

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

Tesis

NANOBARRAS DE ORO CUBIERTAS CON POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES CON POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIA FOTOTÉRMICA

Que para obtener el grado de:
Doctor en Nanotecnología

Presenta:

Mario Eduardo Almada Ortiz

Teniendo como Director a:

Dr. Juárez Onofre Josué Elías

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

VOTOS APROBATORIOS

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS
Coordinador de Posgrado en Nanotecnología

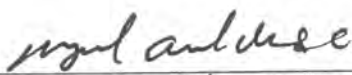
Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Doctorado: “**Nanobarras de oro cubiertas con polímeros biocompatibles con potencial aplicación en terapia fototérmica**”, presentada por:

Mario Eduardo Almada Ortiz

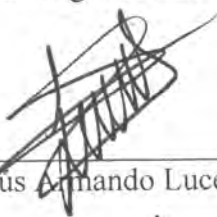
La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Doctor en Nanotecnología:



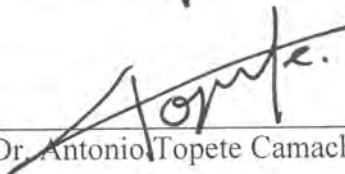
Dr. Josué Elías Juárez Onofre



Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias



Dr. Jesús Armando Lucero Acuña



Dr. Antonio Topete Camacho (Externo)



Dr. Rubén Darío Cadena Nava (Externo)

DEDICATORIA

A mi esposa Olga Arce y a mi hijo Christian Almada, quienes son los motores de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer profundamente al Dr. Josué Elías Juárez Onofre por haber dirigido mi tesis de doctorado, por todo su apoyo tanto en lo académico como en lo personal, por su disponibilidad y su alto grado de compromiso para sacar adelante el trabajo, además de todos los consejos y atenciones hacia mi persona.

Al Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias por todos los consejos y atenciones a lo largo de mis estudios tanto de maestría como de doctorado, gran parte de este logro se lo debo a él. A la Dra. María Guadalupe Burboa por haberme permitido trabajar en su laboratorio para el desarrollo de las pruebas celulares. A los Doctores Jesús Armando Lucero Acuña, Rubén Darío Cadena Nava y Antonio Topete Camacho por sus valiosas aportaciones académicas a este trabajo de tesis.

A mi familia, mi esposa, mi hijo y mis padres, sin los cuales no podría haber llegado a estas instancias académicas.

Agradezco al posgrado en nanotecnología, así como al departamento de física por la formación recibida y por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado. Finalmente agradezco al CONACyT por el apoyo económico recibido durante mis estudios de doctorado a través de la beca de manutención.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Nanotecnología y Nanomedicina.....	3
Nanopartículas de oro.....	4
Propiedades fototérmicas de las nanopartículas de oro.....	9
Nanobarras de oro (AuNBs).....	13
Síntesis de AuNBs.....	15
Mecanismo de crecimiento de las AuNBs.....	18
Aplicaciones de las AuNBs en el diagnóstico y la terapia del cáncer.....	23
Imagenología diagnóstica.....	23
Microscopia de campo oscuro.....	23
Tomografía computarizada de rayos X.....	24
Microscopia de Fluorescencia de dos fotones.....	26
Imagenología fotoacústica.....	26
Terapia fototérmica contra el cáncer.....	27
Toxicidad y métodos de eliminación del CTAB.....	31
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	36
General.....	36
Particulares.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37

Primera Parte	37
Síntesis de Nanobarras de Oro.....	37
Caracterización espectroscópica.....	37
Microscopia de transmisión electrónica.....	38
Segunda Parte	38
Síntesis de quitosano tiolado (Chi-SH).....	38
Síntesis de AuNBs cubiertas con Chi-SH.....	39
Síntesis de AuNBs cubiertas con PEG-SH.....	39
Síntesis de AuNBs cubiertas con Alginato y PVA.....	39
Mediciones de Potencial Zeta.....	39
Microscopia de Fuerza Atómica (MFA).....	41
Experimentos Fototérmicos.....	41
Eficiencia de conversión fototérmica ().....	41
Ensayos citotóxicos.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	44
Primera Parte	44
Caracterización espectroscópica de las AuNBs.....	44
Crecimiento de las AuNBs y efecto del ácido ascórbico.....	49
Cinética de crecimiento de las AuNBs.....	51
Segunda Parte.....	52
Síntesis de AuNBs cubiertas con quitosano-SH.....	52
Síntesis de las AuNBs-Chi-SH cubiertas con alginato o PVA.....	58
Eficiencia de conversión fototérmica ().....	62
Ensayos citotóxicos.....	70

CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS.	78
ANEXO 1	79
ANEXO 2	82
REFERENCIAS.	101

LISTA DE FIGURAS.

Figura		Página
1	a) Representación esquemática del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie en nanopartículas metálicas. b) Valores de la parte real (ϵ_1) e imaginaria (ϵ_2) de la función dieléctrica del oro en bulto en función de la longitud de onda de la luz incidente (tomado de la referencia 37). c) Espectro de absorción característico de nanopartículas de oro de un tamaño de 30 nm calculado con la ecuación (1) y los valores mostrados en b).	5
2	Diferentes formas de nanopartículas de oro, se incluyen los colores y las bandas de absorción características para cada una de ellas. a) Nanobarras de oro, b) Nanojaulas de oro, c) Nanocorazas de oro y d) nanoestrellas de oro. Tomado de las referencias 38-40 y 42.	8
3	Representación esquemática del proceso de calentamiento del gas de electrones después de la absorción de la radiación electromagnética, siguiendo la distribución de Fermi-Dirac. Adaptado de las referencias 33 y 36.	12
4	Representación esquemática del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie de nanobarras de oro, a) PRS transversal y b) PRS longitudinal, y bandas de absorción características de las nanobarras de oro para diferentes c) relaciones de aspecto y d) constantes dieléctrica del medio. Los espectros de absorción de las figuras c) y d) fueron calculados con la ecuación (6) y considerando los valores de ϵ_1 y ϵ_2 mostrados en la figura 1 c.	14
5	a) Forma y estructura cristalina de nanobarras de oro sintetizadas en ausencia de AgNO_3 , b) estructura cristalina y progresión del crecimiento de nanobarras de oro sintetizadas en presencia de AgNO_3 (tomado de la referencia 52), c) progresión de los espectros de absorción característicos de las nanobarras de oro en sus diferentes etapas (tomado de la referencia 57), d) adsorción de micelas cilíndricas de CTAB sobre la superficie de oro (tomado de la referencia 64), e) resumen de los tres mecanismos propuestos para el efecto del AgNO_3 sobre el crecimiento de las nanobarras y f) adsorción del complejo $[\text{Br-Ag-Br}]^-$ sobre las caras cristalinas $\{100\}$ de las “semillas” de oro (tomado de la referencia 62).	17

