

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física
Posgrado de Nanotecnología

Título de Tesis

**NANOCORAZAS DE ORO OBTENIDAS SOBRE UNA
MATRIZ DE QUITOSANO: ESTUDIOS DE
FOTOTERMIA Y ACTIVIDAD BACTERICIDA**

Presenta:

Patricia Dolores Martínez Flores

Director de Tesis:

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

Hermosillo, Sonora

agosto 2021

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 intitulada: “NANOCORAZAS DE ORO OBTENIDAS SOBRE UNA MATRIZ DE QUITOSANO: ESTUDIOS DE FOTOTERMIA Y ACTIVIDAD BACTERICIDA”, presentada por:

PATRICIA DOLORES MARTINEZ FLORES

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 Grado de Maestría en Nanotecnología:

DR. JOSUÉ E. JUÁREZ O.

DR. PAUL ZAVALA RIVERA

DR. ROBERTO C. CARRILLO TORRES

DRA. VIVIANA REYES MARQUEZ

DR. ANTONIO TOPETE CAMACHO
(EXTERNO)

DEDICATORIA

Para DMM mi motor, mi fortaleza...

***“It’s never too late –
never too late to star over,
never too late to be happy”***

Jane Fonda

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al posgrado de Nanotecnología de la Universidad de Sonora por la oportunidad de continuar con mis estudios y por la formación recibida.

También le agradezco al Dr. Josué Juárez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por las atenciones y por su apoyo para superar cada vez más las metas académicas.

A mis compañeros y amigos de laboratorio y generación, gracias por todo su apoyo, consejos y sobre todo sugerencias, ya que también ayudaron a impulsarme a la superación.

A mis padres, porque su ayuda fue, y es fundamental para lograr la superación.

A CONACyT por el apoyo económico recibido durante estos dos años.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	
General	6
Particulares	6
ANTECEDENTES	7
Nanotecnología	7
Nanotecnología Aplicada en Medicina	7
Nanoestructuras de Oro	8
Nanopartículas Núcleo-Coraza de Oro	10
Quitosano	12
Actividad Antibacteriana del Quitosano	14
Nanopartículas Núcleo-Coraza: Terapia Fototérmica contra	
Agentes Bacterianos	15
MÉTODOS	17
Modificación de Quitosano	17
Preparación de Nanopartículas de Quitosano	17
Síntesis del nanosistema núcleo-coraza de Quitosano-Oro	
(NCQs-Au) mediado por semillas	19
Caracterización	20
Dispersión dinámica de luz (DLS)	20
Potencial zeta (ζ)	20
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	21
Microscopia electrónica de barrido (SEM)	22

Espectroscopia UV-Visible	24
Ensayos Fototérmicos	24
 Eficiencia de conversión fototérmica	24
 Ensayos de actividad antibacteriana por efecto fototérmico	25
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
CONCLUSIONES	56
PROSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFÍA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Efecto de pH y cantidad de TPP en el tamaño de NP Qs	31
2	Resultados de P ζ	35
3	Caracterización de nanopartículas núcleo-coraza purificadas	45
4	Valores experimentales obtenidos de los ensayos fototérmicos	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Nanosistemas liberadores de fármacos en nanomedicina	9
2	Representación del fenómeno RPSL en nanoestructuras esféricas	10
3	Desplazamiento del RPSL, dependiente de la relación radio núcleo/espesor de la coraza de oro	13
4	Estructura del quitosano	14
5	Representación esquemática de diferencias en la composición de la pared celular entre bacterias Gram positivas y Gram negativas	16
6	Esquema de síntesis de nanopartículas de quitosano, método de gelificación ionotrópica	18
7	Esquema de síntesis nanocoraza de oro sobre Np de Qs	19
8	Representación de la interacción de la punta del AFM	22
9	Representación de microscopía electrónica de barrido	23
10	Esquema de reacción de amidación, en la modificación de quitosano nativo	28
11	Espectro FT-IR/ATR de quitosano nativo y modificado	29
12	Micrografía de AFM de Np QsMod obtenidas a un pH 4.53, relación TPP/Qs 0.8. y gráfica del tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y análisis de micrografías por AFM	32
13	Micrografía de AFM, de Np QsMod a pH 4.88 relación TPP/Qs 0.8 (izq). Gráfica de tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y analisis de micrografías de AFM (der)	33
14	Micrografía de AFM, de Np QsNativo a pH 4.88 relación TPP/Qs 0.8 (izq). Gráfica de tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y analisis de micrografías de AFM (der)	33

15	Espectro UV-Vis Np NCQs-Au, con distintos tiempos de depósito en el primer paso de síntesis (Np Qs más semillas de oro)	37
16	Micrografías de SEM a) nanopartículas núcleo-coraza QsNa-Au, b) nanopartículas núcleo-coraza QsMod-Au. Micrografías AFM, c) nanopartículas núcleo-coraza QsNa-Au, d) nanopartículas núcleo-coraza QsMod-Au	38
17	Comparación de espectros de absorción de tres repeticiones de síntesis de Np NCQsNa-Au	41
18	Comparación de espectros de absorción de tres repeticiones de síntesis de Np NCQsMod-Au. Donde se observa que conservan la máxima absorción alrededor de los 600 nm	42
19	Micrografías de SEM de Np NCQs-Au después de purificar por centrifugación, (a) QsNa, (b) Qsmod. Donde se observan fragmentos de las Np.	43
20	Micrografías de AFM de Np NCQs-Au a) QsNa, b) QsMod. Se observa una morfología regular	44
21	Espectro de absorción de las Np NC purificadas por diálisis, donde se observa un ligero desplazamiento a una mayor longitud de onda	45
22	Representación esquemática de hipótesis de formación de NpNC Qs-Au	47
23	Curvas de calentamiento-enfriamiento de ensayos fototérmicos de Nanopartículas Núcleo-Coraza NpNC QsMod-Au	48
24	Curvas de calentamiento-enfriamiento de ensayos fototérmicos de NpNC QsNa-Au	49

25	Ajuste lineal para la obtención del coeficiente de conversión fototérmica de las NpNC QsM-Au	50
26	Ajuste lineal para la obtención del coeficiente de conversión fototérmica de las NpNC QsNa-Au	51
27	Gráfica obtenida de la actividad antibacteriana mediante cuenta viable en placa (<i>Escherichia coli</i>). Las barras de error indican \pm desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado.	54
28	Gráfica obtenida de la actividad antibacteriana mediante cuenta viable en placa (<i>Staphylococcus aureus</i>). Las barras de error indican \pm desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado.	55

RESUMEN

Las diferentes áreas de investigación, como la electrónica, mecánica, así como la biología y medicina, por mencionar algunas, han evolucionado gracias a la nanotecnología. En particular, la nanotecnología aplicada en el área de la biomedicina facilita la implementación de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento, para enfermedades que actualmente son difíciles de diagnosticar y tratar, a través del desarrollo de nanomateriales o nanodispositivos funcionales novedosos, aprovechando las distintas propiedades que presentan en la escala nanométrica. Por ejemplo, las propiedades ópticas y electrónicas de nanoestructuras metálicas, (oro, plata, platino, titanio) proporcionan una amplia gama de aplicaciones de diagnóstico por imagen (agentes de contraste de rayos-X, agentes de rastreo, terapia fototérmica (PTT, por sus siglas en inglés)) y tratamiento (terapia fototérmica y fotodinámica). Además, las propiedades fototérmicas y fotodinámicas pueden usarse para combatir diversos microorganismos patogénicos los cuales se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial.

En este trabajo se evaluaron las propiedades fototérmicas de nanopartículas núcleo-coraza y la capacidad de estas para eliminar microorganismos bacterianos. Las nanopartículas núcleo-coraza quitosano-oro (NpNC Qs-Au), se obtuvieron en dos fases. La primera fase consistió en la obtención de nanopartículas de quitosano (nativo y modificado con grupos tiol) mediante el método de gelificación ionotrópica, utilizando como agente entrecruzante tripolifosfato de sodio (TPP, por sus siglas en inglés). Las nanopartículas de quitosano (NpQs) se obtuvieron a distintas relaciones en peso/peso de TPP/Quitosano (1.2, 1.0, 0.8), además se varió el pH de las soluciones de quitosano (4.5-4.8) para obtener nanopartículas esféricas. Las NpQs se caracterizaron por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) y microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés). La formación de la nanocoraza de oro sobre la superficie de las NpQs se realizó por el método mediado por semillas de oro. Se utilizó la espectroscopía de absorción UV-Vis para monitorear la formación de la coraza mediante el espectro de absorción de la resonancia del plasmón de superficie localizado (RPSL), la morfología se caracterizó por AFM y microscopía electrónica de barrido (SEM), por sus siglas en

inglés). Las propiedades fototérmicas del nanosistema se evaluaron mediante el parámetro de eficiencia de conversión fototérmica. Posteriormente, la actividad antibacteriana por efecto de la fototermia se evaluó en dos cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La evaluación de la viabilidad bacteriana dio como resultados la eliminación de aproximadamente el 99% de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*), mientras que la actividad frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) fue ineficiente, manteniendo la viabilidad en un 80%. Con estos resultados, el nanosistema presenta potencial para la aplicación de actividad antibacteriana mediante fototermia.

INTRODUCCIÓN

Las nanoestructuras metálicas son tema de interés científico dentro del área de la nanomedicina debido a sus posibles aplicaciones para el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades[1]. Los metales nobles, como el oro, presentan propiedades ópticas especiales a escala nanométrica potencialmente útiles en el desarrollo de bionanomateriales. Los nanomateriales a base de oro presentan baja toxicidad y alta biocompatibilidad. Las nanopartículas esféricas de oro presentan una resonancia del plasmón de superficie localizado (RPSL) [1], que surge a partir de la oscilación coherente de los electrones localizados en la superficie de la nanopartícula metálica, con el campo electromagnético de una haz de luz que incide sobre la nanopartícula, observándose una banda de absorción dentro de la zona del UV-Visible o infrarrojo cercano [2]. El RPSL depende de la geometría y tamaño de las nanopartículas [3],[4], así que la longitud de onda máxima de absorción puede manipularse, de tal manera que la banda de absorción de la resonancia del plasmón se presente en la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético [5],[6]. Por ejemplo, la biomedicina propone explotar las propiedades de RPSL de las nanocorazas para el desarrollo de [7] biosensores, agentes de contraste, nanosistemas liberadores de fármacos y agentes fototérmicos [8][9]. Las propiedades fototérmicas intrínsecas a la nanopartícula metálica se manifiestan cuando los fotones incidentes son absorbidos por los electrones, convirtiéndose en energía acumulada en la superficie del metal, la cual al liberarse se difunde al medio en forma de calor [10] (propiedad fototérmica) Esta propiedad puede ser utilizada para destruir una célula, tejido o microorganismo patógeno [11].

Las nanoestructuras de oro como las nanobarras (NBs), nanopartículas núcleo-coraza (NpNC), nanocajas (NCs) y nanoestrellas (NSs) destacan en las aplicaciones de terapia fototérmica, por el control en su síntesis para desplazar el RPSL a la región del infrarrojo cercano [12]. Para las NpNC existen dos clasificaciones. Las primeras son conocidas como nanocorazas huecas y su principal método de obtención es mediante el reemplazamiento galvánico de un metal formando una nanopartícula (ejemplo: plata) por otro metal (oro)[13]. La siguiente clase de NpNC están conformadas por un núcleo dieléctrico recubierto

con una capa delgada el metal [14]. Para estas últimas, se utilizan materiales inorgánicos y orgánicos como soporte para la formación de la nanocoraza, incluyendo Fe_3O_4 , poliestireno, copolímeros (PEI-PAsp(DIP/MEA), polipéptidos y sílice [15][16][17][18]. La sílice es el material dieléctrico más utilizado para la obtención de nanocorazas de oro núcleo-coraza [14], [19]. Existen diferentes métodos para la síntesis de estas como: *i*) el método mediado por semillas, donde una suspensión coloidal de nanopartículas de oro se deposita sobre el núcleo, para posteriormente realizar una reducción de iones de oro para recubrir todo el núcleo con el metal [20]; *ii*) otro método de obtención es la mezcla de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) y la suspensión de las nanopartículas del material dieléctrico y después se procede a la reducción de los iones de oro [14].

Por otra parte, los nanodispositivos o bionanomateriales con aplicaciones en el área de la medicina es prioridad que se construyan con materiales biocompatibles y amigables con el medio ambiente. Existe una amplia gama de materiales orgánicos e inorgánicos utilizados, como metales nobles (Ag, Cu, Au), materiales magnéticos (Fe_3O_4) y polímeros (quitosano, alginato, PLGA, PVA). Estos materiales pueden combinarse y aprovechar sus propiedades para tener un nanosistema eficiente. También es posible funcionalizar con biomoléculas particulares, como anticuerpos, fármacos y péptidos, obteniendo un tratamiento y/o diagnóstico específico.[21]–[23]

El quitosano es un biopolímero extensamente estudiado para las aplicaciones biomédicas. Es un polisacárido lineal, obtenido de la deacetilación de la quitina, el segundo polisacárido más abundante en el planeta, el cual se obtiene del exoesqueleto de los crustáceos e insectos y en las células de algunos hongos [24]. Es biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y no tóxico. Además, presentan en su cadena grupos funcionales (-OH, y $-\text{NH}_2$), principalmente) intrínsecos a su estructura química, los cuales permiten modificar la estructura y por lo tanto las propiedades fisicoquímicas en disolución[25], [26], los cuales han permitido la utilización de este material en el desarrollo de nanodispositivos de liberación de fármacos [27]. Además esta característica puede ser aprovechada para favorecer la formación de la nanocoraza en nanopartículas de quitosano mediante la atracción electrostática con el oro [28].

De las metodologías existentes para la obtención de nanopartículas de quitosano, monodispersas y estables, el método de gelificación ionotrópica destaca por ser un proceso sencillo, barato y reproducible [29]. El método utiliza un agente entrecruzante, normalmente el tripolifosfato de sodio (TPP), que ayuda a que las cadenas lineales se entrecrucen formando nanopartículas esféricas.

Hoy en día, existe la necesidad de desarrollar materiales o dispositivos novedosos para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por agentes bacterianos patógenos. El aumento de cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-) resistentes a los fármacos a los que se tiene acceso, han ocasionado un aumento en los costos en el sector salud debido a infecciones intrahospitalarias, además la contaminación del agua por estos agentes provoca pérdidas en la industria alimentaria. Por lo tanto, es urgente desarrollar nuevos sistemas de tratamiento en escala nanométrica para su eliminación. En el presente trabajo, se sintetizó un nanosistema conformado por nanopartículas núcleo-coraza quitosano-oro para combatir estos agentes patógenos. El nanosistema se caracterizó mediante diferentes técnicas analíticas, como dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), microscopía de fuerza atómica (AFM, por su sigla en inglés), espectroscopía de absorción UV-Visible, y posteriormente se realizaron las pruebas fototérmicas evaluando el posible uso en terapia fototérmica contra la eliminación de agentes bacterianos.

HIPÓTESIS

Las propiedades fototérmicas de las nanocorazas de oro obtenidas sobre una matriz de quitosano son efectivas para reducir la viabilidad de los agentes bacterianos interés médico (*Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923).

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Determinar las propiedades fototérmicas de las nanocorazas de oro usando como matriz de soporte nanopartículas de quitosano, para su posible uso en la eliminación de bacterias de interés médico por efecto fototérmico.

Objetivos Particulares

- Modificar químicamente quitosano nativo uniendo ácido mercaptopropanico (3-MPA).
- Obtener nanopartículas de quitosano nativo y modificado estables por el método de gelificación ionotrópica.
- Sintetizar nanocoraza de oro sobre nanopartículas de quitosano (nativo y modificado) mediante el método mediado por semillas.
- Comparar de formación de nanocoraza en los nanosistemas núcleo-coraza, quitosano-oro y quitosano-modificado-oro.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas del nanosistema: DLS, AFM, Espectroscopía de absorción UV-Visible, SEM.
- Evaluar sus propiedades fototérmicas irradiando con una luz laser infrarroja.
- Analizar el efecto fototérmico del nanosistema sobre la viabilidad bacteriana (*Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923).

ANTECEDENTES

Nanotecnología

La nanotecnología emerge de la combinación de diversas áreas de la ciencia y tecnología aplicada, con el propósito de manipular a la materia (desde átomos, moléculas y nanomateriales) para la construcción de materiales y/o dispositivos funcionales, en el que al menos una de sus dimensiones se encuentre en la escala nanométrica (1-100 nm)[30]. En la escala nanométrica las propiedades mecánicas, ópticas, magnéticas y eléctricas cambian, porque la relación área superficial-volumen aumenta[31][32].

Nanotecnología Aplicada en Medicina

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en medicina. Esta se enfoca en la utilización de materiales con propiedades particulares para el desarrollo de nuevos tratamientos y métodos de diagnósticos a enfermedades de interés médico, como son las enfermedades cardiovasculares, neoplásicas e infecciones, las cuales representan un problema de salud a nivel mundial[33]. Distintos materiales de origen orgánico e inorgánico, como polímeros y metales nobles (oro, plata, platino), han sido investigados para su posible uso como agentes liberadores de fármacos, de diagnóstico y contraste, y terapéuticos (Figura 1)[34].

