

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

POSGRADO EN NANOTECNOLOGÍA

**“Obtención y Caracterización de una Nanoplataforma
Funcional Compuesta por Nanovarillas de Oro-PLGA-
Quitosano-PVA”**

TESIS

Que para obtener el título de:

Maestría en Nanotecnología

Presenta:

Gloria Irma Tapia Ayala

Director de Tesis:

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

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

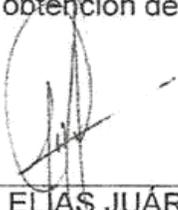
VOTOS APROBATORIOS

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: "**Obtención y Caracterización de una Nanoplateforma Funcional Compuesta por Nanovarillas de Oro-PLGA-Quitosano-PVA**", presentada por:

GLORIA IRMA TAPIA AYALA

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:



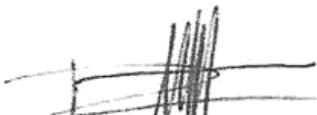
DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE



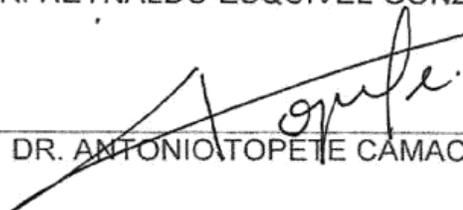
DR. MIGUEL ÁNGEL VALDÉS
COVARRUBIAS



DR. CÉSAR RODRÍGUEZ BEAS



DR. REYNALDO ESQUIVEL GONZÁLEZ



DR. ANTONIO TOPETE CAMACHO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme lograr mis metas.

A la Universidad de Sonora por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado como becario en la realización del trabajo de tesis, con número de proyecto 236185.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Josué Elías Juárez Onofre, Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias, Dr. César Rodríguez Beas, Dr. Reynaldo Esquivel González, Dr. Antonio Topete Camacho.

Al Posgrado en Nanotecnología por acogerme en sus aulas y a los maestros por guiarme y asesorarme, especialmente al Dr. Enrique Álvarez por permitirme ingresar al posgrado.

A los que fueron parte de este proyecto: M.C. Jaime Manuel Ibarra Hurtado, M.C. Mario Eduardo Almada Ortiz, Dr. Roberto Carlos Carrillo Torres, M.N. Carlos Guadalupe Pérez Hernández, M.N. José Ángel González Olmos, M.N. Jesús Alán Pérez Aguirre, ya que su apoyo, asesoramiento y consejos fueron clave para la realización de esta investigación.

A mis amigos y compañeros del posgrado por acompañarme durante mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

A mis padres, Bernardo y Gloria Irma, por su gran amor.

A mis hermanos, Bernardo y Edgardo, por su apoyo y cariño.

A mis sobrinos, Edgardo, Bernardo e Isaac, por convertir cualquier momento en diversión y risas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	3
Oro.....	3
Nanopartículas de oro	3
Plasmón de Resonancia Superficial	4
Nanovarillas de oro.....	5
Polímeros biodegradables	7
Ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)	8
Nanopartículas de PLGA.....	9
Quitosano	10
Polivinil alcohol (PVA).....	11
Nanopartículas híbridas	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
Objetivo General.....	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Síntesis de Nanopartículas	15
Síntesis de Nanovarillas de oro.....	15
Obtención de nanopartículas de PLGA	15
Obtención de la nanoplateforma GNR-PLGA.....	16
Nanoplateforma GNR-PLGA con Quitosano.....	16
Modulación de la carga de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano con PVA	16

Métodos de caracterización	17
Dispersión de Luz Dinámica.....	17
Potencial zeta.....	17
Espectroscopia de absorción Ultravioleta - Visible.....	19
Microscopia de Fuerza Atómica	19
Microscopia Electrónica de Transmisión	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Síntesis de Nanopartículas	23
Obtención de nanopartículas de PLGA	23
Síntesis de nanovarillas de oro	24
Obtención de la nanoplataforma nanovarillas de oro-PLGA (GNR-PLGA)	25
Nanoplataforma GNR-PLGA con Quitosano.....	31
Adsorción para la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano	35
Modulación de carga de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano con PVA.....	40
Adsorción de PVA sobre la superficie de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano	43
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño de partícula y potencial ζ para las partículas de PLGA obtenidas.....	23
Tabla 2. Tamaños de partícula y potencial ζ de la nanoplataforma GNR-PLGA.....	26
Tabla 3. Tamaño de partícula y potencial ζ para la nanoplataforma GNR-PLGA cubiertas con Quitosano.....	31
Tabla 4. Tamaño de partícula y potencial ζ en base a la variación de concentración de PVA.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tamaños y comparaciones de escalas [2].	1
Figura 2. Esquema representativo del plasmón de resonancia superficial para una las nanoesferas y nanovarillas [52].	5
Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis representativo de las nanovarillas de oro [53].	6
Figura 4. Estructura química del CTAB.	7
Figura 5. Estructura del ácido poli(láctico-co-glicólico).	9
Figura 6. Estructura química del Quitosano.	11
Figura 7. Fórmula química del polivinil alcohol.	11
Figura 8. Ejemplo de nanopartícula híbrida [54].	12
Figura 9. Potencial ζ y la doble capa eléctrica [45].	18
Figura 10. Imagen AFM de nanopartícula de PLGA.	23
Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis de las nanovarillas de oro obtenidas.	24
Figura 12. Micrografías TEM de las nanovarillas de oro obtenidas.	25
Figura 13. Suspensión de la nanoplateforma GNR-PLGA con diferentes concentraciones de GNR.	26
Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis de las soluciones de la nanoplateforma GNR-PLGA variando las concentraciones de GNR.	27
Figura 15. Espectro de absorción UV-Vis con 1.29×10^{-12} M de GNR en agua.	27
Figura 16. Imágenes AFM de la nanoplateforma GNR-PLGA con una concentración de a) 1.29×10^{-12} M y b) 1.33×10^{-12} M, c) 2.67×10^{-12} M, d) 2.78×10^{-12} M, e) 3.27×10^{-12} M y f) 5.53×10^{-12} M.	29
Figura 17. Micrografía TEM de la nanoplateforma GNR-PLGA (sin tinción).	30
Figura 18. Gráfica de tamaño de partícula contra concentración de quitosano.	32
Figura 19. Gráfica de concentración de Quitosano con respecto al potencial ζ .	33
Figura 20. Imágenes AFM de NP GNR-PLGA con Quitosano, (a) 1×10^{-8} M, (b) 1.66×10^{-8} M, (c) 2.66×10^{-8} M, (d) 4×10^{-8} M, y (e) 8×10^{-8} M.	34
Figura 21. Concentración de Quitosano contra Potencial ζ normalizado con ajuste a modelo de adsorción de Langmuir.	36
Figura 22. Esquema representativo de la NP GNR-PLGA cubierta con Quitosano a diferentes concentraciones.	38

Figura 23. Concentración de Quitosano contra Potencial ζ normalizado con ajuste a modelo de adsorción de Freundlich.	38
Figura 24. Gráfica de variación de concentración de PVA con respecto al tamaño de partícula.....	41
Figura 25. Gráfica de la variación de la concentración de PVA con respecto al potencial ζ	41
Figura 26. Imágenes AFM de NP GNR-PLGA cubiertas con Quitosano (8×10^{-8} M) y PVA (4.83×10^{-6} M).	42
Figura 27. Ajuste de modelo de adsorción de Langmuir para la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano cubierta con PVA.....	43
Figura 28. Ajuste de modelo de adsorción de Freundlich para la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano cubierta con PVA.....	44

RESUMEN

En la actualidad, las nanopartículas de oro han generado gran interés en el campo de la medicina, en particular, en el desarrollo de nanoplataformas multifuncionales útiles para el diagnóstico y tratamiento (propiedades teranósticas) de una enfermedad dada como el cáncer. Las propiedades teranósticas son atribuidas a las propiedades físicas, químicas, biológicas, ópticas, eléctricas, entre otras, de las nanopartículas de oro, las cuales son dependientes del tamaño y forma de la nanopartícula. En particular, las nanovarillas de oro presentan una fuerte banda de absorción (plasmón de resonancia, SPR) en la región infrarrojo cercano entre 650-1200 nm, el cual varía según el espesor y la longitud de la nanovarilla. En esta región del espectro electromagnético, los tejidos biológicos presentan un mínimo de absorción, por lo tanto, la extinción de la radiación electromagnética será llevada a cabo por las nanovarillas, efecto que puede aprovecharse para la implementación de una terapia fototérmica. Por otra parte, el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un polímero biodegradable y biocompatible, propiedades que lo hacen atractivo para una posible aplicación en biomedicina. Además, el PLGA es un polímero ampliamente utilizado en la elaboración de sistemas de transporte, protección y liberación de fármacos (los cuales pueden ser muy tóxicos para las células) o compuestos hidrofóbicos y/o hidrofílicos susceptibles a degradarse en sistemas acuosos, con el objetivo de mantener una liberación del fármaco sostenida, disminuir sus efectos tóxicos, aumentar su estabilidad e incluso dirigir a las nanopartículas a órganos o tejidos específicos.

En el presente trabajo se realizó una nanoplataforma funcional constituida por nanovarillas de oro cubiertas por una matriz polimérica de PLGA. Para la síntesis de las nanovarillas de oro se utilizó el método mediado por semillas, mientras que para la obtención de las nanopartículas de PLGA se usó el método de nanoprecipitación. Ambos métodos fueron reproducibles y se obtuvieron nanopartículas de tamaño homogéneo y estable. La nanoplataforma se caracterizó por DLS para determinar el tamaño de partícula, por medio de movilidad electroforética su potencial ζ , por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) para obtener información sobre la morfología y tamaño de partícula, y absorción UV-Vis para la obtención del plasmón de resonancia superficial.

ABSTRACT

Nowadays, gold nanoparticles have generated great interest, in particular, in healthy fields as biomedicine in the development of multifunctional nanoplatforms that are useful for diagnosis and treatment (theranostic properties) of a given disease such as cancer. Theranostic properties can be attributed to the physical, chemical, biological, optical, electrical, among other properties of gold nanoparticles, which are size and form dependent of the nanoparticle. In particular, gold nanorods show a strong band absorption (superficial plasmon resonance, SPR) in the near infrared region between 650-1200 nm, which varies according to the diameter and length of the nanorod. In this region of the electromagnetic spectrum, biological tissues present a minimum of absorption, therefore, the extinction of the electromagnetic radiation will be held by the nanorods, effect that can be useful for the implementation of photothermal therapy. On the other hand, PLGA is a biodegradable and biocompatible polymer, with properties that make it attractive for a possible application in biomedicine. Besides, PLGA is a polymer widely used in the development of transport systems, protection and drug delivery, which can be very toxic for cells, or hydrophobic and/or hydrophilic compounds that are susceptible to degrade in aqueous systems, with the objective to maintain a sustained drug release, decrease its toxic effects, increase its stability and even lead nanoparticles to specific organs or tissues.

In the present work, we performed a functional nanoplatform constituted of gold nanorods covered by a PLGA matrix. For the syntheses of gold nanorods, the seed-mediated method was used, while for the obtention of PLGA nanoparticles, we used the nanoprecipitation method. Both methods were reproducible and stable nanoparticles of uniform size were obtained. The nanoplatform was characterized by DLS to obtain its particle size, by electrophoretic mobility its ζ potential, by AFM and TEM to obtain information about its morphology and particles size, and UV-Vis absorption to obtain its surface plasmon resonance.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología surge de la interrelación de diversas áreas de la ciencia y la tecnología con el objetivo de manipular y controlar la materia a nivel molecular para la fabricación de nanodispositivos de menos de 1 micrómetro [1,2] y al día de hoy, la nanotecnología se ha convertido en un campo que ha crecido rápidamente con aplicaciones potenciales que van desde electrónicos hasta cosméticos [3]. El prefijo “nano” significa 10^{-9} . En la escala métrica de medidas lineales, un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro [4]. Para tener una idea de la escala nanoscópica, en la Figura 1 se muestra una escala de los tamaños de algunos organismos vivos y moléculas.

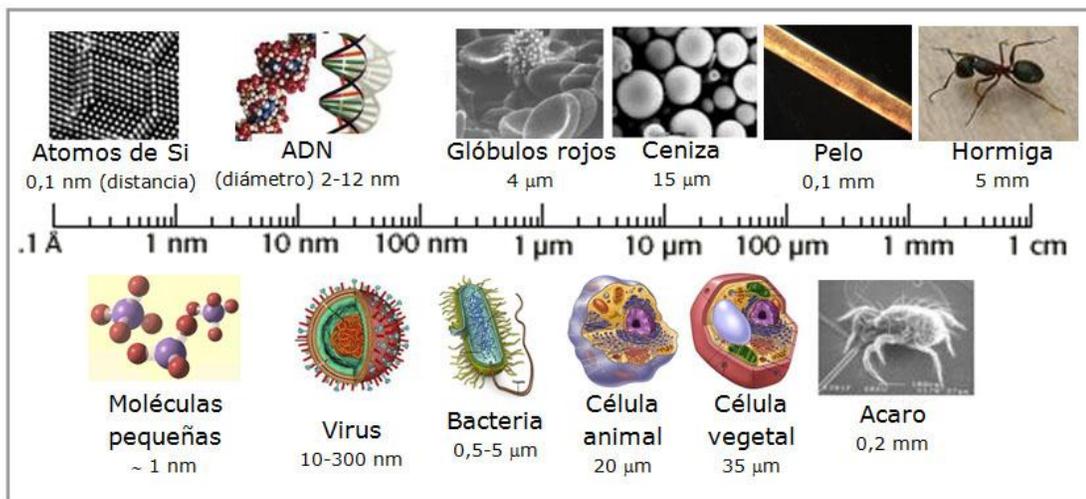


Figura 1. Tamaños y comparaciones de escalas [2].

Cuando la materia está en escala nanoscópica (nanomateriales) nuevas propiedades físicas y químicas emergen, entre las que se encuentran las ópticas, magnéticas y electrónicas. Dichas propiedades fisicoquímicas pueden ser explotadas en diversos campos de la ciencia, tecnología e industria, por lo que las nanopartículas (NPs) son de gran interés para la química, física, electrónica, biología, medicina, por mencionar algunas [5]. Por ejemplo, en biología y medicina, los nanomateriales tanto orgánicos como inorgánicos, tienen una amplia gama de aplicaciones debido a sus extraordinarias propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas, mecánicas y químicas. Entre las aplicaciones biológicas y médicas en las que se propone el uso de nanomateriales está: la detección biomolecular, agentes de contraste por imagen, vehículos de

administración de fármacos en forma de micelas y vesículas, terapia para enfermedades, y como andamios en aplicaciones de ingeniería tisular [6].

Actualmente, una de las potenciales aplicaciones es la posible implementación de novedosas terapias médicas que se basan en la administración de NPs poliméricas, metálicas o cerámicas, e incluso híbridas cargadas con fármacos, con la finalidad de combatir patologías como el cáncer de manera más efectiva, disminuyendo así los efectos adversos que se manifiestan en los tratamientos tradicionales, caso particular la quimioterapia [7,8].

Gracias a la relación área superficial-volumen, los dispositivos a nanoescala pueden fácilmente interactuar con biomoléculas como proteínas, enzimas y receptores celulares. Además, el hecho de que puedan alcanzar y acceder a diferentes partes del cuerpo, hace que las NPs puedan ser utilizadas en el diagnóstico de una enfermedad dada, como el cáncer y, adicionalmente, implementar un tratamiento.