Figura		Página
6	Aplicaciones de las AuNBs en el diagnóstico del cáncer. a) Microscopia de campo oscuro (tomado de la referencia 72), b) Tomografía computarizada de rayos X (tomado de la referencia 76), c) Microscopia de fluorescencia de dos fotones (tomado de la referencia 83), d) Imagenología fotoacústica (tomado de la referencia 86).	25
7	Aplicaciones <i>ip'xlxq</i> de la terapia fototérmica usando nanobarras de oro e irradiación láser, a) Disminución del tumor después de la irradiación láser del tumor 72 h después de la administración intravenosa de nanobarras de oro cubiertas con PEG (tomado de referencia 6), b) Desaparición completa del tumor después de la administración de nanobarras de oro funcionalizadas y su posterior irradiación láser (tomado de referencia 94), c) Completa remoción del tumor después del tratamiento fototérmico usando nanobarras de oro funcionalizadas (tomado de referencia 95).	29
8	Estructura química del a) Quitosano, b) Alginato y c) PVA.	34
9	Representación esquemática del proceso de modificación del quitosano y del recubrimiento de las AuNBs con los polímeros.	40
10	Evolución de los espectros de UV-Vis en la solución de crecimiento después de la adición de las semillas. La concentración de ácido ascórbico se ajustó a: a) 0,75 mM, b) 1 mM, c) 1,25 mM, d) 1,5 mM, e) 1,75 mM y F) 2 mM, que corresponden a relaciones molares de AA/Au ⁺³ de 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4, respectivamente.	45
11	a) Espectro de UV-Vis de las AuNBs para las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas. b) Desplazamiento hacia el rojo de PRSL con el incremento de la concentración de ácido ascórbico, c) Posición del PRSL en función del tiempo para las concentraciones de ácido ascórbico usados. d) La absorbancia del PRSL en función del tiempo para las concentraciones de ácido ascórbico, la línea continua corresponde a ajuste de los datos experimentales. e) Constante de crecimiento medida en función del ácido ascórbico añadido. (Código de color: negro (ácido ascórbico 0,75 mM), rojo (ácido ascórbico 1 mM), azul (ácido ascórbico 1,25 mM), magenta (ácido ascórbico 1,5 mM), verde (ácido ascórbico 1.75mM) y azul marino (ácido ascórbico 2 mM).	46

Figura		Página
12	Imágenes de STEM de AuNBs sintetizadas en una solución de crecimiento preparada con diferente concentración de ácido ascórbico; a) 0,75 mM, b) 1 mM, c) 1,25 mM, d) 1,5 m, e) 1,75 mM y f) 2 mM	48
13	Imagen de las AuNBs después del proceso de diálisis. a) AuNBs-CTAB, b) AuNBs-PEG, c) AuNBs-Chi-SH	54
14	Representación esquemática del proceso de reemplazamiento del CTAB por el quitosano-SH.	56
15	Espectros UV-Vis de AuNBs después del recubrimiento con los polímeros. AuNBs-CTAB (línea Negro), AuNBs-Chi-SH (línea roja), AuNBs-Chi-SH-Alg (línea azul) y AuNBs-Chi-SH-PVA (línea magenta).	57
16	FTIR de las diferentes AuNBs; a) AuNBs-CTAB, b) AuNBs-Chi-SH, c) AuNBs-Chi-SH-PVA y d) AuNBs-Chi-SH-Alg.	59
17	Potencial zeta de AuNBs dispersas en agua (pH≈5) (Rojo) o en buffer de fosfatos 10 mM (pH 7.4) (Azul).	61
18	Imágenes de MFA y perfiles representativas longitudinales y transversales de AuNBs; a) AuNBs-Chi-SH, b) AuNBs-Alg-Chi-SH, c) AuNBs-PVA-Chi-SH, d), e) y f) perfiles longitudinales representativos, g), h) e i) perfiles transversales representativos (cada perfil corresponde a la imagen de MFA mostrada arriba).	63
19	Imágenes de TEM y SEM de AuNBs; a) y d) AuNBs-Chi-SH, b) y e) AuNBs-Alg-Chi-SH, c) y f) AuNBs-PVA-Chi-SH, g) y h) distribución de tamaños transversal y longitudinal AuNBs. (Escala de las imágenes de SEM 100 nm).	64
20	Perfiles de calentamiento de las AuNBs-CTAB a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).	66
21	Perfiles de calentamiento de las AuNBs-Chi-SH a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).	67
22	Perfiles de calentamiento de las AuNBs-Chi-SH-Alg a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17)	67

Figura		Página
23	Perfiles de calentamiento de las AuNBs-Chi-SH-PVA a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea roja representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).	69
24	Eficiencia de transducción fototérmica de las AuNBs	71
25	Citotoxicidad de los polímeros Alginato y PVA sobre la línea celular MDA-MB-231	72
26	Citotoxicidad de las AuNBs sobre la línea celular MDA-MB-231	73
27	Citotoxicidad observada en las células MDA-MB-231 tratadas con las AuNBs cubiertas con Alginato y PVA e irradiadas con el láser a 808 nm durante 5 min	76

RESUMEN

Las nanobarras de oro (AuNBs) presentan propiedades ópticas únicas que pueden ser explotadas para utilizarlas en diversas áreas, incluyendo la medicina, en particular, en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. El método de crecimiento mediado por semillas es el protocolo más utilizado para la síntesis de este tipo de partículas, en este método se prepara una solución de nanopartículas esféricas de oro de alrededor de 1-2 nm (“semillas”) y luego estas se adicionan a una solución que promueve el crecimiento anisotrópico de las “semillas” hasta producir las AuNBs. En estudios previos se ha utilizado el HCl como aditivo para mejorar el rendimiento de formación de AuNBs así como para ajustar el plasmón de resonancia de las mismas, sin embargo, no es muy claro el papel que juega dicho compuesto en el control de la relación de aspecto. Por otro lado, se ha mostrado que el CTAB, frecuentemente utilizado en la síntesis de AuNBs, es muy tóxico, y la completa remoción del mismo es indispensable para aplicar estos sistemas en la práctica médica. Por lo anteriormente descrito, en este trabajo se sintetizaron AuNBs usando el método mediado por semillas a pH ácido y se estudió el papel que juega el HCl en el control de la relación de aspecto. Después estas partículas fueron recubiertas con quitosano para eliminar por completo el CTAB, además el alginato y el PVA se utilizaron para proporcionarles mayor estabilidad, se estudió el efecto de estas cubiertas poliméricas sobre la eficiencia de transducción fototérmica y se evaluó la citotoxicidad de las AuNBs en una línea celular de cáncer de mama. Los resultados muestran que el efecto del HCl consiste aparentemente en detener el crecimiento de las nanobarras de oro en etapas intermedias de su desarrollo debido a que ralentiza la deposición de átomos de oro. Se logró eliminar el CTAB y se reemplazó por quitosano, después se adsorbió alginato o PVA sobre las nanobarras, con esto se disminuyó significativamente la citotoxicidad en comparación con las nanobarras cubiertas con CTAB. Además, las cubiertas poliméricas utilizadas no afectaron la eficiencia de las partículas para transformar la luz absorbida en calor y mostraron ser efectivas para disminuir la viabilidad celular a través de hipertermia producida por irradiación láser.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de oro se han estudiado ampliamente en las últimas décadas debido a sus propiedades ópticas únicas que surgen del fenómeno de plasmón de resonancia de superficie (PRS) (la oscilación colectiva del gas de electrones debido a la interacción con el campo electromagnético). La energía absorbida se disipa en forma de calor induciendo un incremento en la temperatura del medio circundante, esto se ha propuesto para promover la muerte de células cancerosas o la destrucción de fibras amiloides por hipertermia, esto se ha llamado terapia fototérmica¹⁻⁵.

