



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD CUAJIMALPA


POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

**ESTUDIO SOBRE INTERACCIONES DE  
HIDROGELES DE BIOPOLÍMEROS CON  
SISTEMAS FOTODINÁMICOS**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE MAESTRÍA

**DIEGO GÓMEZ-MALDONADO**

DIRECTOR: DR. JOSÉ CAMPOS TERÁN  
ASESORES: DR. ANTONIO TOPETE CAMACHO  
M. EN C. ROXANA LÓPEZ SIMEON





## Tabla de contenidos

---

GLOSARIO DE ABREVIACIONES .....	IV
TABLA DE FIGURAS .....	V
PRODUCCIÓN DE ESTE PROYECTO.....	XI
<i>Presentaciones Orales</i> .....	<i>xi</i>
<i>Posters</i> .....	<i>xii</i>
<i>Otros Trabajos realizados durante los estudios que no están incluidos en esta idónea comunicación de resultados.</i> .....	<i>xiii</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1. BIBLIOGRAFÍA .....	4
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
4.1. GENERAL.....	1
4.2. PARTICULARES .....	1
<b>5. TÉCNICAS DE FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES.....</b>	<b>2</b>
5.1. TÉCNICAS DE SUPERFICIE .....	3
5.1.1. <i>Spin coating</i> .....	3
5.1.2. <i>Microbalanza de cuarzo (QCM-D)</i> .....	5
5.1.3. <i>Plasmón de resonancia superficial (SPR)</i> .....	9
5.2. TÉCNICAS DE ESPECTROFOTOMETRÍA.....	12
5.2.1. <i>Ultravioleta-Visible (UV-Vis)</i> .....	12
5.2.2. <i>Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial Zeta</i> .....	14
5.3. TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA .....	17
5.3.1. <i>Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	17
5.3.2. <i>Difracción de rayos X (DRX)</i> .....	20
5.4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA .....	22
5.4.1. <i>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</i> .....	22
5.4.2. <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	24
5.5 BIBLIOGRAFÍA.....	26
<b>6. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....</b>	<b>29</b>

6.1. ANTECEDENTES .....	29
6.2. METODOLOGÍA.....	33
6.2.1. <i>Generación de nanosemillas de Au (Nseeds)</i> .....	33
6.2.2. <i>Generación de nanocorazas espiculadas de oro (NPAu)</i> .....	34
6.2.3. <i>Preparación y obtención de núcleo polimérico</i> .....	34
6.2.4. <i>Modificación superficial de los núcleos de ácido poli láctico-co-glicólico (PGLA) con quitosano y Nseeds</i> .....	34
6.2.5. <i>Crecimiento de la coraza</i> .....	35
6.2.6. <i>Formación de conjugados NPAu-BSA (albúmina de suero bovino)</i> .....	35
6.2.7. <i>Caracterización de los sistemas fotodinámicos</i> .....	35
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.3.1. <i>Caracterización de Nseeds</i> .....	36
6.3.2. <i>Caracterización de NPAu y NPAu-BSA</i> .....	40
6.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	50
6.5 BIBLIOGRAFÍA.....	52
<b>7. INTERACCIÓN DE HIDROGELES Y SISTEMAS FOTODINÁMICOS .....</b>	<b>55</b>
7.1. ANTECEDENTES .....	55
7.2. METODOLOGÍA.....	60
7.2.1. <i>Formación de las películas de hidrogeles</i> .....	60
7.2.2. <i>Limpieza de las superficies</i> .....	60
7.2.3. <i>Modificación de las superficies de oro</i> .....	60
7.2.4. <i>Generación de las soluciones de hidrogeles</i> .....	61
7.2.5. <i>Deposición del hidrogel</i> .....	61
7.2.6. <i>Cálculo de las concentraciones de los sistemas fotodinámicos</i> .....	62
7.2.7. <i>QCM-D</i> .....	62
7.2.8. <i>SPR</i> .....	63
7.2.9. <i>Caracterización</i> .....	64
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
7.3.1. <i>Caracterización de las superficies de hidrogeles generadas</i> .....	65
7.3.2. <i>Interacción de las superficies de hidrogeles con Nseeds</i> .....	72
7.3.3. <i>Interacción de las superficies de hidrogeles con BSA</i> .....	84
7.3.4. <i>Interacción de las superficies de hidrogeles con NPAu</i> .....	93
7.3.5. <i>Interacción de las superficies de hidrogeles con NPAu-BSA</i> .....	111
7.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	129
7.5. BIBLIOGRAFÍA .....	132

8.	CONCLUSIÓN GENERAL.....	136
9.	CIERRE Y AGRADECIMIENTOS .....	137

# Glosario de abreviaciones

---

Nanosemillas o nanopartículas de oro	<b>Nseeds</b>
Albumina de suero bovino	<b>BSA</b>
Ácido poli láctico-co-glicólico	<b>PGLA</b>
Nanocorazas de oro con núcleo polimérico	<b>NPAu</b>
Microbalanza de cuarzo con disipación	<b>QCM-D</b>
Plasmón de resonancia superficial	<b>SPR</b>
Espectrofotometría de ultravioleta visible	<b>UV-Vis</b>
Dispersión dinámica de luz	<b>DLS</b>
Infrarrojo por transformada de Fourier	<b>FTIR</b>
Difracción de rayos X	<b>DRX</b>
Microscopía de fuerza atómica	<b>AFM</b>
Microscopía electrónica de barrido	<b>SEM</b>

# Tabla de Figuras

---

Figura 1. Esquema general del proyecto.....	2
Figura 2. Generación de una superficie por medio de spin coating. Adaptada de Ossila [11]. .....	3
Figura 3. Origen de discos de QCM-D a partir del corte de un cristal de silicio. Adaptada de Marx [13]......	6
Figura 4. Configuración clásica de un sensor de SPR, en el que el láser pasa por el cristal para excitar la superficie. Adaptada de Meyer [17]......	9
Figura 5. Ejemplo de las gráficas de SPR a) curva de SPR b) sensograma.....	11
Figura 6. Esquema del funcionamiento de un espectroscopio UV-Vis. Adaptada de Poole et al [19]. .....	13
Figura 7. Definición esquemática del potencial zeta. Adaptada de Malvern Instruments [23]. ...	15
Figura 8. Esquema general de requerimientos de un equipo para dispersión dinámica de luz. Adaptada de Malvern Instruments [23]. .....	16
Figura 9. Ejemplo de las zonas en las que se pueden visualizar cada uno de los grupos funcionales de una molécula. Adaptada de Patrick [20] .....	18
Figura 10. Reflexión según la Ley de Bragg, en donde la difracción de los rayos X da una interferencia constructiva cuando las distancias entre los haces difractados son proporcionales en un número entero de longitud de onda. Adaptada de Henry et al [26]. .....	20
Figura 11. Difractogramas de nanopartículas de (a) plata y de (b) oro. Adaptada de Belmares-Perales et al [28]......	21
Figura 12. Esquema del funcionamiento de obtención de imagen por AFM. Adaptada de Poole et al [19]......	23
Figura 13. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido. Adaptada de JEOL Application Notes [31]. .....	24
Figura 14. Distintas nanoestructuras inorgánicas y su uso en la biomédica. Adaptada de Yang et al [9]......	30
Figura 15. Comportamiento fotodinámico de las nanopartículas de oro. Adaptada de Virlan et al [4]......	31

Figura 16. Rango del plasmón de resonancia de las nanopartículas de oro en función de su forma. Adaptada de Poole et al [2].....	32
Figura 17. Espectro UV-Vis de las Nseeds. Donde se observa un único máximo de absorción a 511 nm. ....	36
Figura 18. Esquema de la estructura de las Nseeds. Adaptada de Harrison et al [14].....	37
Figura 19. Distribuciones de tamaño y de potencial zeta de las Nseeds.....	37
Figura 20. FTIR de las a) Nseeds y b) del citrato. Espectro del citrato adaptado de Spectral Database for Organic Compounds. ....	38
Figura 21. Imágenes de fuerza atómica de depósitos de las nanosemillas de oro (Nseeds). ....	39
Figura 22. Micrografías de SEM de las Nseeds.....	39
Figura 23. Espectro UV-Vis de las NPAu (verde), los conjugados (rojo) y la proteína (azul). ...	40
Figura 24. Información de DLS de las NPAu. a) correlograma b) curva de distribución de tamaño por volumen y c) curva de distribución de potencial zeta. ....	41
Figura 25. a) correlograma y b) distribución de tamaño de la proteína BSA. ....	42
Figura 26. Información de DLS de los conjugados de NPAu y BSA. a) correlograma, b) curva de distribución de tamaño por volumen y c) curva de distribución de potencial zeta. ....	43
Figura 27. Comparación entre las distribuciones de NPAu y NPAu-BSA.....	44
Figura 28. FTIR de las NPAu (azul), NPAu-BSA (rojo) y BSA (verde). ....	45
Figura 29. Difractogramas de las NPAu (azul) y NPAu-BSA (negro).....	46
Figura 30. Imágenes de AFM de las NPAu donde se puede ver que la rugosidad concuerda con lo medido en DLS. ....	47
Figura 31. Micrografías SEM e imágenes AFM de las NPAu. ....	48
Figura 32. Imágenes de AFM de los conjugados NPAu-BSA.....	49
Figura 33. Micrografías de SEM de las NPAu-BSA. ....	49
Figura 34. Propuestas del uso de hidrogeles para la ingeniería de tejidos, en una se genera un andamio en el que se crecen las células y se reimplanta al sujeto; mientras que en el otro se inyectan los precursores mezclados con las células y se forma dentro del paciente el hidrogel. Adaptada de Peppas [1].....	56
Figura 35. Estructura molecular de los polisacáridos, a) alginato b) quitosano. ....	57



Figura 36. Esquema del proceso de ingeniería de tejidos, donde se ve los elementos con los que se pueden modificar los andamios para cultivos. Adaptada de Dvir et al [7].	59
Figura 37. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato.	65
Figura 38. Micrografías de SEM del hidrogel de alginato.	66
Figura 39. Imágenes de AFM de las superficies modificadas con el hidrogel de quitosano.	67
Figura 40. Micrografías de SEM de las películas de quitosano.	68
Figura 41. Imágenes de AFM de la superficie con el hidrogel de alginato-quitosano.	70
Figura 42. Micrografías de SEM de la película de alginato-quitosano.	71
Figura 43. Isotherma a 25 °C de QCM-D de las Nseeds en una superficie con hidrogel de alginato. Se presentan los cambios de frecuencia (rojo), así como el cambio de disipación (azul).	72
Figura 44. Imágenes de AFM de la superficie con el hidrogel de alginato con Nseeds.	73
Figura 45. FTIR de la superficie de alginato (azul) y la superficie de alginato con Nseeds (negro).	74
Figura 46. Difractograma de las superficies de alginato (negro) y la de alginato después de la interacción con las Nseeds (azul).	75
Figura 47. Isotherma de adsorción por QCM-D de la interacción de película con hidrogel de quitosano y Nseeds. Se puede ver que los cambios de frecuencia (rojo) y la disipación (azul)...	77
Figura 48. Imágenes de AFM del hidrogel de quitosano con Nseeds.	78
Figura 49. FTIR de la superficie de quitosano antes (azul) y después de la interacción con Nseeds (negra).	79
Figura 50. DRX de la superficie de quitosano y la superficie de quitosano con Nseeds.	80
Figura 51. Isotherma de adsorción por QCM-D del hidrogel de alginato-quitosano con Nseeds, cambio de frecuencia (rojo) y de disipación (azul).	81
Figura 52. Microscopías de SEM e imágenes AFM de la superficie de alginato-quitosano con Nseeds.	83
Figura 53. Isotherma de QCM-D entre una superficie de alginato y BSA. El cambio de frecuencia (rojo) mientras que el cambio de disipación (azul).	84
Figura 54. Imágenes de AFM de la superficie del hidrogel de alginato con BSA.	85
Figura 55. FTIR de las superficies de alginato y de alginato con BSA.	86
Figura 56. Isotherma de QCM-D entre un hidrogel de quitosano y BSA.	87

Figura 57. Imágenes de AFM de la superficie del hidrogel de quitosano y BSA. ....	88
Figura 58. Micrografías electrónicas de la superficie del hidrogel de quitosano después de su interacción con BSA. ....	89
Figura 59. FTIR de las superficies de quitosano y quitosano con BSA. ....	89
Figura 60. Isoterma de la interacción del hidrogel de alginato-quitosano con BSA. ....	91
Figura 61. Imagen de AFM de la superficie de alginato-quitosano con BSA. ....	92
Figura 62. Isoterma de QCM-D de la interacción de NPAu con el hidrogel de alginato. ....	93
Figura 63. Sensograma de SPR de la interacción de NPAu con un hidrogel de alginato. ....	94
Figura 64. Curvas de SPR para la interacción del hidrogel de alginato con NPAu. ....	95
Figura 65. Imágenes de AFM de la superficie con alginato y NPAu. ....	96
Figura 66. FTIR de la superficie de alginato antes y después de la interacción con NPAu. ....	97
Figura 67. Difractograma de la superficie del hidrogel de alginato antes y después de la interacción con NPAu. ....	98
Figura 68. Isoterma de QCM-D a 25 °C de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano. ....	99
Figura 69 Sensograma de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano. ....	100
Figura 70. Curvas de SPR de la interacción entre NPAu y un hidrogel de quitosano. ....	100
Figura 71. Fotografía del sensor de SPR con la película del hidrogel de quitosano después de la interacción con NPAu. ....	101
Figura 72. Imágenes de AFM de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano. ....	102
Figura 73. Micrografías de SEM de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano. ....	103
Figura 74. FTIR de las superficies de quitosano y de quitosano con NPAu. ....	104
Figura 75. Difractograma de las superficies de quitosano y la de quitosano con NPAu. ....	105
Figura 76. Isoterma de adsorción a 25 °C del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. Mostrando el cambio de frecuencia (roja) y el cambio en disipación (azul) de la superficie. ....	106
Figura 77. Sensograma del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. La interacción se dio en PBS como medio a un pH de 7.4 y 25 °C. ....	107
Figura 78. Curvas de SPR del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. ....	107
Figura 79. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. ....	108
Figura 80. FTIR del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. ....	109

Figura 81. DRX de la superficie de alginato-quitosano con NPAu .....	110
Figura 82. Isoterma de QCM-D de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	111
Figura 83. Sensograma de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	112
Figura 84. Curvas de SPR de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	113
Figura 85. Microscopias de AFM de la superficie de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	114
Figura 86. Microscopias de SEM de un hidrogel de alginato con sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	114
Figura 87. FTIR de la superficie de un hidrogel de alginato y alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	115
Figura 88. Difractograma las superficies de alginato y de alginato con el sistema conjugado NPAu-BSA.....	116
Figura 89. Isoterma de QCM de la interacción entre un hidrogel de quitosano y los sistemas conjugados NPAu-BSA. ....	117
Figura 90. Sensograma de la interacción de un hidrogel de quitosano con complejos NPAu-BSA. ....	118
Figura 91. Curvas de SPR de la interacción de un hidrogel de quitosano con NPAu-BSA. ....	119
Figura 92. Imágenes de AFM del hidrogel de quitosano con NPAu-BSA.....	119
Figura 93. Microscopias de SEM del hidrogel de quitosano con NPAu-BSA. ....	120
Figura 94. FTIR de las superficies con hidrogel de quitosano y de quitosano con NPAu-BSA. ....	121
Figura 95. Isoterma de QCM-D a 25 °C donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA.....	122
Figura 96. Sensograma donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA. ....	123
Figura 97. Curvas de SPR donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA. ....	124

Figura 98. Fotografía de sensor de SPR con hidrogel de alginato-quitosano. En la zona superior se depositaron conjugados NPAu-BSA y en la inferior NPAu. ....	124
Figura 99. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato-quitosano con los complejos NPAu-BSA. ....	125
Figura 100. Microscopias de SEM del hidrogel de alginato-quitosano con los complejos NPAu-BSA. ....	126
Figura 101. Espectro de FTIR de las superficies con el hidrogel alginato-quitosano y del hidrogel con complejos NPAu-BSA. ....	127
Figura 102. Difractograma de las superficies con el hidrogel alginato-quitosano y del hidrogel con complejos NPAu-BSA. ....	127

# Producción de este proyecto

---

## Presentaciones Orales

- 253rd ACS National Meeting & Exposition: Advanced Materials, Technologies, Systems & Processes.  
“Adsorption and viscoelastic studies of gold nanoparticles (NPAu) and bovine serum albumin (BSA) complexes at chitosan-alginate films”  
Diego Gómez Maldonado, Alberto Luviano, Roxana López Simeon, Antonio Topete Camacho, Nohra Beltrán, José Campos Terán\*  
Division of Cellulose and Renewable Materials, Simposio: “Valorization of Renewable Resources & Residuals Into New Materials & Multiphase Systems”  
San Francisco, California, EUA, 2 de abril 2017.
- III Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería  
“Estudio sobre interacciones de hidrogeles de celulosa, alginato, quitosano con nanopartículas fotodinámicas”  
Diego Gómez Maldonado, Roxana López Simeon, Antonio Topete Camacho, José Campos Terán.  
Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, Ciudad de México, 13 de septiembre de 2016
- 251st ACS National Meeting & Exposition.  
“Adsorption of gold nanoparticles (NPAu) and bovine serum albumin (BSA) complexes in algae cellulose films”  
Diego Gómez-Maldonado\*, Roxana López-Simeon, Iker Iñarritu, Antonio Topete , José Campos-Terán  
Division of Cellulose and Renewable Materials. Simposio: Valorization of Renewable Resources & Residuals Into New Materials & Multiphase Systems  
San Diego, California, EUA, 14 de marzo 2016.

## Posters

- 4to Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería  
“Estudio sobre interacciones de hidrogeles de biopolímeros con sistemas fotodinámicos”.  
Diego Gómez Maldonado, Roxana López Simeon, Antonio Topete Camacho, José Campos Terán.  
Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa, Ciudad de México, 12-13 de septiembre de 2017.
- 7ma Reunión de la Sociedad de Ingeniería de Tejidos de México  
“Estudio sobre modificación superficial de hidrogeles de alginato-quitosano para ingeniería de tejidos”.  
Diego Gómez Maldonado, José Rafael Hernández Castillo, Nohra E. Beltrán, Roxana López Simeon, Antonio Topete Camacho, José Campos Terán.  
Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) – Ciudad de México, 9 de septiembre de 2016
- 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC’16)  
“Alginate chitosan surfaces for cardiac cell culture”  
José Rafael Hernández Castillo, Diego Gómez Maldonado, Claudia Haydee Gonzales de la Rosa, Elena Arechaga, Maribel Hernández Guerrero, Nohra E. Beltrán.  
Orlando, Florida, EEUU, 17 de agosto de 2016.

## Otros Trabajos realizados durante los estudios que no están incluidos en esta idónea comunicación de resultados.

- Lignocellulosic nanoparticles

Preparation, functionalization and applicability of lignocellulosic nanoparticles. (Capítulo 5 de libro, enviado).

Diego Gómez-Maldonado, Maribel Hernández-Guerrero, Izlia J. Arroyo-Maya, José Campos-Terán.

Libro: Lignocellulosics: Renewable Feedstock for (Tailored) Functional Materials and Nanotechnology

Editores: Ilari Filpponen, Maria Soledad Peresin, Tiina Nypelö.

Editorial: Elsevier

# 1. Introducción

---

El siguiente documento es la idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias Naturales e Ingeniería. El proyecto de investigación en el que se basa este documento, se realizó en el Laboratorio de Superficies e Interfases y en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana en la Unidad Cuajimalpa, así como en la Escuela de Ingeniería Química, en el Departamento de Bioproductos y Biosistemas (School of Chemical Engineering, Department of Bioproducts and Biosystems), de la Universidad de Aalto, Finlandia, durante el periodo comprendido entre septiembre del 2015 y julio del 2017.

El objetivo del trabajo fue la síntesis y caracterización de sistemas fotodinámicos basados en oro; y evaluar su interacción con películas de hidrogeles de los polisacáridos alginato y quitosano.

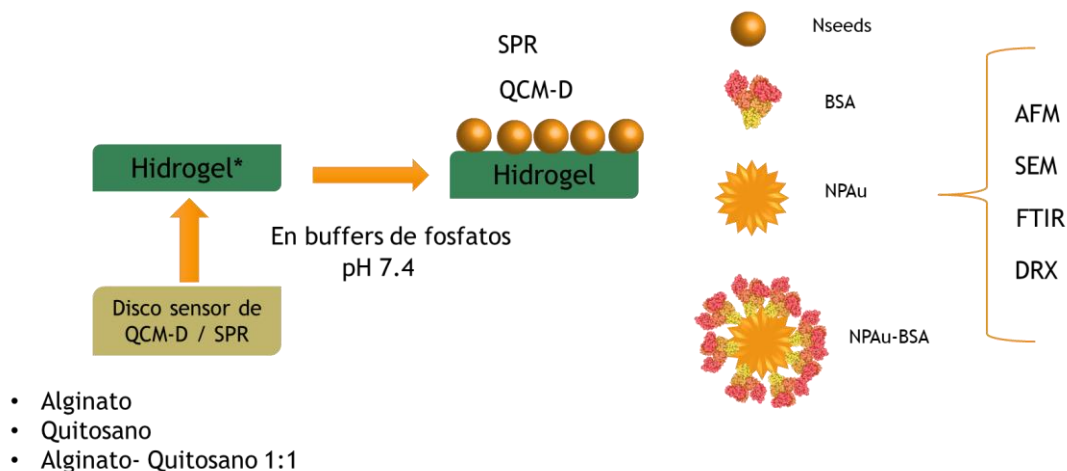
Se formaron películas en lugar de un hidrogel trimensional, por la capacidad de generarse sobre sensores de técnicas como la microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D, por sus siglas en inglés) y resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), ya que estas técnicas permiten un seguimiento en tiempo real de las interacciones, midiendo cambios de frecuencia y de refracción de las superficies respectivamente.

Las superficies resultantes fueron evaluadas con técnicas de microscopía, en específico de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) y electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés); así como con técnicas espectroscópicas: difracción de rayos X (DRX) e infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

En la Figura 1 se presenta el esquema general del trabajo realizado, así como los sistemas fotodinámicos estudiados con las distintas superficies de los hidrogeles que fueron generadas sobre los sensores necesarios para las técnicas. En el esquema se observa la generación de las películas de los hidrogeles sobre las superficies de oro de los sensores de QCM-D y SPR, así como la utilización de buffer de fosfatos con pH 7.4 como medio en el que se dan las interacciones, esto para simular condiciones fisiológicas.



Además, se presentan los cuatro sistemas que se utilizan para interactuar con las películas, que son las nanosemillas de oro (Nseeds), la proteína albúmina de suero bovina (BSA), los sistemas de nanocorazas espiculadas de oro con núcleo poliméricos (NPAu) y los complejos de estos últimos con la proteína (NPAu-BSA). Finalmente, se muestran las técnicas por las cuales se evaluaron las superficies resultantes.



*Figura 1. Esquema general del proyecto.*

Las condiciones y materiales para este trabajo fueron determinadas buscando apoyar el desarrollo de implantes de tejido cardíaco generado mediante ingeniería de tejidos, trabajo que se realiza en el Departamento de Procesos y Tecnología de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la misma unidad; así como el proyecto de Ciencia Básica llamado “Estudio de los efectos de la biofuncionalización de nanoplateformas teranósticas con anticuerpos monoclonales humanizados en el diagnóstico y tratamiento selectivo de cáncer epitelial de ovario” que tiene como responsable al Dr. Antonio Topete Camacho de la Universidad de Guadalajara, y que representa un trabajo multidisciplinario y interinstitucional entre la Universidad Autónoma Metropolitana, la Universidad de Guadalajara y la Universidad de Santiago de Compostela.

## 2. Justificación

---

Las enfermedades cardíacas son uno de los principales problemas a nivel mundial y de acuerdo con los pronósticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la principal causa de muerte en países desarrollados y de los países pobres o en vías de desarrollo [1]. Según la OMS, se calcula que en 2008 fallecieron 17.3 millones de personas a causa de enfermedades cardiovasculares, de las cuales 7.3 millones, es decir, el 42 % de estos fallecieron de cardiopatías coronarias, también llamadas infartos. También se estima que en el año 2030 cerca de 23.6 millones de personas morirán a causa de enfermedades cardiovasculares, principalmente de infartos y de accidentes cerebrovasculares [2]. Las estadísticas en México tampoco son alentadoras, se estima que anualmente hay 75 mil infartos, de los cuales el 25 % están relacionados con el estrés y los malos hábitos adquiridos en las oficinas [3].

El sobrevivir a un infarto conlleva a un cambio de estilo de vida, en el cual la actividad física debe de ser mínima, además de presentarse un incremento en la probabilidad de reincidencia [4]. Los tratamientos actuales suelen ser paliativos; dentro de estos los más utilizados son la angioplastia y el baipás coronario; además son empleados fármacos para combatir los estragos que se pueden causar en el ritmo cardíaco y tono muscular [5, 6]. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la investigación en ingeniería de tejidos, siendo el cultivo tridimensional uno de los principales retos [7-12].

El principio de la ingeniería de tejidos es el crecimiento y diferenciación de células especializadas de un tejido fuera del organismo y su reimplantación al sistema, para recuperar funciones que pueden haber sido perdidas por accidentes o enfermedades. Uno de los aspectos clave para eso es el uso de estructuras tridimensionales, principalmente hidrogeles poliméricos o tejidos descelularizados, como andamios (soportes) para la formación del nuevo tejido [10-16].

Actualmente, este tipo de tratamiento se encuentra aún en investigación, debido a que en los cultivos tridimensionales el crecimiento celular se ve limitado por la capacidad de proliferación y diferenciación de las células adultas. Además, los distintos soportes basados en hidrogeles no alcanzan los requerimientos mecánicos y eléctricos necesarios para su uso prolongado en

aplicaciones como la regeneración de tejido cardiaco [13]. Por lo anterior, se ha propuesto la modificación de estos con elementos que incrementen dichas propiedades, principalmente nanopartículas de metales nobles por su no reactividad química y biocompatibilidad [14-16].

Para poder realizar de forma segura las modificaciones y utilizar estos tejidos cultivados, es necesario entender y poder regular las interacciones entre los hidrogeles y los sistemas que funcionarán como modificadores de sus propiedades. Hasta ahora, el uso de las nanopartículas de oro sobre los hidrogeles ha sido estudiada solamente de forma morfológica y descriptiva [14-16], pero sin un entendimiento de cuales son las fuerzas de interacción o los procesos que dictaminan estas interacciones, ni cuales cambios presentan los hidrogeles después de su combinación con sistemas de este tipo. El entender estos cambios y las interacciones permitirá el mejor control sobre las propiedades que se desean simular y sustituir.

## 2.1. Bibliografía

1. Mathers, C. D., Ma Fat, D., Inoue, M., Rao, C., & Lopez, A. D. (2005). Counting the dead and what they died from: an assessment of the global status of cause of death data. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(3), 171-177c.
2. Organización Mundial de la Salud. (Mayo, 2012). ¿Qué puedo hacer para evitar un infarto de miocardio o un accidente vascular cerebral?.. Fecha de consulta 30 de mayo de 2017 desde <http://www.who.int/features/qa/27/es/> .
3. NOTIMEX. Milenio. (Agosto 2, 2013). México el país con más estrés laboral.. Fecha de consulta 30 de mayo de 2017 desde [http://www.milenio.com/negocios/Mexico-pais-estres-laboral\\_0\\_109189377.html](http://www.milenio.com/negocios/Mexico-pais-estres-laboral_0_109189377.html).
4. Samuels, A. (2010). Heart attack treatment. Assessment of heart attack treatment by first responders. [Version electrónica].
5. Texas Heart Institute. (Octubre, 2013). Marcapasos. Fecha de consulta 30 de mayo de 2017 desde [http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics\\_Esp/Proced/pacemake\\_sp.cfm](http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/Proced/pacemake_sp.cfm).
6. Lampert, R., Ickovics, J. R., Viscoli, C. J., Horwitz, R. I., & Lee, F. A. (2003). Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and

- relation to outcome in the Beta-Blocker Heart Attack Trial. *The American Journal of Cardiology*, 91(2), 137-142.
7. Fukuda, K. (2001). Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs*, 25(3), 187-193.
  8. Caspi, O., Lesman, A., Basevitch, Y., Gepstein, A., Arbel, G., Habib, I. H. M., ... & Levenberg, S. (2007). Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circulation Research*, 100(2), 263-272.
  9. Zimmermann, W. H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didie, M., Münzel, F., Heubach, J. F., ... & Eschenhagen, T. (2002). Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circulation Research*, 90(2), 223-230.
  10. Alperin, C., Zandstra, P. W., & Woodhouse, K. A. (2005). Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26(35), 7377-7386.
  11. Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., & Okano, T. (2003). Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 24(13), 2309-2316.
  12. Fuchs, J. R., Nasser, B. A., & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 72(2), 577-591.
  13. Peppas, N. A. (2010). Biomedical applications of hydrogels handbook. Springer Science & Business Media. ISBN????? Capítulo o fue todo el libro?, no lo creo.
  14. Dvir, T., Timko, B. P., Brigham, M. D., Naik, S. R., Karajanagi, S. S., Levy, O., ... & Kohane, D. S. (2011). Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*, 6(11), 720-725
  15. Shevach, M., Fleischer, S., Shapira, A., & Dvir, T. (2014). Gold nanoparticle-decellularized matrix hybrids for cardiac tissue engineering. *Nano Letters*, 14(10), 5792-5796.
  16. Fleischer, S., Shevach, M., Feiner, R., & Dvir, T. (2014). Coiled fiber scaffolds embedded with gold nanoparticles improve the performance of engineered cardiac tissues. *Nanoscale*, 6(16), 9410-9414.

## 3. Hipótesis

---

La incorporación de sistemas fotodinámicos (nanopartículas a base de oro) a hidrogeles poliméricos de distintas propiedades aniónicas y catiónicas, a través de la modulación de las interacciones electroestáticas, permitirá conformar andámios con las propiedades fisicoquímicas adecuadas para distintas aplicaciones en las áreas biotecnológica y biomédica.

## 4. Objetivos

---

### 4.1. General

Entender los mecanismos de interacción y adsorción de los sistemas fotodinámicos con los distintos hidrogeles de alginato, quitosano y su combinación.

### 4.2. Particulares

1. Sintetizar nanopartículas de oro (NPAu) y funcionalizarlas con proteína (BSA).
2. Caracterizar las NPAu y NPAu-BSA mediante técnicas espectrofotométricas (UV-Vis, DLS), espectroscópicas (FT-IR y DRX) y microscópicas (AFM y SEM).
3. Generar superficies modelo de hidrogeles de alginato, quitosano y su combinación.
4. Evaluar las interacciones entre los hidrogeles poliméricos y los sistemas fotodinámicos mediante microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D) y resonancia del plasmón superficial (SPR).

# 5. Técnicas de formación y caracterización de materiales

---

Para entender un sistema de estudio se requieren de distintas técnicas para conocer las distintas propiedades del mismo. Dependiendo de qué es lo que se quiera conocer serán el tipo de técnicas estructurales, cualitativas o cuantitativas que se deban realizar.

Las técnicas estructurales arrojan información del acomodo de los átomos, moléculas o grupos funcionales dentro de las muestras; las cualitativas por su parte indican que átomos o elementos están presentes en los sistemas; y finalmente, las cuantitativas darán datos relativos o absolutos de los elementos que están interactuando [1].

Existen además técnicas que sirven para la preparación de los sistemas antes de realizar las mediciones. Este tipo de técnicas de modificación, en el caso de superficies, son importantes ya que permiten tener el control de los sustratos a utilizar. Para el caso de las modificaciones superficiales, las más comunes son Langmuir-Blodgett [2-5], Langmuir-Schaefer [4, 5] y Spin coating [6-9].

Otra forma de clasificación de las técnicas está ligada al principio físico que utilizan en vez de la finalidad o tipo de resultados que se obtiene. Así existen técnicas espectroscópicas, espectrofotométricas, microscópicas, cromatográficas, electro-analíticas, calorimétricas, y de superficie, entre otras [10].

En esta sección se hablará brevemente de las técnicas que fueron utilizadas durante el desarrollo del proyecto tanto para la modificación como para el análisis de las superficies (Spin coating, QCM-D y SPR), así como su caracterización por técnicas de microscopía (AFM y SEM) y técnicas espectroscópicas (DRX, FTIR) y espectrofotométricas (UV-Vis, DLS).

## 5.1. Técnicas de superficie

### 5.1.1. Spin coating

Esta técnica se basa en la generación de películas delgadas mediante la deposición del material en solución sobre una superficie, la cual está unida a un rotor que esparce el material homogéneamente sobre la superficie por acción de fuerzas centrífugas y que a la vez evapora el solvente mejorando el acomodo sobre la superficie [6].

Las dos variables principales en el espesor que se obtendrá del depósito son las revoluciones a las que se haga girar la superficie en la que se hará la película; y la viscosidad de la suspensión del material a depositar [6-9]. Otro factor importante es la velocidad en la que el solvente se evapora, pues éste determina el acomodo que tendrá el material sobre las superficies; ya que, si se trata de moléculas pequeñas, la orientación de éstas estará ligada al tiempo que tengan para acomodarse sobre la superficie antes de que el solvente se evapore por completo; así el tiempo de rotación está ligado a la viscosidad del solvente y a la concentración del material en él [11]. En la Figura 2 se ve como al iniciar el giro se elimina el exceso de material, permitiendo que se acomoden las moléculas mientras el solvente se evapora para permitir la formación de los depósitos delgados.

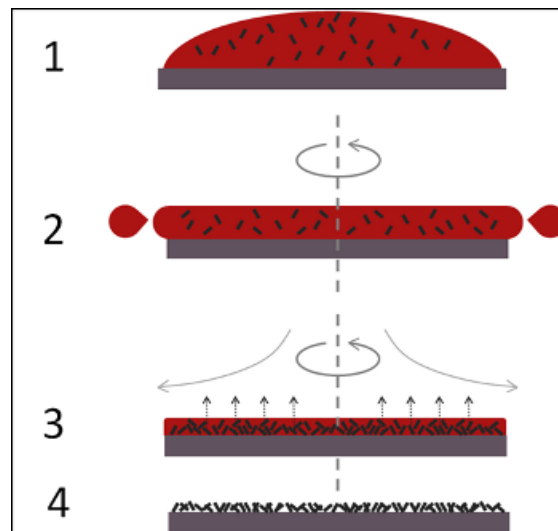


Figura 2. Generación de una superficie por medio de spin coating. Adaptada de Ossila [11].



Para este trabajo se utilizó un spin coater modelo WS-400B 6NPP/Lite de Laurell Technologies (Estados Unidos de América); para la inmovilización de los sensores para QCM-D se utilizó un adaptador de teflón que permite la inmovilización del disco en el rotor y la salida de la solución que se añade en exceso; el equipo se encuentra ubicado en el Laboratorio de Superficies e Interfases de la UAM-C.

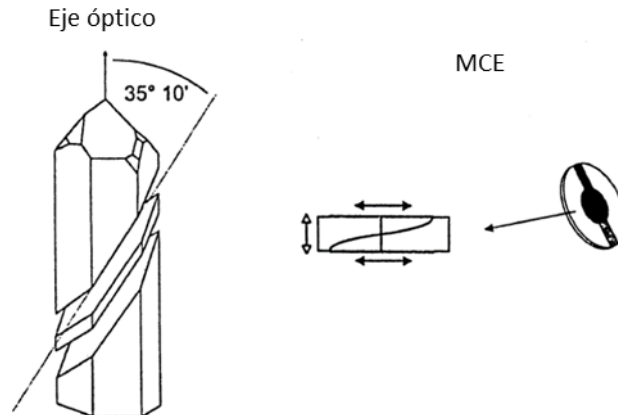
En concreto, se utilizó para la generación de las películas modelo de los hidrogeles sobre los discos sensores de QCM-D y de SPR.

### 5.1.2. Microbalanza de cuarzo (QCM-D)

La manipulación de elementos en el orden de las micras o nanómetros ha llevado al desarrollo de múltiples instrumentos para poder detectar su presencia, sus interacciones y efectos sobre distintos elementos con los que interactúe. Uno de estos instrumentos es la microbalanza de cristal de cuarzo con medición de disipación (Quartz Crystal Microbalance, QCM-D).

Esta técnica se basa en los efectos piezoeléctricos del cuarzo, elemento principal de sus discos sensores, que se rodea de unos electrodos (usualmente de oro) que al transmitir un determinado voltaje activan la frecuencia de resonancia natural de los discos sensores que se encuentra entre los 5 y 20 MHz; esta resonancia es medida y al presentarse una adsorción sobre su superficie muestra un cambio en la frecuencia. Este cambio puede ser traducido a una variación de masa, viscosidad, disipación, rugosidad o hidrofobicidad de la superficie dependiendo del modelo que se utilice para procesar los datos. [12]

La Figura 3 muestra el proceso de fabricación de los discos sensores usados en la QCM-D, desde cómo se obtienen los discos a partir de los cristales de cuarzo para que tengan las propiedades de resonancia necesarias y la colocación de los electrodos en el disco. Los discos sensores son después recubiertos con distintos materiales para que sean las superficies con las que se interactúe, siendo las de  $\text{SiO}_2$  y Au las más comunes [13].



*Figura 3. Origen de discos de QCM-D a partir del corte de un cristal de silicio. Adaptada de Marx [13].*

En 1959 Sauerbrey [14] describió que, para superficies rígidas, es decir con adsorciones en mono capas y no proteicas, existe una correlación directa entre el cambio de frecuencia con respecto al cambio de masa mediante la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\Delta m = \frac{C}{n} \Delta f \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $m$  es la masa,  $C$  es la constante característica ( $17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$  en la frecuencia de resonancia 5 MHz),  $n$  es el armónico y  $f$  la frecuencia.

En general, los discos sensores tienen un espesor máximo de aproximadamente 5 mm con un área activa de  $\sim 20 \text{ mm}^2$  y un rango de frecuencia entre 3-50 MHz con una sensibilidad en frecuencia de:

- $\sim 0.05 \text{ Hz}$  en aire/gas
- $\sim 0.21 \text{ Hz}$  en agua

Lo que se traduce a una sensibilidad en los cambios de masa de:

- $\sim 1 \text{ ng/cm}^2$  en aire/gas
- $\sim 5 \text{ ng/cm}^2$  en líquido

y una sensibilidad en disipación de [12,13]:

- $\sim 2 \times 10^{-8}$  en aire
- $\sim 3 \times 10^{-8}$  en líquido

Por lo general, los gráficos obtenidos por el software son de cambio de frecuencia en función de tiempo; esto es porque permite un análisis de adsorción continuo para poder percibir los cambios que se den al interactuar los distintos elementos en solución que se le presenten. Es importante recordar que, al medir adsorción, los cambios de masa están ligados a las interacciones que presente la superficie y los elementos añadidos, pudiendo ser de cualquier carácter y fuerza. Un ejemplo de esto es que el cambio de aire a agua, mismos que presentará cambios en la frecuencia de resonancia aun cuando las interacciones son sólo momentáneas y serán sustituidas al fluir el líquido; debido a ello es importante dejar estabilizar las mediciones y hacer lavados para obtener sólo las mediciones de interacciones estables en caso de ser lo buscado.

Por su parte, la disipación ( $D$ ) nos permite identificar los cambios de rigidez que presenta una superficie. Esto se debe a que matemáticamente, la disipación es el inverso del factor  $Q$ , que se define en la ecuación 2:

$$D = Q^{-1} = 2\Gamma/f \quad \text{Ecuación 2}$$

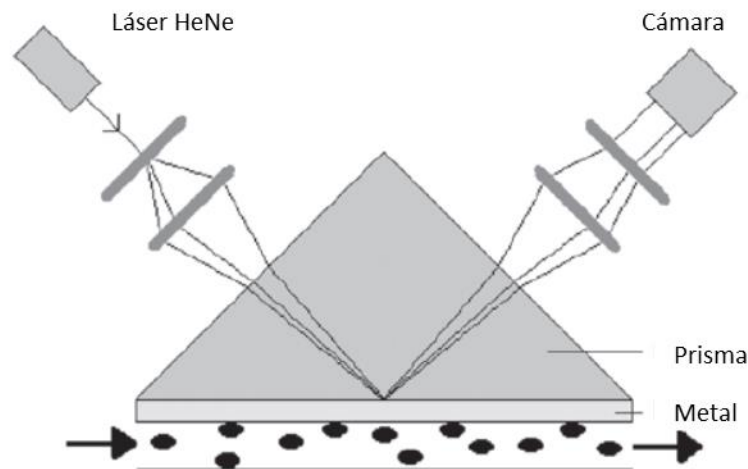
Donde  $\Gamma$  es la mitad del ancho de banda de la frecuencia contra la conductancia, y  $f$  es la frecuencia del máximo de la curva. El factor  $D$  es menos sensible a las perturbaciones por su relación con la conductancia de la superficie y no a su resonancia; esto es relevante ya que los cambios en el ancho de banda se relacionan proporcionalmente a la energía transferida por el cristal a la muestra por unidad de tiempo [15].

Los discos sensores usados en este trabajo tienen frecuencia de resonancia a 5 MHz y están cubiertos de Au, el equipo utilizado fue la QCM-2500 de KSV Instruments Lsd. (Finlandia) el

software para análisis de datos fue el QcmZBrowse de la misma compañía; esto se encuentra en el Laboratorio de Superficies e Interfases de la UAM-C. Su principal uso fue la medición de los cambios de frecuencia, masa y disipación de las películas modelos de hidrogeles al interactuar con los sistemas fotodinámicos, esto para poder indicar cual es la afinidad de cada uno de estos por los distintos polímeros que conforman los hidrogeles.

### 5.1.3. Plasmón de resonancia superficial (SPR)

Esta técnica es un método óptico para la medición del índice de refracción en capas delgadas adsorbidas en un metal, estas capas se generan por la interacción de una superficie con elementos que se encuentran en un flujo que corre sobre el sensor, promoviendo la interacción y adsorción de estos materiales a la superficie. Para los sensores se utilizan principalmente metales que no sea magnetizables, pero sí polarizable, *e.g.* oro. Se basa en la medición del cambio de ángulo de incidencia de un haz que es proyectado sobre la superficie donde éste excita la superficie deslocalizando electrones y generando el plasmón superficial; es éste el que refleja el haz con la misma intensidad a no ser que haya un adsorbato que modifique el ángulo de refracción [16].



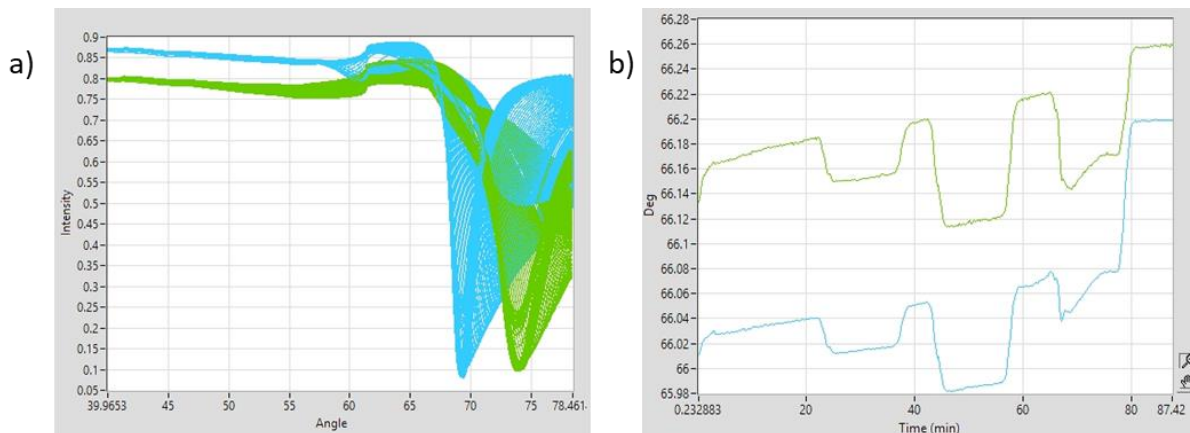
*Figura 4. Configuración clásica de un sensor de SPR, en el que el láser pasa por el cristal para excitar la superficie. Adaptada de Meyer [17].*

En la Figura 4 se observa el acomodo óptico más común para la medición mediante SPR, la configuración geométrica de Kretschmann en la cual el emisor incide en un solo punto el cual es reflejado con la misma intensidad por el plasmón de la superficie al no tener un analito, pero cuando este se presenta, el plasmón es modificado dando entonces un cambio de intensidad [17].

Los medios no son visibles en esta técnica por un fenómeno denominado “Reflexión interna total (TIR)””; este fenómeno se presenta cuando un haz, que pasa por dos medios no absorbentes (de mayor índice de reflexión a menor), presenta una interferencia, la cual genera un campo eléctrico llamado “onda de campo evanescente” que no está relacionado con la pérdida de intensidad o energía. Este campo es el que polariza la superficie del metal generando un cambio en el ángulo de reflexión censable a lo largo del medio, permitiendo la medición del espesor y viscosidad de la película sin que la variación de la intensidad del haz por el cambio del medio sea perceptible [17].

El SPR genera dos tipos de gráficas principales: una es la medición del ángulo contra la intensidad, en donde se observa el ángulo en el cual se pierde la intensidad por la activación del plasmón superficial; además, el cambio inicial se puede relacionar con el índice de refracción del medio por lo que su cambio indica una modificación en el bulto, que se puede relacionar cuando se ve el ángulo TIR a través del tiempo. En la Figura 5a se ve un ejemplo de curvas SPR generadas con láseres con dos longitudes de onda diferentes.

El segundo tipo de gráfica es el sensograma, el cual es la medición en el tiempo del ángulo en el que se activa el plasmón superficial; en la Figura 5b se puede ver un ejemplo de este tipo de gráfico. En general el sensograma se utiliza dando el ángulo en el que se encuentra el mínimo del pico, pero también puede hacerse con el centroide o con el valor del mínimo en intensidad.



*Figura 5. Ejemplo de las gráficas de SPR a) curva de SPR b) sensograma.*

En este trabajo el SPR permitió dilucidar la acción de los sistemas fotodinámicos a nivel superficial sin tomar en cuenta la interacción que pueda tener el medio (agua o buffer) con el hidrogel. El equipo utilizado fue un equipo de BioNavis Ltd (Finland) Bionavis SPR Navi 200 y el software de análisis es el SPR-Navi Data Viewer 4:2:5:1. El equipo utilizado se encuentra en el cuarto limpio del Departamento de Bioproductos y Biosistemas de la Universidad de Aalto en Esbo, Finlandia.



## 5.2. Técnicas de espectrofotometría

### 5.2.1. Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La base de esta técnica es la interacción de la materia con la energía electromagnética, en específico la absorción del espectro en las regiones ultravioleta y el visible, que van de la longitud de onda 200 a 400 nm y 400 a 800 nm respectivamente. La absorción presentada está regida por las transiciones electrónicas de un estado basal a un estado llamado excitado, donde esta energía absorbida da la dislocación electrónica permitiendo el cambio de estado energético.

Los cambios que son detectables en esta técnica son los de  $\pi \rightarrow \pi^*$  y de  $n \rightarrow \pi^*$  además de transiciones en los iones metálicos entre electrones localizados en los orbitales d-d. [18-21]

Los picos generados por la medición son el resultado de la absorción específica que tiene el analito ante una longitud de onda determinada. Matemáticamente (ver Ecuación 3), esta absorción se reporta como:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $I$  es la incidencia o también conocida como la intensidad de luz recibida; e  $I_0$  es la intensidad de luz emitida.

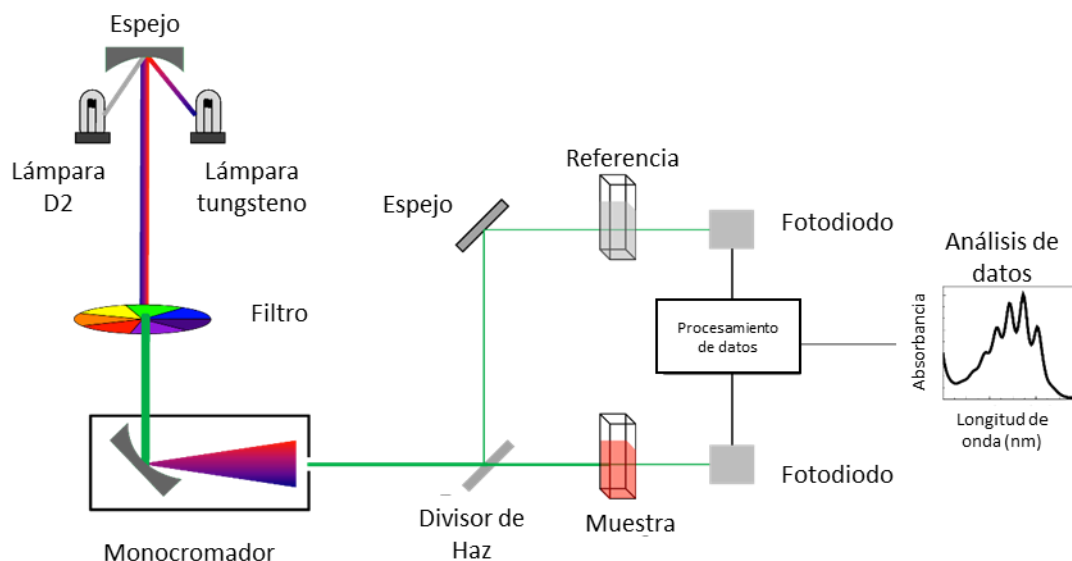
En casos donde los valores de absorbancia sean menores o iguales a 1, se puede presumir que su comportamiento es lineal, lo cual Lambert y Beer relacionaron proporcionalmente con la concentración de analito presente en la muestra; la ecuación resultante es:

$$A = \varepsilon l C \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $\varepsilon$  es el coeficiente de absortividad molar,  $l$  la longitud de paso y  $C$  la concentración del analito. [18, 19]

*La conformación general de estos equipos es: un emisor de luz, el cual debe de tener lámparas con la capacidad de emitir en la región adecuada; un filtro de dispersión que permite que se seleccione la longitud de onda en la que se desea trabajar; y finalmente un detector (ver*

Figura 6) [19].