Actualmente, el trabajo de investigación que se realiza se enfoca a implementar de manera segura estas novedosas herramientas en el área, por ejemplo, las NPs pueden proveer información detallada en el progreso de una enfermedad [9]. Las propiedades únicas y la utilidad de las NPs se derivan de una variedad de factores, incluyendo el tamaño similar de las NPs y biomoléculas como las proteínas y los ácidos polinucleicos [10].

MARCO TEÓRICO

Oro

El oro fue uno de los primeros metales descubiertos por el ser humano y ha sido utilizado desde hace varios miles de años [11]. Se descubrió en Bulgaria hace 5 mil años. El oro coloidal se utilizó en la antigua China y Egipto para propósitos terapéuticos y decorativos. Los coloides de oro han sido recomendados para curar varias enfermedades a lo largo de los siglos hasta la actualidad, aunque sus mecanismos de acción aún no están completamente esclarecidos [12].

A diferencia del oro a macroescala, el oro a nanoescala puede exhibir colores vívidos, que surgen de la interacción con la luz (plasmón de resonancia). Las características plasmónicas son objeto de interés para los químicos, físicos y ahora practicantes de biomedicina [13].

Nanopartículas de oro

Las NPs de oro han generado gran interés científico y tecnológico debido a su facilidad de síntesis, estabilidad química y propiedades ópticas únicas [14]. Además, la aplicación de estos nanomateriales en medicina tiene un gran potencial debido a que cuentan con excelentes propiedades de biocompatibilidad, las cuales las hacen factibles para su uso en el ámbito clínico [15].

Actualmente, las NPs de oro son utilizadas en una amplia gama de investigaciones médicas y biológicas. Por ejemplo, en genómica en el desarrollo de biosensores, inmunoensayos; química clínica, detección y fototermólisis de microorganismos y células cancerígenas; distribución selectiva de medicamentos, péptidos, ADN y antígenos; bioimagen óptica, monitoreo de células y tejidos con el uso de sistema de grabación nanofotónica [11]. Debido a su tamaño comparable en relación a biomoléculas y proteínas, las NPs de oro también pueden interactuar con procesos fisiológicos y modificarlos cuando están específicamente localizadas dentro de las células y tejidos [13]. Dichas NPs se han propuesto para uso en prácticamente todas las aplicaciones médicas, incluyendo diagnóstico, terapia, profilaxis e higiene [11].

Las NPs plasmónicas de metales nobles como oro y plata se distinguen de otras NPs tal como los semiconductores, puntos cuánticos, NPs poliméricas y magnéticas, por su plasmón de resonancia, mejora todas las propiedades radiactivas y no radiactivas de las NPs y ofrece múltiples modalidades para aplicaciones biológicas y médicas [15].

Para propósitos médicos, las NPs de oro son consideradas como un material biocompatible, presentando muy baja toxicidad a altas concentraciones y no afecta la función de los órganos después de una exposición prolongada [16]. Además, el plasmón de resonancia superficial de este tipo de NPs puede modularse en un amplio rango de longitudes de onda, desde 500 nm hasta 1200 nm, controlando el tamaño y la forma de la nanopartícula. Por ejemplo, para una nanovarilla de oro, podemos obtener un plasmón de resonancia en el rango de 800-1200 nm simplemente controlando la relación de aspecto (longitud/anchura) de la nanovarilla. Este rango del espectro electromagnético de la ventana infrarrojo cercano (800-1200 nm), conocida como ventana espectral biológica, es particularmente atractiva para aplicaciones médicas debido a la alta transmitancia, es decir, una baja absorbancia por las moléculas presentes en los tejidos y fluidos biológicos, propiedad que se aprovecha para la terapia fototérmica [17].

Plasmón de Resonancia Superficial

Las propiedades ópticas de las partículas metálicas se originan del plasmón de resonancia superficial [18]. Cuando una partícula metálica se expone a luz, el campo eléctrico oscilatorio de la luz induce una oscilación colectiva coherente de los electrones libres (electrones de la banda de conducción) del metal. Esta oscilación de electrones alrededor de la superficie de la partícula causa una separación de cargas, formando un dipolo que oscila a lo largo de la nanopartícula en la dirección del campo eléctrico de la luz. La amplitud de oscilación alcanza un máximo a una frecuencia específica, llamada plasmón de resonancia superficial (SPR, por sus siglas en inglés). El SPR induce una fuerte absorción de la luz incidente y por lo tanto puede ser medido usando un espectrómetro de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis). El tipo de metal, el tamaño de partícula, la forma, la estructura y la composición de la partícula, son factores que pueden afectar la intensidad de banda del SPR [15]. En la Figura 2 se muestra el

plasmón de resonancia de nanoesferas y nanovarillas de oro (GNR, por sus siglas en inglés), donde se puede ver el campo eléctrico de la luz (flechas rojas) y cómo la respectiva separación de cargas se va dando; en el caso de las GNR tanto en el eje longitudinal como en el eje transversal.

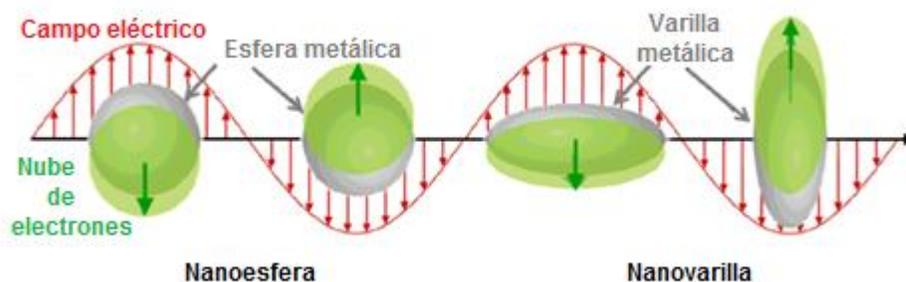


Figura 2. Esquema representativo del plasmón de resonancia superficial para una las nanoesferas y nanovarillas [52].

Nanovarillas de oro

El control en la forma y tamaño de las nanopartículas (NPs) es una de las tareas más importantes en cuanto a la síntesis de NPs metálicas. El tamaño puede influir en las propiedades ópticas de dichas NPs. Las NPs metálicas en forma de varilla pueden ser sintetizadas con plantilla o con agentes reductores débiles, como el ácido ascórbico, y catalizadores en la presencia de surfactantes, método por el cual surfactantes neutros o cargados son utilizados como andamios para hacer crecer las NPs [15,19].

Estas NPs son de gran interés desde el punto de vista de sus propiedades ópticas, las cuales dependen tanto de su tamaño como de su forma. Dichas propiedades ópticas están relacionadas a la interacción entre los electrones de la banda de conducción y el campo eléctrico incidente de la radiación electromagnética; en el caso de algunos metales, como el oro o la plata, muestran intensas bandas de absorción características en la región visible del espectro electromagnético (380-780 nm). La formación de nanovarillas en solución puede ser monitoreada usando espectroscopia UV-Vis-infrarrojo cercano (NIR) [20].

Cuando se cambia la forma de una nanopartícula de esfera a varilla, la banda de SPR se divide en dos bandas: una banda intensa en la región del NIR (800 nm), la cual corresponde a la oscilación de electrones a lo largo del eje longitudinal, referida como banda longitudinal, y una banda débil en la región visible (500 nm) a una longitud de onda similar a la de las nanoesferas de oro, referida como la banda transversal (Figura 3) [15]. Al hacer este cambio, también se aumentan sus secciones transversales de absorción y dispersión. Cabe destacar que el plasmón superficial de las nanovarillas es el más fuerte de las diferentes formas de NPs de oro y plata [21].

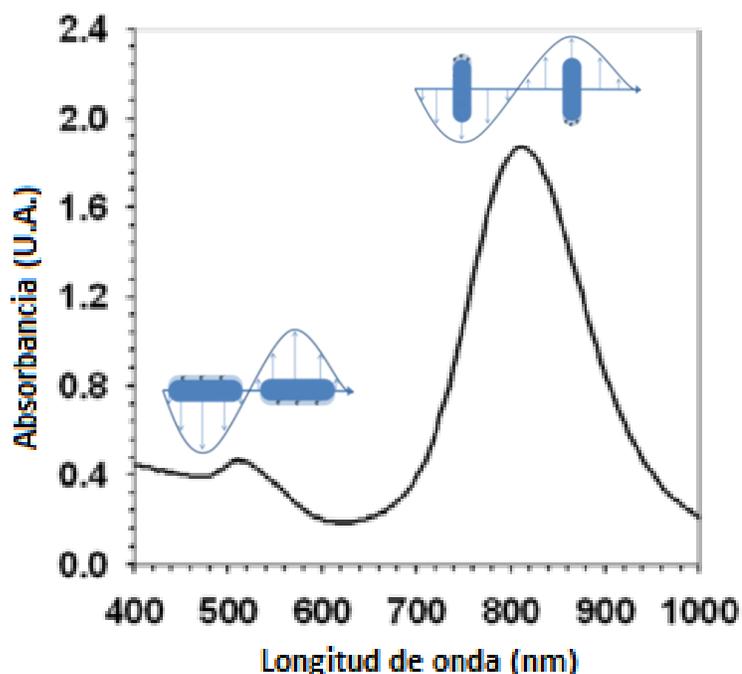


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis representativo de las nanovarillas de oro [53].

Uno de los procesos de síntesis utilizado para la obtención de nanovarillas de oro (GNR) es el método de crecimiento longitudinal mediado por semillas de oro, en el cual se utilizan las semillas de oro como núcleos de agregación. La solución de semillas contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Figura 4) y ácido cloroáurico (HAuCl₄ - sal de oro). Después, se le añade borohidruro de sodio (NaBH₄), un agente reductor fuerte, y este reduce la sal de oro para la formación de nanoesferas de oro de aproximadamente 2-4 nm. Por otra parte, la solución de crecimiento contiene en su mayoría CTAB, nitrato de plata (AgNO₃) y HAuCl₄. Aquí, la sal de oro se reduce a Au⁺¹

con un agente reductor débil (ácido ascórbico). Después, se añaden semillas de oro a la solución de crecimiento, lo cual causa que los iones de Au^{+1} se reduzcan a oro metálico, Au^0 , sobre la superficie de las semillas de oro, resultando en la formación de GNR [20].

Existen diferentes mecanismos que explican la formación de las GNR, sin embargo, no se conoce exactamente cómo es que esto sucede. Dicho mecanismo está en función de los reactivos y del ambiente químico. El mecanismo de crecimiento de unión preferencial (PBDG, por sus siglas en inglés), explica que el CTAB se une preferentemente a ciertos planos cristalinos. De esta forma, la capa de surfactante en los planos cristalinos impide la reducción de iones de oro en dicha superficie. Por ejemplo, se sabe que el plano $\{110\}$ tiene mayor energía superficial que otros, dicha energía superficial permite que el CTAB se adhiera de manera preferencial a este plano cristalino. Esta unión permite que entre más cubierto esté el plano de CTAB, la cantidad de iones capaces de reducirse en dicho plano disminuye. Por lo tanto, ocurre un crecimiento hacia afuera en la cara $\{100\}$, mientras se limita en la cara $\{110\}$, lo cual resulta en partículas con forma de varilla [22].

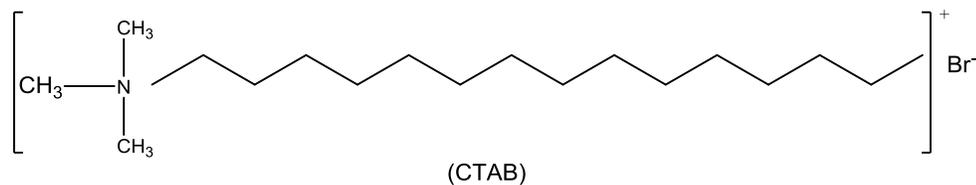


Figura 4. Estructura química del CTAB.

Polímeros biodegradables

Se puede definir como biomaterial a los materiales que están destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [23].

Son materiales biodegradables cuyo origen puede ser sintético o natural y son degradados *in vivo*, ya sea enzimáticamente o no [24]. Dependiendo del modo de degradación, estos pueden clasificarse en polímeros degradables hidrolíticamente y

polímeros degradables enzimáticamente. Los polímeros naturales se pueden considerar como los primeros biomateriales biodegradables usados clínicamente [25]. En la degradación en un organismo vivo se obtienen productos biocompatibles que no son tóxicos, los cuales se eliminan por caminos metabólicos normales. Existe una categoría básica de los biomateriales que son utilizados en el área de liberación de fármacos: a) polímeros biodegradables sintéticos, los cuales incluyen materiales hidrofóbicos derivados de la familia de los ácidos carboxílicos (en esta familia se incluye el ácido poli (láctico-co-glicólico (PLGA)), y b) polímeros naturales, como polímeros de polisacáridos (quitosano) [24].

Algunas de las propiedades más importantes que debe reunir un material biodegradable son las siguientes:

- Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben ser capaces de metabolizarse en el cuerpo.
- El material debe tener permeabilidad apropiada y ser procesables en las aplicaciones previstas.
- El material no debe traer consigo una respuesta tóxica después de implantarse en el cuerpo [25].

Ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)

El PLGA es uno de los polímeros biodegradables más utilizado en aplicaciones biomédicas ya que su hidrólisis lleva a monómeros de metabolitos, ácido láctico y ácido glicólico. Debido a que estos dos monómeros fácilmente son metabolizados en el ciclo de Krebs, la toxicidad sistemática al utilizar PLGA para liberación de fármacos es baja o nula [26]. El PLGA es biodegradable y biocompatible, lo cual lo hace factible para un sistema a nanoescala, proveyendo una liberación a largo plazo de algún agente terapéutico encapsulado y degradándose en productos biocompatibles. El material facilita el control de propiedades físicas como el tamaño, carga y grupos funcionales reactivos, estos últimos pueden utilizarse para anclar químicamente moléculas en la superficie de las NPs dirigirlas a órganos y tejidos blancos específicos [27]. En la Figura 5, se muestra la estructura molecular del PLGA, donde x es el número de unidades de ácido láctico, mientras que y es el número de unidades de ácido glicólico.

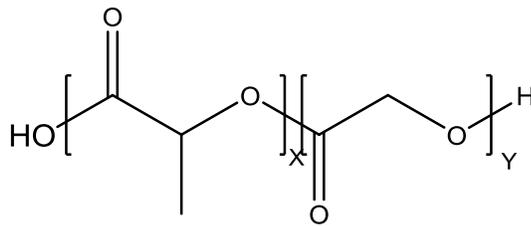


Figura 5. Estructura del ácido poli(láctico-co-glicólico).

El PLGA puede sintetizarse en cualquier tamaño y relación de los bloques que lo componen, el ácido láctico y el ácido glicólico, y puede encapsular moléculas de distintos pesos moleculares. Es soluble en una amplia variedad de solventes orgánicos comunes incluyendo acetona, etil acetato, tetrahidrofurano, etc., mientras que es insoluble en agua y se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster. La presencia de grupos metilo en el ácido poli láctico lo hace más hidrofóbico que el ácido poli glicólico, por lo tanto, copolímeros de PLGA ricos en láctico son menos hidrofílicos, absorben menos agua y se degradan más lentamente [24]. Además, el PLGA está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration; agencia federal de los Estados Unidos que se encarga de proteger la salud pública mediante la regulación de medicamentos de uso humano y veterinario y otros productos biológicos) para el uso en varios sistemas de liberación de fármacos en humanos [26].