Las nanobarras de oro (AuNBs) son las nanopartículas de oro más estudiadas para la terapia fototérmica debido a la relativa facilidad de manipular el PRS para aplicaciones biológicas (700-900 nm) y a su gran eficiencia de conversión fototérmica⁶⁻⁹. En general, las AuNBs muestran dos picos de absorción, que surgen de la oscilación de los electrones a través de los ejes transversal (510-530 nm) y longitudinal (600-1000 nm). El plasmón de resonancia de superficie longitudinal (PRSL) es extremadamente sensible a la relación de aspecto (largo/ancho) de las AuNBs¹⁰.

El método químico más usado en la síntesis de AuNBs es el crecimiento mediado por semillas, desarrollado por Jana et al. (2001)¹¹ y modificado por Nikoobahkt y El-Sayed (2003)¹², el cual está basado en la síntesis de partículas de oro de alrededor de 2 nm (“semillas”), estas son colocadas en una solución de crecimiento (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), HAuCl₄, ácido ascórbico (AA) y AgNO₃) cuya composición promueve el crecimiento anisotrópico de esas semillas para producir las nanobarras. La relación de aspecto de las nanobarras de oro puede ser manipulado variando la concentración de AgNO₃ en la solución de crecimiento¹². Zhu et al. (2010)¹³ reportaron que la relación de aspecto de las AuNBs también podía manipularse usando HCl como aditivo en la solución de crecimiento, ellos observaron que mientras la concentración de HCl se incrementaba, el PRSL de las nanobarras experimentaba un pronunciado desplazamiento hacia el rojo. El proceso mediante el cual el HCl es capaz de manipular la relación de aspecto de las AuNBs es desconocido.

Por otro lado, se ha demostrado que la presencia del CTAB en las AuNBs está relacionada con una alta citotoxicidad y la eliminación completa de este es un requisito importante antes de poder usar estas partículas en la investigación y práctica médica¹⁴⁻¹⁸. Generalmente, para eliminar el exceso de CTAB, se realizan varios pasos de centrifugación y redispersión, sin embargo, una bicapa del surfactante permanece adsorbida en la superficie de las AuNBs aun después del proceso de lavado. Eliminar esta bicapa puede causar la agregación incontrolable de las partículas¹⁹. Por esta razón, se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones para reemplazar o recubrir el CTAB con otro tipo de estabilizador biocompatible^{20,21}.

Los polisacáridos son candidatos ideales para reemplazar el CTAB debido su biocompatibilidad, bajos costos y facilidad para ser modificados^{22,23}. Además, los polisacáridos con comportamiento polielectrolítico permiten realizar un recubrimiento capa por capa (LBL por sus siglas en inglés)²⁴. El quitosano se ha utilizado anteriormente para reemplazar el CTAB con resultados prometedores. La principal desventaja del uso de las AuNBs cubiertas con quitosano con fines médicos es que este polímero tiene un $pK_a \approx 6.3$, por lo tanto, en el pH fisiológico, los grupos amino del quitosano se encuentran predominantemente desprotonados, el potencial zeta se acerca a cero y la repulsión electrostática entre las partículas es muy baja, disminuyendo la estabilidad coloidal²⁵⁻²⁷. Esto plantea la necesidad de recubrir las AuNBs cubiertas con quitosano con moléculas o polímeros que les proporcionan más estabilidad²⁷. El alginato y el poli (vinil alcohol) (PVA) podrían ser utilizados para este propósito.

En este trabajo se sintetizaron AuNBs usando el método de crecimiento mediado por semillas a pH ácido, se caracterizaron espectroscópicamente con el objetivo de elucidar el mecanismo subyacente del control de la relación de aspecto con la adición de HCl. Después, estas nanopartículas fueron recubiertas con quitosano para la eliminación completa del CTAB, finalmente se usó alginato y PVA para cubrir las AuNBs recubiertas de quitosano con el propósito de proporcionarles mayor estabilidad. Se determinó el efecto de estas cubiertas poliméricas sobre la eficiencia de transducción fototérmica y se evaluó la citotoxicidad de las AuNBs cubiertas con y sin irradiación en una línea celular de cáncer de mama.

ANTECEDENTES

Nanotecnología y Nanomedicina.

La nanotecnología implica el entendimiento y el control de la materia en la escala nanométrica, en la cual los materiales presentan fenómenos únicos que posibilitan el desarrollo de nuevas aplicaciones. Es un área multidisciplinaria en la que convergen la química, la física, la biología, la ingeniería y la tecnología para medir, modelar, obtener imágenes y manipular la materia con el objetivo de desarrollar dispositivos nanométricos que posibiliten el desarrollo tecnológico²⁸.

Dentro de todas las posibles aplicaciones de la nanotecnología, el desarrollo de nanomateriales útiles para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades ha recibido especial atención en las últimas décadas, con ello ha surgido el concepto de nanomedicina, que básicamente se refiere a la aplicación de la nanotecnología al cuidado de la salud²⁹. En este sentido se han desarrollado una gran cantidad de nanomateriales como los puntos cuánticos (Quantum-Dots) de semiconductores, las nanopartículas de magnetita, las partículas poliméricas y diversos tipos de nanopartículas metálicas.

