

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN FÍSICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPLATAFORMAS HÍBRIDAS NANORODS-QUITOSANO TIOLADO-PNIPAM Y SU APLICACIÓN COMO AGENTES DE CARGA DE FÁRMACOS.

TESIS PROFESIONAL

1942

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IVÁN CANALE SALAZAR

Universidad de Sonora

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

VOTOS APROBATORIOS

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS

Coordinador de Posgrado en Nanotecnología

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Maestría: “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPLATAFORMAS HÍBRIDAS NANORODS-QUITOSANO TIOLADO-PNIPAM Y SU APLICACIÓN COMO AGENTES DE CARGA DE FÁRMACOS”, presentada por:

IVÁN CANALE SALAAR

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Maestría en Nanotecnología:

DR. REYNALDO ESQUIVEL GONZÁLEZ

DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE

DR. CÉSAR RODRÍGUEZ BEAS

DR. PAUL ZAVALA RIVERA

DR. IVÁN ELEAZAR MORENO CORTÉZ
(EXTERNO)

Dedicatoria

A mis padres Martha O. Salazar y Moisés Canale.

Agradecimientos

Al Dr. Reynaldo Esquivel González por asesorarme durante mi trabajo de tesis.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Antecedentes.....	3
I.1.1 Estado del arte.....	3
II. MARCO TEÓRICO	13
II.1. Nanociencia y Nanotecnología	13
II.2. Nanomateriales, propiedades y síntesis.....	14
II.3. Nanomedicina	15
II.4. Clasificación de los materiales utilizados en la nanomedicina.	17
II.4.1. Materiales inorgánicos.....	17
II.4.2. Nanopartículas Orgánicas.....	23
II.4.3. Materiales híbridos en la carga y liberación de fármacos	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	32
IV. HIPÓTESIS	32
V. OBJETIVOS	32
V.1. Objetivo general.....	32
V.2. Objetivos específicos	32
VI. METODOLOGÍA	34
VI.1. Síntesis de nanovarillas de oro	34
VI.2. Síntesis de quitosano tiolado	35
VI.3. Funcionalización de nanovarillas de oro con quitosano tiolado.....	36

VI.4. Recubrimiento con nanopartículas de PNIPAM	37
VI.5. Técnicas de caracterización	38
VI.5.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	38
VI.5.2. Espectroscopía UV-Vis.....	39
VI.5.3. Potencial ζ	40
VI.5.4. Dispersión de luz dinámica.....	40
VI.5.5. Microscopía de fuerza atómica	41
VI.5.6. Microscopía electrónica de barrido.....	42
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
VII.1. Funcionalización de NvAu con quitosano tiolado (Q-SH)	43
VII.2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas	44
VII.2.1. Estudio de radio hidrodinámico en NvAu-CTAB y NvAuQSH	44
VII.2.2. Estudio de Potencial ζ en NvAu-CTAB y NvAuQSH	46
VII.3. Encapsulación de las NvAuQSH mediante la polimerización in situ de la isopropilacrilamida (NIPAM).....	48
VII.4. Caracterización estructural de la nanoplataforma NvAuQSH _{P_x} mediante FT-IR.	49
VII.4.1. Estudio del efecto de la concentración de NvAuQSH sobre el Potencial ζ	51
VII.4.2. Estudio del efecto de la concentración de NvAuQSH sobre el tamaño de partícula	54
VII.4.3. Estudio del efecto de la temperatura de NvAuQSH _P sobre el tamaño de partícula	56
VII.4.4. Estudio del efecto del pH sobre el tamaño de partícula.....	57
VII.4.5. Determinación del plasmón de resonancia superficial por espectroscopía de UV-Vis	59
VII.4.6. Caracterización morfológica por MFA.....	62
VII.4.7. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	65

VII.4.8. Capacidad de entrapamiento de Cisplatino en NvAuQSHPx.....	66
VIII. CONCLUSIONES.....	69
IX. PERSPECTIVAS	71
X. LITERATURA CITADA	72

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Concentraciones de NvAu utilizadas en las reacciones de síntesis.....	47
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la escala nanométrica.....	1
Figura 2. Relación superficie/volumen en nanopartículas esféricas.....	2
Figura 3. Estímulos físicos y químicos que conllevan a respuestas características de materiales sensibles “In Stimuli”	4
Figura 4. Diagrama de las transiciones LCST y UCST en materiales termosensibles.....	5
Figura 5. Estructura química de la poli-(isopropilacrilamida).	6
Figura 6. Estructura química de la PVC.....	7
Figura 7. Estructura química del PMVE.	8
Figura 8. Evolución del plasmón de resonancia superficial de nanoestructuras de oro al variar la relación de aspecto.....	10
Figura 9. Estructura química del PLGA.	12
Figura 10. Disciplinas que interactúan sinérgicamente para complementar el estudio de la nanotecnología.....	13
Figura 11. Representación gráfica de las metodologías “Top down” y “Bottom up”.....	15
Figura 12. Nanopartícula multifuncional diseñada con fines biomédicos. En su estructura incluye ligandos específicos y fármacos para complementar el tratamiento de enfermedades de forma inteligente.....	16
Figura 13. Estructura de un liposoma con doble capa lipídica, una micela y una lámina de doble capa lipídica.....	24
Figura 14. Protonación del quitosano en medio ácido.....	29
Figura 15. Disociación del persulfato de amonio.	30
Figura 16. Polimerización de la N-isopropil acrilamida con el entrecruzante.	31
Figura 17. Diseño de la nanoplataforma y diagrama de flujo de síntesis.	34
Figura 18. Diagrama de flujo para la síntesis de NvAu.....	35
Figura 19. Diagrama de flujo para la síntesis de quitosano tiolado.....	36
Figura 20. Representación del intercambio de ligandos por medio de diálisis.	37
Figura 21. Diagrama de flujo para la síntesis de PNIPAM.	38
Figura 22. Espectro de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR) para la muestra NvAuQSH.	44

Figura 23. Curvas de distribución de tamaños mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica para las muestras NvAu-CTAB y NvAuQSH.....	45
Figura 24. Potencial ζ de las muestras NvAu y NvAuQSH.	47
Figura 25. Espectros FT-IR de las muestras a) NvAuQSH y del b) quitosano tiolado.....	51
Figura 26. Potencial ζ de las muestras.....	52
Figura 27. Rango de tamaños de las muestras NvAuQSH.....	55
Figura 28. Rango de tamaños de las muestras NvAuQSH ante un barrido de temperatura....	56
Figura 29. Comportamiento de partícula debido a variaciones en el pH.	58
Figura 30. Gráficas de espectroscopia de UV-Vis para las muestras NvAuQSH.....	61
Figura 31. Modelo propuesto para la nanopartícula NvAuQSH.....	62
Figura 32. Imágenes adquiridas por MFA para las muestras NvAuQSH.	64
Figura 33. Imagen MEB de la muestra NvAuQSH4.....	65
Figura 34. Porcentaje de encapsulación de Cisplatino en muestras NvAuQSH.	67

RESUMEN

El estudio de la nanotecnología se ha direccionado en los últimos años hacia el desarrollo e ingeniería de nanoplataformas híbridas como novedosa área de investigación y de elevado interés tecnológico, debido a su potencial aplicación en la construcción de nanoplataformas multifuncionales que cumplan tareas de carga y liberación controlada de fármacos. En el presente trabajo de investigación, se propone como objetivo principal la preparación de una nanoplataforma híbrida (orgánico-inorgánico) multifuncional, es decir, que sea sensible a más de un estímulo externo, como es cambio de pH y estímulos térmicos del medio en que se encuentre. Esta síntesis se llevó a cabo mediante la polimerización vía radicales libres de la ANIPAM en presencia de nanovarillas de oro estabilizadas con una matriz polimérica de quitosano tiolado. Se proponen el uso de materiales sensibles que respondan con cambios estructurales como respuesta a estímulos externos como radiación electromagnética e internos como pH y temperatura. La incorporación de nanoestructuras inorgánicas de metales nobles como nanovarillas de oro (NvAu) da lugar a la formación de nanoplataformas híbridas que pueden ser activadas mediante un haz de luz incidente. Utilizar nanoplataformas como acarreadores de fármacos; entiéndase por nanoplataformas el acoplamiento de dos o más materiales en un dispositivo nanométrico, representa varias ventajas para administrar fármacos, entre las cuales están el prolongar el tiempo de liberación, otorgar especificidad al difundirse en el tejido deseado (ya sea de manera pasiva o activa), y la posibilidad de controlar la liberación con estímulos ambientales. Para este trabajo se utilizaron como centro nanopartículas de oro las cuales tienen la particularidad de responder a la luz de manera que absorben la mayoría de la energía (a ciertas longitudes de onda) resonando los electrones superficiales y generando como consecuencia el calentamiento del material. La razón de utilizar formas anisotrópicas como nanovarillas es desplazar el plasmón de resonancia longitudinal hacia el rojo, evitando dañar el tejido al momento de aplicar el estímulo externo por medio de un láser. Se recubrieron las nanopartículas de oro con quitosano modificado con grupos tiol (-SH) los cuales son susceptibles de formar enlaces coordinados con el oro. Se usó el polímero PNIPAM ya que se caracteriza por una transición de fase estimulada por la temperatura, por debajo de los 32°C las cadenas del polímero y las moléculas del solvente forman una mezcla homogénea, mientras que por arriba de los 32°C se presenta una separación de fases por el colapso del polímero debido al

rompimiento de los puentes de hidrógeno y el predominio de los grupos isopropil. La caracterización estructural de la nanoplataforma se realizó haciendo uso de la técnica de espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FT-IR) para comprobar la funcionalización de los nanorods o nanovarillas de oro (NvAu) con el quitosano. De igual manera se caracterizó mediante la técnica de Potencial ζ en cada etapa de síntesis, esto para comprobar el recubrimiento mediante la carga superficial, que es particular tanto para las NvAu, como para cada polímero que se utilizó. El tamaño se midió mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLD), además, se realizó la caracterización morfológica mediante Microscopia de Fuerza Atómica (MFA) y Microscopia Electrónica de Barrido (MEB). Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que la nanoplataforma sintetizada es capaz de mantener las propiedades características de cada material que la compone.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la nanotecnología ha surgido como novedoso campo de interés en la ciencia sobre todo por su potencial aplicación en áreas como la medicina tradicional. Estudios recientes confirman que una gran diversidad de materiales posee propiedades que prometen mejorar mecanismos ya establecidos para moléculas con actividad biológica, uno de los casos más estudiados es la carga y liberación controlada de fármacos [1]. Hasta el día de hoy, se han logrado numerosos avances en la rama de la nanotecnología, esto enfocado en funcionalización, métodos de síntesis y aplicaciones orientadas en la resolución de problemas actuales en la medicina. Estos resultados han impactado en el desarrollo y establecimiento de nuevos protocolos para la obtención de nanopartículas con prometedoras propiedades fisicoquímicas como morfología, carga superficial y su reactividad química. Las sorprendentes bondades de los nanomateriales surgen de la disminución relativa de las dimensiones de sus precursores hasta la nanoescala. Esta se encuentra en un rango que va desde uno hasta cien nanómetros, en la Figura 1, se muestra una comparación desde la estatura de un ser humano, hasta llegar a las dimensiones nanométrica de nanopartículas, pasando por polímeros naturales como el ADN, y finalmente a las dimensiones atómicas. En estas condiciones, la materia exhibe características diferentes de las que tienen en su estado en “bulto” (agregados grandes de materia), las cuales se encuentran estrechamente relacionadas con su naturaleza, su morfología y el arreglo espacial de sus átomos.

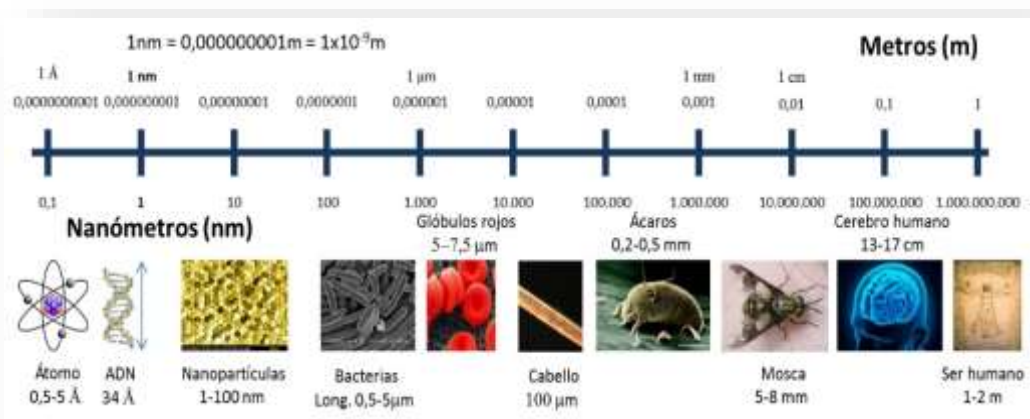


Figura 1. Representación de la escala nanométrica [2].

Una de las características más interesantes en los nanomateriales es el incremento en el área superficial en relación con su volumen, tal como se puede observar en la Figura 2. Una nanopartícula esférica de 3 nm tiene una relación superficie volumen de 2 a 1, mientras que para una nanopartícula de 1 nm esta relación cambia 6 a 1, de acuerdo con la ecuación de la superficie específica que es igual al área superficial dividida entre el volumen. En sistemas coloidales, el incremento del valor del área superficial se traduce en el reacomodo de sus átomos, favoreciéndose la concentración de la mayoría de los átomos en la superficie de la nanopartícula. El número de átomos en la superficie en un material se incrementa siguiendo un comportamiento exponencial, la característica de los átomos superficiales es que tienen menores fuerzas de atracción con átomos del interior de la partícula por lo tanto su potencial de reacción es mayor en comparación con los materiales en bulto.

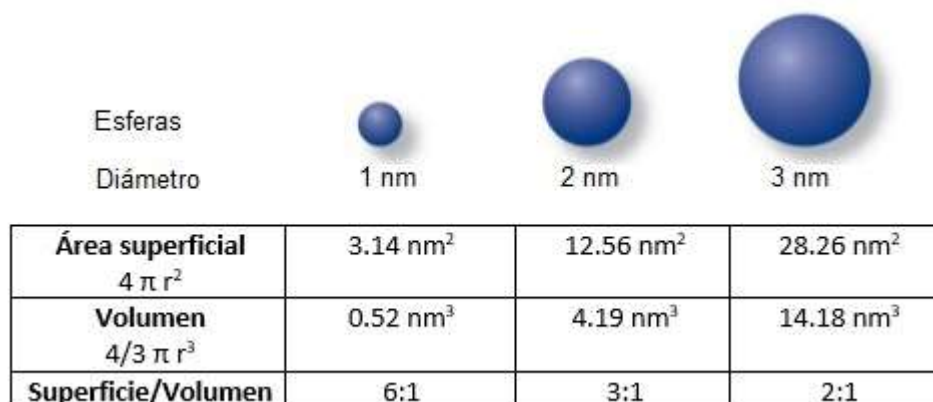


Figura 2. Relación superficie/volumen en nanopartículas esféricas [3].

El aprovechamiento oportuno de las propiedades de los nanomateriales puede ser orientado con el objetivo de resolver problemas de diferentes índoles del conocimiento actual. Hoy en día, se conoce acerca de los múltiples efectos secundarios debidos a antineoplásicos administrados en forma pura por diferentes vías, este hecho impacta gravemente en la calidad de vida de los pacientes que padecen enfermedades crónico-degenerativas [4]. Bajo este contexto resulta apremiante el diseño y preparación de sistemas nanoestructurados que de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y morfológicas puedan por ejemplo transitar fácilmente por los

vasos sanguíneos del sistema circulatorio o internalizarse en las células vía endocitosis. Aspectos como especificidad biológica de ciertos nanomateriales han sido abordados mediante la funcionalización de nanopartículas con ligandos específicos de reconocimiento, anticuerpos, moléculas guía para llegar al tejido blanco y activar mecanismos celulares [5]. A este enfoque relativamente nuevo se le ha denominado como nanomedicina, disciplina que intenta mejorar la capacidad de los fármacos (esto es, la absorción y biodistribución) de compuestos bioactivos y así mejorar el diagnóstico, monitoreo, tratamiento y control en sistemas biológicos. Es importante tener conocimiento de cuáles son los materiales que pueden ser útiles en la elaboración de una nanoplataforma, un diseño bastante utilizado actualmente es la combinación de materiales inorgánicos en el centro, recubiertas de polímeros biocompatibles, aprovechando las propiedades de las partículas inorgánicas combinadas con los polímeros orgánicos. En la sección de antecedentes se hará hincapié en algunos de los materiales poliméricos más utilizados debido a sus respuestas a estímulos ambientales, también se verán los efectos que se pueden aprovechar de las partículas de metales nobles, en especial las nanopartículas de oro, para dar una breve descripción de las nanopartículas híbridas y sus ventajas.

I.1. Antecedentes

I.1.1 Estado del arte

En la última década se han reportado cuantiosas publicaciones enfocadas en la síntesis de novedosos nanomateriales poliméricos orgánicos [6]. Los estudios de estos materiales van dirigidos plenamente al desarrollo de materiales capaces de responder a estímulos externos. Este es el caso de los polímeros inteligentes, es decir, sus propiedades se encuentran en función del medio en que se encuentran. A continuación, se presenta un resumen sobre las propiedades y aplicaciones potenciales de los materiales sensibles “*In Stimuli*”.

1.1.1.1. Materiales Sensibles “In Stimuli”

Los polímeros sensibles “*In Stimuli*”, son aquellos capaces de responder a estímulos externos físicos y químicos (Figura 3), de manera que ante un cambio en su entorno o ambiente, estos responden de manera abrupta con cambios relativamente pequeños en una variable, como puede ser la temperatura, el pH, fuerza iónica, campo magnético, campo eléctrico, irradiación de luz, concentración de alguna especie, reacciones de óxido-reducción, y también en presencia de algunos agentes químicos y biológicos [7].

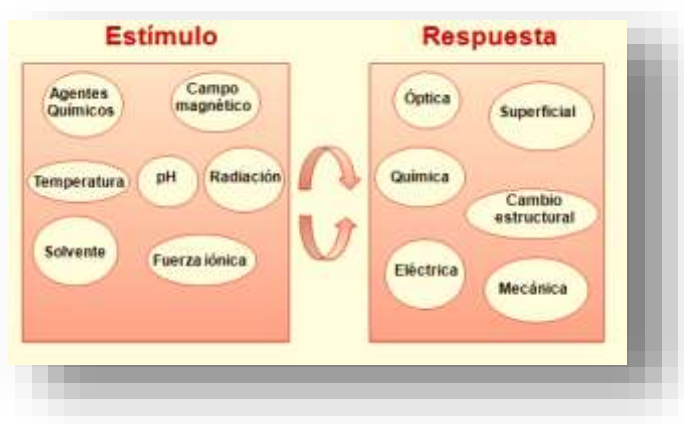


Figura 3. Estímulos físicos y químicos que conllevan a respuestas características de materiales sensibles “*In Stimuli*” [8].

Las respuestas ante esta gran variedad de estímulos resultan ser en cambios en las propiedades ópticas, cambios estructurales, reorientación magnética, respuestas hidrofóbicas/hidrofílicas, entre otras. Una de las aplicaciones que pueden ser potencialmente prometedoras es en la entrega controlada de sustancias de interés biológico debido a pequeñas variaciones en condiciones ambientales como pH, temperatura, concentración de ciertas sustancias que ocurren en las inmediaciones de los tejidos y sus células. Por lo tanto, es factible desencadenar la liberación de fármacos, todo esto recae en la estructura y grupos funcionales presentes en los polímeros, los cuales muestran cambios rápidos en su superficie y por lo tanto en su forma, solubilidad, y agregación de las cadenas por efecto de su carga [9].

I.1.1.1.1. Polímeros Termosensibles

Dentro de la clasificación de materiales sensibles “*In Stimuli*”, se encuentran aquellos que responden a estímulos térmicos teniendo como consecuencia un cambio en su acomodo estructural, y por ende en su solubilidad. Existen dos tipos de polímeros termosensibles de acuerdo a la temperatura en la cual el polímero es totalmente miscible en el disolvente. Unos presentan una temperatura de solución crítica superior (o UCST, por sus siglas en inglés), que se define como la temperatura por encima de la cual el polímero es completamente miscible en el solvente (ver Figura 4 A); mientras que la temperatura de solución crítica inferior (o LCST, por sus siglas en inglés) es la temperatura por debajo de la cual el polímero permanece completamente miscible en el solvente (ver Figura 4 B) [7, 8].

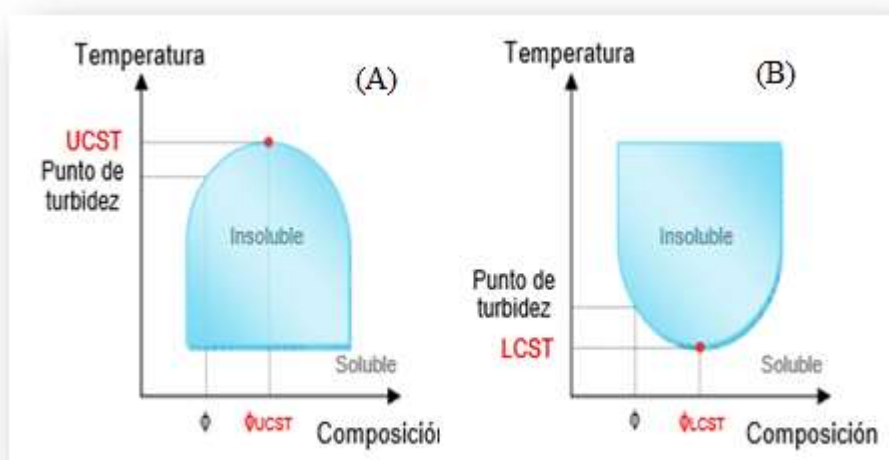


Figura 4. Diagrama de las transiciones LCST y UCST en materiales termosensibles [12].

I.1.1.1.1.1. Poli-(isopropilacrilamida) (PNIPAM)

Los polímeros que tienen una respuesta a la temperatura como consecuencia de su LCST tienen un gran potencial de aplicación como matrices en las cuales se pueden cargar fármacos, usar como vector de genes e incluso en ingeniería de tejidos. Este tipo de respuesta (LCST) se caracteriza por un colapso de la estructura del polímero debido al incremento de la temperatura

del sistema. La poli-(Isopropilacrilamida) o PNIPAM es un polímero sintético formado por monómeros N-isopropilacrilamida, conformado por un grupo amida unido a la cadena principal, el cual tiene a su vez un grupo isopropil como terminación (ver estructura en la Figura 5). La respuesta LCST del PNIPAM se sitúa entre los 30°C y 34°C. La razón de que el PNIPAM presente esta respuesta al elevarse la temperatura (LCST) se debe a que el proceso está favorecido entrópicamente, es decir, predomina sobre el contribuyente entálpico, esto da lugar a una energía libre de Gibbs positiva, resultando en una separación de fases debido a que el proceso de solubilidad está desfavorecido termodinámicamente. [10].

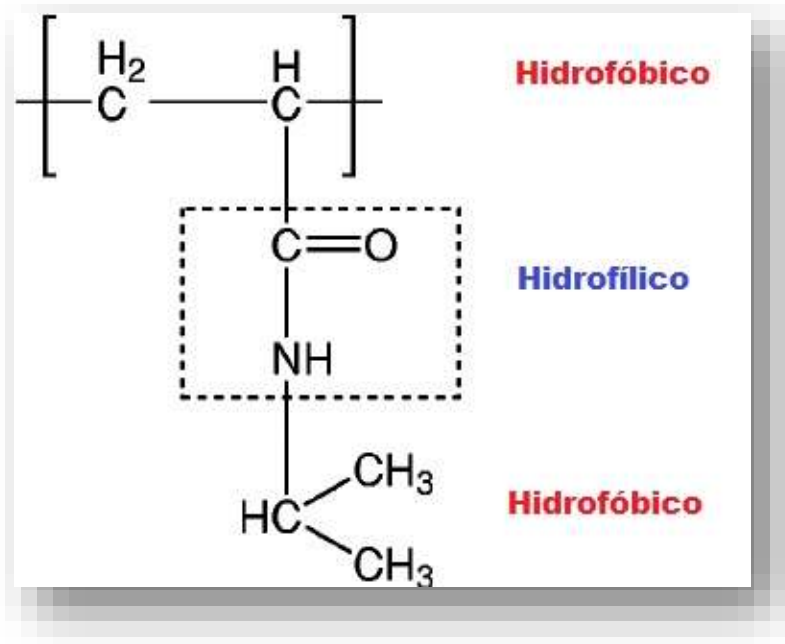


Figura 5. Estructura química de la poli-(isopropilacrilamida).