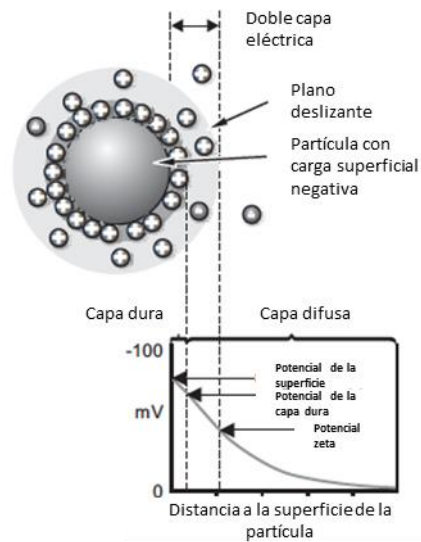
*Figura 6. Esquema del funcionamiento de un espectroscopio UV-Vis. Adaptada de Poole et al [19].*

Dentro de los usos de esta técnica se encuentran la detección de moléculas orgánicas aromáticas, metales, identificación de proteínas, estudios cinéticos y de estabilidad de componentes. En este proyecto se utilizó para la detección de la longitud de onda máxima en la cual absorben las NPAu, también conocido como pico de resonancia del plasmón superficial, el cual está directamente relacionado con el tamaño y forma de las NPAu. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Cary UV-Vis-NIR de Agilent (Estados Unidos de América) y el software: The Agilent Cary Win UV software; este equipo se encuentra en el Laboratorio de Cromatografía I de la UAM-C.

### 5.2.2. Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial Zeta

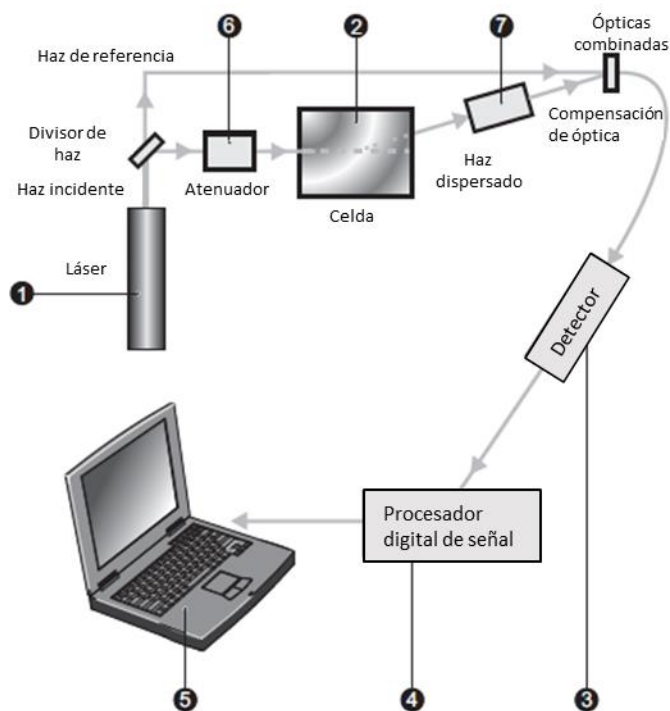
La incidencia de luz sobre la materia, en especial elementos absorbentes, genera una polarización de los electrones superficiales que da como resultado la dispersión de la luz. Es conocido que las partículas de mayor tamaño se desplazan menos en el espacio en un mismo lapso de tiempo con respecto a las partículas de menor tamaño, esto es conocido como movimiento browniano. Si este fenómeno se relaciona con un haz de luz continuo, la intensidad de fluctuaciones de la luz incidida sobre las partículas será distinta y proporcional al número de partículas que se tenga y al tamaño de las mismas, entonces se puede conocer la distribución de tamaños o perfiles hidrostáticos de éstas. [23, 24]

Conforme al mismo principio, se puede inducir un campo eléctrico que haga mover a las partículas debido a su carga hidrodinámica, la cual es medida como potencial zeta, este es un principio similar al de la electroforesis, pero realizado en suspensión líquida. La incidencia de la luz y la intensidad de fluctuaciones determinan la movilidad que presente, y esta es proporcional a la carga que presente su potencial zeta. La Figura 7 ejemplifica el potencial zeta; que es la carga presente en la superficie de una partícula, referido a su radio hidrodinámico. Para las partículas en suspensión coloidal, éste además determina la estabilidad que puede tener en la suspensión, buscándose valores menores a  $-30$  mV o mayores a los  $30$  mV, pues en esos valores se espera la repulsión entre partículas. [20, 22, 23]



*Figura 7. Definición esquemática del potencial zeta. Adaptada de Malvern Instruments [23].*

Al igual que la espectroscopia UV-Vis, esta técnica necesita de un emisor de luz (láser), un atenuador para que no se modifique la muestra, de un receptor que analiza los datos y de un procesamiento digital. En la Figura 8 se puede apreciar las partes que componen a los equipos para DLS.



*Figura 8. Esquema general de requerimientos de un equipo para dispersión dinámica de luz. Adaptada de Malvern Instruments [23].*

En este trabajo, se usa el Zetasizer Nano ZS modelo ZEN 3500 de Malvern Instruments (England) y el software correspondiente versión 7.03 para el análisis de los datos obtenidos relacionados con el tamaño y potencial zeta de los sistemas; este equipo se encuentra en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la UAM-C. Su uso fue para encontrar las distribuciones de tamaño y de potencial zeta de los sistemas fotodinámicos en solución como parte de la caracterización.

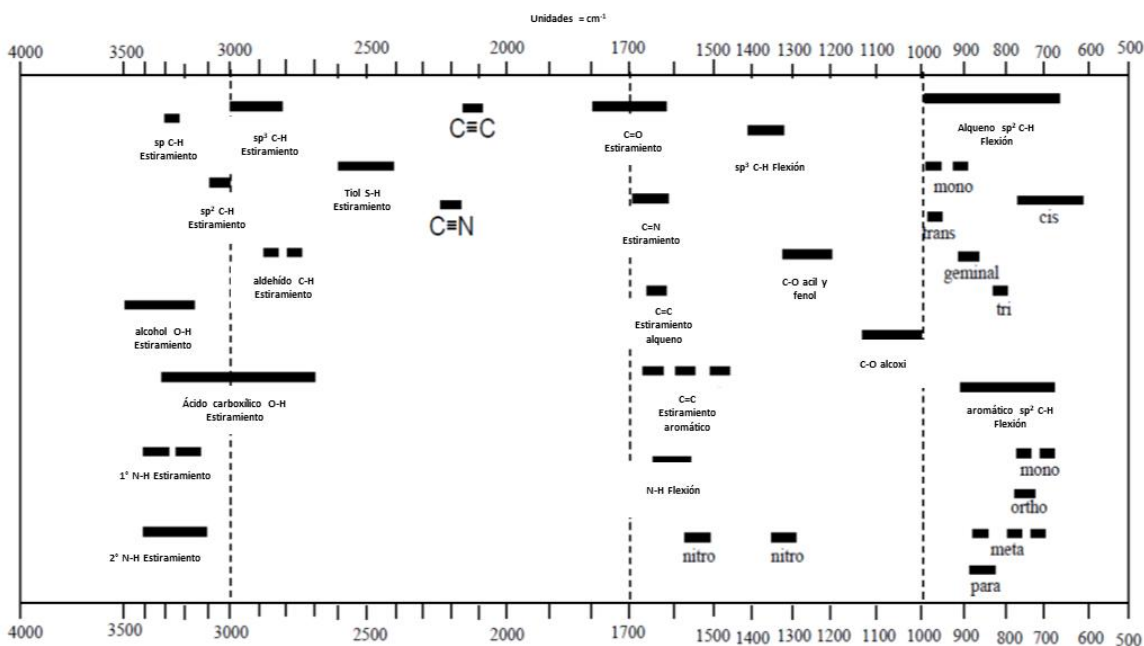
## 5.3. Técnicas de espectroscopia

### 5.3.1. Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica cualitativa se basa en la diferenciación de los niveles vibracionales de los enlaces en las moléculas dentro de la región infrarrojo del espectro electromagnético. El número de onda de esta región va de los  $13000\text{ cm}^{-1}$  a los  $10\text{ cm}^{-1}$  o entre  $0.8$  a  $1000\text{ }\mu\text{m}$  en longitud de onda.

Para que un enlace sea activo en esta región, es decir, que absorba energía y presente vibraciones en sus enlaces, las moléculas deben de presentar un dipolo eléctrico o bien tener un cambio momentáneo en su dipolo inducido por el campo eléctrico generado. Cada enlace tiene una frecuencia de vibración distinta de acuerdo con el tipo movimiento que presente, ya sea estiramiento o flexión, ésta es observada en distinto número de onda, lo que permite identificar el tipo de enlace y los grupos funcionales presentes en éste vía transformada de Fourier [1, 20].

Al contrario de la espectroscopia UV-Vis, en los espectros generados por el FTIR se ve la transmitancia contra el número de onda. El número de onda es el inverso de la longitud de onda, por lo que se muestra de mayor a menor energía; las bandas por su parte muestran el número de onda en los que los enlaces absorben por lo que se ve una pérdida en la línea base de transmisión.



*Figura 9. Ejemplo de las zonas en las que se pueden visualizar cada uno de los grupos funcionales de una molécula. Adaptada de Patrick [20]*

En la Figura 9 se puede observar esta relación de enlaces y movimientos. Se puede observar cómo se requiere de una mayor energía para generar estiramientos que para una flexión, esto también es proporcional a la movilidad que tengan los enlaces dictados por los grupos vecinos, por lo que los C-H que se encuentran en una conformación con enlaces dobles o triples requieren de mayor energía para su movilidad que los que están conformados por enlaces sencillos.

Esta técnica permite identificar qué tipo de interacción es la que se está dando entre los elementos presentes en el sistema, pues si existen enlaces covalentes o de coordinación estos emitirán una señal de transmitancia en los espectros generados, caso contrario si son interacciones electrostáticas o iónicas. Todo esto tomando en cuenta la diferencia de polaridad que tengan los átomos involucrados.

En este trabajo se utilizó un espectroscopio infrarrojo Bruker (Estados Unidos de América) modelo Tensor 27 con el aditamento de reflectancia especular, el cual consiste en la medición

indirecta de los haces reflejados por un polvo o superficie que fue incidida y reflejó a una serie de espejos que están conectados al sensor. El análisis se hizo con el software OPUS de la misma compañía; el equipo se encuentra en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la UAM-C y fue utilizado para el análisis de los grupos funcionales de los hidrogeles y su modificación al momento de interactuar con los sistemas fotodinámicos, pudiendo así encontrar los cambios estructurales y si la interacción se da por covalencia.



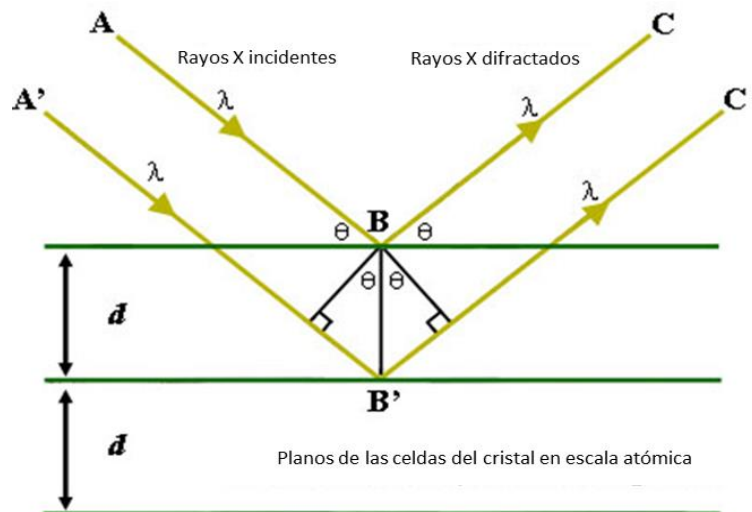
### 5.3.2. Difracción de rayos X (DRX)

El estudio estructural de la materia se simplificó al poder manipular y analizar la energía electromagnética a longitudes de onda del mismo orden que la distancia entre los átomos; los tipos de onda que corresponden a esta distancia son los rayos X [25].

De los diferentes tipos de interacciones entre la materia y la energía, el que se ha estudiado para proporcionar dicha información es la difracción; esto debido a el fenómeno de interferencia constructiva que se da con un haz monocromático y el material a estudiar. Este fenómeno se da siempre y cuando se siga la Ley de Bragg:

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Ecuación 5}$$

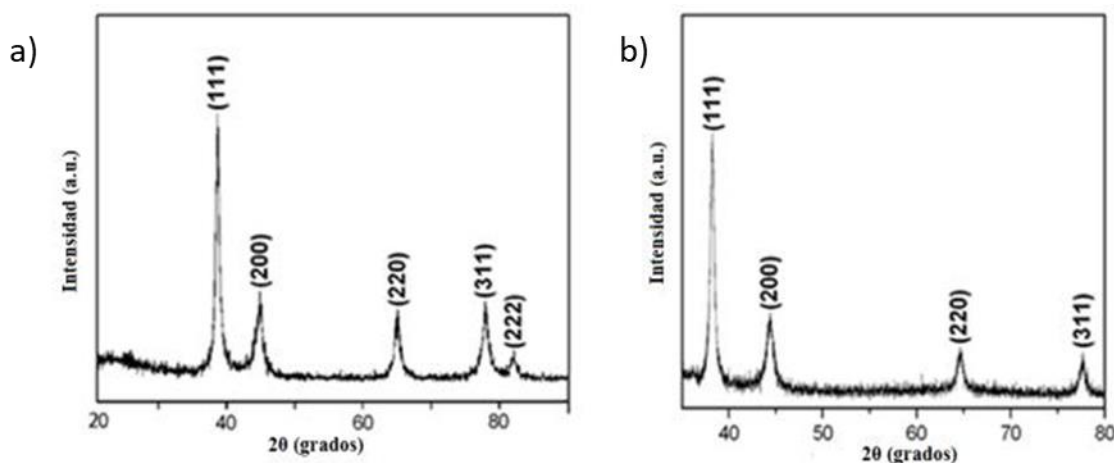
Donde  $n$  es el número entero del orden de reflexión,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $d$  es la distancia entre los planos y  $\theta$  es el ángulo de incidencia. Como se puede ver en la Figura 10, la interferencia constructiva se da entonces cuando la distancia entre los distintos haces y su reflexión se da en un número entero de longitud de onda, que corresponde a la distancia entre los átomos del mismo plano y es dependiente del ángulo de incidencia [26].



*Figura 10. Reflexión según la Ley de Bragg, en donde la difracción de los rayos X da una interferencia constructiva cuando las distancias entre los haces difractados son proporcionales en un número entero de longitud de onda. Adaptada de Henry et al [26].*

La técnica de difracción de polvos se basa en la generación de electrones a partir de un filamento metálico mediante la aplicación de un voltaje, estos electrones son disparados a una placa metálica; si estos electrones tienen suficiente energía para impactar en los electrones internos se generan rayos X que son incididos en la muestra y posteriormente recolectados por el sensor que gira en un ángulo de  $2\theta$ . En caso de que estos cumplan con la Ley de Bragg, entonces su conteo será mayor y esto se puede relacionar con los planos estructurales del material [27].

Los difractogramas muestran en el eje de las ordenadas el ángulo  $2\theta$  y en el eje de las abscisas el número de incidentes por segundo. En la Figura 11 se ven los difractogramas de nanopartículas de plata y oro respectivamente, los picos en determinados valores de  $2\theta$  están relacionados con diferentes planos estructurales en los que hay átomos ordenados de la celda unitaria [28]. Los difractogramas son diferentes para cada material, por lo que son considerados como huellas dactilares con las que se pueden identificar compuestos.



*Figura 11. Difractogramas de nanopartículas de (a) plata y de (b) oro. Adaptada de Belmares-Perales et al [28].*

Para este trabajo se utilizó un equipo Bunker (Estados Unidos de América) modelo D2 Phaser de 2da generación con el software EVA de Bunker para su análisis; este se encuentra de igual forma en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la UAM-C y su uso fue para identificar los cambios estructurales que se presentaron en la superficie de los hidrogeles.

## 5.4. Técnicas de microscopía

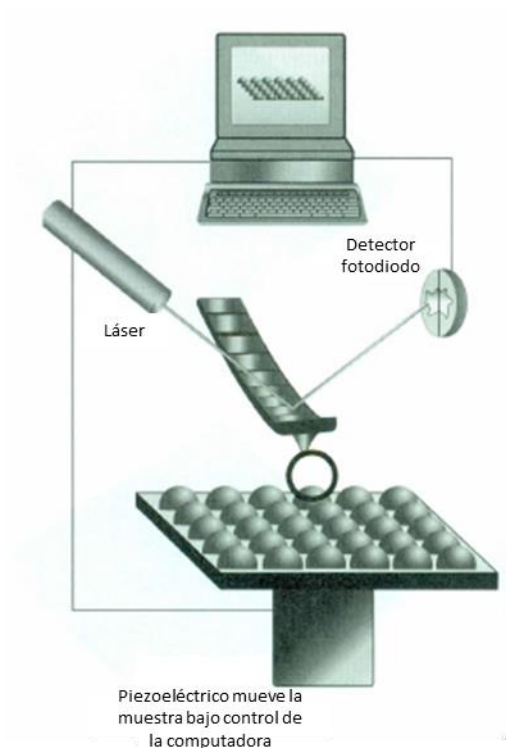
### 5.4.1. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las imágenes siempre han sido la forma predilecta para comprobar la existencia o ausencia de algo; en el caso de estar trabajando a escalas microscópicas, o nanoscópicas como es este caso, se requiere de un mayor nivel de instrumentación por su mayor complejidad de visualización.

Entre ellas se encuentra la microscopía de fuerza atómica que se basa en la interacción de una punta llamada “de prueba”, con la nube electrónica de los átomos superficiales del objeto a observar. Son las interacciones de Van der Waals y las electrostáticas las que generan el perfil característico y dan en consecuencia la atracción o repulsión de la punta a la superficie y la desviación de un láser que incide sobre la punta de prueba, esta deflexión genera los patrones que serán traducidos computacionalmente a una imagen tridimensional. Este equipo permite el uso de muestras húmedas ya que no necesita que tengan un recubrimiento metálico para su observación, como sería en muchos de los microscopios electrónicos utilizados actualmente. [18]

Al ser consecuencia de la nube electrónica se pueden dar complicaciones a la hora de obtener información debido a que las interacciones no sean lo suficientemente claras, sin embargo, esta microscopía da una alta resolución en la dimensión de los Å o de nm. [19, 29]

El funcionamiento general de estos equipos está sustentado en la punta (la cual puede variar dependiendo del tipo de superficie y especificidad que se busque), está unida a una ménsula o placa que refleja un láser incidente llegando a un sensor que evalúa el cambio de posición y da información a la base donde está la superficie y utiliza sus propiedades piezoeléctricas para moverlo y mantener así equidistante la superficie de la punta (>10 nm). En la Figura 12 muestra las partes principales del sistema de obtención de datos de un AFM. [19, 29]



*Figura 12. Esquema del funcionamiento de obtención de imagen por AFM. Adaptada de Poole et al [19].*

Al ser una medición de la topografía de la superficie, las imágenes permiten el análisis de la rugosidad de la superficie ( $R$ ), que de acuerdo a como se decida hacer el promedio tiene distintos subíndices que nos dan distintos tipos de información. Los más comunes son  $Ra$ , que es un promedio de los distintos picos y valles a lo largo de la longitud analizada;  $Rq$  que es el promedio cuadrático;  $Rx$  (ISO) que es el promedio de los 5 picos más altos y los 5 valles más bajos; Finalmente, la comparación entre  $Ry$  que es el pico más alto,  $Rv$  el punto más bajo y  $Rt$  que es la diferencia entre  $Ry$  y  $Rv$  [30].

Para el análisis de las superficies generadas de los hidrogeles y la caracterización de los conjugados adsorbidos se utilizó el equipo NaoAFM de la compañía Nanosurf (Suiza) con su software NaoSTM versión 3.5.0.32., el equipo se encuentra en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la UAM-C.

### 5.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

A diferencia de la microscopía óptica que utiliza fotones, la microscopía electrónica se basa en el uso de electrones para la observación de superficies. Para su funcionamiento, se necesita de la generación de electrones que serán irradiados a los analitos en un medio al vacío, y que posteriormente emitirán electrones secundarios que serán recolectados y amplificados por un detector. En la Figura 13 se puede observar un esquema general del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido [31, 32].

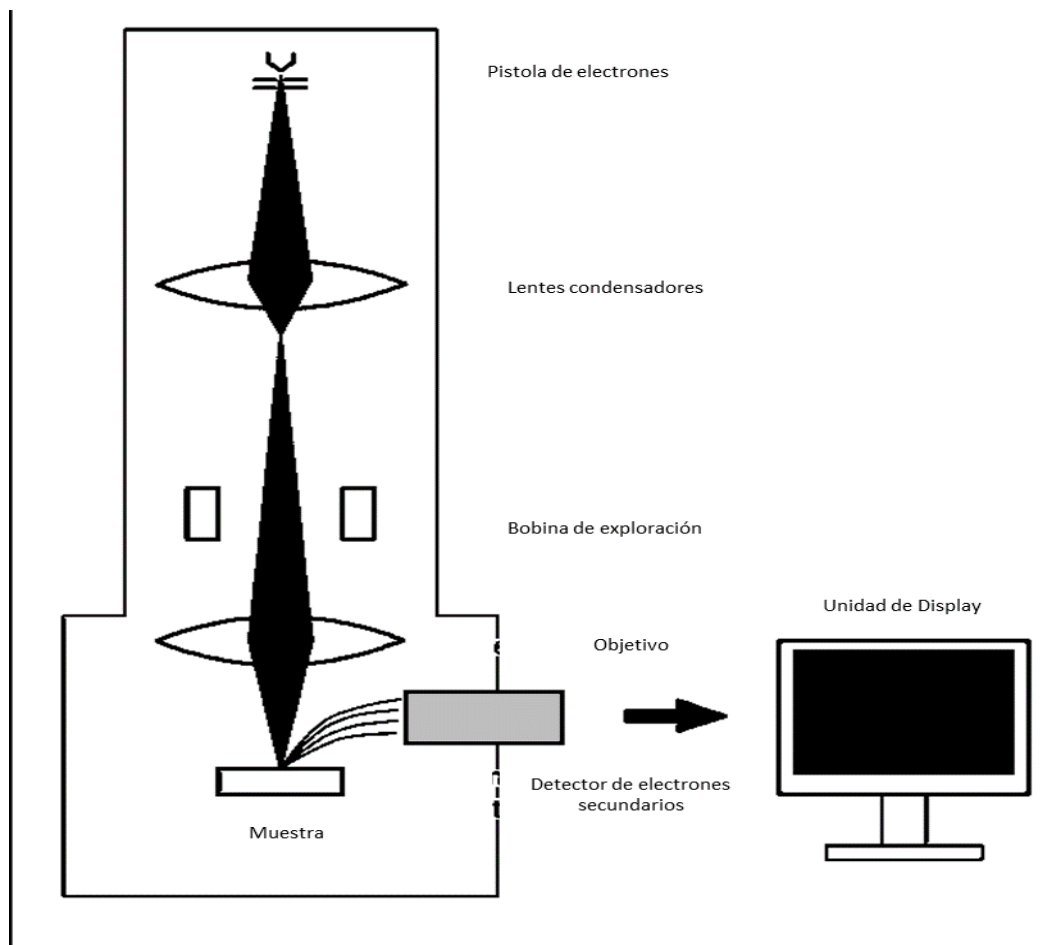


Figura 13. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido. Adaptada de JEOL Application Notes [31].

La calidad de la imagen depende de la energía con la que los electrones son incididos sobre la muestra, pues a distintos voltajes, la intensidad de los electrones secundarios varía y se pueden ver distintos estratos de la muestra; el rango general de emisión va de 5 a 30 keV. Así mismo, los átomos que se encuentran en los vértices o en los bordes tienden a generar una mayor intensidad por atraer de manera distinta a los electrones [33].

Además de la detección de los electrones secundarios, existen otros detectores que pueden ver electrones retrodispersados, cató-luminiscentes, de rayos X o de electrones Auger. De los detectores, los más eficientes para ver partículas metálicas son los retrodispersados [31].

La señal de electrones retrodispersados se da con aquellos electrones que son liberados por la muestra que contiene átomos de un número atómico grande, estos tienen que tener una energía superior a los 50 eV (electronVolts). La diferencia en las imágenes se da porque con los electrones retrodispersados, los que tengan mayor energía, tendrán un mayor brillo en la imagen. Con esto es más factible identificar los elementos que están presentes en la superficie debido al contraste de intensidad [31].

Para este trabajo, se utilizó un microscopio Hitachi (Alemania) modelo TM3030PLUS; las superficies fueron puestas sin recubrimiento y se observaron por electrones retrodispersados a 15 kV; el equipo se encuentra en el Laboratorio de Caracterización de Farmacoquímica de la UAM-C.

## 5.5 Bibliografía

1. Kissinger, P. T. (2002). Instant Notes: Analytical Chemistry. D. Kealey and P. J. Haines. Oxford: Bios Scientific Publishers Limited, 2002, 352 pp.. ISBN 1-859961-89-4.
2. Petty, M. C. (1996). Langmuir-Blodgett films: an introduction. Cambridge University Press.
3. Zasadzinski, J. A., Viswanathan, R., Madsen, L., Garnæs, J., & Schwartz, D. K. (1994). Langmuir-blodgett films. *Science*, 263(5154), 1726-1738.
4. Honciuc, A., Jaiswal, A., Gong, A., Ashworth, K., Spangler, C. W., Peterson, I. R., Dalton, L.R., & Metzger, R. M. (2005). Current rectification in a Langmuir– Schaefer monolayer of Fullerene-bis- [4-diphenylamino-4 -(N-ethyl-N-2 -ethyl) amino-1, 4-diphenyl-1, 3-butadiene] Malonate between Au electrodes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(2), 857-871.
5. Li, M., Chen, M., Sheepwash, E., Brosseau, C. L., Li, H., Pettinger, B., Gruler, H., & Lipkowski, J. (2008). AFM studies of solid-supported lipid bilayers formed at a Au (111) electrode surface using vesicle fusion and a combination of Langmuir– Blodgett and Langmuir– Schaefer techniques. *Langmuir*, 24(18), 10313-10323.
6. Scriven, L. E. (1988). Physics and applications of dip coating and spin coating. In MRS Proceedings (Vol. 121, p. 717). Cambridge University Press.
7. Hall, D. B., Underhill, P., & Torkelson, J. M. (1998). Spin coating of thin and ultrathin polymer films. *Polymer Engineering & Science*, 38(12), 2039-2045.
8. Jiang, P., & McFarland, M. J. (2004). Large-scale fabrication of wafer-size colloidal crystals, macroporous polymers and nanocomposites by spin-coating. *Journal of the American Chemical Society*, 126(42), 13778-13786.
9. Lawrence, C. J. (1988). The mechanics of spin coating of polymer films. *The Physics of Fluids*, 31(10), 2786-2795.
10. Yates, M., Faraldos, M., & Goberna, C. (2002). Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Edición, Madrid, España, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, 221.
11. Spin Coating: A Guide to Theory and Techniques. Ossila. Fecha de consulta 20 de junio de 2017 desde <https://www.ossila.com/pages/spin-coating>

12. Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K., Elwing, H. (2001). Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Analytical Chemistry*, 73, 5796-5804
13. Marx, K. (2003). Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *American Chemical Society. Biomacromolecules* vol 4, 5.
14. Sauerbrey, G. (1959). Use of a quartz vibrator from weighing thin films on a microbalance. *Zeitschrift für Physik*, 155, 206.
15. Johannsmann, D. (2008). Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(31), 4516-4534.
16. Hutter, E., Fendler, J. H., & Roy, D. (2001). Surface plasmon resonance studies of gold and silver nanoparticles linked to gold and silver substrates by 2-aminoethanethiol and 1, 6-hexanedithiol. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(45), 11159-11168.
17. Pattnaik, P. (2005). Surface plasmon resonance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126(2), 79-92
18. Meyer, E. (1992). Atomic Force Microscopy. Progress in Surface Science. Pergmon Press: U.S.A. Vol 4 pp 3-49.
19. Poole, C., Owens, F. (2007). Introducción to Nanotechnology. Reverté: España. Cap. 4, 10 y 12. ISBN: 978-84-291-7971-2.
20. Patrick, G. (2002). Organic Chemistry. Instant Notes. BIOS Scientific Publishers: UK. Second Edition. ISBN: 0-203-44168-0.
21. Temenoff, J.S., Mikos, A. G. Biomaterials. The Intersection of Biology and Materials Sciences. Pearson Prentice Hall Bioengineering: EEUU. Capítulo 7, páginas 268-272.
22. De la Fuente, J., Grazu, V. (2012). Nanobiotechnology Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. Elsevier: UK. ISBN: 978-0-12-415769-9.
23. Zetasizer Nano Series User Manual. (2004). Malvern Instruments Ltd: England. Cap. 13 y 15.



24. Topete Camacho, A. (2013). Development of Hybrid Nanoplateforms for Theranostic Applications. Tesis para obtener el grado de doctorado. Departamento de Física de la Materia Condensada. Universidad de Santiago de Compostela. Capitulo 4.
25. Borie, B. (1965). X-Ray diffraction in crystals, imperfect crystals and amorphous bodies. *Journal of the American Chemical Society*, 87(1), 140-141.
26. Dinnebier, R. E., & Billinge, S. J. (Eds.). (2008). *Powder diffraction: theory and practice*. Royal Society of Chemistry.
27. Jenkins, R., & Snyder, R. L. (1996). Introduction to X-ray Powder Diffractometry, Volume 138. *Chemical analysis, a series of monographs on analytical chemistry and its applications*.
28. Belmares-Perales, S., Torres-López, E., Coparán-Elizondo, J. L., Arriaga-Garza, J., & Elizondo-Villarreal, N. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método de fisicoquímica verde. *Foro de divulgación Científica y tecnológica. México*.
29. Binnig, G., Quate, C., Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* Vol 56, 9.
30. De Oliveira, R. R. L., Albuquerque, D. A. C., Cruz, T. G. S., Yamaji, F. M., & Leite, F. L. (2012). Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications. In *Atomic Force Microscopy-Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*. InTech. Capítulo 7, paginas 147-174.
31. SEM Scanning Electron Microscope A To Z. (S.F.). JEOL Application Notes [Version Electrónica]. [https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem\\_atoz\\_all.pdf](https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf)
32. Hafner, B. (2007). Scanning electron microscopy primer. Characterization Facility, University of Minnesota-Twin Cities, 1-29. [Versión electrónica]. Scanning electron microscopy primer
33. Müllerová, I., & Frank, L. (2007). Very low energy scanning electron microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 2, 795-804.

# 6. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro

---

## 6.1. Antecedentes

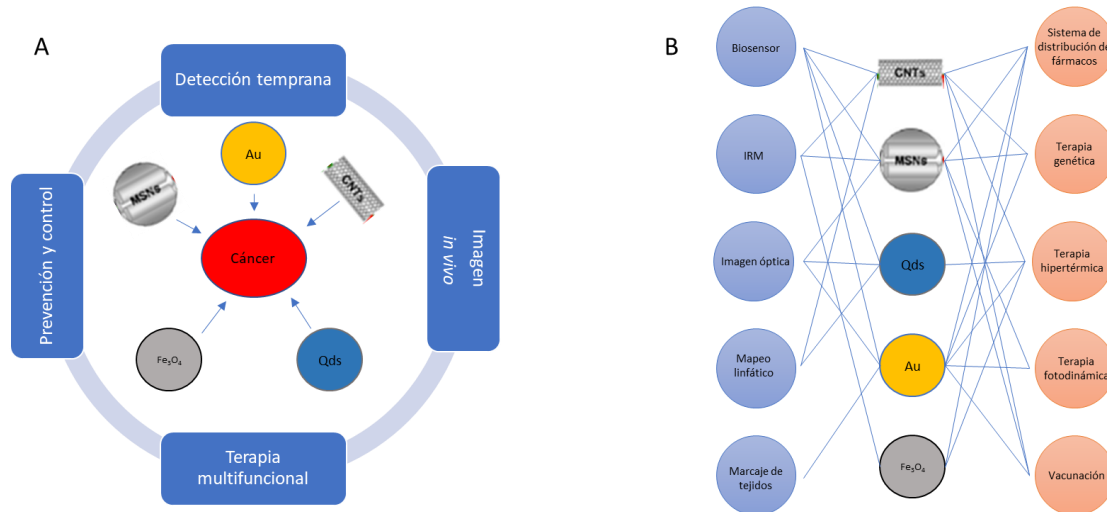
En la regulación de la Unión Europea, un nanomaterial está definido como: “Un material manufacturado, de origen natural o incidental que contiene partículas, en un estado libre, agregado o como aglomerados, y que 50 % o más de estas partículas tienen un valor de distribución de su tamaño, en una o más dimensiones externas en un rango de tamaño entre 1-100 nm” [1].

El interés de producir materiales con estas dimensiones se debe a que, en general, se ha encontrado que los nanomateriales presentan propiedades diferentes comparadas contra los formados por los mismos elementos, pero a una escala macroscópica [2]. La gran mayoría de las propiedades que presentan los nanomateriales se deben a que una mayor proporción de átomos, que forman la estructura, se encuentran en la superficie, la cual presenta una mayor reactividad generando distintos fenómenos fisicoquímicos y electrónicos.

Los nanomateriales engloban a un gran número de estructuras. Por lo general se clasifican en orgánicos e inorgánicos; dentro de los orgánicos se encuentran los de origen proteico, los formadas a base de polisacáridos o bien con estructuras de carbono como el grafeno y los fulerenos; además de estructuras como los dendrímeros [3-5]. Dentro de los de origen inorgánico se encuentran nanocerámicos, las nanopartículas metálicas, los quantum dots y las nanopartículas superparamagnéticas [5-8].

Para muchas aplicaciones en el campo médico los nanomateriales inorgánicos son de interés por la diversidad de sus propiedades que permiten aplicaciones como la obtención de imágenes mediante técnicas como la resonancia magnética; la generación de tratamientos alternativos por efectos magnéticos, fotodinámicos o por hipertermia; la distribución de fármacos; o bien funcionar como transductores para biosensores [8-9]. En la Figura 14 se puede ver que las estructuras más estudiadas han sido los nanotubos de carbono (CNT), las partículas mesoporosas

de sílice (MSN), los quantum dots (QD), las nanopartículas de oro (Au) y de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).



*Figura 14. Distintas nanoestructuras inorgánicas y su uso en la biomedicina. Adaptada de Yang et al [9].*

Las nanopartículas de oro, como otras nanopartículas metálicas, presentan una alta conductividad eléctrica, así como propiedades ópticas y catalíticas. [2-8]. Además, por ser un metal noble presentan poca reactividad, biocompatibilidad y química superficial selectiva, lo que las hace idóneas para su modificación superficial selectiva [2-19].

También presentan un comportamiento fotodinámico, que es consecuencia de la absorción de una longitud de onda específica, usualmente aplicada mediante láseres, [2, 8] y que tiene como consecuencia un cambio en la temperatura, aumento de su porosidad y disminución de los electrones superficiales (ver Figura 15) [8]

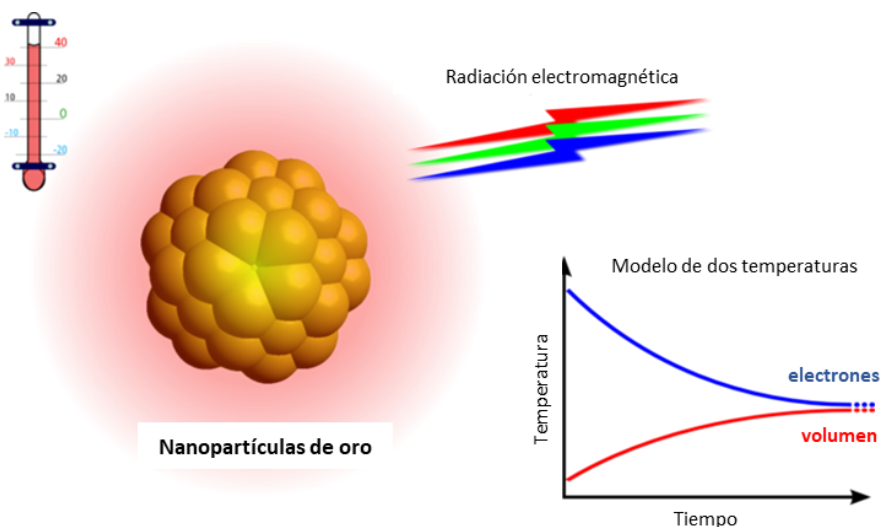


Figura 15. Comportamiento fotodinámico de las nanopartículas de oro. Adaptada de Virlan et al [4].

La morfología de las NPAu está ampliamente ligada con el método de síntesis que se utilice para su obtención y esto relaciona también la longitud de onda que estimula su plasmón; en la Figura 16 se puede observar esquemáticamente esta relación entre forma y longitud de absorción [2,20,21].

Dentro de los métodos químicos más comunes para la síntesis de las NPAu se encuentran la reducción por citratos, las micro-emulsiones, la formación de semillas, y el método Brust-Schiffrin; para los métodos físicos, los más comunes son la fotoquímica, sono-química, termólisis y radiólisis [7,20-24]. Así mismo, se ha encontrado que los extractos de algunas plantas, tales como *Rosa Berberifolia*, *Geranium Maculatum*, *Aloe Barbadensis* y *Cucurbita Digitata* pueden servir como agentes reductores para su formación [25] o incluso son capaces de sintetizar las nanopartículas en sus raíces [26].

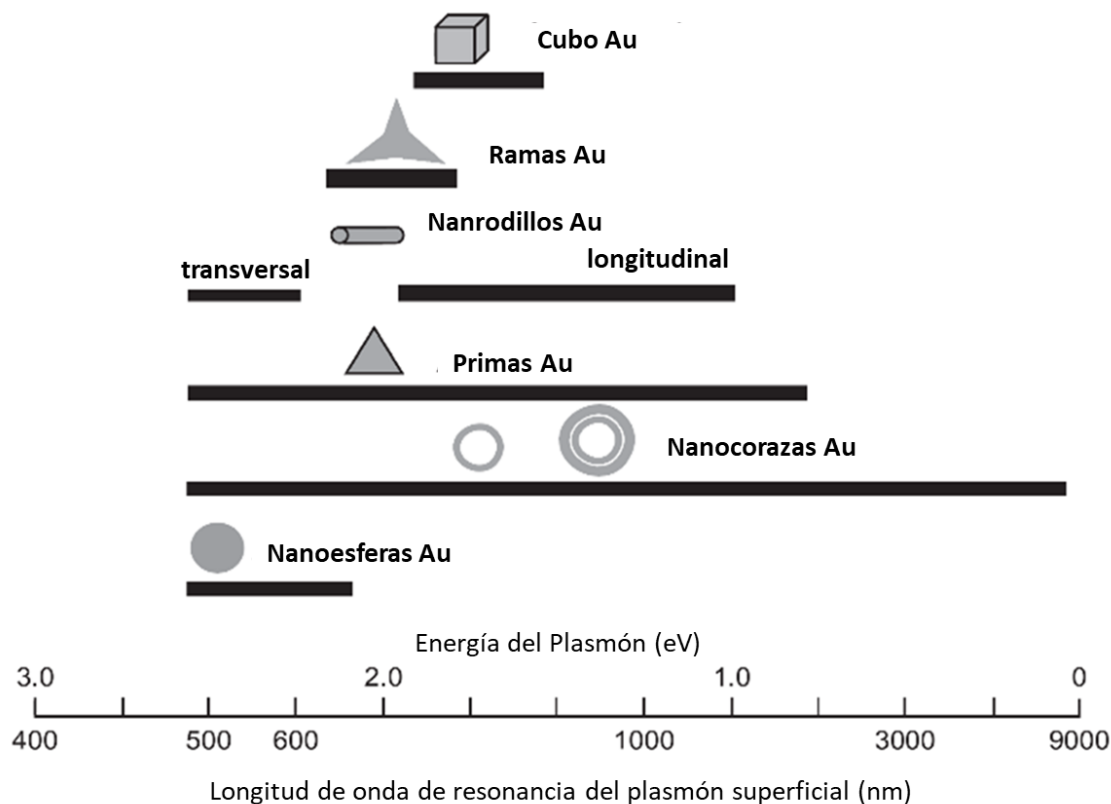


Figura 16. Rango del plasmón de resonancia de las nanopartículas de oro en función de su forma. Adaptada de Poole et al [2].

Un factor importante por considerar al hablar del uso de las nanopartículas es el estabilizante utilizado o los modificadores superficiales que presente, pues serán estos los que dicten las interacciones biológicas que se presentarán entre los sistemas y las células. Dentro de los más comunes son surfactantes, biomoléculas, polímeros y dendrímeros [2-23].

La modificación con proteínas ha sido estudiada por la capacidad que éstas tienen de conferir especificidad a las NPAu, sobre todo para terapias dirigidas, y de mejorar la biocompatibilidad por la corona proteica que se forma [12]. Dentro de estos estudios, el seguimiento de las interacciones de BSA con nanopartículas metálicas resulta interesante por su capacidad de dilucidar los mecanismos de unión entre estos; un estudio realizado por Brewer *et al.* en 2005 [13], demuestra que la interacción entre nanopartículas de oro recubiertas por citrato y BSA se

da por efectos electrostáticos y no por desplazamiento de los citratos. Sin embargo, también se menciona que, en superficies altamente cargadas como el oro, la adsorción de proteínas genera inicialmente una desnaturalización de éstas y posteriormente una interacción por todos los grupos cargados, además de la acción de mecanismos hidrofóbicos [13,15]

En el área de ingeniería de tejidos, algunos grupos están trabajando con sistemas similares, dentro de estos se pueden destacar el grupo de Bakere *et al* [16] que utilizó un sistema conjugado de nanopartículas de plata con BSA que unió a un andamio de poli (3-hidroxilbutirato-co-3-hidroxilvalerato) (PHBV) con colágeno para crecimiento de tejido óseo, mientras que el grupo de Mandal *et al* [17] utilizó las nanopartículas de plata con un sistema recubierto de PEG/TritonX-100, ambos con el fin de utilizar sus propiedades antibacterianas en los andamios; finalmente, el grupo de Encabo-Berzosa *et al* [18] generó un sistema de nanopartículas de corazas de oro con núcleos de PEG para promover la migración de células madres en andamios a base de fibrina buscando su diferenciación a osteoblastos, esto por la mejora que da al andamio el oro en cuanto a biocompatibilidad.

En esta sección se analizará la caracterización de nanopartículas generadas por reducción química con borohidruro de sodio, utilizando citrato como estabilizador y un sistema de nanocoraza de oro en un núcleo polimérico, que posteriormente fue modificado con proteína (BSA).

## 6.2. Metodología

### 6.2.1. Generación de nanosemillas de Au (Nseeds)

Las nanopartículas de oro, también llamadas nanosemillas, fueron generadas siguiendo la metodología de Jana *et al* [7]. Se preparó una solución de  $\text{HAuCl}_4$  al 0.1 M, de ésta se tomaron 125 mL y se añadieron a 10 mL de solución de citrato trisódico al  $2.56 \times 10^{-4}$  M que funciona como estabilizador. Posteriormente, se le agregaron 0.3 mL de  $\text{NaBH}_4$  al 0.1 M a  $4^\circ\text{C}$ , como agente reductor. La solución se deja pernoctar para que se complete la reacción.

### 6.2.2. Generación de nanocorazas espiculadas de oro (NPAu)

Este sistema fue adaptado a partir de la metodología generada por Topete *et al* [11]. Ésta consiste en el crecimiento de una coraza de oro a partir de un núcleo de ácido poli láctico-co-glicólico (PGLA) que está estabilizado con quitosano y el copolímero tribloque Pluronic F-127.

### 6.2.3. Preparación y obtención de núcleo polimérico

Los núcleos de PGLA se formaron a partir de micelas inversas. Se preparó una solución al 10 % m/v de PLGA en acetona; ésta se añadió a una solución acuosa estabilizante de F-127 al 1 % m/v en proporción 1:20. El proceso se llevó a cabo con agitación de 250 rpm a 10 °C.

La solución resultante fue homogenizada por 10 min en baño de hielo con una punta sonicadora (Vibra Cell de Sonics (Estados Unidos de América) modelo VCX 750) de 750 W, frecuencia de 20 kHz y al 40 % de amplitud y se dejó en agitación por 4 horas para volatilizar la acetona sobrante. Posteriormente se hicieron 3 ciclos de lavado mediante centrifugación a 6000 rpm por 15 min a 25 °C; el sobrenadante se retiró y se resuspendió en agua desionizada.

### 6.2.4. Modificación superficial de los núcleos de ácido poli láctico-co-glicólico (PGLA) con quitosano y Nseeds

A la dispersión resultante de nanopartículas de PGLA se le añadió una solución de quitosano (1 % m/v en ácido acético al 1 % v/v) en una proporción 1:20 y se dejó en agitación de 2 a 4 horas. Se hicieron ciclos de lavados en centrifugación como en el paso anterior.

Al resuspender los núcleos recubiertos con quitosano en agua desionizada, se les añadieron Nseeds en proporción 1:5 en agitación a 400 rpm y se dejaron en agitación por 4 horas para propiciar la interacción con las nanopartículas. Finalmente, se hizo un ciclo de lavados por centrifugación.

### 6.2.5. Crecimiento de la coraza

Para la formación de la coraza se generaron previamente las soluciones necesarias:

1. Una solución acuosa 3.69 mM de  $K_2CO_3$  que funciona como el nuevo agente reductor. Ésta se dejó estabilizar por 30 minutos.
2. Una solución 0.025 M de  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ , llamada solución de crecimiento.

Se agregaron 2 mL de la solución 0.025 M de  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  a 98 mL de solución de  $K_2CO_3$  y se dejó sin agitación por cerca de 24 horas en condiciones de oscuridad para evitar la fotooxidación.

3. Una solución iniciadora de ácido ascórbico 0.5 M con un pH  $\approx$  1.95.

900  $\mu$ L de precursores (núcleos de PLGA con semillas) fueron añadidos en agitación a 20 mL de solución de crecimiento. Finalmente, 100  $\mu$ L de solución de ácido ascórbico fueron agregadas abruptamente para la reducción de la sal de oro.

### 6.2.6. Formación de conjugados NPAu-BSA (albúmina de suero bovino)

Se añadieron 0.5 mL de una solución de BSA al 2.5  $\mu$ M en tampón salino de fosfatos (PBS) a 2 mL de NPAu en agua desionizada después de la síntesis. Esta mezcla se dejó en agitación constante a 350 rpm por 48 horas. Después se hicieron dos lavados por centrifugación a 8000 rpm a 15 °C por 10 minutos, resuspendiendo en agua desionizada.

### 6.2.7. Caracterización de los sistemas fotodinámicos

La caracterización de tamaño y carga en solución líquida de los sistemas fotodinámicos se realizó mediante mediciones en UV-Vis y DLS, que fueron realizadas con una dilución 1:10 en agua desionizada. El índice de refracción fue medido con un refractómetro Anton Paar (EUA) modelo Abbemat 300 utilizando la solución concentrada.

Por otro lado, la caracterización morfológica de las Nseeds, NPAu y los complejos NPAu-BSA se realizó mediante las técnicas de microscopías y difracción de rayos X. Para ello se prepararon



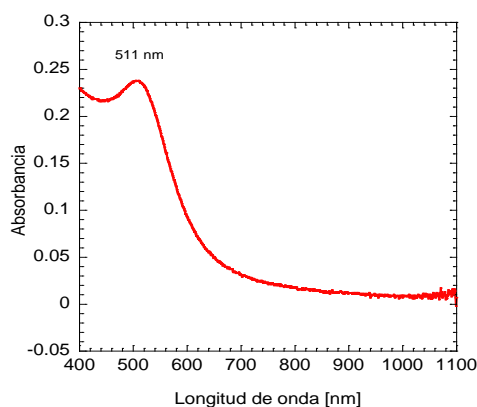
superficies sobre cubreobjetos de vidrio, estos fueron limpiados previamente con chorros de H<sub>2</sub>O desionizada y etanol usando pisetas, y después se pusieron por 20 minutos en un limpiador de plasma. Una vez limpios, en una mesa con flujo laminar, se les añadieron 15  $\mu$ L de las distintas nanopartículas y se dejaron hasta que todo el solvente evaporara; esto se realizó 3 veces para tener un volumen final de 45  $\mu$ L depositados en la superficie.

La concentración de las soluciones de los sistemas fue calculada de acuerdo a los resultados que se obtienen en UV-Vis, por lo que serán explicados en la sección 7.2.6.

## 6.3. Resultados y discusión

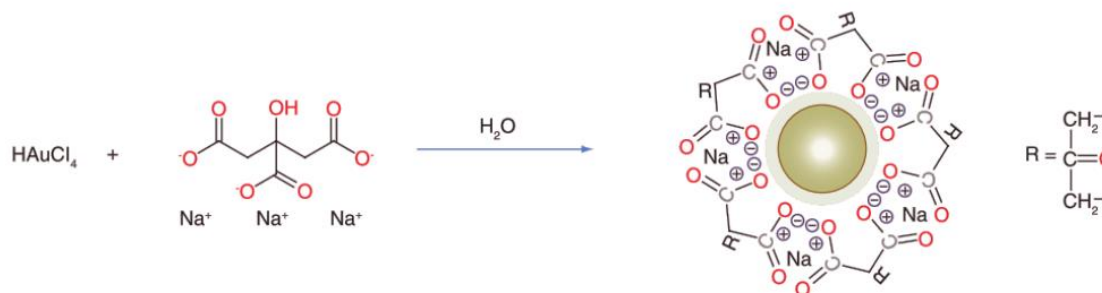
### 6.3.1. Caracterización de Nseeds

La medición en UV-Vis muestra un pico definido a los 511 nm (ver Figura 17), el cual es correspondiente con lo reportado para las nanopartículas de oro de forma esférica y de tamaño menor a los 15 nm [2].