Los puntos cuánticos han sido propuestos para ser utilizados con fines diagnósticos debido a sus propiedades fluorescentes dependientes del tamaño³⁰; las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro pueden ser utilizadas para el diagnóstico por imagen usando resonancia magnética, para administración de fármacos, así como para terapia hipertérmica usando campos magnéticos oscilantes³¹; las nanopartículas poliméricas y lipídicas han sido utilizadas, generalmente, para encapsular moléculas terapéuticas con el objetivo de incrementar su biodistribución y por lo tanto su eficiencia³².

Las nanopartículas metálicas han sido ampliamente investigadas debido, principalmente, a la facilidad de ser sintetizadas controlando su forma, tamaño, composición y estructura, así como la simplicidad para modificar su superficie con moléculas específicas para células diana; dentro de las partículas metálicas, las nanopartículas de oro son de especial interés para ser utilizadas en aplicaciones médicas debido a sus propiedades ópticas únicas que posibilitan su uso, especialmente, en el fotodiagnóstico y la fototerapia del cáncer^{2,5,7,8}. Esto es de especial

interés en el presente trabajo por lo que se abundará en ello de manera más detallada en las secciones siguientes.

Nanopartículas de oro.

El oro es un claro ejemplo del cambio en las propiedades físicas de un material cuando esté es llevado a un tamaño nanométrico; cuando el oro se encuentra en forma de nanopartículas sus propiedades ópticas son modificadas drásticamente debido, principalmente, al confinamiento de los electrones de la banda de conducción (estos no son capaces de moverse libremente como en el material en bulto), provocando que las nanopartículas de oro tengan, a simple vista, una gama de colores desde el rojo hasta el azul, dependiendo de su tamaño y forma, los cuales difieren claramente del color dorado característico del material en bulto³³.

Las intrigantes propiedades ópticas de las nanopartículas de oro son atribuidas a su peculiar forma de interactuar con la luz; cuando estas nanopartículas son sometidas al campo electromagnético oscilante, los electrones de la banda de conducción en la superficie de las partículas entran en resonancia con la frecuencia incidente, es decir, los electrones comienzan a oscilar de manera colectiva y coherente con el campo electromagnético, a este fenómeno se le conoce como plasmón de resonancia de superficie (PRS). Esto induce una polarización en la partícula debido a la separación de cargas entre la nube electrónica (cargada negativamente) y el núcleo metálico (cargado positivamente), lo cual a su vez ejerce una fuerza restauradora que provoca que los electrones continúen oscilando dando como resultado una oscilación dipolar (Figura 1 (a))^{1,2,33-36}.

La teoría completa para describir el comportamiento de una onda electromagnética que interactúa con una partícula metálica fue desarrollada por Gustav Mie en 1908. En esta teoría el campo electromagnético es expandido en una serie de contribuciones multipolares y los coeficientes de la expansión son determinados aplicando condiciones de frontera adecuadas para el campo electromagnético en las interfaces de las nanopartículas metálicas con el medio circundante.

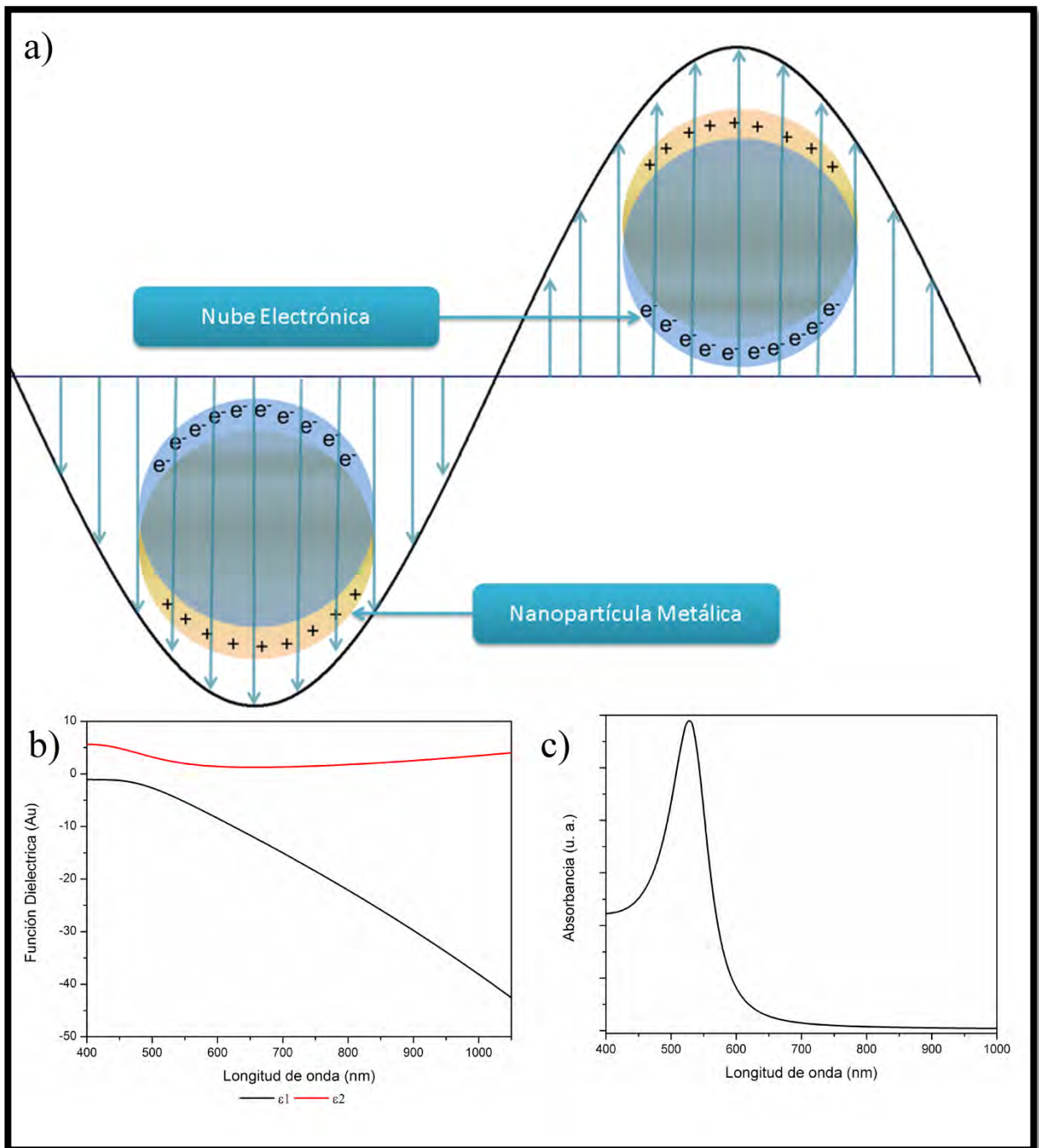


Figura 1. a) Representación esquemática del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie en nanopartículas metálicas. b) Valores de la parte real (ϵ_1) e imaginaria (ϵ_2) de la función dieléctrica del oro en bulto en función de la longitud de onda de la luz incidente (tomado de la referencia 37). c) Espectro de absorción característico de nanopartículas de oro de un tamaño de 30 nm calculado con la ecuación (1) y los valores mostrados en b).