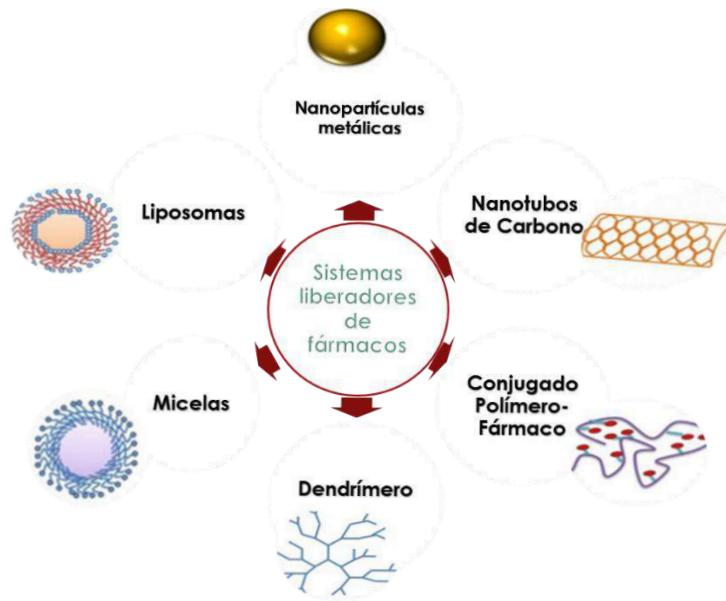


Figura 1 Nanosistemas liberadores de fármacos en nanomedicina. Adaptado de[34]

La nanomedicina en su búsqueda de nuevos nanosistemas para su aplicación médica recurre a materiales que sean biocompatibles, no tóxicos y biodegradables, para así evitar efectos secundarios[35]. Las nanoestructuras metálicas como las de oro han destacado en los últimos años, así como las nanopartículas provenientes de biopolímeros.

Nanoestructuras Metálicas de Oro

Las nanoestructuras de oro poseen propiedades mecánicas, ópticas, catalíticas y eléctricas que a nivel macroscópico no presenta[36]. Estas características, además de su biocompatibilidad, lo hacen prometedor en las aplicaciones dentro de la nanomedicina. Distintas nanoestructuras han destacado dentro del área médica, como agentes de diagnóstico y terapéuticos, las cuales destacan las nanobarras (NBs), nanopartículas sólidas (NpS), nanopartículas núcleo-coraza (NpNC) y nanocorazas huecas (NCH)[37].

El fenómeno de resonancia del plasmón de superficie localizado (RPSL) es una de las principales características que se considera para la aplicación en la nanomedicina. Este fenómeno se define como la oscilación coherente de los electrones de la superficie del metal cuando es irradiado por un campo electromagnético de determinado longitud de onda (Figura 2)[38]. Los electrones pueden pasar por dos procesos de relajación, para llegar a su estado base, ya sea por un proceso radiativo o no radiativo. En términos generales el proceso radiativo sucede cuando los fotones que inciden en el metal son dispersados en otra dirección. En el proceso no radiativo, los fotones provenientes del haz de luz incidente son absorbidos por los electrones de superficie produciendo lo que se conoce como electrones calientes, los cuales son electrones altamente energéticos, liberando la energía absorbida en forma de calor al medio que lo rodea [9][39]. Esta propiedad puede ser explotada en el desarrollo de las terapias fototérmicas.

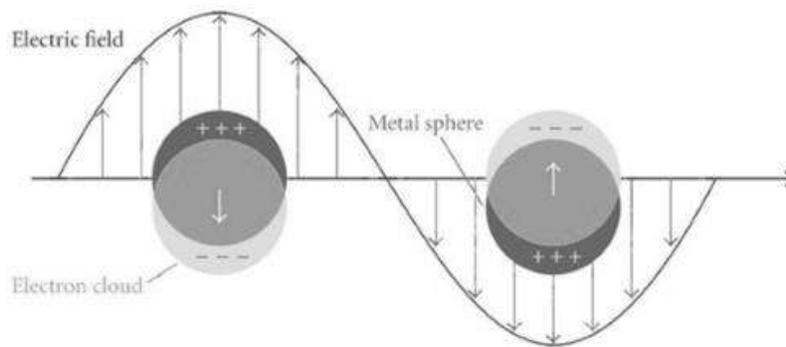


Figura 2 Representación del fenómeno RPSL en nanoestructuras esféricas. Adaptado [38]

El RPSL es dependiente de la forma y tamaño de la nanoestructura metálica y puede ser detectada mediante técnicas espectroscópicas. Regularmente el RPSL se presenta en la región del UV-Visible, en las nanopartículas esféricas aparece

aproximadamente en la longitud de onda de 520 nm[36], mientras que en las NBs y NpNC se puede manipular desde el proceso de síntesis desplazando su RPSL a una longitud de onda mayor perteneciente al infrarrojo cercano (NIR, 750-1000 nm)[40]. Este desplazamiento hacia la región del NIR es importante en aplicaciones biológicas, ya que en esta región los componentes sanguíneos y el agua tienen mínima interacción con el haz de luz incidente[41].

La terapia fototérmica es una aplicación importante dentro de la nanomedicina. el principal enfoque de esta terapia es combatir las células cancerosas utilizando nanoestructuras como las NBs, Nanocajas, Nanoprismas, y NpNC[42]. Además de la eliminación de células cancerosas, también se ha iniciado las investigaciones para la utilización de la terapia fototérmica en la eliminación de agentes bacterianos, los cuales ha mostrado avances significativos. [42][43].

Nanopartículas Núcleo-Coraza de Oro (NpNC)

Las nanopartículas núcleo-coraza de oro se conforman de una capa delgada de oro sobre un núcleo de un material dieléctrico[44]. Es importante mencionar que el RPSL puede manipularse, mediante la relación radio del núcleo/espesor de la coraza (RN/EC)[45]. Dependiendo de la relación RN/EC obtenida, el material dieléctrico utilizado y el medio en el que se encuentran suspendidas las NpNC, el RPSL presentará su máxima absorción en determinada longitud de onda[46]. Este fenómeno se determina con la teoría de Mie, la cual es aplicada para los metales nobles y calcular las secciones eficaces de extinción, las cuales se pueden obtener a partir de técnicas espectroscópicas de absorción[47] (Figura 3[40]).

Existen distintos procesos de síntesis de NpNC, los cuales permiten obtener la presencia del RPSL en la longitud de onda deseada. Las nanopartículas que forman el núcleo de las NpNC son las primeras en ser sintetizadas, comúnmente se utiliza las nanopartículas de sílice[14]. Para la síntesis de la nanocoraza de oro existen principalmente dos procedimientos. El primero es el mediado por semillas, el cual consiste en la obtención de una solución coloidal de oro, donde las nanopartículas

obtenidas tienen un tamaño aproximado entre 2-5 nm, las cuales se depositan en la superficie funcionando como puntos de crecimiento para la formación de la nanocoraza[48]. El segundo procedimiento es la reducción *in situ* del ácido cloroáurico (HAuCl₄), precursor utilizado en la síntesis de nanoestructuras de oro, sin la necesidad de la adsorción de semillas de oro sobre la superficie del material dieléctrico [14][48].

Ambas técnicas permiten obtener NpNC con las características ópticas deseadas, sin embargo, el procedimiento mediado por semillas permite un mejor control en la depósito del oro sobre la superficie del material dieléctrico, teniendo como resultado una coraza uniforme[49]. Dado que el proceso de nucleación permite asegurar que toda la superficie del núcleo sea cubierta, mientras que la reducción *in situ* da como resultado un crecimiento anisotrópico de la coraza[50].

En el proceso de nucleación los grupos funcionales presentes en la superficie del metal son importantes para consolidar la interacción. Como se mencionó previamente, el principal material utilizado como núcleo es la sílice donde la superficie es modificada con grupos aminos dándose una interacción electrostática con el oro. se han investigado otros materiales dieléctricos, como el poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)[51], donde las superficies de las nanopartículas obtenidas son modificadas para mejorar el depósito del oro sobre ellas. Esto ha despertado el interés científico en la búsqueda de nuevos biomateriales dieléctricos, lo que se sugiere al quitosano.

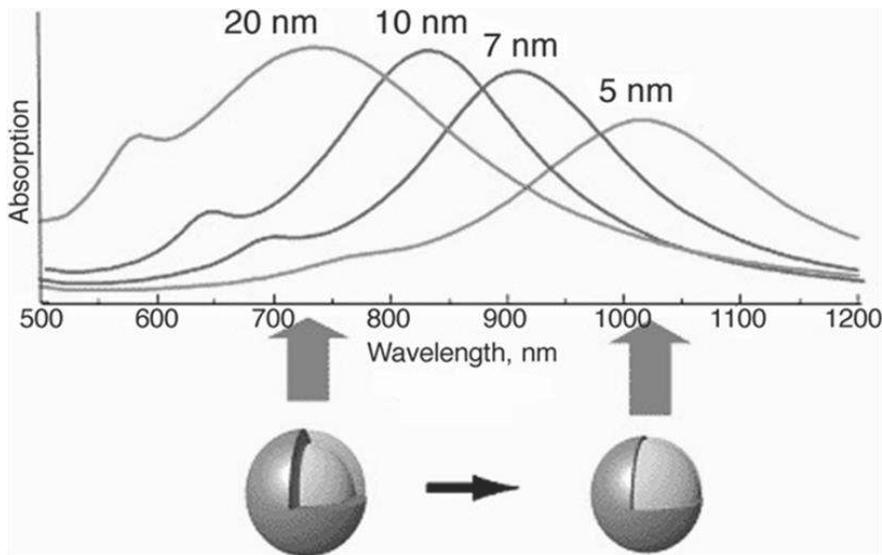


Figura 3 Desplazamiento del RPSL, dependiente de la relación radio núcleo/espesor de la coraza de oro. Adaptado de[40]

Quitosano

El quitosano es un polímero lineal conformado por bloques de *N*-acetilglucosamina y glucosamina (Figura 4)[52]. Se obtiene de la deacetilación de la quitina, proveniente de los exoesqueletos de ciertos crustáceos, insectos y de algunos hongos[53]. Se puede obtener por distintos medios químicos, incluyendo: tratamiento alcalino, enzimático o de explosión de vapor[52]. Este biopolímero posee numerosas propiedades, las cuales han despertado un gran interés científico para múltiples aplicaciones. Las propiedades que se pueden destacar son su solubilidad en ciertos ácidos, biodegradabilidad, biocompatibilidad, grupos funcionales reactivos (-NH₂, -COOH), función hemostática y regenerativa así como efectos antimicrobianos y fungistático[54], [55].

Se han realizado investigaciones para la aplicación del quitosano, que incluyen formación de geles, microgeles y en nanopartículas. Estas últimas se han evaluado como un sistema liberador de fármacos, debido a la reactividad de los grupos funcionales antes mencionados. Se han descrito distintos métodos de síntesis de

nanopartículas de quitosano, como lo es la coacervación, autoensamblaje de derivados hidrofóbicos, secado o pulverización, reticulación química y reticulación iónica[56]. Las nanopartículas obtenidas por estos métodos han mostrado la gran capacidad del quitosano de encapsular fármacos, ADN, ARN y otras proteínas[57][58].

El método de gelificación ionotrópica es el método más utilizado. Las propiedades intrínsecas del quitosano desempeñan una función importante en el proceso de síntesis de las nanopartículas. En ambientes ácidos el quitosano se carga positivamente debido a la protonación de los grupos aminos, permitiendo la interacción con otros materiales cargados negativamente para su conformación en la escala nanométrica[57]. El tripolifosfato (TPP) es un polianión, no tóxico y soluble en agua que se utiliza en la síntesis de las nanopartículas de quitosano (Np Qs) como agente entrecruzante. Para la obtención de las Np Qs factores como el pH de la solución de quitosano, la relación entre quitosano y agente entrecruzante (p/p), la temperatura y agitación, son importantes para lograr sintetizar partículas en la escala nanométrica.[29][59][60]. Mediante esta técnica se han obtenido nanopartículas esféricas por debajo de los 200 nm s.[61]

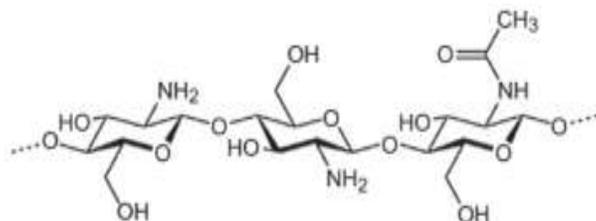


Figura 4 Estructura del quitosano. Adaptado [52]

Estas nanopartículas esféricas obtenidas exhiben en su superficie grupos aminos libres[62], los cuales pueden funcionar como sitios de deposición de semillas de oro

y posteriormente formar la nanocoraza. Además, que permiten modificar su estructura químicamente. De esta forma mediante reacciones químicas como la de amidación, pueden unirse moléculas que tengan grupos funcionales más afines al oro, como los grupos tioles (-SH)[25][26]. Así aumenta la posibilidad de que las semillas de oro se depositen en la superficie del metal mediante enlace covalente[55] [56], además de las interacciones electrostáticas del grupo amino libre[65]. De esta manera la combinación de las propiedades ópticas del oro y las excelentes propiedades del quitosano, dan como resultado un nanosistema prometedor en las aplicaciones biomédicas.

Actividad Antibacteriana de Quitosano

Existen numerosos estudios sobre las distintas aplicaciones de las nanopartículas de quitosano. La actividad antibacteriana y bacteriostática son de las aplicaciones sobresalientes. Si bien aún el mecanismo aún no está definido, existen propuestas que pueden describir los sucesos[26][66]. Factores como el peso molecular del quitosano, el pH del medio, el grado de deacetilación y temperatura son importantes para que el efecto antibacteriano se produzca[67]. El tipo de bacteria (Gram positivo o Gram negativo) también es un factor importante sobre el efecto y mecanismo antibacteriano, debido a la distinta composición de las bacterias[26]. Las bacterias Gram positivo presentan en su exterior una pared celular compuesta mayormente de una capa rígida de peptidoglicano seguido de una membrana plasmática. A diferencia de las Gram negativo cuya superficie es una doble membrana plasmática y entre ellas una capa delgada de peptidoglicano. En la Figura 5 se muestra la pared celular de las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.[68][69]

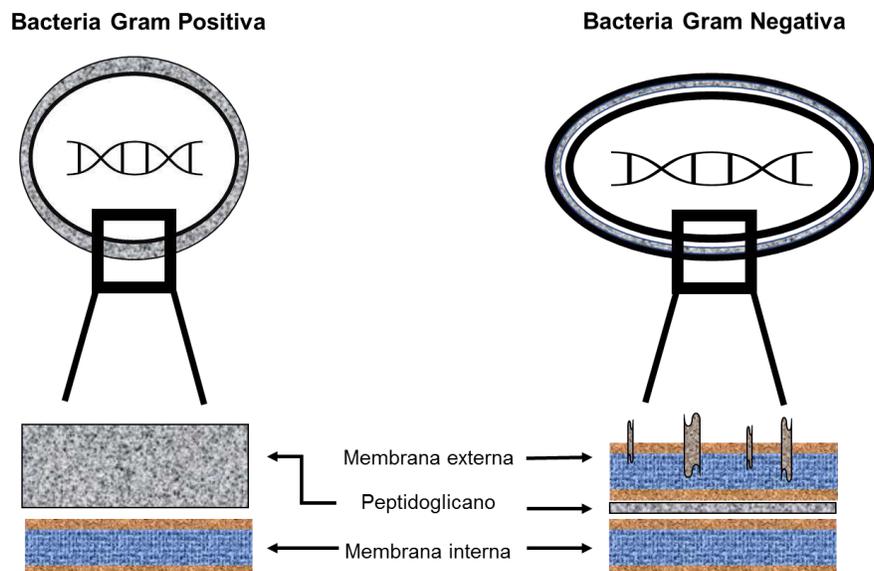


Figura 5 Representación esquemática de diferencias en la composición de la pared celular entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Basado de [69]

En la literatura se describen distintos mecanismos de acción del quitosano sobre las bacterias. El principal mecanismo descrito por autores es la interacción electrostática entre los grupos aminos protonados del quitosano y la carga negativa de la membrana de las bacterias lo cual provoca desequilibrio en la permeabilidad de la membrana resultando en la fuga de nutrientes y por lo tanto la muerte celular. Otro mecanismo de acción propuesto es la internalización de las Np Qs por medio de vacuolas. Alcanzando la interacción con el DNA bacteriano y por lo tanto interfiriendo en la síntesis de proteínas.[70]

Nanopartículas Núcleo-Coraza: Terapia Fototérmica Contra Agentes Bacterianos

En los últimos años las bacterias han desarrollado resistencia a múltiples fármacos, generando graves problemas en el sector salud y la industria alimentaria. La necesidad de nuevos sistemas de tratamientos es de gran importancia[71]. Estos

tratamientos novedosos deben proveer resultados favorables y a su vez evitar que las bacterias desarrollen resistencia. De esta manera las nanopartículas núcleo-coraza prometen ser un sistema antibacteriano efectivo. La eliminación de las bacterias por medio de la capacidad del oro de convertir la luz en calor (efecto fototérmico) evitaría así el desarrollo de resistencia por parte de los agentes patógenos. El calor generado por las NpNC atacaría directamente a las proteínas presentes en la superficie de las bacterias provocando su desnaturalización y por ende la muerte de las bacterias.[72][73]

Existen pocas investigaciones donde se hayan aplicado las NpNC en terapias fototérmicas contra bacterias. La mayoría de las investigaciones de terapias fototérmicas aplicando estas nanoestructuras se enfocan en la destrucción de células cancerígenas[2]. A pesar de eso, los resultados de la terapia fototérmica contra bacterias son prometedores. Por ejemplo, Khantamat, *et al.*[74] en 2015 reportaron un importante estudio, en él se describe como problema las enfermedades intrahospitalarias provocadas en catéteres. Realizaron la terapia fototérmica utilizando como modelo una superficie un catéter, la cual modificaron funcionalizado con nanopartículas núcleo-coraza sílice@Au y simulando una infección con *Enterococcus fecalis*. Después de la irradiación procedieron a la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) observándose una disminución considerable de las UFC en las muestras tratadas con la terapia fototérmica.