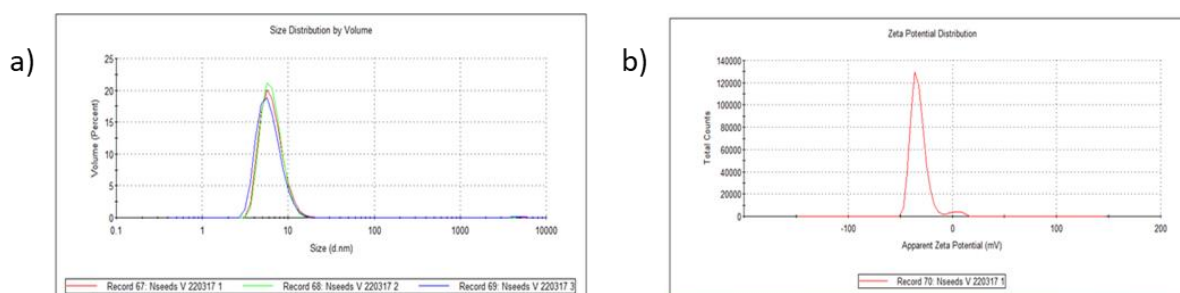
*Figura 17. Espectro UV-Vis de las Nseeds. Donde se observa un único máximo de absorción a 511 nm.*

En la Figura 18 se observa el proceso por el cual se generan las nanoestructuras y como el agente estabilizante, que son los citratos, rodean a la estructura, exponiendo únicamente uno de los grupos carboxilo y el hidroxilo. O bien, elimina la parte central y genera radicales cetónicos [14].



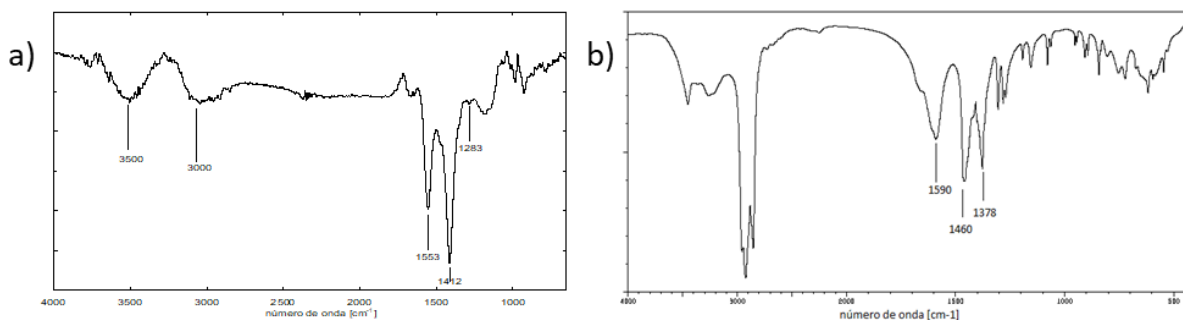
*Figura 18. Esquema de la estructura de las Nseeds. Adaptada de Harrison et al [14].*

Respecto a su tamaño, fue medido con DLS y presentó un pico máximo en su distribución a 7 nm, mientras que el potencial zeta fue de -33.1 mV, este valor se encuentra en el rango donde las soluciones coloidales son estables [13] y una conductividad de  $0.30 \text{ mS cm}^{-1}$  (ver Figura 19); además su índice de refracción fue de 1.33275 nD.



*Figura 19. Distribuciones de tamaño y de potencial zeta de las Nseeds.*

En el espectro de FTIR presentado en la Figura 20, se comparan los espectros de las Nseeds contra el del citrato trisódico solo. Se ve que las bandas principales de los carboxilos que se encuentran en los  $1590$  y  $1460 \text{ cm}^{-1}$  se recorren a números de onda menores al estar unidas al oro. Además de que se pierde la intensidad de las bandas de C-H ( $3000 \text{ cm}^{-1}$ ), lo cual corresponde a lo que se esperaba según la Figura 18.



*Figura 20. FTIR de las a) Nseeds y b) del citrato. Espectro del citrato adaptado de Spectral Database for Organic Compounds.*

Como se mencionó anteriormente, la caracterización morfológica de las Nseeds formadas se realizó mediante AFM y en SEM. En la Figura 21 se muestran las imágenes de AFM, en donde se observan agregados de distinto tamaño, estos pueden ser consecuencia del proceso de secado y formación de la película, el  $Rq$  (rugosidad media) es de 9 nm,  $Ra$  de 7.3 y  $Rm$  es de -7 mientras que el  $Ry$  (Rugosidad total) es de 37.7 nm; esta diferencia de rugosidad muestra que hay agregados muy diferentes sobre la superficie. Esta diferencia en el tamaño de los agregados es visible de igual forma en las imágenes de SEM (ver Figura 22), donde los agregados presentan distintos tamaños y morfologías, pero que, al ser observadas a una mayor magnificación, tienen la forma semi esférica que se espera de ellas y están de forma similar a las microscopias de AFM.

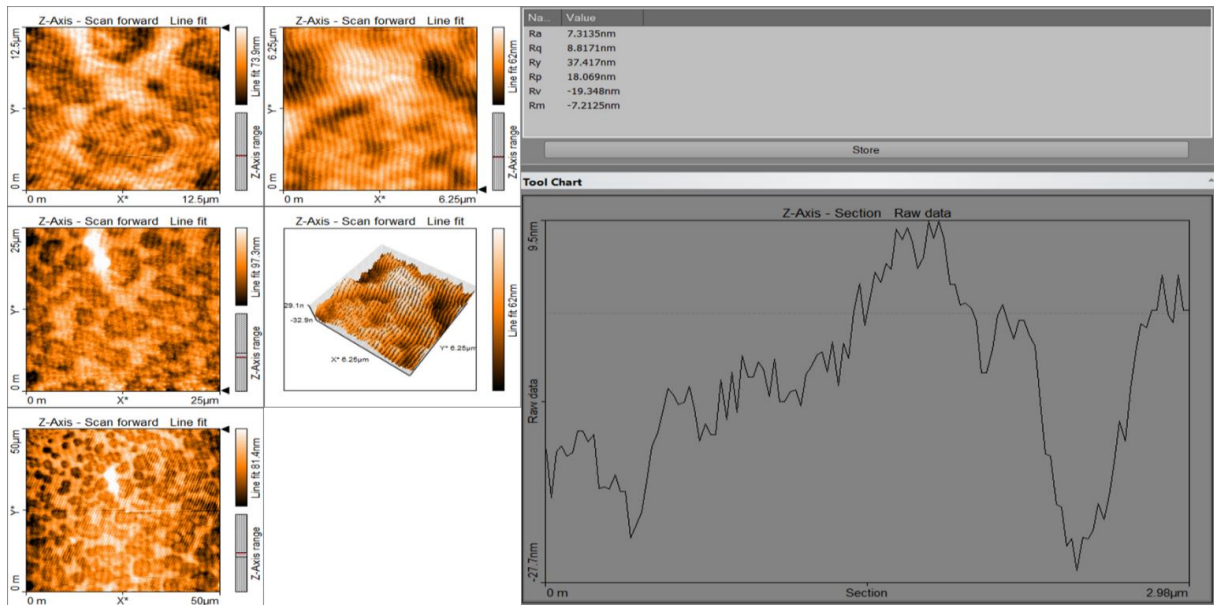


Figura 21. Imágenes de fuerza atómica de depósitos de las nanosemillas de oro (Nseeds).

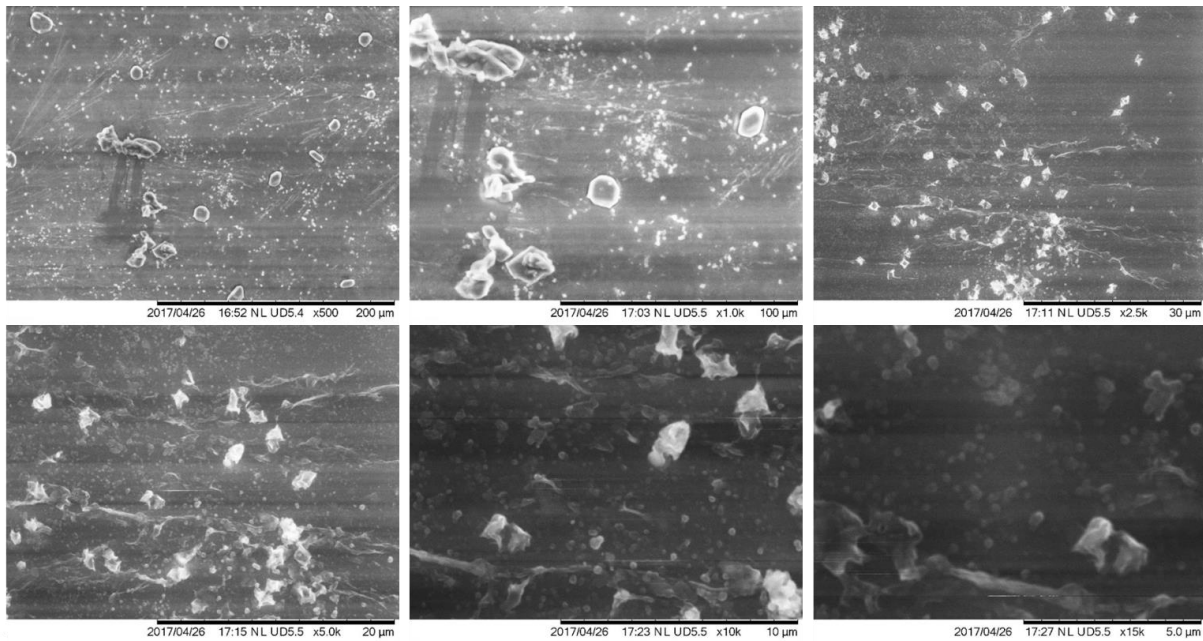


Figura 22. Micrografías de SEM de las Nseeds.

### 6.3.2. Caracterización de NPAu y NPAu-BSA

En la Figura 23 se encuentra el espectro de UV-Vis de las NPAu obtenido y se puede observar un máximo de absorción cercano a 700 nm de longitud de onda. Esto también es congruente con el tamaño y con una superficie cubierta de espículas [2]. Así mismo, se observa que éste máximo se conserva cuando se forman los conjugados, lo que significa que se está conservando el tamaño y la forma, incluso con los cambios que presenta la curva a lo largo del barrido, estos cambios están relacionados con la estabilidad del plasmón, de forma parecida a lo que ocurre en la técnica de SPR pues el desplazamiento se da por la presencia de una capa adsorbida sobre el metal [35].

En esa misma figura, se observa que el color de las nanopartículas cambia al hacerle alguna modificación; de izquierda a derecha se pueden ver las nanoseeds, las NPAu y las NPAu-BSA. Aun cuando la concentración de BSA utilizada para la modificación de las NPAu es del orden micromolar, es lo suficiente para que cambie su índice de refracción y por consecuencia. la coloración.

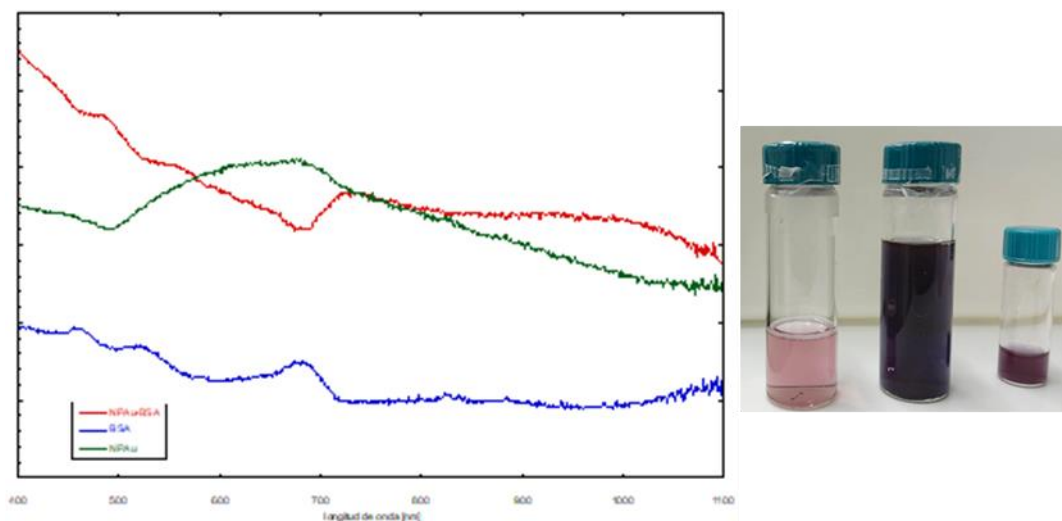
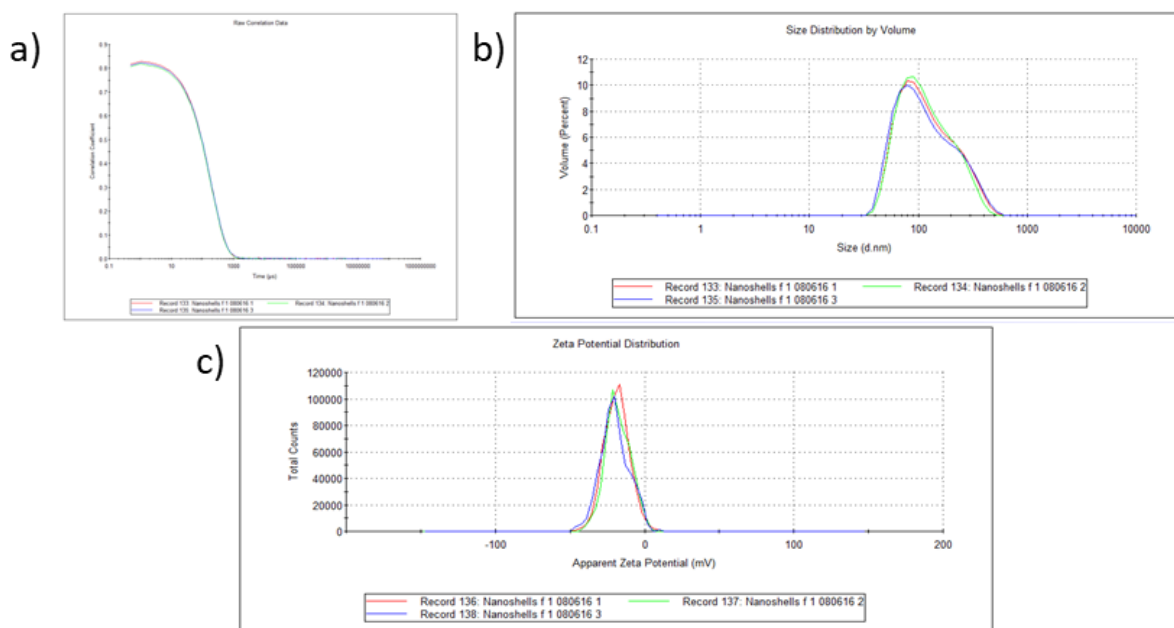


Figura 23. Espectro UV-Vis de las NPAu (verde), los conjugados (rojo) y la proteína (azul).

En la

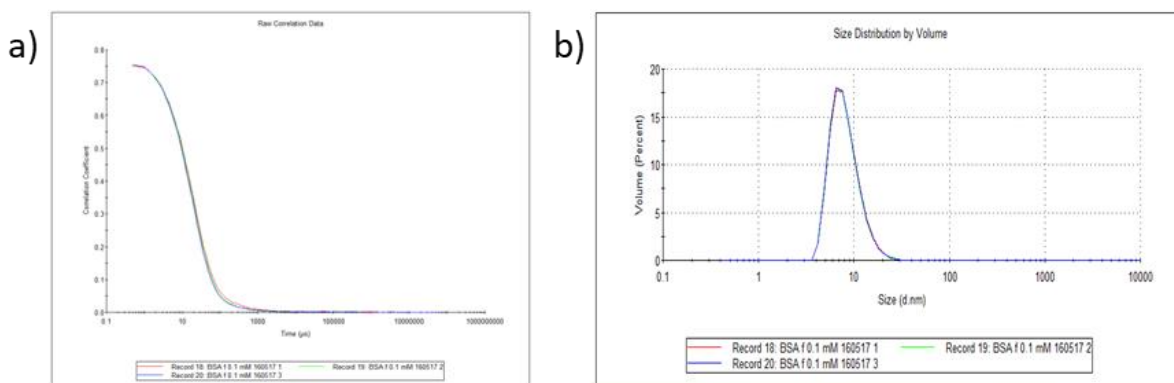
Figura 24, se presentan en a) los correlogramas, b) las curvas de distribución de tamaño por volumen y c) las curvas de potencial zeta para NPAu (cada curva representa una medición del equipo en la misma muestra y muestras diferentes a diferentes tiempos fueron similares). En los correlogramas se observa que la muestra se acopla al modelo matemático utilizado por el equipo para el análisis de las mediciones considerando un movimiento browniano clásico y, por lo tanto, es posible considerar una conversión de los valores de distribución de intensidad a distribución en volumen. El tamaño promedio observado fue de 125 nm con una polidispersidad de 0.239 y un máximo en la distribución de 139 nm. Sin embargo, es importante hacer notar que también se presentan valores de tamaño de entre 200 y 500 nm. Su potencial zeta fue de -18.8 mV y su conductividad de 0.096 mS cm<sup>-1</sup>.



*Figura 24. Información de DLS de las NPAu. a) correlograma b) curva de distribución de tamaño por volumen y c) curva de distribución de potencial zeta.*

Como control, de igual forma se caracterizó a la proteína BSA previo a la formación de los conjugados con las NPAu. Como se observa en la

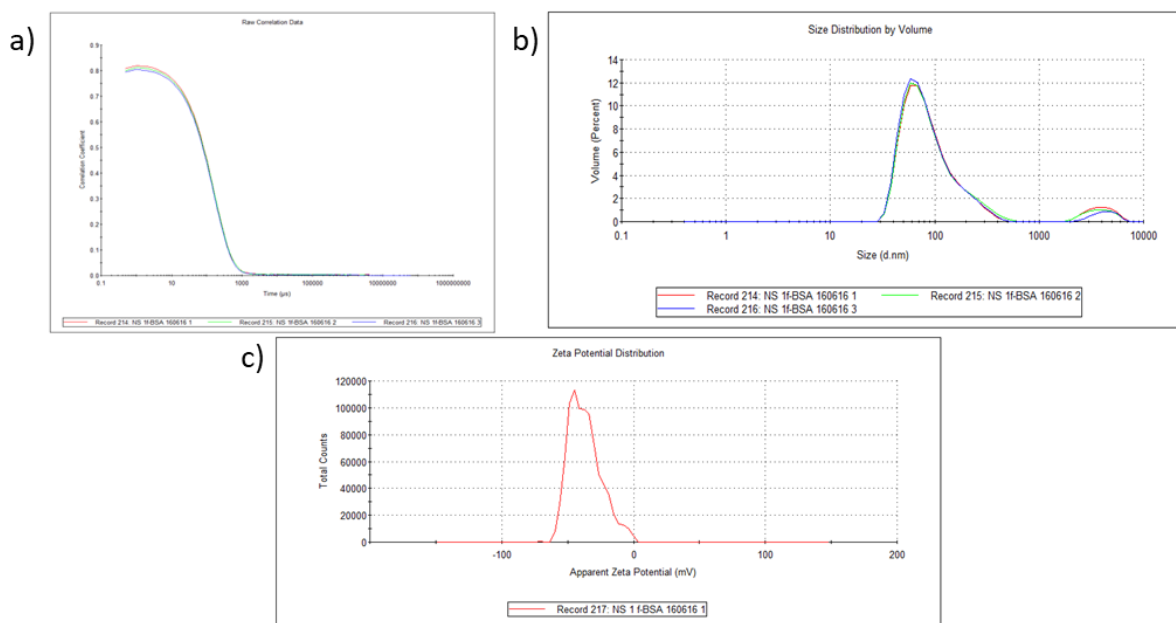
Figura 25, su máximo de tamaño fue de 8.3 nm, su potencial zeta de -10 mV y su conductividad de 15.9 mS cm<sup>-1</sup>; todo esto es concordante con lo reportado previamente [28].



*Figura 25. a) correlograma y b) distribución de tamaño de la proteína BSA.*

Finalmente, se observó que los conjugados NPAu-BSA mantienen un tamaño similar a las NPAu antes de su modificación, sin embargo, posterior a las 48 horas el cambio notable se presenta en los cambios de potencial zeta, este cambio fue de -18.8 mV a -36.9 mV (ver Figura 26).

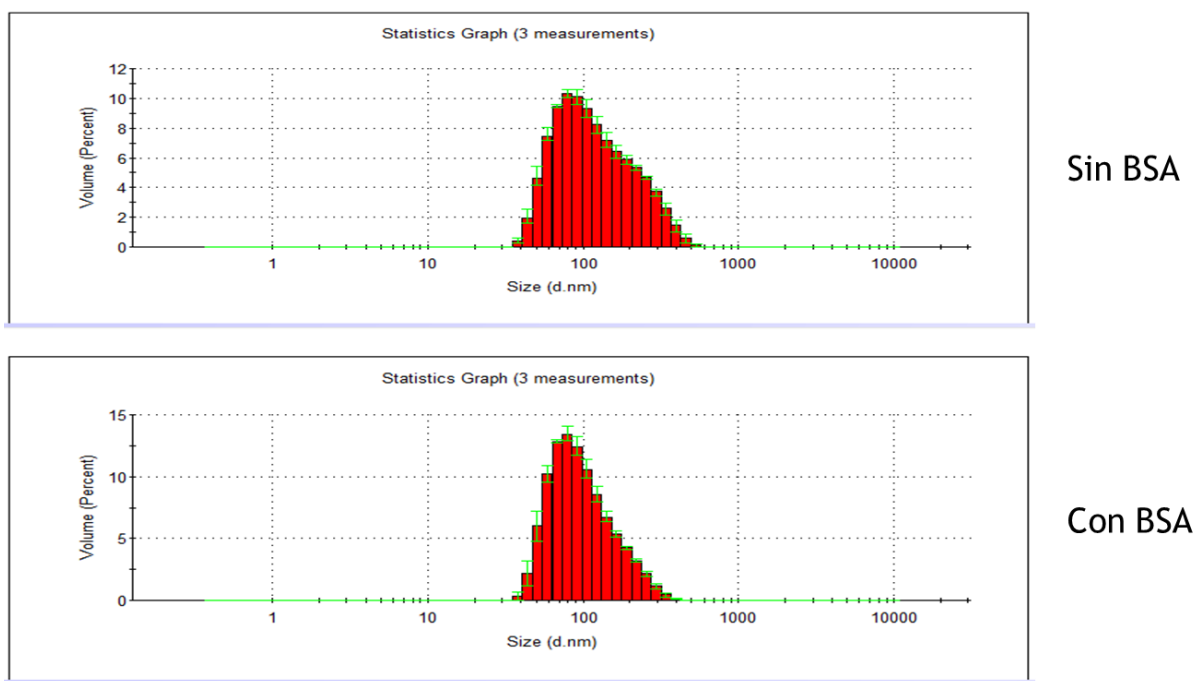
El proceso de conjugación fue evaluado midiendo la solución en donde se formaban los complejos a distintos tiempos; durante estas mediciones se lograban diferenciar 3 poblaciones, siendo aproximadamente el 70 % en  $t_0$  el valor de potencial de las NPAu solas y el restante, a -10 mV, el potencial de la BSA sola. Al transcurso del tiempo se observa la disminución de estas diferencias hasta que se obtuvo una medición con una sola población al finalizar las 48 horas. Otros parámetros que se modificaron fueron los índices de refracción, que para las NPAu fue de 1.33278 y para los conjugados de 1.33310 y la conductividad  $0.096 \text{ mS cm}^{-1}$  a  $5.1 \text{ mS cm}^{-1}$ .



*Figura 26. Información de DLS de los conjugados de NPAu y BSA. a) correlograma, b) curva de distribución de tamaño por volumen y c) curva de distribución de potencial zeta.*

Si comparamos las distribuciones de tamaño antes y después de la interacción con la proteína BSA (ver Figura 27), se puede ver que todos los segmentos después del máximo se ven reducidos, esto puede ser resultado de que la BSA no sólo sirve como modificador superficial, sino también permite la mejor dispersión de las NPAu en el medio, ayudando así a romper los dímeros o agregados que se hayan formado.





*Figura 27. Comparación entre las distribuciones de NPAu y NPAu-BSA.*

En la Figura 28 se presentan los espectros FTIR de las NPAu, donde también se puede identificar los cambios superficiales que presentan estas al momento de ser modificadas con la proteína BSA. En el espectro de las NPAu (azul) se logran ver bandas correspondientes a los grupos presentes en el PGLA, como los CO y los CH<sub>3</sub> en 2900 y 1000 cm<sup>-1</sup> respectivamente, por lo que se puede afirmar que no todas las NPAu están completamente recubiertas de oro. Así mismo las bandas en 1573 y 1423 cm<sup>-1</sup> que se encontraron en las Nseeds por los grupos del citrato [29], se ven reducidas, pero no son completamente eliminadas por lo que debe de haber oro coloidal estructurado y recubierto en la superficie. Para la BSA (verde) se pueden observar bandas características de los aminoácidos como son los de estiramiento de N-H en 3600 cm<sup>-1</sup>, -OH en 3400 cm<sup>-1</sup> y C-N cerca de los 1600 cm<sup>-1</sup>.

Finalmente, en el espectro de los conjugados (rojo) se puede ver aun la presencia de las bandas a 1573 y 1423 cm<sup>-1</sup> pero también se encuentran sobrepuestas las bandas de los grupos funcionales de los aminoácidos, así como el sobre tono de los grupos aromáticos. Los grupos N-H están apantallados, esto podría ser por la interacción de las aminas con la superficie de oro, que es un

punto de interacción conocido entre estos para la formación de enlaces [34] como es el caso de la polietilenimida (PEI).

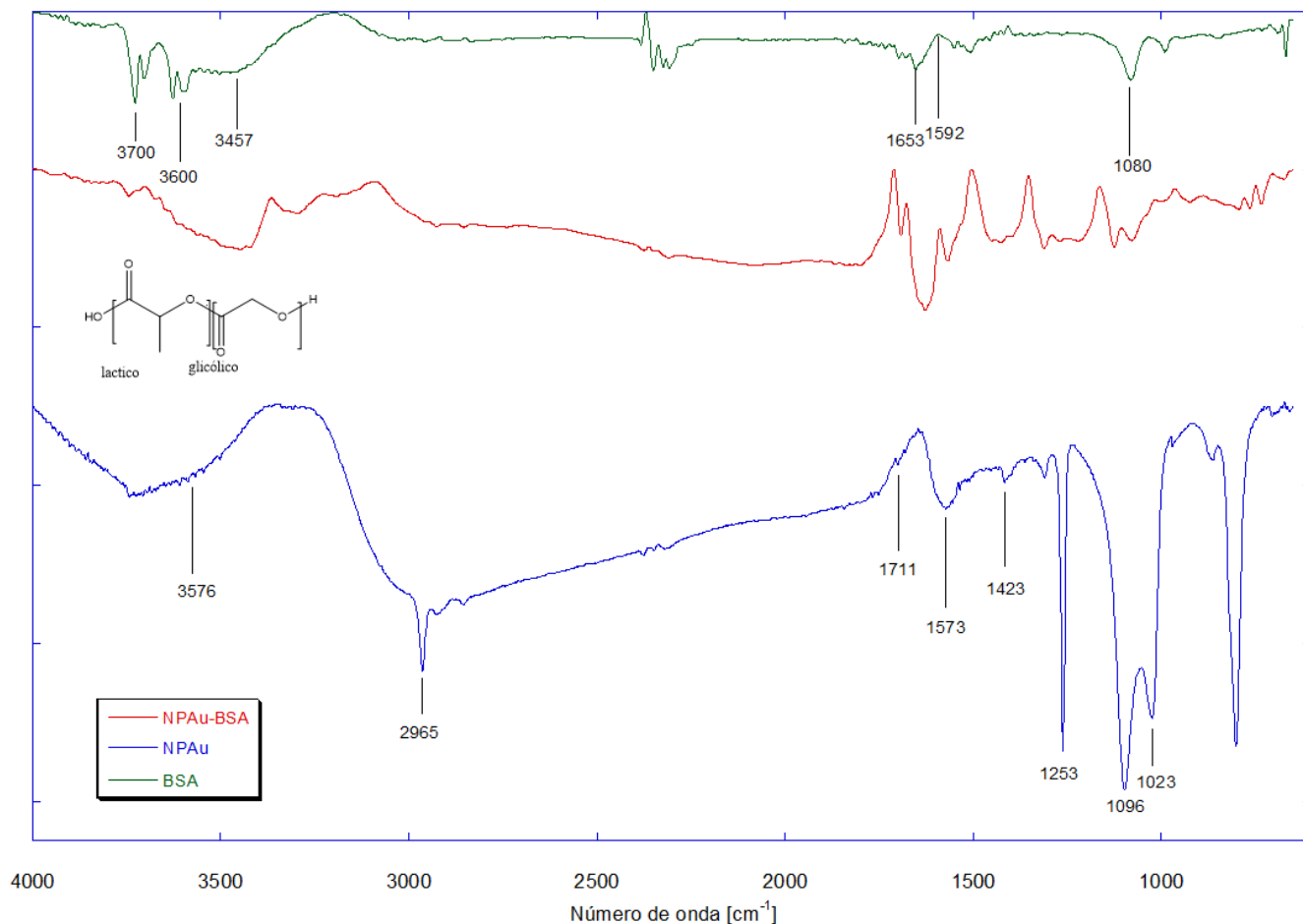
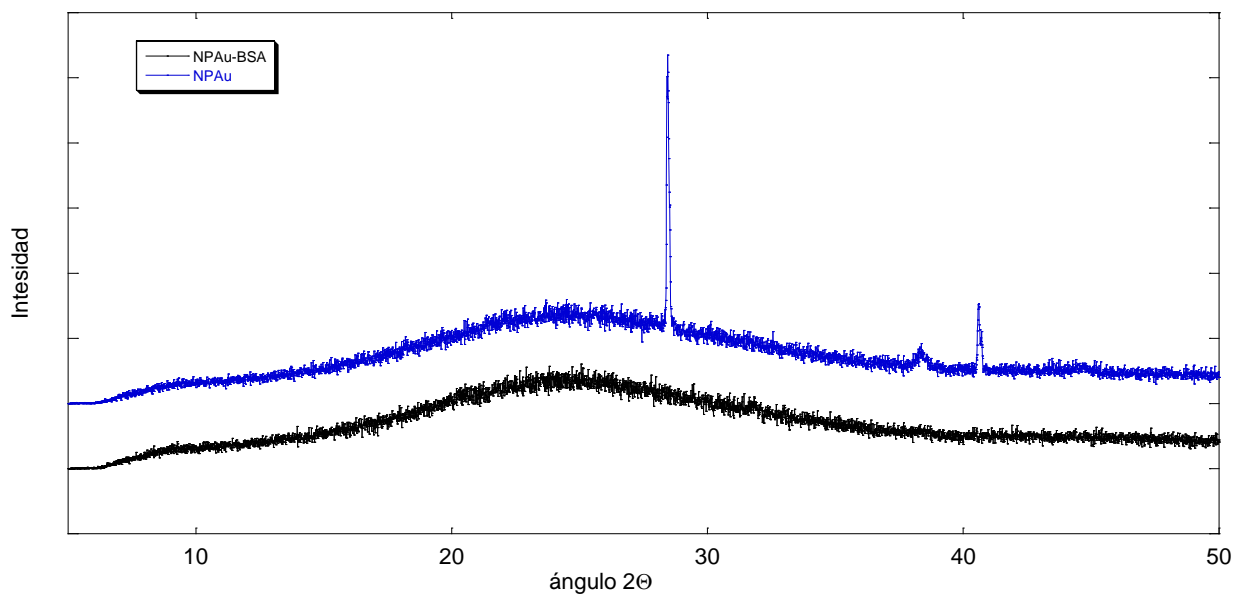


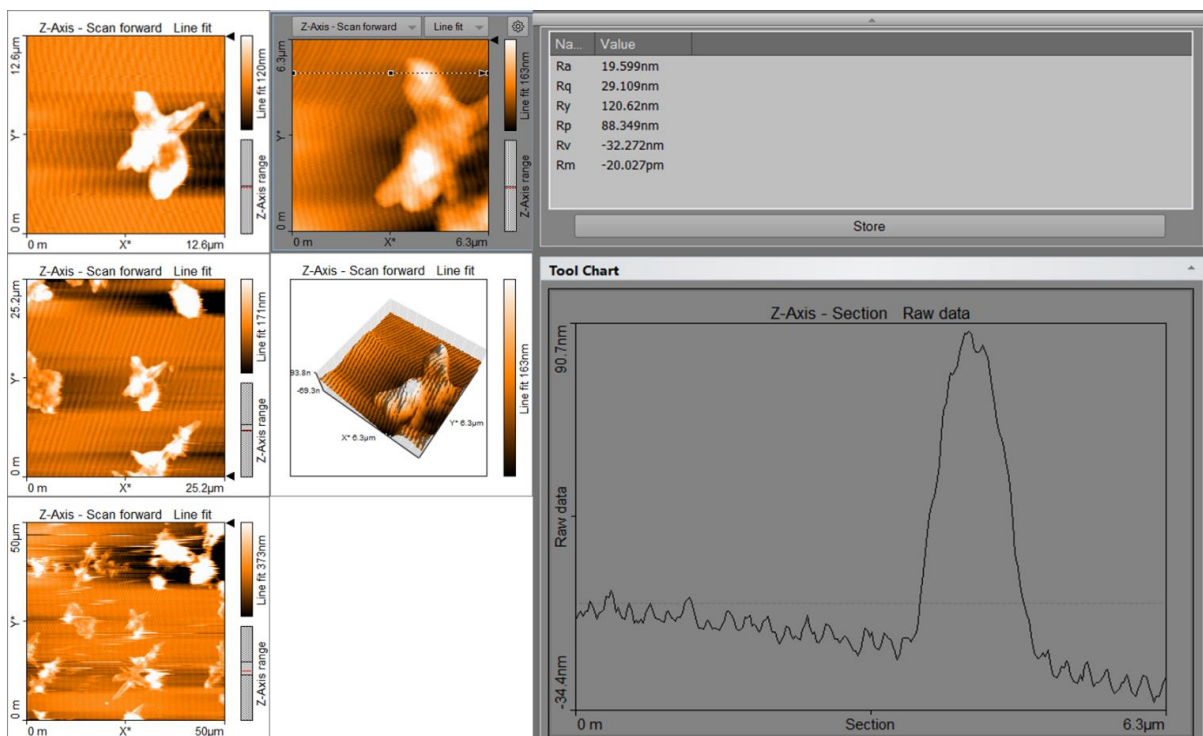
Figura 28. FTIR de las NPAu (azul), NPAu-BSA (rojo) y BSA (verde).

En la Figura 29 se presentan los difractogramas de las NPAu y NPAu-BSA. Éste va de los 5 a 50 ° en el ángulo  $2\theta$ , se ven los picos en 27, 38 y 41 ° para las NPAu, además del pico ancho en 20 ° que corresponde al  $\text{SiO}_2$  [35]. Los picos en 38 ° o 41 ° deben de corresponder al plano (111), estos representan el plano de mayor densidad del oro estructurado, pues su celda unitaria es una cubica centrada en la cara; siendo pico más estructurado a buscar; el cual se pierde en los conjugados. La ausencia de los picos presentes en las Nseeds con respecto a las NPAu puede ser por el mayor número de acomodos estructurales dado por las espículas superficiales.



*Figura 29. Diffractogramas de las NPAu (azul) y NPAu-BSA (negro).*

En la observación morfológica, se compararon las imágenes de microscopía obtenidas en AFM y SEM. Al evaluar la rugosidad de las microscopias que se muestran en la Figura 30 de las NPAu, se puede ver que en el pico se tiene una altura de 88 nm, correspondiente a la población medida en el DLS pues el  $R_y$  es de 120 nm siendo un valor muy cercano al promedio encontrado.



*Figura 30. Imágenes de AFM de las NPAu donde se puede ver que la rugosidad concuerda con lo medido en DLS.*

Es interesante mencionar que estos sistemas al ser depositados parecen organizarse de forma similar a un dendrímero o fractal, y esto se ve mucho más claro en otras imágenes donde la concentración es mayor, como se observa en la Figura 31. Esto fue también observado en las imágenes de SEM que se muestran también en la Figura 31 en donde se ve un tipo de formación de agregados similar al que fue encontrado por Dvir *et al.* [35] pero con nanorods sobre una matriz de alginato. Este grupo no da una explicación a este fenómeno, pero puede ser consecuencia tanto del proceso de secado, como de la formación de agregados en solución o cristalización en la superficie.

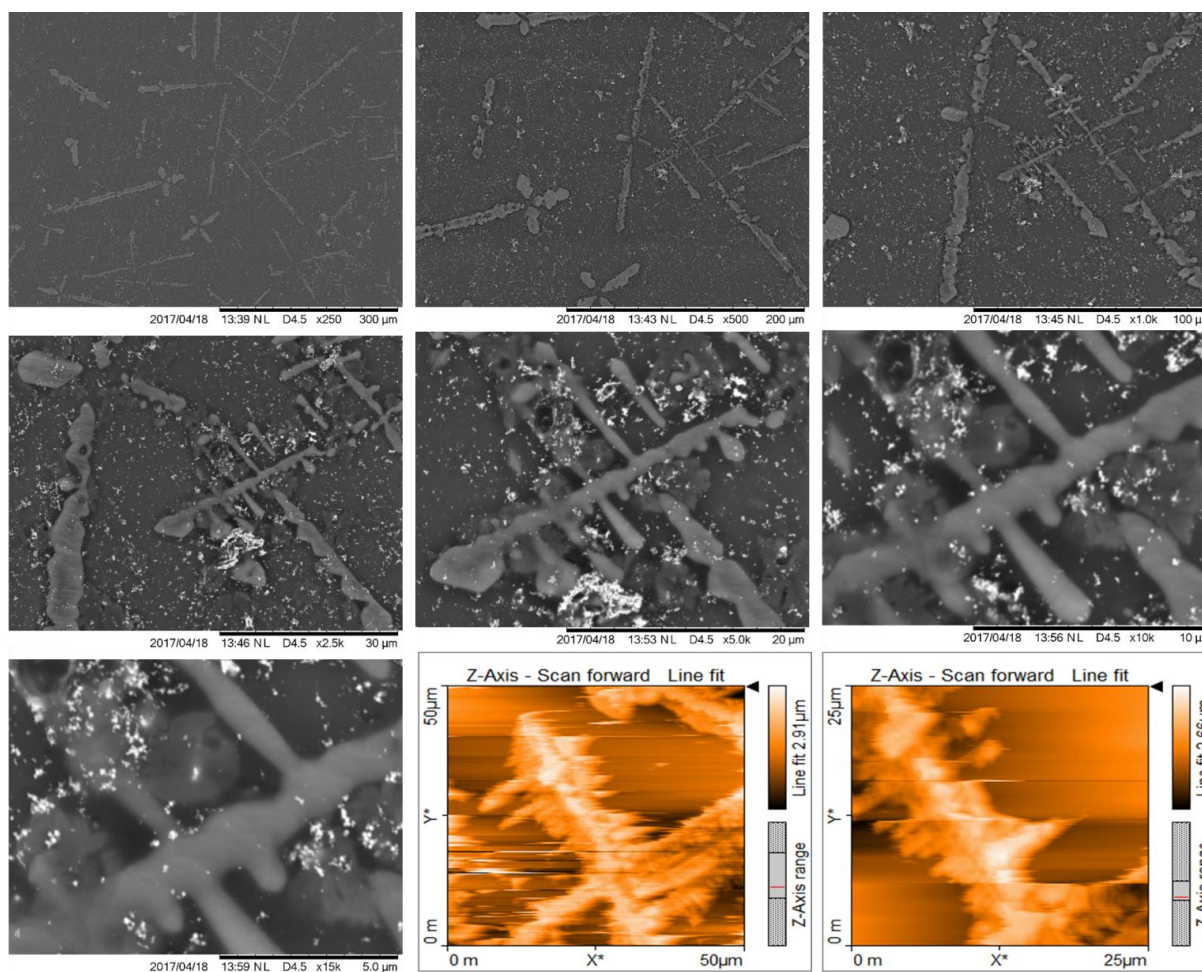
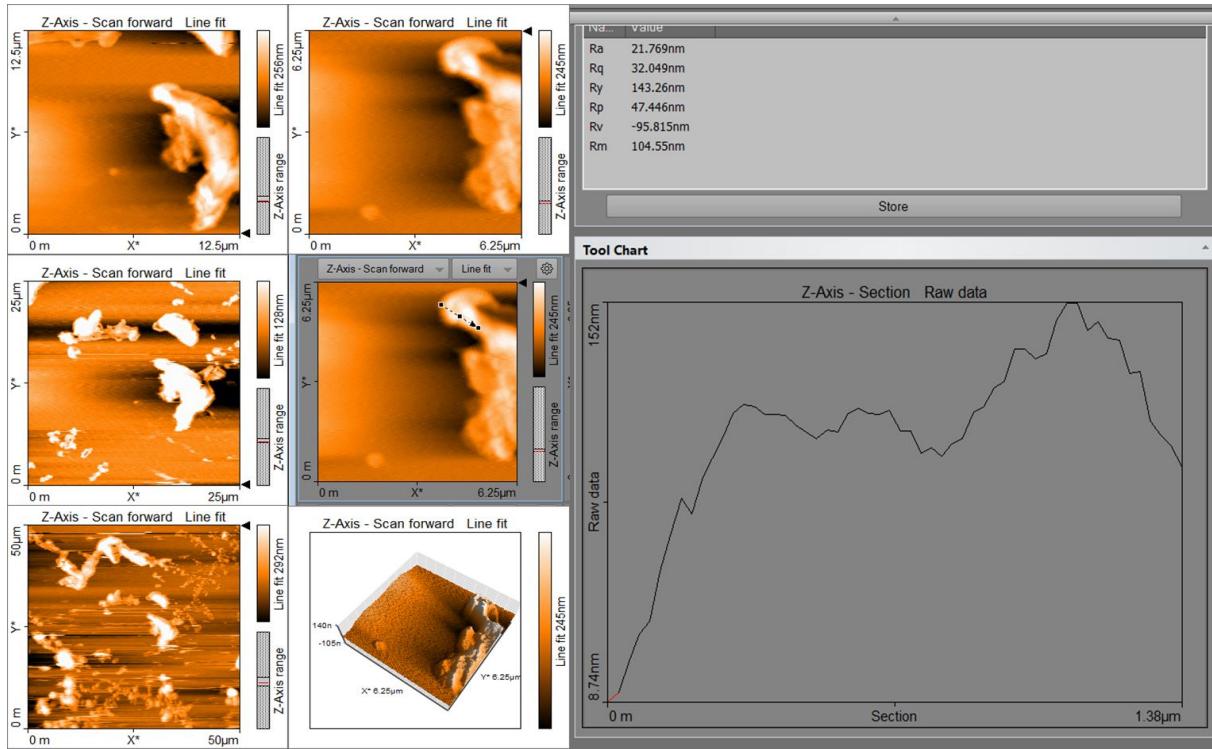
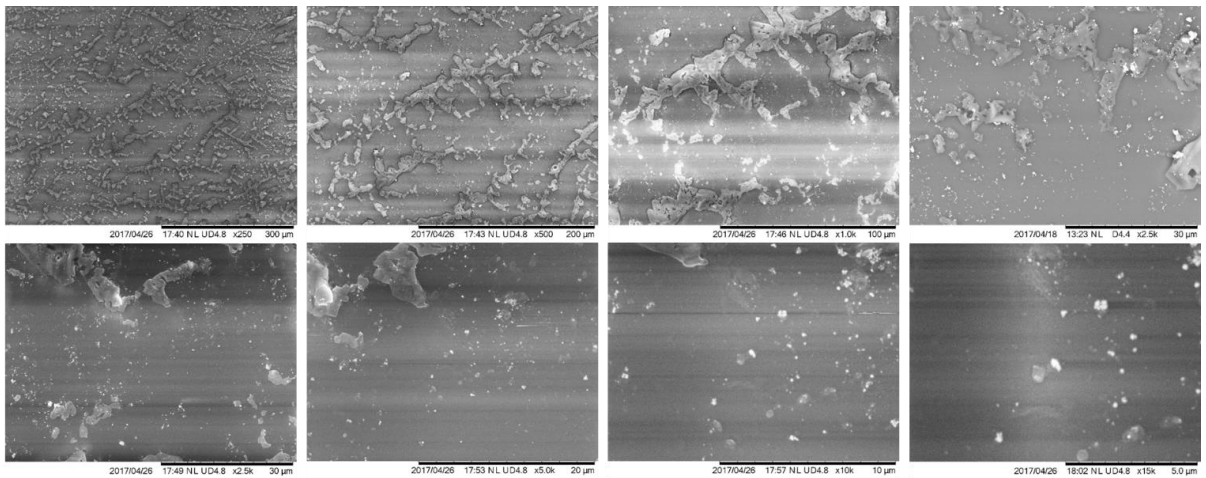


Figura 31. Micrografías SEM e imágenes AFM de las NPAu.

En las imágenes de AFM y SEM de los conjugados NPAu-BSA presentadas en la Figura 32 y Figura 33 respectivamente, se distinguen las diferencias entre las NPAu y los conjugados, éstos últimos el tener proteína en la superficie genera que se encuentren más dispersas sobre la superficie del cubreobjetos y no presentan estructuras tan complejas como con las NPAu, esto puede deberse a su mayor potencial zeta y la estabilidad superficial que le da la conjugación con la proteína. Así mismo, la rugosidad de la superficie se muestra congruente con las mediciones de DLS, pues el  $R_y$  es de 143 nm, valor cercano al máximo en la distribución de tamaños.



*Figura 32. Imágenes de AFM de los conjugados NPAu-BSA.*



*Figura 33. Micrografías de SEM de las NPAu-BSA.*

## 6.4. Conclusiones y Perspectivas

La síntesis de las Nseeds genera las nanopartículas esperadas con diámetro de 9 nm aproximadamente; esto confirmado por microscopías de fuerza atómica (Figura 21) y electrónica de barrido (Figura 22), así como técnicas espectroscopias y espectrofotométricas: de infrarrojo por transformada de Fourier (Figura 20), dispersión dinámica de luz (Figura 19), ultravioleta-visible (Figura 17).

La metodología propuesta para la síntesis de los sistemas de núcleo de PGLA-quitosano y coraza de oro denominados NPAu fue exitosa, en cuanto al efecto del plasmón (Figura 23), tamaño (Figura 24) y morfología (Figura 30 y Figura 31); sin embargo, en FTIR (Figura 28) se observó que no hay un recubrimiento completo de todos los elementos por lo que hay que adaptar la concentración de los reactivos para optimizar el proceso. Principalmente tratar de controlar la concentración de ácido que se añade, controlando mejor la temperatura para que crezcan las corazas de una forma lenta y completa.

La conjugación de los sistemas NPAu con la proteína BSA se da después de 48 horas de interacción, esta modificación superficial le provee de mayor estabilidad coloidal y disminuye la campana de distribución de tamaño (Figura 27), además de un cambio en su índice de refracción de 1.33278 a 1.3331 y en su conductividad de  $0.096 \text{ mS cm}^{-1}$  a  $5.1 \text{ mS cm}^{-1}$ . El cambio de estabilidad fue medido con DLS (Figura 26), AFM (Figura 32), SEM (Figura 33), FTIR (Figura 28) y DRX (Figura 29).

Finalmente, las NPAu al secarse en superficies a altas concentraciones adquieren una estructuración en forma dendrímica y que fue observada en las distintas microscopías (Figura 31). Sin embargo, esto deja de suceder al modificarse con BSA (Figura 32 y Figura 33).

Será de interés la modificación de los sistemas NPAu con diferentes moléculas bioactivas que permitan un uso funcional, como podrían ser factores de crecimiento o siRNA, así como anticuerpos para uso como terapia dirigida.

Además de la integración de fármacos al núcleo de PGLA para su distribución por acción fototérmica, ya que el plasmón se encuentra en la ventana biológica del espectro electromagnético [11].