El procedimiento es bastante complejo, sin embargo, para partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda incidente, se puede considerar que la influencia del campo electromagnético sobre la partícula es uniforme, de esta manera, el problema se simplifica y la partícula puede ser descrita como un dipolo eléctrico, esta simplificación se conoce como la aproximación dipolar. Considerando que las bandas de resonancia que nos interesan en el caso de las nanopartículas de oro se encuentran en la región visible del espectro electromagnético (360-720 nm), las partículas de un tamaño menor a 50 nm pueden cumplir con el tamaño adecuado para ser modeladas usando ésta aproximación^{33,35}.

Considerando la aproximación dipolar, la sección eficaz de extinción (σ_{ext}) está dada por la siguiente ecuación:

$$\sigma_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon_2}{(\epsilon_1 + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_2^2} \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda, ϵ_1 y ϵ_2 son la parte real e imaginaria de la función dieléctrica compleja del metal en bulto, ϵ_o es la constante dieléctrica del medio, la cual está relacionada con el índice de refracción del medio por $\epsilon_o = n_o^2$.

Es necesario detenernos un poco para analizar el significado de la ecuación (1); cuando la luz interactúa con la materia, en este caso particular, con nanopartículas de oro, pueden ocurrir una serie de fenómenos asociados a dicha interacción, la luz puede ser absorbida, dispersada o transmitida dependiendo de las características de la radiación incidente y, por supuesto, de las nanopartículas involucradas. La intensidad de un haz de luz que incide sobre una suspensión de nanopartículas sufre un decaimiento exponencial descrito por:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-c\sigma x} \quad (2)$$

Donde $I(x)$ es la intensidad de la luz después de recorrer una distancia "x" de la suspensión de nanopartículas, I_0 corresponde a la intensidad de la luz incidente, c es la concentración de nanopartículas por unidad de volumen y σ es la sección eficaz de extinción de las nanopartículas. La extinción o atenuación de la luz incidente es la suma de la luz absorbida (determinada por la sección eficaz de absorción σ_{abs}) y la luz dispersada (determinada por la

sección eficaz de dispersión $\sigma_{sc}(\omega)$, es decir $\sigma_{sc}(\omega) = \sigma_{ext}(\omega) - \sigma_{abs}(\omega)$. La sección eficaz de extinción hace referencia, básicamente, a la eficiencia de la partícula para remover fotones de la luz incidente (atenuar o extinguir la intensidad del haz de luz) tanto por absorción como por dispersión^{33,35}.

Por lo tanto, la ecuación (1), nos indica que la eficiencia para atenuar la luz de una suspensión de nanopartículas de oro varía con la longitud de onda de la luz incidente, es decir, existe una determinada longitud de onda a la cual la sección eficaz de extinción se maximiza; dado que la función dieléctrica compleja de los metales ($\epsilon(\omega)$) muestra una dependencia con la frecuencia de la radiación electromagnética incidente, tanto ϵ_1 como ϵ_2 varían con la longitud de onda (λ). Por lo tanto, la absorción de la radiación electromagnética se maximiza y aparece una banda de absorción², cuando $\epsilon_2 = \epsilon_1$. En la Figura 1 b) se muestran los valores de ϵ_1 y ϵ_2 (desde 400 a 1050 nm) reportados por Johnson y Christy³⁷ y en la Figura 1 c) se muestra la posición del PRS de una partícula de oro esférica de 30 nm calculada usando la ecuación (1) y los valores de ϵ_1 y ϵ_2 mostrados en la Figura 1 b). Es importante recalcar que conforme el tamaño de la partícula incrementa, esta aproximación ya no es válida debido a que al campo eléctrico dentro de la partícula ya no es uniforme, por lo tanto, es necesario tomar en cuenta las contribuciones multipolares consideradas en la teoría de Mie.

La posición del PRS es altamente dependiente de la forma y del tamaño de las nanopartículas de oro, es por ello que una gran cantidad de investigadores han desarrollado diversas metodologías con el objetivo de manipular esas dos características para poder controlar la posición del PRS desde el visible hasta el infrarrojo cercano (500-1000 nm)^{2,38-42}. En ese sentido se han obtenido nanobarras, nanocorazas, nanojaulas y nanoestrellas de oro, entre otras estructuras (Figura 2). En este trabajo, en particular, estamos interesados en las nanobarras de oro, por lo que solo nos enfocaremos en este tipo de partículas en lo que resta del texto.