1.1.1.1.2. Polivinilcaprolactama (PVC)

La polivinilcaprolactama es un polímero (ver estructura en la Figura 6) que tiene una temperatura de transición similar a la PNIPAM, situada en aproximadamente en los 33°C, y aunque no ha sido tan extensamente estudiado como la PNIPAM, tiene un gran potencial de aplicación debido a que presenta el mismo comportamiento termosensible a una temperatura

similar a la del cuerpo humano. Otra de las ventajas de este polímero es que es soluble en solventes orgánicos y agua, es biocompatible y posee una gran capacidad de absorción [13].

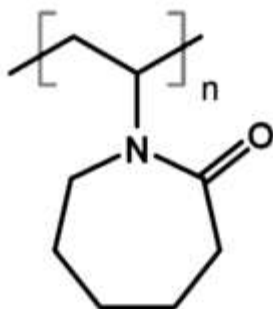


Figura 6. Estructura química de la PVC.

1.1.1.1.3. Poli(metilvinileter) (PMVE)

Este polímero (ver estructura química en la figura 7) tiene una temperatura de transición de 37°C, este valor corresponde con la temperatura fisiológica del cuerpo humano, por lo que tiene un gran potencial de aplicación en áreas biomédicas. El inconveniente de este polímero está en su modo de síntesis, pues tiene que ser sintetizado por polimerización catiónica bajo condiciones inertes, es por esto que no se pueden añadir nucleófilos como alcohol o grupos amino durante la síntesis ya que pudieran resultar en otras especies químicas indeseadas. Esto limita el potencial de aplicación de la PMVE respecto a los disolventes que se pueden usar durante la síntesis, además de la posibilidad de añadir comonómeros para modificar la LCST [14].

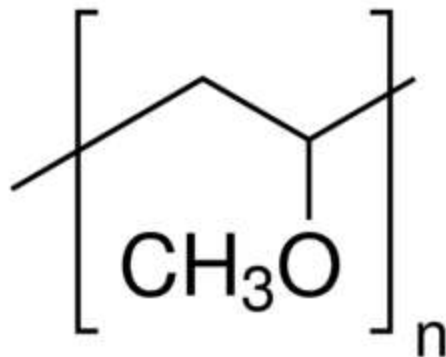


Figura 7. Estructura química del PMVE.

1.1.1.2. Nanomateriales inorgánicos

1.1.1.2.1 Metales nobles

Las nanopartículas de metales nobles han atraído la atención por sus cualidades únicas, incluido su alto coeficiente de extinción molar, lo que significa que absorbe fuertemente la luz aún en concentraciones bajas. Aparte de esto, los metales nobles como la plata se han utilizado desde hace tiempo como antibióticos, incluida su administración por vía tópica en heridas y como antifúngico [15]. El platino también ha sido utilizado como superficie para catalizar reacciones químicas de hidrogenación [16]. Las nanopartículas metálicas tienen gran versatilidad y capacidad de ser modificados en su superficie por funcionalización con especies químicas de interés, que sean biocompatibles para aplicación en biomedicina. Algunas aplicaciones que se han investigado son en imagenología diagnóstica, sensores biológicos y terapias contra el cáncer, ya sea para generar termoablación de tejido dañado o como acarreadores de fármacos [17].

1.1.1.2.2 Nanovarillas de oro

Las nanopartículas de oro presentan propiedades ópticas excepcionales. Fueron reportadas en la literatura científica por primera vez en 1857 por Michael Faraday al formar nanopartículas por la reducción de sal de oro, y atribuyó el color rojo de la solución al estado coloidal de las

partículas de oro [18]. Recientemente las nanopartículas de oro han sido objeto de intensa investigación debido a que una de sus propiedades más interesantes, el plasmón de resonancia localizado en la superficie (LSPR, por sus siglas en inglés). El LSPR es un fenómeno de naturaleza óptica, que radica en la interacción de ondas electromagnéticas de cierta frecuencia y los electrones de la banda de conducción en la superficie de una partícula metálica. Este proceso ocurre si se irradia a las partículas con cierta longitud de onda en la que los electrones de la banda de conducción de las partículas comienzan a oscilar de manera colectiva y relacionada con la red de iones positivos. Cuando los electrones entran en un estado de oscilación colectiva a esta frecuencia, la energía de la luz incidente es absorbida por la estructura, y debido a que el oro tiene un alto coeficiente de extinción molar, esto trae como consecuencia una transducción fototérmica, y por lo tanto se eleva la temperatura de la estructura [19].

El fenómeno de LSPR de las partículas de oro se puede ajustar dependiendo principalmente del tamaño y la forma de la partícula. Este fenómeno se presenta en estructuras tipo NvAu, en estas estructuras metálicas se puede apreciar un plasmón de resonancia transversal y uno longitudinal (como se observa en la Figura 8, las nanopartículas alargadas presentan dos bandas de absorción, que se puede ajustar al variar la relación de aspecto). Es importante tener en cuenta que para aplicaciones biomédicas se tiene que elegir una frecuencia de luz que no sea dañina para los tejidos, y que a su vez pueda penetrar en el tejido para facilitar su uso y que el procedimiento sea menos invasivo. Se sabe que hay una región del espectro electromagnético en la que los tejidos biológicos son mínimamente perjudicados, es la llamada “ventana biológica” [20].

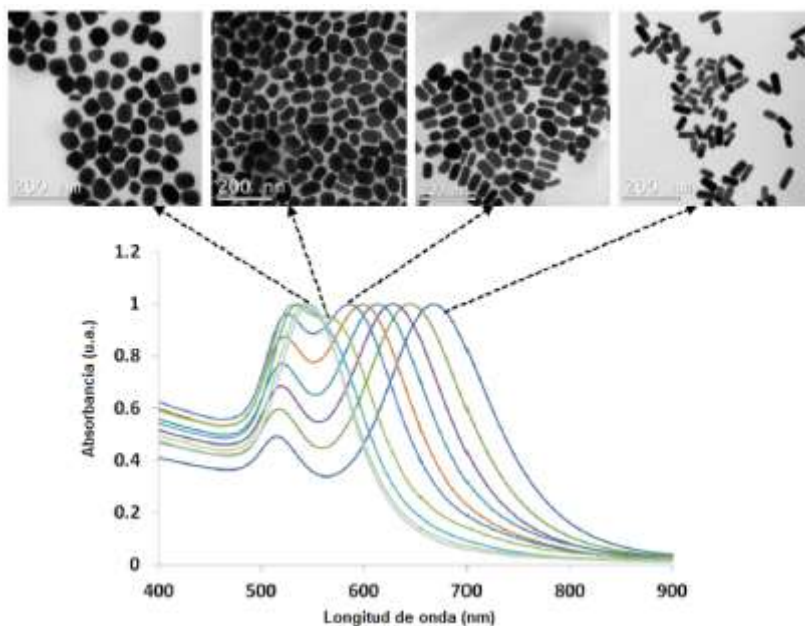


Figura 8. Evolución del plasmón de resonancia superficial de nanoestructuras de oro al variar la relación de aspecto [21].

Esto supone una gran gama de aplicaciones de las NvAu, ya que es posible causar una respuesta del material con solo irradiar con luz de la frecuencia correspondiente al LSPR, el cual se puede ajustar variando el tamaño, forma, composición y funcionalización de la partícula. Además es posible incluir a las NvAu en terapias múltiples aprovechando el calentamiento local para inducir muerte celular y en ciertos casos aprovechar el calentamiento para liberación de fármacos por estímulo térmico [22].

1.1.1.3. Materiales híbridos

El uso de más de un material termosensible de diferente naturaleza y propiedades fisicoquímicas pudiera ser aprovechado en el diseño de nuevas nanoplataformas con objetivos terapéuticos [23]. Las partículas inorgánicas suelen ser menos biocompatibles y hasta presentar cierto grado de toxicidad que limita sus posibles aplicaciones. Es por esto que es recomendable recubrir o encapsular las nanopartículas inorgánicas de manera de favorecer su compatibilidad con el tejido biológico, adicionalmente es posible adornar estas partículas con ligandos o receptores

específicos que mejoren la internalización en el tejido dañado. Entre los materiales inorgánicos que se suelen utilizar se pueden enlistar los metales nobles (oro, plata, platino, paladio) que son aplicados como agentes de terapia fototérmica, los semiconductores (seleniuro de cadmio, óxido de titanio) que se pueden utilizar como agentes de contraste en dispositivos como los puntos cuánticos, y los materiales magnéticos (cobalto, níquel, hierro-cobalto y óxido de hierro) que son sensibles a campos magnéticos [24]. Toda esta gama de nanomateriales pueden ser sintetizados en presencia de los compuestos orgánicos con los cuales se pretende funcionalizar, o bien se puede hacer un intercambio de ligandos si es que las nanopartículas inorgánicas necesitan ser sintetizadas bajo ciertas condiciones específicas que no son las adecuadas para el compuesto funcionalizante [25].

I.1.1.3.1. Sistema PLGA-Magnetita

Las partículas magnéticas tienen gran potencial en nanomedicina, y se ha investigado su aplicación como agentes de separación magnética, hipertermia para tratamiento de tumores, como agente de contraste, y como se ha recalado anteriormente, como partículas acarreadoras de fármaco que pueden ser guiadas bajo un campo magnético [26]. Se ha demostrado que al encapsular las nanopartículas de magnetita se reduce notablemente su toxicidad y se previene la agregación [27]. Dicho esto, uno de los polímeros más usados para recubrimiento de partículas inorgánicas es el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, por sus siglas en inglés), por ser biocompatible y degradarse gradualmente, lo que significa que puede utilizarse para cargar fármacos, y ya que la matriz polimérica se va degradando con el tiempo, el fármaco encapsulado se libera paulatinamente [28]. La estructura química del PLGA es representada en la Figura 9.

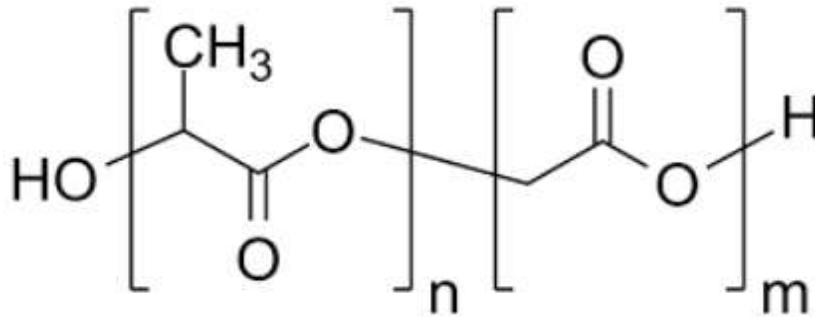


Figura 9. Estructura química del PLGA.

I.1.1.3.2. Sistema quitosano-nanopartículas de oro

Se han reportado en la literatura estructuras formadas por nanopartículas de oro funcionalizadas con quitosano modificado, al cual se le añaden grupos tiol (-SH) que son susceptibles de reaccionar con la superficie de las partículas de oro, adsorbiéndose en estas mediante una interacción química relativamente fuerte. En 2012 Shobhit Charan y col. sintetizaron una nanoplataforma híbrida compuesta de NvAu cubiertos con MUA (ácido 11-mercaptopundecanoico) y ligados covalentemente con quitosano, que posteriormente fueron conjugados con el anticuerpo monoclonal contra EGFR (receptor del factor de crecimiento epidemial), para darle una funcionalidad dirigida hacia la línea celular CAL 27. La nanoplataforma demostró acumulación selectiva, además de elevada biocompatibilidad [29]. En 2014 Anna Regiel-Futyra y col. desarrollaron una nanoplataforma en la que el quitosano fue utilizado como agente reductor y estabilizante para la síntesis de nanopartículas embebidas. Fueron utilizados distintos tipos de quitosano variando el peso molecular y el grado de desacetilación con el objetivo de obtener un nanocomposito con actividad antimicrobiana sin que presentara efectos citotóxicos en células somáticas de mamífero [30].

II. MARCO TEÓRICO

El capítulo en curso servirá como soporte teórico, en este se expondrán los temas básicos y algunas definiciones con las que se habrá de estar familiarizado para comprender en su totalidad el contexto en el que está enmarcado el tema del presente trabajo de tesis.

II.1. Nanociencia y Nanotecnología

La nanotecnología es un campo de estudio muy amplio con pretensiones a aplicaciones prácticas, cuyo principio unificador en donde convergen todas sus ramas es su enfoque al estudio, diseño y caracterización de materiales en la escala de los nanómetros (en la Figura 10 se muestran las ramas de la ciencia y la ingeniería que convergen para el estudio y desarrollo de nuevos materiales en la escala nanométrica). Las principales razones para estudiar la materia en este nivel de tamaño es la modificación del aspecto o relación superficie-volumen, ya que en comparación con agregados más grandes de materia, los objetos que tienen reducido una o varias de sus dimensiones en la nanoescala (por lo general se suele considerar la nanoescala entre los 0.2 nm y 100 nm) tienen mayor área disponible en relación con su volumen, y esto es importante debido a que es en la superficie donde ocurren la mayoría de fenómenos e interacciones.

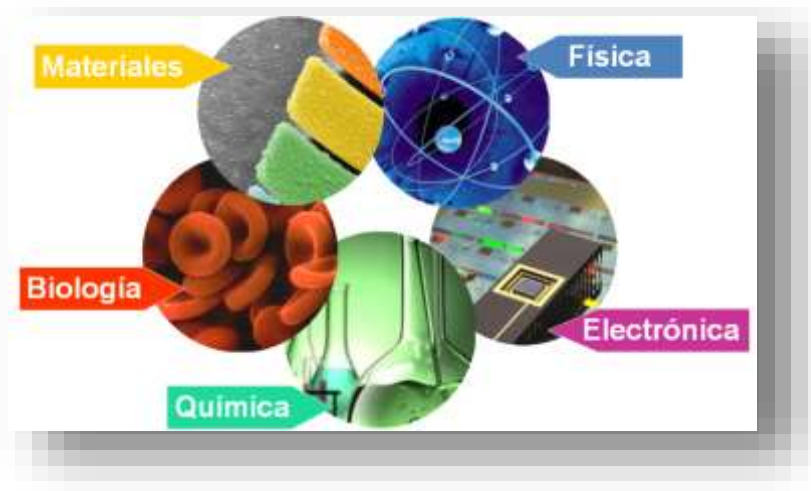


Figura 10. Disciplinas que interactúan sinérgicamente para complementar el estudio de la nanotecnología [31].

Otra de las razones por lo cual es interesante estudiar la materia a esta escala es el predominio o manifestación de efectos cuánticos, en especial los relacionados con las interacciones luz-materia. Se puede considerar a la nanotecnología un enfoque multidisciplinario en el que intervienen varias ramas de la ciencia como la física, química, biología, ciencia de materiales, entre otras. Cada una de estas ramas aporta sus conocimientos para lograr un objetivo en común, siempre teniendo en cuenta, y como principio unificador, la escala de tamaño nanométrica en la cual se trabaja. Entre los productos de utilidad y técnicas que se basan en la aplicación de la nanotecnología se pueden enlistar los siguientes: técnicas de liberación de fármacos, nanopelículas, técnicas de filtración de agua, nanotubos de carbono y transistores a nanoescala [32].

II.2. Nanomateriales, propiedades y síntesis

Aunque por consenso general se define a un nanomaterial como todo aquel que tiene una o varias de sus dimensiones menores a los cien nanómetros, hay ocasiones en las que el material suele exceder estas dimensiones, y seguir manteniendo sus propiedades. Esto sucede en los nanodispositivos híbridos que están compuesto de varios materiales, un ejemplo es el caso de una nanopartícula metálica híbrida, en la que su tamaño sobrepasa las dimensiones consideradas dentro de la nanoescala, pero se toma en cuenta que cada material sigue conservando sus propiedades nanométricas. De este modo, las principales características de los materiales estructurados a nivel nanométrico son su mayor superficie disponible en relación con su volumen y la manifestación de fenómenos cuánticos que dependen de la naturaleza del material precursor, además de la forma y método de síntesis. A pesar de que existen numerosos métodos para sintetizar materiales de distintas formas, tanto para formar puntos cuánticos, películas, nanoalambres, entre otros, esto en realidad depende de la naturaleza del material del que se parte, por lo que es muy distinto para las distintas clasificaciones de materiales. Estos métodos se engloban en dos grandes grupos, el método “top down”, que parte de materiales en bulto para hacer estructuras más pequeñas, y el método “bottom up”, el cual, al contrario, parte de átomos o moléculas para hacer estructuras más grandes (ver Figura 11).

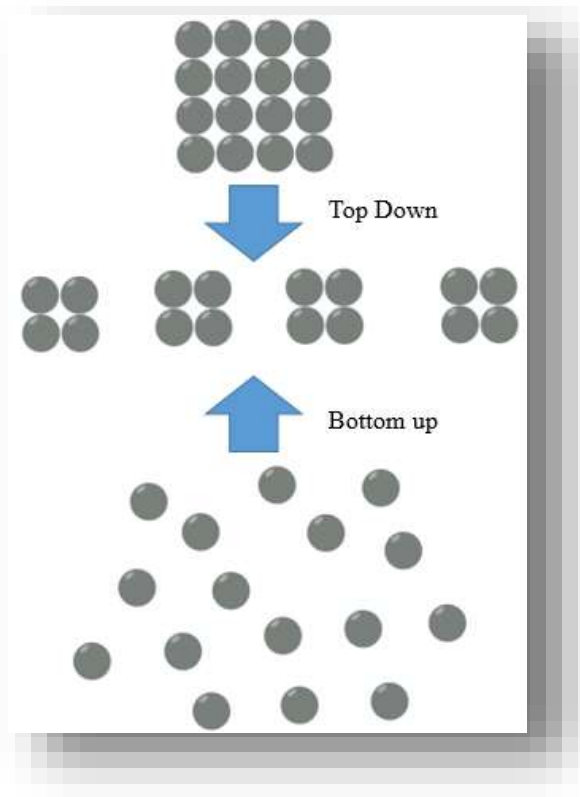


Figura 11. Representación gráfica de las metodologías “Top down” y “Bottom up”.

II.3. Nanomedicina

Uno de los mayores retos de los fármacos aplicados en su forma pura es que estos se dirijan a su tejido blanco sin dañar el tejido sano circundante, que la liberación de este sea controlada, y que estos lleguen a su destino en su forma activa manteniendo sus funciones biológicas. Para remediar estas adversidades el objetivo que la nanomedicina se propone es usar con un nuevo enfoque estos mismos fármacos, de manera que se remedien estos problemas, montándolos en vectores que eviten el deterioro de los fármacos, que respondan de manera sensible a estímulos ambientales y que se liberen de manera controlada solamente en el tejido afectado (en la Figura 12 se representa una nanopartícula multifuncional idealizada). Para esto se propone aprovechar las cualidades que tienen los materiales al reducirse a la escala nanométrica. De los materiales inorgánicos como metales nobles, óxidos metálicos, cerámicas y tierras raras se pueden aprovechar sus propiedades ópticas y magnéticas, ya que en respuesta a un haz de luz incidente

estos pueden absorber y dispersar ondas electromagnéticas, generando efectos muy interesantes que pueden ser utilizados de manera de contraste, como terapia fototérmica, o en el caso de aplicar un campo magnético, guiarlas o inmovilizarlas en el tejido deseado. Los materiales orgánicos, y en especial los polímeros también representan una buena opción como matrices en las que atrapar fármacos, de manera que actúen como redes en las que se puedan transportar hasta llegar al sitio blanco y liberarse por efecto de degradación o cambio estructural debido a estímulos ambientales.

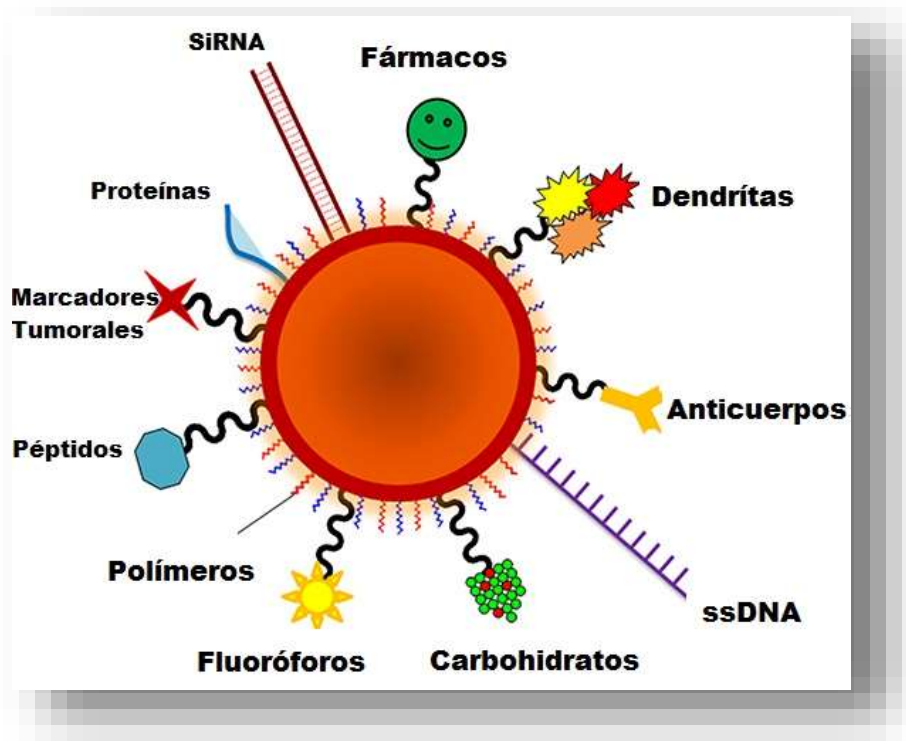


Figura 12. Nanopartícula multifuncional diseñada con fines biomédicos. En su estructura incluye ligandos específicos y fármacos para complementar el tratamiento de enfermedades de forma inteligente [1].

II.4. Clasificación de los materiales utilizados en la nanomedicina.

Como se ha comentado anteriormente en la sección introductoria, los nanomateriales se pueden clasificar según su naturaleza en orgánicos e inorgánicos, dependiendo de si en su estructura presentan cadenas hidrocarbonadas y grupos funcionales propios de moléculas orgánicas, o si estos presentan estructuras cristalinas y enlaces propios de moléculas inorgánicas, tales como metales nobles y cerámicos, estos materiales tienen una gran área de aplicación en aplicaciones de la nanomedicina específicamente en el diseño e ingeniería de nanoplataformas biocompatibles que sean útiles en tareas de carga y liberación controlada de sustancias de interés biológico.