## 6.5 Bibliografía

1. Definition of a nanomaterial. (febrero 22, 2017). Enviromental. UE. Fecha de consulta 30 de junio de 2017 desde [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.html)
2. Poole, C., Owens, F. (2007). Introduction to Nanotechnology. Reverté: España. Cap. 4,10 y 12. ISBN: 978-84-291-7971-2
3. Tarhini, M., Greige-Gerges, H., & Elaissari, A. (2017). Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International Journal of Pharmaceutics*.
4. Virilan, M. J. R., Miricescu, D., Radulescu, R., Sabliov, C. M., Totan, A., Calenic, B., & Greabu, M. (2016). Organic nanomaterials and their applications in the treatment of oral diseases. *Molecules*, 21(2), 207.
5. Gaffet, E. (2011). Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development. (Nanomateriaux: une revue des definitions, des applications, des effets sanitaires et des moyensa mettre en oeuvre pour un d\`eveloppement securise).
6. Shrivastava, V. S. (2010). Metallic and organic nanomaterials and their use in pollution control: a review. *Archives of Applied Science Research*, 2(6), 82-92.
7. Jana N. R., Gearheart L., Murphy C. J. (2001). Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *Journal of Physical Chemistry B*. 105:4065-7.
8. Roblero-Bartolón, G. V., & Ramón-Gallegos, E. (2015). Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamictherapy [PDT]) contra el cáncer. *Gaceta Médica de Mexico*, 151, 85-98.
9. Yang, F., Jin, C., Subedi, S., Lee, C. L., Wang, Q., Jiang, Y., ... & Fu, D. (2012). Emerging inorganic nanomaterials for pancreatic cancer diagnosis and treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 566-579.
10. Gold nanoparticle heating towards more efficient thermal cancer treatment. (2017). Lorenzo Stella. Fecha de consulta 7 de junio de 2017 desde <http://titus.phy.qub.ac.uk/opportunities/gold-nps-2017/>
11. Topete Camacho, A. (2013). Development of Hybrid Nanoplateforms for Theranostic Applications. Tesis de Doctorado. Departamento de Física de la Materia Condensada. Universidad de Santiago de Compostela. Capítulo 4
12. Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*, 3(1), 40-47.
13. Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K., & Franzen, S. (2005). Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, 21(20), 9303-9307.
14. Harrison, E., Coulter, J. A., & Dixon, D. (2016). Gold nanoparticle surface functionalization: mixed monolayer versus hetero bifunctional peg linker. *Nanomedicine*, 11(7), 851-865.
15. Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., & Lindman, B. (2002). Surfactants and polymers in aqueous solution (p. 544). New York: J. Wiley.
16. Bakare, R. A., Bhan, C., & Raghavan, D. (2013). Synthesis and characterization of collagen grafted poly (hydroxybutyrate–valerate)(PHBV) scaffold for loading of bovine serum albumin capped silver (Ag/BSA) nanoparticles in the potential use of tissue engineering application. *Biomacromolecules*, 15(1), 423-435.

17. Mandal, A., Meda, V., Zhang, W. J., Farhan, K. M., & Gnanamani, A. (2012). Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity of PEG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 191-196.
18. Encabo-Berzosa, M. M., Sancho-Albero, M., Crespo, A., Andreu, V., Sebastian, V., Irusta, S., Arruebo, M., Martín-Duque, P., & Santamaria, J. (2017). The effect of PEGylated Hollow Gold Nanoparticles on Stem Cell Migration. Potential Application in Tissue Regeneration. *Nanoscale*, 9, 9848-9858
19. Paciotti, G. F., Kingston, D. G., & Tamarkin, L. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research*, 67(1), 47-54.
20. Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293-346.
21. Guo, S., & Wang, E. (2007). Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 598(2), 181-192.
22. Cioran, A. M., Teixidor, F., Krpetić, Ž., Brust, M., & Viñas, C. (2014). Preparation and characterization of Au nanoparticles capped with mercaptocarboranyl clusters. *Dalton Transactions*, 43(13), 5054-5061.
23. Meyers, J. D., Cheng, Y., Broome, A. M., Agnes, R. S., Schluchter, M. D., Margevicius, S., Wang, X., Kenney, M. E., Burda, C., & Basilion, J. P. (2015). Peptide - Targeted Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Brain Cancer. *Particle & Particle Systems Characterization*, 32(4), 448-457.
24. Pallipurath, A., Nicoletti, O., Skelton, J. M., Mahajan, S., Midgley, P. A., & Elliott, S. R. (2014). Surfactant-free coating of thiols on gold nanoparticles using sonochemistry: A study of competing processes. *Ultrasonics sono chemistry*, 21(5), 1886-1892.
25. Isaac, R. S., Sakthivel, G., & Murthy, C. (2013). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Averrhoa bilimbi fruit extract. *Journal of Nanotechnology*, 2013.
26. Lenaghan, S. C., Burris, J. N., Chourey, K., Huang, Y., Xia, L., Lady, B., Sharma R, Pan, C., LeJeune, Z., Foister, S., Hettich, R. L., Stewart Jr, C. N. & Hettich, R. L. (2013). Isolation and chemical analysis of nanoparticles from English ivy (*Hedera helix* L.). *Journal of The Royal Society Interface*, 10(87), 20130392.
27. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 23(3), 217.
28. Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372-382.
29. Shabestarian, H., Homayouni-Tabrizi, M., Soltani, M., Namvar, F., Azizi, S., Mohamad, R., & Shabestarian, H. (2016). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Their Antioxidant Activity. *Materials Research*, [Enviado]

30. Berlmares, S., Torres, E., Coparán, J., Arriaga, J., & Elizondo, N. (2013). Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y hierro por el método de físicoquímica verde. *Foro de divulgación Científica y tecnológica*. México.
31. Bessonov, A. A., Morozova, N. B., Gelfond, N. V., Semyannikov, P. P., Trubin, S. V., Shevtsov, Y. V., Shubin, Yu. V., & Igumenov, I. K. (2007). Dimethylgold (III) carboxylates as new precursors for gold CVD. *Surface and Coatings Technology*, 201(22), 9099-9103.
32. Aldana-González, J., Palomar-Pardavé, M., Corona-Avendaño, S., De Oca, M. M., Ramírez-Silva, M. T., & Romero-Romo, M. (2013). Gold nanoparticles modified-ITO electrode for the selective electrochemical quantification of dopamine in the presence of uric and ascorbic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 706, 69-75.
33. Montero, M. A., Gennero de Chialvo, María R., & Chialvo, A. C. (2009). Preparation of gold nanoparticles supported on glassy carbon by direct spray pyrolysis. *Journal of Materials Chemistry*, 19(20), 3276.
34. Sullivan, M. O., Green, J. J., & Przybycien, T. M. (2003). Development of a novel gene delivery scaffold utilizing colloidal gold-polyethylenimine conjugates for DNA condensation. *Gene Therapy*, 10(22), 1882-1890.
35. Tebbe, M., Kuttner, C., Männel, M., Fery, A., & Chanana, M. (2015). Colloidally stable and surfactant-free protein-coated gold nanorods in biological media. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(10), 5984-5991.
36. Dvir, T., Timko, B. P., Brigham, M. D., Naik, S. R., Karajanagi, S. S., Levy, O., Jin, H., Parker, K. K., Langer, R., & Kohane, D. S. (2011). Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*, 6(11), 720-725

# 7. Interacción de hidrogeles y sistemas fotodinámicos

---

## 7.1. Antecedentes

Los hidrogeles son redes poliméricas que tienen la capacidad de retener una gran cantidad de líquidos, principalmente agua, como parte fundamental de su estructuración tridimensional. El uso de hidrogeles en las áreas médicas es de gran interés por su similitud con los sistemas naturales, así como debido a su alta capacidad de absorción y retención de líquidos misma que permite el desarrollo y supervivencia celular. Además, estas redes tridimensionales de polímeros presentan propiedades viscoelásticas y de biodegradabilidad que los hace materiales ideales para el desempeño en ingeniería de tejidos [1].

El uso de distintos polímeros para la formación de estos hidrogeles depende de las propiedades que se busca maximizar en éstos; en general, los polímeros naturales como los formados por sacáridos o proteínas tienen mejores propiedades de biocompatibilidad, degradación y susceptibilidad a modificaciones superficiales para generar especificidad en las interacciones, ya sea con células o para la distribución y liberación controlada de fármacos; mientras que los polímeros sintéticos permiten un mejor control sobre las propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas u otras propiedades que propicien funciones como la memoria de forma, el autoensamble y la transferencia de masa controlada. Es por esto que la mayoría de aplicaciones desarrolladas actualmente propone la combinación de polímeros tanto naturales como sintéticos [1-6].

Particularmente en ingeniería de tejidos, se han tomado dos aproximaciones principales con los hidrogeles (ver Figura 34), la primera consiste en la formación externa del hidrogel con las propiedades necesarias para el crecimiento y diferenciación *ex vivo* de las células, para ser posteriormente reimplantado en el sujeto del cual provienen las células. En la segunda propuesta, se mezclan los precursores con las células y son reintroducidas al paciente mediante inyecciones, para su polimerización en condiciones fisiológicas y así cumpla su función de regeneración de tejido y recuperación de función en el sitio específico [1].

Ambas aproximaciones presentan sus ventajas y contratiempos, sin embargo, la aproximación *ex vivo* de la formación de una estructura tridimensional (también llamados andamio) de hidrogel, permite un mejor control en la morfología y propiedades por la gran cantidad de técnicas que existen para su generación; algunas de estas son el electrohilado, las impresiones en 3D dirigidas por diseño computacional, extracción y unión de fibras, liofilizado, generación por lixiviado y la formación de aerogeles mediante espumas [7-11].

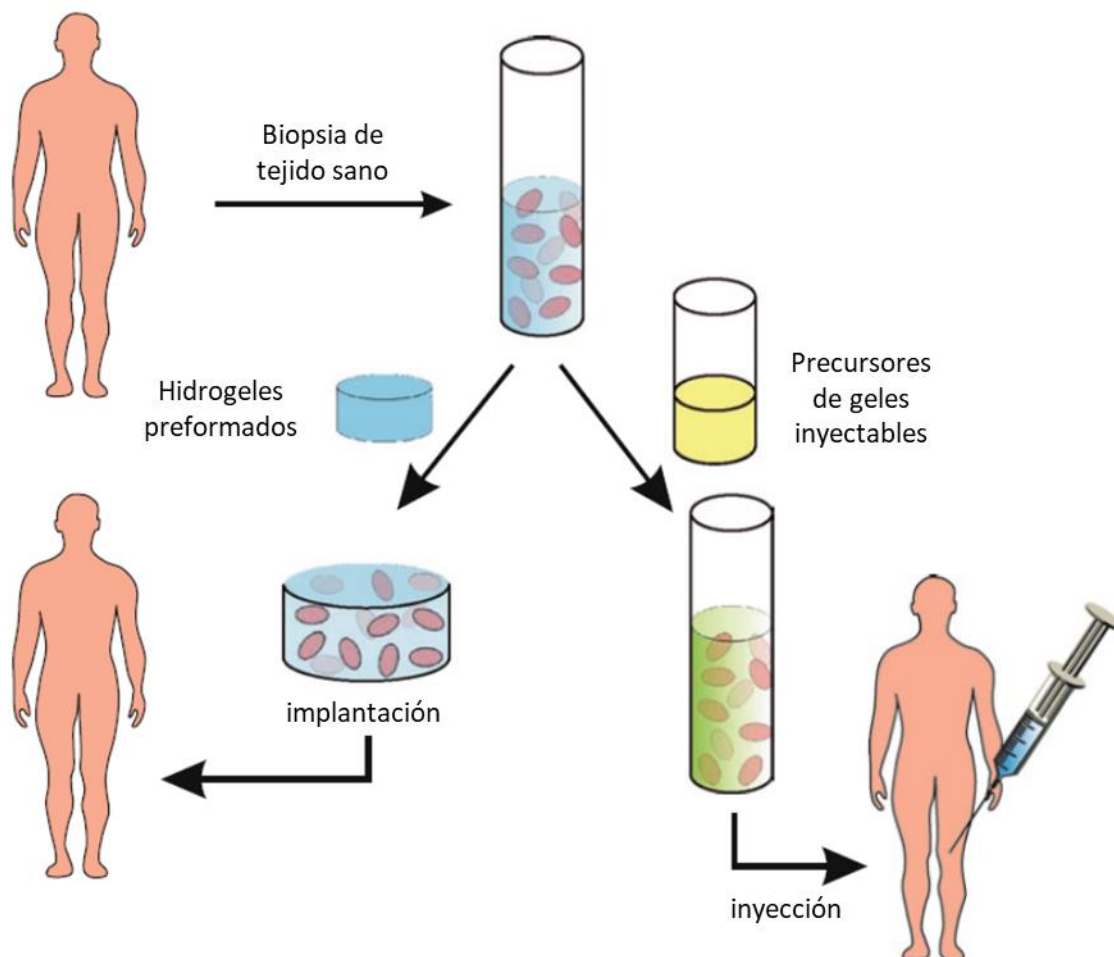
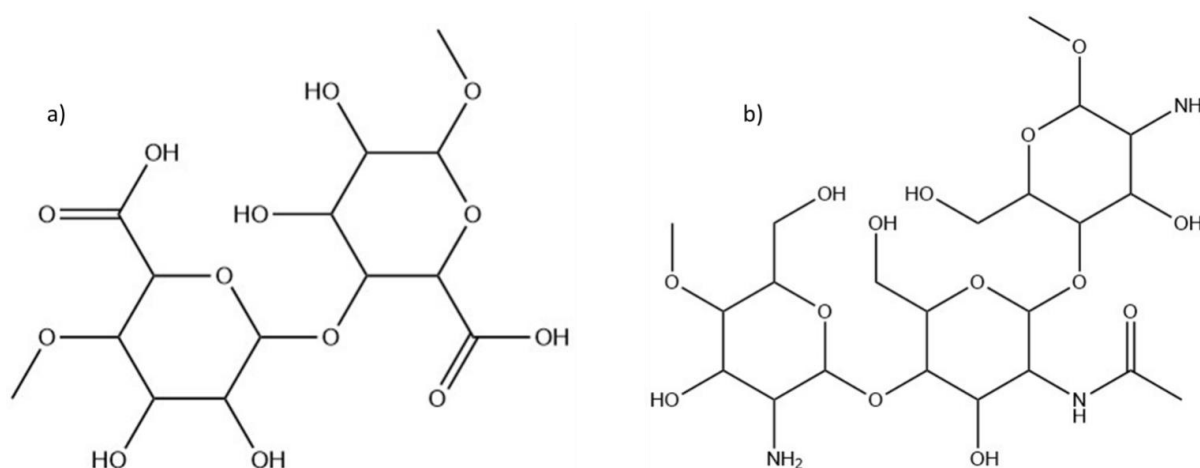


Figura 34. Propuestas del uso de hidrogel para la ingeniería de tejidos, en una se genera un andamio en el que se crecen las células y se reimplanta al sujeto; mientras que en el otro se inyectan los precursores mezclados con las células y se forma dentro del paciente el hidrogel. Adaptada de Peppas [1].

Dentro de las macro moléculas más utilizadas para la generación de andamios se encuentran los polisacáridos, y dentro de estos, el alginato y quitosano. El alginato ha sido ampliamente utilizado por su probada biocompatibilidad al ser un compuesto comunmente usado como emulsificante en alimentos, además de ser abundante en la naturaleza, por lo que es de bajo costo. Otras características que hacen del alginato un polisacárido propicio para la construcción de andamios son: su fácil entrecruzamiento con  $\text{Ca}^{+2}$ , su capacidad de encapsulamiento y la homogeneidad de los hidrogeles obtenidos a partir de él, tanto en porosidad como en propiedades mecánicas, pues se logran tener módulos de compresibilidad cercanos a 800 kPa y de estiramiento de 500 kPa [12-17].

Estructuralmente el alginato está formado por bloques repetidos de los ácidos *D*-manurónico y *L*-gulurónico, unidos por enlaces (1-4)  $\beta$  y  $\alpha$  respectivamente; estos se acomodan en bloques GGG, MMM y MGM, lo que hace que tengan interacciones distintas, siendo el GGG el que se ha demostrado estar relacionado con el entrecruzamiento y con la menor respuesta inmune [18, 19]. En la Figura 35a se muestran los azúcares que lo conforman, como se observa, los grupos funcionales presentes son carboxilos e hidroxilos. Su peso molecular promedio es de entre 32 y 400 kDa y su *pka* está entre a 3 -3.5 [18].



*Figura 35. Estructura molecular de los polisacáridos, a) alginato b) quitosano.*

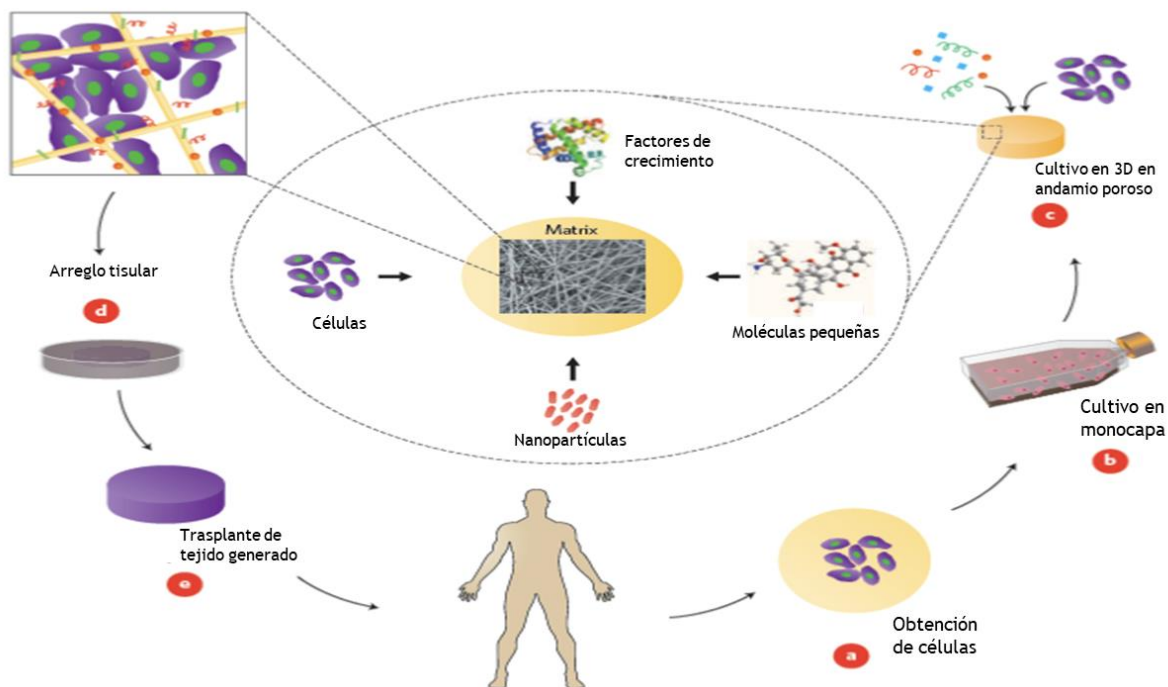
Por su parte, el quitosano, de igual forma es fácilmente obtenible al desacetilar a la quitina, la cual es el segundo polímero más abundante en el planeta. Así mismo, es muy utilizado por su

alta afinidad por el agua, biocompatibilidad con células animales y propiedades antibacterianas, así como su capacidad de respuesta a cambios de pH, capacidad de modificación de grupos funcionales con química sencilla y su capacidad de modificar propiedades mecánicas al estar en mezcla con otros polímeros y factores de crecimiento celular [20-25].

En la Figura 35b se muestra la estructura molecular del quitosano, la cual está formada por unidades acetiladas y desacetiladas, intercaladas al azar de 2-deoxi-*D*-glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$  (1-4). Como se ve en esa misma imagen, presenta grupos amino primarios y acetilos en la superficie, lo que lo hace un buen polícatión con un  $pK_a$  aproximado de 6.5 [25]. El peso molecular del quitosano comercial denominado como medio es de entre 150-700 kDa [26].

La combinación de alginato y quitosano ha sido estudiada para la encapsulación tanto de células como de fármacos y proteínas, como la insulina. Esto es por la capacidad de encapsulación del alginato y la gran densidad de cargas superficiales del quitosano, lo que permite su respuesta a cambios de pH y la unión/liberación de los fármacos de forma controlada [24, 27-29].

Aun cuando estos polímeros son biocompatibles, la ingeniería de tejidos requiere de más elementos para conseguir un tejido funcional y especializado; en la Figura 36 se muestra el esquema general para la generación de un tejido obtenido mediante ingeniería de tejidos, en este se puede ver que aún cuando el andamio y las células son necesarias, existen otros elementos que se deben de añadir para la generación de un andamio que logre la correcta adhesión, crecimiento, proliferación, motilidad y diferenciación de las células [7, 10, 16].



*Figura 36. Esquema del proceso de ingeniería de tejidos, donde se ve los elementos con los que se pueden modificar los andamios para cultivos. Adaptada de Dvir et al [7].*

Dentro de los elementos utilizados para modificar los andamios y mejorar así sus propiedades tanto físicas como de especificidad, se encuentran las nanopartículas y las proteínas. De acuerdo con el tejido que se quiere sustituir se eligen los elementos que se deben de añadir para adquirir las propiedades necesarias; por ejemplo, las nanopartículas de titanio e hidroxiapatita son ampliamente utilizadas para tejido óseo, así como los nanotubos de carbono [30-35]. Mientras que, para el tejido cardíaco, el uso de nanopartículas de oro está siendo utilizado en andamios de alginato para mejorar sus propiedades mecánicas y ser puntos de modificación y unión de otros elementos [36, 37].

El entendimiento de los procesos de interacción de los polímeros y su hinchamiento [38-42], así como de los distintos nanomateriales con las superficies de estos, principalmente en su forma de hidrogeles [43-48], permite un mejor diseño de los andamios y el control de las características que se desean tener para igualar a las del tejido y cumplir su función.



En esta sección se presentan las mediciones que se hicieron de las interacciones entre los sistemas fotodinámicos (Nseeds, BSA, NPAu y NPAuBSA) y películas delgadas de los hidrogeles de alginato, quitosano y una mezcla 1:1 de ambos polímeros. Las mediciones realizadas en QCM-D para todos los sistemas, y mediante SPR, FTIR y DRX fueron estudiados los sistemas con NPAu y NPAu-BSA.

## 7.2. Metodología

### 7.2.1. Formación de las películas de hidrogeles

Puesto que ambos tipos de sensores, de QCM-D y SPR, están recubiertos con oro en la zona de medición, su modificación se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito a continuación.

### 7.2.2. Limpieza de las superficies

Las superficies fueron limpiadas con agua desionizada y etanol al 98 % mediante pissetas, repitiendo el proceso de 2 a 3 veces con cada solvente. Posteriormente, las superficies se secaron con nitrógeno y se colocaron en un limpiador de plasma, generado por inducción magnética, por 20 minutos.

#### **Para reuso de los sensores se siguió el siguiente procedimiento:**

Primero se preparó una solución piraña (5:1:1 de  $\text{NH}_3\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), añadiendo el hidróxido de amonio al agua y finalmente el peróxido de hidrógeno. Esta solución fue llevada a ebullición y se sumergieron los sensores por 10 minutos para ser enjuagados inmediatamente con agua desionizada. Finalmente, se repitió el proceso de limpieza descrito anteriormente, con el uso de chorros de agua y etanol, así como el plasma.

### 7.2.3. Modificación de las superficies de oro

Para mejorar la unión de los hidrogeles a las superficies, éstas se modificaron hidrofobizando con una monocapa autoensamblada de moléculas con tioles terminales.

Para realizar esto, se preparó una solución de hexadecanotiol 1 mM en etanol absoluto (10  $\mu$ L de tioles en 30 mL de etanol).

Los sensores salidos del plasma fueron sumergidos en un vaso de pesaje con la solución de tioles por 20 horas. Después de las 20 horas, los discos se sacaron y se enjuagaron con etanol absoluto para finalmente secarlos con nitrógeno.

#### 7.2.4. Generación de las soluciones de hidrogeles

Se hizo una solución acuosa de alginato al 0.5 % m/v, con pH final de 5.0. En el caso del quitosano se hizo una solución 0.5 % en 1 % v/v de ácido acético, su pH final fue de 3.2.

Para la mezcla, se usó una solución al 1% de alginato en NaOH 1 M a la que se le añadió una solución de quitosano 1 % m/v, 1 % v/v de ácido acético. Esta mezcla se dejó en agitación vigorosa toda la noche.

Todas las soluciones fueron filtradas con membranas de acetato de celulosa con ancho de malla promedio de 0.45  $\mu$ m.

#### 7.2.5. Deposición del hidrogel

Para la deposición de los hidrogeles, los sensores limpios y secos fueron colocados en la base para Spin coating. Una vez que se encontraba en el equipo, pero sin revolucionar, se depositaron 200  $\mu$ L de la solución filtrada sobre la superficie, procurando que no fuera en el centro del sensor para evitar la formación de un anillo sin recubrimiento o con mayor rugosidad en el centro.

Posterior a este depósito, se inicia el proceso de giro de la superficie. El programa de giro utilizado en el equipo se configuró a 2000 rpm, por 2 minutos, con una aceleración en proporción de 0.15. Después de un minuto de iniciado el programa y mientras giraba la base del Spin coating, se depositaron 100  $\mu$ L adicionales de solución con polímero (o de mezcla de polímeros), esto para recubrir los espacios que no hubiesen sido recubiertos en el primer depósito. Posterior a lo anterior, es necesario comprobar que se ha formado la película y para ello un cambio de opacidad

en el disco es un indicador de un depósito exitoso. Finalmente, las superficies se secaron con horno a 60 °C por una hora.

### 7.2.6. Cálculo de las concentraciones de los sistemas fotodinámicos

La concentración de las Nseeds, NPAu y NPAu-BSA se calculó utilizando la ecuación de Lambert-Beer. Para ello se necesita el coeficiente de extinción molar que se calculó con base a la siguiente ecuación [49]:

$$\varepsilon = \frac{Na*\sigma}{2303} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $Na$  es el número de Avogadro y  $\sigma$  es la sección eficaz en  $\text{cm}^2$  y 2303 es  $(\ln 10) \times 1000$

Para las Nseeds su  $\varepsilon$  es de  $7.66 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y para las NPAu es de  $4.18 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Dando una concentración de:

- $5.02 \times 10^{-10} \text{ mM}$  para las NPAu
- $3 \times 10^{-8} \text{ mM}$  para las Nseeds.

La concentración stock de la albumina de suero bovino (BSA) fue de  $2.5 \mu\text{M}$  en PBS por lo que, para los conjugados, considerando que los elementos que va a dictar la concentración serán los sistemas NPAu, entonces la concentración de las NPAu-BSA es de:

- $4.01 \times 10^{-10} \text{ mM}$

### 7.2.7. QCM-D

Los sensores con los hidrogeles fueron sumergidos en PBS la noche previa a su uso para su hidratación y lograr una estabilización en la línea base del equipo en un menor tiempo. Todas las isotermas de adsorción se hicieron a 25 °C con buffer de fosfatos salino (PBS) con pH 7.4 como medio.

Se fijó el flujo de inyección a 1 mL/min con una bomba peristáltica, 15 mL de analito fueron recirculados sobre la superficie para cada dilución utilizada. Las diluciones con las que se trabajó fueron 1:100, 1:50, 1:25 y 1:10 de la solución original de cada uno de los sistemas fotodinámicos.

El cálculo de la masa adsorbida sobre la superficie fue hecho con la ecuación de Sauerbrey (ecuación 1) para superficies rígidas (cuando el cambio de disipación es menor a  $5 \times 10^6$ ) [52, 53]. El armónico reportado en las gráficas es el tercero, elegido para concordar con lo reportado en los artículos de divulgación.

### 7.2.8. SPR

El flujo fue fijado con la bomba peristáltica propia del equipo en 10  $\mu$ L/min sin recirculación.

Para el cálculo del espesor de la película formada se utilizó la siguiente ecuación (Ecuación 7) [54]:

$$d = \frac{ld}{2} * \frac{\Delta\text{ángulo}}{m(n_a - n_o)} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde  $d$  es el espesor;  $l_d$  es la longitud de evanescencia del campo electromagnético (120 nm) y es estimado como 0.37 de la longitud de onda incidente;  $\Delta\text{ángulo}$  es el cambio de grados medidos en SPR;  $m$  es el factor de sensibilidad del sensor ( $109.94^\circ$ ),  $n_o$  es el índice de refracción de la solución, y  $n_a$  el índice de la especie adsorbida. El índice de refracción del PBS se consideró como  $n_{PBS} = 1.33411$  [55], y para las NPAu y NPAu-BSA se consideró de 1.33278 y 1.3331, respectivamente.

Las diluciones utilizadas para los experimentos con NPAu y NPAu-BSA fueron 1:5, 1:2 y 1:1; esto por la menor sensibilidad del equipo a los cambios en la superficie.

### 7.2.9. Caracterización

Los sensores modificados con los hidrogeles y con los sistemas fotodinámicos fueron evaluados morfológicamente mediante AFM y SEM; algunos hidrogeles fueron evaluados con FTIR y DRX para encontrar las principales diferencias estructurales.

Al salir del equipo de QCM-D y SPR y previo a la observación, las superficies fueron enjuagadas con chorros suaves de agua desionizada por unos cuantos segundos para eliminar las sales del PBS que quedaban sobre la superficie.

## 7.3. Resultados y discusión

### 7.3.1. Caracterización de las superficies de hidrogeles generadas

#### 7.3.1.1. Alginato

La solución de alginato fue translúcida y de viscosidad similar al agua, por lo que su uso para spin coating se simplificó, ya que al no presentar agregados su filtrado y manipulación con las micropipetas fue sencillo.

En la Figura 37 se presentan las imágenes de AFM del hidrogel de alginato sobre el sensor de oro para QCM. La rugosidad promedio de la superficie es de 0.9 pm por lo que se puede considerar homogénea; incluso cuando se ven puntos elevados que se observan iluminados en las imágenes con mayor amplificación, éstas no superan las unidades de nanómetros, por lo que no superan el orden molecular de los polímeros siendo menores que todos los sistemas con los que interactuarán los hidrogeles.

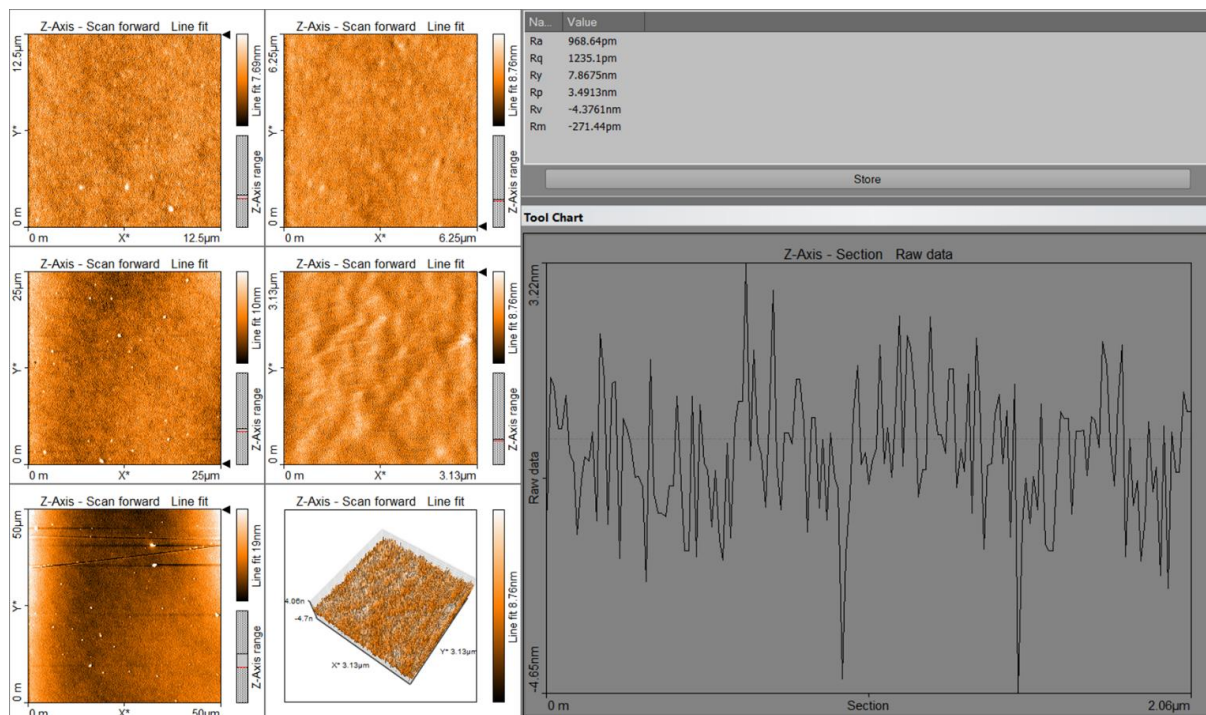
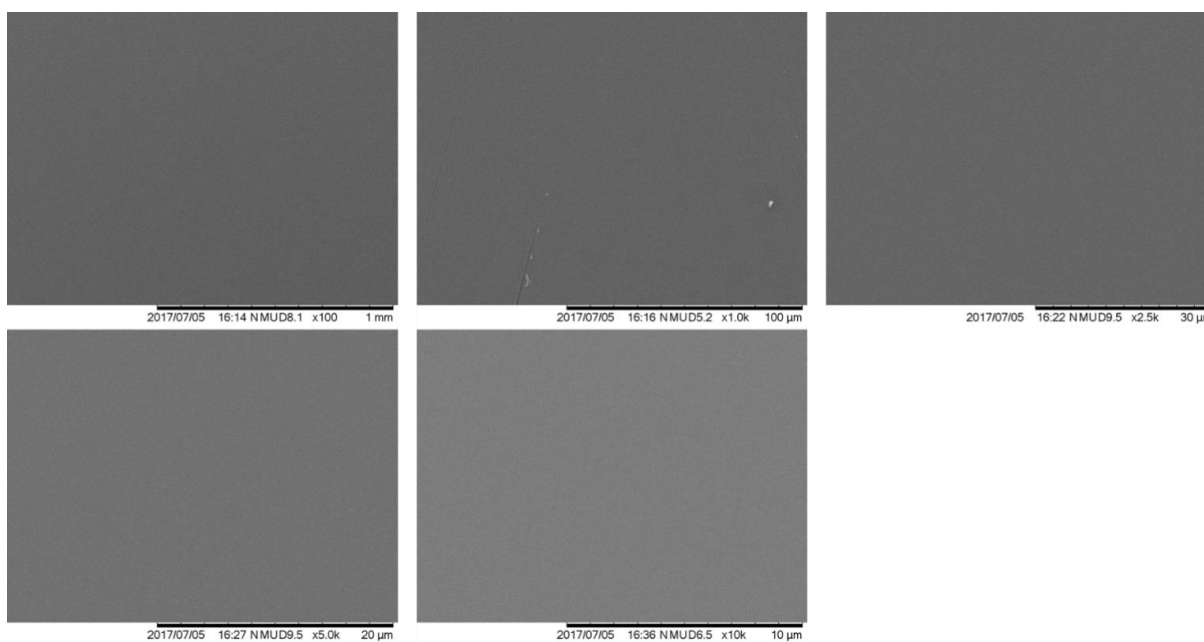


Figura 37. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato.

Al igual que en la figura anterior, en las micrografías electrónicas de barrido presentadas en la Figura 38, se ve una superficie homogénea que no presenta agregados o rugosidad notable, facilitando su comparación con las imágenes obtenidas después de su interacción con los sistemas fotodinámicos.

Si es comparada con las películas de los hidrogeles de quitosano y de la mezcla de quitosano-alginato que se presentan posteriormente en esta sección, se ve que la superficie con el hidrogel de alginato es el que presenta una menor rugosidad y tiene un aspecto más liso y homogéneo, esto puede deberse a la configuración más homogénea de las fibras del polímero en el hidrogel, y de las interacciones de éste sobre la superficie modificada con tioles.



*Figura 38. Micrografías de SEM del hidrogel de alginato.*

### 7.3.1.2. Quitosano

La solución de quitosano para generar las películas presentó una viscosidad mayor comparada con la de alginato o con la de la mezcla de los dos polímeros, a pesar de ello, no presentaba agregados observables a simple vista y era translúcida.

Las superficies modificadas con quitosano no presentaban agregados aparentes, pero presentó iridiscencia en algunas zonas de la película, lo que significa que existían zonas más ordenadas que otras. En la Figura 39 se pueden ver las distintas microscopías de fuerza atómica, los tres tipos de promedio de rugosidad ( $R_a$ ,  $R_q$  y  $R_m$ ) muestran una variación de picnómetros ( $1 \times 10^{12}$ ), lo que hace que esté en tres órdenes de magnitud menor que los sistemas que se están manejando actualmente, además de que la escala de magnitud de la variación permite que se puedan considerar como homogéneos.

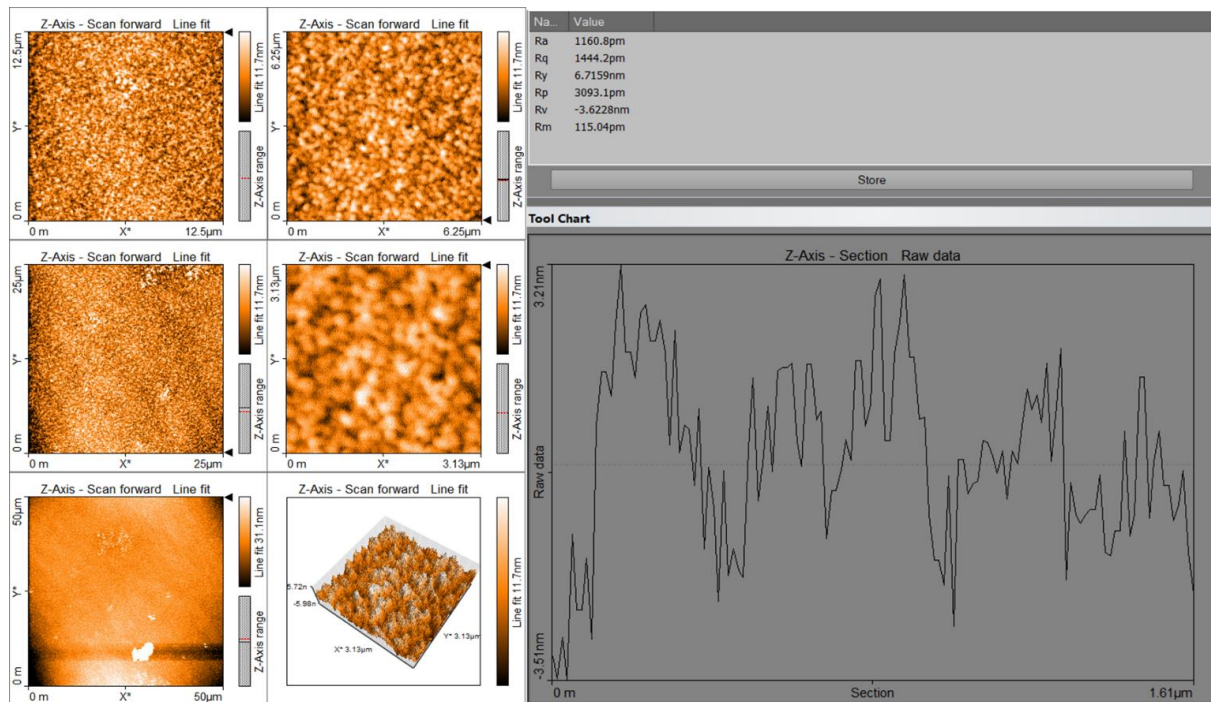
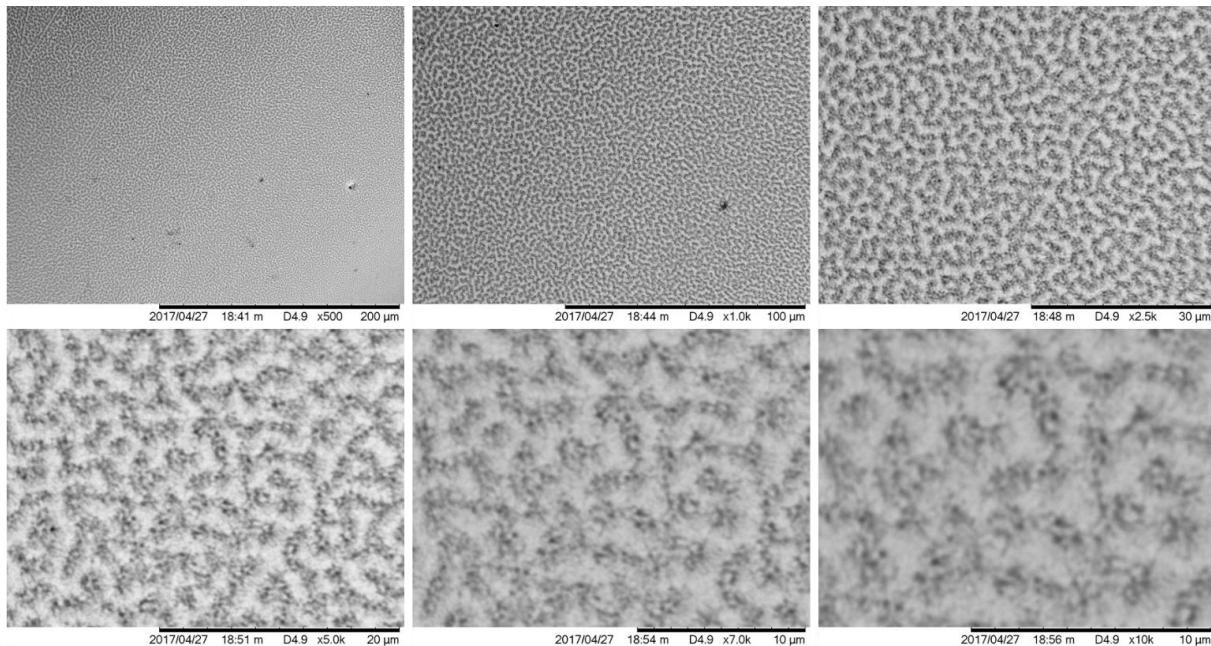


Figura 39. Imágenes de AFM de las superficies modificadas con el hidrogel de quitosano.



En las imágenes de AFM (Figura 39) se puede ver que en las superficies el quitosano parece estar acomodado en agregados en lugar de fibras, pero al ser observadas en SEM (ver Figura 40) se observa que estos aparentes cúmulos están conectados en fibras, además la rugosidad muestra que el máximo de altura que tienen los cúmulos está entre 6 y 7 nm, por lo que sigue siendo considerado en escala molecular.

Esta conformación sobre la superficie puede estar ligada a que el pH al momento de depositarlo es de 3.2, lo que hace que se encuentre en una forma más lineal. Los cambios estructurales pueden ser consecuencia al efecto del cambio de pH en las fibras al entrar en contacto con la superficie de oro, o bien por efectos hidrofóbicos. También puede estar influenciado por el secado que se hace por una hora en el horno a 60 °C, que puede generar un colapso de las fibras [2].



*Figura 40. Micrografías de SEM de las películas de quitosano.*

### 7.3.1.3. Alginato-Quitosano

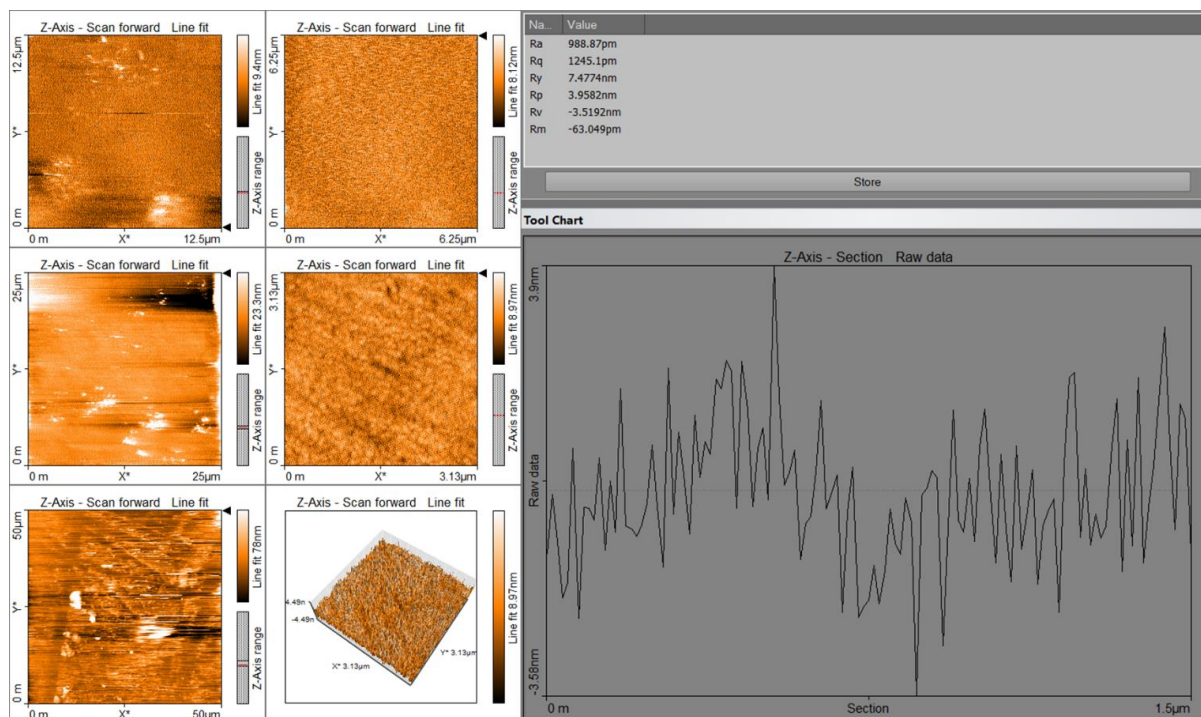
La formación de la solución de alginato-quitosano 1:1 no fue sencilla, las modificaciones en el tiempo o en la velocidad de agitación hacen que la consistencia final del hidrogel sea diferente entre una y otra, aun cuando el pH sea el mismo. Además, la solución obtenida no es translúcida como la de los componentes individuales.

Aún cuando la viscosidad que se obtiene es menor que la del quitosano, el filtrado no es fluido. El hidrogel tiene una gran cantidad de partículas de mayor tamaño que la porosidad del filtro, por lo que se deben de hacer varios filtrados para conseguir una solución translúcida que todavía tenga una viscosidad superior a la del agua. Estos agregados suelen ser resultado de procesos de gelificación que se dan entre el alginato y quitosano por el cambio de pH local al combinarlos y que pueden formar partículas de geles entrecruzados en emulsión o pequeñas capsulas de quitosano recubiertas de alginato.

En las imágenes de AFM mayor tamaño de la Figura 41 se puede ver una diferencia de altura de algunas zonas, esta diferencia es de 20 nm, por lo que no es significativo para las mediciones que se harán en los sistemas de mayor tamaño. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la formación de distintas fases o capas sobre el sensor.

En las imágenes de menor magnificación, se ve una mayor homogeneidad, pero no presentan la formación de ondas o de cúmulos como en las películas de los hidrogeles de los polímeros individuales, por lo que se puede considerar que existen fases distintas, en donde sí existe una combinación de ambos polímeros, pero quizá no en las mismas proporciones.

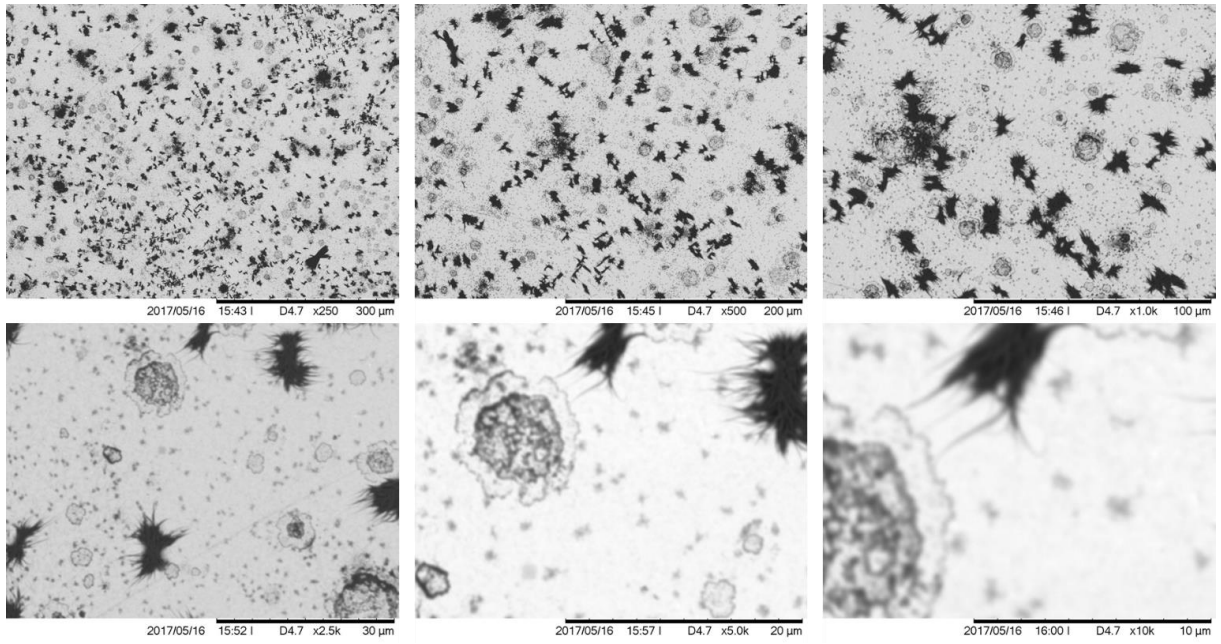
De igual manera, las películas formadas con la mezcla de alginato y quitosano tienen un promedio de rugosidad muy bajo, de solo unos cuantos pm.



*Figura 41. Imágenes de AFM de la superficie con el hidrogel de alginato-quitosano.*

En las micrografías obtenidas por SEM (ver Figura 42) se puede ver claramente que hay distintas fases sobre la superficie del sensor; estas fases están distribuidas equitativamente sobre toda el área, además de que los cambios de altura mostrados por las imágenes de AFM (ver Figura 41) son de nanómetros, manteniéndose en el orden adecuado para que las interacciones con las distintas nanopartículas sean por adsorción y no por otro tipo de efectos, como inclusión entre las fibras o acumulación en la superficie por efectos de fricción con la rugosidad de la superficie.