Nanopartículas de PLGA

Existen diferentes métodos para la preparación de NPs de PLGA como el de evaporación de solvente, polimerización de monómero y nanoprecipitación [28].

Las NPs de PLGA que son cargadas con algún fármaco por lo general son obtenidas por el método de nanoprecipitación, en la cual el polímero es disuelto en acetona y se añade a una solución acuosa, después la acetona se evapora dejando las NPs de PLGA [24]. La liberación de fármacos y la respuesta efectiva de dichas está influenciada por la modificación de la superficie, el método de preparación, el tamaño de partícula, el peso molecular del PLGA y del fármaco que está siendo encapsulado y

la relación de las fracciones de láctico y glicólico. Según bibliografía, se sabe que éstas NPs son medios de transporte efectivos de fármacos [26].

Dichas NPs biodegradables ofrecen numerosos beneficios para el tratamiento de una enfermedad dada como el cáncer, ya que tienen la capacidad de circular a través de los capilares biológicos, acumularse en tejidos tumorales, los cuales se caracterizan por una mayor permeabilidad y retención (EPR, por sus siglas en inglés) en comparación con un tejido sano e internalizarse al interior de las células y liberar el fármaco. El efecto EPR puede ser usado como enfoque de orientación pasiva, ya que permite el paso de portadores de fármacos entre 10 y 500 nm a través de vasos sanguíneos altamente permeables que suministran nutrientes a tumores en crecimiento [29].

Las NPs de PLGA presentan ventajas, entre las cuales está que protegen a los fármacos de degradarse mejorando su estabilidad. También, debido a su tamaño, estas NPs pueden penetrar tejidos específicos, lo cual permite la liberación específica de fármacos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos a tejidos diana. Pueden aumentar la eficacia de tratamiento debido a la liberación sostenida de agentes terapéuticos de NPs estables [26].

El PLGA cuenta con una carga de superficie negativa, lo cual tiende a limitar su captación celular, por lo tanto, se han hecho intentos de modificar la superficie de dichas NPs usando polímeros catiónicos como el quitosano [30]. Sin embargo, el proceso de recubrimiento de la superficie de las NPs de PLGA con quitosano tiene como resultado la inversión de la carga superficial de negativo a adquirir una carga superficial positiva, debido a la adsorción del quitosano. Se ha reportado [31] que partículas catiónicas suelen ser muy citotóxicas, por lo que se recomienda regular la carga con otros polímeros hidrofílicos solubles como el polivinil alcohol (PVA).

Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico obtenido por la desacetilación de la quitina, es no tóxico, biodegradable y biocompatible. La protonación de su grupo amino permite que el polímero pueda solubilizarse en soluciones ácidas, el cual puede interactuar con

material cargado negativamente [32]. En la Figura 6 se observa la estructura química del quitosano.

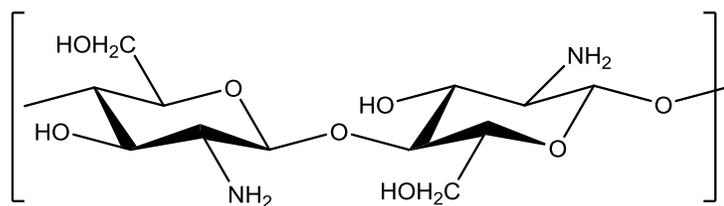


Figura 6. Estructura química del Quitosano.

Se ha utilizado para aplicaciones en nanomedicina en liberación de fármacos y proteínas ya que tiene la capacidad de proteger macromoléculas bioactivas de degradación enzimática y química *in vivo* y también facilita el transporte de macromoléculas cargadas a través de células epiteliales absorbentes [32,33].

Polivinil alcohol (PVA)

El PVA es uno de los estabilizadores poliméricos más utilizados en la producción de NPs de PLGA ya que forma partículas de tamaños relativamente pequeños con una distribución uniforme de estos. Al cubrir las NPs de PLGA con PVA se forma una red interconectada con el polímero en la interface, ya que una fracción de PVA permanece asociada con la nanopartícula aún después de repetidas lavadas [35]. En la Figura 7 se puede observar la fórmula química del PVA.

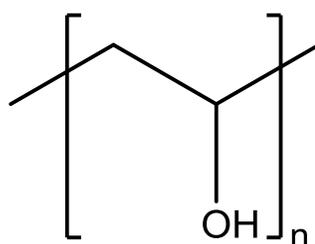


Figura 7. Fórmula química del polivinil alcohol.

Nanopartículas híbridas

Un material híbrido es considerado todo aquello que resulta de la mezcla de dos o más elementos de diferente naturaleza, por lo tanto, no es puramente ninguno de las partes

que lo compuso si no que toma elementos de todas ellas para convertirse en algo nuevo [23].

Uno de los retos existentes en la nanomedicina es el de crear plataformas que combinen liberación de fármacos con herramientas de diagnóstico, las cuales puedan tener precisión y eficacia para obtener un mejor tratamiento. Esto, se puede lograr diseñando nanoplataformas multifuncionales, las cuales, puedan mejorar la solubilidad de agentes terapéuticos en medio acuoso, y a su vez orientarlas a sitios intracelulares deseados, así como darle seguimiento a su ruta [36]. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de cómo estaría compuesta una nanopartícula híbrida teniendo una parte inorgánica que actúe como agente terapéutico y una parte orgánica que brinde compatibilidad, orientación a sitios específicos y provea estabilidad. También existe la posibilidad de agregar agentes de contraste orgánicos e inorgánicos para monitorear su ruta.

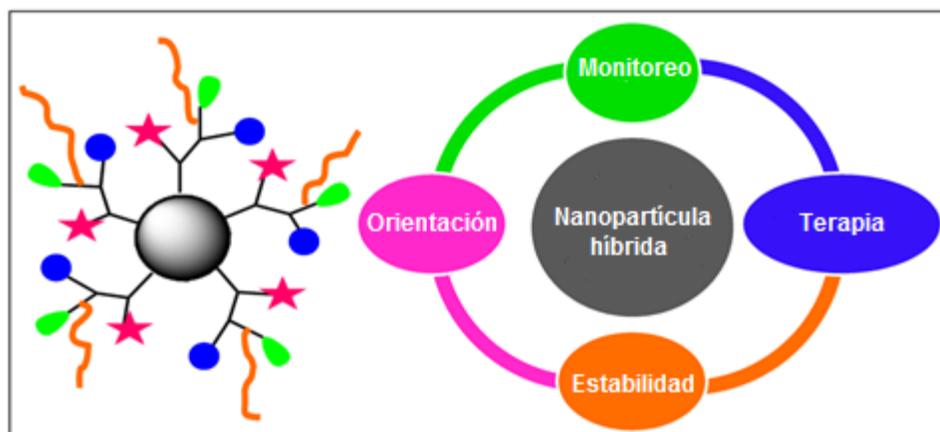


Figura 8. Ejemplo de nanopartícula híbrida [54].

Cuando se incorporan tanto funciones de diagnóstico como terapéuticas en un sistema a nanoescala único, se dice que es un dispositivo teranóstico, en el cual dichas funciones pueden ser administradas en sólo una dosis. Una de las funciones que presentan las NPs al combinar funciones de imagen y terapia es que la biodistribución de los materiales puede ser monitoreada *in vivo* y así reducir efectos secundarios no deseados de la toxicidad de fármacos o daño inducido por hipertermia en tejido sano [37].

HIPÓTESIS

El PLGA es un material polimérico adecuado para preparar una nanoplataforma funcional compuesta por nanovarillas de oro y estabilizada con quitosano y PVA.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener y evaluar las propiedades fisicoquímicas de una nanoplataforma funcional constituida por nanovarillas de oro, PLGA, quitosano y PVA.

Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar nanopartículas de PLGA.
- Sintetizar y caracterizar nanovarillas de oro.
- Obtener y caracterizar una matriz de nanovarillas de oro – PLGA.
- Estabilizar la nanoplataforma GNR-PLGA con Quitosano.
- Modular la carga de superficie de la nanoplataforma con PVA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de Nanopartículas

Síntesis de Nanovarillas de oro

Existen diferentes métodos para la producción de varillas de oro; en este caso se utilizó el método de crecimiento por semilla [42]. Todo material se lavó con agua regia previo a los experimentos. Las semillas de oro se prepararon añadiendo 100 μ l de borohidruro de sodio (NaBH_4) frío a 5 ml de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (0.1 M) y ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (25 mM) bajo agitación magnética. Después de dos minutos, se detiene la agitación magnética y la solución de semillas se deja reposar a 33 °C por 30 min. La solución de crecimiento se prepara mezclando CTAB (0.1 M), HCl (0.08 M), HAuCl_4 (0.5 mM) y AgNO_3 (0.08 mM) en un medio acuoso [43]. Con el NaBH_4 , se redujo el AuCl_4 (III) a AuCl_4 (0) para hacer NPs esféricas (~3 nm) como semillas que están protegidas con el surfactante catiónico CTAB. Las semillas de NPs de oro crecieron en la solución de crecimiento que contiene sales de oro, ácido ascórbico (agente reductor débil) y CTAB. Las moléculas de CTAB se van uniendo a lo largo del eje longitudinal para el crecimiento de las varillas [20].

Obtención de nanopartículas de PLGA

Para la síntesis de NPs de PLGA se utilizó el método de nanoprecipitación, en el cual el polímero se disuelve en un solvente miscible en agua y se inyecta a una solución acuosa en agitación. Cuando ambas fases están en contacto, el solvente se difunde de la fase orgánica al agua y lleva consigo algunas cadenas de polímero que aún están en solución. Conforme el solvente se difunde más en el agua, las cadenas de polímero asociadas se agregan formando NPs [44]. Primeramente, se prepara una solución stock de PLGA (10 mg/ml) disuelta en acetona. La fase orgánica se añade gota a gota en la fase acuosa (10 ml) y se mantiene en agitación magnética, 500 revoluciones por minuto (rpm) por un minuto. Transcurrido el minuto, se quita una capa que se forma en la superficie de la solución y nuevamente se agita magnéticamente por 4 minutos más. Una vez pasados los 4 minutos, se deja reposar a temperatura ambiente hasta que el solvente orgánico se evapore completamente y se obtienen las NPs de PLGA.

Obtención de la nanoplataforma GNR-PLGA

Una vez que se sintetizaron las GNR, se procede a obtener la nanoplataforma GNR-PLGA usando el método descrito con anterioridad para obtener las NPs de PLGA. En una solución acuosa, se añade cierta concentración de GNR (1.33×10^{-12} M), bajo agitación magnética con un volumen final de 10 ml. Después, se agregan 600 μ l de solución de PLGA (10 mg/ml) gota a gota y se agita por un minuto. Pasado el minuto, se detiene la agitación, se retira una capa que queda en la superficie de la solución acuosa y se deja agitando por otros 4 minutos. Pasado el tiempo, se deja reposar a temperatura ambiente hasta que el solvente orgánico se evapore completamente.

Nanoplataforma GNR-PLGA con Quitosano

Se realizó una solución stock de quitosano en ácido acético 10 mM. Se utilizó quitosano de baja viscosidad con un peso molecular de 150000 Da. Se mezclaron 0.04 g de quitosano en 20 ml de ácido acético a 10 mM y se dejaron solubilizando toda la noche. Para cubrir las NPs con quitosano, se hicieron soluciones de quitosano con diferentes concentraciones de éste en agua deionizada y se mezclaron con la nanoplataforma GNR-PLGA (10 ml), teniendo un volumen final de 20 ml.

Modulación de la carga de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano con PVA

Una vez que se cubrió la nanoplataforma GNR-PLGA con quitosano y se observó una inversión de carga, se procedió a modular dicha carga cubriéndola con Polyvinil alcohol (PVA). Se hizo una solución de PVA al 3%. Se pesaron 3 gr de PVA y se disolvieron en 100 ml de agua deionizada. Se colocaron los gramos de PVA en el recipiente, seguido de 70 ml de agua deionizada y se colocó bajo agitación magnética a 70 °C en baño maría por 2 horas. Una vez bien diluido, se echaron los otros 30 ml de agua deionizada hasta que estuvo homogéneo. Transcurrido el tiempo y que se observó homogénea la solución, se dejó temperar y se guardó en el refrigerador.

Una vez lista la solución PVA al 3%, se procedió a modular la carga de las nanopartículas. Para ello, se puso bajo agitación magnética cierta concentración de quitosano disuelto en agua deionizada y se hizo un barrido de concentraciones de PVA

(teniendo volumen de 10 ml). Una vez homogenizado, se agregó la nanoplateforma GNR-PLGA (10 ml) para obtener un volumen final de 20 ml.

Métodos de caracterización

Dispersión de Luz Dinámica

También llamada Espectroscopia de Correlación de Fotones (PCS, por sus siglas en inglés) o Dispersión de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés). Las partículas en un líquido siempre están en movimiento debido al movimiento browniano, el cual es el movimiento de las partículas debido al choque al azar con las moléculas del líquido que rodean a la partícula. La relación entre el tamaño de la partícula y su velocidad debido al movimiento browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein [45].

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

donde D es al coeficiente de difusión y se relaciona al radio hidrodinámico R_h de las partículas, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin y η es la viscosidad dinámica.

Potencial zeta

Para determinar el potencial zeta (ζ), se mide la movilidad electroforética y se aplica la ecuación de Henry. La movilidad electroforética se obtiene por medio un experimento electroforético en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas usando Velocimetría de Láser Doppler (LDV, por sus siglas en inglés). Cuando se aplica un campo eléctrico a través de un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. La velocidad de una partícula en un campo eléctrico es comúnmente referida como su movilidad electroforética. Dicha velocidad depende de la fuerza del campo eléctrico o gradiente de voltaje, la constante dieléctrica del medio, la viscosidad del medio y el potencial ζ [45].

La carga neta en la superficie de una partícula en solución afecta la distribución de los iones que rodean la región interfacial, resultando en un aumento de concentración de contraiones que estén cercanos a la superficie de la nanopartícula, por lo tanto, una doble capa eléctrica existe alrededor de la partícula. El líquido que rodea a la partícula

se puede dividir en dos regiones, la región interior, llamada capa de Stern (Figura 9), región donde los iones se encuentran fuertemente unidos a la superficie de la nanopartícula. Después de esta capa, podemos definir una capa exterior, o difusa, donde los iones están menos unidos. Dentro de la capa difusa existe un límite donde los iones y las partículas forman una entidad estable. Si una partícula se mueve, los iones dentro de este límite se moverán con ella, pero cualquier ion que se encuentre más allá de dicho límite no viajará con la partícula. A este límite se le conoce como "slipping plane" y al potencial eléctrico que existe en este límite se le conoce como Potencial ζ .