II.4.1. Materiales inorgánicos

Respecto a la síntesis de nanopartículas inorgánicas, estas se procesan de tal manera que se supere la barrera energética de reactividad y difusión lenta, lo cual se logra aplicando la suficiente energía por medio de técnicas como la molienda mecánica y tratamiento térmico o calentamiento. Aunque esto funciona muy bien para materiales en “bulto”, este enfoque por lo general resulta en una alta disparidad de tamaños, esto suele ser poco práctico para el desarrollo de nanopartículas coloidales, más aún cuando se requiere una alta precisión al ajustar parámetros que repercuten directamente en el “nanoeffecto” que se desea manifestar de manera homogénea, tal como el plasmón de resonancia o emisión de ciertas longitudes de onda. Para evitar estas desventajas de los métodos “Top down” se han desarrollado varias metodologías para mejorar la monodispersidad de tamaños y el rendimiento de los reactivos, en estos métodos, denominados “Bottom up”, se suele partir de precursores moleculares y se llevan a cabo bajo condiciones más suaves, generalmente por reducción de sales que cristalizan en una dispersión coloidal [33]. El tamaño y la forma de las partículas se puede manipular variando parámetros como la concentración, el tipo de reductor, el tipo de surfactantes o ligandos utilizados como plantilla, aditivos (como el nitrato de plata en el caso de algunas nanopartículas de oro), el tipo de semilla (en caso de método mediado por semillas), así como la temperatura a la cual se lleva a cabo la síntesis. En su artículo de revisión de 2008, Partha Ghosh y col. resumieron los

métodos para sintetizar nanopartículas de oro, el primero por reducción de $\text{AuCl}(\text{PPh}_3)$ con diborano o borohidruro de sodio, en el cual el recubrimiento es fosfina del trifenilfosfano; con este método se obtienen nanopartículas con un diámetro de 1 a 2 nm. El segundo método es por reducción bifásica de HAuCl_4 por borohidruro de sodio en presencia de agentes de recubrimiento tiolados, con el cual se obtienen nanopartículas de 1.5 a 5 nm de diámetro. El tercer método consiste en la reducción de HAuCl_4 con citrato de sodio en agua, dando tamaños de 10 a 150 nm de diámetro [34].

A pesar del enorme potencial de aplicación de las nanopartículas de oro para fines biomédicos, el posible efecto citotóxico que puedan tener aún permanece en tela de juicio. Aunque el oro sea un metal poco reactivo en ‘bulto’, queda en duda si la reducción de tamaño a una escala nanométrica aumenta la toxicidad, ya sea por efectos de su reactividad o por consecuencias mecánicas. En 2010, Paresh Chandra Ray y col resumieron varias investigaciones que se han hecho al respecto sobre la toxicidad de los nanomateriales, incluyendo también trabajos de su grupo de investigación en el departamento de química de la Jackson State University. Su grupo ha investigado el efecto que tiene el tamaño y la forma de nanopartículas de oro sobre la internalización celular y la toxicidad en queratinocitos HaCaT de piel humana. Al observar bajo el microscopio electrónico de transmisión se encontró que las nanopartículas de oro pueden penetrar fácilmente en el núcleo celular y acumularse en él. Además, hicieron un estudio para corroborar si las bandas de absorción atribuidas al plasmón de resonancia cambiaban a través del tiempo, lo cual se confirmó y se adjudicó a la formación de agregados de las propias nanopartículas de oro [35]. Dentro del mismo artículo se menciona una investigación de Catherine M. Goodman y col. de la Universidad de Massachusetts, en la que examinan el efecto tóxico debido a la funcionalización de partículas de oro con ligandos catiónicos y aniónicos, encontrando que debido al efecto de la carga electrostática, los ligandos catiónicos presentan una mayor toxicidad al interactuar con la superficie de las membranas celulares cargadas negativamente [36]. Por otra parte U. Taylor y col. asocian los efectos citotóxicos de las nanopartículas de oro principalmente al tamaño, al Potencial ζ y a la funcionalización de la superficie. Se menciona que en un estudio realizado en ratones, partículas con un rango de tamaño de 8 a 37 nm indujo que estos enfermaran gravemente y acortó su periodo de vida en 21

días, además se encontró que la funcionalización con citrato y CTAB resultaron ser las más tóxicas [37].

Las nanopartículas de oro exhiben propiedades que son muy diferentes de las de otros materiales, y debido a su eficiente transducción de luz en calor estas pueden utilizarse para erradicar tejido enfermo de una manera específica por medio de ablación térmica, aprovechando este efecto particular por el cual las partículas responden al ser irradiadas con longitudes de onda que corresponden a la banda de absorción que concuerdan con su plasmón de resonancia superficial [38]. Erik C. Dreaden y col. enlistaron algunos de los usos potenciales de las nanopartículas de oro en biomedicina, entre los cuales, además de la ya mencionada terapia fototérmica, menciona su uso potencial como vehículos liberadores de fármaco, argumentando que su gran área superficial es excepcional para anclar fármacos, mejorando la solubilidad y estabilidad, ya que al estar atados a la superficie están menos expuestos a posibles efectos de degradación. Otra ventaja es que se pueden funcionalizar con ligandos específicos, aumentando la especificidad y evitando efectos adversos en tejido sano. También se menciona que la funcionalización con múltiples ligandos permite interacciones multivalentes con receptores de membrana otras biomoléculas, además, se ha demostrado que las nanopartículas de oro se acumulan preferentemente en tejido tumoral por efecto de la angiogénesis [39]. El LSPR es entonces resultado de la interacción los fotones del haz de luz incidente y los electrones localizados en la superficie de la nanopartícula, que se mueven en la banda de conducción. Esta interacción entre la luz y los electrones superficiales provoca que estos oscilen colectivamente de forma coherente, y esta energía luego es transmitida a la red cristalina provocando movimiento vibracional y por lo tanto el calentamiento de la estructura. La frecuencia a la cual resuenan los electrones en la capa de conducción depende de factores tales como el material del que está compuesto la nanopartícula, el tamaño, la forma, el ambiente que la rodea y la separación que hay entre las partículas [40]. El LSPR es objeto de estudio de la plasmónica, disciplina que se encarga de estudiar este tipo de interacciones entre la luz y la materia, los efectos que se derivan de este fenómeno han conllevado a un esfuerzo colectivo para investigar una vasta gama de aplicaciones en espectroscopia de superficie, sensores químicos y biológicos, y fabricación de objetos por litografía [36–40].

II.4.1.1. Nanoesferas

Las nanopartículas de forma esférica son las primeras en haberse sintetizado, siendo Turkevich y col. en 1951 quien desarrollo un método simple utilizando citrato de sodio como agente reductor [22]. Respecto a las propiedades plasmónicas de las nanoesferas de oro se puede decir que los dos principales parámetros que afectan su LSPR son, primero, la constante dieléctrica del medio dispersante, y segundo, el tamaño de la nanopartícula o diámetro. Cuanto más grande el diámetro, la frecuencia máxima de la banda de absorción del LSPR presenta un corrimiento hacia el rojo. De igual manera, cuando las nanopartículas se juntan para formar agregados más grandes se recorre la banda de absorción del LSPR hacia la región infrarroja [22]. En comparación con otras formas, la morfología esférica presenta ventajas tales como métodos de síntesis fáciles de dominar, al igual que sus métodos de funcionalización. Los métodos de síntesis han mejorado tanto que es posible obtener nanoesferas de oro con un índice de monodispersidad excepcional por el método de reducción con citrato. El rango de tamaño puede ser ajustado variando la concentración de citrato de sodio, desde un par hasta cientos de nanómetros [46]. El rango de absorción del LSPR para las nanoesferas de oro es de 510 nm a los 550 nm. La anchura del pico o banda de absorción indica la distribución de tamaños que se encuentra en la muestra [18].

II.4.1.2. Nanovarillas de oro

Como se mencionó anteriormente, aunque las nanopartículas de metales nobles como el oro manifiestan el fenómeno de LSPR, se busca que la banda de absorción se restrinja a una frecuencia tal que no dañe los tejidos biológicos, mientras que la partícula siga mostrando una eficiente transducción fototérmica. De igual manera se mencionó que algunas de las maneras de ajustar la banda de absorción del LSPR mediante la variación del tamaño y la forma de la partícula.

Se pueden resumir tres métodos principales para la síntesis de $NvAu$: el método de plantilla, el método electroquímico y el método mediado por semillas. El método de plantilla se basa en la deposición electroquímica del oro dentro de plantillas porosas compuestas de alúmina o de

policarbonato. Después de la deposición la plantilla de alúmina es disuelta con un estabilizador polimérico. Por último, las $NvAu$ son dispersadas en un disolvente orgánico. Evidentemente el diámetro de las nanopartículas sintetizadas por medio de este método coincide con el diámetro de poro de la plantilla de alúmina [47]. En el método electroquímico, el metal comienza a oxidarse en el ánodo, mientras que los cationes del metal se desplazan hacia el cátodo, en el proceso, la reducción toma lugar con la formación de nanopartículas en presencia de un surfactante o agente estabilizador [48]. A pesar de haber muchos otros métodos, el más utilizado sigue siendo el método mediado por semillas. La técnica se utiliza pequeñas semillas de cristales de oro de entre 2 a 5 nm de diámetro que son sintetizados a partir de $HAuCl_4$ como precursor, en exceso de un reductor fuerte como el $NaBH_4$ para promover el crecimiento isotrópico de pequeñas partículas. Estas estructuras actuarán como semillas serán añadidas seguidamente a la solución de crecimiento, que consta de igual manera del precursor $HAuCl_4$, un agente reductor débil (ácido ascórbico), además de un agente que actúe como plantilla para guiar el crecimiento anisotrópico, que por lo general es un surfactante catiónico como el CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), el cual se sabe que forma micelas de formas tubulares. Para el método mediado por semillas se utilizan comúnmente aditivos para añadir el ion plata a la solución, este se cree que actúa adsorbiéndose preferentemente en las facetas $\{110\}$ de las partículas de oro, llevando a un crecimiento relativamente rápido de otras facetas lo cual promueve un crecimiento anisotrópico. Por otro lado, en ausencia de iones de plata el surfactante es el que juega un papel adsorbiéndose diferencialmente en las facetas cristalinas. La adsorción preferencial del surfactante ocurre en las caras $\{100\}$ y $\{110\}$, lo que bloquea el crecimiento en esas facetas mientras permite el aumento de la cara $\{111\}$ [49].

Es mediante la variación de la relación de reactivos, concentraciones y parámetros físicos de síntesis que se logra guiar a las nanopartículas a crecer de forma anisotrópica. Las formas anisotrópicas como es el caso de las $NvAu$, presentan características plasmónicas únicas en comparación con las formas esféricas, ya que ofrecen dos bandas de absorción para su LSPR, una correspondiente a modo transversal, asociado con la oscilación de los electrones en la dirección transversal, y otro modo longitudinal, asociado al movimiento oscilatorio de los electrones a lo largo del eje de la nanopartícula. La longitud de onda correspondiente a la banda

de absorción del LSPR longitudinal se puede ajustar a lo largo de un amplio espectro, cubriendo desde la región visible hasta la región cercana al infrarrojo (NIR) [50]. Esta característica convierte a los nanovarillas en una de las formas más convenientes para aplicaciones biomédicas, ya que se busca que al irradiar a las partículas las longitudes de onda incidentes estén en el rango conocido como la “ventana biológica”, que es donde la hemoglobina y el agua presentan mínimos de absorción, esta región se encuentra entre los 650 nm y los 900 nm [20].

II.4.1.3. Otras formas de nanopartículas de oro

Existen otro tipo de estructuras además de las ya descritas anteriormente, que, aunque no son tan fáciles de sintetizar y sus parámetros de síntesis no están bien definidos, éstas presentan características que las hacen particularmente interesantes por sus propiedades plasmónicas y geométricas. Uno de estos arreglos que se han logrado sintetizar son las nanocorazas, que son partículas esféricas constituidas de un centro dieléctrico cubierto de una fina capa de oro. Por sus propiedades ópticas, sus campos de aplicación son imagenología óptica en biomedicina, fluorescencia mejorada de moléculas emisoras débiles, aplicaciones en terapéutica, SERS y espectroscopia de absorción infrarroja mejorada [18]. La longitud de onda del LSPR de las nanocorazas de oro puede controlarse a lo largo de un amplio rango que cubre desde una porción de la región visible hasta el espectro cercano al infrarrojo entre los 700 nm y 1100 nm, esto simplemente variando el tamaño o la proporción relativa entre la capa interna y la externa [51]. Uno de los inconvenientes de las nanocorazas es que con los métodos de síntesis existentes solo se han logrado sintetizar tamaños de partícula de entre 80 nm y 150 nm de diámetro, lo cual reduce sus posibilidades de aplicación médica ya que partículas dentro de ese rango son captadas por el sistema retículo endotelial, y su difusión está limitada dentro del tejido [38]. Otro tipo de estructura que se puede formar son las nanocajas, estas constan de estructuras huecas y porosas. La banda de absorción LSPR de las nanocajas puede ser recorrida hacia la región cercana al infrarrojo controlando el grosor y la porosidad de la estructura. Ya que son estructuras huecas se puede aprovechar ese espacio para almacenar otras partículas de diferente naturaleza en su interior, esto para desarrollar nanoplateformas multifuncionales híbridas, además es posible funcionalizar con ligandos en el exterior y poder cargar fármacos dentro de estas [19]. La banda

de absorción que corresponde al LSPR puede cubrir el rango desde los 500 nm a los 1200 nm [18].

II.4.2. Nanopartículas Orgánicas

Las partículas orgánicas son aquellas que están compuestas de precursores que contienen en su estructura principal cadenas hidrocarbonadas, que principalmente suelen ser polímeros o estructuras lipídicas, éstas se unen para formar partículas sólidas. A diferencia de las nanopartículas inorgánicas los coloides orgánicos presentan un carácter más dinámico en su estructura, esto favorecido por sus fuerzas de interacción intermoleculares que resultan ser débiles en comparación con los materiales inorgánicos y que participan principalmente en la estabilidad coloidal [52].

Las nanopartículas se pueden dividir en dos grandes grupos principales en función de su estructura, estos son nanoesferas y nanocápsulas. La estructura de las nanoesferas se compone de una red sólida de densidad relativamente homogénea, mientras que las nanocápsulas están compuestas de un centro hueco rodeado por una pared o coraza de material sólido orgánico. Aunque por lo general dominan las formas esféricas o semiesféricas, también se pueden encontrar geometrías no esféricas, tales como tubos o estructuras ramificadas [53]. Al igual que las partículas inorgánicas, se han desarrollado varios métodos para la síntesis de nanopartículas orgánicas, que recaen bajo la misma clasificación, los métodos “Top Down”, también denominados de alta energía, y los métodos “Bottom up”, llamados de baja energía, algunos de estos métodos son la precipitación por antisolvente, el autoensamblaje, coacervación, microemulsión y nanoemulsión, y métodos mediados por plantilla [54].

II.4.2.1. Micelas y liposomas

Las micelas y los liposomas son estructuras cuyos bloques de construcción o monómeros son moléculas anfifílicas, es decir, moléculas que están constituidas de una sección hidrofílica (cabeza), esto quiere decir que es soluble al agua, y otra sección hidrofóbica (cadena) que

permanece insoluble en agua (en la Figura 13 se muestra la estructura de los monómeros, con las cadenas amarillas representando las secciones hidrofóbicas, además se pueden apreciar las estructuras que forman al estar en solución acuosa). Esto puede explicarse por la polaridad de cargas que presentan estas secciones. La principal diferencia estructural es que las micelas se componen de una monocapa de moléculas anfifílicas dispuestas esféricamente, quedando los grupos polares hidrofílicos en contacto con el agua y los grupos no polares hidrofóbicos aislados en el interior. Mientras que los liposomas están constituidos de una doble capa, pudiendo encerrar moléculas hidrosolubles en su interior [47, 48, 50, 51].

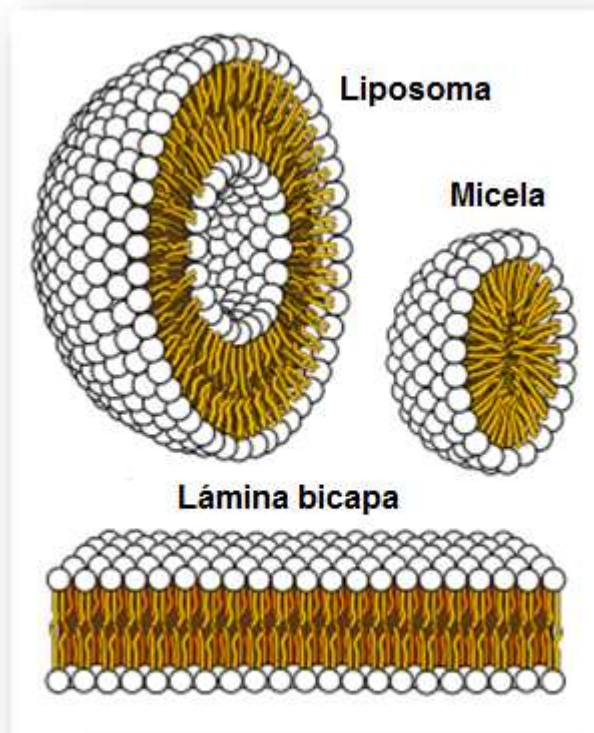


Figura 13. Estructura de un liposoma con doble capa lipídica, una micela y una lámina de doble capa lipídica [57].

II.4.2.2. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas que se construyen a partir de segmentos pequeños y repetidos llamados monómeros, la estructura química de estas moléculas puede dar lugar a mecanismos físicos como formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals o dominios donde prevalecen las interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas. Según su método de síntesis pueden estar compuestos de un solo tipo de monómero, o bien pueden copolimerizarse con otros monómeros diferentes, en cuyo caso estos se disponen de diferentes maneras, ya sea de manera alternada, aleatoria, o en bloques. Según su estructura los polímeros también se pueden clasificar en lineales, cuando se conforman de una sola cadena sin grupos adyacentes; en ramificados, cuando la cadena de polímero presenta cadenas que derivan de la cadena principal; y en entrecruzados, cuando varias cadenas de polímero son unidas mediante un agente entrecruzante y se disponen en forma de una red o matriz. Cabe destacar que los copolímeros de bloque pueden formar micelas si uno de sus bloques es polar hidrofílico y el otro no polar hidrofóbico.

Las nanopartículas poliméricas pueden ser sintetizadas directamente por la reacción propagativa de sus monómeros por medio de diferentes técnicas, como microemulsión, nanoemulsión, emulsión libre de surfactante y polimerización en interface. El método de polimerización depende varios factores como el tipo de sistema polimérico que se requiere obtener, el área de aplicación de la nanopartícula, requerimientos de tamaño, entre otros factores. Para ejemplificar esto, una nanopartícula polimérica que se piensa utilizar con fines biomédicos, en la industria alimenticia o agricultura requiere que estén libres de cualquier aditivo o reactivos como surfactantes y solventes orgánicos [58]. A pesar de que las nanopartículas poliméricas presentan varias ventajas para ser usadas en biomedicina, para el desarrollo de nanopartículas terapéuticas que funcionen de modo inteligente para tratamientos personalizados, explotando métodos de funcionalización con ligandos y utilizándolas para la encapsulación y liberación de fármacos; actualmente solo hay un pequeño número de tratamientos basados en nanopartículas poliméricas aprobados por la FDA (Food and Drug Administration). Aun se requieren muchos estudios para entender todos los factores que afectan su aplicación clínica, como la toxicidad, métodos de

síntesis reproducibles a gran escala, biodistribución, estudios preclínicos en humanos y adecuados métodos de caracterización y estandarización [4, 53].

II.4.2.2.1. Polímeros naturales

Debido a su actividad biológica los seres vivos siempre están sintetizando nuevo material, ya sea en forma de tejido, secreciones y metabolitos secundarios, por lo que se genera una cantidad considerable de materia, incluyendo entre esta una gran cantidad de monómeros y polímeros que pueden aprovecharse sin necesidad de tener que sintetizarse en un laboratorio. La selección natural que se ha llevado a cabo durante un amplio período de tiempo ha conllevado a la evolución de una gran variedad de biopolímeros y sus arreglos estructurales que se sintetizan en los seres vivos. Algunos de estos biopolímeros se han explotado a lo largo de la historia sin modificación alguna, siendo la celulosa un perfecto ejemplo de esto, además del algodón y otros ensamblajes poliméricos como la madera, corcho y de origen animal como la piel [60]. Actualmente es común modificar los polímeros para aprovecharlos mejorando sus propiedades para darle más solubilidad, mejorar sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas. Es por esto que los polímeros naturales o derivados de monómeros naturales ofrecen cualidades excepcionales, debido a que están sintetizados por los organismos, y muchas veces son de bajo costo ya que normalmente se clasifican como desperdicio de la industria. Las nanopartículas derivadas de polímeros naturales se pueden elaborar básicamente de tres maneras. La primera, cuando el monómero es polimerizado durante el proceso de preparación, para eventualmente formar la nanopartícula. La segunda, un polímero insoluble es tratado con un proceso físico, resultando en la formación de nanopartículas. Y el tercer proceso de elaboración ocurre cuando un polímero soluble es entrecruzado por medio de un agente químico, formando una matriz polimérica [61].

II.4.2.2.1.1. Celulosa

Las propiedades físicas, durabilidad y uniformidad estructural que es requerida para elaborar materiales de alta calidad actualmente no pueden lograrse con el uso de celulosa sin un procesamiento adecuado. Es por eso que se han desarrollado nanopartículas a base de celulosa, ya que de esta manera se pueden remover la mayoría de los defectos asociados con la estructura normal de la celulosa. Las nanopartículas de celulosa son un material biopolímero que tiene un gran potencial de uso en la industria, y es que por su constitución, la celulosa cristalina tiene un buen módulo de elasticidad axial mejor que el Kevlar [62].

La primera etapa para la preparación de partículas de celulosa en la purificación y homogenización, esta primera etapa depende enormemente de la fuente de celulosa. La segunda etapa consiste en la separación de la celulosa ya purificada en sus componentes cristalinos y microfibrillas. Existen varios métodos para aislar partículas de celulosa, pero los más importantes son el tratamiento mecánico y la hidrólisis ácida. El tratamiento mecánico consiste en homogenización por altas presiones, molienda y refinación, criofractura, tratamiento ultrasónico de alta intensidad, y microfluídica. En la hidrólisis ácida, la celulosa purificada es mezclada con agua desionizada con una concentración determinada de ácido, típicamente ácido sulfúrico. Después de reaccionar por un cierto tiempo, la mezcla es diluida con agua desionizada para detener la reacción. La mezcla luego se somete a una serie de pasos de lavados, purificación y separación, por medio de centrifugaciones y filtración por diálisis con agua desionizada para remover el ácido que todavía pueda estar presente. Finalmente se puede separar el tamaño de partícula deseado mediante otra centrifugación y filtración para remover aglomerados más grandes, mientras se usan tratamientos ultrasónicos para facilitar la separación y dispersar las partículas y agregados.

II.4.2.2.1.2. Quitosano

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes (es el segundo después de la celulosa) e importantes en la naturaleza porque es un constituyente estructural de los organismos. Se

encuentra principalmente en los artrópodos, hongos y nematodos. En los insectos, tiene una función de dar dureza y soporte a la cutícula. Es por esto que los insectos producen insistentemente enzimas relacionadas a su síntesis y degradación en diferentes tejidos, esto con el objetivo de mudar su exoesqueleto para seguir en crecimiento [63].

Con el objetivo de aprovechar la quitina y mejorar su solubilidad esta se procesa para dar lugar al quitosano, un derivado de la desacetilación de la quitina, que en rangos comerciales tiene un porcentaje de desacetilación que va desde el 60% al 100%. La molécula de quitosano es un copolímero que está compuesto por monómeros de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (estructura en Figura 14). Es un polímero policationico que tiene un grupo amino y dos grupos hidroxilo en sus monómeros de D-glucosamina. Es muy parecido a la celulosa excepto por el grupo acetilamina que remplaza al grupo hidroxilo en la posición del segundo carbono [58, 59].