De las distintas fases visibles, es interesante ver que las zonas que se ven más oscuras se parecen a los agregados que se observan en las superficies de quitosano, por lo que se podría asumir que están formadas de este polímero; pero de ser éste el componente, tienen una mayor estructuración fibrilar comparado con los cúmulos que se formaron en las películas con el hidrogel de quitosano. En esa misma idea, la parte más homogénea sería la fase correspondiente al alginato sin interactuar; y existe una fase que tiene un arreglo más estructurado, similar a un par de anillos irregulares concéntricos, que corresponderían a la fase donde sí interactuaron los polímeros.

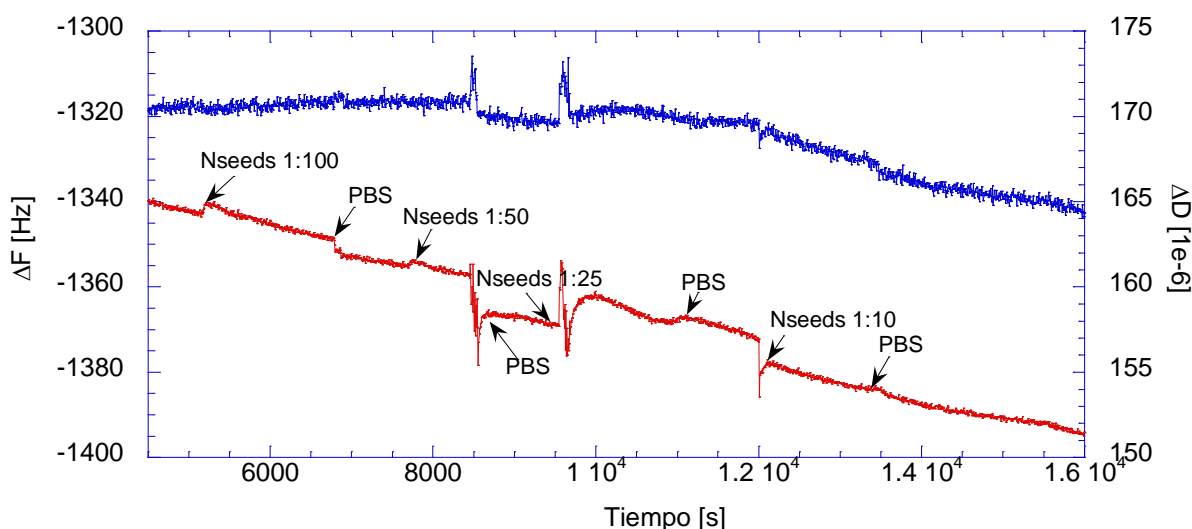


*Figura 42. Micrografías de SEM de la película de alginato-quitosano.*

## 7.3.2. Interacción de las superficies de hidrogeles con Nseeds

### 7.3.2.1. Alginato

La Figura 43 presenta la isoterma de adsorción a 25 °C de las Nseeds que se encuentran en flujo de PBS con pH de 7.4, sobre la película con el hidrogel de alginato medida mediante la QCM-D, en rojo se muestran los cambios de frecuencia, los cuales tienen una pendiente siempre negativa, que se relaciona a un aumento de masa sobre la superficie, y que se le puede atribuir a la absorción de agua, de sales presentes en el buffer o bien de las Nseeds a una proporción determinada; este tipo de comportamientos con pendientes marcadas durante todo el proceso de adsorción se ha encontrado en otros hidrogeles, *e.g.* los hechos con celulosa [40].



*Figura 43. Isoterma a 25 °C de QCM-D de las Nseeds en una superficie con hidrogel de alginato. Se presentan los cambios de frecuencia (rojo), así como el cambio de disipación (azul).*

Aun con la absorción de agua por parte del hidrogel, se ve que posterior a la deposición de las Nseeds sobre la superficie, al volver a inyectar el PBS, la muestra se estabiliza y presenta menores cambios, incluso la disipación (en azul) se mantiene constante. Esto es hasta que se llega a la dilución 1:25, donde parece haber un cambio importante en la estructura del hidrogel por la rápida disminución de la disipación; esto podría referirse que la interacción deja de ser superficial y las redes del gel se abren para permitir la entrada de las Nseeds y de agua, por lo

que el cambio de la disipación puede ser explicado como la transformación del hidrogel a un estado de menor rigidez.

Hasta antes de la inyección de la dilución 1:25, la isoterma puede ser relacionada con la ecuación de Sauerbrey (ecuación 1) para superficies rígidas, hasta ese punto, la masa adsorbida sobre el hidrogel sería de  $147.5 \text{ ng cm}^{-2}$ , lo cual podría atribuirse principalmente a las Nseeds y no al agua porque los cambios de disipación son muy pequeños hasta este punto.

En la Figura 44 se muestran las imágenes de AFM del hidrogel de alginato con Nseeds. Esta superficie muestra  $R_m$ ,  $R_q$  y  $R_a$  similares a los de la superficie de alginato antes de ponerse a interactuar con una diferencia de 1 nanometro, pero hay un aumento en  $R_y$  de 5 nm, lo cual corresponde al orden de tamaño de las Nseeds; además se ve una superficie con más protuberancias y menos lisa, así como un mayor número de agregados en las imágenes de mayor magnificación.

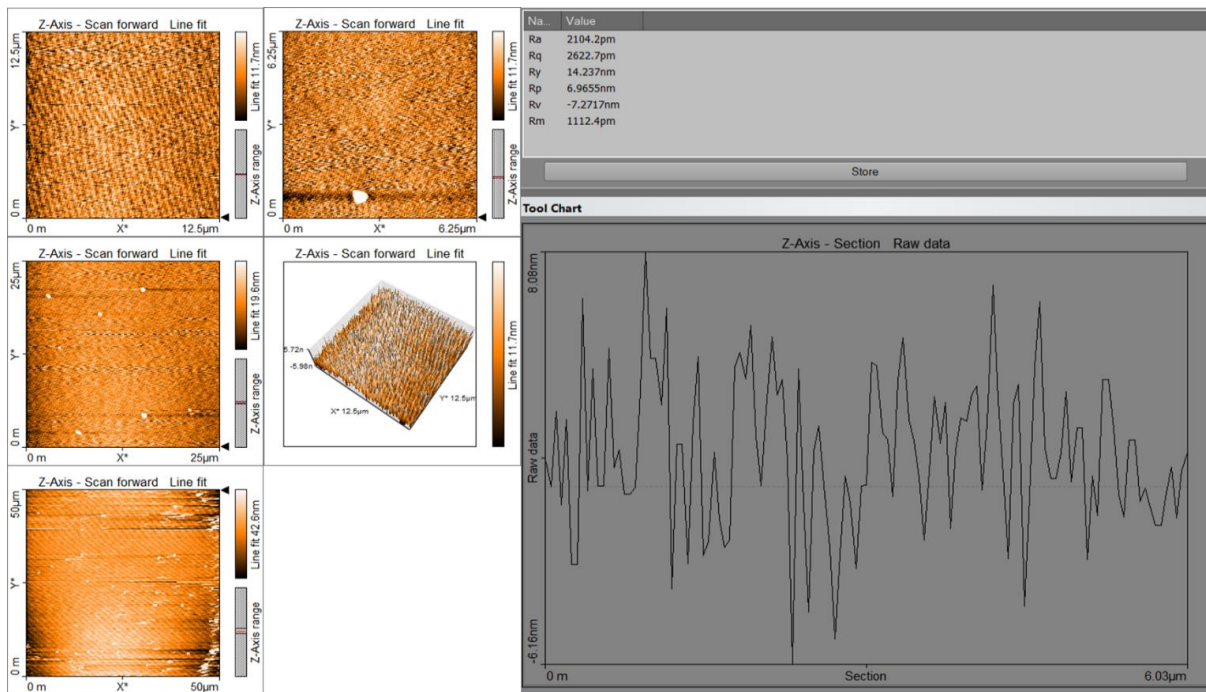
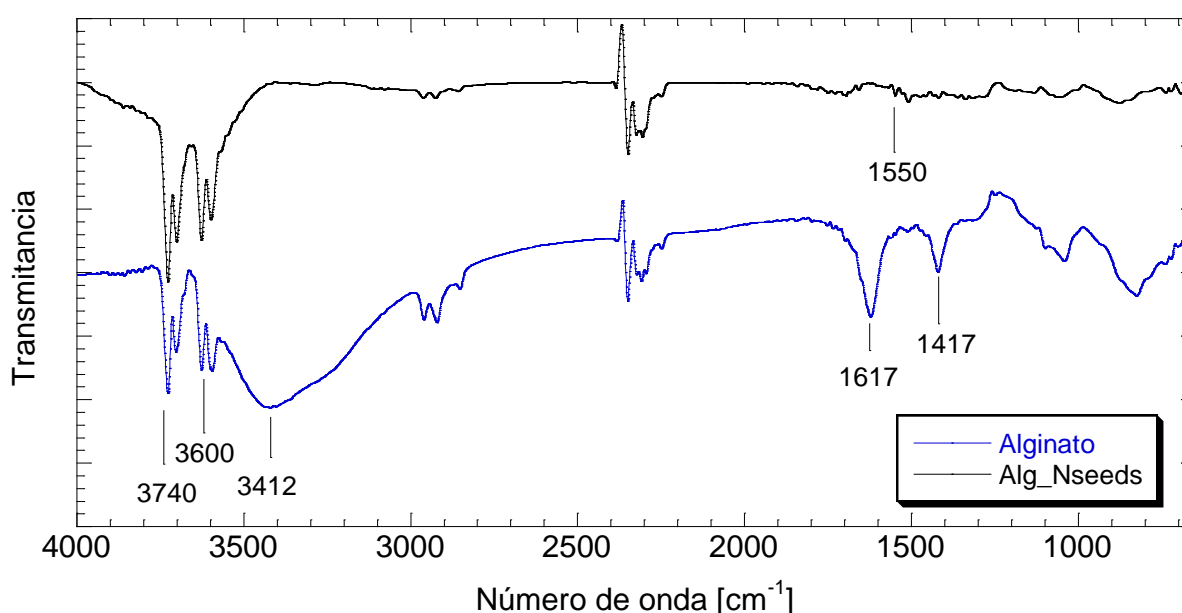


Figura 44. Imágenes de AFM de la superficie con el hidrogel de alginato con Nseeds.

Por otra parte, en la Figura 45 se encuentran los espectros de FTIR de la superficie del hidrogel de alginato y la superficie del hidrogel después de interactuar con las Nseeds. Se puede ver que la banda de hidroxilos en  $3400\text{ cm}^{-1}$ , así como las bandas representativas de los carboxilos en  $1600$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  desaparecen después de la interacción con las Nseeds. Las bandas de las aminas  $3600$  y  $3750\text{ cm}^{-1}$  se encuentran desde el disco sensor de QCM-D, por lo que no parecen modificarse después de la interacción con las Nseeds; y el hecho de que no se vean las bandas correspondientes a los citratos que rodean a las Nseeds puede deberse a la baja concentración de estas en comparación con el alginato, siendo apantallado, o bien un proceso de desplazamiento de estos citratos por el alginato como agente estabilizante.



*Figura 45. FTIR de la superficie de alginato (azul) y la superficie de alginato con Nseeds (negro).*

En la Figura 46 se presenta el difractograma de ambas superficies, en esta se ve que no hay picos de intensidad cuando se observa la superficie con el hidrogel de alginato solo (en negro); pero, sí hay picos en la superficie con las Nseeds, los picos se encuentran en  $27^\circ$  y  $39^\circ$ . Estos picos se encuentran también en los difractogramas de las Nseeds, siendo el cercano a  $40^\circ$  el correspondiente al plano (111), confirmando nuevamente la presencia de oro estructurado de las Nseeds en la superficie.

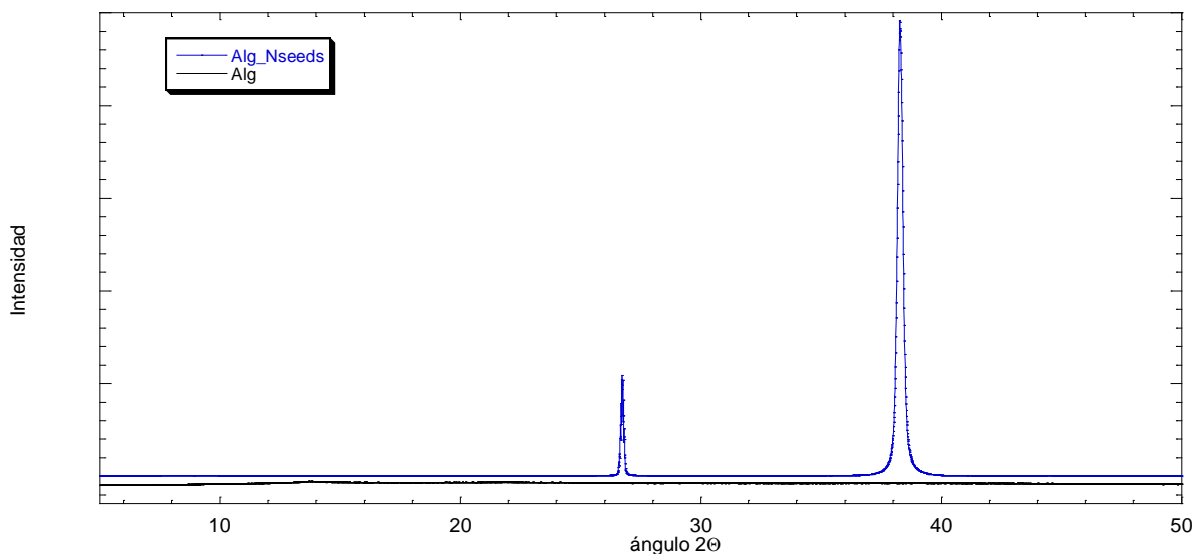


Figura 46. Difractograma de las superficies de alginato (negro) y la de alginato después de la interacción con las Nseeds (azul).

La interacción de nanopartículas de oro con alginato ya había sido estudiada por Dvir *et al.*, para la modificación de andamios de alginato con nanorods de oro; este estudio sólo se basa en la visualización por microscopías y medición de altura en AFM, a la par de estudios de crecimientos y viabilidad celular [36].

La homogeneidad en la rugosidad de las superficies observadas puede deberse a la formación de una capa que cubra toda la superficie, que se formaría antes de usar la dilución 1:25, esta interacción confirmada con el FTIR y DRX; puede ser debido a que después de formar la monocapa, el excedente de las Nseeds empieza a modificar la matriz del hidrogel generando los cambios que llevan a una mayor disipación y a absorber tanto agua como Nseeds, a una mayor tasa.

Las mediciones que son reportadas aquí, así como la información bibliográfica encontrada, permite dilucidar una clara interacción de las nanopartículas de oro con el alginato, mostrando incluso estructura sobre la superficie.



### 7.3.2.2. Quitosano

Para el caso de las Nseeds interactuando con los hidrogeles de quitosano, en la Figura 47 se presenta la isoterma de adsorción por QCM-D de la película de quitosano y las Nseeds. Los cambios en frecuencia (rojo) al igual que en el caso del alginato, son negativos lo que confirma el aumento de masa sobre la superficie; sin embargo, esta superficie se estabiliza más rápido que la del hidrogel de alginato, pues no se ve una tendencia de disminución de frecuencia continua como en el caso anterior. Después de la interacción con las nanopartículas, la estabilización en PBS es casi inmediata, lo que confirma que es una superficie más rígida a este pH de 7.4.

En cuanto a la disipación los cambios son pequeños, de solo  $6 \times 10^{-6}$ , y estos son positivos. De acuerdo con esos valores y al cambio positivo se puede decir que la superficie se vuelve más rígida por lo que el hidrogel se inmoviliza por la cantidad de interacciones que forma con las Nseeds. Así mismo, como los cambios de disipación son pequeños la ecuación para relacionar la masa con los cambios de frecuencia en una superficie rígida aplican; dando así un cambio de masa total de  $949.9 \text{ ng cm}^{-2}$ , tomando el punto hasta antes de la inyección de 1:25, el cambio de masa es de  $649 \text{ ng cm}^{-2}$ .

La diferencia entre la cantidad de Nseeds del hidrogel de alginato con el de quitosano es de  $501.5 \text{ ng cm}^{-2}$ ; es decir, es 4.5 veces mayor la cantidad de Nseeds contenidas en el quitosano que en el alginato. Esto indica una mayor afinidad de las Nseeds por la superficie con menor cantidad de cargas superficiales de quitosano que por la de alginato que tiene principalmente cargas negativas en su superficie; esta falta de afinidad con el alginato, puede deberse a que se encuentra en un pH de 7.4, lo cual desfavorece la interacción entre el alginato y de las Nseeds que también tiene carga superficial negativa por los grupos carboxilos de los citratos. Por otra parte, si se piensa en un desplazamiento de estos grupos, también se explica la menor afinidad que se da por parte de las Nseeds por el alginato.

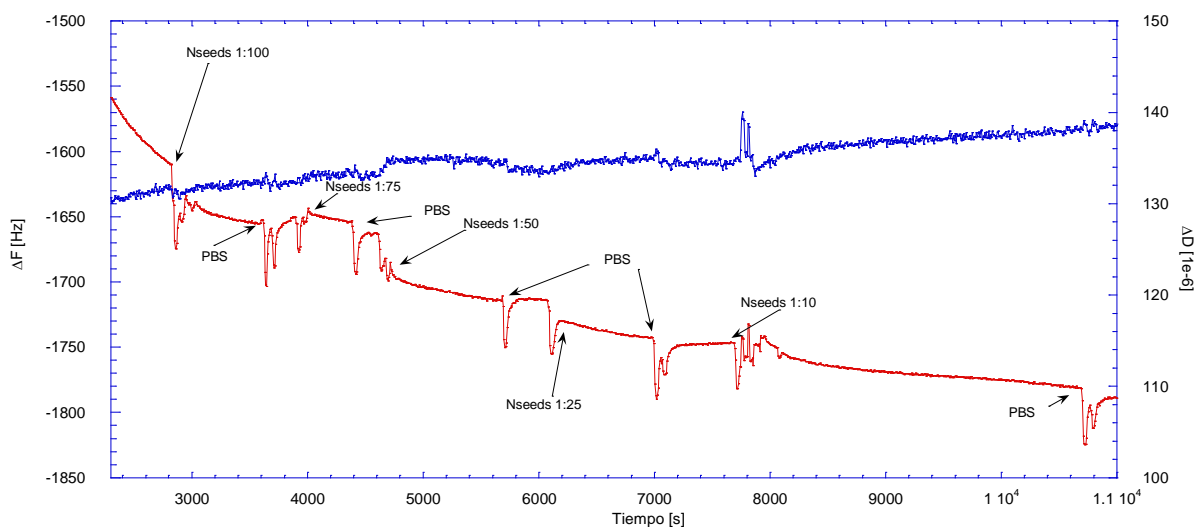
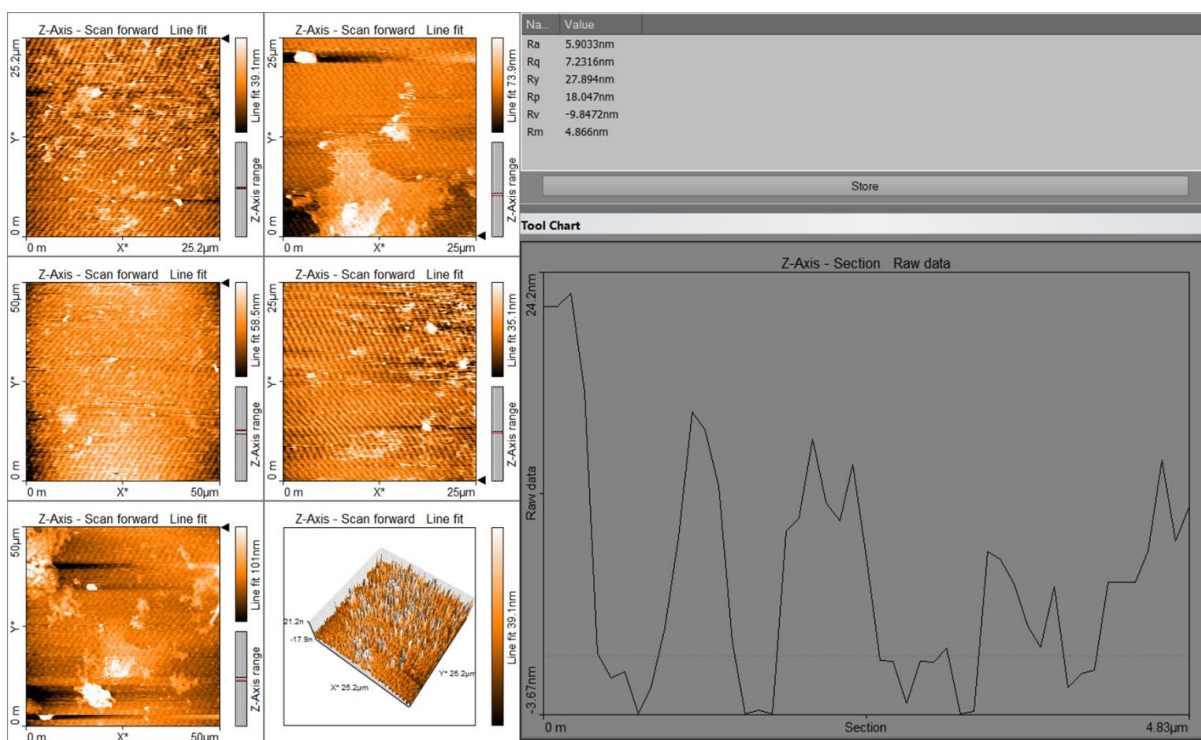


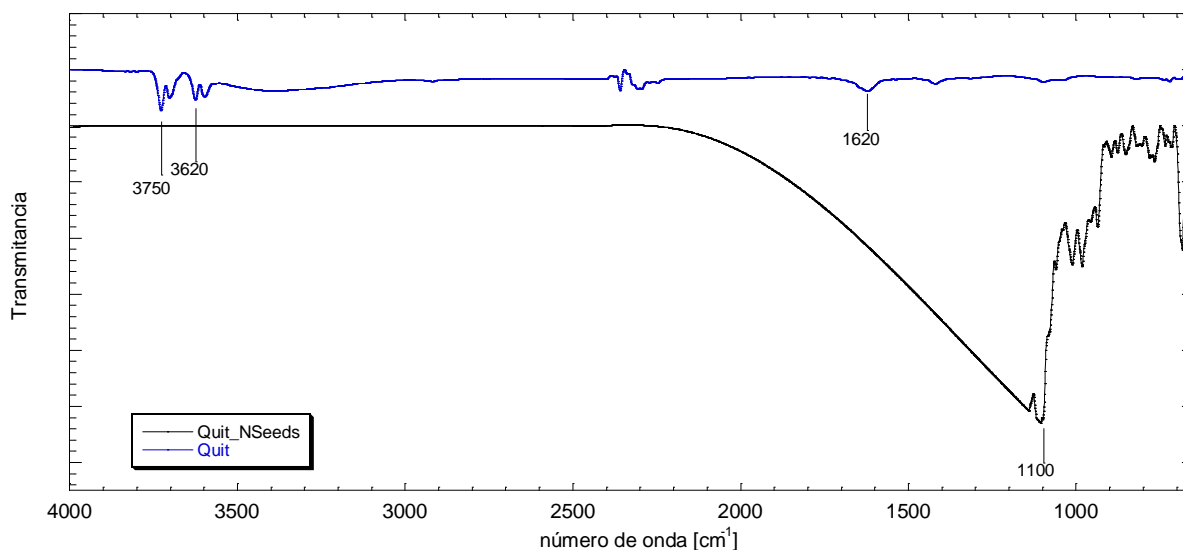
Figura 47. Isoterma de adsorción por QCM-D de la interacción de película con hidrogel de quitosano y Nseeds. Se puede ver que los cambios de frecuencia (rojo) y la disipación (azul).

En la Figura 48 se muestran las imágenes de AFM de la superficie de quitosano con las Nseeds; la  $R_m$  es de 4.86 nm y el valor de  $R_a$  de 5 nm, lo cual entra dentro de la escala de tamaño de las Nseeds, pero su  $R_y$  es de 27 nm por lo que según las mediciones de DLS de la Figura 19, serían tres Nseeds agregadas. La presencia de agregados explicaría los cambios en la superficie y la cantidad de zonas altas en las imágenes de mayores dimensiones.



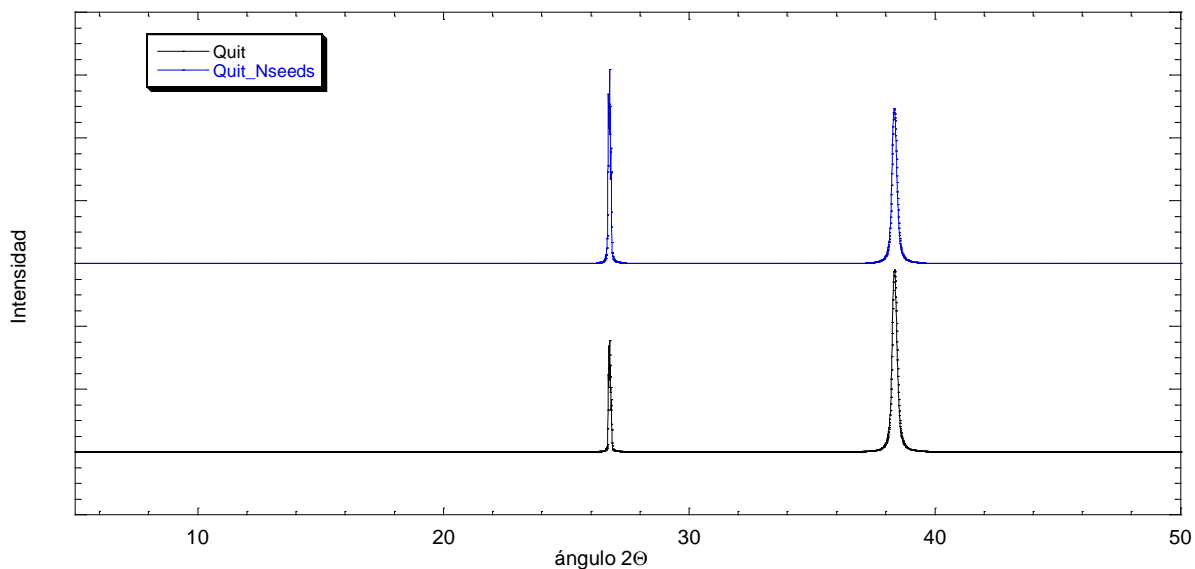
*Figura 48. Imágenes de AFM del hidrogel de quitosano con Nseeds.*

En la Figura 49 se observan los FTIR de la superficie de quitosano antes y después de interactuar en la QCM-D con las Nseeds; las diferencias se presentan en que las bandas de los grupos amina en  $3600$  y  $3750\text{ cm}^{-1}$  ya que desaparecen por completo, la intensidad crece en las bandas entre  $1700$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ; mismas que están relacionadas con los grupos citrato de las Nseeds por lo que se podría decir que interacción es fuerte entre el quitosano y las Nseeds, además de que las interacciones pueden estar mediadas por los grupos amino, siendo consistente con lo que se espera de algunos polímeros con aminas al interactuar con superficies de oro [50]. El que se mantengan los grupos citratos indica que la interacción no esta dirigida por un intercambio de recubrimiento, sino por la interacción entre el citrato y el quitosano, permitiendo así una interacción más rápida y dirigida.



*Figura 49. FTIR de la superficie de quitosano antes (azul) y después de la interacción con Nseeds (negra).*

En la Figura 50 se presentan los difractogramas de las superficies de quitosano y de quitosano con Nseeds. Hay dos picos en ambas superficies, las cuales corresponden al oro, pero para el caso de la superficie de quitosano debe de ser el oro que se encuentra en el sensor, por lo que la película debe de ser más delgada para permitir la interacción del oro con la radiación de los rayos X. El cambio principal se da en la disminución de las intensidades del pico en  $40^\circ$  y el aumento en el de  $27^\circ$ , lo que indica que hay oro en otra estructuración sobre la superficie, lo cual estaría ligado con la estructura de las Nseeds.

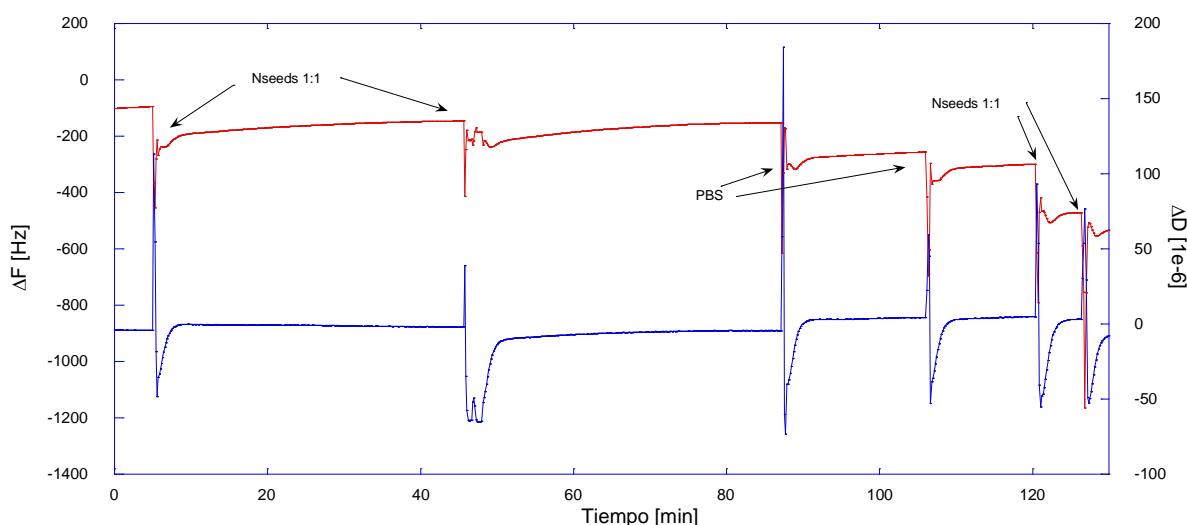


*Figura 50. DRX de la superficie de quitosano y la superficie de quitosano con Nseeds.*

La interacción entre este polímero y las Nseeds son el principio para generar las NPAu [56], por lo que se esperaba que se dieran un resultado positivo, pero el conocimiento de la cantidad necesaria por área superficial nos da un indicio de cómo mejorar y optimizar los procesos de generación de las NPAu y de diferentes andamios que utilicen el quitosano como material biocompatible.

### 7.3.2.3. Alginato-Quitosano

En la Figura 51 se presenta la isoterma de adsorción en QCM-D del hidrogel de alginato-quitosano con las Nseeds. Se ve que los cambios de frecuencia (rojo) son siempre negativos, mientras que los cambios de disipación (azul) parecen nulos, el punto inicial es en  $-5.7 \times 10^{-6}$  y el final está en  $2.5 \times 10^{-6}$ , por lo que la superficie se puso más rígida de lo que estaba al iniciar el experimento. En los cambios de frecuencia, se ve que al igual que con los dos componentes individuales, que el cambio de frecuencia negativo se presenta, pero a diferencia del alginato, la estabilización es más rápida y similar al caso del quitosano; de igual manera, el cambio positivo en la disipación después de la adsorción de las Nseeds es un comportamiento similar al hidrogel de quitosano.



*Figura 51. Isotherma de adsorción por QCM-D del hidrogel de alginato-quitosano con Nseeds, cambio de frecuencia (rojo) y de disipación (azul).*

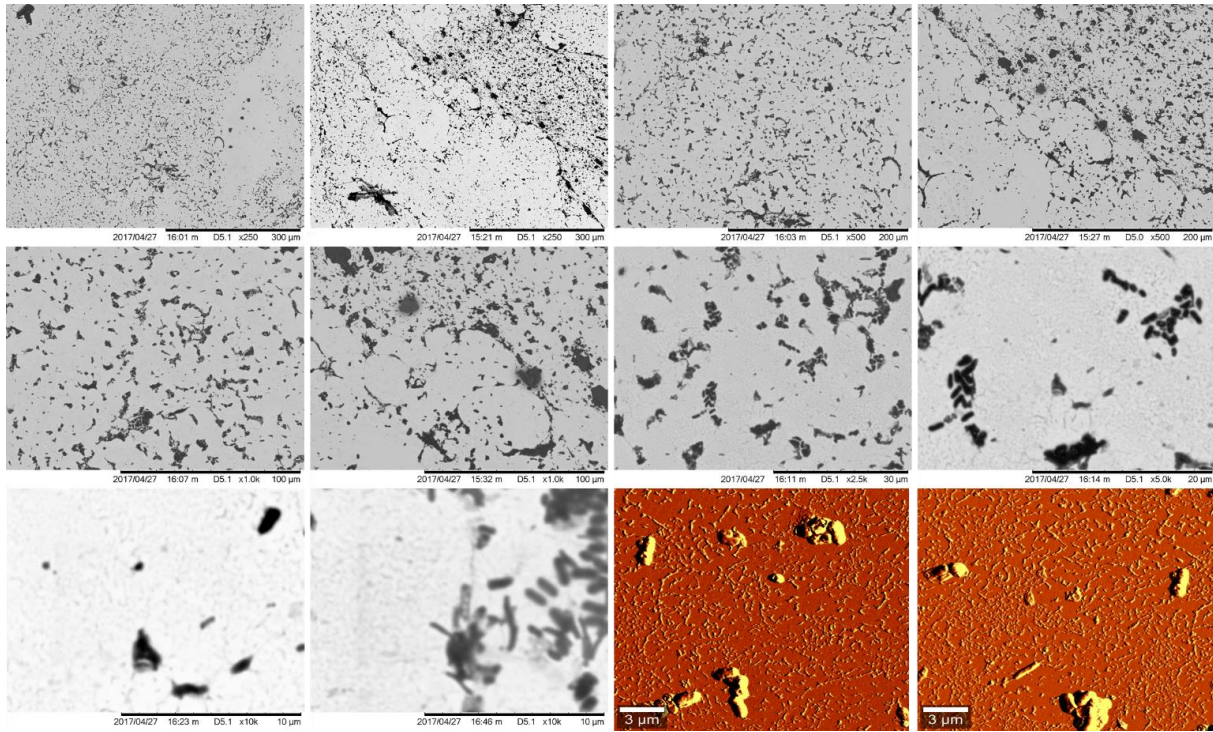
Aun cuando el cambio es superior al margen de  $5 \times 10^{-6}$  que se tiene para usar la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 1) [51-53], usándola para hacer una estimación del cambio de masa se obtiene que el cambio total es de  $2,576.5 \text{ ng cm}^{-2}$ . Este cambio como se puede ver por la disminución de frecuencia aun cuando interactúa solamente con el PBS que sirve de flujo para enjuague, es una combinación de agua, sales y Nseeds, pero incluso así es más de cuatro veces superior a la interacción con quitosano solo.

Este cambio en la frecuencia y disipación cuando se está en presencia del flujo de enjuague de PBS es muy similar a lo que sucede con el alginato cuando estaba en presencia de Nseeds en exceso, por lo que quizá la hidratación está dirigida por este polímero, pero limitado por el quitosano, que es el que tiene mayor interacción con las Nseeds y da rigidez a la película como se esperaba [41].

En la Figura 52 se muestran las micrografías electrónicas de barrido y las imágenes por microscopía de fuerza atómica de la superficie de alginato-quitosano con las Nseeds. En las imágenes de mayores magnificaciones se ve la presencia de zonas más oscuras, estas pudieran ser agregados o las fases en donde se encuentra el quitosano. Comparando con la Figura 42, las zonas oscuras corresponderían a las fases de quitosano, pero con una apariencia diferente, mucho menos fibrilar y más compacta, lo que puede ser consecuencia de la interacción con las Nseeds. Al ver las microscopías de magnificaciones menores, en concreto la última fila de la Figura 52, se ve la presencia de las Nseeds sobre la superficie en un acomodo aleatorio, pero se ve que pueden formar estructuras cuando se aumenta la concentración como sucede en los depósitos que se muestran en la Figura 22.

La alta capacidad de integración de las Nseeds al hidrogel demuestra que es un elemento utilizable para la modificación de andamios para cultivo celular, además de que la cantidad de quitosano que se utilice modificará tanto la rigidez del andamio como la cantidad de Nseeds que se puedan adsorber al material.

Así mismo, la presencia de las Nseeds cumple un papel de modificador mecánico de los andamios, pues les provee de una mayor rigidez y probablemente también modifica las propiedades eléctricas, lo que es una propiedad necesaria para la generación de tejido cardiaco. Aun cuando la presencia de Nseeds dé rigidez al andamio, esta puede ser modulada con la cantidad de alginato que se utilice, pues presenta interacciones con las Nseeds mediante los grupos hidroxilos y carboxilos, y además permite la modulación de la capacidad del material de absorber agua, pues la presencia de altas concentraciones de Nseeds ha demostrado aumentar esta capacidad.



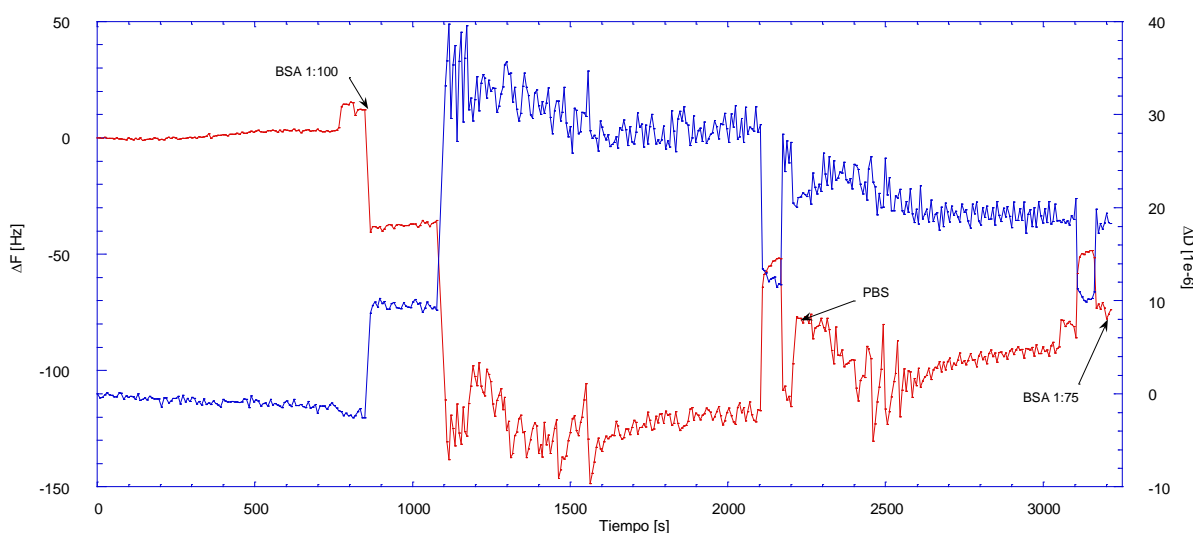
*Figura 52. Microscopías de SEM e imágenes AFM de la superficie de alginato-quitosano con Nseeds.*



### 7.3.3. Interacción de las superficies de hidrogeles con BSA

#### 7.3.3.1. Alginato

En la Figura 53 se puede ver la isoterma de QCM-D a 25 °C de una película de alginato con BSA, de igual manera se ve un cambio negativo en la frecuencia, lo que indica que hay una interacción entre el hidrogel y la proteína. El cambio en la disipación es positivo y de un valor cercano a  $20 \times 10^{-6}$  por lo que no se está tratando con una superficie rígida al inicio del experimento, pero que va adquiriendo una mayor rigidez conforme interactúa con la BSA.



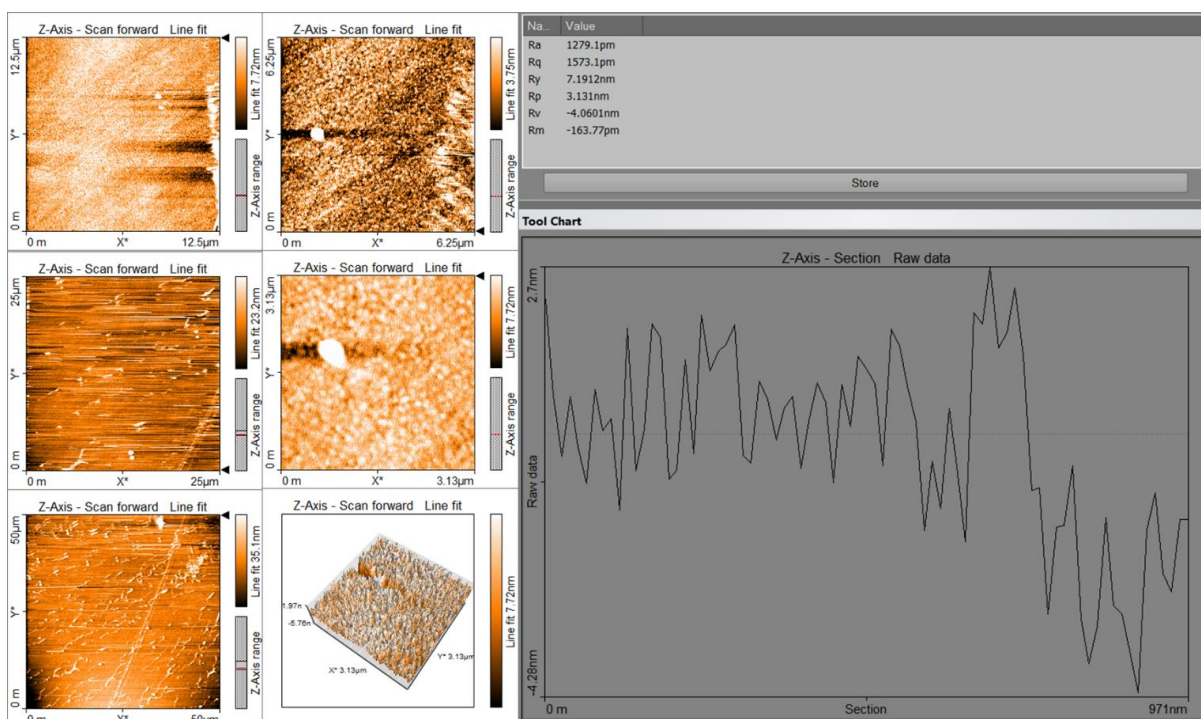
*Figura 53. Isotherma de QCM-D entre una superficie de alginato y BSA. El cambio de frecuencia (rojo) mientras que el cambio de disipación (azul).*

Recordando que la BSA tiene un punto isoeléctrico de 4.6 y un peso molecular de 67 kDa, entonces es una molécula que se encuentra con carga promedio negativa a pH de 7.4, igual que el alginato, por esto la interacción no está dirigida por efectos electrostáticos, sino por efectos hidrofóbicos y entrópicos.

En la Figura 54 se pueden observar las imágenes de AFM del hidrogel de alginato con BSA. En las imágenes se puede ver la presencia de la proteína en un estado estructurado. Aun cuando las mediciones de rugosidad no dan un cambio significativo comparado con los valores obtenidos en la superficie de alginato sola (Figura 37), la gráfica tridimensional si muestra una

conformación diferente en la superficie, así como los valores del cambio vistos en la isoterma de QCM-D (Figura 53).

La interacción entre BSA y alginato ha sido utilizada para la formación de nanopartículas y encapsulados [57, 58], así como para generar superficies, por lo que la proteína tiende a extenderse en superficies de este hidrogel [59].

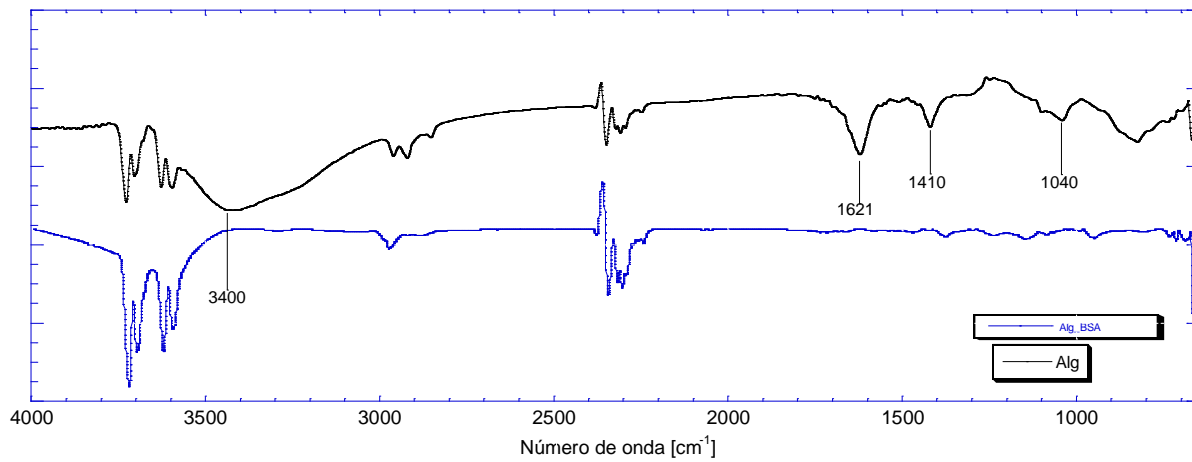


*Figura 54. Imágenes de AFM de la superficie del hidrogel de alginato con BSA.*

En la Figura 55 se pueden ver los espectros de FTIR de la superficie de alginato antes y después de la interacción con BSA. El cambio principal se da en que se pierde la intensidad de los grupos carboxilos ( $1410\text{ cm}^{-1}$ ) e hidroxilos (OH en  $3400\text{ cm}^{-1}$  y CO en  $1040\text{ cm}^{-1}$ ), esto debido a que muy probablemente interaccionan con la proteína, por lo que la interacción hace que se pierdan las bandas, ya sea porque se utilizan estos grupos para formar otro tipo de enlaces, o por el apantallamiento de los mismos.

Con esto se puede deducir que entrópicamente es más favorable para la proteína el estar unida al polímero que en solución en el buffer, lo que indica que puede presentarse una desorción si las

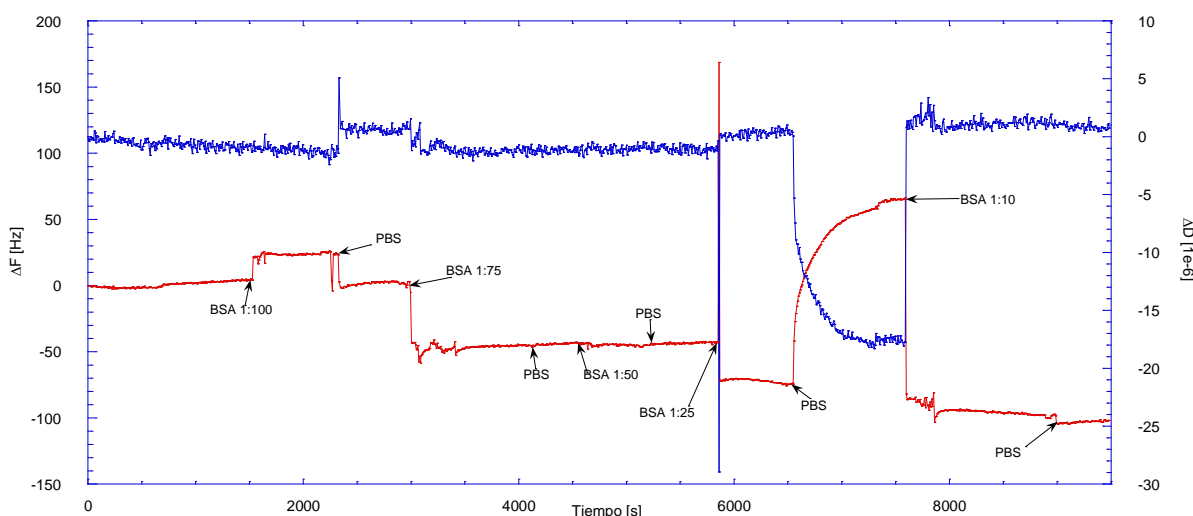
condiciones cambian para la proteína, ya sea modificando el pH de la superficie o disminuyendo concentraciones salinas [60].



*Figura 55. FTIR de las superficies de alginato y de alginato con BSA.*

### 7.3.3.2. Quitosano

En la Figura 56 se presenta la isoterma de adsorción a 25 °C de la interacción de una película con hidrogel de quitosano con BSA medida mediante QCM-D. Al igual que en el sistema anterior, se muestra una disminución en la frecuencia (rojo), pero aquí los cambios de disipación (azul) son casi nulos, por lo que se puede considerar una superficie rígida y aplicar en esta la ecuación de Sauerbrey (ecuación 1).