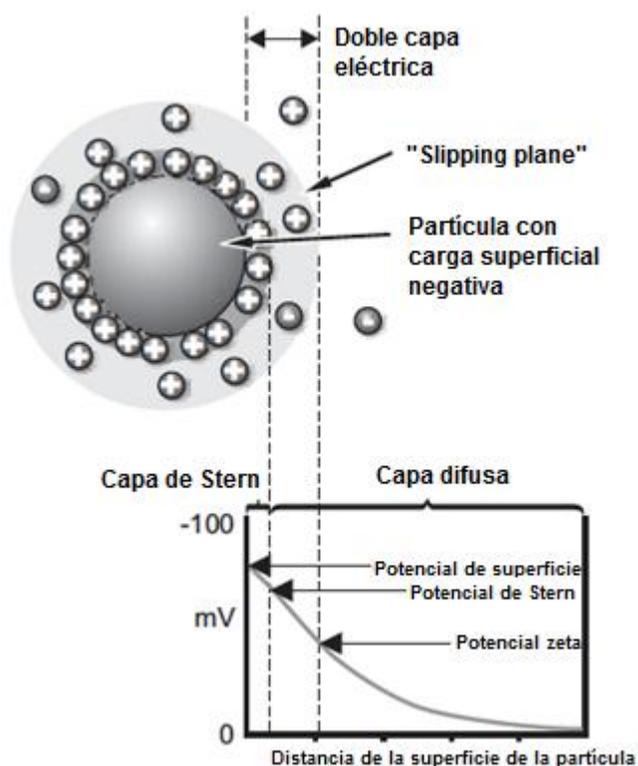


Figura 9. Potencial ζ y la doble capa eléctrica [45].

La magnitud del potencial ζ puede utilizarse como un indicador de la estabilidad para un sistema coloidal. El valor del potencial ζ que define la estabilidad de un sistema coloidal es de +30 y -30 mV. Partículas con un potencial ζ menor a 30 mV son consideradas inestables [45].

Espectroscopia de absorción Ultravioleta - Visible

Es la medida de la atenuación de un haz de luz después de que pasa a través de una muestra o después de la reflexión de una superficie de una muestra. La atenuación puede resultar de absorción, dispersión, reflexión o interferencia. Existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración absorbida, lo cual hace que esta técnica sea atractiva para mediciones cuantitativas. Los fotones UV-Vis son suficientemente energéticos para promover electrones a estados de alta energía en moléculas y materiales. Por lo tanto, la espectroscopia UV-Vis es útil para la exploración de las propiedades electrónicas de los materiales.

El uso de la espectroscopia UV-Vis en la investigación de materiales puede dividirse en dos categorías principales: mediciones cuantitativas de un analito en fase gaseosa, líquida o sólida, y caracterización de propiedades ópticas y electrónicas de un material.

Análisis cuantitativo

La absorbancia de un haz de luz por una muestra es directamente proporcional a la distancia que viaja el haz a través de la muestra y a la concentración de las especies absorbentes. Esta relación lineal se conoce como la ley de Beer-Lambert (también llamada ley de Beer-Lambert-Bouguer o solamente ley de Beer). Cuando se trabaja con unidades de concentración de molaridad, la ley de Beer-Lambert se escribe como

$$A = \varepsilon \times b \times c$$

Donde ε es el coeficiente de extinción molar con unidades de $\text{molaridad}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, b es la longitud de la celda y c es la concentración del analito [46].

Microscopia de Fuerza Atómica

Esta técnica se basa en la separación de fuerzas entre dos cuerpos cualquiera [47]. La microscopia de sonda de barrido (SPM, por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para examinar materiales con una sonda sólida escaneando las superficies. Examina las características de la superficie cuyas dimensiones están en el rango de espacio atómico a la décima parte de un milímetro. Es considerada una de las

herramientas más poderosas actualmente utilizada para examinar la superficie de las estructuras ya que permite “ver” átomos. En 1980, se inventó el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés) [48]. El AFM utiliza fuerzas de campo cercano entre átomos de la punta y la superficie de la muestra, generando señales de topografía de superficie. Utiliza una punta afilada y hace un mapa topográfico de la muestra.

La interacción de fuerzas, atractivas o repulsivas, tan pequeñas como unos pocos nano-Newtons ($nN=10^{-9}$ N) entre la punta y la muestra pueden ser medidas. El cantiléver siente las fuerzas de superficie que surgen de varias interacciones (Van der Waals, electrostáticas, hidratación) entre la punta y la muestra. Cuando la curva de la fuerza se inicia en un punto donde la fuerza y la muestra están separadas, la magnitud de las fuerzas de superficie (actuando entre la punta y la muestra) son bastante insignificantes, y, por lo tanto, no habrá cambio del cantiléver. Conforme la muestra es elevada hacia la punta, una variedad de fuerzas atractivas y repulsivas hacen que el cantiléver se desvíe. [47].

Es necesario saber acerca de las fuerzas de campo cercano que actúan entre la punta y la muestra para entender cómo funciona el AFM. Existen varios tipos de fuerzas de campo cercano, las cuales se describen a continuación.

Fuerzas de corto alcance

Este tipo de fuerza se refiere a las fuerzas atómicas entre los átomos cuando su distancia es cercana al espaciado atómico. Un solapamiento de su función de onda electrónica causa ya sea fuerzas atractivas o repulsivas.

Fuerzas de Van der Waals

Son fuerzas interactivas entre dipolos de moléculas. La fuerza de dispersión, la cual es un tipo de fuerza de Van der Waals entre dipolos que surge de fluctuaciones térmicas o por inducción de campo eléctrico, siempre está presente entre moléculas. Son fuerzas atractivas o repulsivas.

Fuerzas electrostáticas

Se refiere a las fuerzas interactivas entre las cargas eléctricas de la punta y la muestra. Las fuerzas electrostáticas pueden actuar entre una muestra conductiva y una punta si existe un diferencial de potencial eléctrico. Son de atracción o de repulsión dependiendo de los signos de las cargas: cargas negativas frente a cargas negativas o cargas positivas frente a cargas positivas se repelen, mientras que cargas negativas frente a cargas positivas se atraen.

Fuerzas capilares

Son fuerzas que resultan entre la condensación de vapor de agua entre la punta y la muestra. En un entorno de aire, el vapor de agua tiende a formar un núcleo condensado. El núcleo condensado entre la punta y la muestra formará un menisco el cual es similar a la superficie de agua en un tubo capilar [48].

Microscopia Electrónica de Transmisión

La microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es una herramienta clave para entender la microestructura interna de los materiales a un nivel nanométrico. Aunque técnicas como difracción de rayos-x por lo general proveen mejor información cuantitativa que las técnicas de difracción de electrones, los electrones tienen una ventaja importante sobre los rayos-x ya que pueden enfocarse usando lentes electromagnéticas. Esto permite que se obtengan imágenes de materiales de espacio real con resoluciones en el orden de unas pocas décimas a algunos nanómetros dependiendo de las condiciones de las imágenes y simultáneamente obteniendo información de difracción de regiones específicas en las imágenes, tan pequeñas como 1 nm [46].

En un sistema de TEM, un cañón de electrones genera un haz de electrones de alta energía para iluminar. Los electrones son emitidos de un cátodo, una superficie sólida, y son acelerados por alto voltaje para formar un haz de electrones de alta energía con una energía $E = eV_0$. Debido a que la energía cinética de estos determina la longitud de onda de los electrones y esta a su vez determina la resolución del microscopio, el voltaje de aceleración determina la resolución en gran medida. En los microscopios

electrónicos no se pueden usar lentes de vidrio porque el vidrio no enfoca un haz de electrones. Como los electrones tienen cargas eléctricas y estas interactúan con campos magnéticos, se puede usar una fuerza magnética para enfocar el haz de electrones, razón por la cual todos los lentes en un microscopio electrónico son electromagnéticos [48].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de Nanopartículas

Obtención de nanopartículas de PLGA

En la Tabla 1 se muestra el tamaño de las NPs de PLGA obtenidas y el potencial ζ . El tamaño obtenido fue de 146.4 nm y un potencial ζ de -39 mV. Como se puede observar, el potencial ζ de las NPs es negativo, debido a la ionización de los grupos carboxílicos del PLGA presentes en la superficie.

Tabla 1. Tamaño de partícula y potencial ζ para las partículas de PLGA obtenidas.

Muestra	Tamaño de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)
NP PLGA	146.6 \pm 0.06	-39.0 \pm 0.1

La morfología de las NPs de PLGA se determinó por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 10), observándose NPs esféricas de dimensiones similares a los obtenidos por DLS.

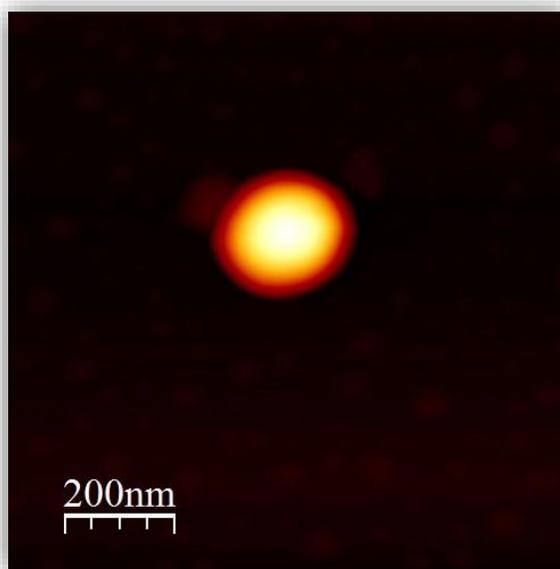


Figura 10. Imagen AFM de nanopartícula de PLGA.

Síntesis de nanovarillas de oro

En la Figura 11 se muestra el espectro UV-Vis de las GNR obtenidas por el método de crecimiento mediado por semillas de oro. Podemos observar dos bandas de absorción a las longitudes de onda en 520 nm y 800 nm, los cuales corresponden al plasmón de resonancia transversal y longitudinal, respectivamente, de los GNRs. En estudios teóricos y experimentales [49] previamente reportados, demuestran que la banda de absorción correspondiente al plasmón de resonancia longitudinal puede utilizarse para determinar el coeficiente de extinción molar y la relación de aspecto (AR, por sus siglas en inglés) de la nanovarilla de oro (longitud del radio longitudinal/longitud del radio transversal (L/T)). Por lo tanto, el coeficiente de absorción de las GNRs obtenidas en este trabajo es de $5.01 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ aproximadamente, con un AR aproximado de 4.3, resultados que concuerdan con el análisis de imagen de las GNRs obtenidas por microscopia de transmisión electrónica (TEM).

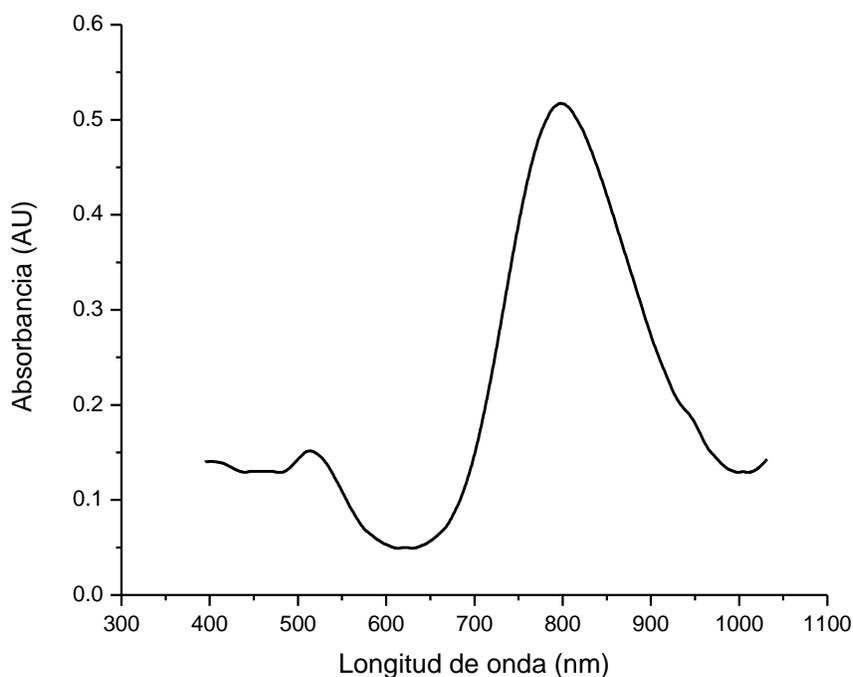


Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis de las nanovarillas de oro obtenidas.

La Figura 12 muestra la geometría de morfología de GNR obtenidas por TEM. De acuerdo a la Figura 12, la longitud del diámetro transversal de las GNRs obtenidas es de 16.5 nm, mientras que su eje longitudinal es de 70.3 nm, con una AR de 4.3,

resultados que concuerdan con los trabajos teóricos y experimentales reportados previamente.

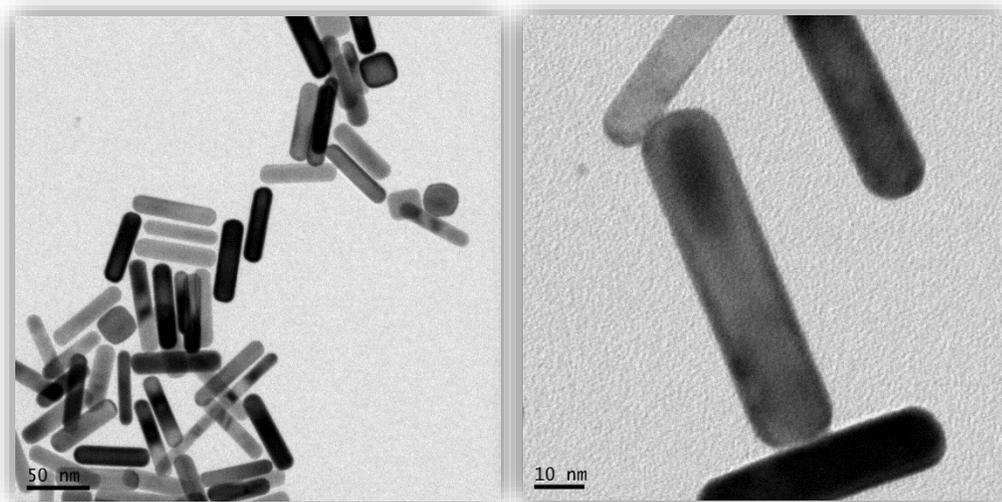


Figura 12. Micrografías TEM de las nanovarillas de oro obtenidas.

Obtención de la nanoplataforma nanovarillas de oro-PLGA (GNR-PLGA)

Para la obtención de la nanoplataforma GNR-PLGA, primero se realizó un barrido de concentraciones de GNR para determinar la concentración adecuada para el desarrollo final de la nanoplataforma funcional. Para esto, se varió la concentración de GNRs desde 1.29×10^{-12} M hasta un máximo de 10.8×10^{-12} M en 10 ml de agua. Es importante mencionar que al añadir GNRs por arriba de 10.8×10^{-12} M el sistema de NPs se aglomeraba y precipitaba. Después se añadió la solución de PLGA (600 μ l) gota a gota y se dejó evaporar la acetona por 24 horas en una campana de extracción.

Caracterización de la nanoplataforma GNR-PLGA

En los resultados de DLS se observó que la nanoplataforma GNR-PLGA aumenta de tamaño comparando con el tamaño de las NPs de PLGA sin modificar. Además, los datos de potencial ζ obtenidos a las concentraciones más bajas de GNRs (1.29×10^{-12} M - 2.67×10^{-12} M) no presentaron cambios significativos conforme aumentaba la concentración de GNR. En base a estos resultados, DLS y potencial ζ , podemos sugerir que los GNRs están siendo encapsulados dentro de la matriz de PLGA y, esencialmente, no afectan la carga superficial de la matriz de PLGA. En la Tabla 2, se muestran los tamaños de partícula y potencial ζ de la nanoplataforma a las diferentes concentraciones de GNR. Por otra parte, cuando se aumenta la concentración de

GNRs, desde 2.78×10^{-12} M – 10.8×10^{-12} M, el tamaño de la nanoplateforma prácticamente no cambia, sin embargo, podemos observar una disminución de su carga superficial respecto a las NPs de PLGA e incluso respecto a las nanoplateformas GNR-PLGA obtenidas a bajas concentraciones, por lo que podemos considerar que la matriz de PLGA se ha saturado y probablemente las GNRs empiezan a adsorberse en la superficie de la nanoplateforma. Este fenómeno resulta en una desestabilización de las NPs y la formación de un sedimento de PLGA. En la Figura 13 se muestra la imagen de la suspensión de la nanoplateforma con diferentes concentraciones de GNR.