La principal fuente comercial de quitina son los exoesqueletos de desecho del camarón, langostas y cangrejos. Varios millones de toneladas de quitina son recolectados anualmente en el mundo, por lo que este biopolímero representa un recurso barato y disponible que se desaprovecharía de otra manera. El quitosano se obtiene al darle un tratamiento termoquímico a la quitina en un medio alcalino, lo que promueve la desacetilación. Se han desarrollado varios métodos para este proceso, en la mayoría se utiliza hidróxido de sodio e hidróxido de potasio para facilitar la hidrólisis del grupo acetil. Por ejemplo, el tratamiento de quitina en una solución acuosa de hidróxido de sodio 40-45% peso en volumen a 90-120°C por 4-5 horas da como resultado la desacetilación de la quitina. Variando las condiciones se puede controlar el peso molecular y el grado de desacetilación [66]. A pesar de que la quitina se considera como insoluble, el quitosano es soluble en soluciones ácidas diluidas con un pH por debajo de 6.0, esto debido a la presencia de los grupos amino, lo que altera la carga neta del polímero y sus propiedades en general, convirtiéndolo en un polímero polielectrolito cationico soluble en agua (en la Figura 14 se representa la protonación del quitosano en soluciones ácidas). Por lo que se puede resumir que, a valores de pH bajos o ácidos, los grupos amino del quitosano se protonan debido al exceso de iones hidronio y al par de electrones libre del grupo amino. El quitosano responde a esto solubilizándose en agua, ya que las cadenas obtienen una carga neta, lo que tiende a separar las cadenas, además de que se facilita la formación de puentes de hidrógeno [60, 61].

También se han desarrollado metodologías para sintetizar nanopartículas de quitosano por el método de gelificación iónica utilizando un entrecruzante. Recientemente el quitosano de bajo peso molecular se ha usado para la síntesis de nanopartículas que han mostrado un gran potencial de aplicación como vectores poliméricos acarreadores de fármacos y como dispositivos en la liberación de genes, esto debido a su fácil posibilidad de modificación en el grupo amino y que se pueden encapsular moléculas en la entreverada red de su matriz polimérica [62–66].

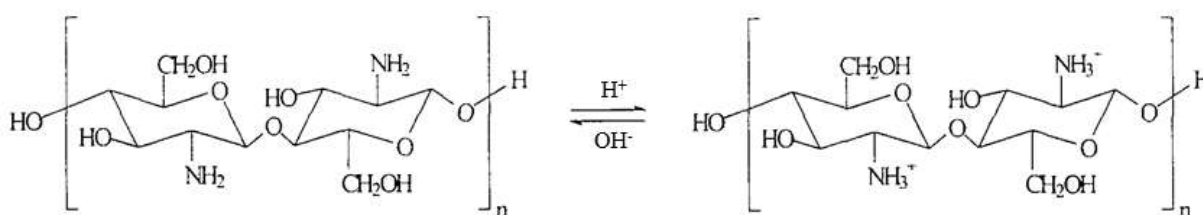


Figura 14. Protonación del quitosano en medio ácido [73].

II.4.2.2.2. Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos son aquellos conformados a partir de monómeros obtenidos por rutas químicas por vías sintéticas y polimerizados en el laboratorio, por lo que son obtenidos de forma artificial. Existe un gran número de polímeros disponibles y tienen la ventaja de que se pueden modificar sus propiedades físicas y químicas con el objetivo de poder usarlos para fines biomédicos. Los polímeros sintéticos pueden enlazarse con biomacromoléculas específicas que sirven para guiar a las nanopartículas hacia tejidos específicos [74].

II.4.2.2.2.1. PNIPAM (*Poli(N-isopropilacrilamida)*)

El PNIPAM es uno de los polímeros que responden a la temperatura más ampliamente estudiados en la actualidad, esto porque exhibe una transición de fase inducida por la temperatura cuando se encuentra en solución acuosa, cuando está por encima de la LCST, debido a que el polímero contiene en su estructura grupos hidrofílicos (grupos amida) y grupos

hidrofóbicos (isopropil) en su cadena. Con una variación de la temperatura el polímero se somete cambio de fase-volumen, por debajo de esa temperatura el hidrogel está hinchado y absorbe una cantidad significativa de agua, mientras que por encima cierta temperatura la matriz de polímero colapsa y libera abruptamente el agua libre del control de los puentes de hidrógeno [7]. Cuando la PNIPAM se copolimeriza con monómeros hidrofílicos o hidrofóbicos, la temperatura de transición del LCST se puede desplazar hacia valores más altos o más bajos respectivamente [8]. Las partículas de PNIPAM absorben agua a temperatura ambiente debido a que estas moléculas se acomodan alrededor de los grupos amida por medio de puentes de hidrógeno. Cuando la temperatura incrementa por encima de la LCST, el movimiento de las moléculas como consecuencia de la temperatura interrumpe y desfavorece estos enlaces de hidrógeno y conlleva a la disociación de las estructuras de moléculas de agua formadas alrededor de las cadenas de PNIPAM, esto provoca que dominen las interacciones hidrofóbicas entre los grupos isopropil y tiene como consecuencia la deshidratación parcial de la estructura polimérica del hidrogel de PNIPAM [69–73].

La polimerización vía radicales libres de la PNIPAM implica la disociación de las moléculas del iniciador persulfato de amonio en dos radicales (ver figura 15) que atacan al monómero N-isopropil acrilamida, provocando una ruptura homolítica de su doble enlace que inicia una reacción en cadena con otras moléculas de monómero. El entrecruzante queda unido covalentemente (ver figura 16) entreverado entre las cadenas principales, formando una red de polímero [79].

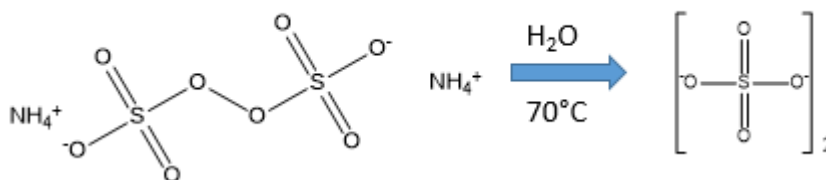


Figura 15. Disociación del persulfato de amonio.

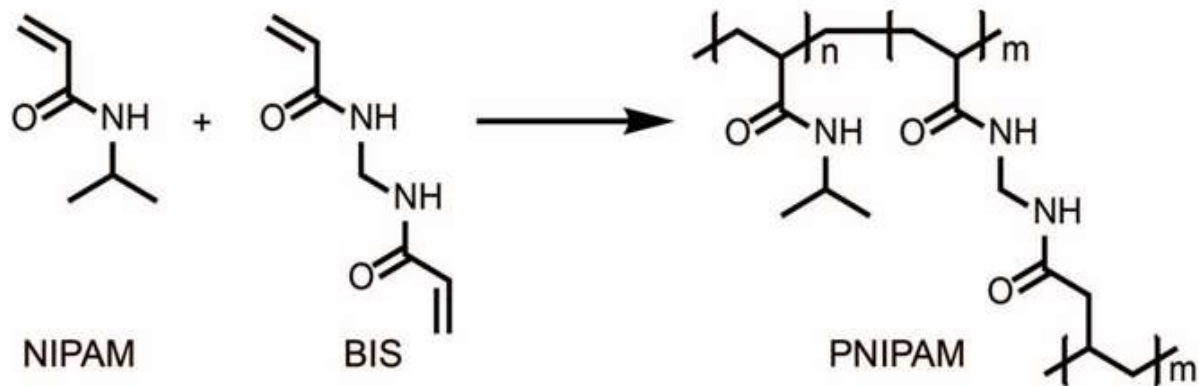


Figura 16. Polimerización de la N-isopropil acrilamida con el entrecruzante.

II.4.3. Materiales híbridos en la carga y liberación de fármacos

Cuando se diseñan nano Plataformas híbridas como acarreadores de fármacos, es común incluir materiales que respondan a un estímulo externo o a un cambio ambiental, es por eso que se emplean polímeros que sean sensibles al pH, potencial redox, temperatura o a biomoléculas específicas. En todos los casos el estímulo aplicado conlleva a un cambio físico (cambio estructural) o químico (degradación, disociación de enlaces) en el material, lo que provoca la liberación del fármaco [75–77].

III. JUSTIFICACIÓN

Dado los efectos colaterales de los fármacos administrados en forma pura, aunado a la inespecificidad y poco control en la liberación, es necesario desarrollar vectores eficientes y específicos para la entrega de fármacos de manera controlada y dirigida que respondan de forma inteligente a estímulos físicos y químicos.

IV. HIPÓTESIS

Se prevé que el grupo tiol del quitosano interactúe y se quimisorba en la superficie de los NvAu, mientras que el PNIPAM quedará atado a la superficie. Los polímeros de la nanoplataforma mantendrán sus propiedades de sensibilidad al pH y temperatura, mientras que los NvAu mantendrán sus bandas de absorción características.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Sintetizar nanoplataformas híbridas con un centro de NvAu funcionalizadas con quitosano tiolado adsorbido en la superficie, y recubiertas de PNIPAM, que sean sensibles y capaces de responder de manera significativa al pH y a la temperatura.

V.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar NvAu.
2. Sintetizar quitosano tiolado.
3. Adsorber el quitosano tiolado en la superficie de las NvAu.
4. Sintetizar nanopartículas de PNIPAM e incorporar las nanovarillas ya funcionalizadas de manera que quede una doble capa de polímero PNIPAM y Quitosano tiolado recubriendo a las NvAu.

5. Evaluar la capacidad de atrapamiento de Cis-Platino en la nanoplataforma.
6. Caracterizar la nanopartícula por las técnicas espectroscópicas de UV-Vis y FT-IR, además de las técnicas de Dispersión de luz dinámica (DLD) y Potencial ζ para conocer el radio hidrodinámico y la carga superficial.
7. Caracterizar la morfología de las muestras por medio de las técnicas de Microscopia de fuerza atómica (MFA) y Microscopia electrónica de barrido (MEB).

VI. METODOLOGÍA

En la Figura 17 se presenta el diseño de la nanoplataforma híbrida. Tomando en cuenta que en un principio las NvAu están recubiertas con el surfactante CTAB, es necesario hacer un intercambio de ligandos para que el quitosano quede adsorbido en la superficie. Seguidamente se sintetiza el PNIPAM en presencia de las nanovarillas recubiertas con quitosano tiolado.

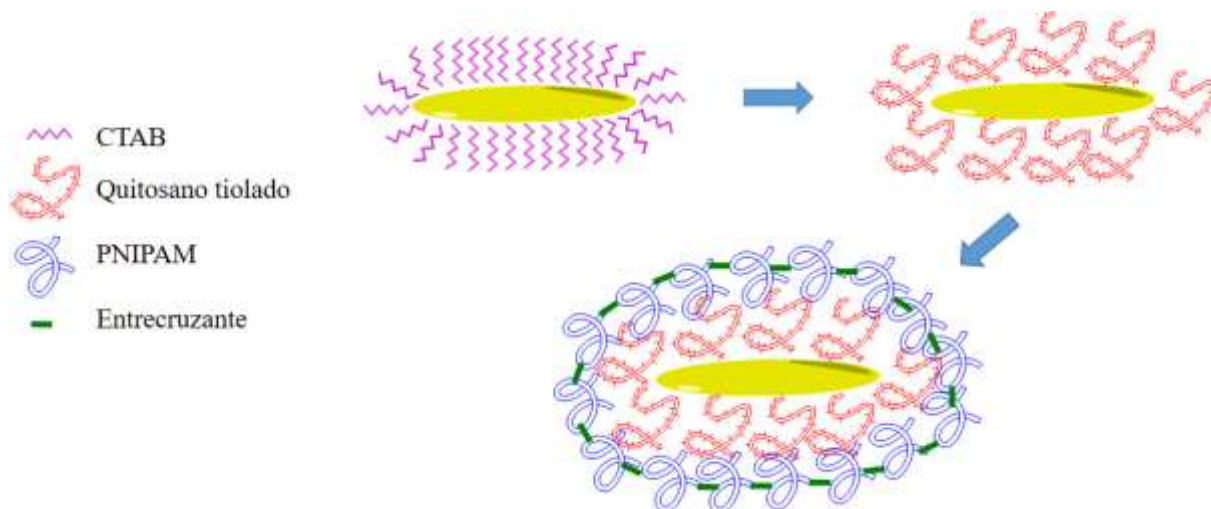


Figura 17. Diseño de la nanoplataforma y diagrama de flujo de síntesis.

VI.1. Síntesis de nanovarillas de oro

Para llevar a cabo la síntesis de NvAu, lo primero es hacer la solución de semillas de la cual partir para posteriormente crecer las semillas de manera anisotrópica. La solución de semillas consta de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) como precursor, y CTAB como estabilizante y plantilla suave para facilitar el crecimiento en forma tubular. Para esta solución se utiliza un reductor fuerte que conlleva a un crecimiento acelerado de las partículas. Ya que se tiene la solución de semillas se procede a elaborar la solución de crecimiento, esta se prepara partiendo de HAuCl_4 como precursor e igualmente CTAB como estabilizante y como plantilla, además de esto se agrega nitrato de plata (AgNO_3) el cual se adsorbe preferentemente a ciertas facetas cristalinas lo cual actúa guiando el crecimiento anisotrópico deseado. Por último, se juntan las

soluciones de crecimiento y de semillas para dar lugar a la formación de NvAu. En la Figura 18 se muestra un diagrama de flujo general del proceso de síntesis.

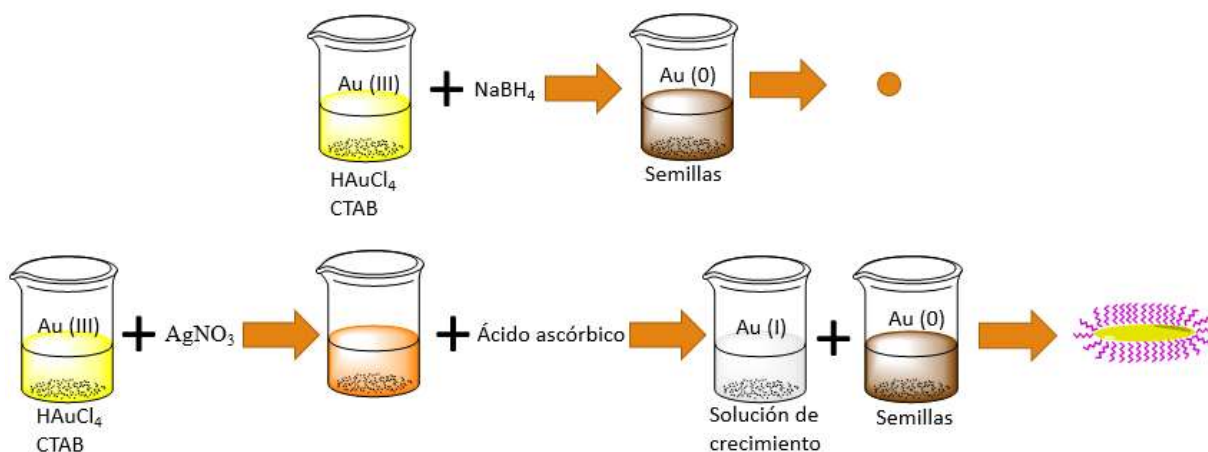


Figura 18. Diagrama de flujo para la síntesis de NvAu.

VI.2. Síntesis de quitosano tiolado

En la figura 19 se presenta el diagrama de flujo que se siguió para la síntesis del quitosano tiolado. Para esto se utilizó el precursor del grupo tiol ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA), y se dejó en agitación durante tres horas con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), que se usó como agente activante del grupo carboxilo del 3-MPA. Posteriormente se añadió N-hidroxisuccimida, y se dejó en agitación por 30 minutos. Se añadió una solución de quitosano 5% y se ajustó el pH a 5.5 para después dejarlo en agitación durante 12 horas. Se precipitó el quitosano de la solución mediante la alcalinización del medio con hidróxido de sodio, se centrifugó y se liofilizó la muestra para después pulverizarla en un mortero.

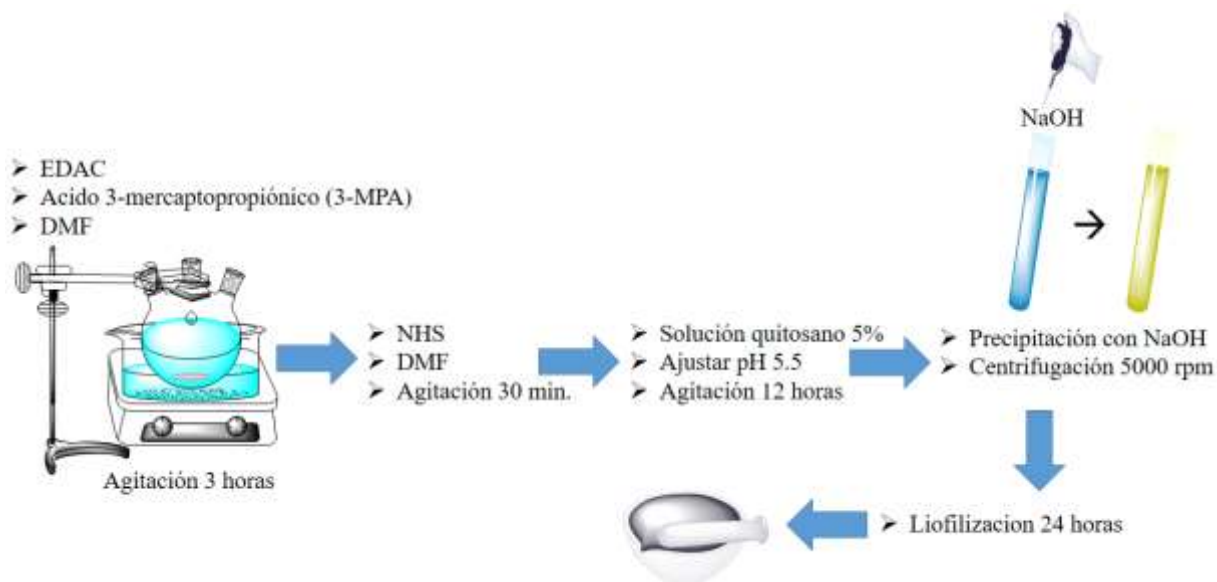


Figura 19. Diagrama de flujo para la síntesis de quitosano tiolado.

VI.3. Funcionalización de nanovarillas de oro con quitosano tiolado

Dado a que la síntesis de NvAu implica el uso de CTAB como estabilizador coloidal y como una plantilla suave para guiar el crecimiento anisotrópico, lo ideal es removerlo ya que se sabe que presenta cierta toxicidad que es indeseable al momento de sintetizar nanoplateformas que están diseñadas para acarrear fármacos dentro del organismo. Al momento de remover el CTAB es necesario sustituirlos por otro estabilizante con carga suficiente para que las nanopartículas se repelan entre si y estas no formen agregados más grandes. Dentro del gran abanico de opciones se eligió el quitosano ya que es extensa la literatura que lo expone como un polímero altamente biocompatible, además de fácilmente modificable haciendo reaccionar su grupo funcional amino.

Para llevar a cabo la remoción del estabilizante CTAB, las NvAu fueron dializados en una membrana de diálisis Spectra/Por Dialysis Membrane® junto con una solución de quitosano tiolado 1mg/mL (previamente disuelto durante una hora en ácido acético al 1%) durante 24 horas realizando 4 recambios de agua, la membrana de diálisis fue sellada mediante dos sujetadores de grapa, mientras que la membrana se mantuvo bajo agitación constante dentro de

un vaso de precipitados de un litro, encima de una placa para proveer agitación magnética (Figura 20).

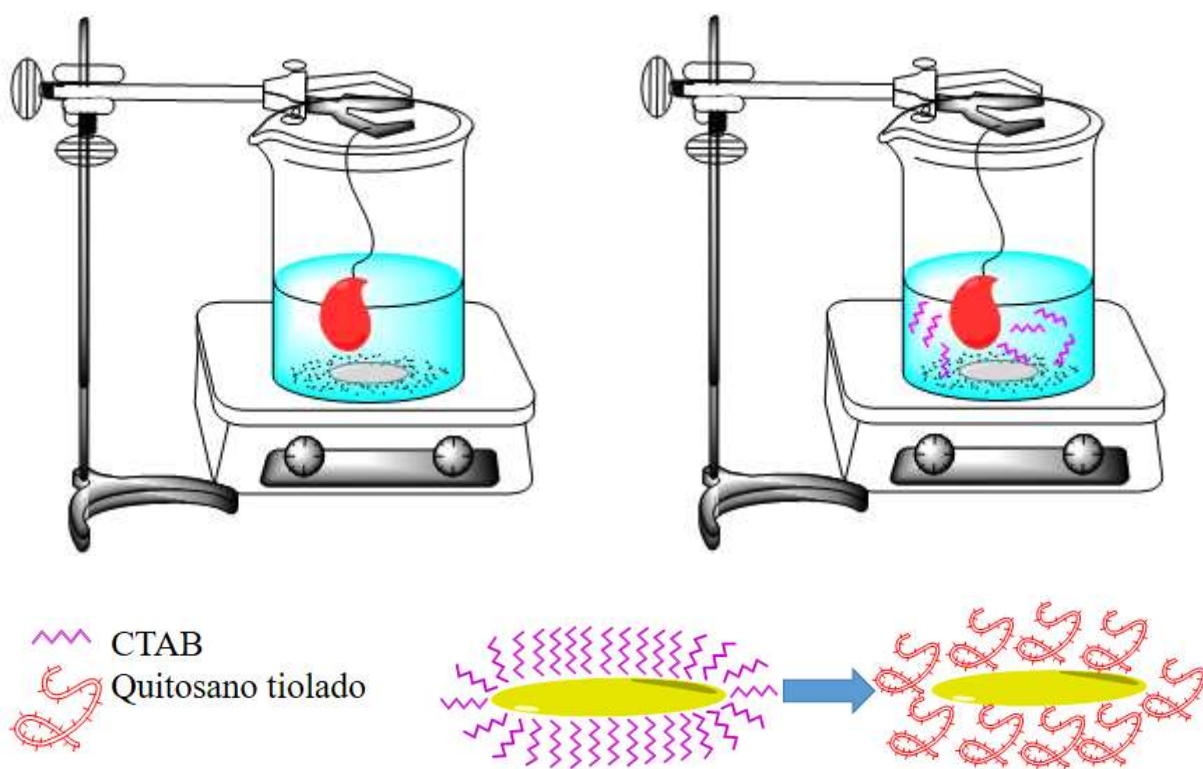


Figura 20. Representación del intercambio de ligandos por medio de diálisis.

VI.4. Recubrimiento con nanopartículas de PNIPAM

Para recubrir las NvAu (ya funcionalizadas con quitosano tiolado) de una segunda capa de polímero de PNIPAM, primero se preparó un montaje de reacción para purga con nitrógeno, calentamiento y agitación magnética, el cual consistió en una placa de calentamiento, un recipiente para baño maría con agua a la mitad, sobre el cual se colocó un matraz de dos bocas con tapones herméticos, uno de los cuales se conectó a una manguera con flujo de nitrógeno (ver diagrama de flujo en Figura 21).

El monómero precursor N-Isopropilacrilamida (173.34 mg), el entrecruzante N,N'-Metilenbisacrilamida (5.34 mg), y el surfactante Dodecil sulfato de sodio (4 mg) fueron pesados y vertidos para su posterior agitación en 34 mL de agua desionizada (18 M Ω) dentro del matraz

de dos bocas. Mientras se mantenía en agitación se inició la purga con nitrógeno para eliminar todo el oxígeno presente. Previamente se pesó y se mantuvo en agitación el iniciador de la reacción Persulfato de amonio (8.6 mg en 2 mL de agua desionizada), y después de quince minutos de purgado se agregaron 1.33 mL de la solución de iniciador al matraz de dos bocas, comenzando la reacción por adición de radicales libres. Adicionalmente se repitió la operación variando la cantidad de NR-QT agregados a la reacción de PNIPAM; las cantidades agregadas fueron 10, 20, 30 y 40 μL .

Para la encapsulación de fármaco en la nanoplataforma híbrida se siguió la misma metodología anterior, desarrollando el mismo método de síntesis por radicales libres de PNIPAM, solo que se sustituyó el agua desionizada por una solución de Cis-Platino de 50 $\mu\text{g/mL}$.