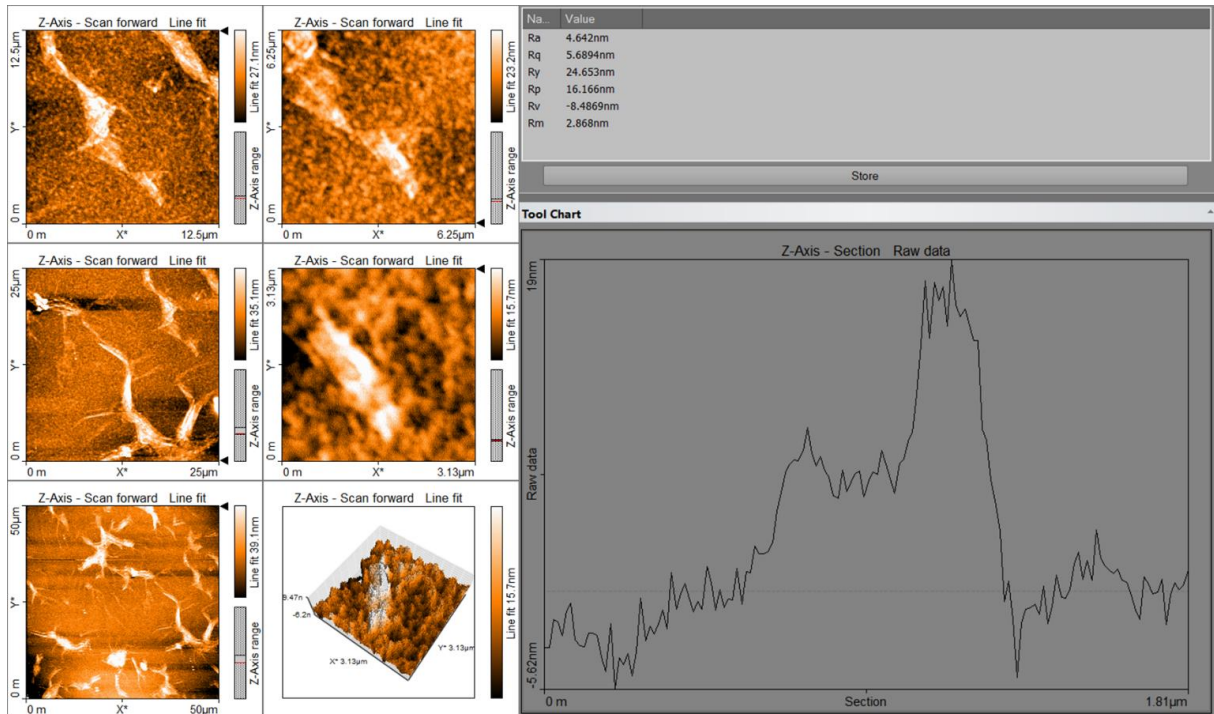


*Figura 56. Isotherma de QCM-D entre un hidrogel de quitosano y BSA.*

La caída visible en ambas gráficas se recupera después de la inyección de la BSA 1:10, lo que puede ser causado por vibraciones en el equipo, pero se estabiliza de nuevo al tener un cambio en la superficie. Sin contar esto, el  $\Delta F$  total es de -101 Hz, lo que equivale a  $595.9 \text{ ng cm}^{-2}$ , siendo un cambio cercano a la cantidad de Nseeds adsorbidas en la isoterma de la Figura 47, la diferencia es que en el caso anterior, la medición fue antes de que se inyectara la dilución 1:25 de una solución con concentración menor al nM, y esta está más de tres órdenes de magnitud arriba.

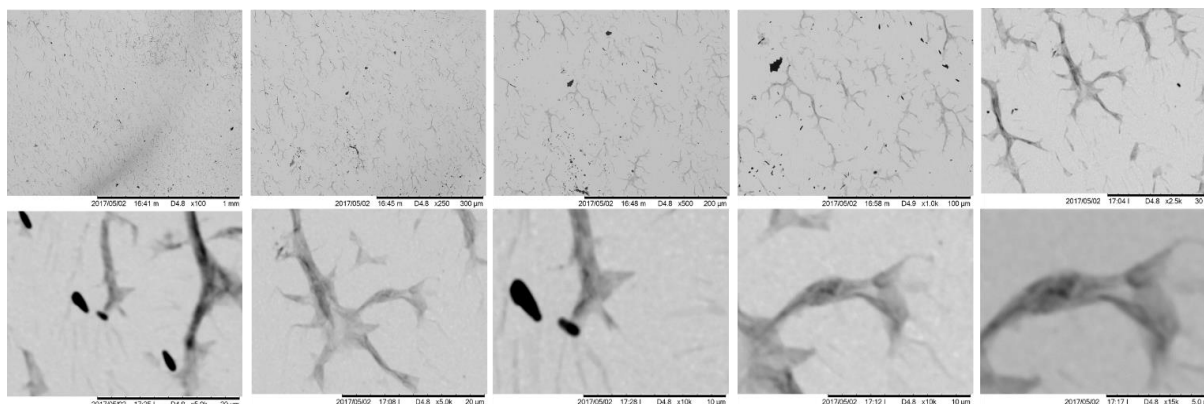
Aquí el  $\Delta D$  fue de  $1 \times 10^{-6}$  positivo, por lo que al contrario que en el caso del alginato el hidrogel se vuelve menos rígido, pero como se vio anteriormente, el alginato tiene mayor intercambio con el agua comparado con el quitosano.

En la Figura 57, en las imágenes de AFM se pueden observar estructuras similares a las que se presentaron con el alginato (ver Figura 54) aunque con una mayor altura. Aquí las rugosidades medias están entre 2 y 5 nm por lo que se puede considerar que existe ya una capa que está cubriendo la superficie y los agregados más grandes son consecuencia del excedente que está depositado en la superficie.



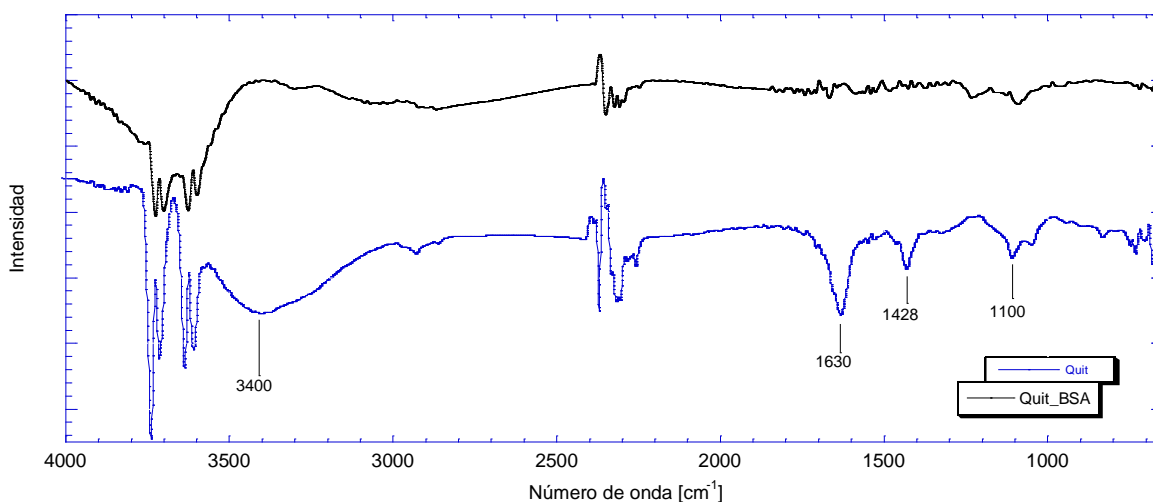
*Figura 57. Imágenes de AFM de la superficie del hidrogel de quitosano y BSA.*

Estructuras similares a las vistas en las imágenes de AFM (ver Figura 57) fueron encontradas en las micrografías electrónica de barrido presentadas en la Figura 58. La superficie se ve completamente recubierta ya que no se ven estructuras en el fondo similares a las que se observaron en las imágenes del polímero solo (ver Figura 40).



*Figura 58. Micrografías electrónicas de la superficie del hidrogel de quitosano después de su interacción con BSA.*

En la Figura 59 se muestran los FTIR de una superficie de quitosano y una superficie de quitosano con BSA. Después de la adsorción de la BSA en el hidrogel de quitosano, las bandas de los grupos hidroxilo en  $3400\text{ cm}^{-1}$  se ven disminuidas, casi inexistentes, así como las bandas de carboxilos y de carbonilos en  $1630$  en  $1100\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Otras bandas que se ven disminuidas son las de estiramiento de los  $\text{CH}_3$ , que se encuentran en  $1428\text{ cm}^{-1}$ .



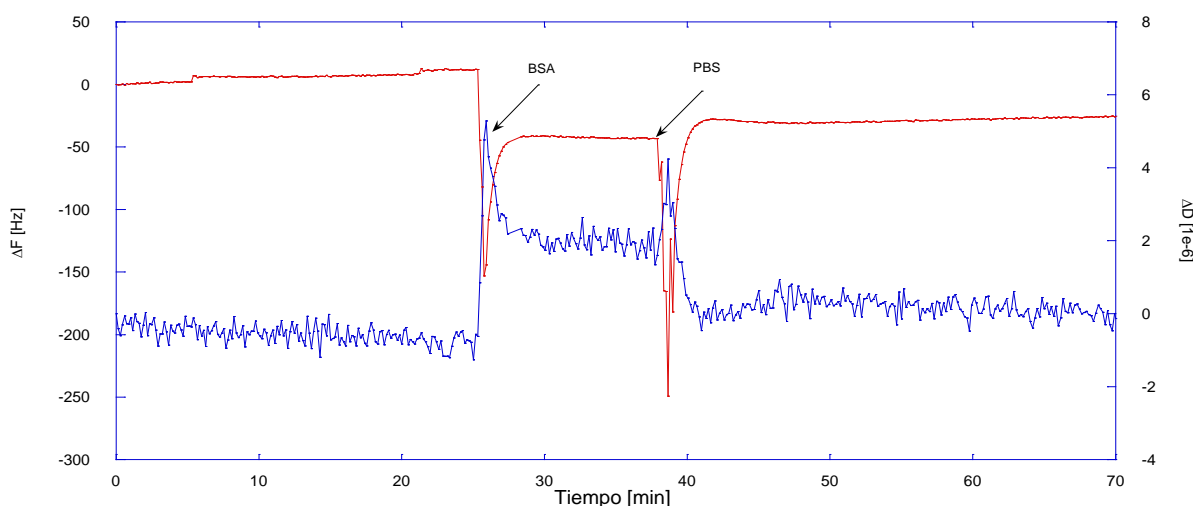
*Figura 59. FTIR de las superficies de quitosano y quitosano con BSA.*

Con estos apantallamientos en los FTIR, más las imágenes de SEM se puede decir que la superficie en efecto está recubierta. La cantidad de material depositado fue tal que se logró un exceso en la superficie que llega a formar estructuras fibrosas.

El hecho de que la proteína BSA y el quitosano hayan presentado tan buena interacción puede ser que esta esté dirigida por las cargas que presentan, BSA tiene un carga de  $-9$  mV, mientras que el quitosano a pH 7.4 se espera que no tenga cargas, el hecho de que se este tan cerca del  $pka$  hace que exista aun una cierta densidad de cargas positivas, las cuales interactúen con las cargas negativas de la proteína y con algunos otros amino ácidos que pueden estar con cargas parciales por tener valores de  $pka$  diferentes.

### 7.3.3.3. Alginato-Quitosano

En la Figura 60 se observa la isoterma de adsorción del hidrogel de alginato-quitosano y su interacción con la proteína BSA en PBS a pH 7.4 y 25 °C. Se ve que al entrar en contacto el BSA con el hidrogel se presenta un cambio negativo en la frecuencia, este  $\Delta F$  es bajo, pero logra que se dé un aumento en la disipación, volviéndose más rígida por la cantidad de materia en la superficie. Posteriormente, después de enjuagar con PBS se ve un ligero aumento en la frecuencia, lo que indica que se está lavando el exceso que se presentaba en la superficie; este lavado también rehidrata al gel bajando de nuevo su disipación.

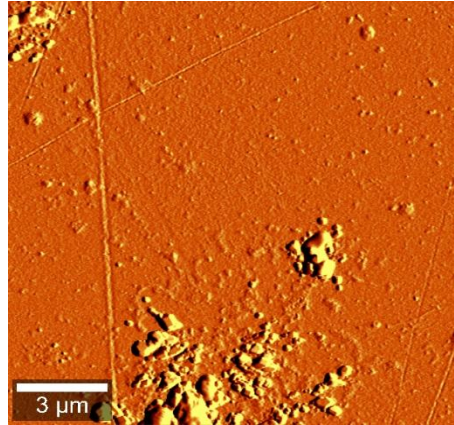


*Figura 60. Isoterma de la interacción del hidrogel de alginato-quitosano con BSA.*

Aun cuando se presenta un cambio en la frecuencia, la misma está dentro de los márgenes de una superficie rígida, demostrando de nuevo que la presencia de quitosano hace que la superficie adquiera esta característica. El cambio de masa es entonces de  $177.5 \text{ ng cm}^2$ . Este valor es menor que al obtenido en los componentes individuales, lo que puede deberse a que las interacciones posibles se dan entre los polisacáridos preferentemente en lugar de con la proteína. Aun con esto en la imagen de AFM de la Figura 61 se puede ver la presencia de aglomerados de BSA sobre el



hidrogel, por lo que también se da la interacción entre estos sistemas como se muestra en la generación distintos sistemas de acarreamiento [57].



*Figura 61. Imagen de AFM de la superficie de alginato-quitosano con BSA.*

## 7.3.4. Interacción de las superficies de hidrogeles con NPAu

### 7.3.4.1. Alginato

La interacción con sistemas más complejos, como son las NPAu, permite una mayor modificación y control sobre la liberación de diferentes moléculas y con ello la modificación de los andamios para hacerlos funcionales y no solamente modificar sus propiedades físicas.

En la Figura 62 se presenta la isoterma de las interacciones entre una superficie modelo de un hidrogel de alginato con las NPAu. En este se puede ver que los cambios de frecuencia son positivos, lo que significa que se pierde materia sobre la superficie; pero, los cambios de disipación son negativos, lo que se relaciona con un aumento en la viscosidad de la superficie.

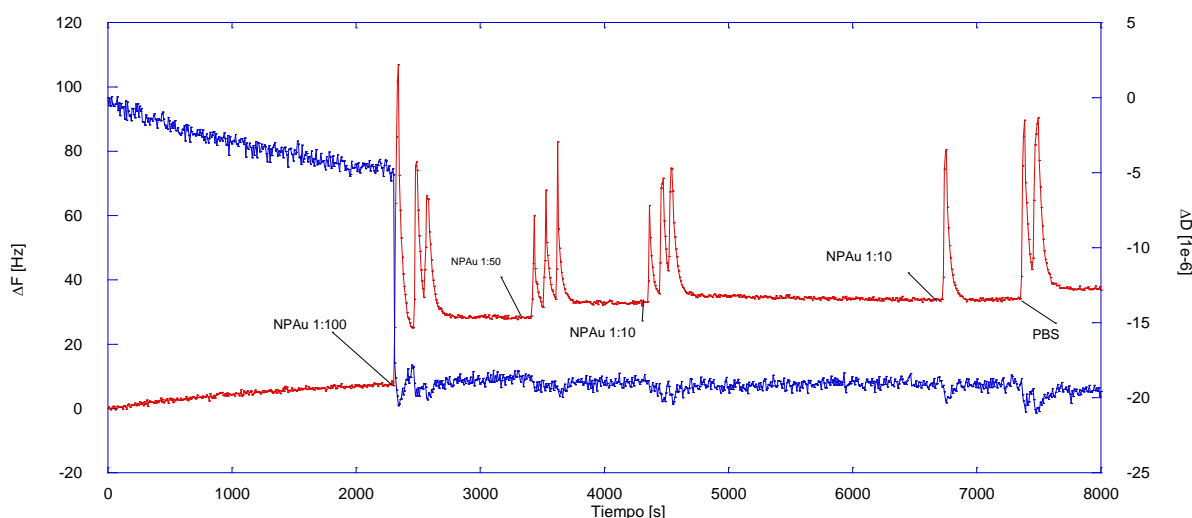
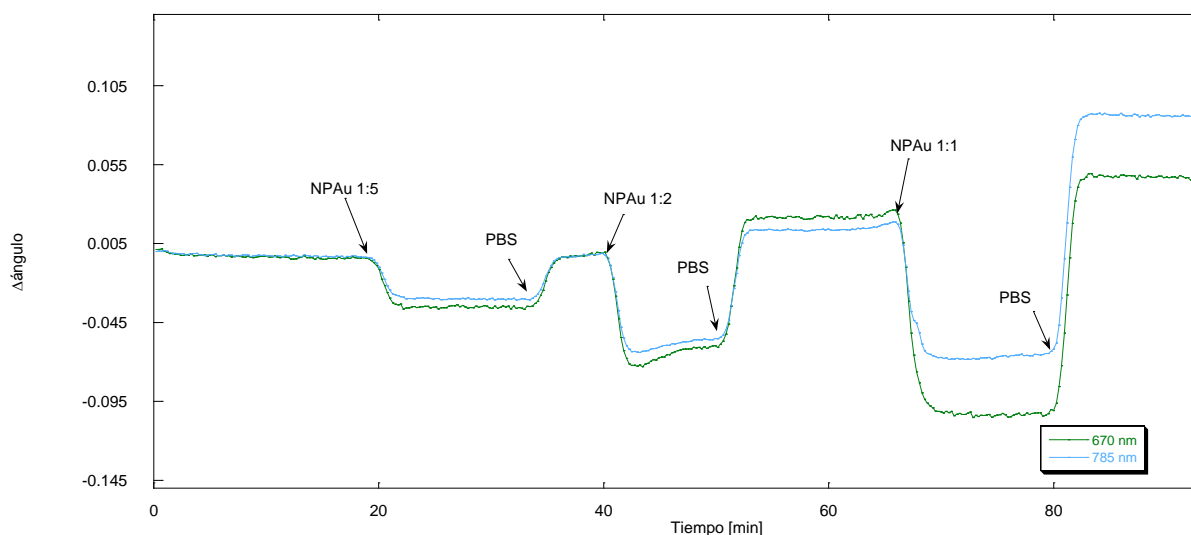


Figura 62. Isoterma de QCM-D de la interacción de NPAu con el hidrogel de alginato.

Este comportamiento en el cambio de disipación es muy similar a lo que sucede con el alginato al interactuar con las Nseeds, que son partículas de oro de dos órdenes de magnitud menores que los sistemas NPAu. Si comparamos con la Figura 43, el  $\Delta D$  tiene el mismo valor de  $-15 \times 10^{-6}$  para cuando la superficie cambia su pendiente al saturarse después de que se inyecta la concentración 1:25.

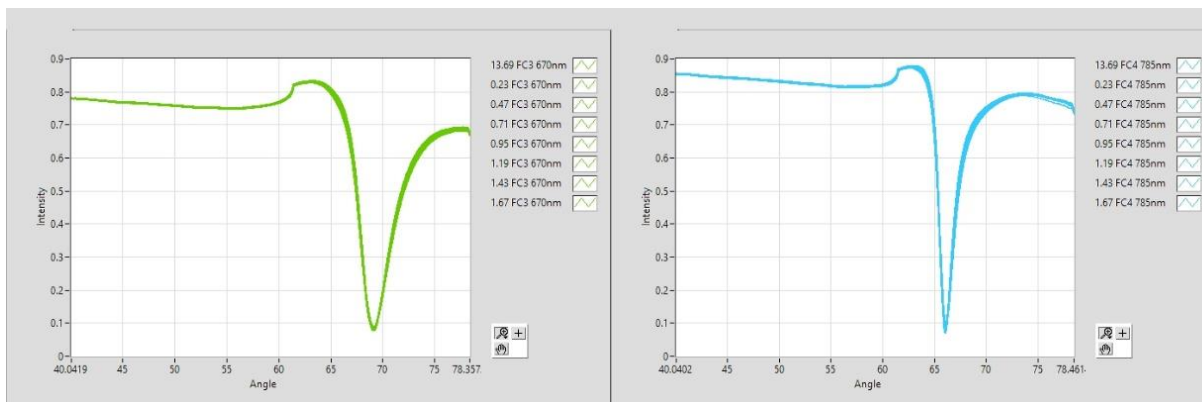
En este sentido es congruente considerar que las NPAu son más grandes que las Nseeds, por lo que el  $\Delta F$  puede deberse entonces a la liberación de agua y sales por parte del hidrogel. Esta idea está sustentada con el sensograma de SPR presentado en la Figura 63, en este se ve que cuando entran en contacto las NPAu con la superficie, esta pierde espesor; es decir, es comprimida pero que al volver a PBS no solo recupera su tamaño, sino que este aumenta, ya sea por la adhesión de las NPAu o por la mayor absorción de agua, recordando que los experimentos se llevaron a buffer de PBS con pH de 7.4 a 25 °C.



*Figura 63. Sensograma de SPR de la interacción de NPAu con un hidrogel de alginato.*

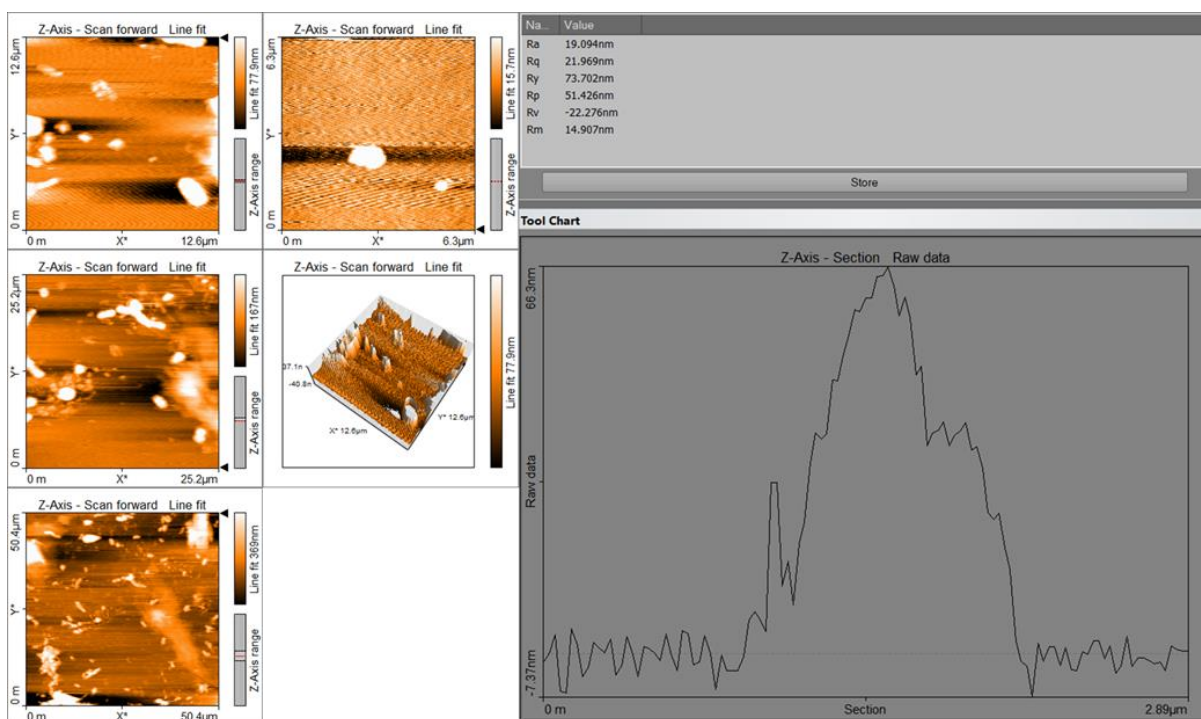
Utilizando la ecuación descrita previamente para el láser de 670 nm, entonces el cambio total de espesor fue de 38.13 nm. Lo cual es mucho menor a lo esperado con sistemas que se calcularon en DLS con cerca de 125 nm de diámetro (

Figura 24). Incluso en las curvas de SPR de la Figura 64, el cambio en el ángulo es muy pequeño, pero está presente por lo que no se puede decir que no hay material adsorbido, pero tampoco se puede definir completamente a que se debe ese cambio, quizá se deba a las NPAu de menor tamaño en la distribución que tenían la fuerza suficiente de adhesión para permanecer en la superficie.



*Figura 64. Curvas de SPR para la interacción del hidrogel de alginato con NPAu.*

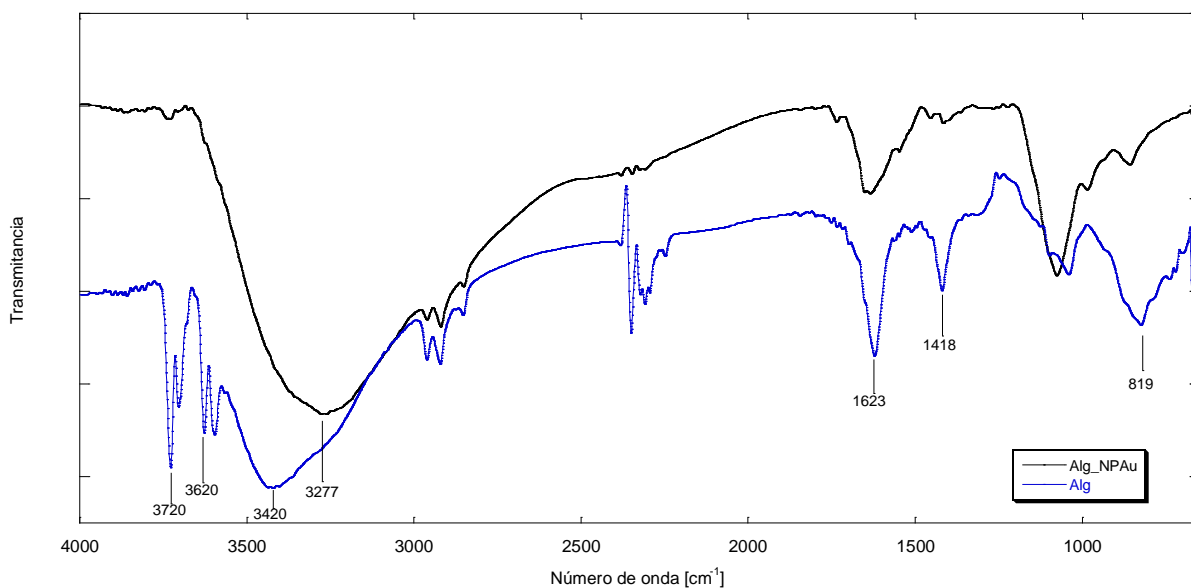
Por otro lado, la observación por AFM de la superficie que interactuó en la QCM-D (ver Figura 65), muestra la clara presencia de las NPAu sobre la superficie. La rugosidad media es de 19 nm, lo cual es la mitad del espesor calculado con el cambio de ángulo en el sensograma de SPR (Figura 63); pero, la rugosidad máxima es de 71 nm lo que es el valor para las NPAu de menor tamaño por lo que quizá las interacciones con el alginato no son lo suficientemente fuertes con el área superficial para retener a las NPAu sobre la superficie.



*Figura 65. Imágenes de AFM de la superficie con alginato y NPAu.*

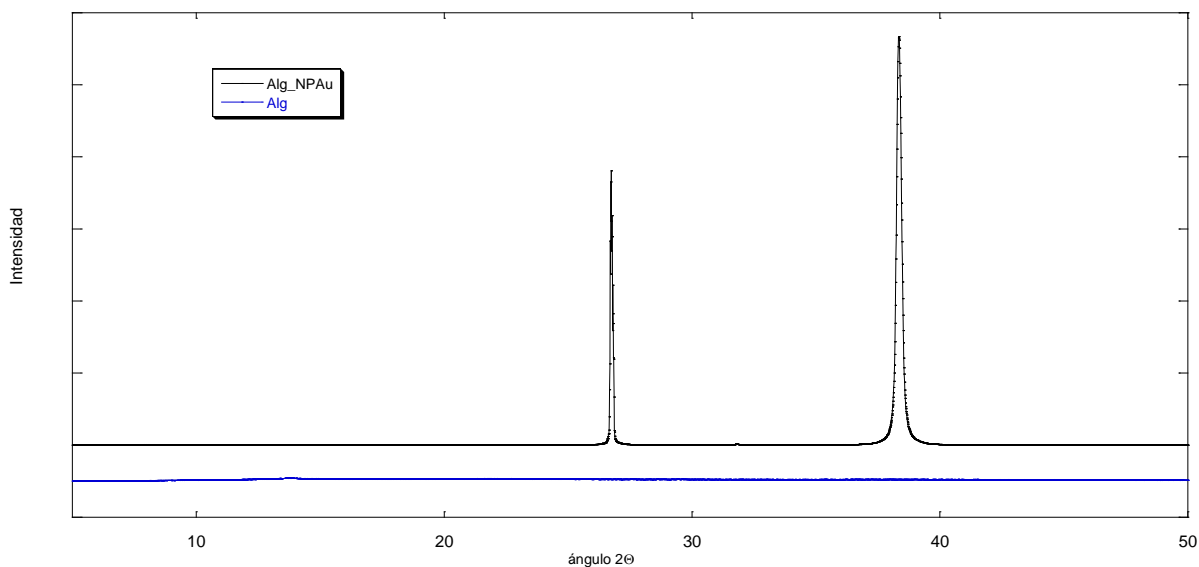
En la Figura 66 se presentan los espectros de FTIR de la superficie de alginato y el obtenido de la superficie de alginato con las NPAu. El cambio más notable es que las bandas de aminas de  $3720$  y  $3620\text{ cm}^{-1}$  no se encuentran después de la interacción con las NPAu por lo que deben de estar ocluidas, o bien si interactúan, se formaría un enlace Au-NH el cual no es observable en FTIR. Así mismo se ve que la banda en  $1418\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las flexiones de  $\text{CH}_3$  desaparece y crece una banda que se encuentra cerca de los  $800\text{ cm}^{-1}$  que pueden ser flexiones de  $\text{CH}_2$  alifáticos. Finalmente, se ve un corrimiento de los estiramientos O-H de  $3420$  a  $3277\text{ cm}^{-1}$  después de la interacción, por lo que puede presentarse un cambio estructural que le permite mayor movilidad a estos grupos.

Cabe recalcar que como en los otros casos de alginato, las bandas de los carboxilos y carbonilos que podrían ser vistos en los sistemas fotodinámicos, desaparecen; lo que indica un proceso de desplazamiento de estos para ser sustituidos por el alginato.



*Figura 66. FTIR de la superficie de alginato antes y después de la interacción con NPAu.*

En el difractogramas de la Figura 67, se ve que aparecen los picos correspondientes al sistema de NPAu, las cuales se ven mucho más intensas que cuando se observaron en la superficie de vidrio, esto se presentó en la Figura 29. El pico más intenso es el correspondiente al plano (111) del oro.



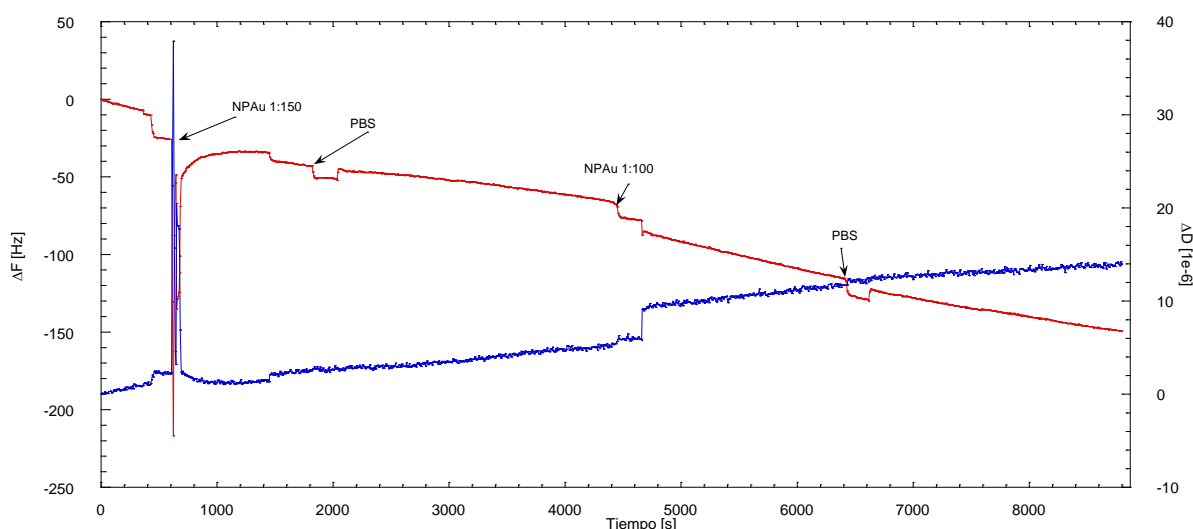
*Figura 67. Difractograma de la superficie del hidrogel de alginato antes y después de la interacción con NPAu.*

Las espectroscopias y microscopía demuestran los cambios debido a la presencia de las NPAu en la superficie aun cuando el SPR y la QCM-D no puedan hacer mediciones claras de cómo es esta interacción.

Esta diferencia entre las Nseeds y NPAu puede ser por el cambio en la forma en la que las NPAu pueden interactuar con la superficie a consecuencia del tamaño y morfología, pues se encontró en la isoterma mostrada anteriormente (Figura 43) que las Nseeds sí interactúan con la superficie y éstas son los centros de nucleación para el crecimiento de la coraza de las NPAu, por lo que la interacción similar debiese existir.

### 7.3.4.2. Quitosano

La interacción de las NPAu con el hidrogel de quitosano es más clara; en la Figura 68 se puede ver en la isoterma de QCM-D, el cambio negativo en la frecuencia (rojo), lo cual está relacionado con la adsorción de los materiales. Es este caso, la adsorción al entrar la dilución 1:150 es clara y se estabiliza mucho más rápido que en el caso anterior, pero a partir de ahí al entrar el PBS se ve un ligero cambio negativo que debe de estar relacionado con la absorción de agua por parte de la superficie, esto continúa pasando aun cuando se le agregan más NPAu y encuentra un equilibrio que después vuelve a modificarse por la absorción de agua.



*Figura 68. Isotherma de QCM-D a 25 °C de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano.*

La adsorción de NPAu también es visible por los cambios de disipación (azul), este cambio muestra un aumento en la rigidez del sistema. El  $\Delta D$  es tan grande que no se puede considerar una superficie rígida, lo que soporta la idea de que se da un intercambio entre las NPAu y el agua que tiene el hidrogel.

Esta adsorción también es visible en SPR, la Figura 69 muestra de igual forma un cambio en la superficie del hidrogel, aumentando su espesor en gran medida. En el sensograma completo, se puede ver que los cambios son pequeños cuando se ponen diluciones, pero al momento de poner



la solución concentrada el cambio es de más de 7 grados, por lo que la adsorción sí es dependiente de la concentración a la que se expone el hidrogel.

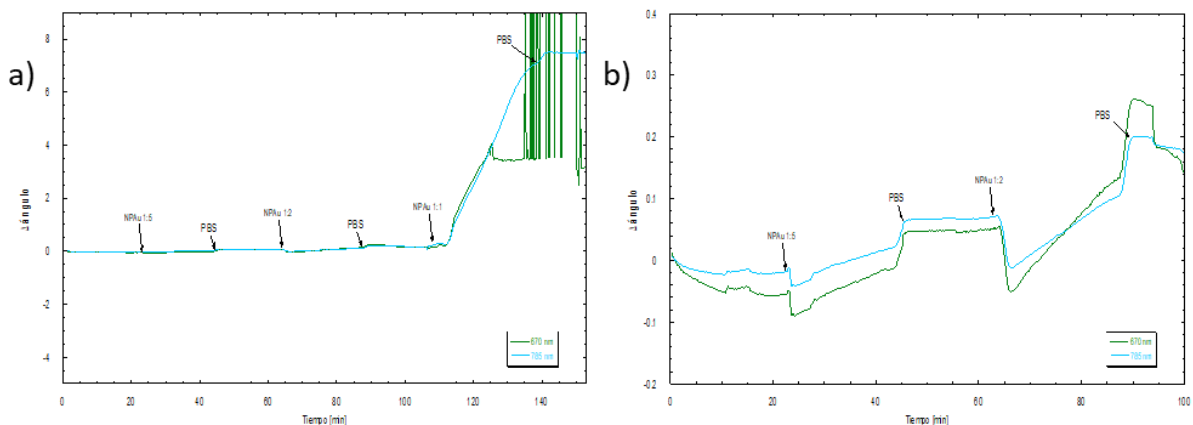


Figura 69 Sensograma de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano.

El láser con longitud de onda de 670 nm (verde) tiene un cambio mayor que el láser de 785 nm, tal es que la medición no puede completarse mostrando señales parecidas a ruido en la Figura 69a, pues el cambio en grados es tal que se sale del rango de medición; esto puede observarse en la primera parte de la Figura 70. El cambio tan grande puede deberse al mismo tiempo a la interacción de la superficie recubierta de NPAu, que si recordamos tiene su máximo muy cercano a ese valor, por lo que estarían absorbiendo la radiación modificando así el plasmón del sensor.

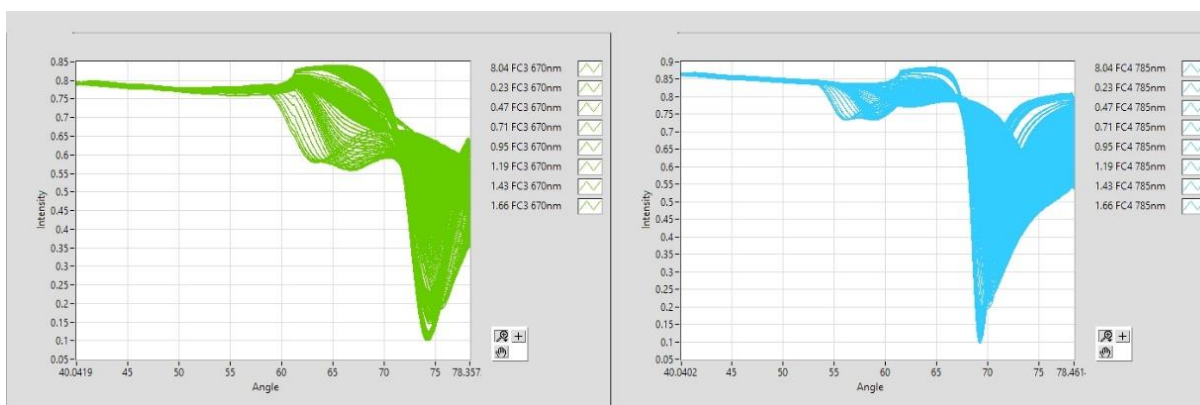
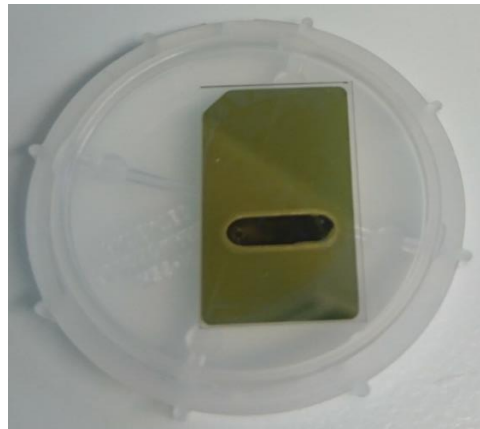


Figura 70. Curvas de SPR de la interacción entre NPAu y un hidrogel de quitosano.

*En la segunda gráfica de la Figura 69 b se muestra el sensograma hasta el minuto 100 para poder ver los cambios antes de la interacción con la solución concentrada. Recordando que la técnica de SPR no ve los cambios por la interacción del agua, entonces tiene sentido que cuando estén las NPAu en el medio haya un aumento en el espesor, pero no cuando está en el PBS, que por el contrario estabiliza estos cambios. El cambio total en la interacción seguido con el láser a 785 nm es de 0.2 grados, que si se calcula el cambio de espesor da un valor de 198.6 nm, lo cual está en el mismo orden que las mediciones de DLS de las NPAu (ver*

Figura 24).

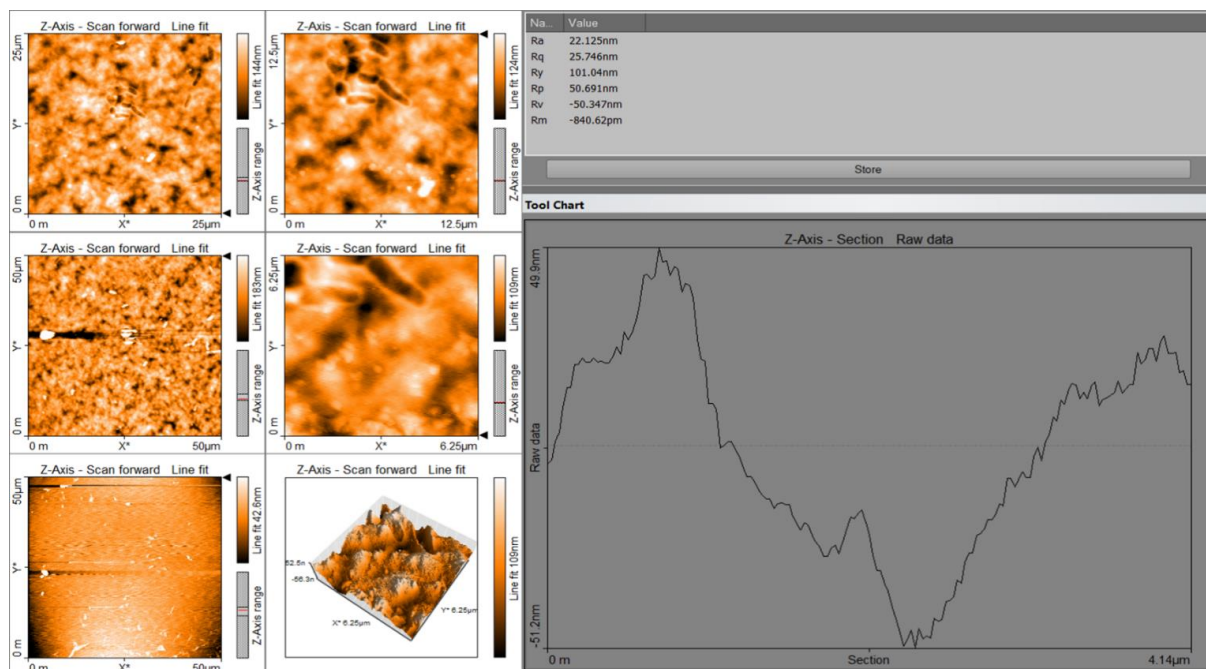
Tomando eso como cierto, entonces la concentración crítica para recubrir la superficie del hidrogel es de  $2.26 \times 10^{-10}$  nM. Esto considerando que después de este cambio, el incremento que se ven con la solución concentrada se debe a la formación de multicapas sobre el hidrogel ya recubierto. Esto puede ser congruente si observamos la Figura 71; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en la cual se observa el exceso de material depositado sobre la superficie, pues generalmente solo genera un poco de iridiscencia sobre los sensores.



*Figura 71. Fotografía del sensor de SPR con la película del hidrogel de quitosano después de la interacción con NPAu.*

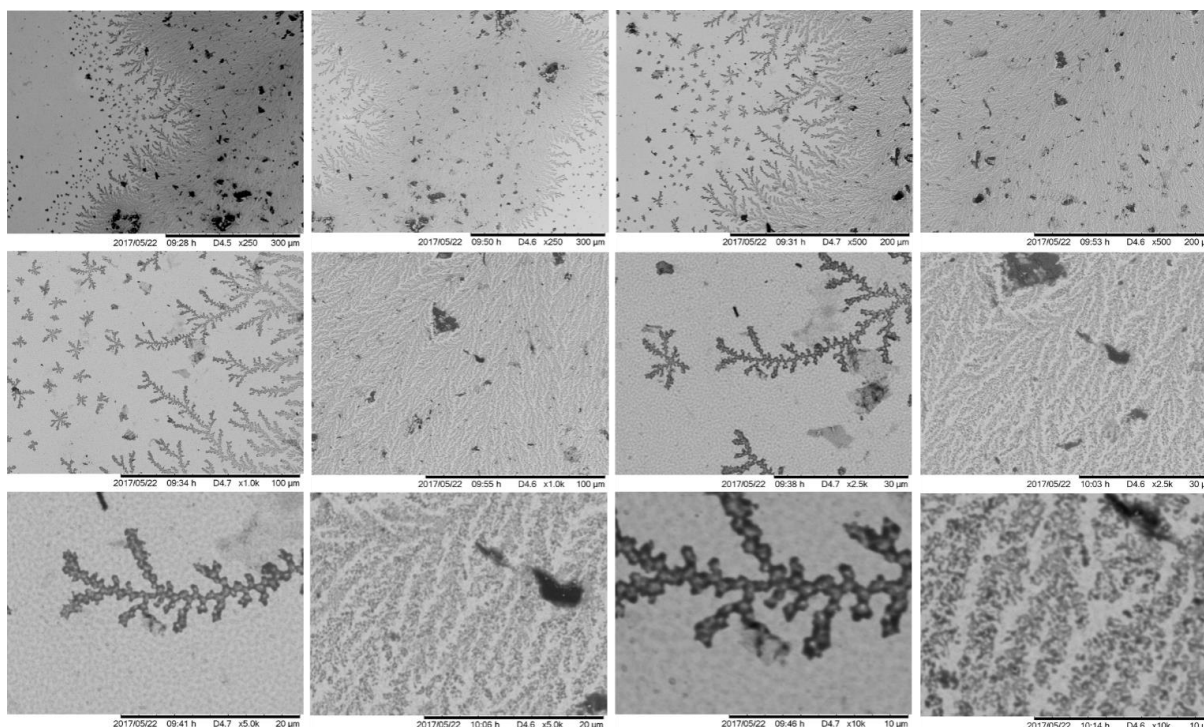
Tomando el máximo de  $7.8^\circ$  en el cambio total del ángulo para el láser de 785 nm, se tiene un cambio de rugosidad ( $\Delta d$ ) igual a 7.7469 micras. Por lo que está por encima de lo deseado para la interacción de las células con el hidrogel pues la cobertura de los sistemas no permitirá la interacción con los polímeros, sólo se daría la interacción célula-NPAu.

En la Figura 72 se muestran las imágenes de AFM de la superficie con el hidrogel de quitosano con NPAu generado en la QCM-D. Aquí  $R_a$  y  $R_q$  están por arriba de los 20 nm, y nuestro  $R_y$  es de 101 nm, lo cual es congruente con las dimensiones esperadas para NPAu. Si se observa la gráfica 3D de la figura, se ve que las elevaciones son irregulares y que tiene la unión de distintas partículas contiguas, lo que indica que adquieren una conformación sobre el hidrogel.



*Figura 72. Imágenes de AFM de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano.*

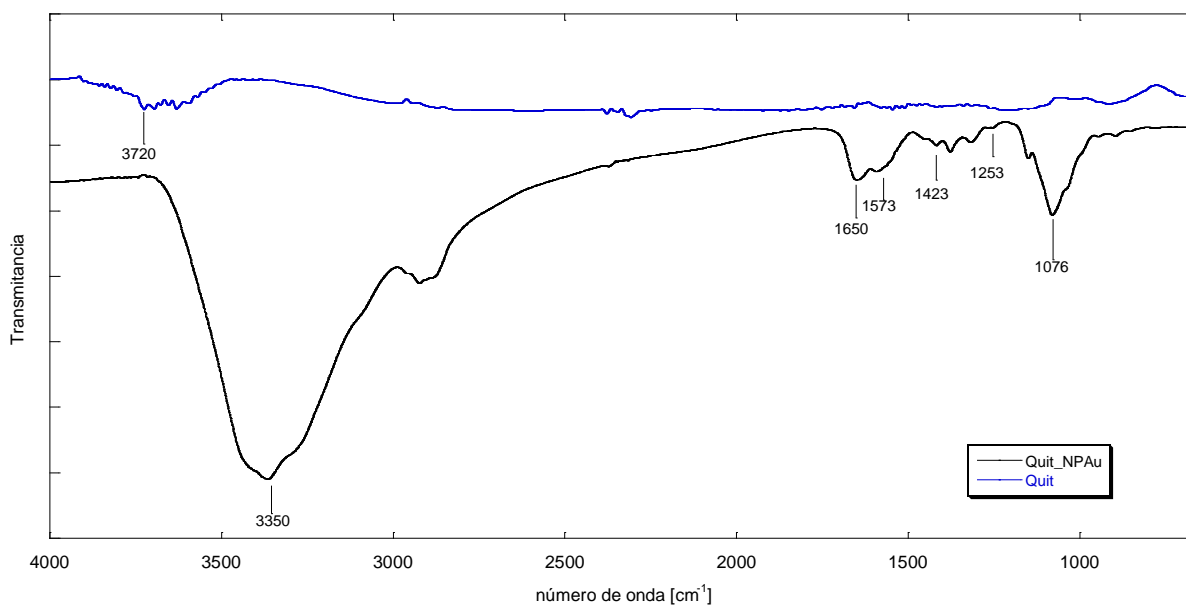
Esta conformación es visible en las micrografías de SEM de la Figura 73. Como se observa forma ramificaciones muy parecidas a las que se encontraron en los depósitos sobre vidrio (ver Figura 31).



*Figura 73. Micrografías de SEM de la interacción entre NPAu con un hidrogel de quitosano.*

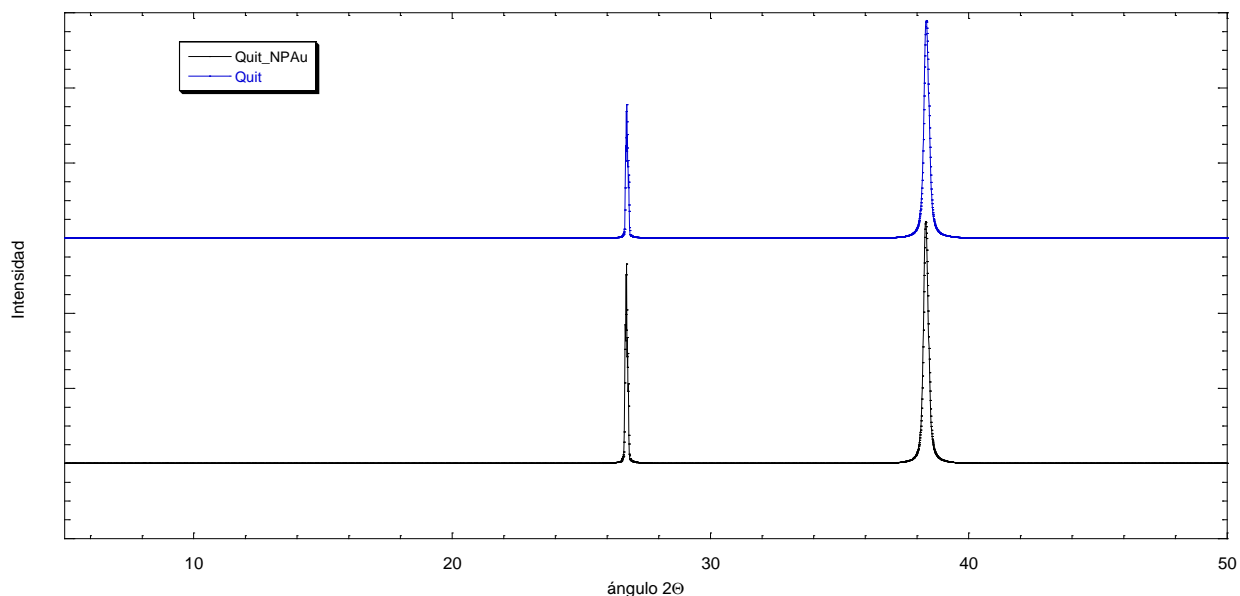
La interacción de NPAu con el hidrogel también es visible mediante FTIR, en la Figura 74 se presentan los espectros de la superficie de quitosano antes y después de la interacción con NPAu, en estos espectros se puede ver que hay una disminución y desaparición de las bandas de aminas que se encuentran el  $3720\text{ cm}^{-1}$ , lo que podría ser consecuencia de la formación de enlaces N-Au, los cuales no se encuentran en FTIR. También se presentó la aparición de bandas cercanas a lo esperado para las nanopartículas de oro en  $1573$ ,  $1423$  y  $1253\text{ cm}^{-1}$ , lo que tiene sentido al decir que no se eliminan los citratos al interactuar con el quitosano, haciendo la interacción dirigida por las cargas de estos grupos. También se ven las bandas en  $1650$  y  $1076\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con los enlaces C-O dobles y sencillos respectivamente, las cuales pueden ser algunos citratos que hayan sido desplazados y atrapados por el quitosano, o bien los propios del polímero.