Esto proporciona nuevas opciones en la aplicación de la terapia fototérmica. Además, permite buscar nuevas combinaciones de biomateriales para implementar sistemas de NpNC. La conformación de nanopartículas de quitosano recubiertas de oro, prometen solucionar el problema de salud de infecciones provocadas por agentes bacterianos, debido a las propiedades que ambos biomateriales presentan.

MÉTODOS

Modificación de Quitosano

La presencia de grupos funcionales reactivos (-NH₂, -OH principalmente) presentes en la estructura del quitosano permite realizar cambios en las propiedades fisicoquímicas del biopolímero. Así, la modificación del quitosano se realizó por medio de una reacción de amidación uniendo químicamente ácido 3-mercaptopropanoico (3-MPA), el cual proporcionará el grupo funcional tiol (-SH). Este grupo funcional favorecerá la interacción de las nanopartículas de quitosano con las semillas de oro mejorando la formación de la nanocoraza. El procedimiento se realizó siguiendo la técnica descrita por Ko *et al.*[75], con adecuaciones. La reacción se lleva a cabo en dos partes, primero una activación del 3-MPA en una mezcla de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDAC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) disueltos en dimetilformamida (DMF). En la segunda parte se disuelve quitosano en HCl 0.01 M, una vez disuelto se ajusta el pH a 4.0 con NaOH 1 M. Posteriormente se añade el 3-MPA activado y se deja reaccionar por 12 horas. Transcurrido ese tiempo se procede a una diálisis exhaustiva para eliminar el exceso de reactivo que no formó parte de la modificación. La muestra obtenida se liofilizó y se le realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en modo de reflectancia atenuada (FT-IR/ATR) para evaluar la modificación.

Preparación de Nanopartículas de Quitosano

Las nanopartículas de quitosano nativo y modificado se obtuvieron por el método de gelificación ionotrópica, descrita por Calvo, *et al.*[76] con ligeras modificaciones (Doctor en Nanotecnología Mario Eduardo Almada Ortíz, Universidad de Sonora). El método consiste en la preparación de una suspensión de quitosano 0.5 mg/mL (nativo y modificado) en ácido acético 50 mM manteniendo en agitación magnética por 24 horas. Después, 10 ml de la suspensión de quitosano se colocó a baño maría a 60 °C por 10 minutos en agitación magnética constante. Justo después de los 10 min en baño maría, se pasó a un baño de agua helada (alrededor de 2-4°C) e

inmediatamente se agregó una alícuota de la solución de TPP (2 mg/mL), preparada previamente en agua desionizada y se dejó por 15 minutos en agitación magnética. Para encontrar las mejores condiciones de preparación de nanopartículas de quitosano, las proporciones de TPP y quitosano (p/p) se variaron sistemáticamente (1.2; 1.1; 1.0; 0.8; 0.6), así como el pH de la solución de quitosano (entre 4.5-5.0), con el propósito de obtener una nanopartícula con un tamaño inferior a los 200 nm.

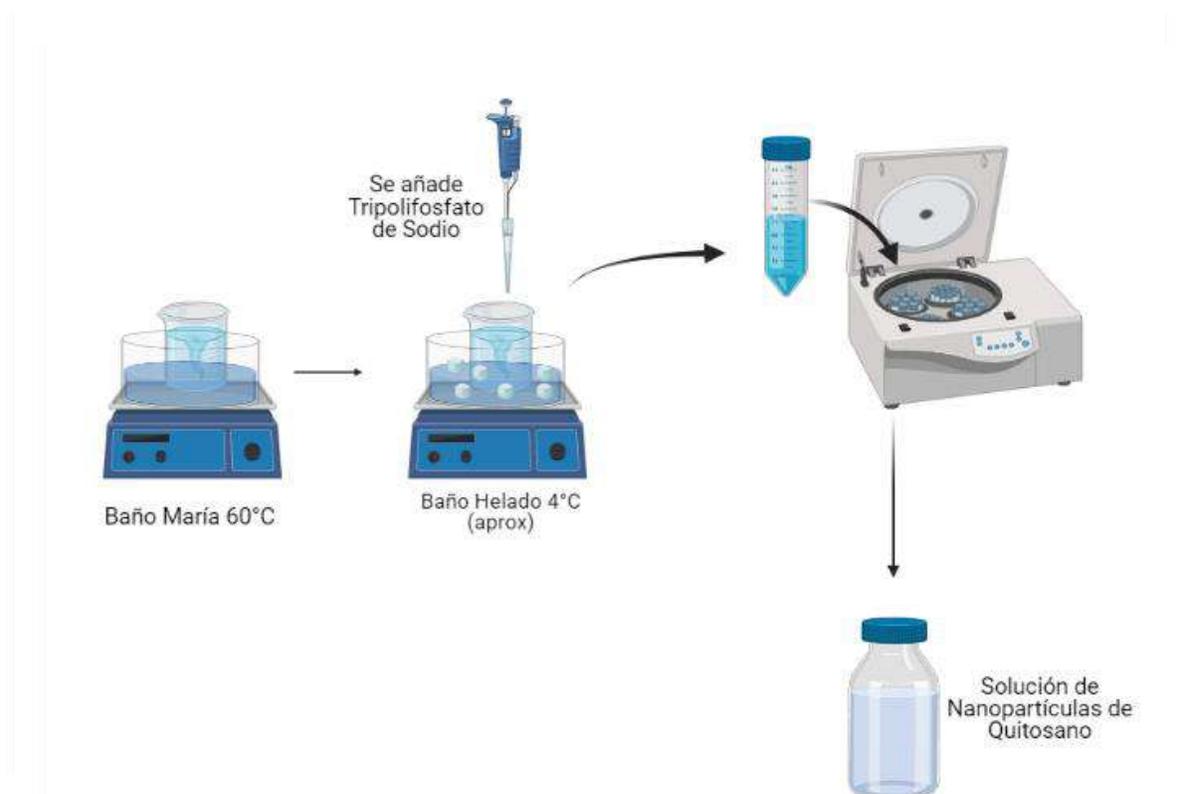


Figura 6 Esquema de síntesis de nanopartículas de quitosano, método de gelificación ionotrópica.

Síntesis del Nanosistema Núcleo-Coraza de Quitosano-Oro (NCQs-Au) Mediado por Semillas

Las nanopartículas de quitosano previamente preparadas fueron utilizadas como andamio de soporte para la obtención de la nanocoraza de oro. La síntesis de la nanocoraza se realizó por el método de crecimiento mediado por semillas. La solución coloidal de semillas de oro, se sintetizaron por el procedimiento descrito por Topete, *et al.*[77], con ligeras modificaciones, utilizando como agente estabilizante citrato de sodio y como agente reductor NaBH_4 . Posteriormente se realizaron diferentes experimentos para encontrar las mejores relaciones semillas oro-nanopartículas de quitosano para la obtención de la nanopartícula núcleo-coraza. Brevemente, una alícuota de la dilución de las semillas se adiciona a la solución de nanopartículas de quitosano, previamente diluidas (dilución 1:10), manteniendo una agitación suave y constante por diferentes tiempos (0.5 hrs y 16 hrs). Una vez transcurrido el tiempo, se añaden alícuotas de la solución de HAuCl_4 1.47 mM y ácido ascórbico 10 mM para el crecimiento de la coraza.

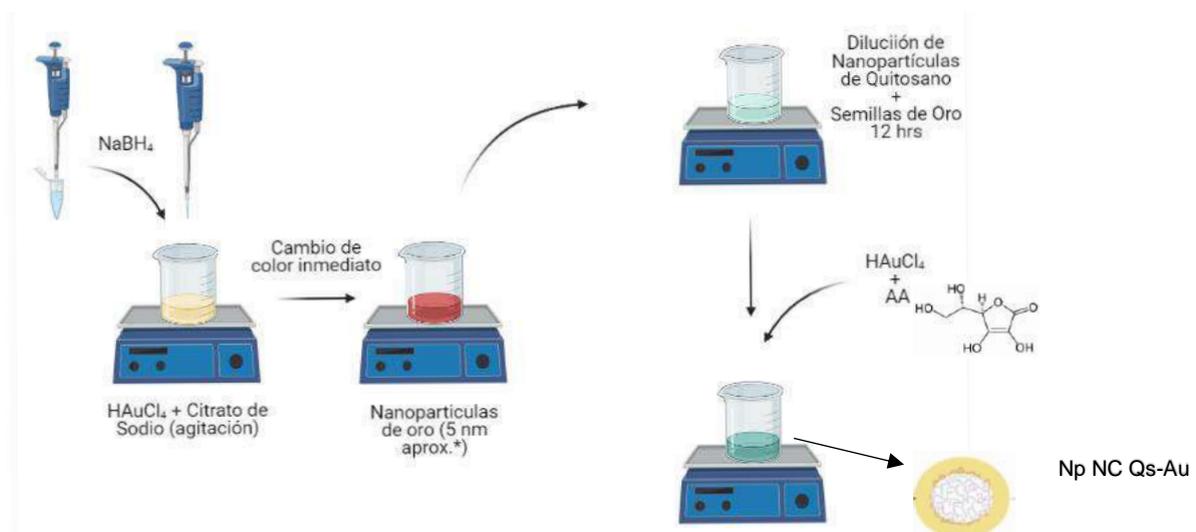


Figura 7 Esquema de síntesis nanocoraza de oro sobre Np de Qs.

Caracterización

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La técnica de dispersión de luz dinámica se basa en la medición de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersa contra tiempo, la cual se colecta a un ángulo particular. La dispersión sucede cuando el haz de luz incide en una suspensión de partículas de tamaños entre 1 nm y 1 μm . Las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersa, está relacionado con la velocidad de difusión de las partículas en suspensión, cuando estas colisionan con las moléculas del disolvente (movimientos Browniano). La velocidad de difusión o coeficiente de difusión (D) está directamente relacionada con el tamaño de las partículas; si son pequeñas, al interactuar la luz con ellas las variaciones de la intensidad se darán en periodos de tiempo corto, en comparación con las de mayor tamaño, donde las variaciones de tiempos serán un poco más prolongadas.

Una vez que se determina el D, el radio hidrodinámico de la nanopartícula se calcula mediante la ecuación (1) de Einstein-Stokes:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (1)$$

La distribución de tamaño de las nanopartículas de quitosano, se obtuvieron empleando un equipo *Zetasizers-NanoZS de Malvern instruments*, equipado con una láser rojo de $\lambda = 633 \text{ nm}$ (He-Ne, 4mW). Las muestras después de ser dispersadas en agua desionizada fueron colocadas en la celda de medición, realizándose medidas por triplicado a temperatura constante de 25 °C, los ciclos de medición fueron determinados por el equipo.

Potencial Zeta (ζ)

Las mediciones del potencial zeta, pueden analizarse por diferentes técnicas, una de las más utilizadas es por medio de la microelectroforesis de láser Doppler. La cual consiste en medir la velocidad electroforética de una nanopartícula cargada

cuando se aplica un campo eléctrico externo. Esta velocidad está relacionada con el ζ por medio de la ecuación (2) de Henry[78].

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3 \eta} f(Ka) \quad (2)$$

El valor de potencial zeta puede relacionarse con la estabilidad de las nanopartículas en solución, así que un valor elevado de potencial zeta se considera estable, debido a la repulsión electrostática que evita la aglomeración de las nanopartículas.[79] Las nanopartículas que presentan un potencial zeta en valor absoluto de |10| mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las nanopartículas con potenciales zeta mayores de |30| mV se consideran fuertemente catiónicas y aniónicas, respectivamente y se considera que son estables.[80]

Las muestras fueron analizadas en el equipo *Zetasizer-NanoZS* de *Malvern instruments*. La suspensión de nanopartículas se colocó en una celda para P ζ . Los valores son reportados como una media \pm la desviación estándar de tres mediciones independientes.

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica permite obtener imágenes topográficas de nanopartículas. Consta de una sonda o microplaca en donde se encuentra una punta a la cual se le hace incidir un láser. La punta sube o baja debido a la interacción con la superficie de la muestra, la micropalanca refleja la desviación del láser a un fotodetector y es interpretada por el software generando una imagen. (Figura 8).[81]

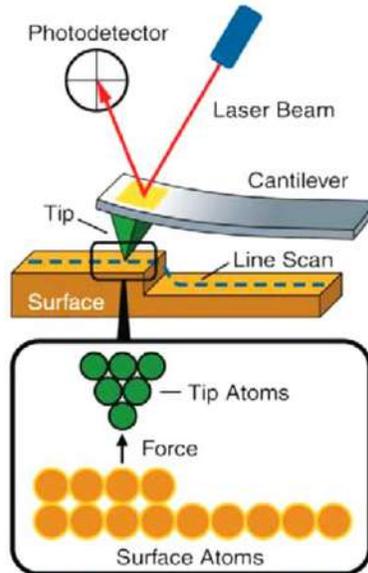


Figura 8 Representación de la interacción de la punta del AFM. [82].

Se utilizó un microscopio modelo JSPM-4210, JEOL, Japan. Una alícuota (entre 50-100 μ l) de la suspensión de las nanopartículas se depositó sobre una mica, dejando reposar por 1 min, el exceso se adsorbió con la ayuda de un papel y se dejó secar por 1 h. Las imágenes fueron obtenidas en modo no-contacto empleando un cantiléver HQ:NSC15/AI BS. Las imágenes fueron procesadas en el software WSxM 5.0.

Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica utilizada para obtener imágenes y caracterizar materiales en escala nanométrica por su alto grado de resolución. La imagen se obtiene a partir de electrones secundarios que se desprenden de la muestra cuando un haz de electrones incide en la superficie. Los electrones secundarios son recolectados por un detector los cuales son interpretados por un software como una imagen. Además, se puede obtener información sobre los elementos presentes en la muestra, cuando el haz de

electrones incide en ella, puede desprender un electrón del elemento, provocando una transición de un segundo electrón de niveles energéticos elevados ocupe el hueco, esto produce una rayo X de energía específica para cada elemento que se encuentre presente en la muestra, la cual es una técnica que nos ayuda a conocer los elementos presentes en la superficie del material, así como su morfología (Figura 9).[83], [84]

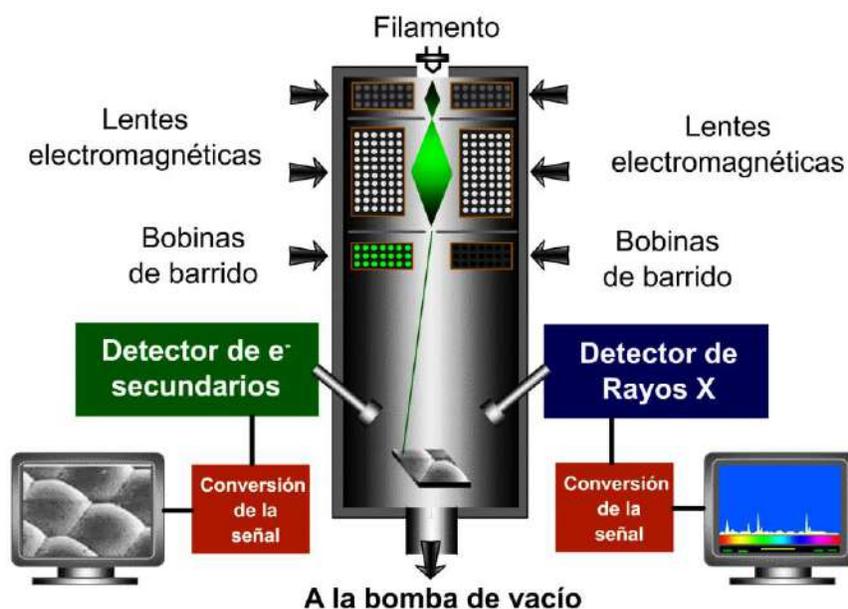


Figura 9 Representación de microscopía electrónica de barrido.

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo de ultra-alta resolución modelo JEOL JSM-7800F. Una alícuota de las NpNC se depositaron sobre una placa de vidrio, se dejaron reposar por 5 min. Posteriormente se adsorbió el excedente y se dejó secar por alrededor de 1 h.