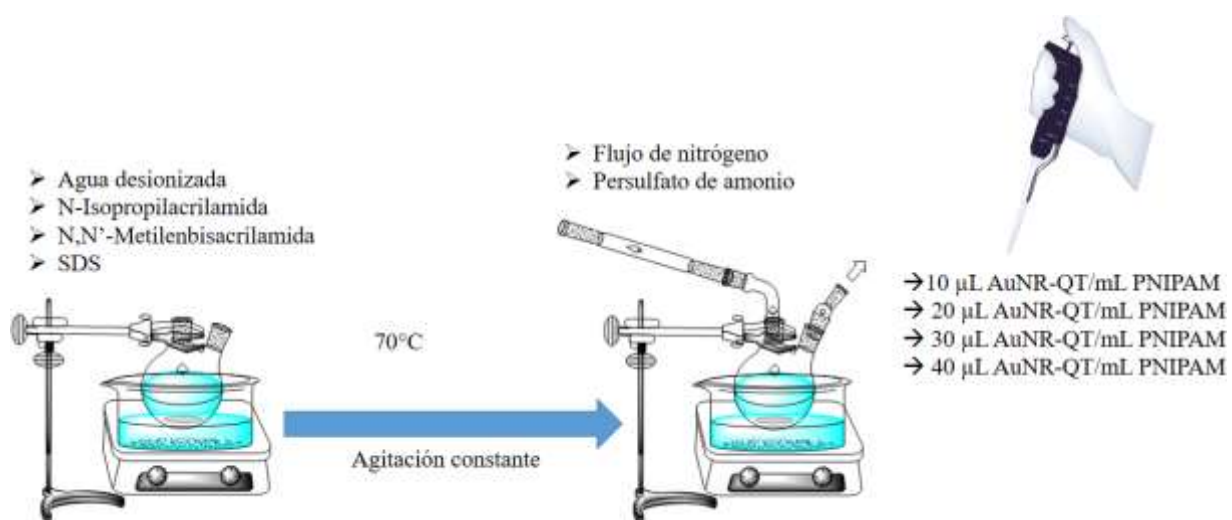


Figura 21. Diagrama de flujo para la síntesis de PNIPAM.

VI.5. Técnicas de caracterización

VI.5.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Las técnicas espectroscópicas se consideran no destructivas y se caracterizan por involucrar a los fenómenos que la radiación electromagnética causa sobre la materia a la cual se le incide, entre los cuales están la absorción, transmisión, dispersión, entre otros. Las ondas

electromagnéticas se pueden describir con tres características básicas, que son la longitud de onda (la distancia de un pico al siguiente), la frecuencia (el número de ondas que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo) y la amplitud (la altura medida desde el punto medio de la onda). Dependiendo de los valores de la longitud de onda corresponderán diferentes tipos de fenómenos que se conocen colectivamente como espectro electromagnético, del cual el ojo humano solo puede percibir una pequeña porción denominada como luz visible o espectro visible. En los márgenes de esta pequeña porción se encuentran los rayos ultravioletas, rayos X y rayos gamma, por un lado; y por otro se encuentran la porción infrarroja, microondas y ondas de radio. Las energías dependen directamente de la longitud de onda; a menor longitud de onda las ondas tendrán más energía, y a mayor longitud de onda, estas tendrán menor energía. Es por eso que el margen del ultravioleta, con una menor longitud de onda, tiene una mayor energía, mientras que el margen infrarrojo tiene una energía menor. Dependiendo del tipo de longitud de onda que se incida sobre la materia esta responderá de diferentes maneras, absorbiendo y transmitiendo (dejando pasar) ciertos valores. Estas bandas de absorción, en el espectro infrarrojo se relacionan con estiramiento y movimientos de los enlaces de los átomos, o grupos de átomos en una molécula.

VI.5.2. Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis consiste en que la muestra es irradiada con un haz de luz cambiante de frecuencias correspondientes a esa parte del espectro, de ahí su nombre. Mientras las frecuencias van cambiando, se registran longitudes de onda que corresponden a las necesarias para excitar los electrones de la muestra a llegar a un nivel más alto de energía, lo cual se detecta como absorciones o absorbancia de la muestra que un software grafica en función de las longitudes de onda.

La absorbancia se define como:

$$A = \log I_0 / I$$

Donde I_0 se denomina a la intensidad de la luz incidente, mientras que I se le llama a la intensidad de la luz transmitida.

La absorptividad molar (ϵ) indica la cantidad de luz absorbida y se expresa de la siguiente manera:

$$\epsilon = A / c * l$$

Donde A es la absorbancia, c es la concentración y l es la longitud de la celda en cm.

La ecuación se puede reorganizar de manera que la concentración c quede despejada, lo que nos permite conocer la concentración a partir del conocimiento de la absorptividad molar, la absorbancia y la longitud de la celda.

VI.5.3. Potencial ζ

Para comprender el Potencial ζ primero hay que entender el modelo de la doble capa, en este, se supone un ambiente iónico rodeando a las partículas coloidales. Si se imagina una partícula negativa, los iones positivos en la solución, o contra iones, por ser de carga opuesta al coloide, se verán atraídos electrostáticamente hacia la superficie del coloide y se formara una capa rígida denominada como capa de Stern. De hecho, otros iones positivos se ven atraídos hacia el coloide, aunque cada vez menos debido a que las fuerzas de atracción electrostáticas dependen de la distancia en gran medida. Es por eso que a una cierta distancia del coloide se formara una región difusa de contra iones, que estarán en equilibrio dinámico intercambiándose entre el coloide y el entorno.

Entre la partícula coloidal cargada negativamente y su atmosfera se produce un potencial eléctrico debido a la diferencia de cargas, y el punto en el cual se unen la capa difusa con la capa de Stern es conocido como el Potencial ζ , el cual es un valor que puede utilizarse para revisar el comportamiento del coloide, ya que un cambio en la carga superficial conlleva a una fuerzas de repulsión o atracción aumentadas, lo que repercute en la estabilidad coloidal o agregación de las partículas [78, 79].

VI.5.4. Dispersión de luz dinámica

El tamaño de partícula se determina por la medición del movimiento Browniano de las partículas en una celda utilizando la técnica de DLD. Luego se determina el tamaño analizando las fluctuaciones temporales por medio de una función de autocorrelación de fotón. Las partículas en un líquido tienden a moverse de manera aleatoria y su velocidad de movimiento determina el tamaño de partícula. De esto se sigue que las partículas pequeñas tienden a moverse rápidamente en un líquido, y que las partículas más grandes se mueven más lentamente. El DLD funciona relacionando esta información al enviar un haz de luz que se dispersa en las partículas. Si se capta un movimiento mínimo y las posiciones de las partículas no variaron mucho, se interpreta que las partículas en la muestra deben de ser grandes. Pero en cambio si se detecta que ha habido una gran cantidad de movimiento y que la posición de las partículas varía mucho con el tiempo, entonces se interpreta que las partículas presentes en la muestra son pequeñas [85].

VI.5.5. Microscopia de fuerza atómica

La microscopia de fuerza atómica es una técnica de caracterización que se ha convertido en una de las herramientas más útiles para hacer medidas directas de la topografía de superficies y dilucidar las microestructuras que esconden las superficies hasta un nivel atómico. Además, puede revelar el tipo de fuerzas intermoleculares involucradas en la nanoescala a partir de mediciones de fuerza. Por lo común, el cantiléver, que es la punta o sonda que mide la muestra, puede operar de tres maneras diferentes: en modo de no contacto, en modo contacto y en modo tapping. En el modo de no contacto el cantiléver se mueve permaneciendo ligeramente apartado de la superficie de la muestra y oscilando el cantiléver en o cerca de su frecuencia natural de resonancia. En el modo contacto el cantiléver permanece en contacto con la muestra en todo momento, monitoreando las fuerzas de interacción en la muestra. En el modo tapping se combinan los dos modos alternándose, oscilando el cantiléver mientras permite que la punta del cantiléver impacte en la muestra por una mínima cantidad de tiempo [86].

VI.5.6. Microscopia electrónica de barrido

En la microscopia electrónica de barrido hay una fuente de electrones que pasan por una serie de condensadores y lentes hasta llegar a la muestra, en la que son dispersados. Por lo tanto, a diferencia de la microscopia electrónica de transmisión, los electrones que se detectan provienen de la superficie de la muestra, y no de electrones transmitidos a través de esta. El haz de electrones es enfocado y hace un barrido de la muestra a lo largo de toda la superficie, registrándola completamente, lo cual toma unos pocos segundos. Al golpear el haz de electrones sobre la muestra, las pequeñas variaciones en la topografía superficial de la muestra afectan el patrón con que se dispersan los electrones. Los valles y grietas permanecen oscuros mientras que las elevaciones y protuberancias aparecen claras. Los electrones dispersados son después amplificados y transmitidos a un monitor. La microscopia electrónica de barrido produce representaciones tridimensionales de las superficies de las muestras.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VII.1. Funcionalización de NvAu con quitosano tiolado (Q-SH)

Las reacciones de funcionalización por intercambio de algunas estructuras inorgánicas dan como resultado la disminución considerable en la toxicidad en sistemas celulares, actualmente existe un incremento en el uso de biopolímeros que permitan alcanzar estas metas y que al mismo tiempo conserven o mejoren las propiedades fisicoquímicas como carga superficial, tamaño de partícula y morfología. En la primera etapa de preparación de la nanoplataforma, se planteó una reacción de intercambio entre el estabilizante catiónico CTAB utilizado en la reacción de síntesis de las NvAu y Quitosano modificado con grupos tiol (Q-SH). Los análisis estructurales mediante FT-IR que fueron realizados para la etapa uno de modificación, se ofrecen en la Figura 22. El espectro FT-IR de la nanoplataforma en la etapa uno será nombrada como NvAu, la gráfica demuestra que después de la etapa de diálisis es posible apreciar bandas alrededor de 980 cm^{-1} , esta señal puede estar asociada al estiramiento del puente -O- de la glucosamida que pertenece a la molécula de quitosano. El espectro de FT-IR presenta una banda cerca de 1641 cm^{-1} que es asignada al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) que forma parte del grupo funcional amida, además de manera complementaria aparece la banda de la amina sin acetilar, para este compuesto la señal aparece a 1636 cm^{-1} . En el rango de 2920 y 2968 cm^{-1} el espectro de FT-IT exhibe dos bandas asimétricas que se relacionan con estiramientos vibracionales de los grupos alifáticos (-CH₂- y -CH₃-) del anillo de piranosa respectivamente. Los resultados obtenidos mediante esta técnica espectroscópica nos permiten sugerir que las bandas características de los grupos funcionales del quitosano confirman la presencia de este biopolímero después del tratamiento de diálisis. Los análisis fisicoquímicos de la nueva estructura NvAu-QSH (Potencial ζ y radio hidrodinámico) serán presentados en la siguiente sección para confirmar la funcionalización de las nanovarillas metálicas, además de permitir el diseño de la segunda etapa de la nanoplataforma, en la cual se espera realizar la reacción de polimerización in-situ sobre la nanoplataforma NvAu-SH.

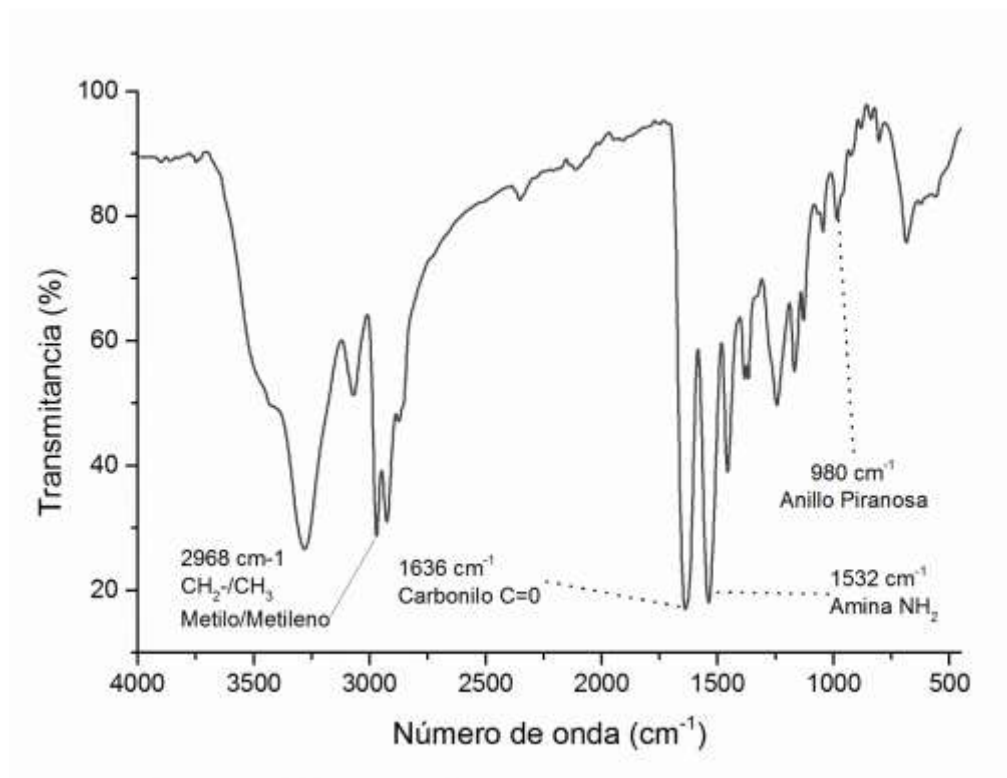


Figura 22. Espectro de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR) para la muestra NvAuQSH.

VII.2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas

VII.2.1. Estudio de radio hidrodinámico en NvAu-CTAB y NvAuQSH

El diseño y elaboración de nanoplataformas para aplicaciones orientadas a sistemas biológicos establece que las propiedades fisicoquímicas son de trascendental importancia para el óptimo funcionamiento en las inmediaciones del cuerpo humano. El tamaño de partícula desenvuelve un rol importante en los fenómenos de internalización celular, reactividad y capacidad de carga de diversas sustancias de interés biológico. En esta sección se estudiará el efecto de la modificación de la superficie de NvAu mediante el intercambio de estabilizante, sobre el diámetro y polidispersidad del sistema coloidal. Los análisis realizados mediante la técnica de DLD aparecen en la Figura 23, en esta gráfica es posible apreciar dos poblaciones para la muestra NvAu-CTAB que concierne a las nanovarillas metálicas previamente a la modificación, el análisis revela dos picos importantes que prevalecen tamaños de 7 nm y 70 nm.

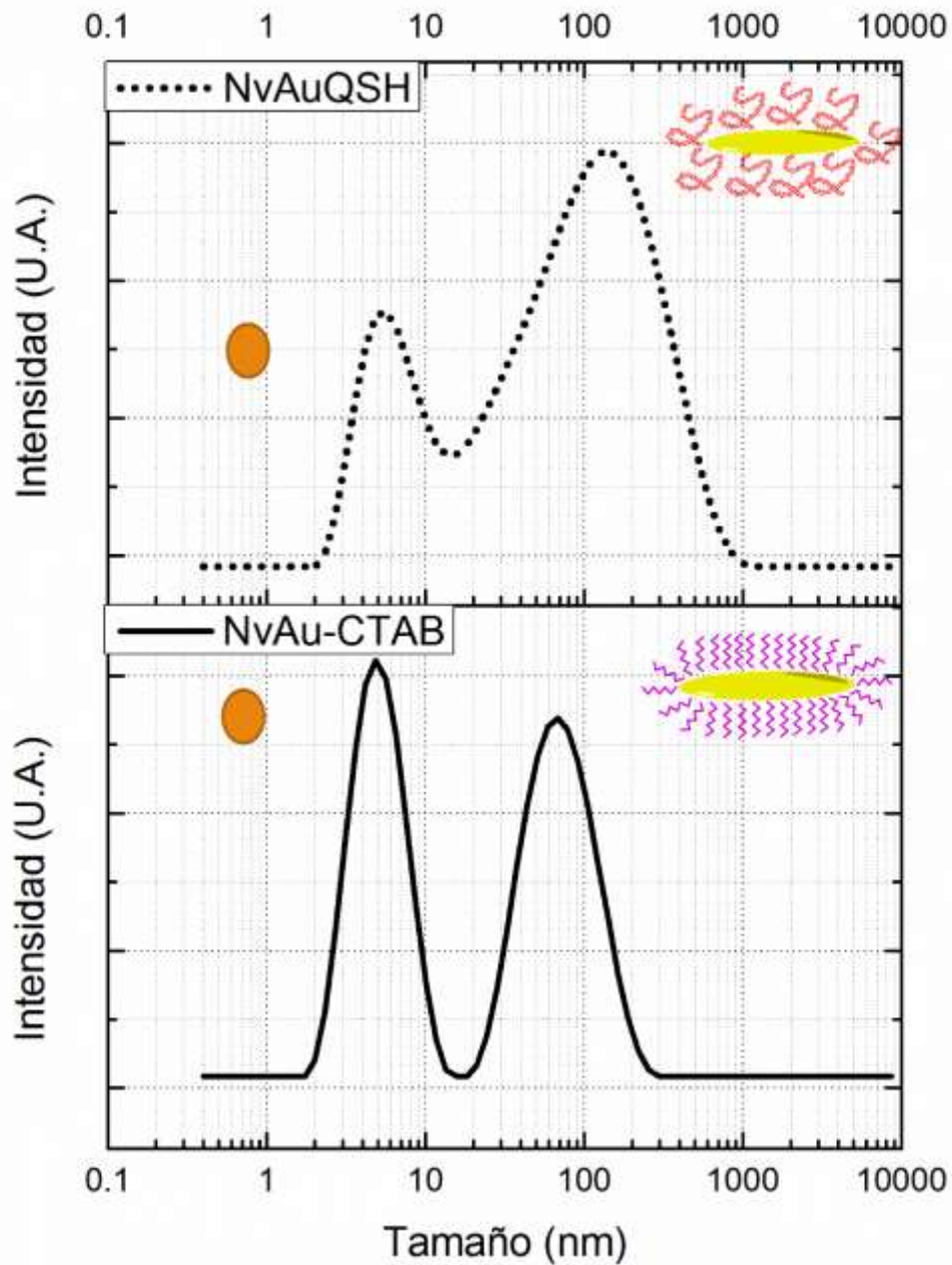


Figura 23. Curvas de distribución de tamaños mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica para las muestras NvAu-CTAB y NvAuQSH.

Los valores de tamaño obtenidos se asocian con la formación de las NvAu sintetizadas por el método mediado por semillas, el valor de menor tamaño (7 nm) se debe a la presencia de

semillas de oro remanentes en la síntesis de las nanoestructuras inorgánicas. El proceso de modificación superficial de las NvAu con la solución de quitosano tiolado (Q-SH) da como resultado un ligero incremento en la distribución de tamaño, al igual que en la etapa de síntesis de las nanoestructuras se observa una curva multimodal que para el caso de las partículas de menor tamaño el valor es el mismo, este dato fue asignado a semillas de oro y no experimentaron incremento. Por otro lado, resulta evidente el crecimiento de las NvAu después del tratamiento con el biopolímero. Existen reportes en la literatura que señalan que la interacción entre los grupos tiol (SH) se favorece sobre superficies metálicas nobles como la plata y oro [87], dando como resultado interacciones relativamente fuertes de tipo enlace coordinado. El incremento debido a la formación de capas sencillas en la superficie de la nanovarilla fue de hasta cerca de 40 nm, los tamaños registrados en la curva de DLD muestran un valor máximo en 110 nm. La polidispersidad de la población coloidal se vio afectada, posiblemente a que existe una concentración óptima de sustitución, en la cual la mayor parte de las NvAu estarán recubiertas por el biopolímero modificado químicamente. Los resultados descritos en esta sección sugieren que fue posible llevar a cabo el crecimiento de las nanovarillas a casusa de la adsorción química del polímero QSH, el monitoreo visual indica que la nanoplataforma en esta etapa se encuentra libre de agregados, y de manera complementaria el incremento en el tamaño de partícula detectado por DLD refuerza la teoría de la sustitución del estabilizante. A continuación, se presentan los resultados que corresponden a la determinación de Potencial ζ para determinar la carga predominante en la nanoplataforma.

VII.2.2. Estudio de Potencial ζ en NvAu-CTAB y NvAuQSH

El estudio de la carga superficial en sistemas coloidales se relaciona ampliamente con la estabilidad, aunque se sabe que no es el único factor que influye en estabilidad coloidal es común realizar modificaciones en la superficie de las nanoestructuras con el objetivo de modificar propiedades como toxicidad, estabilidad en sistemas biológicos y capacidad de interacción con membranas con cargas formales. En sistemas celulares es importante desarrollar nanoplataformas que puedan seguir diferentes mecanismos de internalización celular, ya sea por

interacciones electrostáticas, ya que es conocida la carga negativa de la membrana celular. En este trabajo de investigación se determinó la diferencia de potencial en la superficie para monitorear la modificación realizada sobre las NvAu, en la Figura 24 se presentan la gráfica de barras con los valores de Potencial ζ para las nanovarillas purificadas y con CTAB (NvAu) como estabilizante catiónico, la carga superficial corresponde a lo reportado en la literatura (38.93 mV), además evidencia el desbalance de potencial debido a la presencia del estabilizante iónico. Los cambios en el Potencial ζ de una partícula se utilizan como punto de monitoreo para determinar la modificación de la superficie mediante su carga, la muestra NvAuQSH muestra incremento en el Potencial ζ , este hecho resulta ser de acuerdo a lo esperado, debido a que los grupos funcionales amino (NH_2) pueden protonarse según la siguiente ecuación:

Ecuación 1

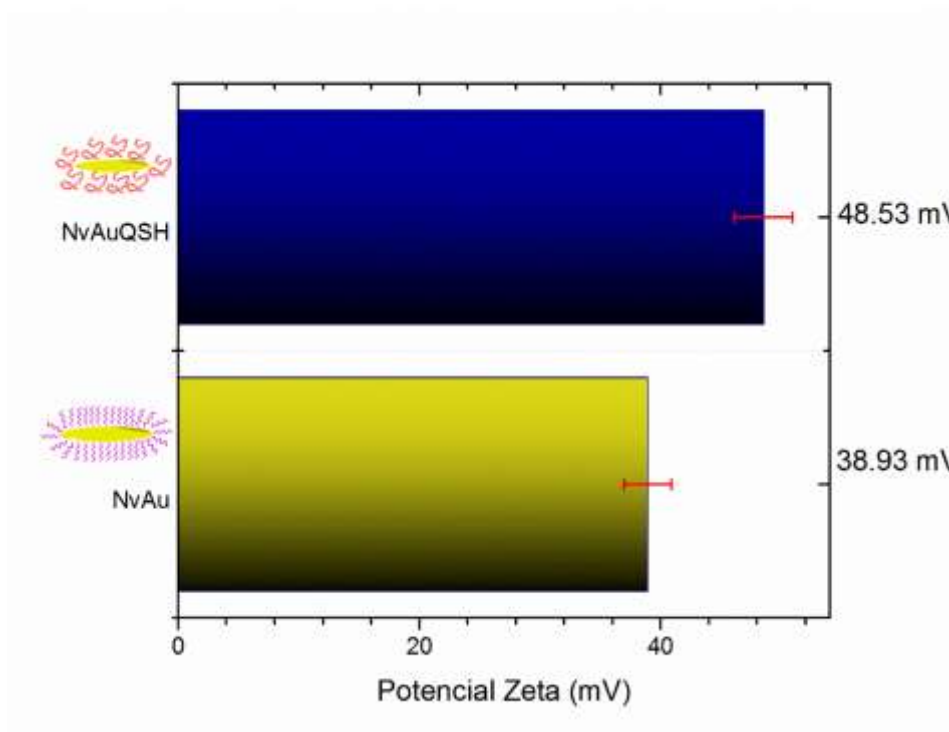
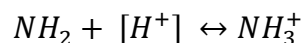


Figura 24. Potencial ζ de las muestras NvAu y NvAuQSH.

Por esta razón, es posible sugerir que el incremento en el Potencial ζ está vinculado con la presencia de grupos amina protonables adheridos a la superficie, de igual manera resulta interesante comparar la capacidad de carga del CTAB y del QSH, resultando ser mayor para el polímero debido a que el número de puntos con carga positiva (NH_3) es mayor en relación con el CTAB. Los estudios estructurales y de propiedades fisicoquímicas demuestran que es posible sugerir que se llevó a cabo la modificación superficial de las NvAu anclando cadenas de biopolímero en la superficie. En la siguiente etapa de la preparación de la nanoplataforma se llevará a cabo la polimerización in situ de la ANIPAM, el objetivo es sintetizar una nanoplataforma que pueda realizar tareas de carga de fármacos y que además pueda responder a estímulos térmicos debido a la presencia de PNIPAM como agente de encapsulación.