Otro cambio por resaltar es que la banda de estiramiento de los hidroxilos es más intensa que las demás después de que se añadieron las NPAu al hidrogel, tanto que el espectro de la superficie de quitosano parece plano.



*Figura 74. FTIR de las superficies de quitosano y de quitosano con NPAu.*

Finalmente, para los difractogramas presentados en la Figura 75 se puede ver que no hay cambios significativos en la intensidad del pico cercano a  $40^\circ$ , pero el pico ubicado en  $27^\circ$  se ve con un aumento en su intensidad, por lo que la estructura de las NPAu parece dictar el cambio con el hidrogel.



*Figura 75. Difractograma de las superficies de quitosano y la de quitosano con NPAu.*

Todas las mediciones muestran que existe un cambio importante entre el hidrogel de quitosano después de la interacción con las NPAu; la interacción es tan fuerte que logra tener un acomodo sobre la superficie, que de continuar genera multicapas llegando a más de 7 micras de espesor.

El acomodo sobre la superficie parece realizarse en forma de ramas parecidas a dendrimeros, las cuales sirven como base para la posterior deposición de NPAu sobre ellas. Esta interacción podría ser utilizada para generar una capa y modificarse con otros elementos bioactivos sobre superficie de las NPAu en una aproximación capa por capa.

### 7.3.4.3. Aginato-Quitosano

Para el caso de la interacción del hidrogel combinado de alginato con quitosano con los sistemas NPAu en PBS a pH 7.4 y 25 °C, la isoterma presenta un aumento en la frecuencia (rojo), mientras que el  $\Delta D$  es negativo, por lo que la superficie se comporta como un gel viscoso. El cambio de disipación es tan grande que se puede hablar de un cambio de la estructura del hidrogel, aunque después de que se pone con la dilución 1:25 los cambios se vuelven más sutiles, mostrando que se está estabilizando y dejando de absorber agua y material.

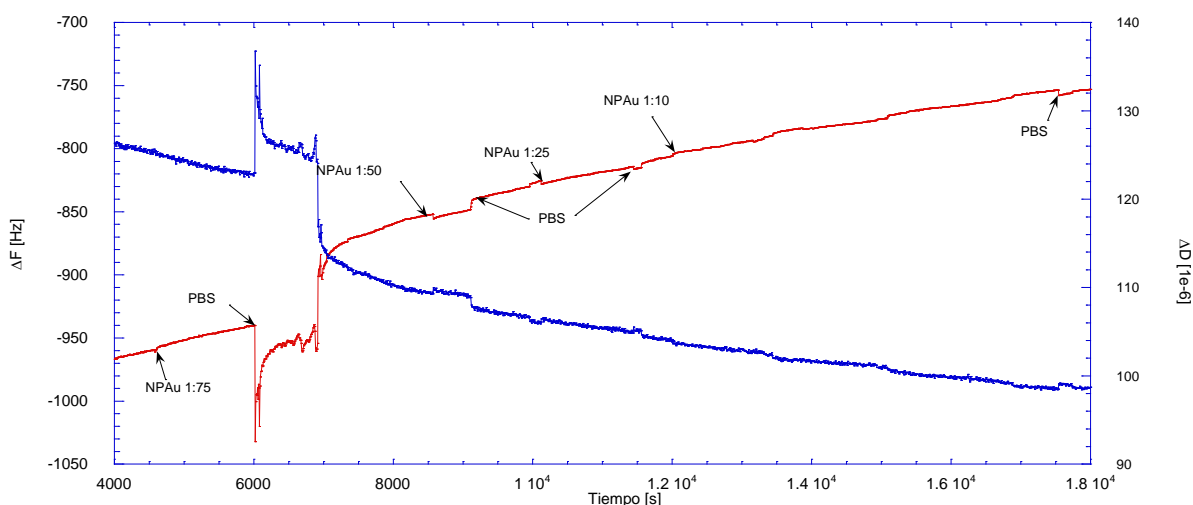


Figura 76. Isoterma de adsorción a 25 °C del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. Mostrando el cambio de frecuencia (roja) y el cambio en disipación (azul) de la superficie.

El cambio en el sensograma de la Figura 77 muestra un comportamiento más estable que el presentado en el sensograma del quitosano (ver Figura 69); para las diluciones 1:5 y 1:2 el comportamiento es similar al alginato (ver Figura 63) donde no presentaba pendientes de adsorción sino un cambio rápido inicial, sin embargo, al llegar al enjuague después de la concentración 1:2 se presenta un cambio positivo, el cual se incrementa exponencialmente al entrar la solución concentrada.

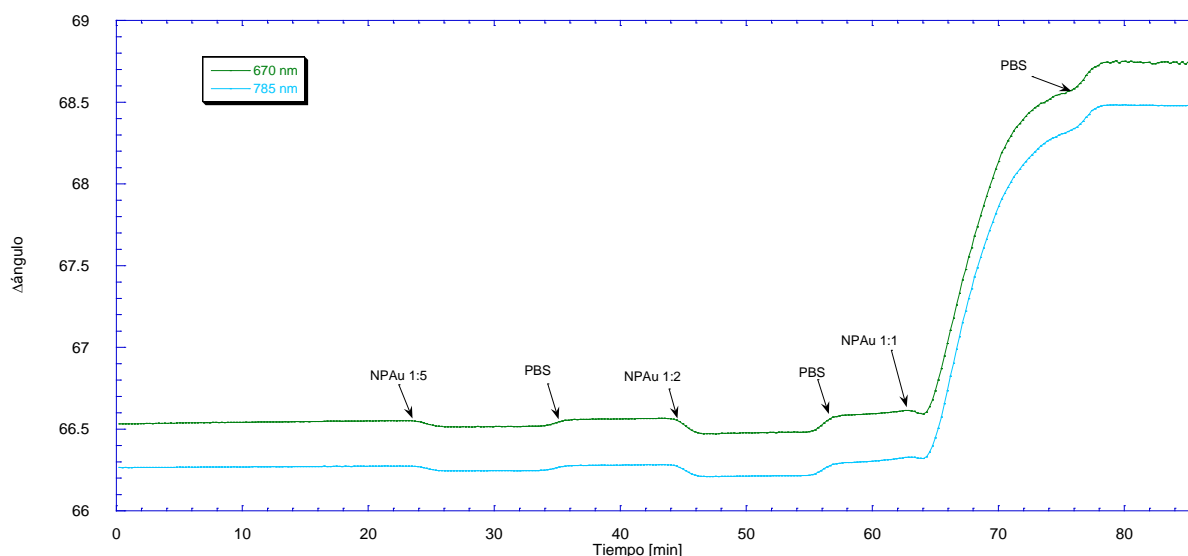


Figura 77. Sensograma del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu. La interacción se dio en PBS como medio a un pH de 7.4 y 25 °C.

Incluso los cambios en las curvas mostradas en la Figura 78 son más discretos que los del hidrogel de quitosano. Para la combinación de polímeros el  $\Delta d$  total es de 2.23 micras, mientras que el cambio hasta antes de que entre en contacto la solución concentrada es de 69.5 nm.

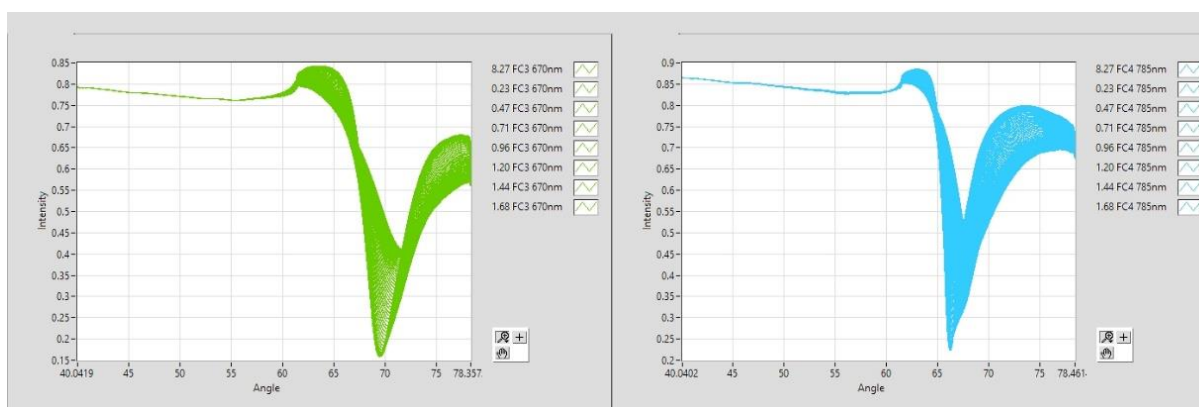


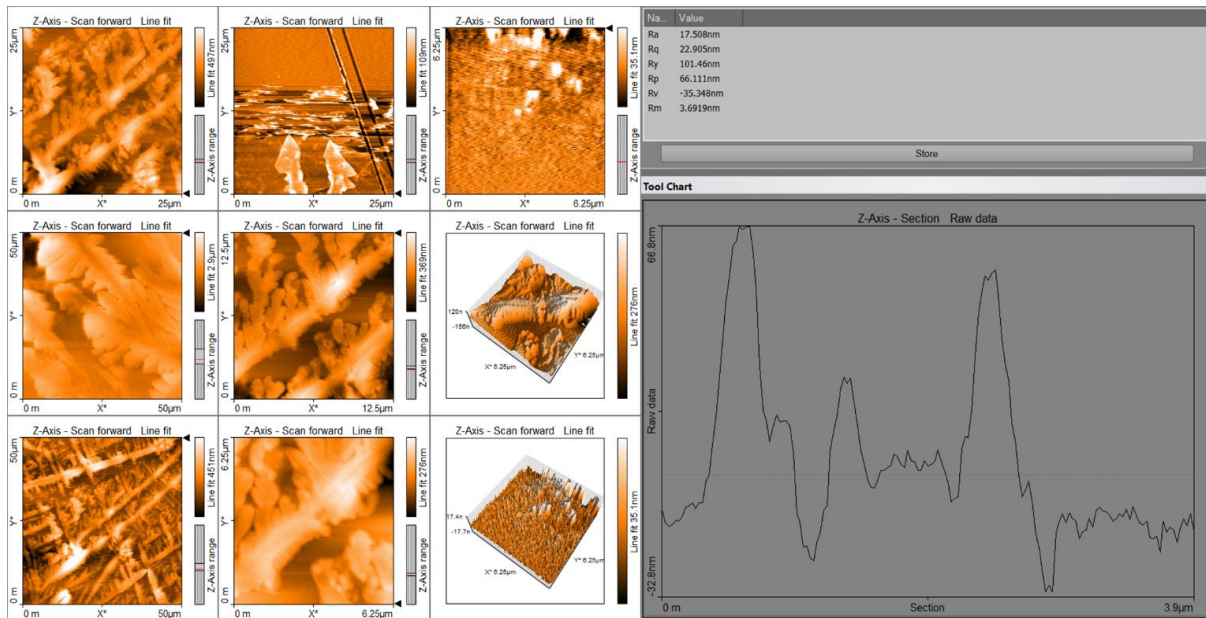
Figura 78. Curvas de SPR del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu.

Aun cuando el cambio total es grande, éste es 3.4 veces menor que cuando se tiene el hidrogel de quitosano puro, estos cambios en la proporción deben de ser por las distintas fases que se encontraron en las microscopias del hidrogel de alginato-quitosano (ver Figura 41 y Figura 42).



Es posible que las NPau interactúen primero con alginato que rodea al quitosano, ocasionando un cambio conformacional del hidrogel, esto se explicaría los cambios de disipación de la isoterma de QCM-D (ver Figura 76) y la mayor absorción de agua que se presenta, así mismo que las interacciones al inicio en el sensograma de SPR (ver Figura 77) sean tan similares al hidrogel de alginato solo (ver Figura 63) para después ser más parecidas al comportamiento presentado en la isoterma del hidrogel de quitosano (ver Figura 69).

La presencia de las NPau sobre la superficie es apreciable en la Figura 79, ahí se pueden ver estructuras complejas como en el hidrogel de quitosano (ver Figura 72), pero también se ven zonas con mayor dispersión y con pocas NPau en la superficie.  $R_a$  es de 17 nm mientras que  $R_q$  es de 22 nm, por lo que se encuentran en un orden similar, aun así, lo más notable es que hay elevaciones de más de 100 nm, lo cual es correspondiente a la altura de las NPau (ver Figura 24).



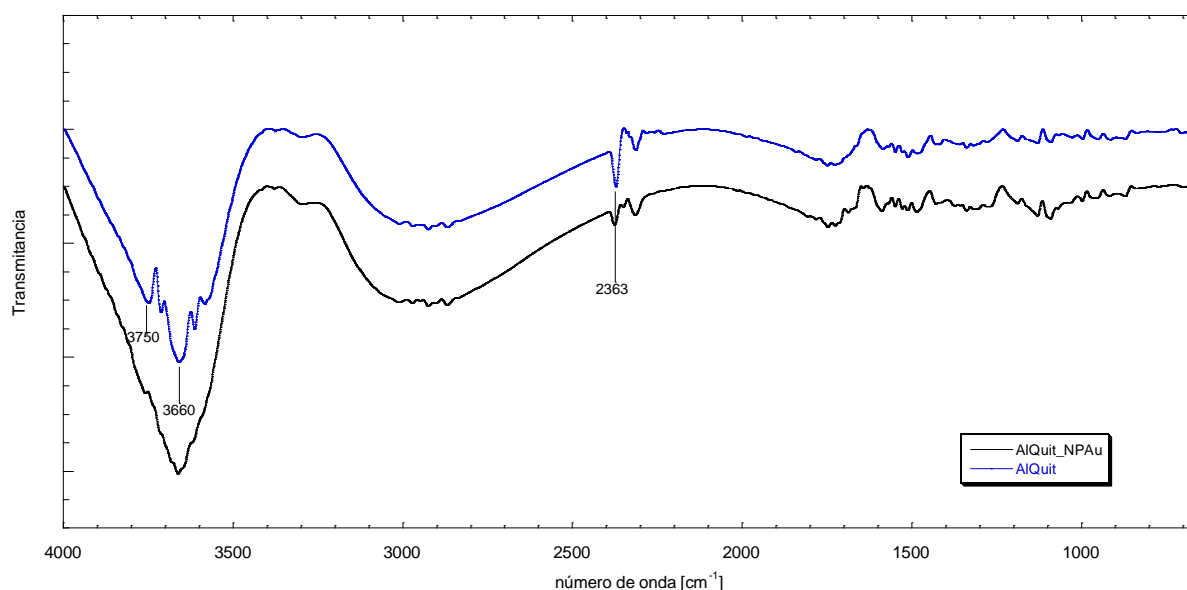
*Figura 79. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato-quitosano con NPau.*

En cuanto a las técnicas espectroscópicas, el espectro de FTIR de la Figura 80 muestra cambios en las bandas de amino del hidrogel, los cuales son menos definidos que en los hidrogeles solos. Las bandas que estaban en  $3750\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del hidrogel (azul) se ven disminuidas en el

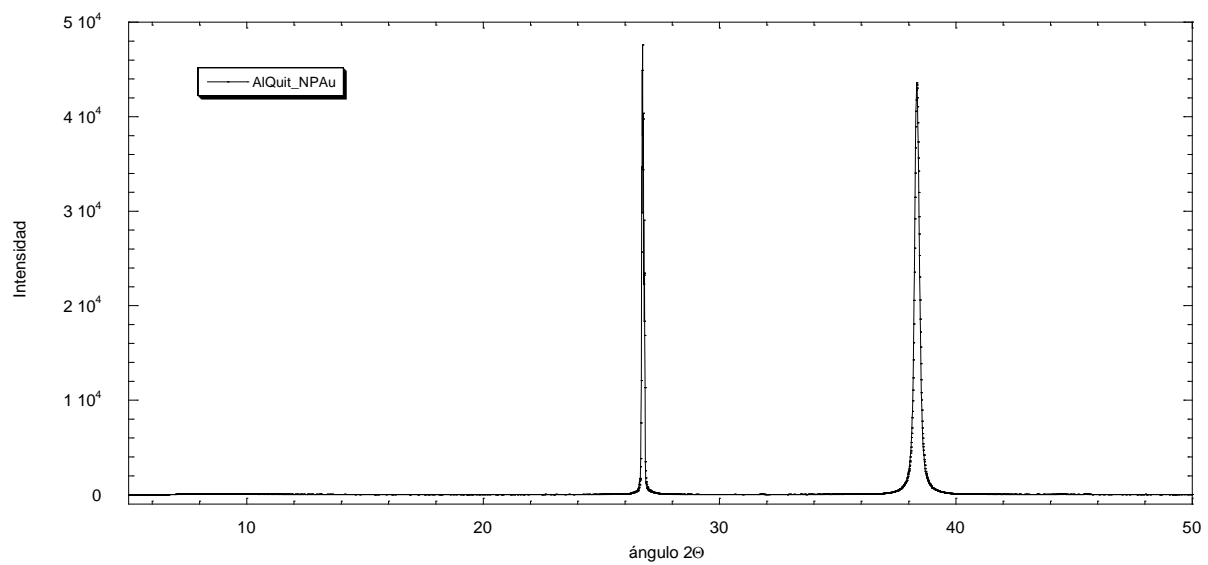
espectro de la superficie con las NPAu (negro) por lo que se puede creer que son estos grupos los que interactúan con la superficie de las NPAu. En  $2363\text{ cm}^{-1}$  se perciben unas bandas de la película de alginato-quitosano, estas bandas corresponden por lo general al estiramiento de los grupos tiol (S-H), mismas que deberían de corresponder a la superficie del sensor, pues fueron los tioles los utilizados para la modificación del sensor para mejorar la unión con las películas de los hidrogeles; estas bandas también se ven disminuidas después de la interacción con NPAu, lo cual puede ser consecuencia de la mayor cantidad de materia sobre la superficie, y la formación de enlaces entre el grupo S con Au.

En estos hidrogeles combinados, los grupos citrato que pueden estar rodeando al oro, no son perceptibles, lo que indica que hay un mayor número de moléculas desplazadas, o bien que no es tan precindible para la estabilización de los sistemas en solución.

En el difractograma de la Figura 81, se ven los picos que se han relacionado con la estructura de las NPAu en  $27^\circ$  y  $39^\circ$ . Esto de igual forma indica la presencia de este sistema sobre la superficie.



*Figura 80. FTIR del hidrogel de alginato-quitosano con NPAu.*

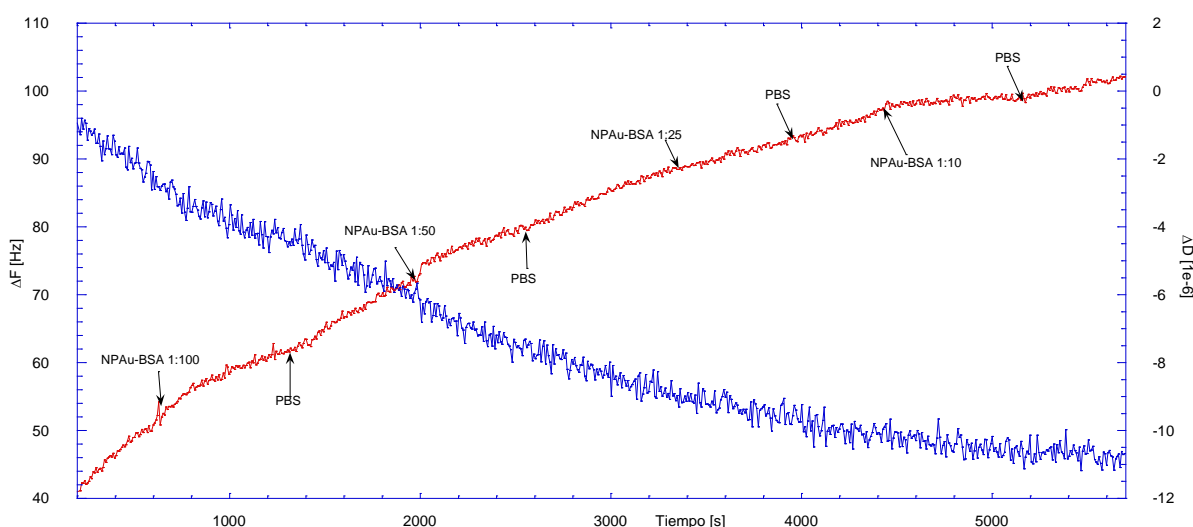


*Figura 81. DRX de la superficie de alginato-quitosano con NPAu*

## 7.3.5. Interacción de las superficies de hidrogeles con NPAu-BSA

### 7.3.5.1. Alginato

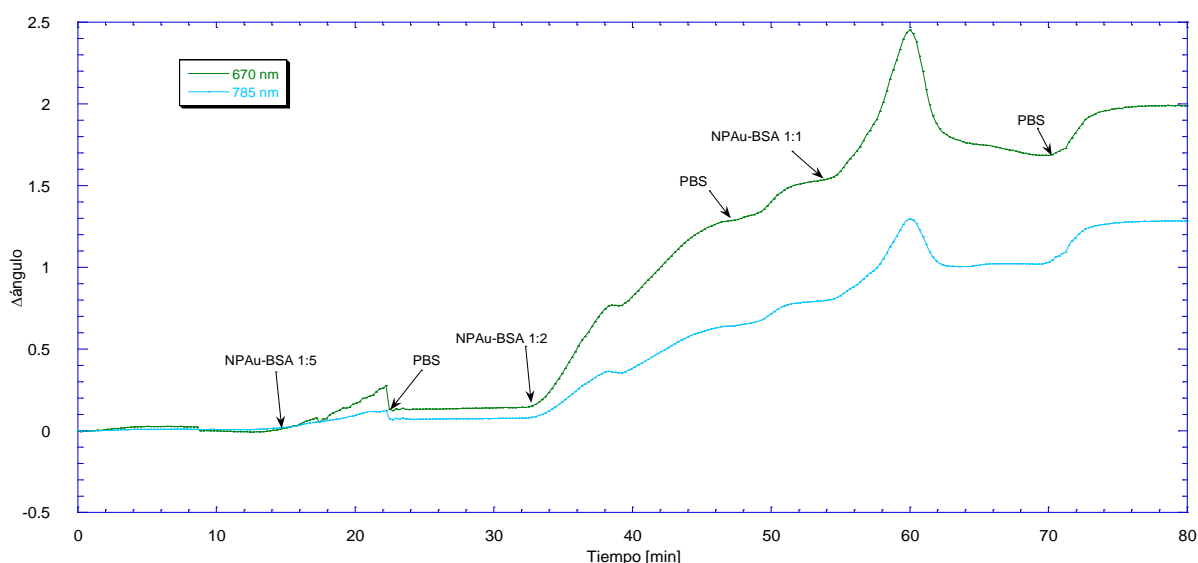
En la Figura 82 se muestra la isoterma de QCM-D del hidrogel de alginato con los sistemas conjugados de NPAu-BSA, al igual que con el hidrogel con las NPAu (ver Figura 62), los cambios de frecuencia (rojo) son positivos, por lo que hay una pérdida de materia sobre la superficie, pero los cambios de disipación (azul) indican que el gel se vuelve más viscoso y se estabiliza hasta que la concentración aumenta considerablemente, cerca de la dilución 1:10. Cuando las NPAu-BSA se encuentran en el flujo sobre el sistema, las pendientes positivas disminuyen un poco comparadas con las tendencias que se observan cuando sólo es PBS en el flujo. Esto puede indicar que sí hay adsorción en la superficie y un reajuste cuando las NPAu-BSA están sobre el hidrogel.



*Figura 82. Isotherma de QCM-D de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA.*

Algo notable es que el cambio de disipación es menor que en los otros casos, dando la mitad que en las isotermas de BSA y NPAu solas (ver Figura 53 y Figura 62). Esto puede ser que al haber una mayor estabilidad en suspensión coloidal (ver Figura 27), los efectos hidrofóbicos son menores por lo que la interacción está dirigida por entropía principalmente.

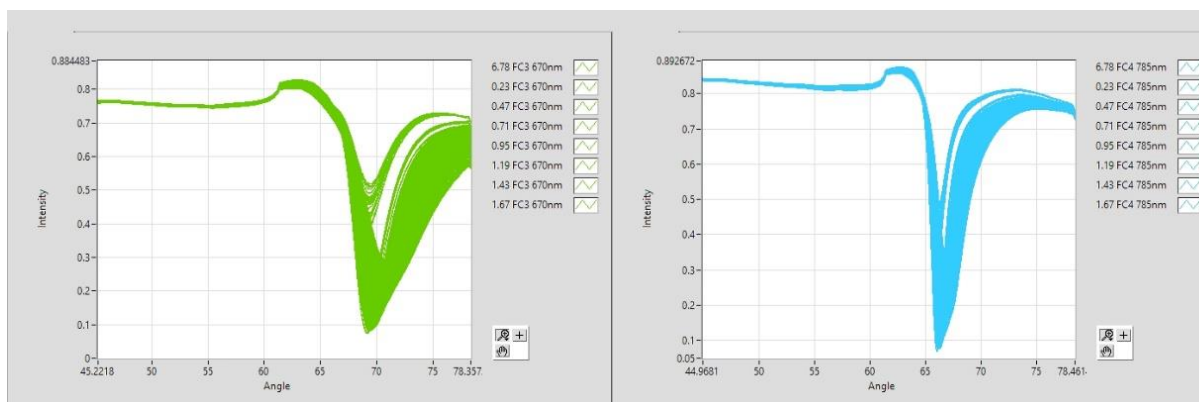
En la Figura 83 se ve el sensograma de SPR del hidrogel de alginato con los sistemas conjugados, en este se ve que los conjugados tiene un proceso de adsorción superior que las NPAu solas (ver Figura 64), incluso cuando la concentración es más baja, pues desde la dilución 1:2 se ve un aumento significativo en el ángulo. Aun cuando existe la interacción, el equilibrio no es unidireccional como con las NPAu, pues llega a un punto de saturación para después volver a disminuir, por lo que parte de lo que se agrega al hidrogel es de nuevo liberado al flujo.



*Figura 83. Sensograma de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA.*

El cambio total de espesor en la superficie en el punto de equilibrio después del último lavado con PBS es de 1.71 micra. Este valor en el cambio de espesor demuestra que las interacciones sí se ven favorecidas respecto a las NPAu solas (ver Figura 63) pero que siguen siendo menores a las interacciones con el quitosano. Este cambio también se ve reflejado en las curvas de SPR mostradas en la Figura 84.

El hecho de que el cambio de la superficie favorezca la unión de los conjugados a la superficie permite una mayor cantidad de propuestas para la modificación de andamios inteligentes.



*Figura 84. Curvas de SPR de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA.*

Al igual que la isoterma y el sensograma, las imágenes de las microscopías de fuerza atómica (ver Figura 85) y las micrografías electrónicas de barrido (ver Figura 86), muestran la presencia de material en la superficie. Los cambios de rugosidad media son de entre un valor de picnómetros a valores entre 6 y 9 nanómetros, por lo que se puede pensar en capas de los conjugados sobre la superficie; así mismo las elevaciones mayores con valores de 35 nm pueden ser consecuencia de la distribución de tamaño que tienen los complejos (ver Figura 26).

Las micrografías de la Figura 86 muestran una distribución en la superficie que no es homogénea, pues se estructura en aglomerados a lo largo de la superficie que parecen crecer con una estructuración particular. En las microscopías de menores magnificaciones se pueden apreciar zonas más oscuras y otras más claras alrededor, lo que correspondería a la NPAu y a la BSA respectivamente, la BSA no está distribuida equitativamente sobre la superficie de la NPAu, por lo que la idea de que se desnaturaliza y forma una corona parece la forma de interacción predilecta [60].

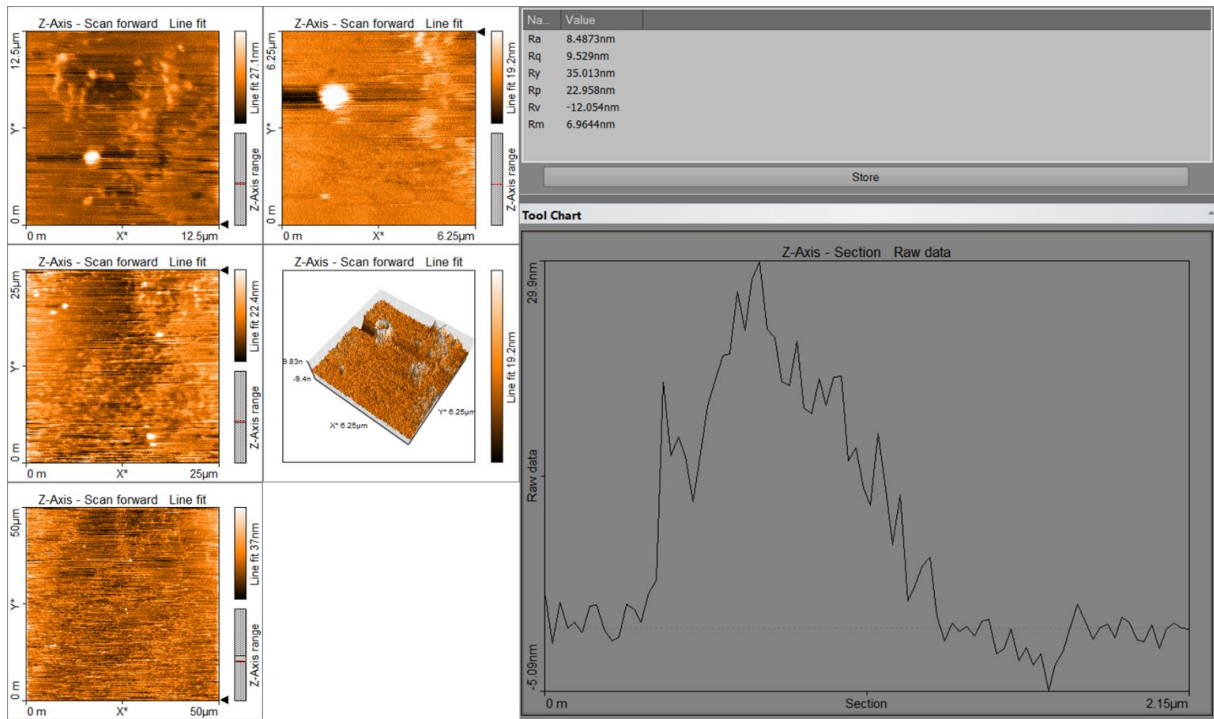


Figura 85. Microscopias de AFM de la superficie de la interacción entre un hidrogel de alginato con los sistemas conjugados NP Au-BSA.

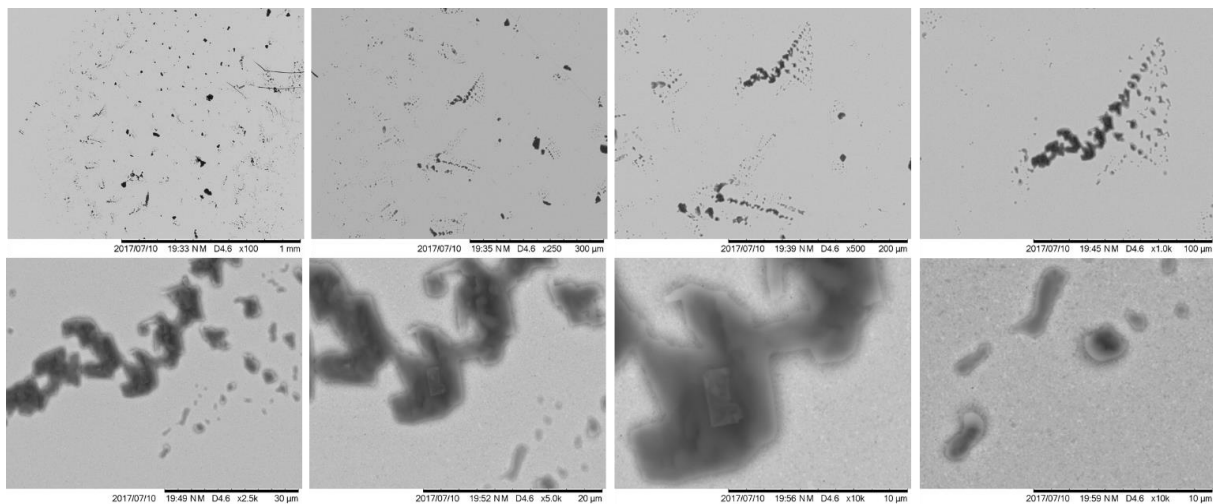
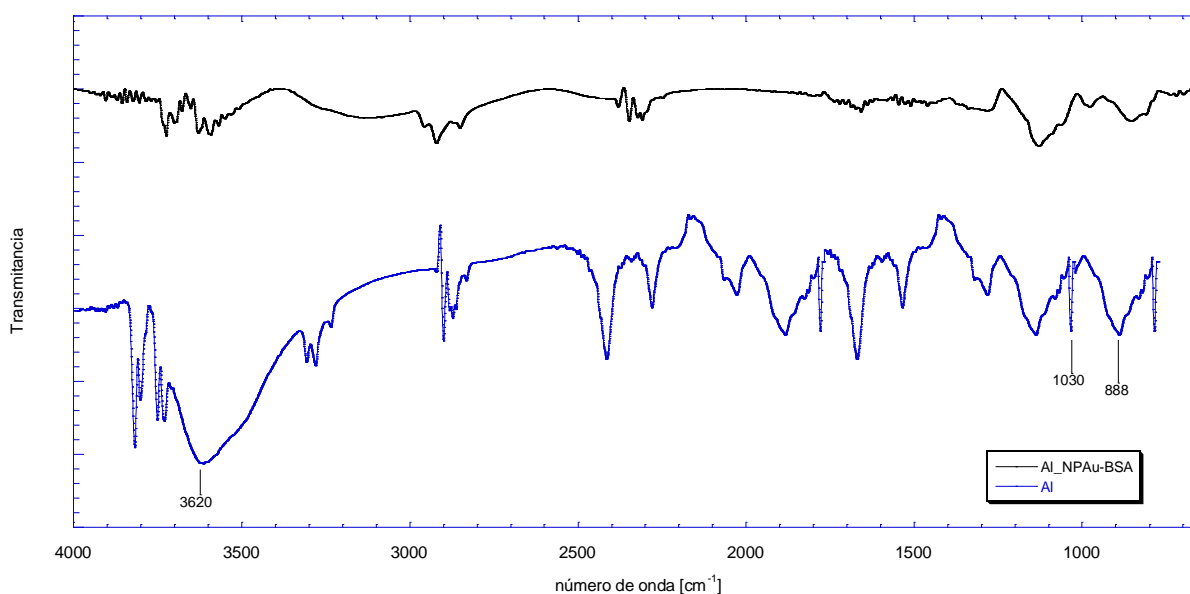


Figura 86. Microscopias de SEM de un hidrogel de alginato con sistemas conjugados NP Au-BSA.

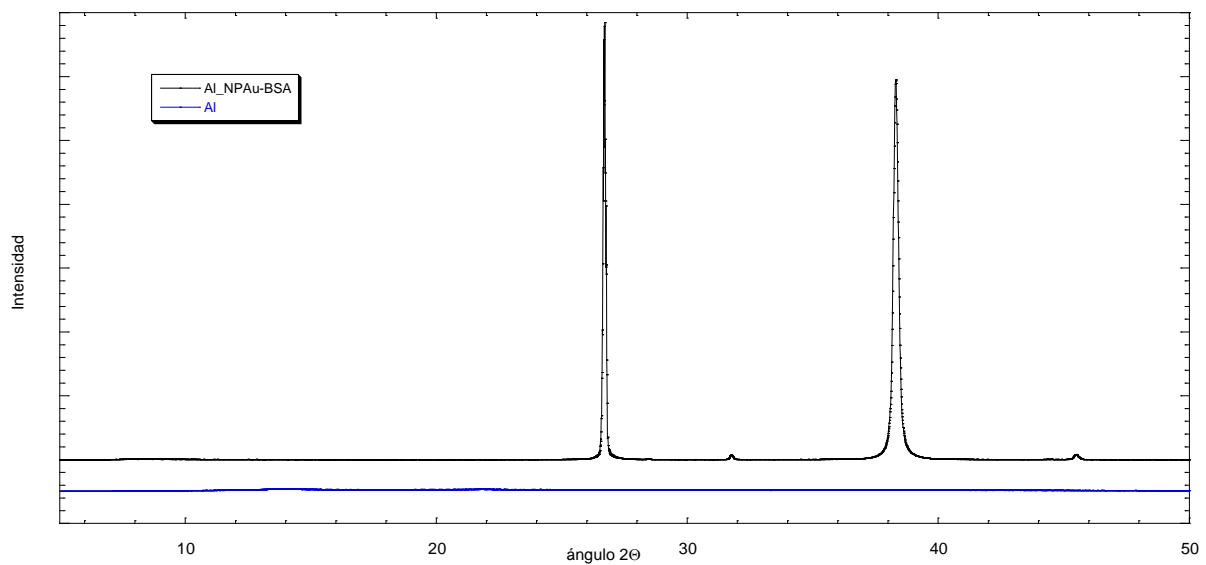
En la Figura 87 se muestran los espectros de FTIR de la superficie de alginato antes y después de la interacción con los conjugados NPAu-BSA, en general la mayoría de bandas disminuyen de intensidad, a excepción de la banda a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , esta es de las pocas que se mantiene y corresponden a la unión C-O, otra banda que se mantiene es la relacionada con los polisacáridos en  $888\text{ cm}^{-1}$ . Un cambio importante es la disminución de las aminas en  $3620\text{ cm}^{-1}$ , los cuales están relacionados con la posible unión de las NPAu con las superficies como fue observado en otros espectros (ver Figura 74 y Figura 80). Estas uniones se perderían por la unión de las aminas mediante los enlaces NH-Au, lo cual inmoviliza el estiramiento de las aminas.



*Figura 87. FTIR de la superficie de un hidrogel de alginato y alginato con los sistemas conjugados NPAu-BSA.*

El difractogramas de la Figura 88 muestra la aparición de picos en  $28^\circ$  y  $39^\circ$  como con las NPAu solas (ver Figura 67), pero a su vez presenta unos picos menos intensos en  $32^\circ$  y  $45^\circ$ . El pico de  $45^\circ$  está relacionado con el plano (200) del oro, por lo que aparenta que las NPAu tienen un mayor orden que las Nseeds (ver Figura 45) lo cual tiene sentido por ser de mayor tamaño y con espículas en la superficie, que son principalmente cristales ordenados.





*Figura 88. Difractograma las superficies de alginato y de alginato con el sistema conjugado NPAu-BSA.*

### 7.3.5.2. Quitosano

La interacción de los complejos NPAu-BSA con el hidrogel de quitosano seguido por QCM-D a las mismas condiciones de los otros experimentos, 25 °C y PBS con pH de 7.4; se muestra en la Figura 89. En ésta se puede observar que los cambios de frecuencia (rojo) son positivos al igual que cuando se hicieron interactuar con el hidrogel de alginato (ver Figura 82). En bajas concentraciones se ve que al estar los complejos en el flujo la pendiente del cambio de frecuencia parece estabilizarse, pero al entrar el PBS vuelve a presentar un aumento. Después de la dilución 1:25, al igual que con las Nseeds (ver Figura 47), es cuando se presenta el cambio más drástico en la estructura del hidrogel, por lo que siguiendo los cambios de disipación (azul) se puede percibir el aumento de agua adsorbida dentro del sistema.

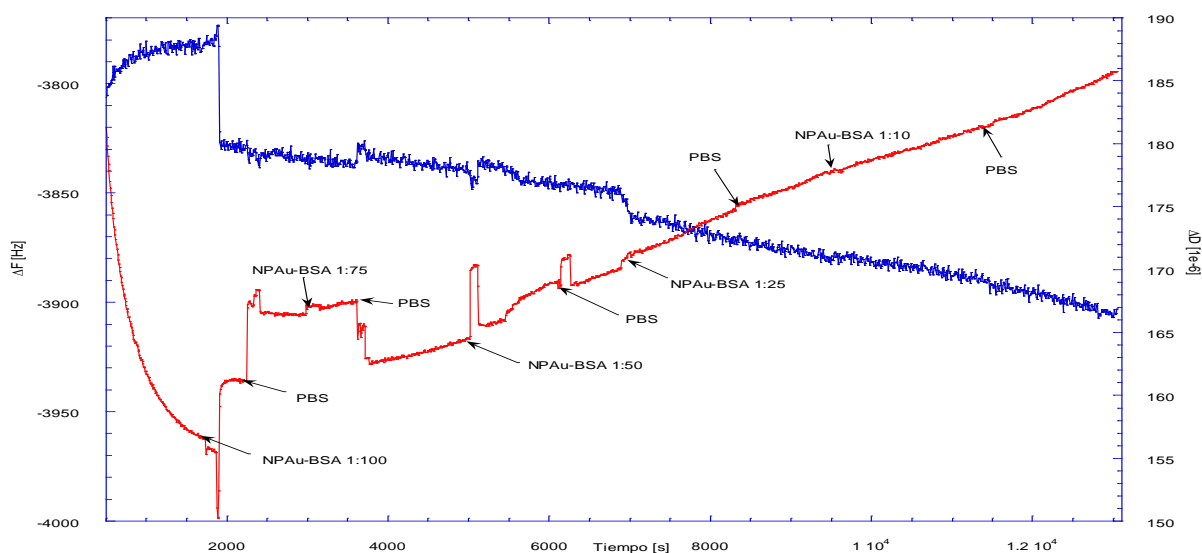


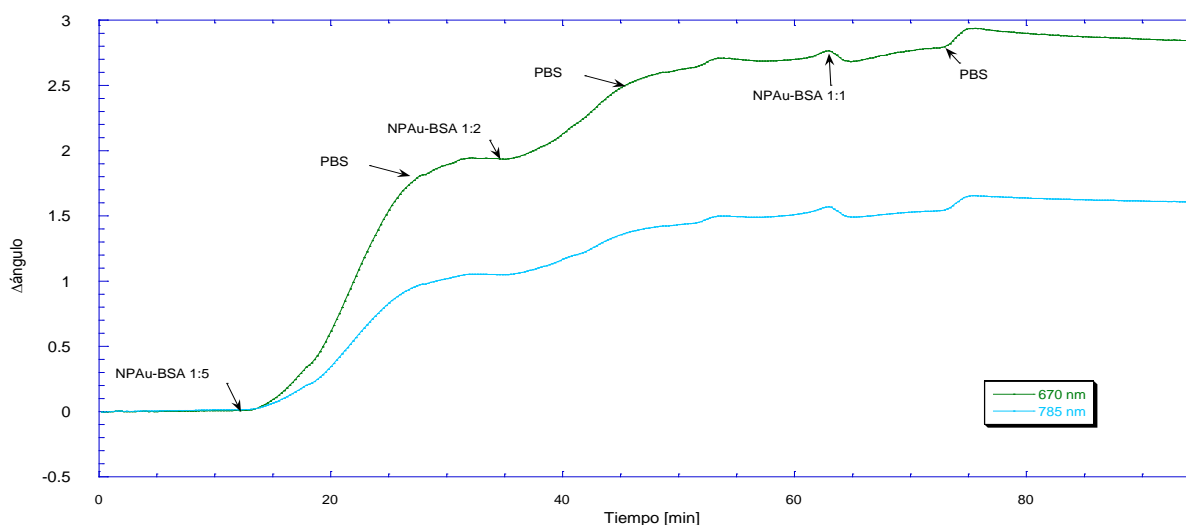
Figura 89. Isotherma de QCM de la interacción entre un hidrogel de quitosano y los sistemas conjugados NPAu-BSA.

Al igual que en los casos anteriores el  $\Delta D$  es de  $20 \times 10^{-6}$ , lo que parece ser constante para este tipo de hidrogeles de polisacáridos [61], incluso para la combinación de diferentes polisacáridos.

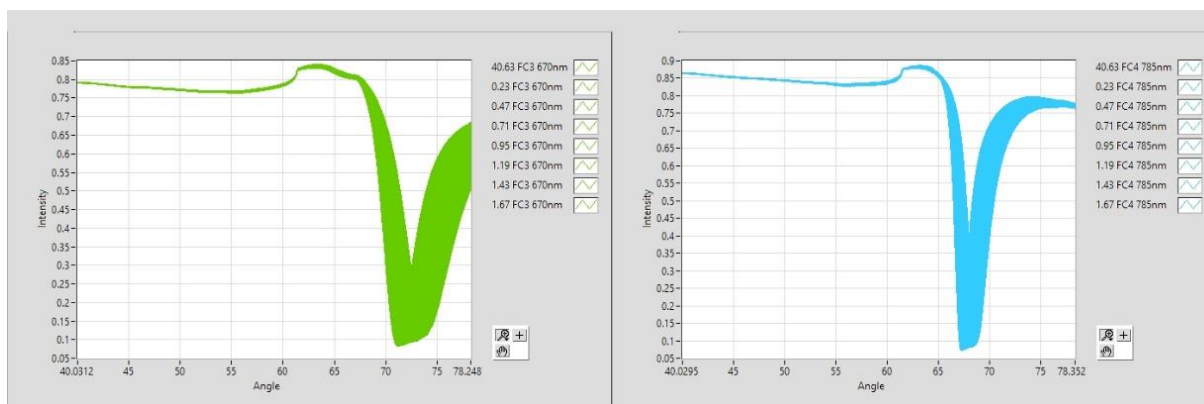
La adsorción seguida por SPR se muestra en la Figura 90 y en la Figura 91. La primera es el sensograma en el cual se puede ver que la interacción entre el hidrogel y los complejos es mucho

más fuerte que con las NPAu solas (ver Figura 69). Desde la primera concentración se ve un gran cambio en el ángulo, de 2 grados, este cambio es similar a lo que se da entre la combinación alginato-quitosano y las NPAu solas.

La saturación del hidrogel parece darse en un valor de 2.8 grados, lo que haría que el  $\Delta d$  sea de aproximadamente 2.1 micras, cerca del 50 % más que con la interacción con el hidrogel de quitosano (ver Figura 83). También cabe resaltar que aquí no parece haber un exceso que se desorba, pero sí hay un cambio después de que se realiza un lavado con PBS; esto indicaría que hay un cambio conformacional en la superficie después del acomodo de los conjugados sobre ella.