Espectroscopía UV-Visible

La técnica de espectroscopia UV-visible es utilizada para la caracterización de nanopartículas metálicas. Debido al fenómeno de RPSL. El espectro de absorción del RPSL cae dentro del rango de longitudes del UV-Visible y varía de acuerdo con la forma, geometría, composición y tamaño de la nanopartícula metálica [47], [85]. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Lambda 365 PerkinElmer en modo de absorbancia, la suspensión de NpNC se colocó en una celda de cuarzo para la medición de la absorbancia en el rango de los 400-1000 nm.

Eficiencia de Conversión Fototérmica (η)

Para determinar la eficiencia de conversión fototérmica, la suspensión de nanocorazas de oro se colocó en una celda de cuarzo donde se irradiaron con un láser de onda continua ($\lambda=808$ nm, 1 W), registrándose los cambios de temperatura hasta alcanzar un máximo de esta. Al obtener una temperatura máxima, el láser se apagó para registrar el descenso de esta, realizando tres ciclos continuos de laser encendido y apagado, para determinar la estabilidad de las nanocorazas de oro durante el ensayo fototérmico. Es importante mencionar que la celda debe estar sellada con el sensor dentro para evitar que el agua de la solución se evapore. A partir de la curva de calentamiento-enfriamiento se determinará la eficiencia de conversión fototérmica (η) siguiendo el modelo descrito por Roper *et. al.*, [86].

Primero, los valores de la constante de velocidad de enfriamiento (τ_s) y el coeficiente de transferencia de calor (h) son determinados por la ecuación (3):

$$\tau_s = \frac{\sum m_i C_i}{hA} \quad (3)$$

Donde m_i y C_i se refieren a la masa y capacidad calorífica del sistema (agua, cuarzo, nanopartículas, etc.), A es el área externa de la celda, h es el coeficiente de transferencia de calor.

τ_s se determina a partir de la curva de enfriamiento la cual se ajusta a un comportamiento exponencial, ecuación (4)[87]:

$$\frac{\Delta T}{(T_{m\acute{a}x} - T_{min})} = e^{-\left(\frac{t}{\tau_s}\right)} \quad (4)$$

Al graficar el tiempo transcurrido contra el cambio de temperatura obtenemos un comportamiento lineal del enfriamiento, donde la pendiente de la línea recta corresponde al valor de τ_s , para después sustituir el valor en la ecuación (3) y obtener el valor de h .

Una vez que se conocen los valores de τ_s y h se obtiene la eficiencia de conversión fototérmica del nanosistema mediante la ecuación (5) descrita por Roper, *et al.*[88].

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{min}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A\lambda})} \quad (5)$$

Donde Q_0 es el calor suministrado por el sistema (agua y cuarzo), I es la potencia del láser y A_λ es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda del láser (808 nm).

Evaluación de Actividad Antibacteriana mediante Terapia Fototérmica

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante conteo viable en placa. Para ello la preparación de las muestras bacteriológicas se utilizó el procedimiento de macrodilución en tubo aprobada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)[89] donde se trabaja con una concentración conocida de 500,000 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Las cepas bacterianas que se utilizaron fueron cepas de control ATCC, *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923.

En la suspensión de NpNC (concentración total de oro 10.97 $\mu\text{g/mL}$) se añadieron las bacterias, después se irradiaron de manera constante por la parte superior del tubo, por un tiempo de 15 min, con un láser de $\lambda=808$ nm a una potencia de 1 W. Después de la irradiación se tomó una alícuota para extenderla sobre la placa de agar e incubar a 37°C por 16-18hrs. Transcurrido el tiempo de incubación se procede al conteo de UFC viables después de la irradiación. Se hicieron

comparaciones con controles sin irradiar e irradiadas (bacterias suspendidas en agua desionizada).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Modificación de Quitosano

La modificación química del quitosano con 3-MPA se realizó con el fin de favorecer la interacción entre el quitosano y el oro. El azufre y el oro tienen un elevado grado de atracción, formando un enlace covalente entre ellos, unión más energética que las interacciones electrostáticas entre el grupo amino y los iones de oro [90]. Al modificar la cadena del quitosano y, formar la nanopartícula, se aumenta la afinidad en los sitios de interacción del oro para que se deposite sobre la superficie permitiendo la formación de la coraza.

La modificación se realizó en dos partes. En la primera parte se activó el 3-MPA cuando reacciona con EDAC formando una especie intermediaria inestable llamada acilisourea. La estabilización de esta especie química es la adición de NHS, formándose una nueva especie intermediaria llamada Sulfo-NHS. La particularidad de la Sulfo-NHS es la afinidad de reaccionar, primordialmente, con las aminas primarias, de esta manera favorece la formación del enlace amida con el grupo carbonilo, proveniente del 3-MPA y la amina del quitosano (Figura 10)[91].

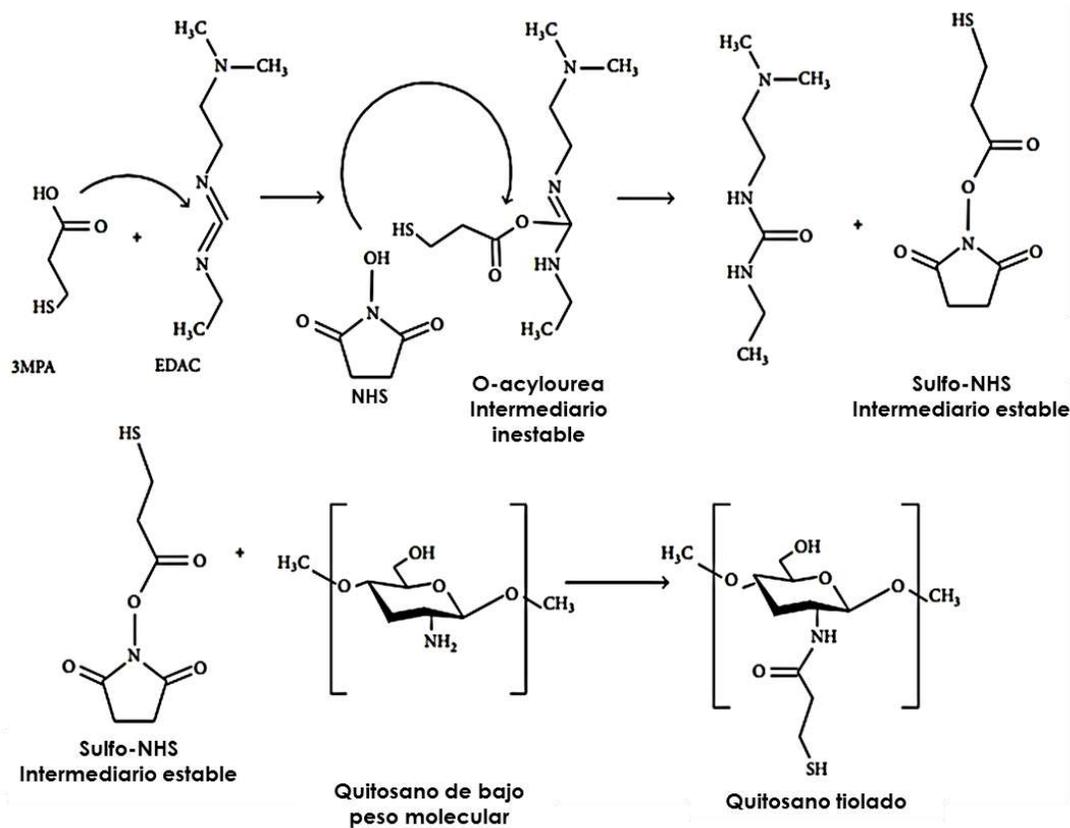


Figura 10 Esquema de reacción de amidación, en la modificación de quitosano nativo [91].

Espectroscopía FT-IR(ATR)

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier en modo de reflectancia total atenuada se utilizó para corroborar la modificación química del quitosano. En la Figura 11 se muestra el espectro del quitosano nativo y quitosano modificado. La presencia las bandas de absorción de las aminas y amidas del quitosano se localizan en los números de onda $1600-1550\text{ cm}^{-1}$ y $1550-1500\text{ cm}^{-1}$ [92] respectivamente, manteniéndose en ambas muestras analizadas. El quitosano nativo con un grado de desacetilación del 80-90% muestra una mayor intensidad de absorción de las aminas, en comparación con la del quitosano modificado, donde la intensidad de la banda de absorbancia de las aminas se reduce y se incrementa la intensidad de la banda de las amidas, indicando la unión química del 3-MPA.

Además, la presencia de un ligero hombro en la región de los 2600-2500 cm^{-1} puede atribuirse al grupo tiol (-SH) del 3-MPA[92].

La región entre los 4000-3000 cm^{-1} son atribuidas a las vibraciones de estiramiento de enlaces -OH y -NH₂. Por lo que esta región del espectro también provee información. Debido a la sustitución grupos aminos por enlaces amidas la concentración disminuye, reflejándose en el espectro del quitosano modificado.

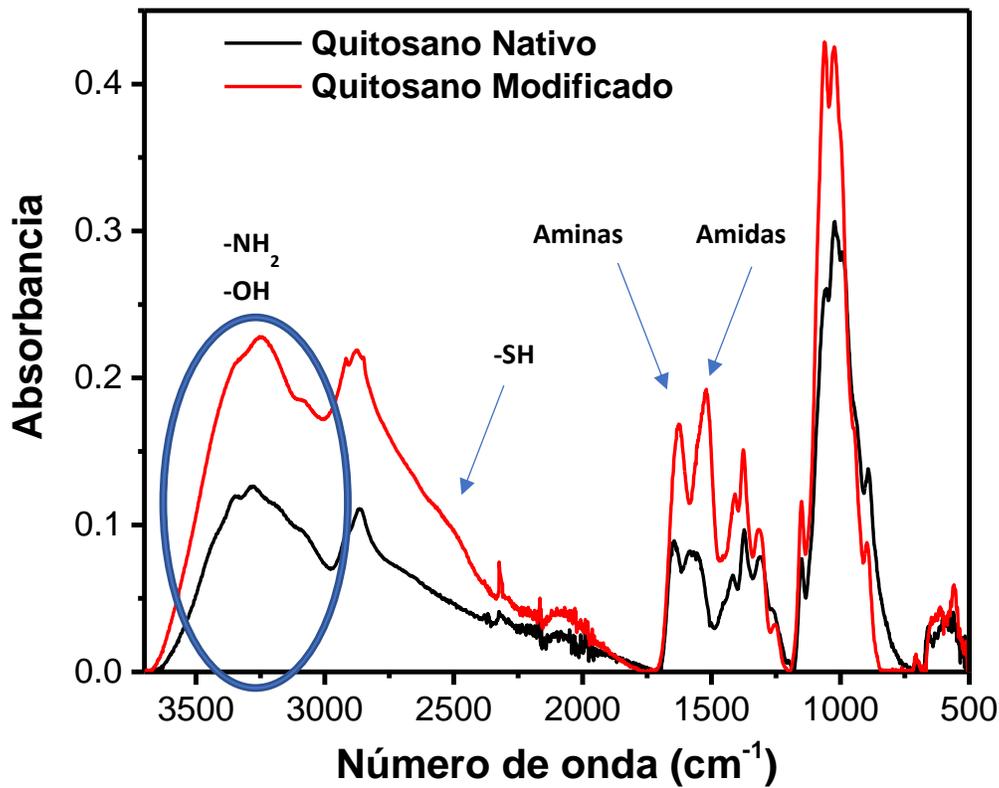


Figura 11 Espectro FT-IR/ATR de quitosano nativo y modificado.

Síntesis de Nanopartículas de Quitosano Nativo y Modificado

El proceso de obtención de nanopartículas de quitosano se realizó a diferentes pH y variando la cantidad del agente entrecruzante, TPP, esto con el fin de encontrar las mejores condiciones de la formación de las nanopartículas de quitosano (NpQs). La protonación de grupos aminos de la cadena del quitosano se da en ambientes ácidos, y la formación de NpQs se favorece a pH entre 4.5 y 5.5 por debajo del pKa del quitosano (pH 6.5) [60], asegurando las interacciones electrostáticas entre los grupos aminos protonados del quitosano y los grupos fosfatos del TPP.

Al variar el pH en la síntesis es necesario cambiar las proporciones de TPP/quitosano para formar las nanopartículas. Los pH en los cuales se trabajaron fueron de 4.5, 4.8 y 4.9, así como las relaciones (p/p) TPP/Qs 1.2; 1.1; 1.0; 0.8 y 0.6., manteniendo fija la cantidad de quitosano.

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos en las síntesis de Np Qs, determinando que las condiciones de pH 4.8 y una relación TPP/Qs 0.8 son las mejores para obtener nanopartículas de un tamaño menor a los 200 nm y con una morfología esférica para ambos tipos de quitosano, nativo y modificado con grupos tiol. Esta información se discutirá en el siguiente apartado.

Tabla 1 Efecto de pH y cantidad de TPP en el tamaño de NP Qs

Quitosano	TPP	Relación TPP/Qs (p/p)	pH	Tamaño*(nm)	PDI
Nativo (5mg)	5mg	1.0	4.88	273±2	0.473
Nativo (5mg)	4.5mg	0.9	4.88	208±7	0.113
Nativo (5mg)	4mg	0.8	4.88	138±1	0.108
Modificado (5mg)	6mg	1.2	4.53	368±21	0.518
Modificado (5mg)	5mg	1.0	4.53	209±8	0.359
Modificado (5mg)	4mg	0.8	4.53	203±15	0.377
Modificado (5mg)	4mg	0.8	4.88	154±1	0.145
Modificado (5mg)	3mg	0.6	4.88	222±6	0.231

* Los valores presentados son mediciones promedio con ± desviación estándar.

Morfología de nanopartículas de Quitosano Nativo y Modificado

Las nanopartículas de quitosano modificado (Np QsMod), sintetizadas en pH de 4.5, presentan una morfología amorfa con tamaños por arriba de los 500 nm (Figura 12). El pH es un factor importante en la formación de las nanopartículas de quitosano, por lo que a pH ácidos la mayor parte de los grupos aminos del quitosano se encuentran protonados, provocando repulsión electrostática intracadenas e intercadenas del quitosano. Es importante mencionar que la repulsión intracadena en las moléculas de quitosano conduce a una conformación extendida del biopolímero lo cual dificulta la formación de una nanopartícula bien estructurada, por lo que al observar en AFM su morfología es irregular, de tal manera que parecen agregados, como forma de frambuesa.

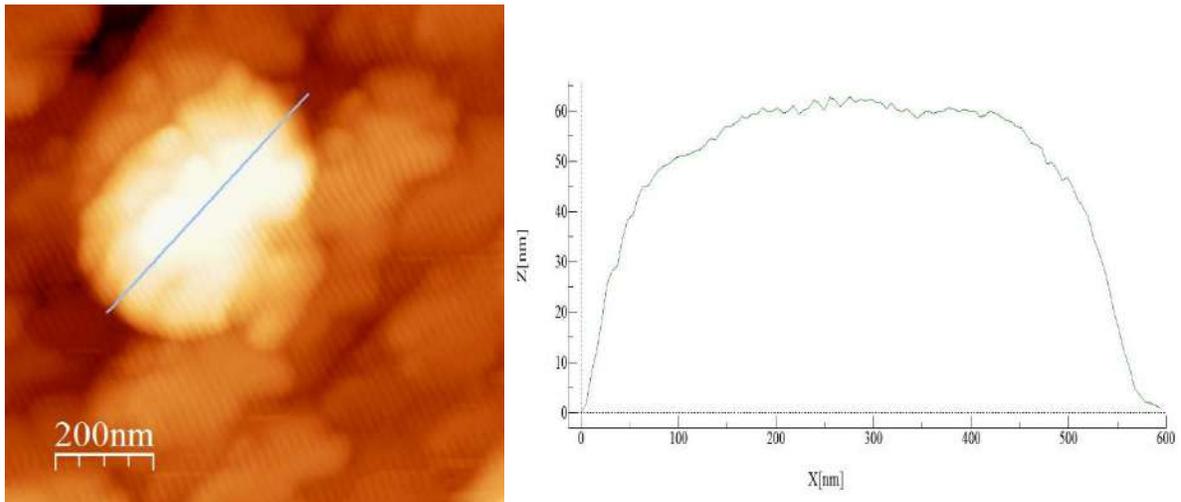


Figura 12. Micrografía de AFM de Np QsMod obtenidas a un pH 4.53, relación TPP/Qs 0.8. y gráfica del tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y análisis de micrografías por AFM.

Por otra parte, las Np QsMod obtenidas a un pH de 4.8, presentan una morfología esférica, tal como muestran las micrografías de AFM (Figura 13). Además, el tamaño promedio de esta Np está por debajo de los 200 nm, dimensiones que son adecuadas para la obtención de la nanocoraza de oro.