VII.3. Encapsulación de las NvAuQSH mediante la polimerización in situ de la isopropilacrilamida (NIPAM).

En los últimos años se ha estudiado la preparación y diseño de materiales compatibles y que sus propiedades fisicoquímicas permitan la liberación controlada de sustancias de interés biológico mediante estímulos externos como cambios en el pH, fuerza iónica y campo magnético, en este trabajo se sintetizó un material sensible a la temperatura como lo es la PNIPAM. La metodología que se propuso involucra la polimerización in situ en el sistema coloidal NvAu-QSH con el objetivo de formar capsulas que en interior o centro se encuentren las nanoestructuras metálicas y en la superficie una coraza de PNIPAM, la intención es elaborar un nanosistema que conserve las propiedades del plasmón de resonancia del Au coloidal y que su vez pueda responder a estímulos térmicos a causa de la presencia del polímero inteligente. En esta sección se llevó a cabo la síntesis de esta nueva nanoplataforma, y de igual manera fue evaluado el efecto de la concentración de NvAu en las propiedades fisicoquímicas de este coloide. La síntesis se llevó a cabo modificando la concentración inicial de NvAu (1.5×10^{-11} M), en total se utilizaron 4 concentraciones diferentes las cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de NvAu utilizadas en las reacciones de síntesis.

Muestra	Concentración (M)
NvAuQSHP ₄	1.5 x 10 ⁻¹⁰ M
NvAuQSHP ₃	7.5 x 10 ⁻¹¹ M
NvAuQSHP ₂	3.7x 10 ⁻¹¹ M
NvAuQSHP ₁	1.8 x 10 ⁻¹¹ M

VII.4. Caracterización estructural de la nanoplataforma NvAuQSHP_x mediante FT-IR.

En el proceso de elaboración de las nanoplataformas se planteó incluir segmentos estructurales que permiten a la nanopartícula ofrecer respuesta a estímulos de las inmediaciones en las que se encuentre, actualmente se incluye este sistema para el diseño de terapias alternativas que en un futuro pudieran ofrecer tratamientos personalizados contra diferentes tipos de patologías. La caracterización mediante FT-IR nos permite confirmar la presencia de grupos funcionales característicos de los polímeros involucrados en la reacción química llevada a cabo en la superficie del oro coloidal. En la Figura 25a presentamos el espectro de FT-IR obtenido en las lecturas de las muestras NvAuQSHP_x, comparando las señales de todos los espectros a diferentes concentraciones de NvAu, resulta evidente la permanencia de señales de importancia como la banda que aparece a 980 cm⁻¹ que pertenece al estiramiento del puente -C-O-C- del anillo de piranosa, esto evidencia la presencia del polímero de quitosano en la estructura, por otro lado cerca de 1364 cm⁻¹ se identificó la banda correspondiente a los grupos isopropil de la PNIPAM. La comparación entre los espectros de FT-IR de las muestras que contienen las NvAu y el espectro de quitosano puro, se aprecia una nueva banda muy pequeña a 1454 cm⁻¹ para los derivados de PNIPAM, esta se asocia al estiramiento de la amida (-NH-) de la cadena principal del polímero. Adicionalmente se muestra el espectro del quitosano tiolado libre en la Figura 25b, con las bandas de absorción correspondientes al enlace disulfuro (818 cm⁻¹), al enlace carbono azufre (1264 cm⁻¹), al estiramiento carbonilo (1688 cm⁻¹), y se enfatiza la banda

correspondiente al grupo tiol (2546 cm^{-1}), corroborando que realmente se presentan los grupos tiol dentro de la estructura del quitosano. La estabilidad de las nuevas NvAu depende en gran manera de las interacciones que existen entre la superficie del oro coloidal y el polímero estabilizador. En la bibliografía existen antecedentes que reportan la estabilización de estas superficies metálicas con quitosano [29], si bien en esta propuesta se propone que la interacción se da entre los grupos tiol (SH) del quitosano modificado y la superficie, existen otras interacciones que han sido publicadas. Sorina Garabagiu y col. publicaron en 2013 la síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con quitosano, esta aportación demostró la interacción entre grupos carbonilo del quitosano, esto fue evidenciado mediante el corrimiento de la banda del estiramiento carbonilo presente en la Glucosamida (C=O), según los resultados obtenidos por los autores, el corrimiento se da desde 1670 cm^{-1} para el quitosano libre, es decir el grupo carbonilo no está interaccionando con la superficie de oro, la muestra de NPEAu presenta un recorrimiento de esta banda hasta 1640 cm^{-1} . Los espectros obtenidos en este trabajo se encuentran en la Figura 25 y es evidente que existe este mismo comportamiento, el espectro del quitosano nativo muestra esta banda cerca de 1670 cm^{-1} (estiramiento carbonilo, C=O-Au) y las NvAu tratadas con quitosano revelan la misma señal desplazada en un rango de 1624 cm^{-1} hasta 1630 cm^{-1} .

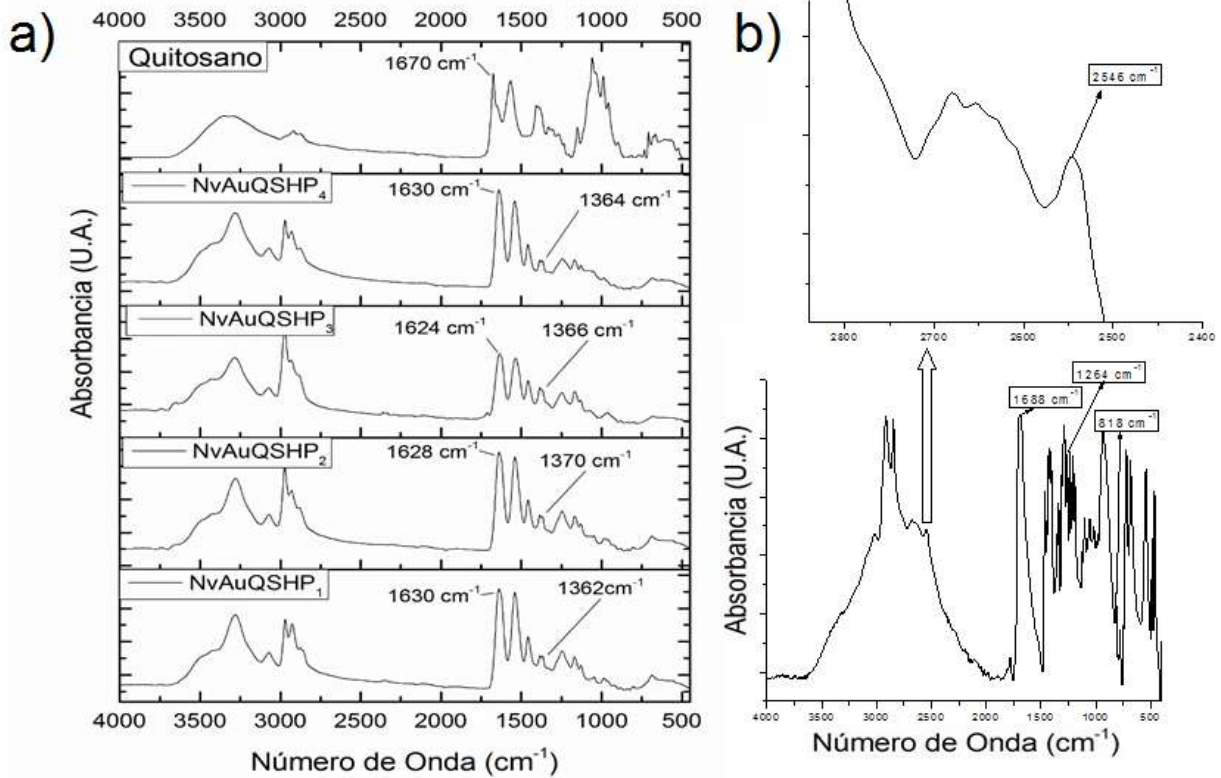


Figura 25. Espectros FT-IR de las muestras a) NvAuQSHP y del b) quitosano tiolado.

VII.4.1. Estudio del efecto de la concentración de NvAuQSH sobre el Potencial ζ

La aplicación de sistemas nanoparticulados como agente de carga y liberación de fármacos depende en gran manera de su capacidad de respuesta frente al medio en que se encuentra. Actualmente se han realizados diversos trabajos de investigación en los cuales se indaga en la degradación de partículas poliméricas en pH relativamente ácidos, afectando así la liberación controlada de sustancias de interés biológico. La carga superficial de estos nanosistemas es otro punto de estudio que limita la capacidad de internalización celular debido a interacciones electrostáticas con la doble capa fosfolipídica, aunque se ha demostrado que existen más factores que favorecen o limitan la capacidad de internalización de estos nanovectores [88].

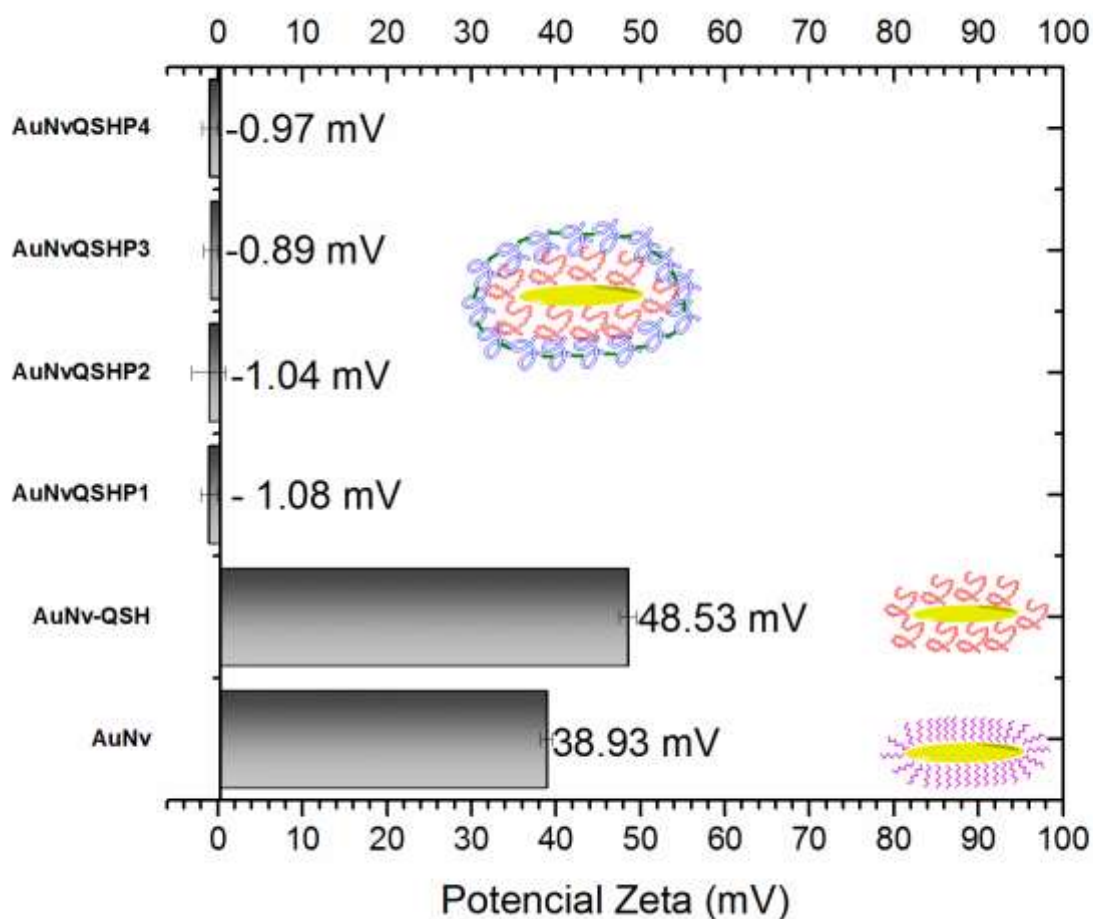


Figura 26. Potencial ζ de las muestras.

En este apartado se presentan los resultados de Potencial ζ obtenidos mediante el equipo Zeta Sizer, en la Figura 26 aparecen los resultados para todas las etapas de funcionalización de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo de investigación. La muestra NvAu presenta potencial superficial positivo (38.93 mV) el potencial positivo se relaciona con la presencia del CTAB en la superficie del metal noble, la carga positiva proviene específicamente de los grupos amonio ($^+N-(CH_3)_3$). La estabilización electrostática depende en gran manera de la concentración de CTAB en el medio de reacción, esto se asocia con el arreglo en forma de bicapa en la superficie de la NvAu, en estudios recientes se ha demostrado que existe la posibilidad de realizar diversos mecanismos ya sea para intercambiar solventes mediante el

modificación de fase en el que se encuentren suspendidas las partículas [89], además de estudiar intercambios de estabilizador mediante reacción de sustitución, nuestro caso de estudio en su segunda etapa involucra la estabilización de NvAu mediante la adición de quitosano modificado con grupos tiol (SH). De acuerdo a la gráfica de Potencial ζ para la segunda etapa es posible apreciar el incremento debido a la presencia del quitosano en la superficie de las NvAu, esto podemos sustentarlo mediante la caracterización espectroscópica y a la modificación del potencial de superficie. La etapa tercera se enfoca en la encapsulación mediante la polimerización in situ de la ANIPAM, las muestras tratadas con la polimerización fueron estudiadas y resulta evidente la disminución dramática del Potencial ζ , desde valores positivos (48.5 mV para la muestra NvAuQSH) y en el caso de las muestras tratadas los valores son -1.08 mV (NvAuQSHP₁), -1.04 mV (NvAuQSHP₂), -0.89 mV (NvAuQSHP₃) y -0.97 mV (NvAuQSHP₄). La notable disminución puede ser atribuida a las cargas parciales negativas proporcionadas por los grupos carbonilos del polímero PNIPAM y es posible apreciar un ligero incremento al aumentar la concentración de NvAu. De acuerdo a los aspectos teóricos presentados en secciones anteriores, la estabilidad coloidal se relaciona con valores de carga ya sea positiva o negativa en las cuales predominan las fuerzas de repulsión entre especies con la misma carga, lo anterior asocia la estabilidad coloidal con grandes fuerzas de repulsión entre las partículas suspendidas. Las partículas NvAuQSHPx presentan valores negativos de Potencial ζ (de -0.89 mV hasta -1.08 mV), las partículas sintetizadas están libres de precipitados, lo cual sugiere que la estabilidad se debe a factores estéricos por la presencia de la PNIPAM. Esto se debe que al aproximarse las nanoplateformas, el polímero alrededor de estas entra en contacto, teniendo un menor número de conformaciones que puede tomar en el punto de contacto, por lo que entrópicamente este proceso es desfavorable, y por la tanto las nanoplateformas tienden a separarse, contribuyendo a la estabilidad coloidal. Las propiedades de carga superficial permiten corroborar la incorporación de la cápsula de PNIPAM, a continuación, se estudia el efecto de la encapsulación de las NvAuQSH en el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (IPD).

VII.4.2. Estudio del efecto de la concentración de NvAuQSH sobre el tamaño de partícula

Los mecanismos de internalización de nanopartículas con actividad biológica en sistemas celulares están en función del tamaño de la partícula, tamaños de partícula por encima de 500 nm siguen procesos que requieren gasto energético para lograr la penetración en la doble capa, mientras que sistemas por debajo de 500 nm llevan a cabo mecanismos que no requieren gasto de energía (difusión, canales iónicos, etc.). La importancia del tamaño de partícula resulta ser trascendental para otros procesos como la carga de sustancias de interés biológico y reactividad, en esta sección se discuten los tamaños de partícula obtenidos para las muestras NvAuQSHP_x y el efecto de la concentración de NvAu sobre el IPD. En la Figura 27 se encuentran la compilación de curvas de distribución de tamaños para todas las muestras sintetizadas. Los resultados demuestran que existe una tendencia al incremento de tamaño al aumentar la concentración de NvAu en el medio de reacción. Lo anterior nos lleva a pensar a que posiblemente puede existir nanovarillas en el centro de la nanocápsula de PNIPAM y si se incrementa la concentración de NvAu pueden introducirse una mayor cantidad de nanovarillas en el interior de la esfera de PNIPAM. La muestra llamada NvAuQSHP₁ presenta un valor de Dh= 358.5 nm, el índice de polidispersidad es de 10 %, este valor indica la obtención de tamaños cercanos al tamaño principal, las siguientes muestras analizadas presentan incrementos en el tamaño de partícula y en la dispersión de tamaños, los valores se mantuvieron constantes para las muestras NvAuQSHP₂₋₃ (Dh= 369 nm, IPD= 11 % y 12 %), si bien se manifestó un ligero incremento en la dispersión de tamaños esto puede atribuirse a que la menor concentración de nanovarillas conduce a estructuras más homogéneas. Por otro lado, la plataforma NvAuQSHP₄ exhibe tamaños de partícula cercanos a Dh= 372 nm y presenta el mayor valor de IPD (14%), este comportamiento podemos justificarlo debido a que al existir una mayor concentración de nanovarillas se presentan variaciones en el mecanismo de polimerización dando lugar a partículas con diferentes tamaños. Los estudios realizados hasta esta sección permiten establecer que fue posible sintetizar nanoplataformas en dos etapas, con variaciones en el tamaño de partícula y carga superficial entre cada una de las etapas de preparación, lo que permite sugerir que las reacciones de funcionalización se llevaron de manera exitosa, estos estudios se complementan con estudios espectroscópicos (FT-IR) enfocados al estudio estructural de los

componentes de las nanoplataformas sintetizadas. Bajo este contexto se estudiará el comportamiento y la funcionalidad de la familia de nanoplataforma NvAuQSHP₁₋₄, el objetivo del estudio será determinar la capacidad de respuesta de los vectores frente a estímulos de temperatura y cambios en el pH para determinar su potencial aplicación como agente de liberación controlada de fármacos.

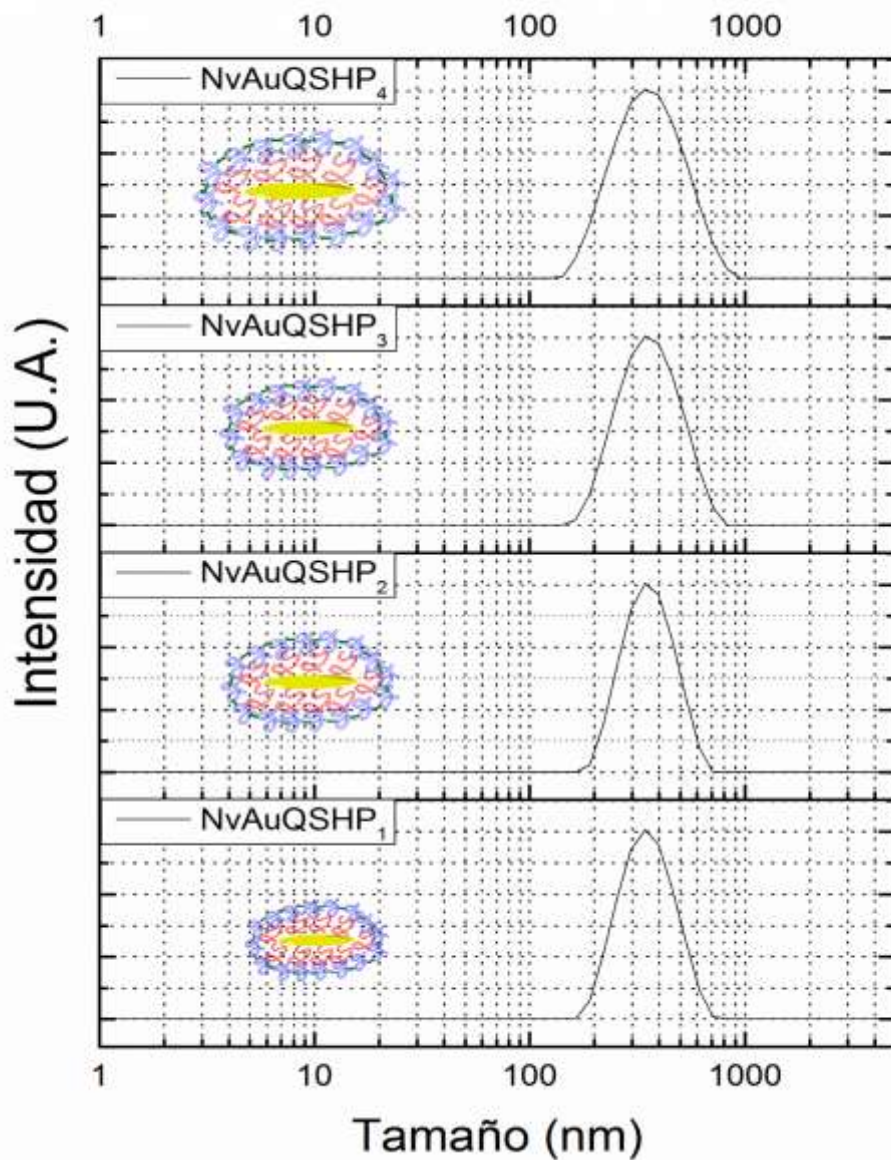


Figura 27. Rango de tamaños de las muestras NvAuQSHP.

VII.4.3. Estudio del efecto de la temperatura de NvAuQSHP sobre el tamaño de partícula

La capacidad de respuesta de los polímeros termosensibles es una de las propiedades más importantes para aplicaciones dirigidas para fines de carga y liberación controlada de sustancias de interés terapéutico. El objetivo de este trabajo es sintetizar plataformas que sean estables y que además sus propiedades fisicoquímicas estén en función de estímulos externos aplicados como temperatura y pH. Para determinar la sensibilidad de la nanoplataforma en función de la temperatura del medio, se realizó un barrido de temperaturas para cada una de las muestras sintetizadas en este trabajo.

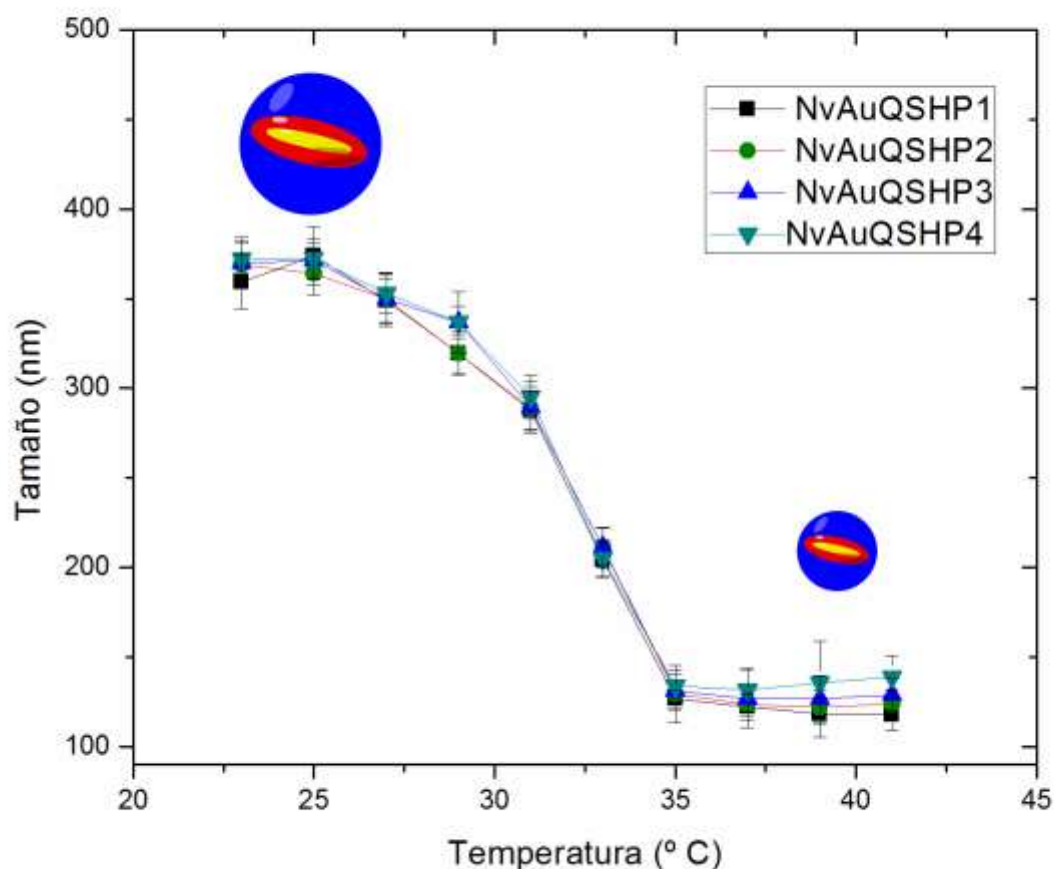


Figura 28. Rango de tamaños de las muestras NvAuQSHP ante un barrido de temperatura.

