y. Qian, "Novel synthesis method of ZnO nanorods by ion complex transformed PVA-assisted nucleation," vol. 299, pp. 272–276, 2007.
- [16] F. D. Sandoval-ibarra, J. L. López-cervantes, and J. Gracia-fadrique, "Q uímica educación y tensoactivos," *Educ. Química*, vol. 26, no. 4, pp. 307–313, 2015.
- [17] C. Hao *et al.*, "Applied Surface Science Adsorption behavior of magnetite nanoparticles into the DPPC model membranes," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 362, pp. 121–125, 2016.
- [18] R. Sarkar, P. Pal, M. Mahato, and T. Kamilya, "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces On the origin of iron-oxide nanoparticle formation using phospholipid membrane template," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 79, no. 2, pp. 384–389, 2010.
- [19] O. L. A. Para, L. A. Ciencia, and L. A. Tecnologia, *NANOCIENCIA Y .*
- [20] Q. Viva, M. Fiona, and R. Guillermo, "Nanotecnología , hacia un nuevo portal científico-tecnológico Nanobiotechnology : towards a new scientific and technological gateway," 2012.
- [21] M. I. Felipe and C. Rodríguez, "Introducción a los nanomateriales," 2012.
- [22] I. Ambiental-agua, C. Alberto, H. Aguilar, T. Principal, and I. D. E. Física, "Universidad nacional autónoma de méxico," 2015.
- [23] Ahmad MZ1, Akhter S, Rahman Z. Nanometric gold in cancer nanotechnology: current status and future prospect. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65(5):634-51.
- [24] G. Victoria and R. Eva, "Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer," pp. 1–6, 2015.
- [25] C. Infrarrojo, "I c a t a u l," 2009.
- [26] B. California and A. Khomenko, "Resonancias ópticas en las nanopartículas metálicas," no. April, 2014.
- [27] "Wang, C., Wang, T., Ma, Z. and Su, Z..tuned synthesis of gold nanostructures from gold nanorods with different aspect ratios. *Nanotechnology*. 2005; 16: 2555-2560.
- [28] F. Ratto, Æ. P. Matteini, and Æ. F. Rossi, "Size and shape control in the overgrowth of gold nanorods," pp. 2029–2036, 2010.

- [29] M. Almada, E. D. Ruiz, N. Hassan, and M. J. Kogan, "Growth Kinetics of Gold Nanorods Synthesized by a Seed-Mediated Method Under pH Acidic Conditions," vol. 16, no. xx, 2016.
- [30] Y. M. A. L. Vigil, "Biopolímeros y su integración con polímeros convencionales como alternativa de empaque de alimentos," pp. 42–52.
- [31] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," vol. 32, pp. 762–798, 2007.
- [32] D. M. Garc, "Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular," pp.46, 2008.
- [33] N. M. Texzles, "Quitina Y Quitosano. Nuevos Materiales Textiles." no.110, pp. 67-71, 1996.
- [34] K. Deepak, M. S. Kumar, and N. Mahadevan, "I nternational J ournal of R ecent A dvances in P harmaceutical R esearch Thiolated Chitosan : Modified Advanced Generation of I nternational J ournal of R ecent A dvances in P harmaceutical R esearch," vol. 2, no. July, pp. 31–41, 2012.
- [35] R. Hejazi and M. Amiji, "C hitosan-based gastrointestinal delivery systems," vol. 89, pp. 151–165, 2003.
- [36] M. C. Salazar and A. V. Negrón, "Preparación y Caracterización de Películas De Quitosano Despolimerizado Y Reticulado con Tripolifosfato de Sodio Preparation And Characterization of Depolymerised Chitosan Films and Crosslinked with Sodium Tripolyphosphate," vol. 79, no. 3, pp. 195–208, 2013.
- [37] L. García-rivas *et al.*, "Síntesis y Caracterización de Esferas de Quitosano-Egde-pva Para Adsorción de Cu (II)," vol. 11, no. 7, pp. 541–549, 2010.
- [38] E. N. Biomedicina and Y. E. N. Biotecnología, "Estructuras Tridimensionales Porosas de Mwcnts con Aplicaciones en Biomedicina y en Biotecnología.," 2009.
- [39] S. A. Y. C. Remuñán-lópez, "7. Nanopartículas metálicas: oro," pp. 8–17.
- [40] L. Lu, F. Peng, Z. Jiang, and J. Wang, "Poly (vinyl alcohol)/ Chitosan Blend Membranes for Pervaporation of Benzene / Cyclohexane Mixtures," vol. 2, no. March, 2005.
- [41] A. M. Q. B, "Gelatina Y PVA Thermomechanical Properties of Biodegradable Films Based Gelatin PVA Blends," vol. 75, no. 1, pp. 87–93, 2009.
- [42] "Malvern Instruments Ltd. 2004. "Zetasizer Nano Series User Manual", MAN0317 Issue 1.1 Head office: Malvern Instruments Ltd. Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire. WR14 1XZ United Kingdom.

[43] R. Moreno, J. S. Montoya & J. Requena, "Electroquímica de suspensiones cerámicas" Bol.Soc.Esp.Ceram.Vird. vol. 26 (6), pp 355-365, 1987.

[44] GONZALEZ. G., LASKOWSKI, J."The point of zero charge of oxidized copper minerals: tenorite, malachite and chrysocolla. *Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.* 53 pp 452-56, 1974.

[45] "López & Solares 2009 AFM principio.pdf." .

[46] J. Holler and S. R. 2014 *Fundamentos de Química Analítica* 9na ed. Ed. Cengage Learning® Av. Santa Fe núm. 505, piso 12 Col. Cruz Manca, Santa Fe C.P. 05349, México, D.F.

[47] M. I. Litter and M. A. Armienta, *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos.* .

[48] Daza M. y col., Trabajo de Tesis Doctoral." Monocapas Autoensambladas de Alcanodiolos y α, ω -alcanodiolos sobre Oro : Adsorción no específica de Moléculas Bioactivas , Biomoléculas y Vesículas," 2011.

[49] G. Ma and H. C. Allen, "DPPC Langmuir Monolayer at the Air - Water Interface : Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy," no. 26, pp. 5341–5349, 2006.

[50] J. Torres and S. Durán, "Fosfolípidos : Propiedades y efectos sobre la salud," vol. 31, no. 1, pp. 76–83, 2015.

[51] J. Ramón, J. Jiménez, and K. C. Reyes, "Surfactante pulmonar en el síndrome de dificultad respiratoria," 2009.

[52] M. Almada, M. G. Burboa, E. Robles, L. E. Gutiérrez, and M. A. Valdés, "Interaction and Cytotoxic Effects of Hydrophobized Nanoparticles on MDA-MB-231 , HeLa and Arpe-19 Cell Lines Chitosan," pp. 692–701, 2014.

[53] E. M. Adams, C. B. Casper, and H. C. Allen, "Journal of Colloid and Interface Science Effect of cation enrichment on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers at the air-water interface," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 478, pp. 353–364, 2016.

[54] Venables, J., Stevenson, P. C., & Hiller, J. "Electron back scattering patterns a new technique for obtaining crystallographic information in the scanning electron microscope". *Philosophical Magazine*, vol. 27 no. 5, pp. 1193-1200, 1973.

[55] L. Simes & T. Brich. "Bioquímica orientada a los Análisis Clínicos.",Ed.1, Jorge Sarmiento, Editor-Universitas, pp.327, 2015.

[56] Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. I. (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro.*Acta toxicológica argentina*, 21(2), 102-109.