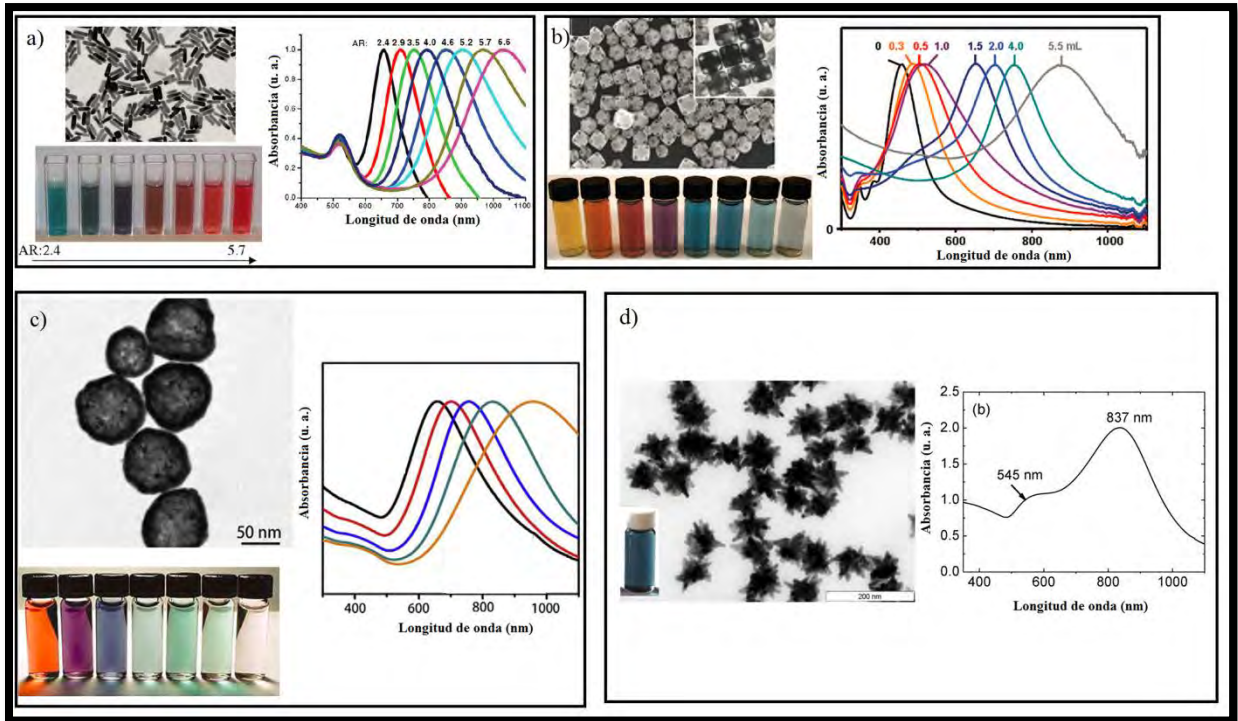


Figura 2. Diferentes formas de nanopartículas de oro, se incluyen los colores y las bandas de absorción características para cada una de ellas. a) Nanobarras de oro, b) Nanojaulas de oro, c) Nanocorazas de oro y d) Nanoestrellas de oro. Tomado de las referencias 38-40 y 42.

Rtqrkgfcfgulhqvn²to kcu'fg'lcu'pcpqrctvkwcu'fg'htq0'

La energía absorbida por las nanopartículas de oro, proveniente de la radiación electromagnética incidente, es disipada en forma de calor al medio ambiente circundante por medio de una serie de procesos no radiativos, este fenómeno ha motivado el uso de estas nanopartículas para desarrollar la llamada terapia fototérmica^{5,7}. Los procesos físicos subyacentes a esta propiedad de las partículas de oro son bastante complejos, así que los abordaremos de manera un tanto superficial a continuación.

Se deben considerar las siguientes cuestiones para comprender un poco la relación existente entre la luz absorbida y el calor disipado: 1) el fenómeno de resonancia del plasmón puede ser considerado como un conjunto de transiciones electrónicas intrabanda (dentro de la banda de conducción de la partícula de oro) que oscilan en fase; 2) el calor es el resultado de un conjunto de vibraciones en un sólido y es transportado a través de partículas elementales como los electrones, los fonones (modo cuantizado de vibración que se presenta en los sólidos) y los fotones, en los primeros dos casos el mecanismo involucrado es la conducción y en el último el transporte de calor es a través de la radiación; 3) los electrones y la red cristalina de la nanopartícula pueden ser considerados como dos subsistemas acoplados, la separación se justifica debido a las grandes diferencias en sus capacidades caloríficas^{33,36}.

Cuando un haz de luz incide sobre una suspensión de nanopartículas de oro, parte de la luz es absorbida e induce transiciones electrónicas tanto intrabanda como interbanda (dependiendo de la energía incidente). La forma apropiada para describir cambios en la distribución electrónica dentro de la banda de conducción de un metal es a través de la estadística de Fermi-Dirac. La distribución electrónica, f es descrita matemáticamente como:

$$f = \frac{1}{1 + e^{(E-E_f)/kT_e}} \quad (3)$$

donde T_e es la temperatura electrónica, definida como una medida que caracteriza a la energía interna electrónica en el equilibrio, E_f es la energía de Fermi, que indica el nivel energético más alto ocupado por un sistema cuántico a 0 K y k es la constante de Boltzmann, por lo tanto, "cada distribución electrónica está asociada a una determinada temperatura electrónica"³⁶.

Imaginemos ahora que irradiamos la suspensión de nanopartículas de oro con un láser de 620 nm, lo cual equivale a una energía de 2 eV (Figura 3). Antes de la irradiación, la temperatura electrónica (T_e) es igual a la temperatura de la red cristalina (T_l), es decir, ambos están en equilibrio térmico, es decir, $T_e = T_l$ (temperatura inicial), esta situación es mostrada en la Figura 3 a). Cuando iniciamos la irradiación, los electrones con una energía menor o igual a 2 eV por debajo de la Energía de Fermi son impulsados a niveles energéticos de hasta 2 eV por arriba de la energía de Fermi, esto corresponde a la distribución electrónica descrita en la Figura 3 b). Esta distribución electrónica en este momento no se encuentra en equilibrio de acuerdo a lo que dicta la estadística de Fermi-Dirac para los fermiones; para recuperar el equilibrio, la energía es internamente redistribuida dentro del gas de electrones a través de colisiones electrón-electrón hasta que se alcanza una nueva distribución de Fermi (Figura 3 c)) a una temperatura más alta ($T_e > T_l$), es decir, se produce una termalización electrónica como resultado de la absorción de la energía de la radiación incidente^{33,36}.

En este punto tenemos que la temperatura del gas de electrones es mayor que la temperatura de la red cristalina de la nanopartícula de oro ($T_e > T_l$), por lo tanto, como ambos subsistemas están acoplados, el sistema completo tiende a alcanzar el equilibrio térmico a través de un proceso denominado acoplamiento electrón-fonón, de tal manera que la energía de los electrones es transferida a la red cristalina, por lo tanto, T_l incrementa mientras T_e disminuye. Esto es descrito a través del denominado modelo de dos temperaturas (two-temperature model (TTM)), desarrollado para metales en bulto y adaptado para nanopartículas, este modelo consiste en dos ecuaciones diferenciales acopladas que describen como varía la temperatura del gas de electrones y de la red cristalina de la nanopartícula con el tiempo:

$$C_e \frac{\partial T_e}{\partial t} = -G(T_e - T_l) + P_{abs}(t) \quad (4)$$

$$C_l \frac{\partial T_l}{\partial t} = G(T_e - T_l) \quad (5)$$

donde C_e y C_l denotan el calor específico del gas de electrones y de la red cristalina, respectivamente, G es la constante de acoplamiento electrón-fonón (para el oro $G = 3 \times 10^{16} \text{ W m}^{-3} \text{ K}^{-1}$) y P_{abs} representa la potencia del láser absorbida por unidad de volumen del metal.

El signo negativo en la ecuación (4) hace referencia a una disminución en la temperatura del gas de electrones conforme transcurre el tiempo, el calor es transferido a la red cristalina de la nanopartícula y por lo tanto la temperatura de esta incrementa, el índice de cambio de la temperatura depende, como se observa en la ecuación, de la diferencia de temperatura entre los dos subsistemas^{1,33,36}.