La figura 28 presenta los perfiles de temperatura para todas las muestras de PNIPAM modificadas con NvAu, las mediciones de DLD revelan que el tamaño de partícula de las muestras NvAuQSHP₁₋₄ están en función de la temperatura. Los resultados para la síntesis de nanopartículas poliméricas de PNIPAM-oro de 300 nm, demuestran que existen ligeros incrementos en la distribución de tamaños de las nanopartícula al incluir esferas metálicas distribuidas en las nanopartículas poliméricas. De este modo la funcionalidad de la nanopartícula consiste en los cambios estructurales de la partícula cuando se incrementa la temperatura del medio, el perfil obtenido consiste en una estructura expandida (soluble) con una temperatura de transición (LCST) cerca de 32°C, es decir a esta temperatura sucede un reacomodo estructural de los grupos hidrofílicos (-NHC=O) y la subsecuente ruptura de puentes de hidrógeno que mantenían unidas a las moléculas de agua a la estructura polimérica, finalmente predominarán las interacciones hidrofóbicas (grupo isopropil) conduciendo al colapso de la estructura hasta una estructura compacta. Los resultados de dispersión de tamaño de partícula demuestran que a temperatura de 24°C las muestras NvAuQSHP₁₋₄ alcanzan tamaños por cerca de 380 nm al incrementar la temperatura del medio ocurre la transición estructural a 32°C y finalmente la estructura colapsa y alcanza valores mínimos de tamaño por encima de 34°C. El comportamiento es de acuerdo a lo esperado, ya que la concentración de NvAu es moderada 1.08×10^{-11} M y no tiene un impacto en las propiedades fisicoquímicas de la partícula. De este modo los resultados demuestran que los sistemas NvAuQSHP₁₋₄ conservan la sensibilidad a la temperatura de las nanopartículas de PNIPAM pura, este hecho contribuye a la elaboración de nanopartículas funcionales que pueden ser de utilidad potencial en tareas de carga y liberación de fármacos.

VII.4.4. Estudio del efecto del pH sobre el tamaño de partícula

Los segmentos estructurales de la PNIPAM contribuyen en reacomodos conformacionales de la estructura, aun así, no se ha demostrado que este valor sea dependiente del pH del medio en que

se encuentra. Por esta razón, en nuestro caso de estudio, se incluyó un polímero sensible a cambios en la concentración de ión Hidronio como el oligosacárido quitosano. La evolución del tamaño de las muestras NvAuQSH_{P1-4} se monitoreo mediante la técnica de DLD, los resultados se muestran en la Figura 29 y resulta evidente un incremento en el tamaño de partícula a medida que se disminuye el valor de pH.

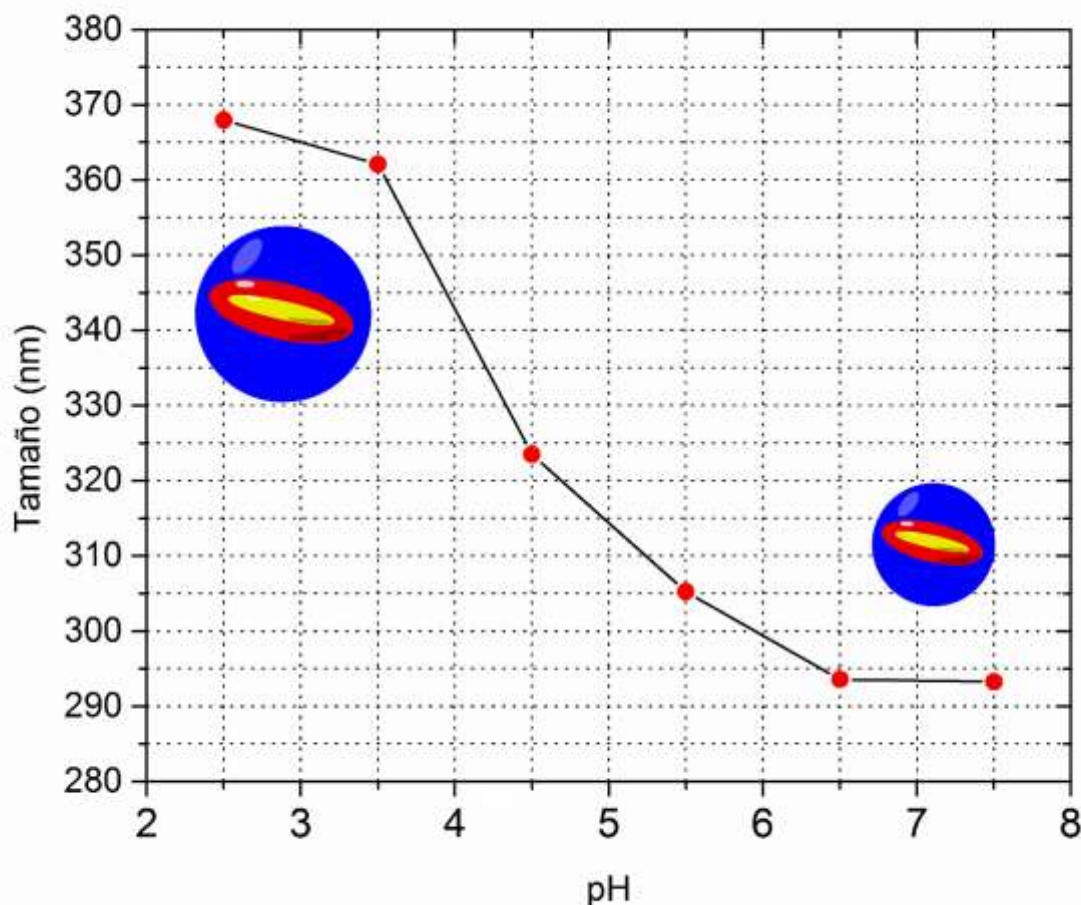


Figura 29. Comportamiento de partícula debido a variaciones en el pH.

El comportamiento de la nanoestructura para este estudio fisicoquímico se asocia principalmente a la capacidad de protonación del grupo amina (NH_2), la reacción de protonación del grupo amina se favorece a pH ácido, por lo tanto, bajo condiciones ácidas el grupo amina

permanece en su forma (NH_3^+), la carga presente en el segmento de quitosano tiolado fomenta interacciones de tipo repulsión entre cadenas con la misma carga, dando lugar a cadenas expandidas incrementando así el tamaño de partícula. Para todas las muestras se observa un valor máximo cercano a 370 nm a $\text{pH}=3$ y el valor de tamaño alcanza un valor mínimo a pH 7.5. De acuerdo a los resultados, los valores de pH ácido promueven el incremento en el tamaño de partícula y a pH básico se favorece la disminución del tamaño, lo anterior permite sugerir que la partícula puede favorecer la capacidad de carga de moléculas hidrosolubles, además de modular el tamaño a pH cercano al del cuerpo humano, esto resulta favorable debido a que $\text{pH}=7.5$ la partícula permanece estable, libre de fenómeno de precipitación.

VII.4.5. Determinación del plasmón de resonancia superficial por espectroscopia de UV-Vis

La caracterización espectroscópica pretende determinar la presencia del plasmón de resonancia transversal y longitudinal en la nanoplateforma, ésta propiedad es característica de las NvAu , si bien, es conocido que estas nanoestructuras inorgánicas son utilizadas para el calentamiento local mediante la irradiación de un láser de longitud de onda visible (700-810 nm), nuestra intención es comprobar la funcionalidad de las NvAu en el interior de la nanocápsula NvAuQSHP_{1-4} . En la Figura 30 se presentan las gráficas de espectroscopia de UV-Vis para las muestras de NvAu , NvAuQSHP_{1-4} , en las cuales es posible observar dos bandas de absorción principales con diferencias de intensidad, la primera banda (menor) se encuentra alrededor de 520 nm que corresponde al plasmón de resonancia transversal, la banda de mayor intensidad se localiza 760 nm y es característico del plasmón de resonancia longitudinal. Aunque las bandas de absorción longitudinal son parecidas para todas las muestras NvAuQSHP_x , estas presentan un leve corrimiento respecto a las NvAu que puede deberse al índice de refracción del polímero funcionalizante. Los valores calculados para el coeficiente de extinción molar presentan una disminución en comparación con el valor reportado para las NvAu , el valor para las muestras de nanoplateforma NvAuQSHP_{1-4} valor resultó ser $1.8 \times 10^9 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Los espectros presentan diferencias en cuanto intensidad de absorbancia, la muestra que presentó un valor mayor de intensidad fue NvAuQSHP_4 con un valor máximo cerca de 0.28 (u.a.) y la muestra con menor

intensidad corresponde a $NvAuQSHP_1$ con un valor de 0.11 (u.a.). Los resultados obtenidos nos permiten pensar que las nanoplataformas presentan actividad óptica, aun así, es posible optimizar la intensidad de absorción modificando la concentración de $NvAu$ en los sistemas reaccionantes. Esta propiedad coloca a nuestras nanoplataformas como candidatos potenciales en terapia fototérmica, y el objetivo en futuros trabajos será modular la liberación mediante el calentamiento local de la cápsula de PNIPAM mediante la oscilación del plasmón de resonancia de las $NvAu$. La caracterización complementaria a estos estudios incluye la determinación de la morfología final de las nanoplataformas, esto para evaluar su posible aplicación como agente de liberación controlada de sustancia de interés biológico.

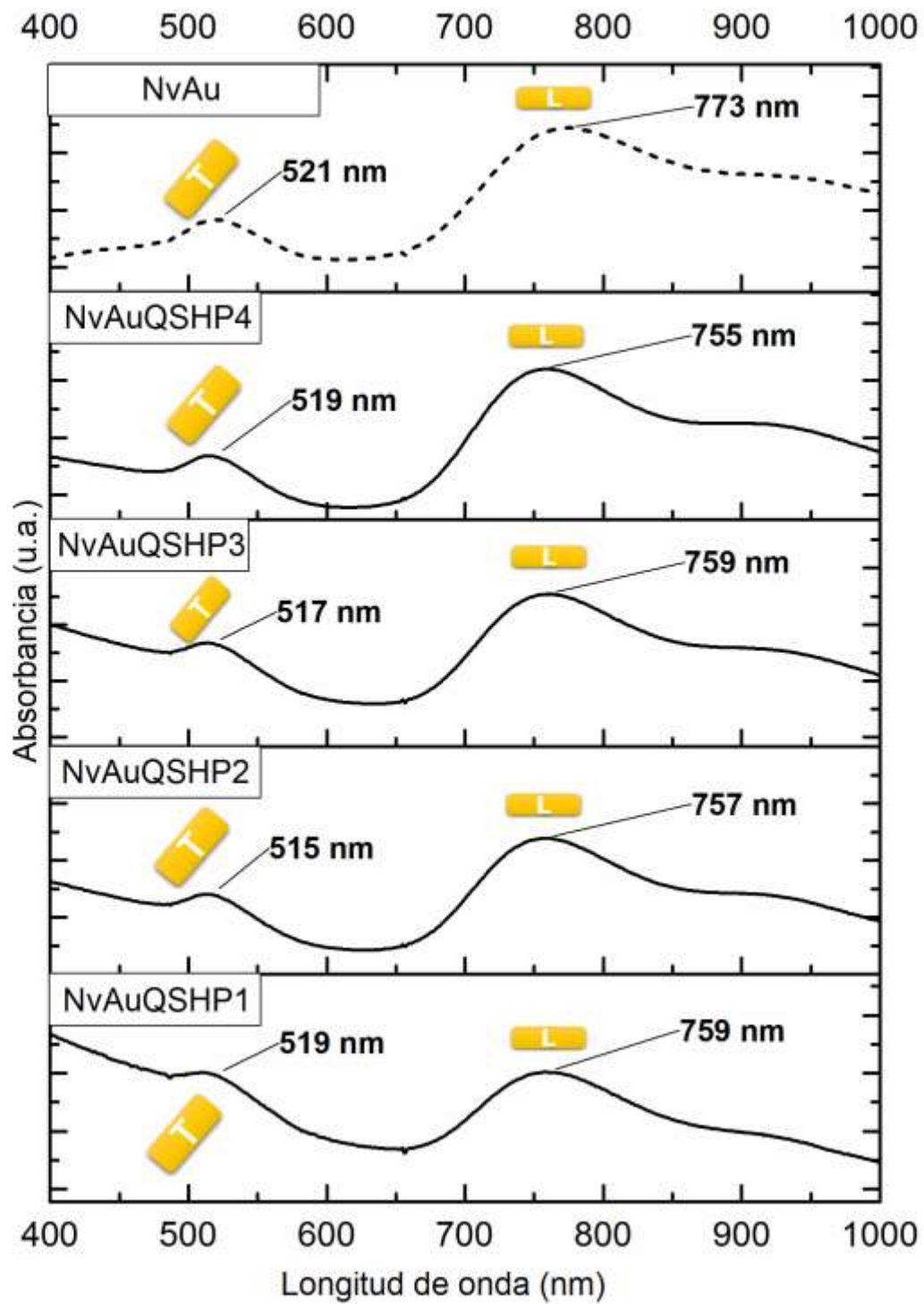


Figura 30. Gráficas de espectroscopia de UV-Vis para las muestras NvAuQSHP.

VII.4.6. Caracterización morfológica por MFA.

Una de las propiedades de gran interés para aplicaciones biomédicas de nuevas nanoplataformas consiste en el conocimiento pleno de la forma y tamaño, debido a que los mecanismos de internalización y de interacción en sistemas biológicos se encuentran estrechamente relacionados con estas propiedades morfológicas. De acuerdo con el planteamiento inicial, la estructura esperada se basa en el crecimiento de capas poliméricas sobre las NvAu. En la Figura 31 se presenta un modelo esperado de la morfología de las nanoplataformas NvAuQSHPI-4, si bien se sabe que debido a la presencia de la última capa de PNIPAM la morfología final puede sufrir modificaciones en el tamaño y morfología dependiendo de la temperatura del medio en que se encuentre. Un aspecto más a considerar es la posibilidad de algunas deformaciones de la nanocápsula, esto a causa de las NvAu que por tratarse de una superficie metálica se pueden presentar deformaciones, esto es justificado por la diferencia de las densidades entre los polímeros involucrados y el metal noble. Estos aspectos de crecimiento y deformación son considerados en el modelo propuesto, el cual se trata de una estructura esférica con tendencia a deformarse desde su interior.

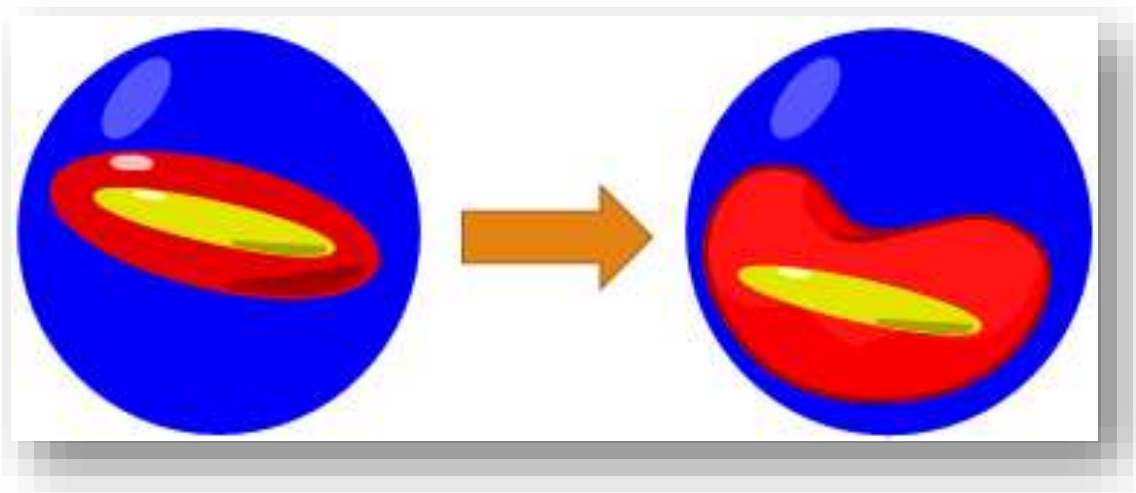


Figura 31. Modelo propuesto para la nanopartícula NvAuQSHPI.

En la Figura 32 aparecen las imágenes adquiridas por MFA para las muestras $NvAuQSHP_{1-4}$ en suspensión coloidal diluida, de manera general se obtuvieron dimensiones entre 200 nm y 300 nm, estos resultados concuerdan con las mediciones de DLD. La Figura 32 a) muestra la nanoplataforma $NvAuQSHP_1$, y podemos observar cierta similitud a una $NvAu$, es importante resaltar los incrementos en las dimensiones entre una $NvAu$ y el centro de esta nanoplataforma. Esto nos permite sugerir que el centro de la partícula $NvAuQSHP_1$ contiene $NvAu$ recubiertas con quitosano. El monitoreo de la evolución de las propiedades fisicoquímicas como radio hidrodinámico (359 nm) y carga superficial (-1.08 mV), permiten confirmar la modificación en la última etapa de la síntesis, es decir, la disminución dramática del Potencial ζ puede asociarse con el recubrimiento de PNIPAM en la superficie de quitosano, otro hecho que valida la modificación es el incremento notable en el radio hidrodinámico (desde 150 nm hasta 359 nm). En la imagen 32 b) puede apreciarse la estructura $NvAuQSHP_2$, el incremento en la concentración de $NvAu$ en las inmediaciones de reacción, permitió que se llevara a cabo la modificación de la superficie para dar lugar a la formación de estructuras similares a varillas, pero con incremento en el valor del tamaño. La imagen de MFA nos revela que existe una mayor cantidad de nanovarillas recubiertas con PNIPAM lo cual nos lleva a pensar que el aumento en la concentración de $NvAu$ afecta principalmente el rendimiento de la modificación superficial. La morfología de las muestras $NvAuQSHP_3$ y $NvAuQSHP_4$ se presentan en las figuras 32 c) y d), estas imágenes muestran que la cantidad de $NvAuQSH$ recubiertas con PNIPAM aumentaron en función de la concentración inicial, además la morfología tiende a ser de más esférica a más alargada, lo cual sugiere que existe una menor cantidad de nanovarillas recubiertas con quitosano ($NvAuQSH_{3-4}$) y con una mayor cantidad de PNIPAM. La presencia del polímero inteligente no puede descartarse en ninguna de las muestras, debido a que según los barridos de temperatura contra el tamaño revelan que todas las estructuras presentadas en este trabajo tienen la capacidad de cambiar su conformación estructural en función de la temperatura (LCST). El conjunto de caracterizaciones permite establecer los valores óptimos de reacción para preparar nanoestructuras híbridas funcionales y de morfología semi-esférica, la aplicación de estos nanosistemas está dirigida en la carga de fármacos útiles en terapias contra el cáncer.

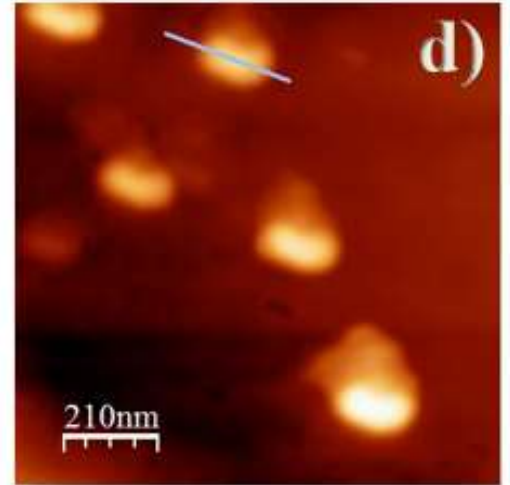
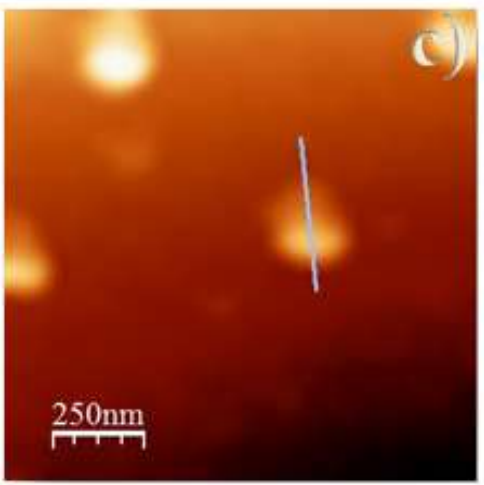
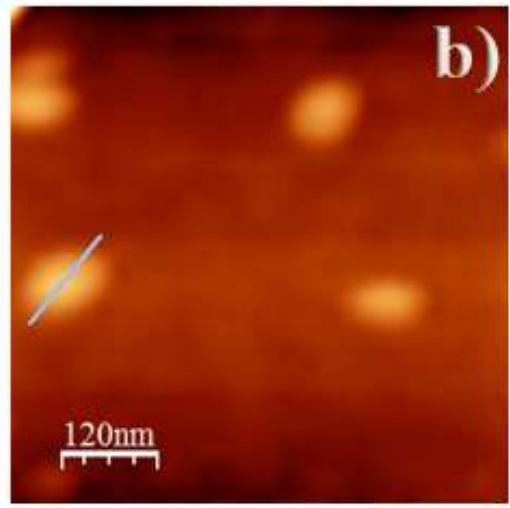
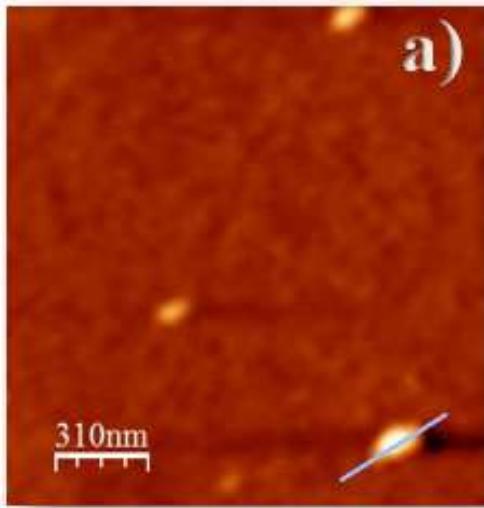


Figura 32. Imágenes adquiridas por MFA para las muestras NvAuQSHP.

VII.4.7. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La técnica de MEB fue realizada para la muestra que presentó las mejores condiciones fisicoquímicas y de morfología discutidas en puntos anteriores (NvAuQSHP₄). La imagen MEB confirma la presencia de estructuras semi-esféricas, en esta toma fue posible apreciar nanovarillas en el interior de la cápsula de PNIPAM, además de NvAu adheridas a la superficie, el tamaño de partícula promedio alcanza un valor de 250 nm. El incremento en la cantidad de nanovarillas encapsuladas puede ser potencialmente útil en la optimización de futuros trabajos para el calentamiento local modulado por estímulo de láser de 808 nm. En el siguiente punto se discutirán los resultados de la capacidad de entrapamiento de CisPlatino utilizando las nanoplateformas NvAuQSHP₁₋₄ presentadas y caracterizadas en este trabajo de investigación.