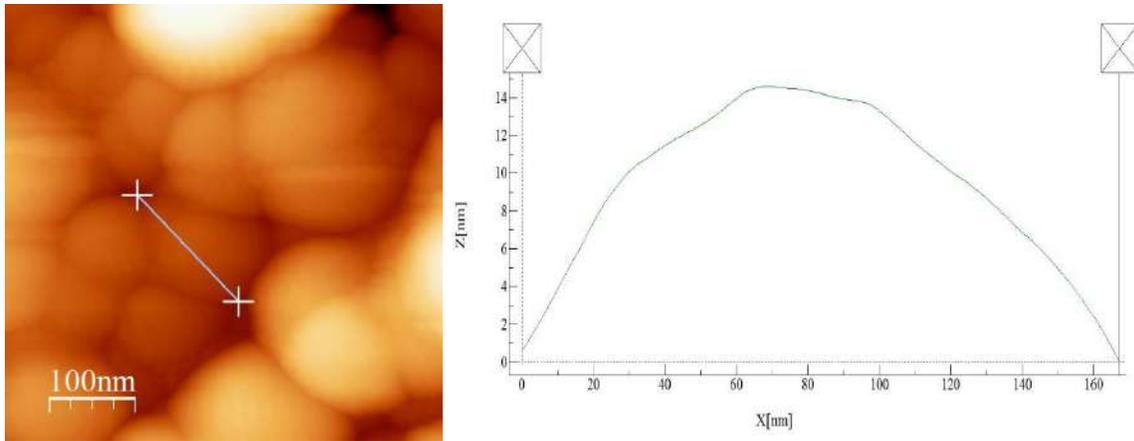


Figura 13. Micrografía de AFM, de Np QsMod a pH 4.88 relación TPP/Qs 0.8 (izq). Gráfica de tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y análisis de micrografías de AFM (der).

Las condiciones de síntesis de nanopartículas de quitosano nativo fueron similares a las NpQsMod, pH 4.88 y una relación TPP/Qs de 0.8 para obtener un tamaño promedio por debajo de los 200 nm, así como una morfología esférica (Figura 14)

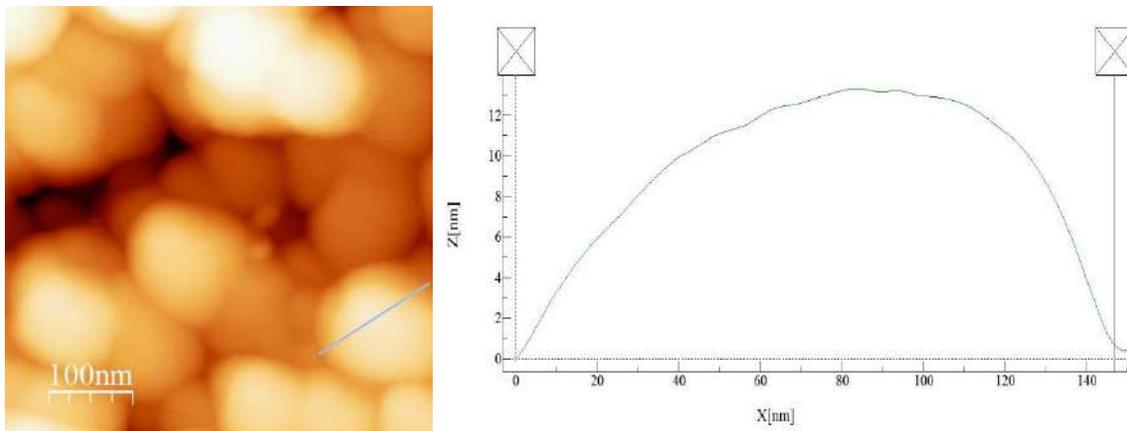


Figura 14. Micrografía de AFM, de Np QsNativo a pH 4.88 relación TPP/Qs 0.8 (izq). Gráfica de tamaño proporcionado por el programa WSxM 5.0 utilizado para la visualización y análisis de micrografías de AFM (der).

La obtención de nanopartículas con morfología esférica es favorable en las aplicaciones biológicas, además de mantenerlas por debajo de los 200 nm. Estas características permiten que las nanopartículas circulen en el organismo evitando ser captadas por el hígado y el bazo[93], elevando la posibilidad de llegar al sitio deseado para su utilización. De esta misma manera el tamaño influye en la interacción con la pared celular de las bacterias, ya que al ser menor el tamaño mayor superficie de la bacteria podrá interactuar y así efectuar algún mecanismo de acción para la eliminación de la bacteria, el tamaño del polímero también es importante tener en cuenta, ya que se ha registrado que el quitosano de menor peso molecular tiene mayor eficiencia en la eliminación de bacterias [94][95].

Potencial ζ de las Nanopartículas de Quitosano

El valor de potencial ζ está relacionada con la carga superficial de las nanopartículas, así como su estabilidad en el medio en el que se encuentran, por lo que se fue necesario dicha evaluación. Los valores obtenidos para las nanopartículas de quitosano (nativo y modificado) sintetizadas a pH 4.88, se muestran en la Tabla 2. Los valores obtenidos indican una carga superficial catiónica, provenientes de los grupos aminos protonados que se encuentran en la cadena del quitosano, comparándose con los resultados obtenidos en investigaciones previas donde también se obtienen valores de P ζ positivos [96][97].

Tabla 2 Resultados de P ζ

Quitosano	P ζ (mV)
Nativo	+18 \pm 0.3
Modificado	+17 \pm 0.2
Los valores presentados son la media \pm desviación estándar	

Síntesis de Nanocorazas de Oro

La síntesis de las nanocorazas mediado por semillas es uno de los procedimientos que se utiliza para obtener las Nanopartículas Núcleo-Coraza (NpNC). El proceso consta de varios pasos y factores importantes que deben ser considerados como el tiempo en el paso de depósito de semillas, grupos funcionales presentes en la superficie del núcleo y el tipo de agente reductor[48].

En este trabajo la coraza de oro se obtuvo por el método mediado por semillas de oro (\approx 5 nm), las cuales se sintetizaron siguiendo el procedimiento descrito por Topete, *et al*, con ligeras modificaciones [51].

En un primer experimento, se preparó una dilución de nanopartículas de quitosano nativo y modificado (1:10), y se añadió una alícuota de semillas de oro (Au 2.75 x

10^{-9} mMoles), manteniéndose en agitación constante, por 0.5 h y 16 h, después se adicionó una alícuota de HAuCl_4 y de ácido ascórbico, llevándose a cabo la reducción *in situ* del Au^{+3} a Au^0 sobre las nanopartículas de quitosano. La formación de la coraza se monitorizó por espectroscopía de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis). En el espectro obtenido se puede observar la presencia del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie. Con base a los resultados de espectroscopia UV-Vis, se obtiene que con un tiempo prolongado en el depósito de semillas se favorece la formación de la coraza (Figura 15). Ashayer, *et al.*[98], investigaron el efecto que tiene el tiempo de depósito de semillas, obteniendo que un tiempo mayor a 90 min la cantidad de semillas depositadas sobre la superficie eran mayor, pero sin cubrir totalmente la superficie, siendo necesario un posterior paso de crecimiento.

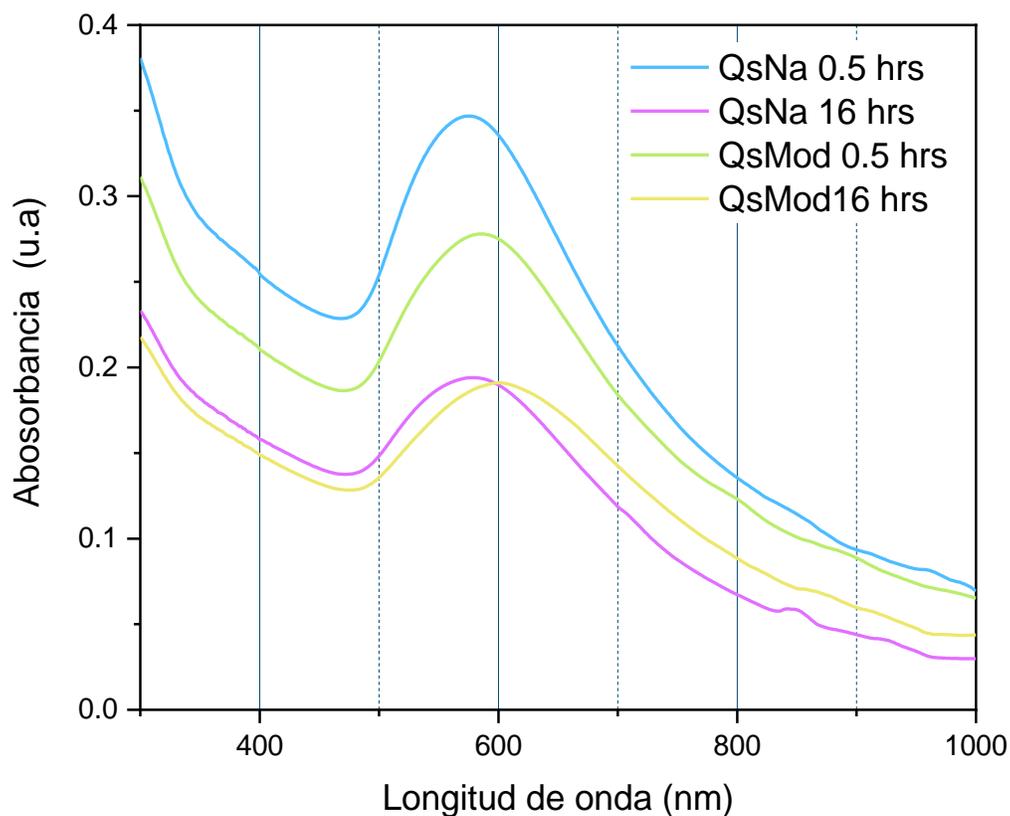


Figura 15. Espectro UV-Vis Np NCQs-Au, con distintos tiempos de depósito en el primer paso de síntesis (Np Qs más semillas de oro).

Para observar la morfología de las Np NCQs-Au se realizó AFM y SEM. Con ambas técnicas microscópicas se logran observar la cubierta de oro sobre las Np Qs. Estas presentan una morfología rugosa, en ambos núcleos, tanto de quitosano nativo como modificado (Figura 16). También se observan nanopartículas de oro libre, indicando un exceso de semillas oro y de la cantidad de sal de oro. Por este motivo, se ajustó la cantidad de semillas adicionada a la síntesis de las NpNC, utilizando una dilución de 1:4.

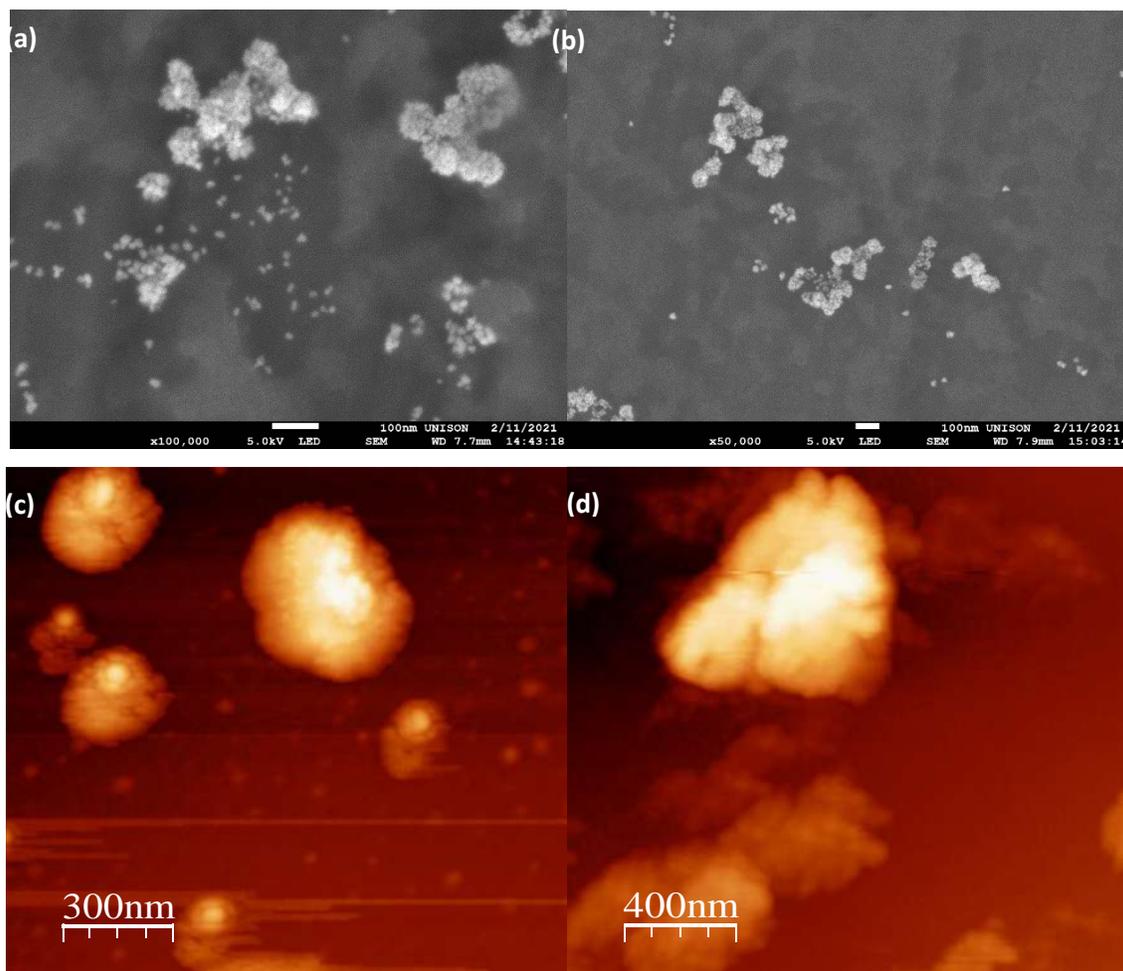


Figura 16 Micrografías de SEM a) nanopartículas núcleo-coraza QsNa-Au, b) nanopartículas núcleo-coraza QsMod-Au. Micrografías AFM, c) nanopartículas núcleo-coraza QsNa-Au, d) nanopartículas núcleo-coraza QsMod-Au.

En los siguientes experimentos se añadió 2.94×10^{-4} mMoles de iones Au^{3+} en intervalos de 90 min para su reducción *in situ* y completar la formación de la coraza, ya que el tiempo de reacción de reducción también es un factor importante en la formación de la nanocoraza. Los intervalos de adición de iones de oro y AA se realizaron para que la reducción de Au^{3+} a Au^0 sucediera sobre la superficie de las nanopartículas. De acuerdo Luty-Blocho, *et al.*[99] la reducción sucede en dos partes, primero de $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^{1+}$, después mediante un proceso autocatalítico, Au^{1+}

se reduce a Au⁰. Lo cual favorece la formación de la nanocoraza de oro debido a las semillas de oro depositadas en la superficie de las nanopartículas de quitosano [99].

Para asegurar la reproducibilidad del método la síntesis de corazas sobre la matriz de quitosano nativo y modificado los experimentos se realizaron por triplicado. La formación de la coraza de oro se monitorizó por espectroscopía de absorción UV-Vis a través de la presencia del PRSL. En ambos casos el máximo de absorción del PRSL se encuentra alrededor de los 600 nm, (Figuras 17 y 18). En los espectros se puede observar cambios significativos en la forma de las bandas de absorción. El PRSL de las NpNC formadas sobre el quitosano nativo se presenta como una banda definida que puede atribuirse a una formación de coraza esférica (Figura 17), mientras que las bandas de absorción que presentan las NpNC sobre quitosano modificado, es más ancha, sugiriendo la formación de una coraza de oro anisotrópica (Figura 18).

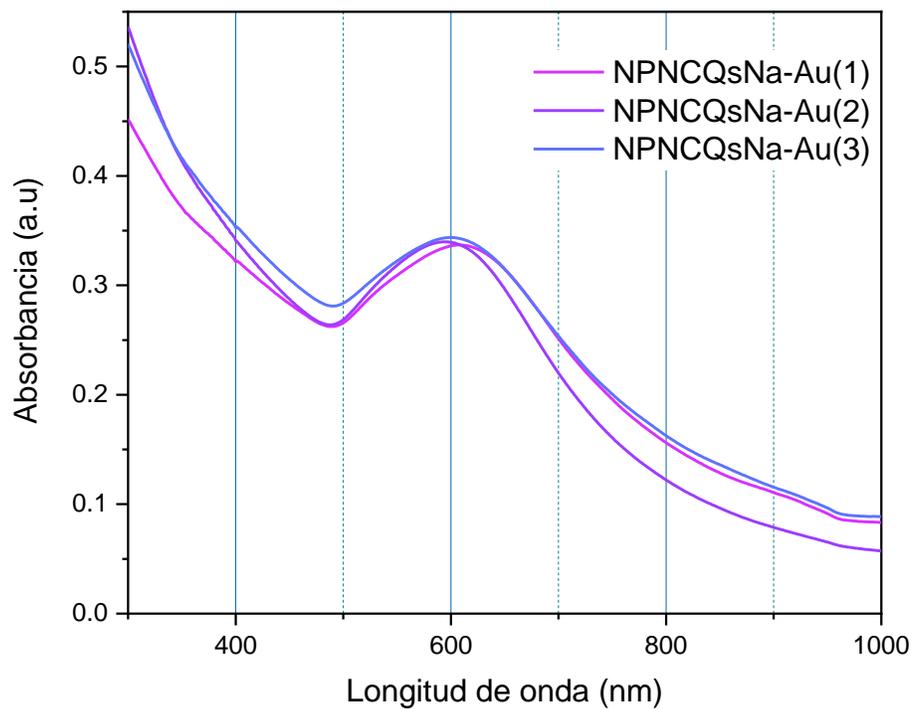


Figura 17 Comparación de espectros de absorción de tres repeticiones de síntesis de Np NCQsNa-Au.