Tabla 2. Tamaños de partícula y potencial ζ de la nanoplateforma GNR-PLGA.

Muestra GNR (M) ($\times 10^{-12}$)	Diámetro de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)
1.29	147.1 \pm 0.1	-32.0 \pm 1.2
1.33	150.2 \pm 1.2	-31.1 \pm 0.0
2.67	150.5 \pm 0.6	-30.7 \pm 0.8
2.78	150.3 \pm 1.3	-26.7 \pm 0.2
3.27	151.2 \pm 0.8	-26.7 \pm 0.8
5.53	154.4 \pm 0.1	-26.7 \pm 0.2
7.29	156.4 \pm 0.6	-25.8 \pm 0.3
10.8	150.0 \pm 0.1	-25.2 \pm 0.2



Figura 13. Suspensión de la nanoplateforma GNR-PLGA con diferentes concentraciones de GNR.

En la Figura 14 se muestra el espectro de absorción de las diferentes suspensiones de la nanoplateforma GNR-PLGA donde no se observan los plasmones de resonancia de los GNR, lo cual se atribuye a que el polímero está en la superficie de la nanoplateforma, de tal manera que se aumenta la dispersión de la luz incidente, limitando la absorción de la luz por las GNR.

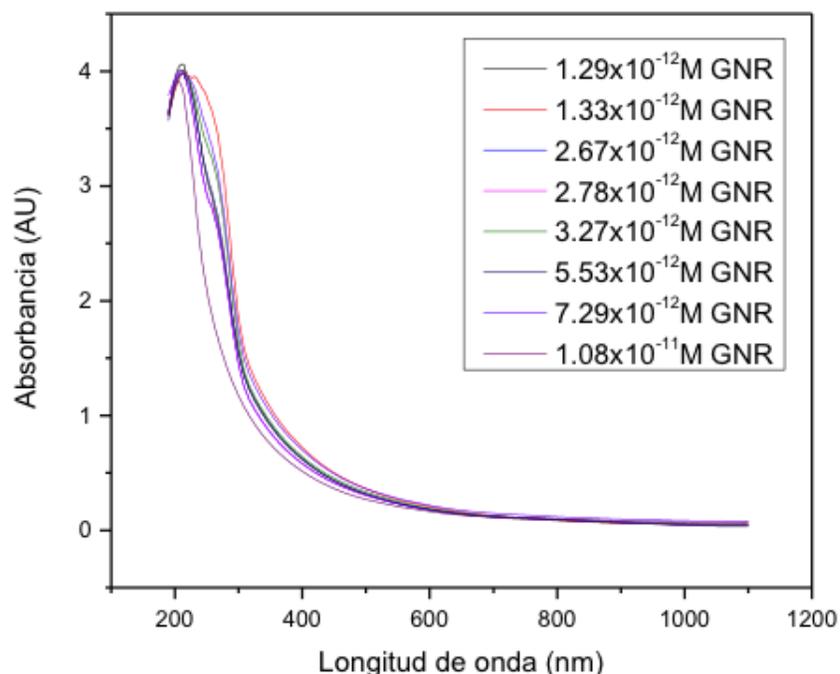


Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis de las soluciones de la nanoplateforma GNR-PLGA variando las concentraciones de GNR.

Esta suposición se corroboró obteniendo el espectro de absorción de una solución de GNR a la concentración más diluida utilizada en la preparación de la nanoplateforma. En la Figura 15 podemos ver que la cantidad de GNRs es suficiente para observar el espectro característico de las GNR.

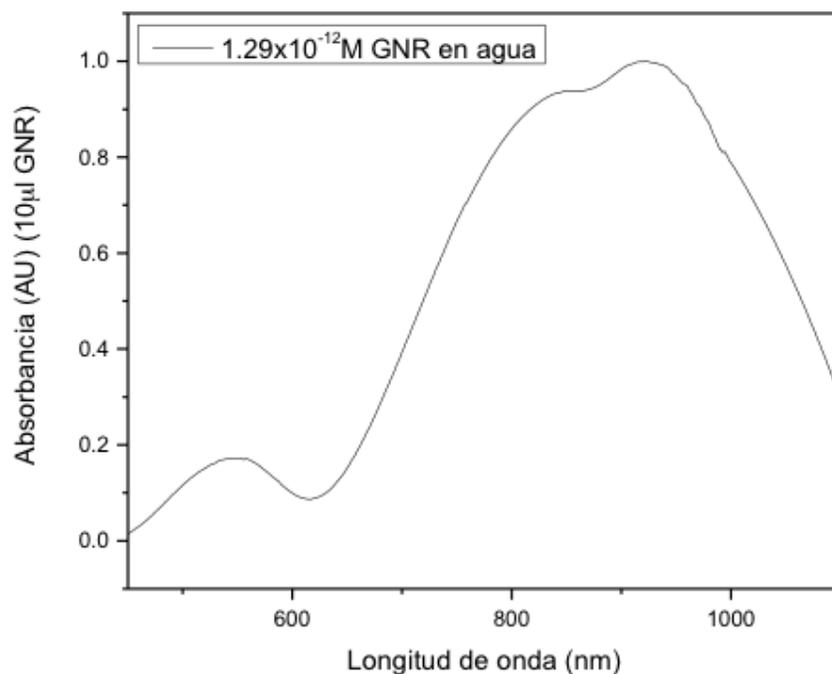


Figura 15. Espectro de absorción UV-Vis con 1.29×10^{-12} M de GNR en agua.

Las imágenes de AFM de la nanoplataforma GNR-PLGA se muestran en la Figura 16. Podemos observar que la forma de la nanopartícula muestra una dependencia con la concentración de GNRs. Se observó una deformación de la nanoplataforma conforme la concentración de GNRs se incrementa. Por ejemplo, la Figura 16a muestra una nanoplataforma esférica, cuando la nanoplataforma se preparó con 1.29×10^{-12} M de GNR. Por otra parte, la forma esférica de la nanoplataforma se pierde cuando estas son preparadas con una mayor cantidad de GNRs (1.33×10^{-12} M – 2.78×10^{-12} M), e incluso las nanoplataformas colapsan formando agregados de estructura irregular (3.27×10^{-12} M – 1.08×10^{-11} M).

En la Figura 17 se observa una micrografía TEM de la nanoplataforma sin tinción, donde sí se pueden apreciar los GNRs. Suponemos que el halo que aparece alrededor de los GNR sea producto del polímero que está cubriendo a los GNR.

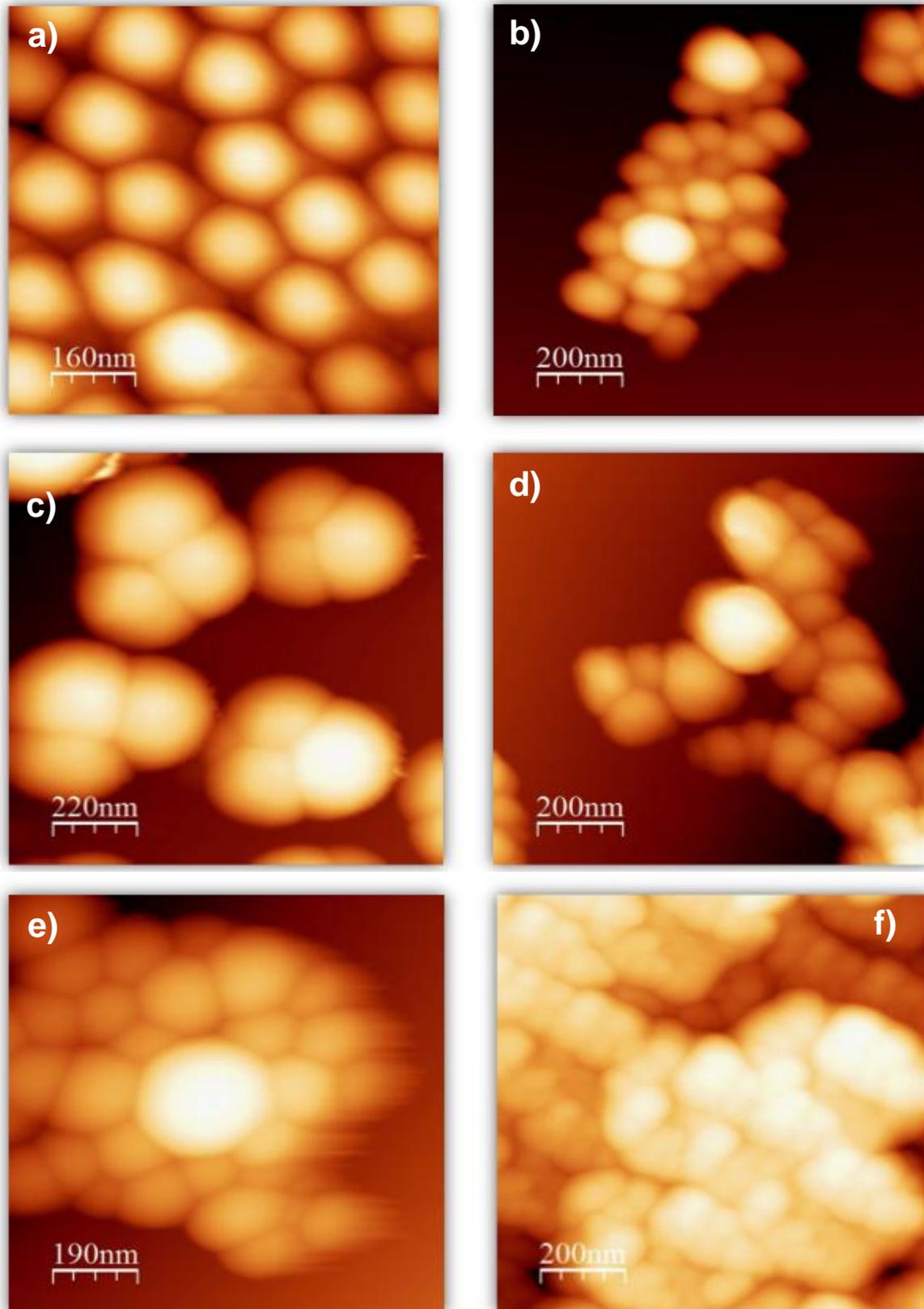


Figura 16. Imágenes AFM de la nanoplataforma GNR-PLGA con una concentración de a) 1.29×10^{-12} M y b) 1.33×10^{-12} M, c) 2.67×10^{-12} M, d) 2.78×10^{-12} M, e) 3.27×10^{-12} M y f) 5.53×10^{-12} M.



Figura 17. Micrografía TEM de la nanoplateforma GNR-PLGA (sin tinción).

Nanoplataforma GNR-PLGA con Quitosano

La nanoplataforma de GNR-PLGA se estabilizó con quitosano. Primeramente, se hizo una solución stock de quitosano disolviendo 0.04 g de quitosano en 20 ml de ácido acético 10 mM. Después, se añadió la nanoplataforma con una concentración de 1.33×10^{-12} M de GNR (10 ml), se colocó en agitación magnética y se homogenizó por 1 hora. Para encontrar la concentración de quitosano necesaria para obtener una nanoplataforma de GNR-PLGA-Quitosano estable, se realizó un barrido de la cantidad de quitosano utilizado en la estabilización de la nanoplataforma de GNR-PLGA desde 3.33×10^{-9} M hasta 1.33×10^{-7} M, utilizando agua deionizada como diluyente, con un volumen final de 10 ml. El volumen final de NPs GNR-PLGA cubiertas con quitosano fue de 20 ml. La estructura y tamaño de la nanoplataforma fue caracterizada por DLS, potencial ζ y AFM. En la Tabla 3 se muestran los diferentes tamaños de partícula y potencial ζ obtenido para las diferentes concentraciones de quitosano.

Tabla 3. Tamaño de partícula y potencial ζ para la nanoplataforma GNR-PLGA cubiertas con Quitosano.

Concentración de Quitosano (M) ($\times 10^{-9}$)	Diámetro de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)
0	150.2 \pm 1.2	-31.1 \pm 0.0
0.333	192.1 \pm 1.2	8.7 \pm 0.3
1.0	176.9 \pm 1.3	15.8 \pm 0.1
1.33	174.3 \pm 1.0	18.1 \pm 0.2
1.66	167.3 \pm 1.4	18.2 \pm 0.6
2.0	163.8 \pm 1.0	18.7 \pm 1.8
2.33	159.3 \pm 1.9	21.6 \pm 0.7
2.66	158.6 \pm 0.6	21.6 \pm 0.1
4.0	161.0 \pm 1.9	26.6 \pm 1.0
5.33	155.4 \pm 1.5	29.2 \pm 0.2
8.0	159.4 \pm 1.9	30.4 \pm 0.2
9.33	161.3 \pm 1.9	29.7 \pm 0.2
12.0	158.9 \pm 1.3	34.2 \pm 0.7
13.3	165.0 \pm 0.3	36.9 \pm 1.2

Podemos observar cambios importantes en los tamaños de la nanoplataforma y una inversión de carga de la superficie de la matriz de PLGA cuando se adiciona quitosano. A bajas concentraciones de quitosano, se observa un cambio drástico en el tamaño de la nanoplataforma. Este resultado se debe a la agregación de la nanoplataforma de

GNR-PLGA-Quitosano debido a la baja cantidad de quitosano adsorbido en la superficie de la matriz de PLGA que resulta en una inversión del valor del potencial ζ , desde -15 mV a 8 mV. De acuerdo a la literatura, una suspensión coloidal es estable cuando el valor absoluto del potencial ζ es \geq a 30 mV, por debajo de este valor, las suspensiones suelen ser inestables. Por lo tanto, podemos considerar que a bajas concentraciones de quitosano, la repulsión eléctrica entre nanoplateformas no es lo suficientemente fuerte para evitar la agregación de la nanoplateforma. Por otra parte, al aumentar la concentración de quitosano, el tamaño disminuye, mientras que el potencial ζ se incrementa, hasta que ambos parámetros alcanzan un valor prácticamente constante (Figura 18 y Figura 19).