Figura 33. Imagen MEB de la muestra NvAuQSHP₄.

VII.4.8. Capacidad de atrapamiento de Cisplatino en NvAuQSHPx

La potencial aplicación de las nanoplateformas sintetizadas en este trabajo de investigación fueron evaluadas con el objetivo de conocer su capacidad de carga y adsorción de un fármaco hidrofílico como lo es el Cisplatino. La cuantificación se llevó a cabo mediante la determinación espectroscópica indirecta por UV-Vis de un complejo formado entre la droga Cisplatino y la ortofenildiamina (OPDA) en disolvente orgánico dimetilformamida (DMF). La metodología describe que la solución tratada por encima de 90°C vira de incoloro a color verde, esto indica la correcta formación del complejo. Este método fue adaptado para la cuantificación del cisplatino fuera de la capsula descartado en el sobrenadante. La eficiencia de atrapamiento se define como la concentración de fármaco en el interior de la nanocápsula y adsorbido en la superficie de la misma, de aquí surge la ecuación 2.

Ecuación 2.

$$\text{Eficiencia de Entrampamiento} = \frac{\text{Masa de fármaco en NP's}}{\text{Masa de fármaco inicial}} \times 100$$

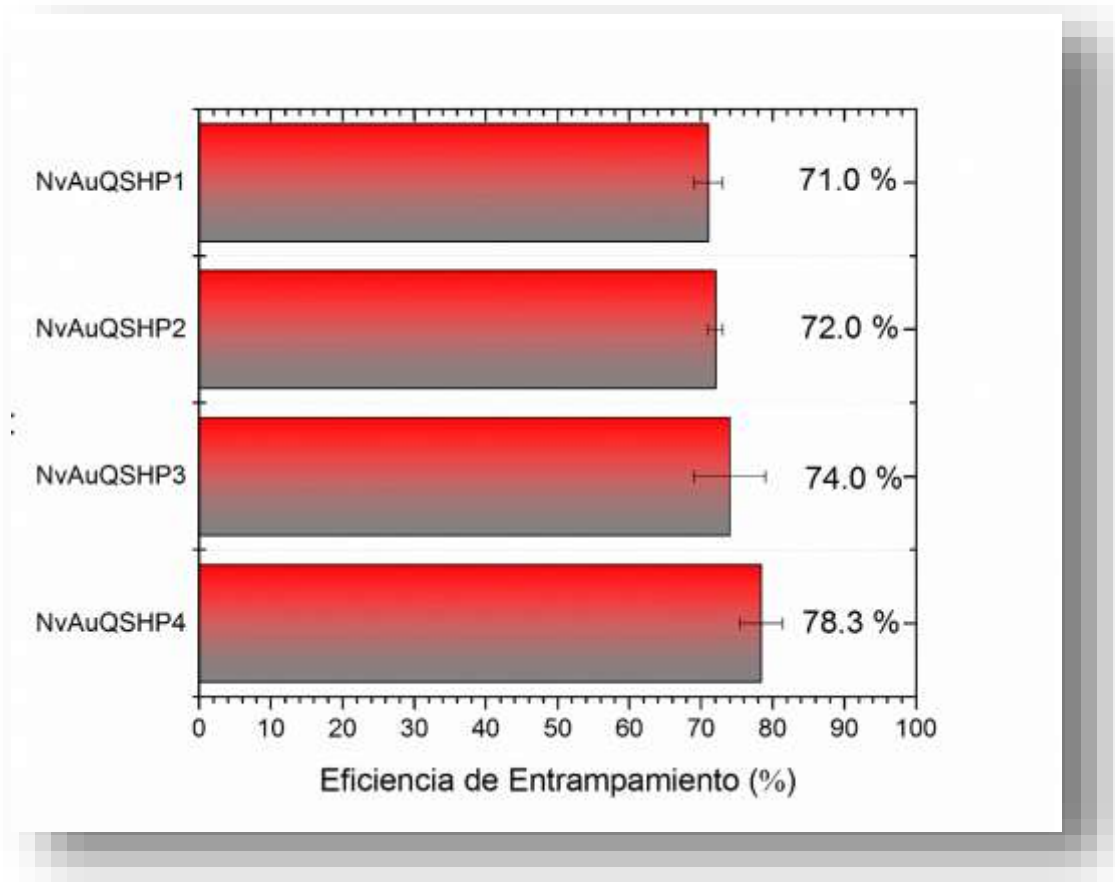


Figura 34. Porcentaje de encapsulación de Cisplatino en muestras NvAuQSHP.

Los resultados calculados para las nanoplataformas, se presentan en la figura 31, y resulta evidente apreciar que la muestra con la mayor concentración de NvAu en el medio reaccionante (NvAuQSHP₁) alcanza valores mínimos de EE (%) cerca de 71.0 %, en la muestra NvAuQSHP₂ es una mayor de concentración de varillas y esto resultó ser proporcional a la EE de este sistema registrando un porcentaje de 72 %. Si bien, es de esperarse un incremento en la concentración de cisplatino en la cápsula, esto al existir una mayor concentración de varillas, los resultados confirman lo esperado, en nuestro punto de vista, pudieran existir varios factores fisicoquímicos que pudieran afectar de manera importante la capacidad de retención de las nanocápsulas. El caso de NvAuQSHP₃₋₄ confirma este comportamiento, ya que sus valores de tamaño son mayores y su IPD se mantuvo en 14 %. Si bien las eficiencias de atrapamiento fueron 74 % y 78.3 % de manera respectiva, estos datos fueron los más altos en el estudio realizado. Los resultados obtenidos en esta sección, nos permiten corroborar la funcionalidad de la familia de la nanoplataforma NvAuQSHP₁₋₄ para la carga de un antineoplásico hidrofílico como el CisPlatino.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la caracterización fisicoquímica (radio hidrodinámico, Potencial ζ , MEB y MFA) además de los estudios realizados en este trabajo de investigación, podemos comentar a manera de conclusión que se prepararon 4 nanoplateformas de la familia $NvAuQSHP_x$. La preparación de las nanoplateformas se llevó a cabo en dos etapas, la primera parte de este trabajo involucra la reacción de intercambio de estabilizante de las $NvAu$, esta etapa da como resultado cambios importantes en el Potencial ζ ($\zeta= 38.93$ mV para $NvAu$ hasta $\zeta=48.5$ mV para $NvQSH$ modificado) el valor de D_H fueron impactados al registrarse un incremento desde 70 nm para el caso de las nanovarillas estabilizadas con CTAB y 150 nm para el sistema $NvQSH$. El estudio del impacto de la concentración de $NvAu$ sobre la encapsulación de estas estructuras metálicas nos permiten sugerir que fue posible llevar a cabo la encapsulación de la plataforma $NvQSH$, resulta importante que los cambios en el Potencial ζ de $\zeta= 48.5$ mV hasta un valor de $\zeta=-1.08$ mV, esto sin comprometer la estabilidad coloidal. El tema relacionado con la funcionalidad y potencial aplicación de las nanoplateformas presentadas están fundamentados en los análisis de espectroscopia de UV-Vis, estos revelan la presencia del plasmón de resonancia superficial de las $NvAu$ y muestra el comportamiento esperado en función de la concentración inicial de varillas. La eficiencia de atrapamiento nos permite colocar a los materiales preparados en este trabajo como un buen candidato en lo relacionado a sistemas de carga de fármacos, en nuestro caso en particular estudiamos el antineoplásico CisPlatino. Los estudios realizados nos indican que las nanoplateformas $NvAuQSHP_x$, alcanzaron un valor máximo de EE (%) de 78.3 % y este fue el caso de la muestra más concentrada en nanovarillas $NvAuQSHP_4$. El trabajo de investigación y los estudios realizados nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló una familia de nanoplateformas de configuración general $NvAuQSHP_x$, mediante la reacción de polimerización por radicales libres de la isopropilacrilamida en medio acuoso.

- Fue posible estabilizar las NvAu mediante la reacción de intercambio utilizando quitosano tiolado como agente de sustitución.

- Se demostró que la familia de nanoplateformas NvAuQSHPx responde a estímulos externos como cambios en la temperatura, esto se sustenta mediante el barrido de temperatura contra tamaño, esta curva revela que es posible modular el tamaño de la nanoplateforma desde 380 nm (32°C) hasta 120 nm (por encima de 35°C). La principal aplicación de estos sistemas sería en la liberación controlada de fármacos o sustancias hidrofílicas mediante estímulos térmicos.

- Los estudios revelan que las plataformas modifican su tamaño en función del valor de pH en que se encuentren es decir a un valor de pH= 3 el diámetro de la plataforma es cerca de 375 nm y al desplazarse a pH básico de 7 el diámetro disminuye hasta 295 nm.

- Se evidenció que los sistemas obtenidos en este trabajo presentan actividad óptica que corresponden al fenómeno de plasmón de resonancia superficial de las NvAu. Los espectros de UV-Vis recolectados para las muestras NvAuQSHPx presentan el mismo comportamiento, el plasmón de resonancia no sufrió desplazamientos de acuerdo a lo reportado en la literatura.

Fueron preparados novedosos nanosistemas capaces de realizar tareas de carga de un fármaco hidrofílico (Cisplatino), los valores máximos de EE fueron de 78.3 % para el valor máximo con una concentración inicial de cisplatino de 50 µg/ml.

IX. PERSPECTIVAS

Aunque la nanoplataforma híbrida sintetizada demostró responder a los estímulos externos de pH y temperatura, aún faltan pruebas para comprobar su viabilidad, estudios de liberación, además de corroborar el aumento de temperatura por medio de la irradiación con láser. También resulta oportuno ajustar los parámetros de tamaño y Potencial ζ , que son los que más influyen en la circulación e internalización, aparte de ligandos específicos que se pueden utilizar para potenciar aún más la especificidad de las nanoplataformas.

X. LITERATURA CITADA

- [1] J. Conde, J. T. Dias, V. Grazú, M. Moros, P. V Baptista, and J. M. de la Fuente, “Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine,” *Front. Chem.*, vol. 2, no. July, p. 48, 2014.
- [2] L. M., “Escala (en logarítmica) de las cosas,” 2016. [Online]. Available: <http://elfaronanotec.blogspot.mx/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html>.
- [3] D. Funes, “Nanotecnología. Introducción,” 2015. [Online]. Available: <http://www.davidfunesbiomed.es/2015/06/nanotecnologia-introduccion.html>.
- [4] S. M. Moghimi, “Nanomedicine: current status and future prospects,” *FASEB J.*, vol. 19, no. 3, pp. 311–330, 2005.
- [5] M. Virlan, D. Miricescu, R. Radulescu, C. Sabliov, A. Totan, B. Calenic, and M. Greabu, “Organic Nanomaterials and Their Applications in the Treatment of Oral Diseases,” *Molecules*, vol. 21, no. 2, p. 207, 2016.
- [6] B. L. Banik, P. Fattahi, and J. L. Brown, “Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 271–299, 2016.
- [7] L. Chu, X. Ju, R. Xie, and W. Wang, *Smart Hydrogel Functional Materials*. 2013.
- [8] F. Liu and M. W. Urban, “Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 3–23, 2010.
- [9] C. I. C. Crucho, “Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine,” *ChemMedChem*, vol. 10, no. 1, pp. 24–38, 2015.
- [10] M. A. Ward and T. K. Georgiou, “Thermoresponsive polymers for biomedical applications,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1215–1242, 2011.
- [11] P. S. Mohanty and W. Richtering, “Structural ordering and phase behavior of charged microgels,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 47, pp. 14692–14697, 2008.

- [12] E. A. Clark and J. E. G. Lipson, "LCST and UCST behavior in polymer solutions and blends," *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 2, pp. 536–545, 2012.
- [13] E. E. Makhaeva, H. Tenhu, and A. R. Khokhlov, "Conformational Changes of Poly(vinylcaprolactam) Macromolecules and Their Complexes with Ionic Surfactants in Aqueous Solution," *Macromolecules*, vol. 31, no. 18, pp. 6112–6118, 1998.
- [14] R. Moerkerke, F. Meeussen, R. Koningsveld, H. Berghmans, W. Mondelaers, E. Schacht, K. Dusek, and K. Solc, "Phase transitions in swollen networks. 3. Swelling behavior of radiation cross-linked poly(vinyl methyl ether) in water," *Macromolecules*, vol. 31, no. 7, pp. 2223–2229, 1998.
- [15] R. de Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, "Silver nanoparticles: A brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 32, no. 11, pp. 867–879, 2012.
- [16] G. C. Bond, "Platinum Metals as Hydrogenation Catalysts," *Platin. Met. Rev.*, vol. 1, no. 3, pp. 87–93, 1957.
- [17] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 1578–1586, 2008.
- [18] M. Das, K. H. Shim, S. S. A. An, and D. K. Yi, "Review on gold nanoparticles and their applications," *Toxicol. Environ. Health Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 193–205, 2011.
- [19] M. Hu, J. Chen, Z.-Y. Li, L. Au, G. V Hartland, X. Li, M. Marquez, and Y. Xia, "Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 11, pp. 1084–1094, 2006.
- [20] R. Weissleder, "A clearer vision for in vivo imaging.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. 4, pp. 316–317, 2001.
- [21] K. C. Ng and W. Cheng, "Fine-tuning longitudinal plasmon resonances of nanorods by thermal reshaping in aqueous media," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 10, p. 105602, 2012.
- [22] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal

- therapy (PPTT) using gold nanoparticles,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 217–228, 2008.
- [23] J. Yuan and A. H. E. Müller, “One-dimensional organic-inorganic hybrid nanomaterials,” *Polymer (Guildf)*, vol. 51, no. 18, pp. 4015–4036, 2010.
- [24] A. Fahmi, T. Pietsch, C. Mendoza, and N. Cheval, “Functional hybrid materials,” *Mater. Today*, vol. 12, no. 5, pp. 44–50, 2009.
- [25] G. L. Nealon, R. Greget, C. Dominguez, Z. T. Nagy, D. Guillon, J. L. Gallani, and B. Donnio, “Liquid-crystalline nanoparticles: Hybrid design and mesophase structures,” *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 8, pp. 349–370, 2012.
- [26] K. Bootdee, M. Nithitanakul, and B. P. Grady, “Synthesis and encapsulation of magnetite nanoparticles in PLGA: Effect of amount of PLGA on characteristics of encapsulated nanoparticles,” *Polym. Bull.*, vol. 69, no. 7, pp. 795–806, 2012.
- [27] B. Gaihre, M. S. Khil, D. R. Lee, and H. Y. Kim, “Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study,” *Int. J. Pharm.*, vol. 365, no. 1–2, pp. 180–189, 2009.
- [28] M. Furlan, J. Kluge, M. Mazzotti, and M. Lattuada, “Preparation of biocompatible magnetite–PLGA composite nanoparticles using supercritical fluid extraction of emulsions,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 54, no. 3, pp. 348–356, 2010.
- [29] S. Charan, K. Sanjiv, N. Singh, F. C. Chien, Y. F. Chen, N. N. Nergui, S. H. Huang, C. W. Kuo, T. C. Lee, and P. Chen, “Development of chitosan oligosaccharide-modified gold nanorods for in vivo targeted delivery and noninvasive imaging by NIR irradiation,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 11, pp. 2173–2182, 2012.
- [30] A. Regiel-Futyra, M. Kus-Lis??kiewicz, V. Sebastian, S. Irusta, M. Arruebo, G. Stochel, and A. Kyzio??, “Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 2, pp. 1087–1099, 2015.
- [31] “<http://yamilnec.blogspot.mx/>.” .

- [32] D. Bhattacharyya, S. Singh, and N. Satnalika, "Nanotechnology , Big things from a Tiny World : a Review," *Sci. Technol.*, vol. 2, no. 3, pp. 29–38, 2009.
- [33] S. Mathur, H. Shen, S. Barth, and C. Cavelius, "Inorganic Nanomaterials through Chemical Design," *SPIE Newsroom*, vol. 1, pp. 2–5, 2006.
- [34] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles in delivery applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1307–1315, 2008.
- [35] P. C. RAY, H. YU, and P. P. FU, *Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs*, vol. 27, no. 1. 2009.
- [36] C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, and V. M. Rotello, "Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains," *Bioconjug. Chem.*, vol. 15, pp. 897–900, 2004.
- [37] O. I. Wilner, B. Willner, and I. Willner, "Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research," *Nano-Biotechnology Biomed. Diagnostic Res.*, vol. 733, pp. 97–114, 2012.
- [38] J. Choi, J. Yang, E. Jang, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, K. Lee, and S. Haam, "Gold Nanostructures as Photothermal Therapy Agent for Cancer," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 11, pp. 0–0, 2011.
- [39] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, and M. a. El-Sayed, "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, p. 2740, 2012.
- [40] E. Petryayeva and U. J. Krull, "Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing-A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 706, no. 1, pp. 8–24, 2011.
- [41] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. October, pp. 267–297, 2007.
- [42] J. M. McDonnell, "Surface plasmon resonance: Towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 572–577, 2001.
- [43] A. Szabo, L. Stolz, and R. Granzow, "Surface plasmon resonance and its use in

- biomolecular interaction analysis (BIA),” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 699–705, 1995.
- [44] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, and L. M. Liz-Marzán, “LSPR-based nanobiosensors,” *Nano Today*, vol. 4, no. 3, pp. 244–251, 2009.
- [45] A. Abbas, M. J. Linman, and Q. Cheng, “New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 1815–1824, 2011.
- [46] X. Huang, W. Qian, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, “The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, no. 9, pp. 747–753, 2007.
- [47] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, and P. Mulvaney, “Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 249, no. 17–18 SPEC. ISS., pp. 1870–1901, 2005.
- [48] A. K. Samal and T. Pradeep, “Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions,” vol. 1, pp. 1–62, 2011.
- [49] C. J. Murphy, L. B. Thompson, D. J. Chernak, J. A. Yang, S. T. Sivapalan, S. P. Boulos, J. Huang, A. M. Alkilany, and P. N. Sisco, “Gold nanorod crystal growth: From seed-mediated synthesis to nanoscale sculpting,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 128–134, 2011.
- [50] H. Chen, L. Shao, Q. Li, and J. Wang, “Gold nanorods and their plasmonic properties,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 7, pp. 2679–2724, 2013.
- [51] N. Li, P. Zhao, and D. Astruc, “Anisotropic gold nanoparticles: Synthesis, properties, applications, and toxicity,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 7, pp. 1756–1789, 2014.
- [52] I. Nanoparticles and O. Nanoparticles, *Nanoparticles for Therapy*. 2012.
- [53] R. Kumar and S. Lal, “Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review,” *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, vol. 3, no. 4, pp. 1–11, 2014.

- [54] K. Pan and Q. Zhong, "Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization," *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 7, no. December 2015, pp. 245–266, 2016.
- [55] J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, and Y. Deng, "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 81–98, 2014.
- [56] O. S Vaze, "Pharmaceutical Nanocarriers (Liposomes and Micelles) in Cancer Therapy," *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 3, 2016.
- [57] K&k, "Liposomes or Micelles?," 2009. [Online]. Available: <https://morgellons1.wordpress.com/2009/10/14/liposomes-or-micelles/>.
- [58] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [59] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," *J. Control. Rel.*, vol. 70, pp. 1–20, 2001.
- [60] A. Gandini, "Polymers from renewable resources: A challenge for the future of macromolecular materials," *Macromolecules*, vol. 41, no. 24, pp. 9491–9504, 2008.
- [61] F. R. Wurm and C. K. Weiss, "Nanoparticles from renewable polymers.," *Front. Chem.*, vol. 2, no. July, p. 49, 2014.
- [62] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, and J. Youngblood, *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*, vol. 40, no. 7. 2011.
- [63] H. Merzendorfer, "Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases," *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. 24, pp. 4393–4412, 2003.
- [64] I. Aranaz, M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, and A. Heras, "Functional characterization of chitin and chitosan," *Curr. Chem. Biol.*, vol. 3, pp. 203–230, 2009.
- [65] P. K. Dutta, J. Duta, and V. S. Tripathi, "Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and

- applications,” *J. Sci. Ind. Res. (India)*., vol. 63, no. 1, pp. 20–31, 2004.
- [66] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, “Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011.
- [67] C. K. S. Pillai, W. Paul, and C. P. Sharma, “Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 641–678, 2009.
- [68] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, “Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 90, no. 1, pp. 21–27, 2012.
- [69] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, “Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, 2004.
- [70] I. Aranaz, R. Harris, and A. Heras, “Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications,” *Curr. Org. Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 308–330, 2010.
- [71] K. V. Harish Prashanth and R. N. Tharanathan, “Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 3, pp. 117–131, 2007.
- [72] S. Agarwal, A. Leekha, A. Tyagi, V. Kumar, I. Moin, and A. K. Verma, “Versatility of Chitosan: A Short Review,” *J. Pharma Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 125–134, 2015.
- [73] G. Kumar, “Modified chitosan polymers and enzymatic methods for the production thereof,” 2000. [Online]. Available: <http://www.google.com/patents/WO2000011038A1?cl=en#backward-citations>.
- [74] Y. Hoshino, T. Urakami, T. Kodama, H. Koide, N. Oku, Y. Okahata, and K. J. Shea, “Design of synthetic polymer nanoparticles that capture and neutralize a toxic peptide,” *Small*, vol. 5, no. 13, pp. 1562–1568, 2009.
- [75] B. Sierra-Martin, J. R. Retama, M. Laurenti, A. Fernández Barbero, and E. López Cabarcos, “Structure and polymer dynamics within PNIPAM-based microgel particles,”

Adv. Colloid Interface Sci., vol. 205, pp. 113–123, 2014.

- [76] R. Pelton, “Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 348, no. 2, pp. 673–674, 2010.
- [77] J. Clara-Rahola, a Fernandez-Nieves, B. Sierra-Martin, a B. South, L. a Lyon, J. Kohlbrecher, and a Fernandez Barbero, “Structural properties of thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-poly(ethyleneglycol) microgels,” *J. Chem. Phys.*, vol. 136, no. 21, p. 214903/1-214903/7, 2012.
- [78] D. J. Phillips and M. I. Gibson, “Towards being genuinely smart: ‘isothermally-responsive’ polymers as versatile, programmable scaffolds for biologically-adaptable materials,” *Polym. Chem.*, vol. 6, no. 7, pp. 1033–1043, 2015.
- [79] T. Still, K. Chen, A. M. Alsayed, K. B. Aptowicz, and A. G. Yodh, “Synthesis of micrometer-size poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles with homogeneous crosslinker density and diameter control,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 405, pp. 96–102, 2013.
- [80] M. E. Caldorera-Moore, W. B. Liechty, and N. A. Peppas, “Responsive theranostic systems: Integration of diagnostic imaging agents and responsive controlled release drug delivery carriers,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 1061–1070, 2011.
- [81] S. M. Janib, A. S. Moses, and J. A. MacKay, “Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 11, pp. 1052–63, 2010.
- [82] A. Babu, A. K. Templeton, A. Munshi, and R. Ramesh, “Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 3, pp. 709–21, 2014.
- [83] Z.-M. Inc., “Potencial Zeta : Un Curso Completo en 5 Minutos,” *Zeta-m. Inc.*, pp. 1–22, 2008.
- [84] J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, and E. San Martín-Martínez, “Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas,” *Am. J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, 2014.

- [85] Malvern instruments, "Zetasizer Nano Series User Manual," *Dep. Biochem. Biophys. Facil. , Univ. Chambridge*, no. 2, p. 207, 2004.
- [86] N. Jalili and K. Laxminarayana, "A review of atomic force microscopy imaging systems: Application to molecular metrology and biological sciences," *Mechatronics*, vol. 14, no. 8, pp. 907–945, 2004.
- [87] Y. Xue, X. Li, H. Li, and W. Zhang, "Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control.," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 4348, 2014.
- [88] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, and J. M. DeSimone, "The effect of particle design on cellular internalization pathways.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 33, pp. 11613–11618, 2008.
- [89] G. H. Woehrle, L. O. Brown, and J. E. Hutchison, "Thiol-Functionalized , 1 . 5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions : Scope and Mechanism of Ligand Exchange," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 7, pp. 2172–2183, 2005.