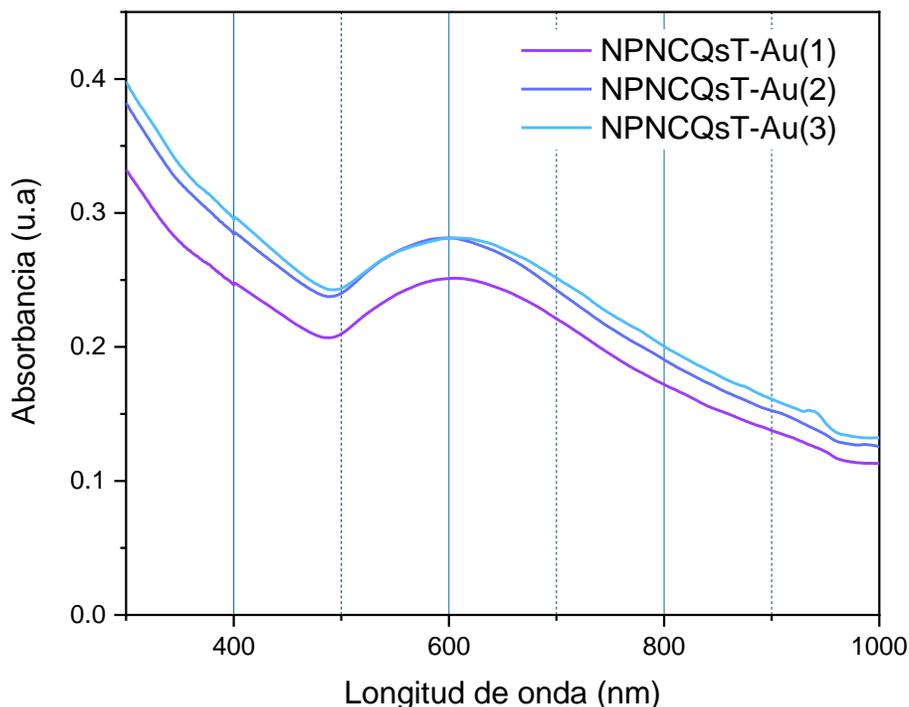


Figura 18 Comparación de espectros de absorción de tres repeticiones de síntesis de Np NCQsMod-Au. Donde se observa que conservan la máxima absorción alrededor de los 600 nm.

Purificación de Nanopartículas Núcleo-Coraza

Las nanopartículas núcleo-coraza de oro se recuperaron por centrifugación, de donde el sobrenadante se desecha y el precipitado se resuspende con agua desionizada. La integridad de las NpNC se corroboró por SEM. En las micrografías de SEM (Figura 19) se puede observar la destrucción de las NpNC, esto se puede atribuir a las diferentes densidades entre el polímero y el metal, el cual, al aplicarse un efecto centrífugo, el material más denso tiende a desplazarse hacia el fondo de manera rápida. El nanosistema al estar formado por sitios de crecimiento del metal sobre el polímero, este efecto provoca la ruptura de los puntos donde el oro creció

en la superficie de la nanopartícula de quitosano. Fue necesario buscar otras alternativas de métodos de purificación.

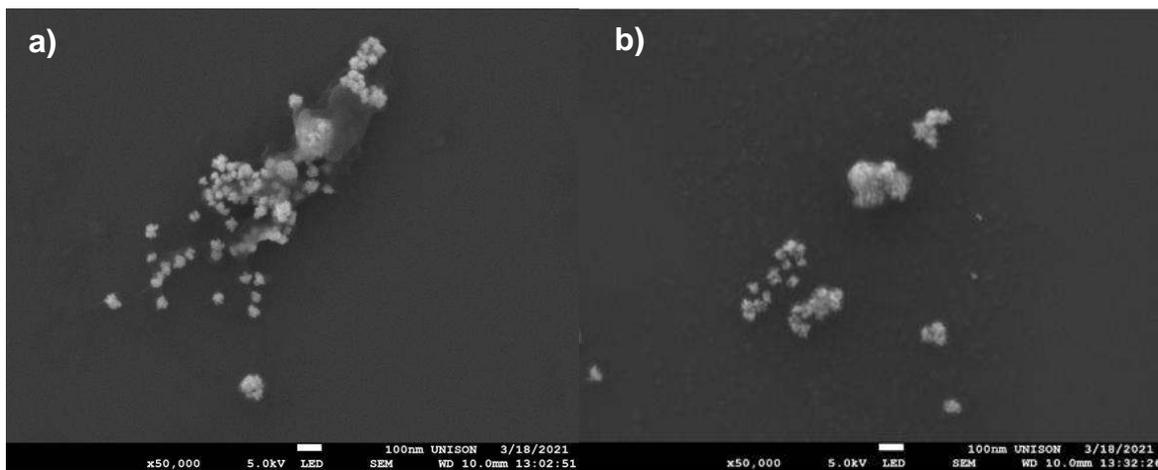


Figura 19. Micrografías de SEM de Np NCQs-Au después de purificar por centrifugación, (a) QsNa, (b) Qsmod. Donde se observan fragmentos de las Np.

Dado que la suspensión de NpNC se encuentra en ambiente acuoso, el proceso de diálisis es conveniente, con este proceso se puede asegurar la eliminación del exceso de reactivos libres y productos secundarios de la reacción. La utilización del proceso de diálisis a nanosistemas conformados por oro, debe de realizarse con cuidados en el tiempo de duración, en procesos prolongados genera desestabilización del oro lo cual provoca agregación de las nanopartículas[100]. Para el nanosistema sintetizado en este trabajo se realizó una diálisis de 4 hrs, utilizando agua desionizada. Durante este tiempo la integridad del nanosistema se mantuvo, esto se corroboró mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y microscopía de fuerza atómica, antes y después del proceso de diálisis. Obteniendo resultados favorables, ya que las bandas máximas de absorción se mantienen en las longitudes de onda alrededor de los 600 nm antes y después del proceso,

(Figuras 17,18 y 21 respectivamente), y en la morfología de las nanopartículas se observa una superficie regular y sin nanopartículas libres alrededor (Figura 20).

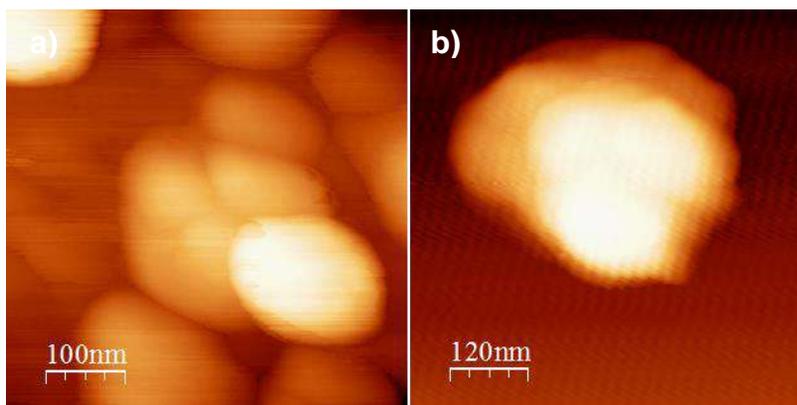


Figura 20 Micrografías de AFM de Np NCQs-Au a) QsNa, b) QsMod. Se observa una morfología regular.

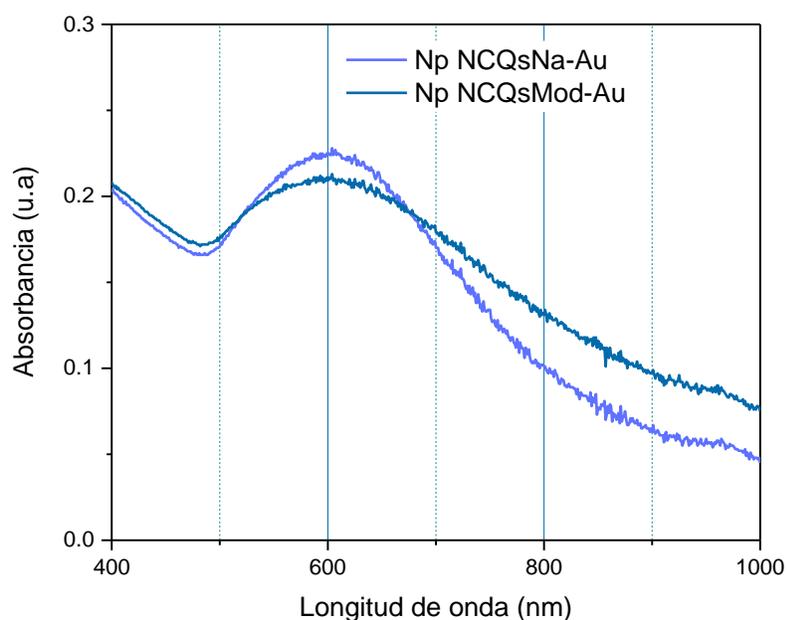


Figura 21 Espectro de absorción de las Np NC purificadas por diálisis, donde se observa un ligero desplazamiento a una mayor longitud de onda.

Después de la purificación también se realizaron análisis de tamaño y carga superficial ($P\zeta$), los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Caracterización de nanopartículas núcleo-coraza purificadas

NpNC	Tamaño (nm)	PDI	$P\zeta$ (mV)
NpNc QsNa-Au	458±20	0.228	+28±1
NpNc QsMod-Au	434±15	0.381	+27±2

Los valores presentados son mediciones promedio con \pm la desviación estándar.

Los valores obtenidos para el P ζ difieren de los registrados en la literatura, por ejemplo Sood, *et al.*[42] sintetizaron una nanocoraza de oro por el método mediado por semillas, utilizando como agente reductor ácido ascórbico, (método similar al empleado en este trabajo), y reportan un valor de P ζ = -23.3 mV, discuten que el ácido ascórbico al reducir al oro, sus derivados oxidados funcionan como agentes estabilizantes confiriendo a la nanopartícula carga negativa. En el caso del nanosistema sintetizado en este trabajo se hipotetizan dos conformaciones los cuales le dan la carga positiva (Figura 22). En primer lugar se puede hacer referencia al exceso de quitosano, el cual no pudo ser eliminado en el proceso de diálisis, el cuál interactúa con los productos del AA de carga negativa que se encuentran estabilizando al oro recubriendo a la nanopartícula por lo que los grupos aminos del polímero le confieran la carga positiva al nanosistema, coadyuvando a la estabilización del mismo, ya que los valores obtenidos son cercanos a los |30| mV, los cuales se consideran un nanosistema estable[79].

Se considero también que el valor positivo del nanosistema sea por el método utilizado. Ya que entre los puntos de crecimiento se tenga un espacio libre, donde cadenas del polímero queden expuestas al exterior, enmascarando el valor de la carga negativa proveniente de los productos de reacción del AA. Para confirmar cualquier hipótesis se necesitaría realizar otro estudio de caracterización, como la microscopía electrónica de transmisión ya que proporcionaría información de la morfología del nanosistema de manera detallada.

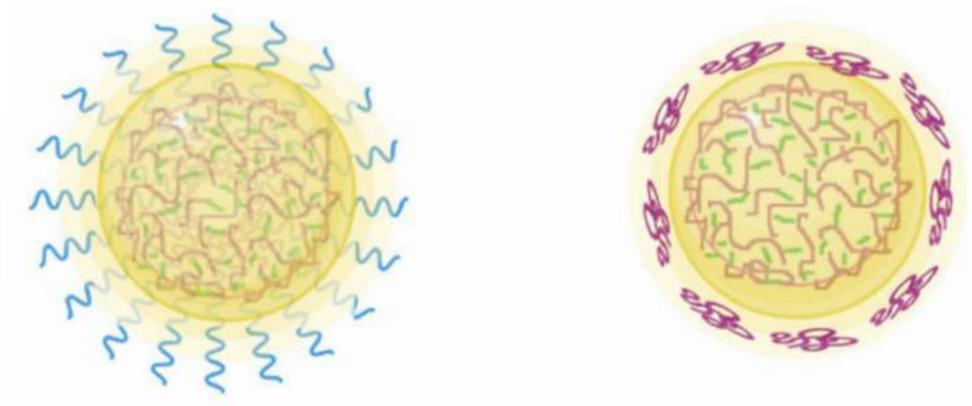


Figura 22 Representación esquemática de hipótesis de formación de NpNC Qs-Au.

Eficiencia de la Conversión Fototérmica (η)

Las propiedades fototérmicas de las NpNC purificadas fueron evaluadas utilizando un láser de $\lambda=808$ nm a una potencia de 1 Watt. El ensayo de fototermia constó de tres ciclos de calentamiento y enfriamiento. Las gráficas obtenidas se muestran en las Figuras 23 y 24. El comportamiento que se presenta durante los ciclos se considera constantes en ambos casos, indicando estabilidad de las nanopartículas al proceso fototérmico. El máximo incremento de la temperatura resultó mayor para las NpNC QsMod-Au ($\Delta T = 6.3$ °C) en comparación al registrado para las NpNC QsNa-Au ($\Delta T = 3.9$ °C).

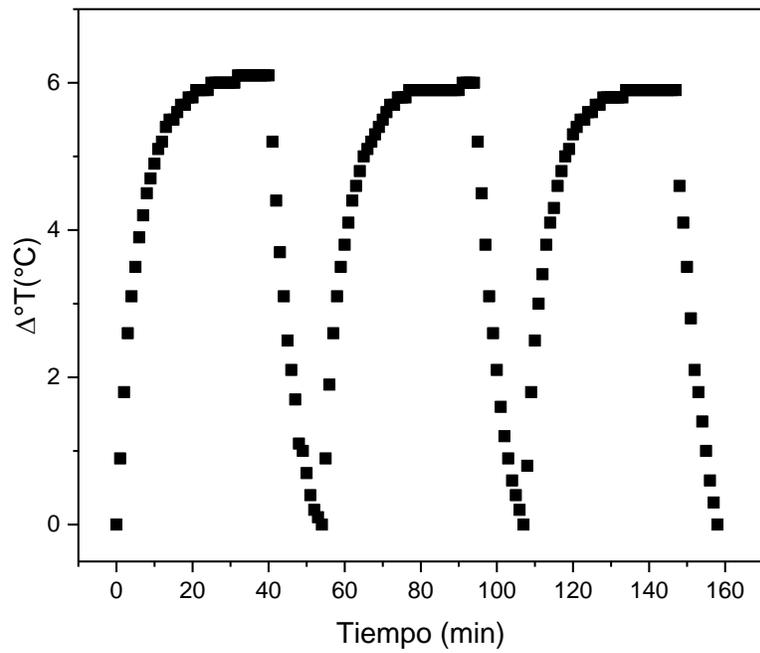


Figura 23 Curvas de calentamiento-enfriamiento de ensayos fototérmicos de Nanopartículas Núcleo-Coraza NpNC QsMod-Au.

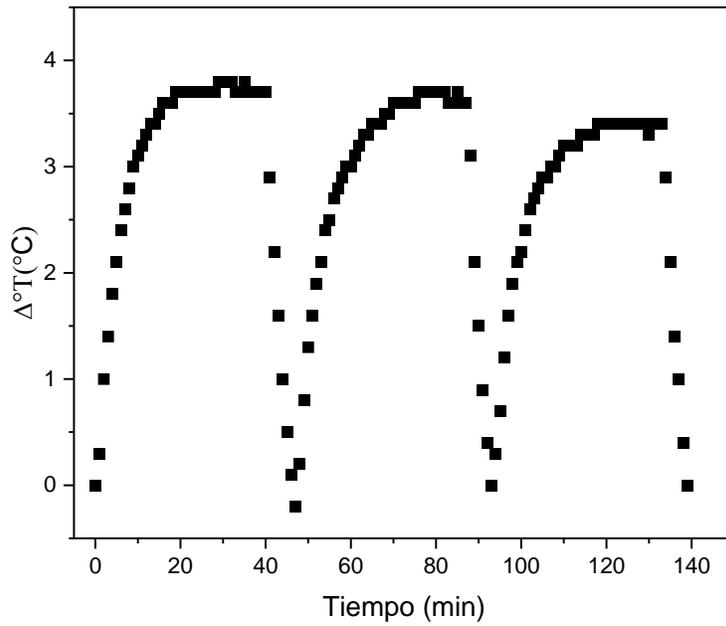


Figura 24 Curvas de calentamiento-enfriamiento de ensayos fototérmicos de NpNC QsNa-Au.

Los valores de τ_s y h se calcularon a partir de la curva de ΔT vs t . Para esto la ecuación 4 se linealizó graficando el logaritmo natural del cambio de temperatura contra el tiempo (Figura 25 y 26). Una vez obtenidos estos valores, la eficiencia de conversión fototérmica, η , se calculó utilizando la ecuación 5. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.