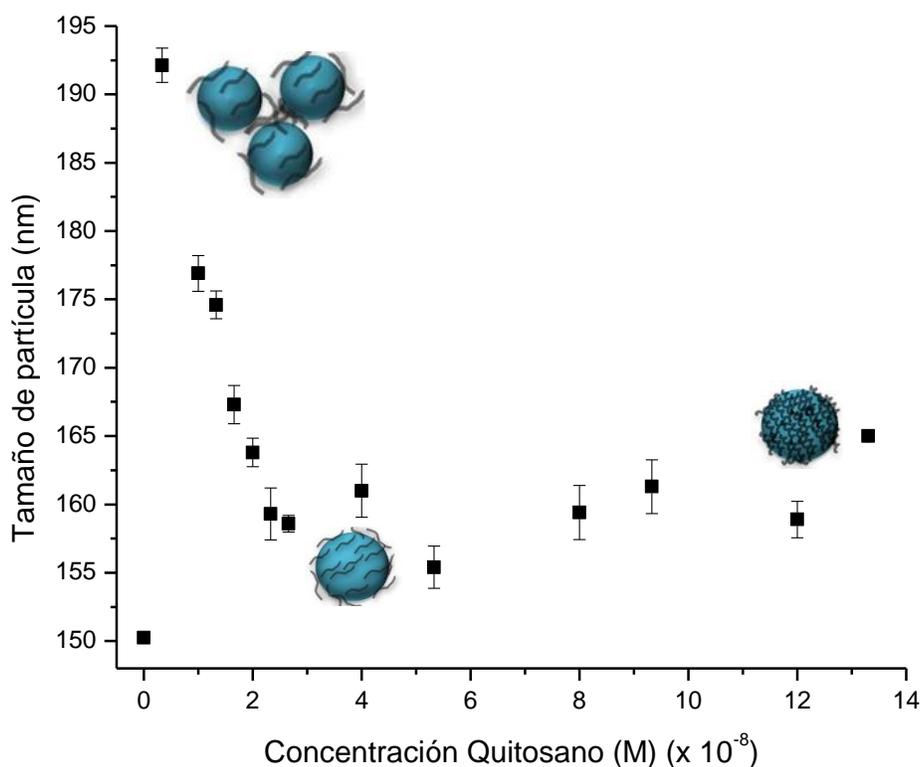


Figura 18. Gráfica de tamaño de partícula contra concentración de quitosano.

En la Figura 18 se muestra cómo a concentraciones bajas, el tamaño de partícula disminuye de 192.3 nm hasta 159.3 nm, después de ahí comienza a fluctuar en tamaño de 165 nm a 155.4 nm conforme aumentamos la concentración de quitosano. El hecho de que a bajas concentraciones existan tamaños de partícula mayores se atribuye a

que al momento de agregar la solución de NPs GNR-PLGA, ocurre una agregación de NPs debido a que es tan baja la concentración de quitosano que no hay suficientes moléculas de este para cubrir las NPs de GNR-PLGA y entonces una sola molécula de quitosano se adsorbe a dos o más NPs y se induce un puente de floculación.

En la Figura 19 se observa el cambio potencial ζ con respecto a la concentración de quitosano. Existe una adhesión electrostática entre los grupos $-NH_3$ del quitosano añadido, y los grupos $-COOH$ presentes en la superficie de la matriz de PLGA. Podemos ver un aumento en el potencial ζ conforme incrementa la concentración de quitosano, esto confirma la adsorción del quitosano sobre la superficie de la nanoplateforma.

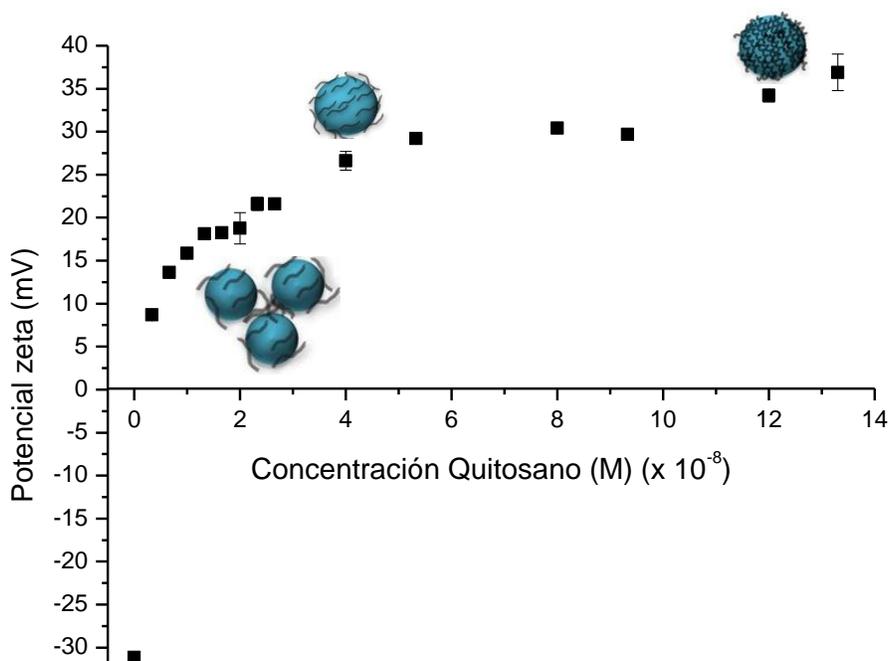


Figura 19. Gráfica de concentración de Quitosano con respecto al potencial ζ .

La Figura 20 muestra las imágenes de AFM de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano. De acuerdo a los valores obtenidos en DLS, potencial ζ y AFM, la concentración adecuada de Quitosano para trabajar fue la de 2.66×10^{-8} M ya que cuenta con un tamaño, carga superficial y morfología adecuada.

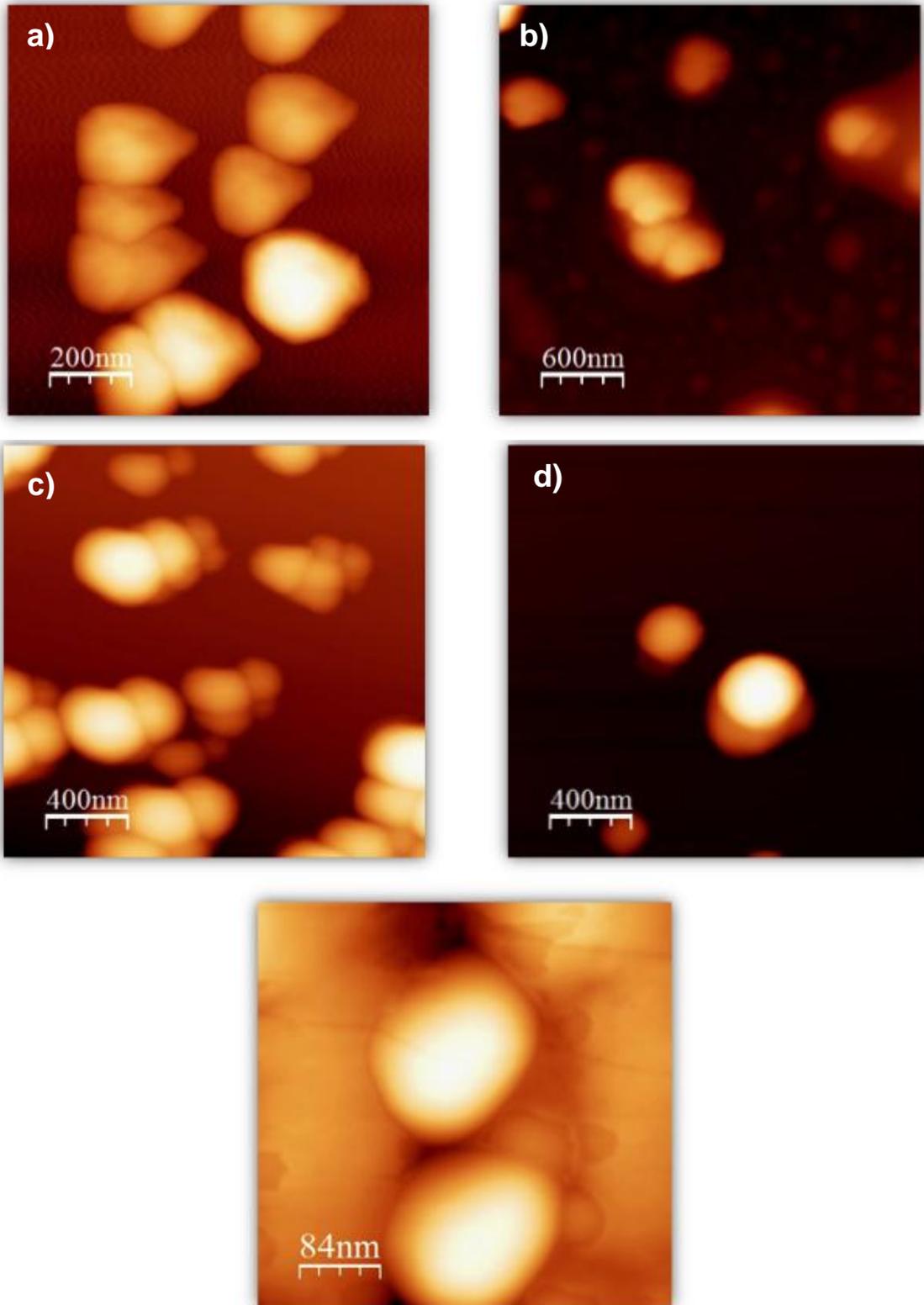


Figura 20. Imágenes AFM de NP GNR-PLGA con Quitosano, (a) 1×10^{-8} M, (b) 1.66×10^{-8} M, (c) 2.66×10^{-8} M, (d) 4×10^{-8} M, y (e) 8×10^{-8} M.

Adsorción para la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano

Para tener un mejor entendimiento sobre el proceso de adsorción del quitosano sobre la superficie de PLGA, los datos de potencial ζ se ajustaron a los modelos de adsorción de Langmuir y de Freundlich.

El modelo de adsorción de Langmuir es un modelo empírico que asume que la adsorción sólo puede ocurrir en un número finito de sitios localizados y que la capa adsorbida es una molécula de grosor, una monocapa de adsorción. Dicho modelo puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$q_e = K_L \frac{C_e}{1 + K_L C_e}$$

donde q_e = es la cantidad adsorbida, K_L = constante que indica la capacidad de adsorción, C_e = concentración del adsorbato en el adsorbente [50].

El modelo de Langmuir tomó a consideración las siguientes suposiciones:

1. La superficie del adsorbente está en contacto con una solución que contiene un adsorbato el cual está fuertemente atraído a la superficie.
2. La superficie tiene un número específico de sitios donde las moléculas del soluto pueden adsorberse.
3. La adsorción involucra la adhesión de sólo una capa de moléculas en la superficie, i.e. monocapa de adsorción.

Esta isoterma se refiere a un tipo de adsorción homogénea, donde cada molécula posee entalpías constantes y energía de activación de sorción (todos los sitios poseen igual afinidad por el adsorbato), sin que exista un cambio del adsorbato en el plano de superficie. Gráficamente, se caracteriza por un plateau, un punto de saturación de equilibrio donde una vez que una molécula ocupa un sitio, no sucede otra adsorción.

El modelo de Freundlich se considera un proceso de adsorción no ideal y reversible, el cual puede aplicarse a una adsorción de multicapas. La expresión no lineal del modelo de la isoterma de Freundlich puede mostrarse como la siguiente ecuación:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

donde, K_F y n son constantes, miden la capacidad (K) y la intensidad (n) de adsorción [50]. La pendiente varía entre 0 y 1 y es una medida de la intensidad de adsorción o heterogeneidad de la superficie, siendo más heterogéneo conforme el valor se acerca a cero [51].

En la Figura 21 y Figura 23 se muestran los ajustes de los valores de potencial ζ a los modelos de Langmuir y Freundlich, respectivamente. Para ajustar a los valores de potencial ζ obtenidos a estos modelos, se tomaron las siguientes consideraciones: i) que sólo la fracción del quitosano adsorbido corresponde al potencial ζ adsorbido y ii) que el potencial ζ de la fracción libre de quitosano es despreciable. Es importante mencionar que el potencial ζ del quitosano libre, sin la adición de nanoplateformas, nos da un valor de +45 mV y este valor no se observa durante el proceso de obtención de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano.

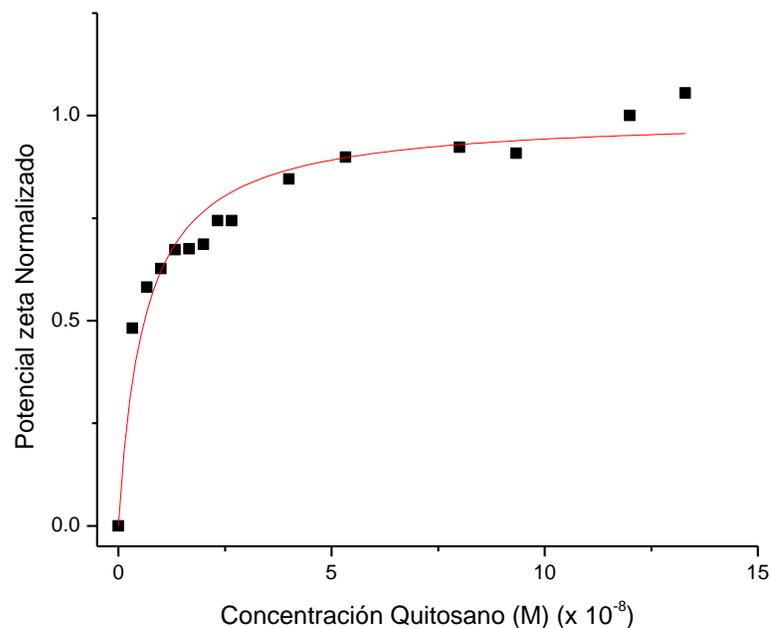


Figura 21. Concentración de Quitosano contra Potencial ζ normalizado con ajuste a modelo de adsorción de Langmuir.

En la Figura 21, se muestran los valores del potencial ζ normalizados contra la concentración de Quitosano (M). Los datos experimentales se ajustaron al modelo de adsorción de Langmuir tomando en cuenta que es la fracción del quitosano adsorbido la que promueve un cambio en la carga superficial de la nanopartícula de GNR-PLGA. El valor de la constante de adsorción (K) es de 1.64×10^8 . En la figura podemos observar que el potencial ζ aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor máximo, en donde el valor del potencial ζ permanece prácticamente constante (plateau) conforme la concentración de quitosano se incrementa.

La primer parte de la gráfica se debe a la adsorción de las moléculas de quitosano, en donde el número de los sitios de adsorción libres permiten la adsorción progresiva de las moléculas de quitosano, las cuales se ordenan en una configuración extendida sobre la superficie de la matriz polimérica, resultando en: i) a bajas concentraciones de quitosano podemos observar la inversión de carga superficial de la nanoplateforma, conduciendo a la formación de agregados de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano, tal como se muestra en los resultados de DLS y AFM; ii) conforme se aumenta la cantidad de quitosano utilizado para la estabilización de la nanoplateforma, el número de sitios de adsorción disminuye y las moléculas de quitosano se adsorben sobre la superficie de la nanopartícula provocando un incremento del potencial ζ y una disminución del tamaño de las nanopartículas; iii) cuando se alcanza el plateau de la gráfica, la adsorción de moléculas de quitosano sigue sucediendo, debido a que probablemente aún existen sitios de unión libres, aparentemente no disponibles para permitir la adsorción de más moléculas de quitosano. Sin embargo, para que estos sitios de unión queden disponibles, las moléculas de quitosano cambian su configuración, reordenándose de manera más compacta, ocupando una menor área de superficie, permitiendo así la adsorción de un mayor número de moléculas de quitosano, sin provocar un cambio en el tamaño y potencial ζ de la nanoplateforma, sugiriendo la formación de una monocapa de quitosano sobre la superficie de la matriz de PLGA (Figura 22).