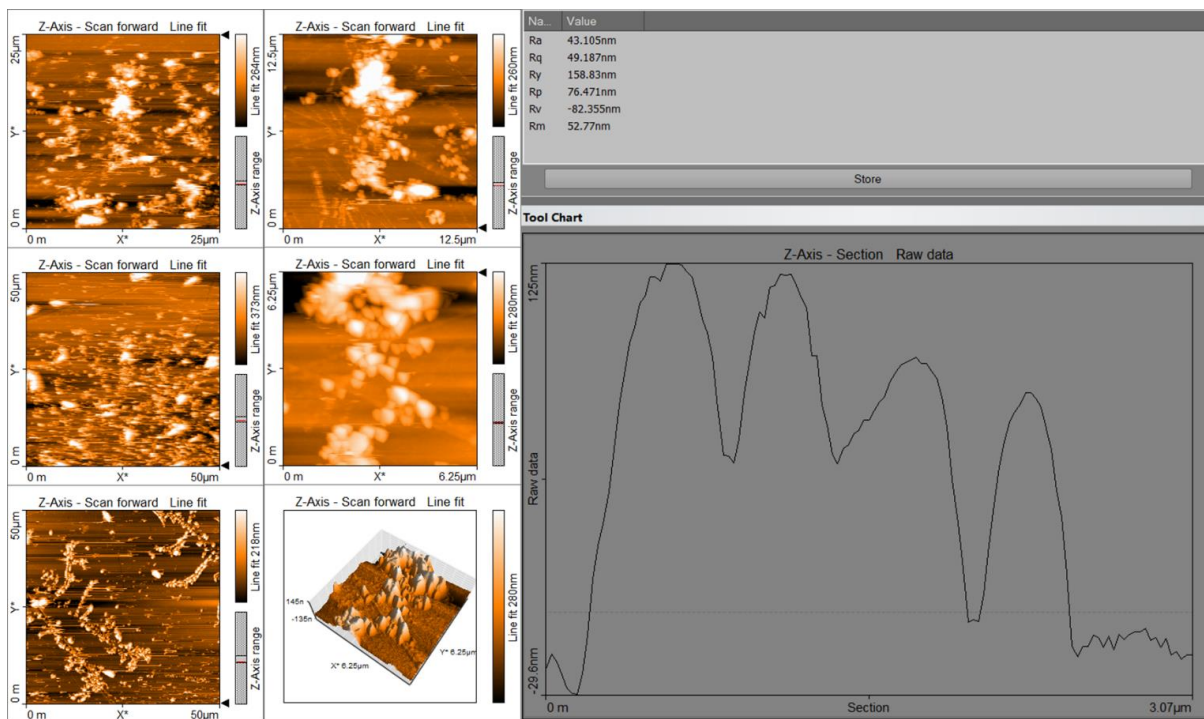


*Figura 90. Sensograma de la interacción de un hidrogel de quitosano con complejos NPAu-BSA.*



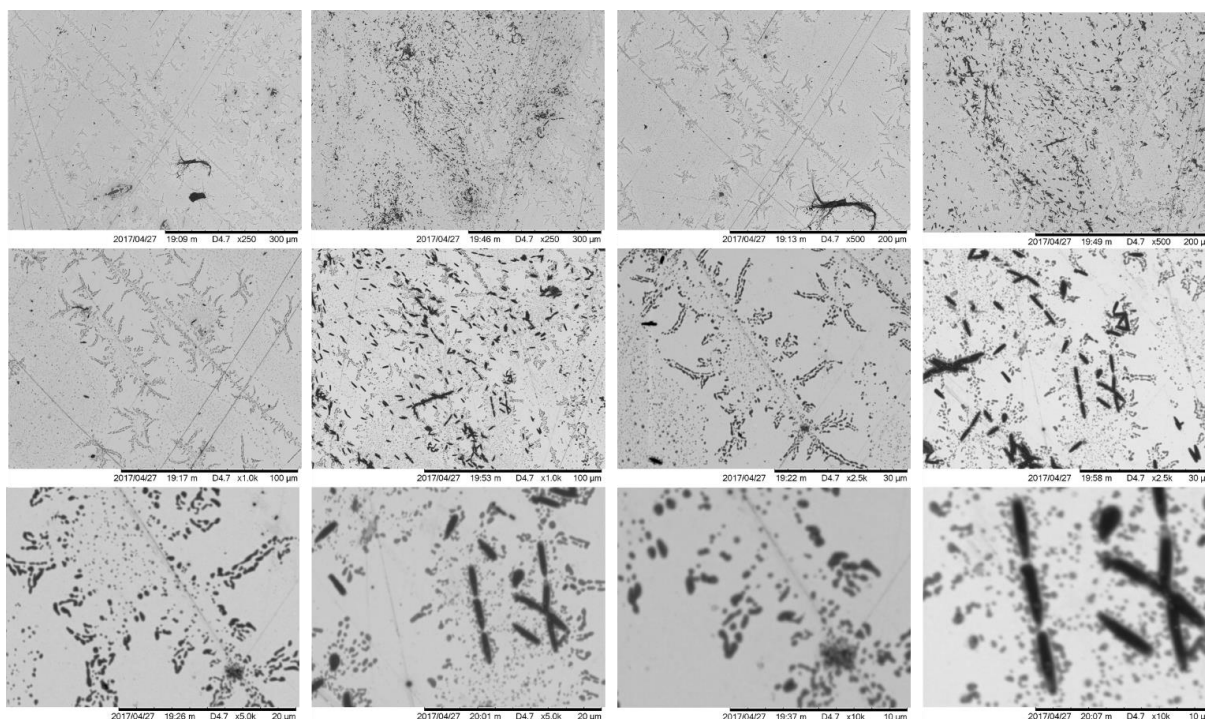
*Figura 91. Curvas de SPR de la interacción de un hidrogel de quitosano con NPAu-BSA.*

Las imágenes de la microscopía de fuerza atómica de la Figura 92 muestran una rugosidad media de entre 40 y 50 nm, que solamente puede ser consecuencia de la presencia de los conjugados sobre la superficie, además el  $\Delta h$  (cambio de Altura). Es de 150 nm en algunas secciones, lo que corresponde perfectamente al máximo en la distribución de tamaños de los conjugados (ver Figura 26).



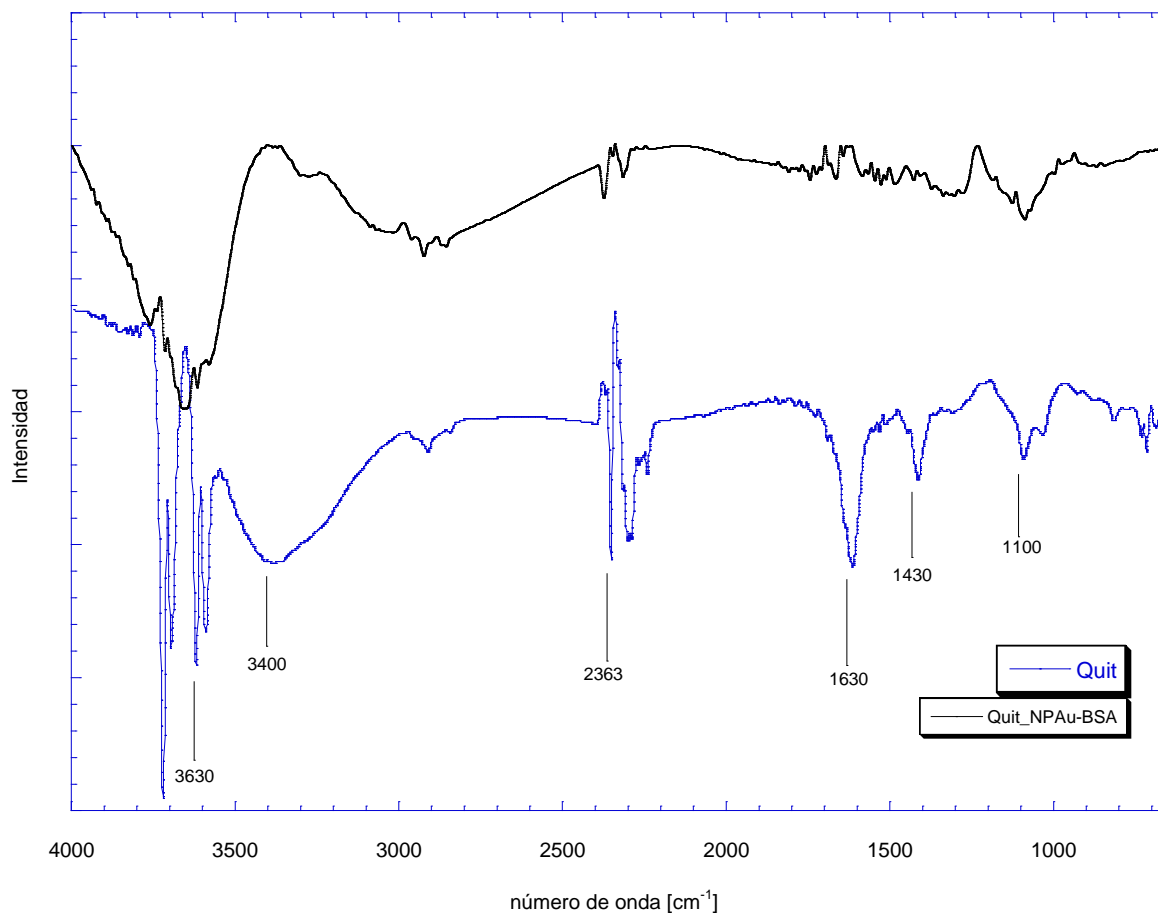
*Figura 92. Imágenes de AFM del hidrogel de quitosano con NPAu-BSA.*

Las micrografías obtenidas en SEM son mostradas en la Figura 93, en estas se puede ver la presencia los conjugados sobre la superficie, además se perciben zonas más oscuras que parecen fases donde el quitosano está más expuesto y rodeado por las NPAu-BSA. Es posible que los conjugados atrapen el exceso de material y lo estructuren para así disminuir su entropía.



*Figura 93. Microscopias de SEM del hidrogel de quitosano con NPAu-BSA.*

Los espectros de FTIR de las superficies de quitosano y la de quitosano con los conjugados NPAu-BSA se presentan en la Figura 94, dentro de los cambios más importantes de la superficie después de la interacción, se encuentra la disminución de las bandas propias del estiramiento de las aminas en  $3630\text{ cm}^{-1}$ , así como el aparente desplazamiento a zonas menos energéticas de la banda de OH; la banda de tioles en  $2363\text{ cm}^{-1}$  también se ve disminuida; las bandas correspondientes a los grupos carboxilos están presentes en  $1630\text{ cm}^{-1}$  y las flexiones de COH de  $1430\text{ cm}^{-1}$ , pero son de muy baja intensidad, lo cual sería congruente con un recubrimiento de estas con BSA.



*Figura 94. FTIR de las superficies con hidrogel de quitosano y de quitosano con NPAu-BSA.*

Aquí al igual que en caso del hidrogel de alginato, se ve una interacción con los conjugados mayor que con los sistemas NPAu solos; pero aun cuando los cambios totales pueden ser identificados parece que los conjugados reforman la superficie del hidrogel, lo cual hay que seguir con un mayor detenimiento para mejorar la modificación de éstos con el sistema NPAu-BSA o alguno similar usando como base al sistema NPAu.

### 7.3.5.3. Alginato-Quitosano

Por ser el sistema más complejo por tener todos los elementos de estudio, se decidió bajar la concentración en el flujo para la QCM-D, esperando así determinar mejor la cantidad que se une en la superficie.

En la Figura 95 se presenta la isoterma resultante del seguimiento en QCM-D. Comparado con las isotermas para los hidrogeles de alginato (ver Figura 82) y de quitosano (ver Figura 89), el uso de una menor concentración permitió que los cambios de disipación (azul) sean mínimos, por lo que se puede usar la ecuación de Sauerbrey para calcular la masa por  $\text{cm}^2$ . Los cambios en frecuencia (rojo) se ven con una pendiente negativa, conforme se aumenta la concentración, ésta se va estabilizando llegando al equilibrio después de interactuar con el flujo que llevaba la dilución 1:200; al igual que en otras combinaciones, cuando se tiene los sistemas en el flujo la pendiente no cambia pero al entrar el PBS se decrementa la frecuencia, por lo que se puede hablar de un cambio conformacional al interactuar con los complejos, lo que permite la absorción de líquidos, lo que es conveniente si se busca un gel superabsorbente [1].

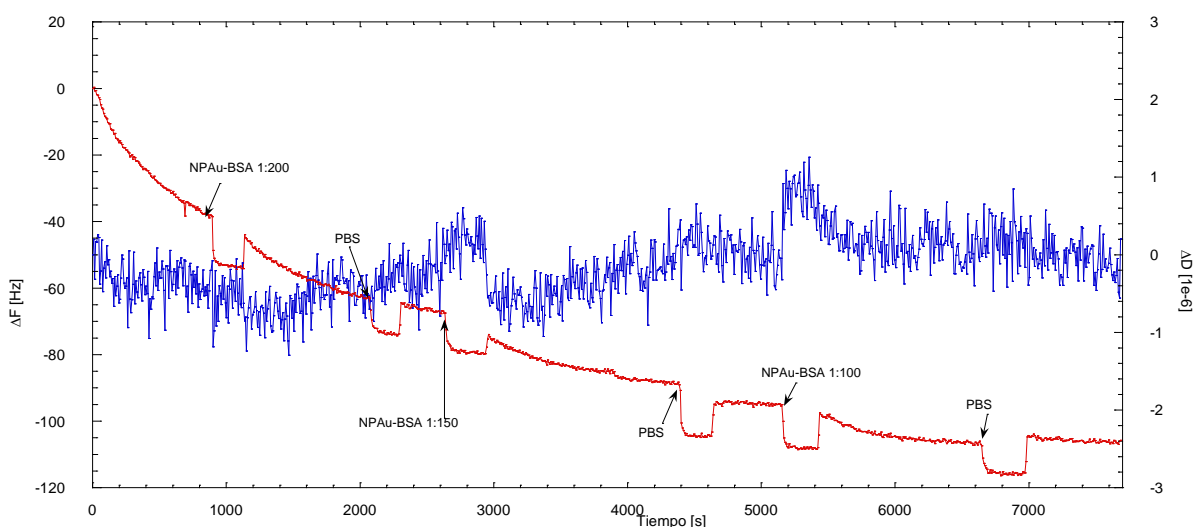
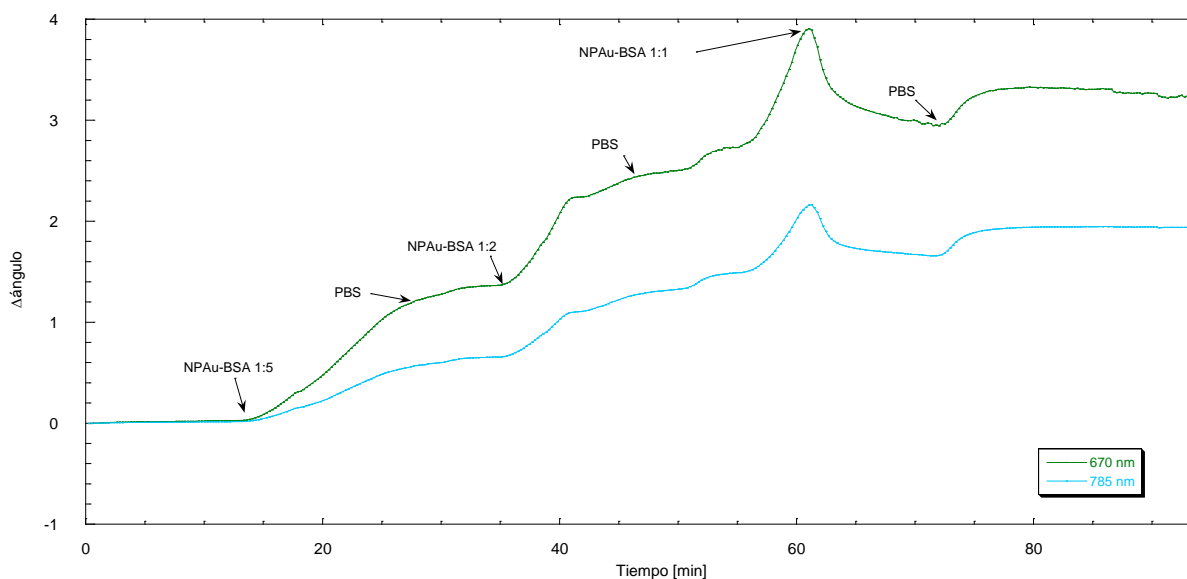


Figura 95. Isoterma de QCM-D a 25 °C donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA.

El  $\Delta F$  total es de -103 Hz, lo que corresponde a un cambio de masa de  $607.7 \text{ ng cm}^{-2}$ . Este cambio es 3.7 veces menor al cambio de este hidrogel con las Nseeds (ver Figura 51) y muy parecido al cambio del quitosano con las mismas nanopartículas (ver Figura 47).

Para el seguimiento con SPR, en la Figura 96 se muestra el sensograma y en la Figura 97 las curvas de cambio de intensidad del ángulo. En el sensograma se ven los cambios en el ángulo desde el flujo con la dilución 1:5 de los complejos, comportamiento que es similar al hidrogel de quitosano (ver Figura 90) pero con menor intensidad, de igual forma se ve que se forma un exceso de material depositado que es luego lavado, de forma similar al alginato (ver Figura 83), similarmente el cambio total está en el mismo rango que para el caso del alginato.



*Figura 96. Sensograma donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA.*

Un comportamiento que parece particular de este sistema es que las primeras diluciones se estabilizan más rápido que en los otros geles e incluso parece llegar a un punto de saturación después de la inyección de la dilución 1:2, pero este equilibrio es alterado al entrar el PBS sin complejos.



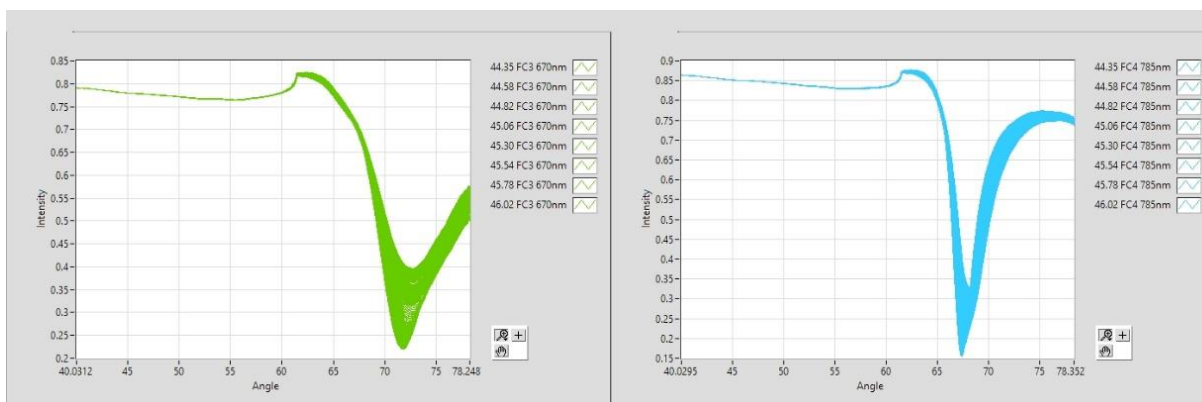


Figura 97. Curvas de SPR donde se sigue la interacción entre un hidrogel de alginato-quitosano y los complejos NPAu-BSA.

En la Figura 98 se muestra un sensor de SPR con el hidrogel de alginato-quitosano. En la zona de medición superior se siguió la interacción con los complejos NPAu-BSA y en la zona inferior la interacción con NPAu descrita en la Figura 77. Se puede ver como ambos sistemas modifican la opacidad del hidrogel sobre la superficie, por lo que sí se puede considerar un cambio en la conformación del hidrogel sobre la superficie.

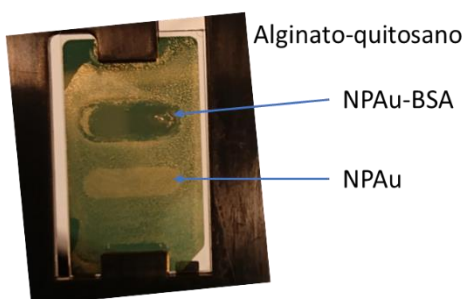
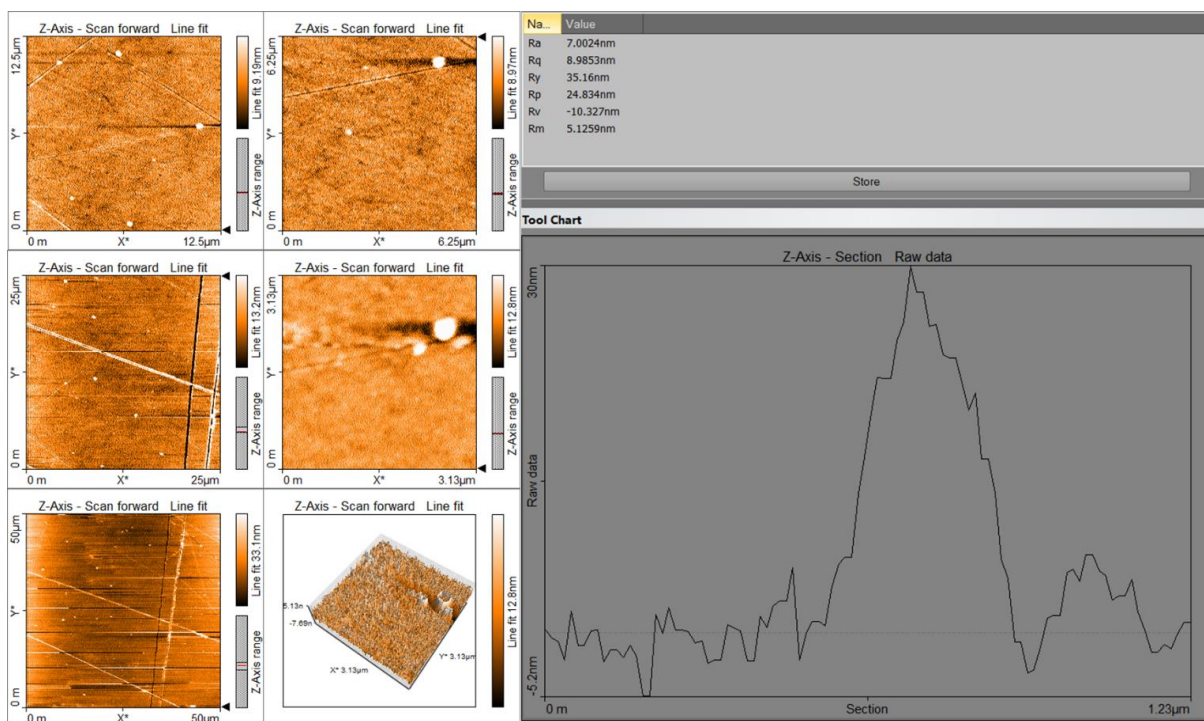


Figura 98. Fotografía de sensor de SPR con hidrogel de alginato-quitosano. En la zona superior se depositaron conjugados NPAu-BSA y en la inferior NPAu.

Para el láser de 785 nm el  $\Delta$ ángulo total es de 2 grados, por lo que el  $\Delta d$  es de 2.64 micras. Este valor es mayor que el calculado para el quitosano y menor que el calculado para el hidrogel de alginato. Esto tiene sentido si consideramos lo propuesto para la interacción de las NPAu solas; en donde éstas interactúan primero con el alginato generando un cambio en la estructura para después interactuar con el quitosano.

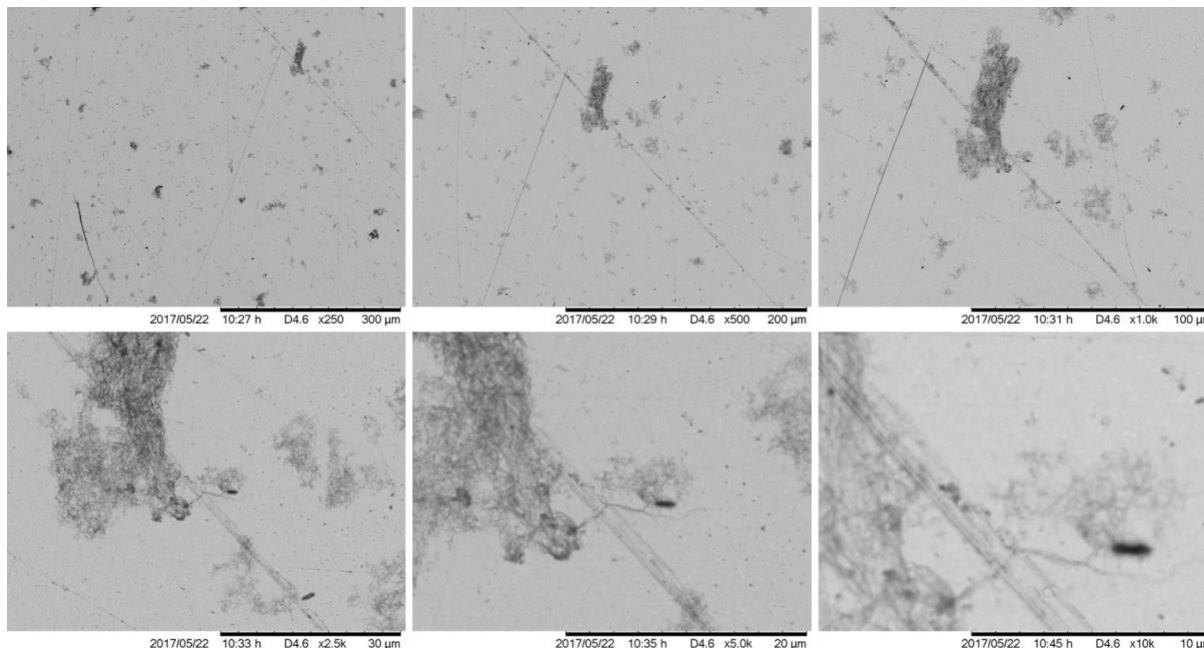
Las imágenes de la superficie del sensor de QCM-D obtenidas por microscopía de fuerza atómica se presentan en la Figura 99. En estas como interactuaron con una menor concentración de complejos, se pueden observar de forma más clara pero dispersas a lo largo de la superficie. La rugosidad media es de entre 7 y 8 nm, lo cual es un orden de magnitud superior a lo medido en la superficie sin complejos (ver Figura 41), así mismo presenta una elevación máxima de 35 nm parecido a lo medido en la superficie de alginato con los complejos (ver Figura 85). Estos cambios de rugosidad pueden ser tan pequeños por cambios en la película, donde los complejos se embeben en el hidrogel, lo que explicaría los cambios en la rugosidad media.



*Figura 99. Imágenes de AFM del hidrogel de alginato-quitosano con los complejos NPAu-BSA.*

En las micrografías electrónicas mostradas en la Figura 100 se puede ver que hay un cambio en las fases comparando con la superficie antes de la interacción con los complejos (ver Figura 42). Estos cambios se ven principalmente en las fases que identificamos como de quitosano. Esto es concordante con lo observado en las microscopías de SEM para el hidrogel de quitosano con complejos (ver Figura 93).

Así mismo, se pueden observar algunos complejos distribuidos a lo largo de la superficie, sobre todo en las microscopias de mayor aumento.



*Figura 100. Microscopias de SEM del hidrogel de alginato-quitosano con los complejos NPAu-BSA.*

En el espectro de FTIR de las superficies antes y después de su interacción con los complejos de la Figura 101, se puede ver que hay una fuerte disminución en las bandas de estiramiento de las aminas ( $3660\text{ cm}^{-1}$ ), también aparece de una banda en donde pueden estar los residuos con tioles de las proteínas ( $2346\text{ cm}^{-1}$ ).

Finalmente, se puede ver que la banda ancha de los hidroxilos ( $2900\text{ cm}^{-1}$ ) recorre su máximo a zonas de mayor energía ( $2950\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual puede relacionarse con un mayor grado de inmovilización de parte de esos grupos. Este cambio en los grupos amino es consistente con lo que pasa para el quitosano en todos los sistemas con oro, además de que el desplazamiento de la banda de hidroxilo parece estar más relacionado a las superficies que tienen hidrogeles de alginato.

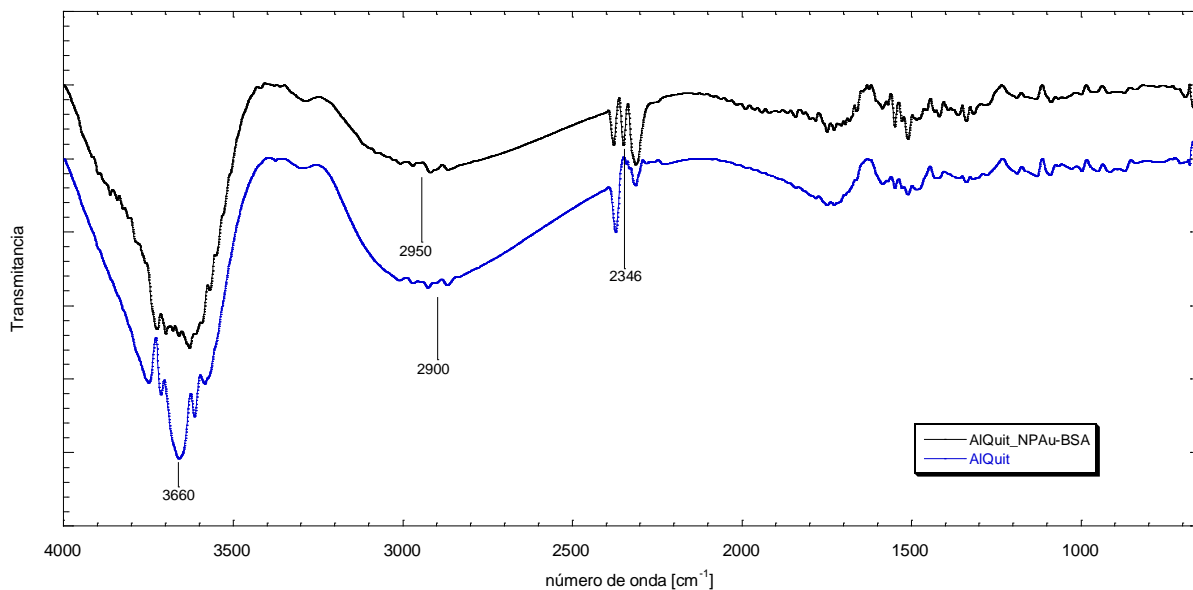


Figura 101. Espectro de FTIR de las superficies con el hidrogel alginato-quitosano y del hidrogel con complejos NPAu-BSA.

Para el difractogramas, se observan los dos picos definidos que se tiene en todos los sistemas con oro, por lo que se puede asegurar que hay estructuras de oro en la superficie.

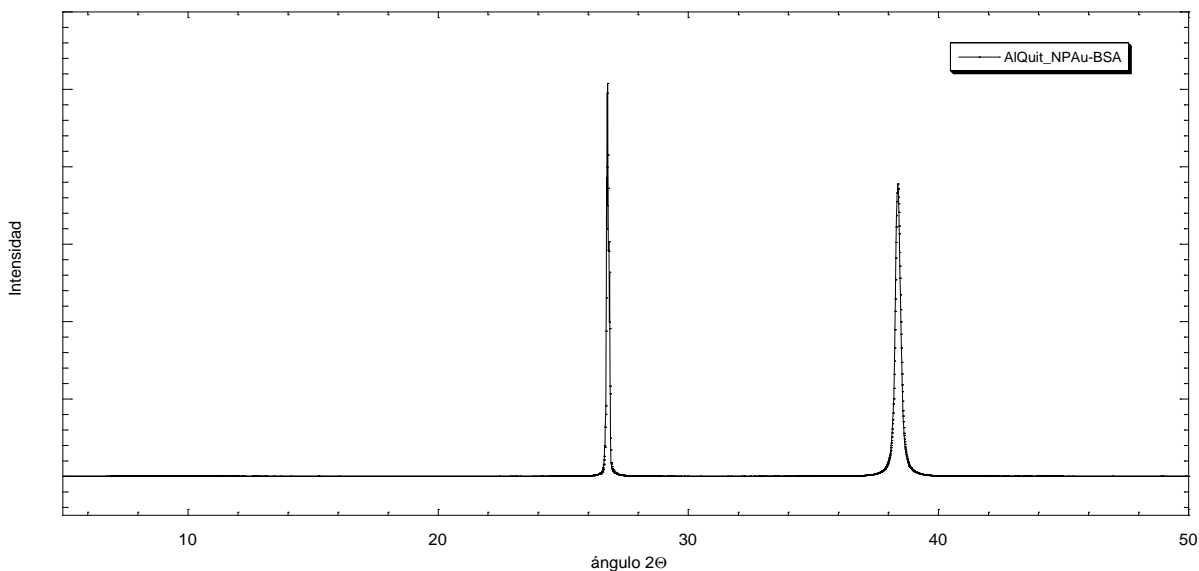


Figura 102. Difractograma de las superficies con el hidrogel alginato-quitosano y del hidrogel con complejos NPAu-BSA.

En general, el comportamiento del hidrogel en QCM-D y SPR parece estar mediado por ambos polímeros por separado, lo cual tiene sentido si se piensa en interacción de cada una de las fases que conforman el polímero; así mismo parece haber un cambio conformacional en el hidrogel al interactuar con los complejos, esto puede ser consecuencia de la gran densidad de cargas que debe de presentar el sistema NPAu modificado.

Comparando con el alginato, la corona proteica mejora la interacción con el hidrogel, mientras que, contra el quitosano, las interacciones se ven disminuidas. Eso confirma que la interacción entre las NPAu y la BSA es por una variedad de efectos hidrofóbicos, entrópicos y de enlaces, evitando el desplazamiento de BSA al estar en presencia de moléculas más grandes que podrían disminuir todavía más su entropía. Así la BSA en la superficie de NPAu se interpone en la interacción del oro con los grupos amino y carboxilo del quitosano o del alginato.

## 7.4. Conclusiones y Perspectivas

Las superficies de hidrogeles, alginato, quitosano y la mezcla de estos, generadas sobre los sensores de QCM y SPR mediante la técnica de Spin coating tienen baja rugosidad y apariencia homogénea, lo que las hace adecuadas para servir como modelo para medir las interacciones superficiales de moléculas y nanopartículas, así como sistemas más complejos. Esta baja rugosidad fue medida por microscopías de fuerza atómica y electrónica de barrido.

De los dos polímeros, el quitosano es el que da una mayor rigidez a los hidrogeles, además de ser el que tiene una mayor interacción con los distintos sistemas; esto por su disponibilidad tanto de grupos amino como carboxilo e hidroxilo. El alginato por otro lado es el que da una mayor interacción con el medio, permitiendo la absorción de agua e hidratación del hidrogel en general. También este hidrogel de ambos polímeros presenta claramente fases.

La presencia de oro, tanto en las Nseeds como en NP Au, aumenta la capacidad de absorción del medio por parte de los hidrogeles, pero principalmente cuando contiene alginato.

Los cambios en los hidrogeles después de interactuar con los distintos sistemas pudieron ser evaluados con microscopías de fuerza atómica y electrónica de barrido, en general se encontró que se forman superficies más homogéneas sobre el hidrogel de alginato que con el quitosano, pues este último tiene un mayor número de agregados y de rugosidad en la superficie.

Respecto a las espectroscopias, en todos los casos se logra diferenciar la presencia de los sistemas sobre las superficies. En DRX por la aparición de los picos correspondientes al oro en  $27^\circ$  y  $39^\circ$  y la variación en intensidad de estos; y en FTIR se ven un cambio, por lo general una disminución, en las bandas de estiramiento de los grupos hidroxilo, carboxilo y amino; además de la presencia de las bandas características para los citratos de las nanopartículas de oro. También con FTIR se encontró que la interacción de las Nseeds o de los sistemas con oro se ven favorecidas al tener el recubrimiento de oro para su unión con el quitosano, mientras que para la interacción con el alginato, este tenía que ser desplazado, disminuyendo así la interacción entre estos sistemas.

Las Nseeds muestran una clara interacción con las distintas superficies de los hidrogeles, siendo con el quitosano la más fuerte, incluso se da un cambio de disipación de  $20 \times 10^{-6}$ ; lo cual se

relaciona con la modificación estructural del hidrogel. Comparando valores de adsorción a bajas concentraciones, dilución 1:25 de la solución original con concentración de  $3 \times 10^{-8}$  mM, se tiene que el cambio de masa para el hidrogel de alginato de  $147.5 \text{ ng cm}^{-2}$  mientras que para el quitosano es de  $649 \text{ ng cm}^{-2}$ . Para la combinación de los polímeros, el cambio es de  $2,576.5 \text{ ng cm}^{-2}$ .

En general, las Nseeds mostraron una alta capacidad de integración a los hidrogeles, tal es ésta que generan una mayor absorción de medio después de que las Nseeds se encuentran en el hidrogel, lo que las hace un buen elemento para modificar los hidrogeles para aplicaciones médicas.

Estudios de la diferencia de crecimiento y adhesión de células es un trabajo que aún queda por realizar, así como la modificación con distintos elementos al hidrogel con Nseeds ya integradas, permitiendo a éstas la función de interfase de interacciones.

De igual manera la BSA se integra a la superficie de los distintos hidrogeles. En ambos casos forma una monocapa primero y después se agrega y probablemente se desnaturaliza sobre esta monocapa. El FTIR demostró para los dos polímeros que la disponibilidad de grupos OH se ve reducida después de la interacción con la proteína.

De los dos polímeros, de nuevo es el quitosano el que tiene una mayor interacción con la proteína, siendo de casi  $600 \text{ ng cm}^{-2}$ , mientras que, al combinarlo con alginato, la cantidad adsorbida de este nuevo hidrogel desciende a  $177 \text{ ng cm}^{-2}$ .

Para los sistemas NPau, las isotermas de QCM-D sólo generaban información de los cambios en rigidez del hidrogel después de la interacción, mientras que en los sensogramas de SPR mostraban cambios discretos hasta que se interactuaba con la solución concentrada. De esto se puede decir que la incorporación de este sistema a los hidrogeles no se da de forma lineal o exponencial, sino que es progresiva hasta un punto en el que se satura la superficie y se generan multicapas, recubriendo toda la superficie.

Finalmente, para los conjugados, la presencia de proteína superficial aumentó la interacción del sistema con el alginato, pero disminuyó la interacción con el quitosano. Así mismo se vio que la

interacción entre NPAu y BSA es lo suficientemente estable porque no hay un desplazamiento de la proteína por parte de los polímeros del hidrogel. Aun cuando la interacción es menor que la medida con los componentes individuales, se logra la formación de multicapas, las cuales pueden ser lavadas hasta alcanzar un equilibrio, lo cual puede ser aprovechado para aplicaciones biomédicas como recubrimiento de STENS o para distribución de fármacos. Así mismo, se encontró que los conjugados generan una fuerte modificación estructural de los hidrogeles de alginato-quitosano, por lo que el reacomodo permite que haya etapas en las interacciones entre el sistema y el hidrogel.

En conclusión, los sistemas fotodinámicos estudiados son una opción real para la modificación de hidrogeles que contengan alginato y quitosano; la proporción de cada polímero modificará la capacidad de carga que tenga el hidrogel de cada uno de los sistemas, así como la cantidad de agua que sea capaz de absorber y mantener en el enramado.

Los sistemas más pequeños son más fáciles de evaluar en isotermas de QCM-D y sensogramas de SPR; mientras que NPAu y su conjugado con BSA presentan un comportamiento diferente, entre ellos y comparados con los otros sistemas, sobre las superficies de los hidrogeles, tal es que pueden generar cambios estructurales en éste.

Para una aplicación biomédica es aún necesario evaluar el caso específico a utilizar para regular las interacciones de un modo más fino y selectivo.



## 7.5. Bibliografía

1. Peppas, N. A. (2010). Biomedical applications of hydrogels handbook. Springer Science & Business Media.
2. Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., & Lindman, B. (2002). Surfactants and polymers in aqueous solution (p. 544). New York: J. Wiley.
3. Prabakaran, M., & Mano, J. F. (2006). Stimuli responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6(12), 991-1008.
4. De, S. K., Aluru, N. R., Johnson, B., Crone, W. C., Beebe, D. J., & Moore, J. (2002). Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: Models, experiments, and simulations. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 11(5), 544-555.
5. Dong, L., Agarwal, A. K., Beebe, D. J., & Jiang, H. (2006). Adaptive liquid microlenses activated by stimuli-responsive hydrogels. *Nature*, 442(7102), 551-554.
6. Murakami, Y., & Maeda, M. (2005). DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell. *Biomacromolecules*, 6(6), 2927-2929.
7. Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., & Langer, R. (2011). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, 6(1), 13-22.
8. Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.
9. Li, W. J., Laurencin, C. T., Catterson, E. J., Tuan, R. S., & Ko, F. K. (2002). Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 60(4), 613-621.
10. Huttmacher, D. W., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2004). Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 354-362.
11. Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., & Gatenholm, P. (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4), 419-431.
12. Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511-521.
13. Alsberg, E., Anderson, K. W., Albeiruti, A., Franceschi, R. T., & Mooney, D. J. (2001). Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Dental Research*, 80(11), 2025-2029.
14. Lim, F., & Sun, A. M. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 210(4472), 908-910.
15. Zima, A., Czechowska, J., Siek, D., Olkowski, R., Noga, M., Lewandowska-Szumieł, M., & Ślósarczyk, A. (2017). How calcite and modified hydroxyapatite influence physicochemical properties and cytocompatibility of alpha-TCP based bone cements. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 28(8), 117.
16. Demirbilek, M., Laçın, N. T., & Aktürk, S. N-acetylglucosamine modified alginate sponges as scaffolds for skin tissue engineering.

17. Tresoldi, C., Pacheco, D. P., Formenti, E., Gentilini, R., Mantero, S., & Petrini, P. (2017). Alginate/Gelatin Hydrogels to Coat Porous Tubular Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *European Cells & Materials*, 33.
18. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2011;2012;). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106.
19. U. Zimmermann, G. Klock, K. Federlin, K. Haning, M. Kowalski, R.G. Bretzel, A. Horcher, H. Entenmann, U. Siebers, T. Zekorn. (1992). Production of mitogen contamination free alginates with variable ratios of mannuronic to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 13, pp. 269-274
20. Suh, J. K. F., & Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589-2598.
21. Madihally, S. V., & Matthew, H. W. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20(12), 1133-1142.
22. Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1), 1-21.
23. Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., & Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24(26), 4833-4841.
24. Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., & Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26(18), 3919-3928.
25. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
26. Mishra, M. (Ed.). (2015). Handbook of encapsulation and controlled release. CRC Press.
27. Murata, Y., Maeda, T., Miyamoto, E., & Kawashima, S. (1993). Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads—effects of chitosan on gel matrix erosion. *International Journal of Pharmaceutics*, 96(1), 139-145.
28. Gåserød, O., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (1998). Microcapsules of alginate-chitosan—I: a quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, 19(20), 1815-1825.
29. Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Bhattacharya, S., Mishra, R., & Kundu, P. P. (2015). pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 640-648.
30. Drechsler, U., Erdogan, B., & Rotello, V. M. (2004). Nanoparticles: Scaffolds for molecular recognition. *Chemistry-A European Journal*, 10(22), 5570-5579.
31. Zhao, H., Dong, W., Zheng, Y., Liu, A., Yao, J., Li, C., Tang, H., Chen, B., & Shi, Z. (2011). The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds. *Biomaterials*, 32(25), 5837-5846.
32. Hong, R., Fischer, N. O., Verma, A., Goodman, C. M., Emrick, T., & Rotello, V. M. (2004). Control of protein structure and function through surface recognition by tailored nanoparticle scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 126(3), 739-743.
33. Wong, L., Sevimli, S., Zareie, H. M., Davis, T. P., & Bulmus, V. (2010). PEGylated functional nanoparticles from a reactive homopolymer scaffold modified by thiol addition chemistry. *Macromolecules*, 43(12), 5365-5375.

34. Yang, F., Cho, S. W., Son, S. M., Bogatyrev, S. R., Singh, D., Green, J. J., Meia, Y., Parkd, S., Bhange, S. H., Kime, B. S., Langer, R., & Anderson, D. G. (2010). Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3317-3322.
35. Abarrategi, A., Gutiérrez, M. C., Moreno-Vicente, C., Hortigüela, M. J., Ramos, V., López-Lacomba, J. L., Ferrer, M. L., & del Monte, F. (2008). Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*, 29(1), 94-102.
36. Dvir, T., Timko, B. P., Brigham, M. D., Naik, S. R., Karajanagi, S. S., Levy, O., Jin, H., Parker, K. K., Langer, R., & Kohane, D. S. (2011). Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nature Nanotechnology*, 6(11), 720-725
37. Shevach, M., Maoz, B. M., Feiner, R., Shapira, A., & Dvir, T. (2013). Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(39), 5210-5217.
38. Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232-239.
39. Pavinatto, F. J., Caseli, L., & Oliveira Jr, O. N. (2010). Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules*, 11(8), 1897-1908.
40. Fält, S., Wågberg, L., & Vesterlind, E. L. (2003). Swelling of model films of cellulose having different charge densities and comparison to the swelling behavior of corresponding fibers. *Langmuir*, 19(19), 7895-7903.
41. Alves, N. M., Picart, C., & Mano, J. F. (2009). Self-assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR spectroscopy. *Macromolecular Bioscience*, 9(8), 776-785.
42. Toivonen, M. S., Kurki-Suonio, S., Schacher, F. H., Hietala, S., Rojas, O. J., & Ikkala, O. (2015). Water-resistant, transparent hybrid nanopaper by physical cross-linking with chitosan. *Biomacromolecules*, 16(3), 1062-1071.
43. Khan, M. S., Vishakante, G. D., & Siddaramaiah, H. (2013). Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 199, 44-58.
44. Hutter, E., Fendler, J. H., & Roy, D. (2001). Surface plasmon resonance studies of gold and silver nanoparticles linked to gold and silver substrates by 2-aminoethanethiol and 1, 6-hexanedithiol. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(45), 11159-11168.
45. Vikholm-Lundin, I., Rosqvist, E., Ihalainen, P., Munter, T., Honkimaa, A., Marjomäki, V., Alberts, W. M., & Peltonen, J. (2016). Assembly of citrate gold nanoparticles on hydrophilic monolayers. *Applied Surface Science*, 378, 519-529.
46. Silin, V., Weetall, H., & Vanderah, D. J. (1997). SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA on gold surfaces modified by self-assembled monolayers (SAMs). *Journal of colloid and interface science*, 185(1), 94-103.
47. Wu, B. Y., Hou, S. H., Yin, F., Li, J., Zhao, Z. X., Huang, J. D., & Chen, Q. (2007). Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 838-844.
48. Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K., & Franzen, S. (2005). Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, 21(20), 9303-9307.

49. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(14), 7238-7248.
50. Sullivan, M. O., Green, J. J., & Przybycien, T. M. (2003). Development of a novel gene delivery scaffold utilizing colloidal gold–polyethylenimine conjugates for DNA condensation. *Gene Therapy*, 10(22), 1882-1890.
51. Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K., Elwing, H. (2001). Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Analytic Chemistry* 2001, 73, 5796-5804
52. Marx, K. (2003). Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules* vol 4, 5.
53. Johannsmann, D. (2008). Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(31), 4516-4534.
54. Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N., & Yee, S. S. (1998). Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir*, 14(19), 5636-5648.
55. Schoch, R. L., Kapinos, L. E., & Lim, R. Y. (2012). Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG-nucleoporin molecular brushes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16911-16916.
56. Topete Camacho, A. (2013). Development of Hybrid Nanoplateforms for Theranostic Applications. Tesis para Doctorado. Departamento de Física de la Materia Condensada. Universidad de Santiago de Compostela. Capítulo 4.
57. Yi, Y. M., Yang, T. Y., & Pan, W. M. (1999). Preparation and distribution of 5-fluorouracil 125I sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles. *World Journal of Gastroenterology*, 5(1), 57.
58. Shen, H., Shi, H., Xie, M., Ma, K., Li, B., Shen, S., Wang, X., & Jin, Y. (2013). Biodegradable chitosan/alginate BSA-gel-capsules for pH-controlled loading and release of doxorubicin and treatment of pulmonary melanoma. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(32), 3906-3917.
59. Ma, R., & Zhitomirsky, I. (2011). Electrophoretic deposition of chitosan–albumin and alginate–albumin films. *Surface Engineering*, 27(1), 51-56.
60. Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K., & Franzen, S. (2005). Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, 21(20), 9303-9307.
61. Orelma, H., Filpponen, I., Johansson, L. S., Laine, J., & Rojas, O. J. (2011). Modification of cellulose films by adsorption of CMC and chitosan for controlled attachment of biomolecules. *Biomacromolecules*, 12(12), 4311-4318.

## 8. Conclusión general

---

El control del tamaño (Nseeds o NPAu), carga superficial y funcionalización de los sistemas fotodinámicos permite modular las interacciones de adsorción de éstos con hidrogeles biopoliméricos (aniónicos y catiónicos), generando sistemas con propiedades estructurales (hidratación, rigidez, carga) variables que pudieran tener aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

Lo anterior basado en los resultados encontrados en los experimentos realizados. En cuanto a las Nseeds, estas tienen una interacción más fuerte con el quitosano, pero sin generar un cambio con la estructura de el hidrogel de este compuesto; caso contrario de la interacción con el alginato, donde la interacción es menor pero sí se observa un fuerte cambio estructural de este hidrogel.

Por otro lado, la modificación superficial de las NPAu con BSA permitió una interacción dirigida tanto por efectos hidrofóbicos como electroestáticos, generando una mejor adsorción al polímero aniónico, que favorece una distribución más homogénea en la superficie.

Finalmente, en este trabajo el uso complementario de la QCM-D junto con SPR demostraron ser técnicas adecuadas para el estudio de hidrogeles y su modificación superficial con distintos elementos, en concreto con los sistemas fotodinámicos propuestos en este trabajo.

## 9. Cierre y agradecimientos

---

Este trabajo es una primera aproximación al estudio de sistemas complejos para la modificación de andamios para ingeniería de tejidos; el entendimiento de las interacciones entre los hidrogeles con los sistemas para su modificación permitirá el diseño inteligente de los andamios para conseguir optimizar y mejorar el crecimiento, adaptación, modificación y funcionamiento de las células. Dicho entendimiento de los sistemas usados en la ingeniería de tejidos debe de continuar aumentando, para así lograr la mejora de la calidad de vida de las personas y con ello seguir en la búsqueda de una sociedad participativa e incluyente.

El desarrollo y conclusión de este proyecto no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, hermanos y familia; así como el siempre pronto acompañamiento del Dr. José Campos Terán, quien siempre estuvo para guiarme y aconsejarme, no sólo en el proyecto, sino en las decisiones importantes para mi formación y carrera; a las doctoras Maribel Hernández, Izlia Arroyo y Nohra Beltrán, por la amistad, apoyo y por toda su experiencia de la que cada día sigo aprendiendo; a la doctora en práctica Roxana López, por ser mi amiga, compañía, guía y consultora; así como a los diferentes doctores y alumnos que a lo largo de mi trayectoria en la UAM han estado siempre conmigo para apoyarme y compartir sus diversos conocimientos.

También agradezco al Dr. Antonio Topete y a la Universidad de Guadalajara por la estancia realizada en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud y todo su apoyo en el área de nanociencias; así como al Dr. Orlando Rojas y a la M. Sc. Maija Vuoriluoto, por su seguimiento y consejos durante la estancia en Aalto University. Finalmente, agradezco al Dr. Eduardo Peñalosa Castro quien durante su rectorado apoyo mi estancia de investigación en Finlandia, a la coordinación del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, así como a todos los trabajadores de la UAM Cuajimalpa que nos brindan siempre condiciones óptimas para desarrollar nuestras actividades; y al CONACyT por su apoyo económico para la realización de este proyecto y mis estudios de maestría.