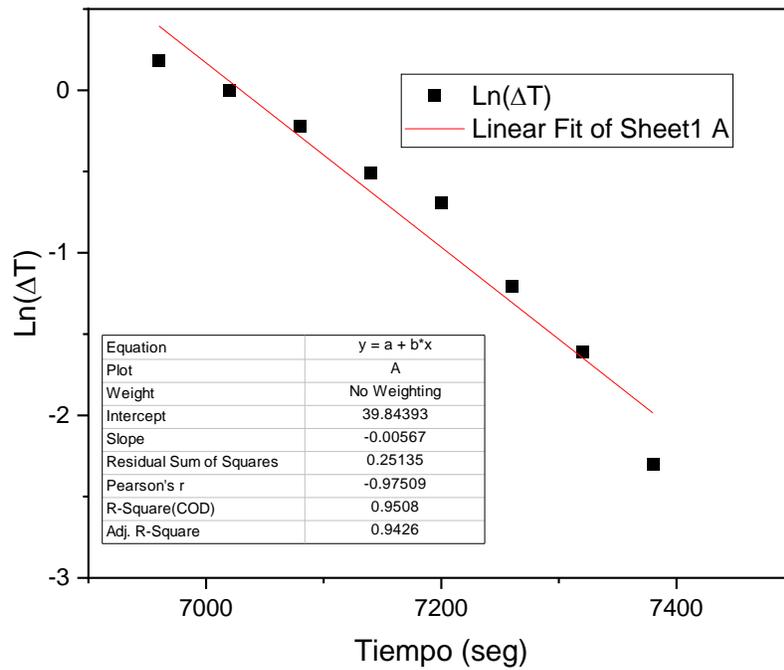


Figura 25 Ajuste lineal para la obtención del coeficiente de conversión fototérmica de las NpNC QsM-Au.

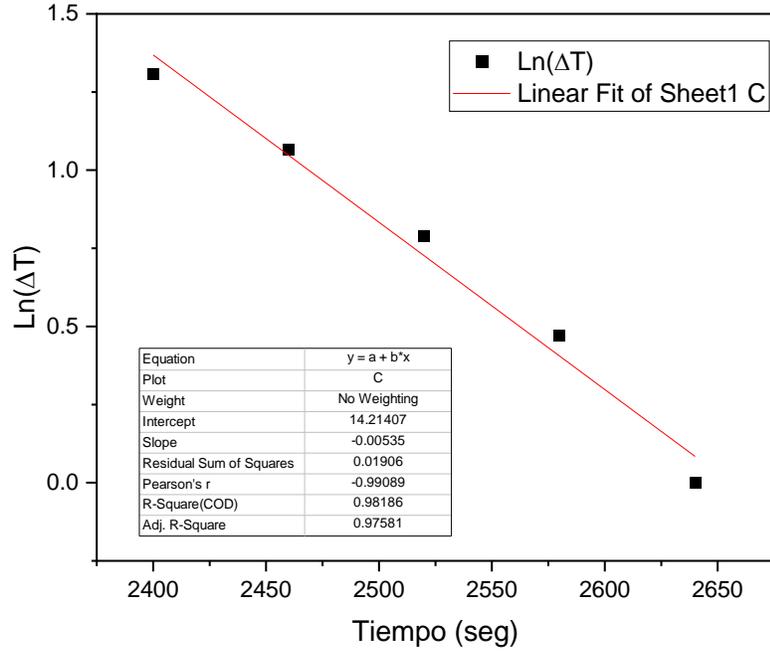


Figura 26 Ajuste lineal para la obtención del coeficiente de conversión fototérmica de las NpNC QsNa-Au.

Tabla 4 Valores experimentales obtenidos de los ensayos fototérmicos

Muestra	Constante de velocidad de enfriamiento del sistema (τ_s , seg)	Coefficiente de transferencia de calor (h , $\text{JK}^{-1}\text{m}^{-2}$)	Potencia del láser (I , Watt)	Eficiencia de conversión térmica (η , %)
Np NCQsNaAu	185	36	1	36
Np NCQsModAu	175	38	1	34

Valores similares de la eficiencia fototérmica se han reportado en la literatura. Como los obtenidos por Cole, *et al.* [88], quienes evaluaron las eficiencias de conversión fototérmica de nanovarillas y nanocorazas obteniendo valores de 30% y 55% respectivamente, utilizando una potencia de irradiación de 1 W. Hessel, *et al.*[101] evaluaron las nanocorazas comerciales Nanospectra Biosciences Inc (Au nanoshell) obteniendo un valor de 13%, en este caso la potencia utilizada fue de 2 W. En los trabajos mencionados utilizan un láser de 808 nm en los ensayos fototérmicos y el mismo análisis matemático de la curva de enfriamiento. Estos ensayos reportados nos ayudan validar los resultados obtenidos de las nanopartículas núcleo-coraza quitosano-oro, y para su posible aplicación biológica.

Evaluación de Actividad Antibacteriana mediante Terapia Fototérmica

Para la evaluación del efecto antibacteriano del nanosistema se utilizaron las nanopartículas núcleo-coraza quitosano modificado-oro debido a que presentaron un mayor incremento de temperatura en las curvas fototérmicas, así como estabilidad después del proceso. La evaluación por efecto fototérmico se determinó mediante ensayos *in vitro* utilizando como modelos bacterianos cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Los resultados del efecto fototérmico en la viabilidad de *Escherichia coli* (ATCC 25922) se muestran en la Figura 27. Primero se puede observar que las NpNCs sin irradiar tiene un efecto en la viabilidad de las bacterias. Las nanopartículas sólidas de oro tienen pocos reportes de actividad antibacteriana, ya que se considera tienen un bajo efecto antibacteriano. Sin embargo, la investigación de Cui, *et al.*[102] reportaron que el efecto de la viabilidad celular de estas nanopartículas puede deberse a que: *i*) las nanopartículas de oro son capaces de inhibir mecanismos celulares a nivel de la membrana que son vitales para la bacteria. Por ejemplo, pueden unirse al sistema ATP sintasa e inhibir su actividad, provocando la disminución de los niveles de ATP; *ii*) las nanopartículas adsorbidas en la membrana bacteriana afectan sus propiedades mecánicas provocando poros o defectos que

conduce a la muerte de la bacteria. Estos mecanismos pueden acercarse al efecto que se observó del nanosistema contra *Escherichia coli* cuando no irradió.

El efecto fototérmico proveniente del nanosistema aumento su actividad antibacteriana, eliminando cerca de un 99% de la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922), esto puede deberse a la interacción de las NpNC QsM-Au en la bacteria, y que, al ser irradiadas, el calor liberado al medio sea suficiente para provocar daño en casi el 100% de la bacterias presentes en la suspensión del nanosistema.

En cambio, en los controles, irradiados y no irradiados, se puede observar que la viabilidad de las bacterias se mantuvo, indicando que el medio acuoso en el cual fueron suspendidas y el láser utilizado no tienen efecto antibacteriano, lo cual hace válido la actividad antibacteriana del nanosistema contra *Escherichia coli* (ATCC 25922).

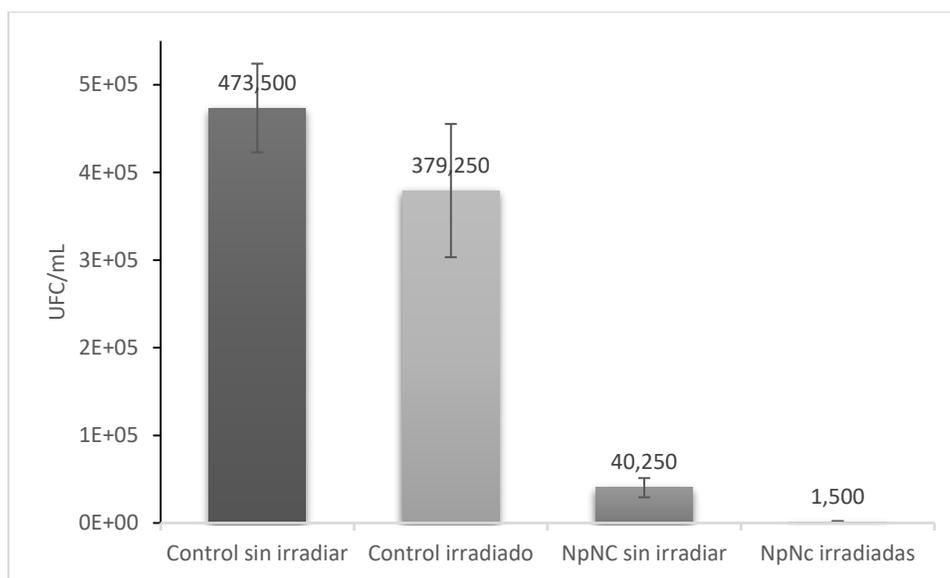


Figura 27 Gráfica obtenida de la actividad antibacteriana mediante cuenta viable en placa. Las barras de error indican \pm desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado.

La actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) se muestran en la Figura 28. El efecto fototérmico sobre la viabilidad de esta cepa bacteriana fue menor en comparación con el observado para *Escherichia coli* (ATCC 25922). Este resultado se puede explicar en función de las diferencias estructurales que existen entre ambas cepas. El *Staphylococcus aureus*, es una bacteria Gram positiva cuya composición de su pared celular consta de una capa rígida de peptidoglicano de aproximadamente 50 nm de ancho[69], la cual las hace más resistentes y adaptables a los cambios en el ambiente[103]. Mientras que la composición de la pared celular de las bacterias Gram negativas es susceptible a rupturas mecánicas[68], por lo que al elevar la temperatura del medio ambiente donde se encuentre la bacteria, es posible inducir la muerte de la bacterias (temperaturas entre 48-70°C[43]) en poco tiempo. A pesar de las diferencias conformacionales de las bacterias, la actividad antibacteriana que presentó el

nanosistema contra *Escherichia coli*, no puede descartarse que sea efectivo en la eliminación de bacterias Gram positivas, ya que investigaciones previas han evaluado la aplicación de la terapia fototérmica. La diferencia es que han recurrido a la modificación de la de superficie de oro, funcionalizando con anticuerpos específicos[104] y moléculas fotosensibles, como ICG[105], para la aplicación dual de fotodinámica y fototermia. De esta forma la interacción específica permiten que el aumento de temperatura sea de manera localizada [104] afectando de manera directa la pared celular e induciendo la muerte de las bacterias.

Se propone que, en investigaciones posteriores, se aumente el tiempo de interacción y de irradiación de las NpNC contra *Staphylococcus aureus*, así como funcionalizar la superficie.

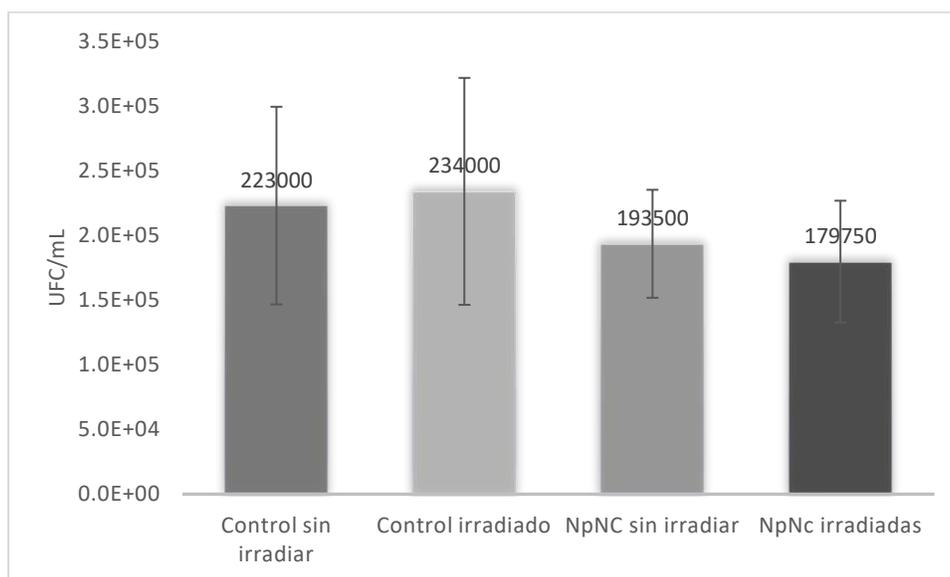


Figura 28 Gráfica obtenida de la actividad antibacteriana mediante cuenta viable en placa. Las barras de error indican \pm desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado.

CONCLUSIONES

Las nanopartículas de quitosano modificado permiten obtener nanocorazas con una eficiencia de conversión fototérmica adecuada para posibles aplicaciones biológicas. Además de tener una elevación de temperatura mayor en comparación de las nanopartículas de quitosano nativo.

La diálisis fue un proceso de purificación que permitió mantener la integridad de la NpNC Qs-Au, además de obtener Nanopartículas estables y con una morfología definida.

La evaluación de actividad fototérmica fue más evidente en las bacterias Gram negativas, debido a la composición de la membrana celular, la cual es susceptible a los cambios en el medio. Sin embargo, para las Gram positivas se propone funcionalizar la superficie añadiendo un anticuerpo específico, para obtener un tratamiento localizado.

PROSPECTIVAS

Complementar estudios de seguimiento de formación de la nanocoraza de oro sobre las Np Qs, (Potencial ζ , SEM, TEM en cada parte del proceso).

Evaluación de la actividad antibacteriana por fototermia de las Np NC QsNa-Au.

Encapsular fármaco y/o funcionalizar la superficie de la NpNC y evaluar el efecto de la terapia dual.

Evaluación de las propiedades antibacterianas por fototermia a otras cepas bacterianas y en cepas de aislado clínico.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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, doi: 10.1021/ar7002804.
- [2] A. R. Rastinehad *et al.*, "Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 37, pp. 18590–18596, 2019, doi: 10.1073/pnas.1906929116.
- [3] M. Shah, V. D. Badwaik, and R. Dakshinamurthy, "Biological applications of gold nanoparticles," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 344–362, 2014, doi: 10.1166/jnn.2014.8900.
- [4] C. M. Cobley, J. Chen, E. C. Cho, L. V. Wang, and Y. Xia, "Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 44–56, 2011, doi: 10.1039/b821763g.
- [5] D.A. Stuart, A.J. Haes, C.R. Yonzon, E.M. Hicks, and R.P. Van Duyne, "Biological applications of localised surface plasmonic phenomena," *IEEE Proc. nanobiotechnology*, vol. 152, no. 6, pp. 207–211, 2005, doi: 10.1049/ip-nbt.
- [6] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, and N. J. Halas, "Nanoengineering of optical resonances," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 288, no. 2–4, pp. 243–247, 1998, doi: 10.1016/S0009-2614(98)00277-2.
- [7] K. S. Lee and M. A. El-Sayed, "Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 39, pp. 19220–19225, 2006, doi: 10.1021/jp062536y.
- [8] 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, doi: 10.1016/j.aca.2011.08.020.

- [9] M. Kim, J. H. Lee, and J. M. Nam, "Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications," *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 17, 2019, doi: 10.1002/advs.201900471.
- [10] C. Clavero, "Plasmon-induced hot-electron generation at nanoparticle/metal-oxide interfaces for photovoltaic and photocatalytic devices," *Nat. Photonics*, vol. 8, no. 2, pp. 95–103, 2014, doi: 10.1038/nphoton.2013.238.
- [11] P. Manivasagan *et al.*, "Thiol chitosan-wrapped gold nanoshells for near-infrared laser-induced photothermal destruction of antibiotic-resistant bacteria," *Carbohydr. Polym.*, vol. 225, no. August, p. 115228, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115228.
- [12] L. Jauffred, A. Samadi, H. Klingberg, P. M. Bendix, and L. B. Oddershede, "Plasmonic Heating of Nanostructures," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 13, pp. 8087–8130, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00738.
- [13] I. Grabowska-Jadach, D. Kalinowska, M. Drozd, and M. Pietrzak, "Synthesis, characterization and application of plasmonic hollow gold nanoshells in a photothermal therapy—New particles for theranostics," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 111, no. January, pp. 1147–1155, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.01.037.
- [14] B. J. Jankiewicz, D. Jamiola, J. Choma, and M. Jaroniec, "Silica-metal core-shell nanostructures," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 170, no. 1–2, pp. 28–47, 2012, doi: 10.1016/j.cis.2011.11.002.
- [15] K. M. Mayle *et al.*, "Polypeptide-based gold nanoshells for photothermal therapy," *SLAS Technol.*, vol. 22, no. 1, pp. 18–25, 2017, doi: 10.1177/2211068216645292.
- [16] L. Wang *et al.*, "Photothermo-chemotherapy of cancer employing drug leakage-free gold nanoshells," *Biomaterials*, vol. 78, pp. 40–49, 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.024.
- [17] Y. Hu *et al.*, "Multifunctional Fe₃O₄@Au core/shell nanostars: A unique platform for multimode imaging and photothermal therapy of tumors," *Sci.*

Rep., vol. 6, 2016, doi: 10.1038/srep28325.