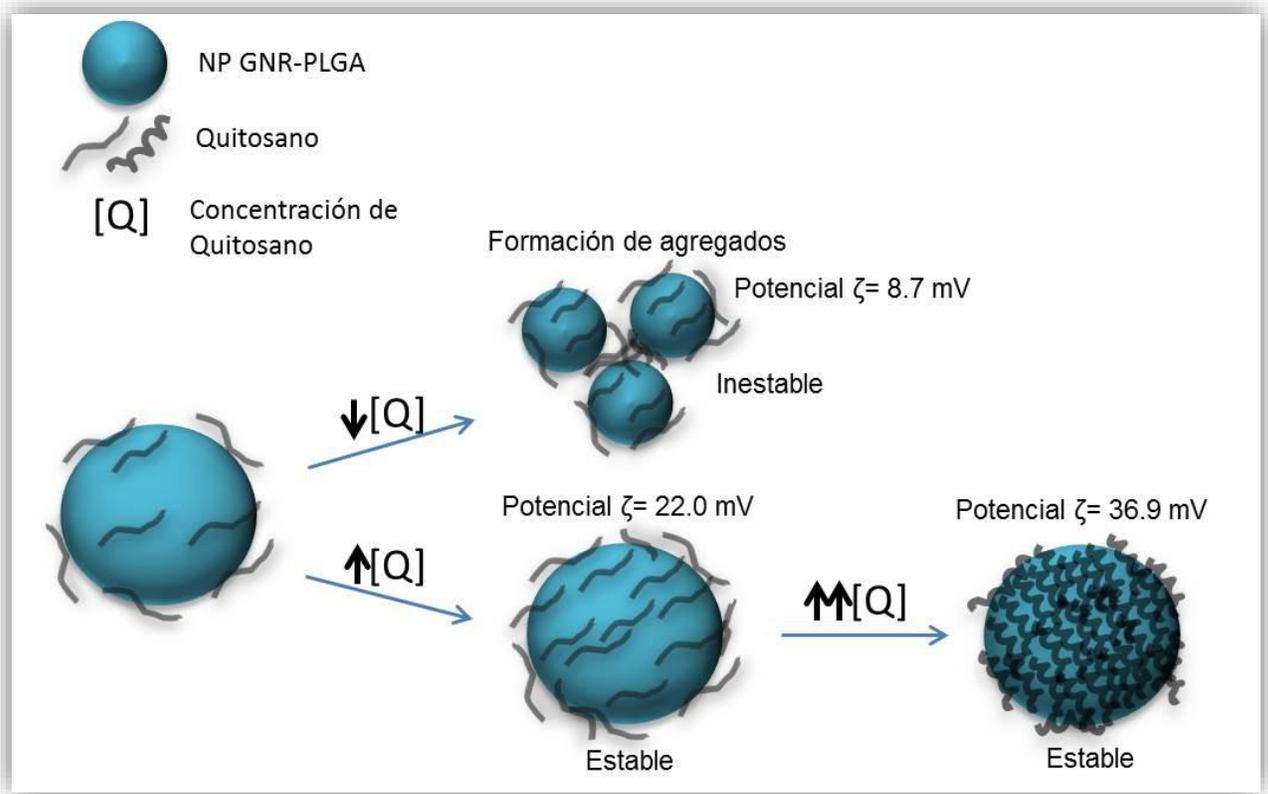


Figura 22. Esquema representativo de la NP GNR-PLGA cubierta con Quitosano a diferentes concentraciones.

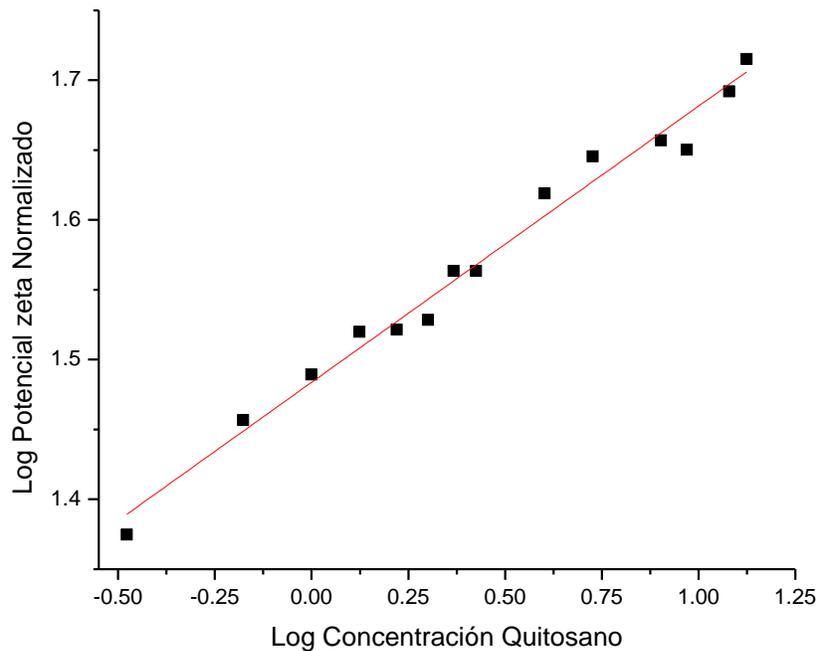


Figura 23. Concentración de Quitosano contra Potencial ζ normalizado con ajuste a modelo de adsorción de Freundlich.

La Figura 23 muestra la gráfica logarítmica de los datos del potencial ζ normalizado contra la concentración de quitosano y se ajustó al modelo de adsorción de Freundlich. El valor de la constante de adsorción (K) fue de 1.48×10^{-8} , indicando una fuerte adsorción de las moléculas de quitosano sobre la superficie de la nanoplataforma GNR-PLGA, mientras que el valor de n obtenido fue de 5.07, indicando que la adsorción de las moléculas de quitosano sobre la superficie de la matriz polimérica es homogénea [50], resultado que concuerda con el modelo de adsorción de Langmuir.

Modulación de carga de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano con PVA

Para modular la carga de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano se utilizó un polímero hidrofílico neutro, como el PVA. Además de reducir la carga superficial de la nanoplataforma, nuestro propósito era que la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano final fuera estable. Bajo esta directriz, la modulación de la carga superficial de la nanoplataforma se realizó variando la cantidad de PVA utilizando un rango de concentraciones de 4.83×10^{-6} a 4.83×10^{-4} M.

La Tabla 4 muestra la influencia del PVA sobre el tamaño de partícula y potencial ζ . Las NPs estabilizadas con PVA son de mayor tamaño y tienen un potencial ζ menor comparado con la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano. Como se puede ver, conforme se aumenta la concentración de PVA, el tamaño de partícula aumenta de 197.7 nm hasta 266.7 nm, mientras que el potencial ζ disminuye desde 15.5 mV hasta 3.17 mV. Esto se debe a que el PVA, que es un polímero neutro, se adsorbe sobre la monocapa de quitosano presente en la superficie de la nanoplataforma, apantalla la carga eléctrica del quitosano, provocando una disminución del potencial ζ . La Figura 24 y Figura 25, muestra la gráfica correspondiente a la variación de la concentración de PVA contra los tamaños de partícula obtenidos y potencial ζ , respectivamente, donde se observa claramente el efecto que tiene el aumento de concentración de PVA sobre el tamaño de partícula.

Tabla 4. Tamaño de partícula y potencial ζ en base a la variación de concentración de PVA.

Concentración PVA (M) ($\times 10^{-4}$)	Tamaño de partícula (nm)	Potencial ζ (mV)
0	158.6 \pm 1.3	21.6 \pm 0.1
0.0483	197.7 \pm 6.1	15.5 \pm 0.0
0.0967	204.5 \pm 2.8	13.7 \pm 0.1
0.145	207.8 \pm 1.2	12.1 \pm 0.4
0.290	208.1 \pm 1.4	10.2 \pm 1.6
0.483	208.3 \pm 0.6	7.96 \pm 0.5
0.967	212.0 \pm 3.9	4.24 \pm 0.2
1.935	227.4 \pm 4.9	4.15 \pm 0.6
4.830	266.7 \pm 5.7	3.17 \pm 0.8

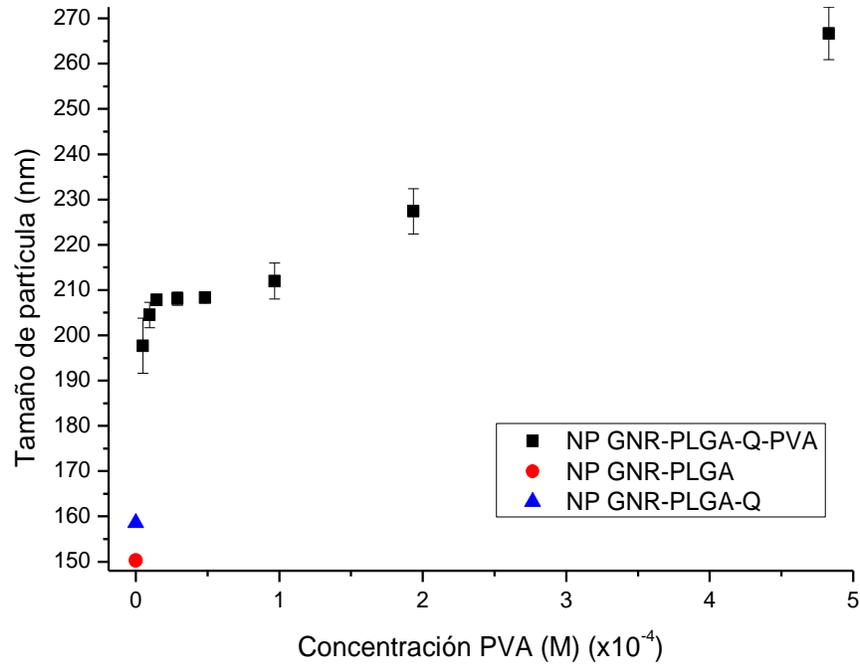


Figura 24. Gráfica de variación de concentración de PVA con respecto al tamaño de partícula.

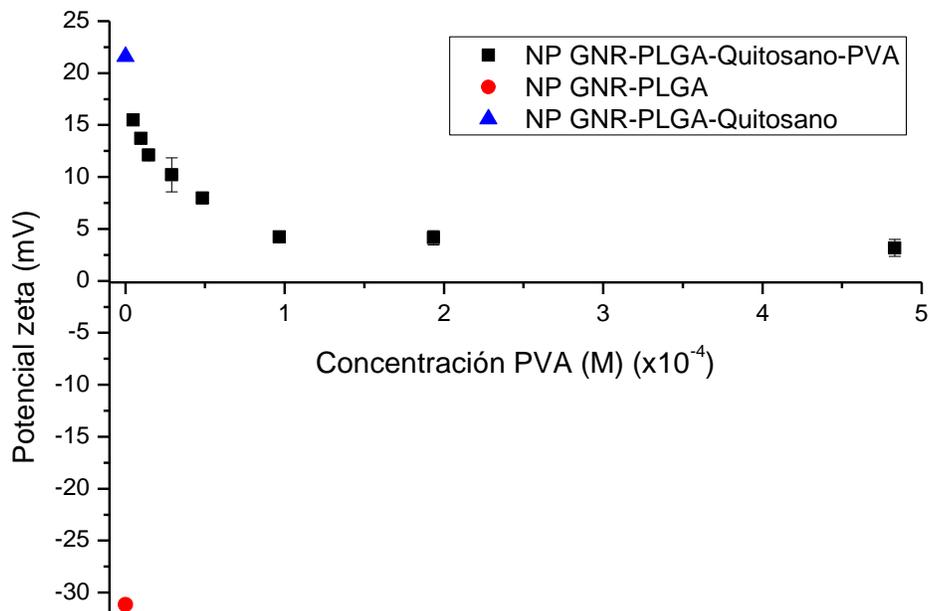


Figura 25. Gráfica de la variación de la concentración de PVA con respecto al potencial ζ .

Las imágenes de AFM de la nanoplateforma de GNR-PLGA-Quitosano-PVA se muestran en la Figura 26. Comparando la morfología de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano con la nanoplateforma final, podemos observar cambios en el tamaño y morfología de la nanoplateforma, en donde la superficie de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano-PVA es irregular o rugosa debido a la adsorción de PVA. Los círculos señalan lo que conformaría solo una nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosano-PVA.

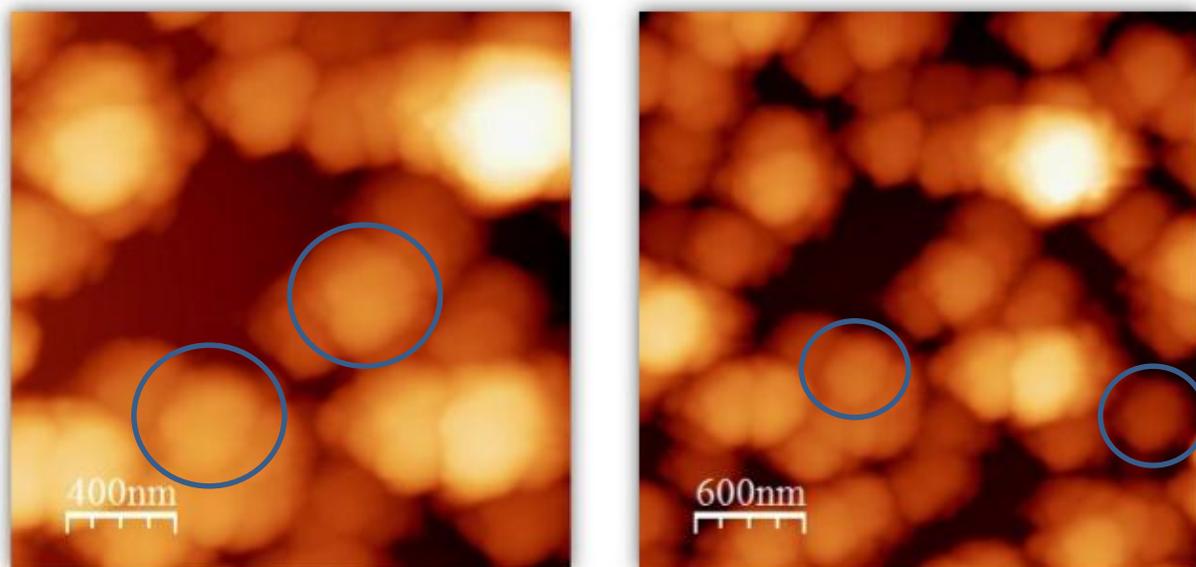


Figura 26. Imágenes AFM de NP GNR-PLGA cubiertas con Quitosano (8×10^{-8} M) y PVA (4.83×10^{-6} M).

Adsorción de PVA sobre la superficie de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano

Los resultados obtenidos de la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano cubierta con PVA se ajustaron a dos modelos de adsorción, de Langmuir y de Freundlich. A continuación, en la Figura 27 y en la Figura 28 se muestran las gráficas obtenidas en dichos modelos.