Finalmente el calor de la red cristalina de la nanopartícula es disipado a los alrededores. Generalmente las nanopartículas están suspendidas en una solución acuosa, por lo tanto, el calor disipado genera un incremento de temperatura de esta de acuerdo a $S = \rho c V \Delta T$. Considerando lo anterior, es posible hacer una estimación del cambio de temperatura aproximado de una suspensión de nanopartículas irradiadas con un láser; supongamos que irradianos 3 mL de una suspensión de nanopartículas con una absorbancia de 1 (a 808 nm) usando un láser de 808 nm a una potencia de 1 W durante un período de 20 min, bajo estas condiciones se suministrarían 1200 J de energía al sistema, la suspensión atenúa el 90 % de la luz incidente lo cual corresponde a 1080 J, si consideramos que el 50 % de la extinción se debe a la absorción⁴³ tendríamos un total de 540 J absorbidos; tomando en cuenta que $S = \rho c V \Delta T$ $\rho = 3 \text{ g}$ y $c = 4.8 \text{ J/g}^\circ\text{C}$, considerando que el sistema está aislado, entonces la temperatura de la suspensión de las nanopartículas incrementaría 37.5°C ⁴⁴.

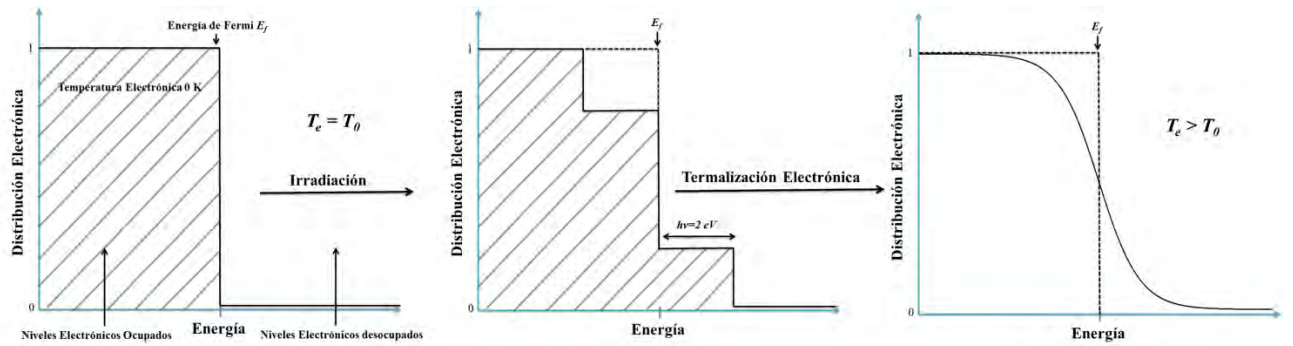


Figura 3. Representación esquemática del proceso de calentamiento del gas de electrones después de la absorción de la radiación electromagnética, siguiendo la distribución de Fermi-Dirac. Adaptado de las referencias 33 y 36.

*Pcpqdcttcu'fg'htq'*CwPDu#0'*

Como se mencionó en párrafos anteriores, la longitud de onda a la cual las nanopartículas de oro presentan un máximo en la atenuación de la luz es altamente dependiente de la forma de dicha partícula. En este sentido, las nanobarras de oro son un claro ejemplo de este comportamiento, en ellas, la oscilación de los electrones puede llevarse a cabo tanto en el eje transversal como en el longitudinal, esto provoca que estas partículas presenten dos bandas de absorción, una alrededor de 510-530 nm debido al PRS transversal y la otra entre 600 y 1000 nm debido al PRS longitudinal (Figura 4).

Estas propiedades ópticas pueden ser descritas utilizando la teoría desarrollada por Gans para partículas elipsoides utilizando la aproximación dipolar^{10,34,45}, la posición de las bandas de absorción de AuNBs orientadas al azar es descrita por:

$$\sigma_{abs} = \frac{2\pi N V \varepsilon_m^{3/2}}{3\lambda} \sum \frac{(1/P_j^2) \varepsilon_2}{\left(\varepsilon_1 + \frac{1-P_j}{P_j} \varepsilon_m\right)^2 + \varepsilon_2^2} \quad (6)$$

donde R_j corresponde a los factores de depolarización para los tres ejes de la nanobarra con $C@D? E$, los cuales son definidos como:

$$P_A = \frac{1-e^2}{e^2} \left[\frac{1}{2e} \ln \left(\frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right] \quad (7)$$

$$P_B = P_C = \frac{1-P_A}{2} \quad (8)$$

donde

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{B}{A}\right)^2} \quad (9)$$