- [18] J. He *et al.*, “Gold–silver nanoshells promote wound healing from drug-resistant bacteria infection and enable monitoring via surface-enhanced Raman scattering imaging,” *Biomaterials*, vol. 234, no. January, p. 119763, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119763.
- [19] J. Choma, A. Dziura, D. Jamiola, P. Nyga, and M. Jaroniec, “Preparation and properties of silica-gold core-shell particles,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 373, no. 1–3, pp. 167–171, 2011, doi: 10.1016/j.colsurfa.2010.10.046.
- [20] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, “Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles,” *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 7, pp. 2313–2322, 2001, doi: 10.1021/cm000662n.
- [21] R. Francis, “Biomaterials for Biomedical Applications,” pp. 1–20, 2017.
- [22] R. Gupta and H. Xie, “Nanoparticles in daily life: Applications, toxicity and regulations,” *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 37, no. 3, pp. 209–230, 2018, doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026009.
- [23] J. J. Giner-Casares, M. Henriksen-Lacey, M. Coronado-Puchau, and L. M. Liz-Marzán, “Inorganic nanoparticles for biomedicine: Where materials scientists meet medical research,” *Mater. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 19–28, 2016, doi: 10.1016/j.mattod.2015.07.004.
- [24] B. Y. Chua, M. Al Kobaisi, W. Zeng, D. Mainwaring, and D. C. Jackson, “Chitosan microparticles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines,” *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 1, pp. 81–90, 2012, doi: 10.1021/mp200264m.
- [25] N. A. Negm, H. H. H. Hefni, A. A. A. Abd-Elaal, E. A. Badr, and M. T. H. Abou Kana, “Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 152, pp. 681–702, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196.
- [26] W. Wang, C. Xue, and X. Mao, “Chitosan: Structural modification, biological

- activity and application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 164, pp. 4532–4546, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042.
- [27] Q. Hu and Y. Luo, “Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 151, pp. 624–639, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.109.
- [28] A. Sugunan, C. Thanachayanont, J. Dutta, and J. G. Hilborn, “Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 6, no. 3-4 SPEC. ISS., pp. 335–340, 2005, doi: 10.1016/j.stam.2005.03.007.
- [29] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, “Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique,” *Colloids Surf. B*, vol. 90, no. 1, pp. 21–27, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.
- [30] F. Sanchez and K. Sobolev, “Nanotechnology in concrete - A review,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 24, no. 11, pp. 2060–2071, 2010, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014.
- [31] A. Mews, *Nanomaterials Handbook. Edited by Yury Gogotsi.*, vol. 46, no. 13. 2007.
- [32] Y. Xiong and X. Lu, *Metallic Nanostructures, From controlled syntesis to applications*. Springer International Publishing, 2015.
- [33] S. K. Saxena and S. M. P. Khurana, *NanoBioMedicine*. 2020.
- [34] Y. Rojas-Aguirre, K. Aguado-Castrejón, and I. González-Méndez, “La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?,” *Educ. Quim.*, vol. 27, no. 4, pp. 286–291, 2016, doi: 10.1016/j.eq.2016.07.002.
- [35] W. J. Stark, “Nanoparticles in biological systems,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 6, pp. 1242–1258, 2011, doi: 10.1002/anie.200906684.
- [36] V. Amendola *et al.*, “Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles,”

in *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*, vol. 66, Elsevier, 2014, pp. 81–152.

- [37] M. Hu *et al.*, “Gold nanostructures: Engineering their plasmonic properties for biomedical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 11, pp. 1084–1094, 2006, doi: 10.1039/b517615h.
- [38] K. A. Willets and R. P. Van Duyne, “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 267–297, 2007, doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- [39] J. A. Webb and R. Bardhan, “Emerging advances in nanomedicine with engineered gold nanostructures,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 5, pp. 2502–2530, 2014, doi: 10.1039/c3nr05112a.
- [40] L. R. Hirsch *et al.*, “Metal nanoshells,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, no. 1, pp. 15–22, 2006, doi: 10.1007/s10439-005-9001-8.
- [41] J. E. Park, M. Kim, J. H. Hwang, and J. M. Nam, “Golden Opportunities: Plasmonic Gold Nanostructures for Biomedical Applications based on the Second Near-Infrared Window,” *Small Methods*, vol. 1, no. 3, 2017, doi: 10.1002/smt.201600032.
- [42] A. Gharatape, S. Davaran, R. Salehi, and H. Hamishehkar, *Engineered gold nanoparticles for photothermal cancer therapy and bacteria killing*, vol. 6, no. 112. Royal Society of Chemistry, 2016.
- [43] G. Guan, K. Y. Win, X. Yao, W. Yang, and M. Y. Han, “Plasmonically Modulated Gold Nanostructures for Photothermal Ablation of Bacteria,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–29, 2021, doi: 10.1002/adhm.202001158.
- [44] Y. C. Wang, É. Rhéaume, F. Lesage, and A. Kakkar, “Synthetic methodologies to gold nanoshells: An overview,” *Molecules*, vol. 23, no. 11, pp. 1–28, 2018, doi: 10.3390/molecules23112851.
- [45] A. W. H. Lin, N. A. Lewinski, J. L. West, N. J. Halas, and R. A. Drezek, “Optically tunable nanoparticle contrast agents for early cancer detection: model-based analysis of gold nanoshells,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 6, p.

064035, 2005, doi: 10.1117/1.2141825.

- [46] R. Bardhan, N. K. Grady, T. Ali, and N. J. Halas, "Metallic nanoshells with semiconductor cores: Optical characteristics modified by core medium properties," *ACS Nano*, vol. 4, no. 10, pp. 6169–6179, 2010, doi: 10.1021/nn102035q.
- [47] R. Desai, V. Mankad, S. K. Gupta, and P. K. Jha, "Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment," *Nanosci. Nanotechnol. Lett.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–34, 2012, doi: 10.1166/nnl.2012.1278.
- [48] S. N. Abdollahi, M. Naderi, and G. Amoabediny, "Synthesis and physicochemical characterization of tunable silica-gold nanoshells via seed growth method," *Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp*, vol. 414, pp. 345–351, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.08.043.
- [49] M. J. García-Soto and O. González-Ortega, "Synthesis of silica-core gold nanoshells and some modifications/variations," *Gold Bull.*, vol. 49, no. 3–4, pp. 111–131, 2016, doi: 10.1007/s13404-016-0188-2.
- [50] L. L. Félix, J. M. Porcel, F. F. H. Aragón, D. G. Pacheco-Salazar, and M. H. Sousa, "Simple synthesis of gold-decorated silica nanoparticles by in situ precipitation method with new plasmonic properties," *SN Appl. Sci.*, vol. 3, no. 4, 2021, doi: 10.1007/s42452-021-04456-0.
- [51] A. Topete *et al.*, "Fluorescent drug-loaded, polymeric-based, branched gold nanoshells for localized multimodal therapy and imaging of tumoral cells," *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 2725–2738, 2014, doi: 10.1021/nn406425h.
- [52] P. R. Sivashankari and M. Prabakaran, "*Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan*", *Chitosan Based Biomaterials*, vol. 1, pp. 117-133 Elsevier, 2017.
- [53] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, and K. de la Caba, "Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 1358–1368, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.

- [54] S. Islam, M. A. R. Bhuiyan, and M. N. Islam, "Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering," *J. Polym. Environ.*, vol. 25, no. 3, pp. 854–866, 2017, doi: 10.1007/s10924-016-0865-5.
- [55] M. Shafiei, H. Jafarizadeh-Malmiri, and M. Rezaei, "Biological activities of chitosan and prepared chitosan-tripolyphosphate nanoparticles using ionic gelation method against various pathogenic bacteria and fungi strains," *Biologia (Bratisl)*., vol. 74, no. 11, pp. 1561–1568, 2019, doi: 10.2478/s11756-019-00299-8.
- [56] K. Divya and M. S. Jisha, "Chitosan nanoparticles preparation and applications," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 1, pp. 101–112, 2018, doi: 10.1007/s10311-017-0670-y.
- [57] Y. Boonsongrit, A. Mitrevej, and B. W. Mueller, "Chitosan drug binding by ionic interaction," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 62, no. 3, pp. 267–274, 2006, doi: 10.1016/j.ejpb.2005.09.002.
- [58] K. G. H. Desai, "Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances," *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 33, no. 2, pp. 107–158, 2016, doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016014850.
- [59] E. N. Koukaras, S. A. Papadimitriou, D. N. Bikiaris, and G. E. Froudakis, "Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 10, pp. 2856–2862, 2012, doi: 10.1021/mp300162j.
- [60] R. D. Bhumkar and V. B. Pokharkar, "Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note," *AAPS PharmSciTech*, vol. 7, no. 2, pp. 2–7, 2006, doi: 10.1208/pt070250.
- [61] A. Rampino, M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich, and A. Cesàro, "Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability," *Int. J. Pharm.*, vol. 455, no. 1–2, pp. 219–228, 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.034.
- [62] E. M. A. Hejjaji, A. M. Smith, and G. A. Morris, "Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different

- chitosan to tripolyphosphate (CS:TPP) ratios,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 1610–1617, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.185.
- [63] J. R. Reimers, M. J. Ford, S. M. Marcuccio, J. Ulstrup, and N. S. Hush, “Competition of van der waals and chemical forces on gold–sulfur surfaces and nanoparticles,” *Nat. Rev. Chem.*, vol. 1, 2017, doi: 10.1038/s41570-0017.
- [64] Q. Chi, M. J. Ford, A. Halder, N. S. Hush, J. R. Reimers, and J. Ulstrup, “Sulfur ligand mediated electrochemistry of gold surfaces and nanoparticles: What, how, and why,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 1, no. 1, pp. 7–15, 2017, doi: 10.1016/j.coelec.2016.12.004.
- [65] R. H. Wang *et al.*, “Self-assembled gold nanoshells on biodegradable chitosan fibers,” *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 10, pp. 2719–2721, 2006, doi: 10.1021/bm060340y.
- [66] M. Chandrasekaran, K. D. Kim, and S. C. Chun, “Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review,” *Processes*, vol. 8, no. 9, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/PR8091173.
- [67] D. R. Perinelli *et al.*, “Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 117, no. September 2017, pp. 8–20, 2018, doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.046.
- [68] C. L. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, “Microbiology an introduction, thirteenth edition,” p. 964, 2018.
- [69] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl, *Brock biology of microorganisms*,. 2015.
- [70] R. C. Goy, D. De Britto, and O. B. G. Assis, “A review of the antimicrobial activity of chitosan,” *Polimeros*, vol. 19, no. 3, pp. 241–247, 2009, doi: 10.1590/S0104-14282009000300013.
- [71] R. J. Fair and Y. Tor, “Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century,” *Perspect. Medicin. Chem.*, no. 6, pp. 25–64, 2014, doi: 10.4137/PMC.S14459.
- [72] Y. Zou, Y. Zhang, Q. Yu, and H. Chen, “Photothermal bactericidal surfaces:

- Killing bacteria using light instead of biocides," *Biomater. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 10–22, 2021, doi: 10.1039/d0bm00617c.
- [73] C. Mao *et al.*, "Local Photothermal/Photodynamic Synergistic Therapy by Disrupting Bacterial Membrane to Accelerate Reactive Oxygen Species Permeation and Protein Leakage," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, no. 19, pp. 17902–17914, 2019, doi: 10.1021/acsami.9b05787.
- [74] O. Khantamat *et al.*, "Gold nanoshell-decorated silicone surfaces for the near-infrared (NIR) photothermal destruction of the pathogenic bacterium *E. faecalis*," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 7, pp. 3981–3993, 2015, doi: 10.1021/am506516r.
- [75] E. B. Ko, H. Y. Cho, T. H. Kim, C. H. Yea, and J. W. Choi, "Cell chip with a thiolated chitosan self-assembled monolayer to detect the effects of anticancer drugs on breast normal and cancer cells," *Colloids Surf. B*, vol. 112, pp. 387–392, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.016.
- [76] M. J. Alonso, P. Calvo, and C. Remun, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:13.0.CO;2-4.
- [77] A. Topete *et al.*, "Fluorescent drug-loaded, polymeric-based, branched gold nanoshells for localized multimodal therapy and imaging of tumoral cells," *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 2725–2738, 2014, doi: 10.1021/nn406425h.
- [78] I. M. Tucker *et al.*, "Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 20, no. 4, pp. 215–226, 2015, doi: 10.1016/j.cocis.2015.07.001.
- [79] J. Batalla, A. Cuadros, and E. S. Martín-martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas," *Latin-American J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, 2014.
- [80] S. E. McNeil, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. 2011.

- [81] “Microscopio de Fuerza Atómica (ATM).” [http://www.linan-
ipicyt.mx/Microscopio_de_Fuerza_Atomic.html](http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_de_Fuerza_Atomic.html) (accessed Jun. 23, 2020).
- [82] G. Kada, F. Kienberger, and P. Hinterdorfer, “Atomic force microscopy in bionanotechnology,” *Nano Today*, vol. 3, no. 1–2, pp. 12–19, 2008, doi: 10.1016/S1748-0132(08)70011-2.
- [83] B. J. Inkson, *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization*. Elsevier Ltd, 2016.
- [84] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018, doi: 10.1039/c8nr02278j.
- [85] V. Amendola and M. Meneghetti, “Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 11, pp. 4277–4285, 2009, doi: 10.1021/jp8082425.
- [86] D. K. Roper, W. Ahn, and M. Hoepfner, “Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 9, pp. 3636–3641, 2007, doi: 10.1021/jp064341w.
- [87] O. A. Savchuk, J. J. Carvajal, J. Massons, M. Aguiló, and F. Díaz, “Determination of photothermal conversion efficiency of graphene and graphene oxide through an integrating sphere method,” *Carbon N. Y.*, vol. 103, pp. 134–141, 2016, doi: 10.1016/j.carbon.2016.02.075.
- [88] J. R. Cole, N. A. Mirin, M. W. Knight, G. P. Goodrich, and N. J. Halas, “Photothermal efficiencies of nanoshells and nanorods for clinical therapeutic applications,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 28, pp. 12090–12094, 2009, doi: 10.1021/jp9003592.
- [89] *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition*, vol. 32, no. 2. 2012.
- [90] H. Häkkinen, “The gold-sulfur interface at the nanoscale,” *Nat. Chem.*, vol. 4, no. 6, pp. 443–455, 2012, doi: 10.1038/nchem.1352.

- [91] R. Esquivel, J. Juárez, M. Almada, J. Ibarra, and M. A. Valdez, "Synthesis and characterization of new thiolated chitosan nanoparticles obtained by ionic gelation method," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/502058.
- [92] Anon, "No Title," *Infrared Spectroscopy Absorption Table*. Available at: <https://chem.libretexts.org/@go/page/22645>, 2020. .
- [93] R. A. Petros and J. M. Desimone, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 8, pp. 615–627, 2010, doi: 10.1038/nrd2591.
- [94] A. Garrido-Maestu *et al.*, "Engineering of chitosan-derived nanoparticles to enhance antimicrobial activity against foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7," *Carbohydr. Polym.*, vol. 197, no. March, pp. 623–630, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.046.
- [95] D. J. Sullivan, M. Cruz-Romero, T. Collins, E. Cummins, J. P. Kerry, and M. A. Morris, "Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles," *Food Hydrocoll.*, vol. 83, pp. 355–364, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.05.010.
- [96] N. Kocak, M. Sahin, I. Akin, M. Kus, and M. Yilmaz, "Microwave assisted synthesis of chitosan nanoparticles," *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 48, no. 10, pp. 776–779, 2011, doi: 10.1080/10601325.2011.603613.
- [97] H. Liu and C. Gao, "Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 20, no. 7, pp. 613–619, 2009, doi: 10.1002/pat.1306.
- [98] R. Ashayer, S. H. Mannan, and S. Sajjadi, "Synthesis and characterization of gold nanoshells using poly(diallyldimethyl ammonium chloride)," *Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp*, vol. 329, no. 3, pp. 134–141, 2008, doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.07.004.
- [99] M. Luty-Błocho, M. Wojnicki, and K. Fitzner, "Gold Nanoparticles Formation via Au(III) Complex Ions Reduction with L-Ascorbic Acid," *Int. J. Chem. Kinet.*,

vol. 49, no. 11, pp. 789–797, 2017, doi: 10.1002/kin.21115.

- [100] R. La Spina, V. Spampinato, D. Gilliland, I. Ojea-Jimenez, and G. Ceccone, “Influence of different cleaning processes on the surface chemistry of gold nanoparticles,” *Biointerphases*, vol. 12, no. 3, p. 031003, 2017, doi: 10.1116/1.4994286.
- [101] C. M. Hessel *et al.*, “Copper selenide nanocrystals for photothermal therapy,” *Nano Lett.*, vol. 11, no. 6, pp. 2560–2566, 2011, doi: 10.1021/nl201400z.
- [102] Y. Cui, Y. Zhao, Y. Tian, W. Zhang, X. Lü, and X. Jiang, “The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, pp. 2327–2333, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.057.
- [103] Y. A. Que and P. Moreillon, *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome)*, Eighth Edi., vol. 2. Elsevier Inc., 2014.
- [104] V. P. Zharov, K. E. Mercer, E. N. Galitovskaya, and M. S. Smeltzer, “Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles,” *Biophys. J.*, vol. 90, no. 2, pp. 619–627, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.061895.
- [105] Q. Wu, R. Peng, Y. Luo, Q. Cui, S. Zhu, and L. Li, “Antibacterial Activity of Porous Gold Nanocomposites via NIR Light-Triggered Photothermal and Photodynamic Effects,” *ACS Appl. Bio Mater.*, 2021, doi: 10.1021/acsabm.1c00318.