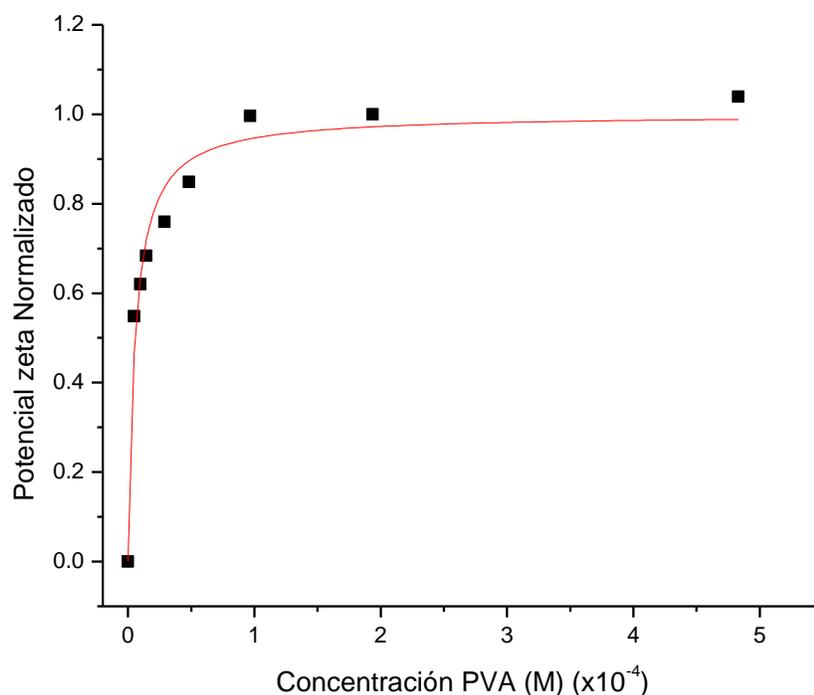


Figura 27. Ajuste de modelo de adsorción de Langmuir para la nanoplataforma GNR-PLGA-Quitosano cubierta con PVA.

La Figura 27 muestra el ajuste de los datos al modelo de Langmuir, donde se obtuvo una constante de adsorción de 17.81×10^4 , lo cual indicaría que se está obteniendo una mejor adsorción que una desorción.

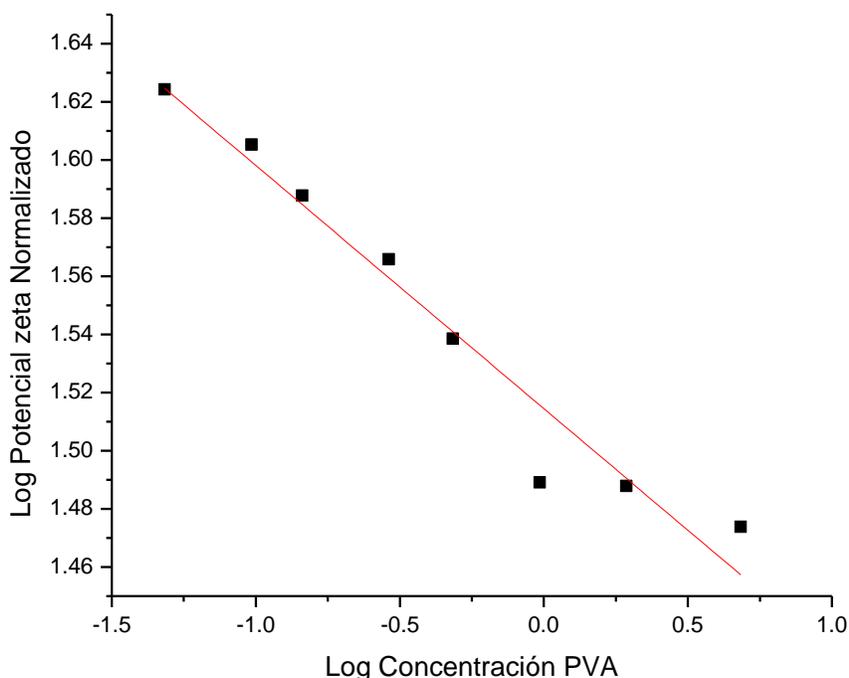


Figura 28. Ajuste de modelo de adsorción de Freundlich para la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosaño cubierta con PVA.

En la Figura 28 se observa el ajuste lineal del modelo de Freundlich para los datos obtenidos de la nanoplateforma cubierta con PVA. La constante K dio un valor de 1.514, mientras que la pendiente absoluta de la recta obtenida fue de 0.08 y despejando n nos da un resultado igual a 12.5. A pesar de que este valor de n nos indica que el proceso de adsorción se lleva a cabo de manera homogénea, con base a los datos obtenidos por DLS, podemos suponer que a bajas concentraciones de PVA, este forma una monocapa sobre la superficie de la nanoplateforma GNR-PLGA-Quitosaño hasta alcanzar un tamaño que se mantiene constante. Sin embargo, al aumentar la concentración de PVA (9.67×10^{-5} M) se observa un incremento de tamaño, lo que sugiere que el polímero de PVA empieza a formar multicapas sobre la nanoplateforma sin afectar significativamente la carga superficial de la nanoplateforma.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, DLS, potencial ζ , UV-Vis, AFM y TEM, se puede concluir que se lograron encapsular GNR en PLGA, lo cual se estabilizó con quitosano y PVA. El quitosano se agregó para invertir la carga de la nanoplateforma y que de esta manera tuviera una mejor interacción celular, donde la mejor concentración, según los resultados obtenidos en la isoterma de Langmuir, fue la concentración de 2.66×10^{-8} M debido que es donde se observa la formación del plateau y, corroborando con tamaño de partícula y potencial ζ , se obtuvo un tamaño de 161.0 nm con una carga superficial de 21.6 mV. Se procedió a estabilizar con PVA, debido a que NPs muy positivas son citotóxicas, donde la mejor concentración fue 4.83×10^{-6} M ya que según los resultados obtenidos mediante DLS y potencial ζ se obtuvo un tamaño adecuado de 197.7 nm y una carga superficial de 15.5 mV.

- ❖ Fue posible desarrollar una nanoplateforma cuya matriz es PLGA y encapsular GNR.
- ❖ Se sintetizaron GNR, donde se observó la absorción del eje transversal en una longitud de onda de ≈ 510 nm y la absorción del eje longitudinal en una longitud de onda de ≈ 800 nm.
- ❖ A su vez, se obtuvieron NPs de PLGA, con un tamaño de 146.0 nm y un potencial ζ de -39.0 mV, con lo cual se corroboró la carga negativa del polímero.
- ❖ Se obtuvo la nanoplateforma de GNR-PLGA, donde dependiendo de la cantidad de GNR que se agregaban, aumentaba de tamaño desde 147 nm hasta 156.4 nm y su potencial ζ disminuía, haciéndolo menos negativo, desde -32.0 mV hasta -25.8 mV.
- ❖ Se estabilizó la nanoplateforma GNR-PLGA con Quitosano, desde una concentración de 3.33×10^{-9} M hasta 1.33×10^{-7} M, viendo que con la concentración más baja de Quitosano el tamaño de partícula fue de 192 nm y conforme se aumentó la concentración, el tamaño fue disminuyendo hasta que los tamaños

fueron fluctuando entre 155 nm y 165 nm. El potencial ζ fue de muy negativo a muy positivo, corroborando que las moléculas catiónicas de Quitosano se adsorbieron en la superficie de las NPs aniónicas de la nanoplataforma GNR-PLGA.

- ❖ Una vez cubierta la nanoplataforma con Quitosano, se cubrió con PVA para modular la carga de las partículas, observándose un aumento en el tamaño de partícula conforme se aumentaba la concentración de este, desde 180 nm hasta 266.7 nm. Así mismo, se observó que el potencial ζ se redujo de 30 mV hasta 3.17 mV.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. N. Banerjee and M. Verma, "Application of Nanotechnology in Cancer," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 7, no. 2, pp. 149–154, Apr. 2008.
- [2] F. M. Britto, "Nanotecnología , hacia un nuevo portal científico-tecnológico," pp. 171–183, 2012.
- [3] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [4] J. H. Thrall, "Radiology," 2004.
- [5] S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, and J. W. Simons, "Nanotechnology applications in cancer.," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, pp. 257–288, 2007.
- [6] R. Swaminathan, "Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications," pp. 1–13, 2010.
- [7] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. a Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, and R. Langer, "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 16, pp. 6315–20, Apr. 2006.
- [8] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde, "Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents," no. 13, pp. 6679–6686, 2002.
- [9] R. M. Navalakhe and T. D. Nandedkar, "Application of nanotechnology in biomedicine," vol. 45, no. February, pp. 160–165, 2007.
- [10] P. Nasimi and M. Haidari, "Medical Use of Nanoparticles: Drug Delivery and Diagnosis Diseases," *Int. J. Green Nanotechnol.*, vol. 1, Jan. 2013.
- [11] L. Dykman and N. Khlebtsov, "Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 6, pp. 2256–82, Mar. 2012.
- [12] E. Boisselier and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 1759–82, Jun. 2009.
- [13] 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,

pp. 2740–79, Apr. 2012.

- [14] A. M. Alkilany and C. J. Murphy, “Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?,” *J. Nanopart. Res.*, vol. 12, no. 7, pp. 2313–2333, Sep. 2010.
- [15] X. Huang and M. a. El-Sayed, “Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy,” *J. Adv. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 13–28, 2010.
- [16] N. Khlebtsov and L. Dykman, “Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles : a review of in vitro and in vivo studies,” pp. 1647–1671, 2011.
- [17] E. Locatelli, W. Bost, M. Fournelle, J. Llop, L. Gil, F. Arena, V. Lorusso, and M. Comes Franchini, “Targeted polymeric nanoparticles containing gold nanorods: A therapeutic approach against glioblastoma,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 16, no. 3, 2014.
- [18] V. Sharma, K. Park, and M. Srinivasarao, “Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly,” *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 65, no. 1–3, pp. 1–38, 2009.
- [19] B. Nik and a El Sayed, “Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed - Mediated Growth Method,” no. 16, pp. 1957–1962, 2003.
- [20] 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.
- [21] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. a. El-Sayed, “Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 6, pp. 2115–2120, 2006.
- [22] C. J. Murphy, L. B. Thompson, A. M. Alkilany, P. N. Sisco, S. P. Boulos, S. T. Sivapalan, J. A. Yang, D. J. Chernak, and J. Huang, “The Many Faces of Gold Nanorods,” pp. 2867–2875, 2010.
- [23] D. W. Grainger, “The Williams dictionary of biomaterials,” *Mater. Today*, vol. 2, no. 3, p. 29, 1999.
- [24] H. K. Makadia and S. J. Siegel, “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier,” pp. 1377–1397, 2011.

- [25] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [26] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le, and V. Pr at, "PLGA-based nanoparticles : An overview of biomedical applications," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–522, 2012.
- [27] R. L. Mccall and R. W. Sirianni, "PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E- TPGS," no. December, pp. 1–8, 2013.
- [28] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. Davis, "PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation : drug loading and release studies of a water soluble drug," vol. 57, pp. 171–185, 1999.
- [29] T. Betancourt, B. Brown, and L. Brannon-Peppas, "Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation.," *Nanomedicine (Lond)*., vol. 2, no. 2, pp. 219–232, 2007.
- [30] N. Nafee, M. Schneider, U. F. Schaefer, and C. Lehr, "Relevance of the colloidal stability of chitosan / PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile," vol. 381, pp. 130–139, 2009.
- [31] C. M. Goodman, C. D. Mccusker, T. Yilmaz, and V. M. Rotello, "Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains," pp. 897–900, 2004.
- [32] H. S. Kaş, "Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems.," *J. Microencapsul.*, vol. 14, no. 6, pp. 689–711, 1997.
- [33] E. Locatelli, I. Monaco, and M. C. Franchini, "Surface Modifications of Gold Nanorods for Applications in Nanomedicine.," *RSC Adv.*, 2014.
- [34] B. Kim, C. Kim, and K. Lee, "The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-coated Poly (D , L-lactide- co-glycolide) Nanoparticles," vol. 31, no. 8, pp. 1050–1054, 2008.
- [35] V. L. Sanjeeb K. Sahoo, Jayanth Panyam, Swayam Prabha, "Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D , L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake R esidual polyvinyl alcohol associated with poly (D , L -lactide-co- glycolide) nanoparticles affects thei," vol. 82, no. August 2015, pp. 105–114, 2002.
- [36] C.-W. Su, C.-S. Chiang, W.-M. Li, S.-H. Hu, and S.-Y. Chen, "Multifunctional

- nanocarriers for simultaneous encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in cancer treatment,” *Nanomedicine*, vol. 9, no. 10, pp. 1499–1515, 2014.
- [37] J.-H. P. Michael J. Sailor, “Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 28, pp. 3779–3802, 2013.
- [38] X. Wang, Y. Wang, Z. G. Chen, and D. M. Shin, “Advances of cancer therapy by nanotechnology,” *Cancer Res. Treat.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–11, 2009.
- [39] T. S. Hauck, T. L. Jennings, T. Yatsenko, J. C. Kumaradas, and W. C. W. Chan, “Enhancing the toxicity of cancer chemotherapeutics with gold nanorod hyperthermia,” *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 20, pp. 3832–3838, 2008.
- [40] S. Acharya and S. K. Sahoo, “PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 170–183, 2011.
- [41] A. Wei, “Hyperthermic effects of gold nanrods on tumour cells,” *Natioanl Inst. Heal. Public Access*, vol. 2, no. 1, pp. 125–132, 2008.
- [42] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, “Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods,” pp. 4065–4067, 2001.
- [43] M. Almada, E. D. Ruiz, J. Ibarra-Hurtado, N. Hassan, M. J. Kogan, R. D. Cadena-Nava, M. A. Valdés, and J. Juárez, “Growth Kinetics of Gold Nanorods Synthesized by a Seed-Mediated Method Under pH Acidic Conditions,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 16, no. 7, pp. 7707–7714, 2016.
- [44] S. Zia, U. Quasim, A. Naveed, M. M. Athar, S. Irfan, M. I. Ali, M. Ahmed, and R. B. Reddy, “Materials for Drug & Gene Delivery,” vol. 385, no. January, pp. 113–142, 2010.
- [45] Malvern instruments, “Zetasizer Nano Series User Manual,” *Dep. Biochem. Biophys. Facil. , Univ. Chambridge*, no. 2, p. 207, 2004.
- [46] E. N. Kaufmann, *Characterization of Materials*. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [47] K. S. Birdi, *SCANNING PROBE Applications in Science*. 2003.
- [48] Y. Leng, *Related Titles Characterization of Surfaces and Nanostructures Basic Concepts of X-Ray Diffraction Characterization of Solid Materials and Heterogeneous Catalysts Advanced Characterization Techniques for Thin Film Solar Cells Characterization Techniques f*, 2nd editio. Wiley-VCH, 2013.
- [49] R. D. Near, S. C. Hayden, R. E. Hunter, D. Thackston, and M. A. El-sayed, “Rapid

and Efficient Prediction of Optical Extinction Coefficients for Gold Nanospheres and Gold Nanorods,” 2013.

- [50] X. Chen, “Modeling of experimental adsorption isotherm data,” *Inf.*, vol. 6, no. 1, pp. 14–22, 2015.
- [51] K. Y. Foo and B. H. Hameed, “Insights into the modeling of adsorption isotherm systems,” *Chem. Eng. J.*, vol. 156, no. 1, pp. 2–10, 2010.
- [52] R. Álvarez-Puebla, “Los avances de la ciencia,” 2016. [Online]. Available: http://ctqcquimicasostenible.blogspot.mx/2016_01_01_archive.html. [Accessed: 08-Jun-2016].
- [53] E. Kim, J. Yang, J. Choi, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, and S. Haam, “Synthesis of gold nanorod-embedded polymeric nanoparticles by a nanoprecipitation method for use as photothermal agents,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 36, p. 365602, 2009.
- [54] A. Sharma and A. Kakkar, “Designing dendrimer and miktoarm polymer based multi-tasking nanocarriers for efficient medical therapy,” *Molecules*, vol. 20, no. 9, pp. 16987–17015, 2015.