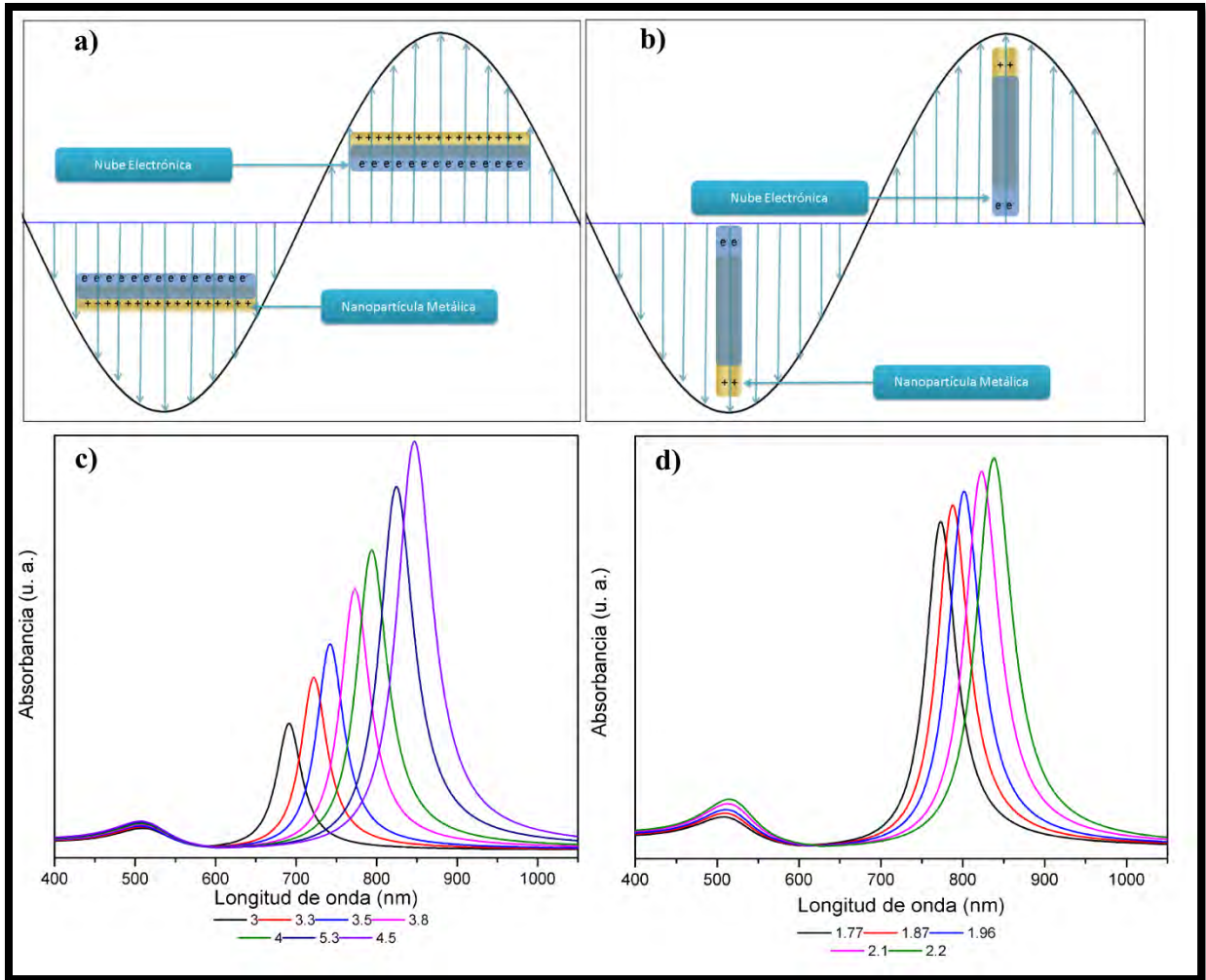


Figura 4. Representación esquemática del fenómeno de resonancia del plasmón de superficie de nanobarras de oro, a) PRS transversal y b) PRS longitudinal, y bandas de absorción características de las nanobarras de oro para diferentes c) relaciones de aspecto y d) constantes dieléctricas del medio. Los espectros de absorción de las Figuras c) y d) fueron calculados con la ecuación (6) y considerando los valores de ϵ_3 y ϵ_4 mostrados en la Figura 1 c).

En la Figura 4 se muestran los espectros de absorción para nanobarras de oro con diferente relación de aspecto y para diferentes constantes dieléctricas del medio calculadas usando la ecuación (6) y los valores de ϵ_3 y ϵ_4 reportados por Johnson y Cristy³⁷, el eje transversal de la nanobarra se mantuvo constante (15 nm) y se varió el tamaño del eje longitudinal para obtener diferentes valores de la relación de aspecto (definida como la relación largo/ancho). Se puede notar claramente que la posición del PRSL depende fuertemente tanto de la relación de aspecto de la nanobarra de oro, como de la constante dieléctrica del medio. La banda de absorción del PRSL experimenta un corrimiento muy pronunciado al rojo (de 680 a 850 nm) cuando la longitud de la nanobarra de oro cambia de 45 nm (relación de aspecto de 3) a 67.5 nm (relación de aspecto de 4.5). Algunos autores³⁴ han propuesto una relación lineal entre el PRSL y la relación de aspecto de las nanobarras de oro siguiendo la ecuación:

$$\lambda_{max} = 95R + 420 \quad (10)$$

Este comportamiento del PRSL en función de la relación de aspecto tiene una relevancia importante para el uso de las AuNBs para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer debido a que es posible obtener nanopartículas que absorban la radiación electromagnética dentro de la llamada ventana biológica (700-900 nm), donde se presenta un mínimo en la absorción de los tejidos^{46,47}, por ello se han realizado una gran cantidad de investigaciones con el objetivo de optimizar las condiciones de síntesis para poder controlar la relación de aspecto y por lo tanto la posición del PRSL³⁴. El efecto de la constante dieléctrica del medio sobre la posición del PRS ha sido explotado, por ejemplo, para el desarrollo de biosensores⁴⁸.

Uspvku'fg'CWPDuO''

El protocolo más utilizado para sintetizar AuNBs es el método mediado por semillas, este es un proceso que consiste en dos pasos, primero se sintetizan unas partículas de oro de alrededor de 2 nm (“semillas”) estabilizadas con CTAB, después, estas “semillas” son colocadas en una solución (solución de crecimiento) que contiene CTAB, H₂AuCl₄, Ácido Ascórbico y generalmente AgNO₃, las semillas actúan como centros de nucleación para la deposición de nuevos átomos de oro, provenientes de la reducción del H₂AuCl₄ por el ácido ascórbico, y la composición de la solución de crecimiento promueve un incremento anisotrópico de las “semillas” dando como resultado la formación de las nanobarras⁴⁹.

Los primeros reportes de la síntesis de AuNBs por medio del método mediado por semillas fueron publicados en 2001 por Jana et al.^{11,50}, ellos sintetizaron nanopartículas de oro de 3.5 nm cubiertas con citrato, después agregaron la solución de semillas a una solución de crecimiento que contenía CTAB, HAuCl₄ y ácido ascórbico, después de un período de tiempo corto, tomaron una alícuota de esa solución y la agregaron a una nueva solución de crecimiento, finalmente una alícuota de esta última fue transferida a una tercera solución de crecimiento. Este protocolo les permitió obtener AuNBs con relaciones de aspecto desde 10 hasta 25. El principal problema con este protocolo es que la proporción de nanobarras es solo de alrededor del 5 % y se requieren múltiples pasos de centrifugación y resuspensión para la purificación de las mismas. Las nanobarras sintetizadas por este método presentan una estructura cilíndrica con caras cristalinas {111} en las puntas y {100} o {110} en la parte lateral de la estructura (Figura 7 a))⁵¹.

Posteriormente, Nikoobahkt y El-Sayed (2003)¹² mejoraron el protocolo desarrollado por Jana et al., ellos sintetizaron AuNBs de una relación de aspecto más pequeña (1.5 a 4.5) y con un rendimiento mucho mayor. Para ello utilizaron “semillas” de oro de 1.5 nm cubiertas con CTAB en lugar de citrato y además agregaron diferentes concentraciones de AgNO₃ a la solución de crecimiento para controlar la relación de aspecto. Observaron que existía una dependencia directa de la relación de aspecto de las AuNBs con la concentración de AgNO₃ utilizada, por lo que la posición del plasmón podría ser controlada simplemente variando la concentración de plata utilizada en la solución de crecimiento. La estructura cristalina de las AuNBs es diferente de la obtenida con el protocolo de Jana et al., aparentemente las partes laterales de la AuNBs están conformadas por caras {250} mientras las puntas están formadas por caras {111}, {110} y {100} (Figura 7 b))⁵².

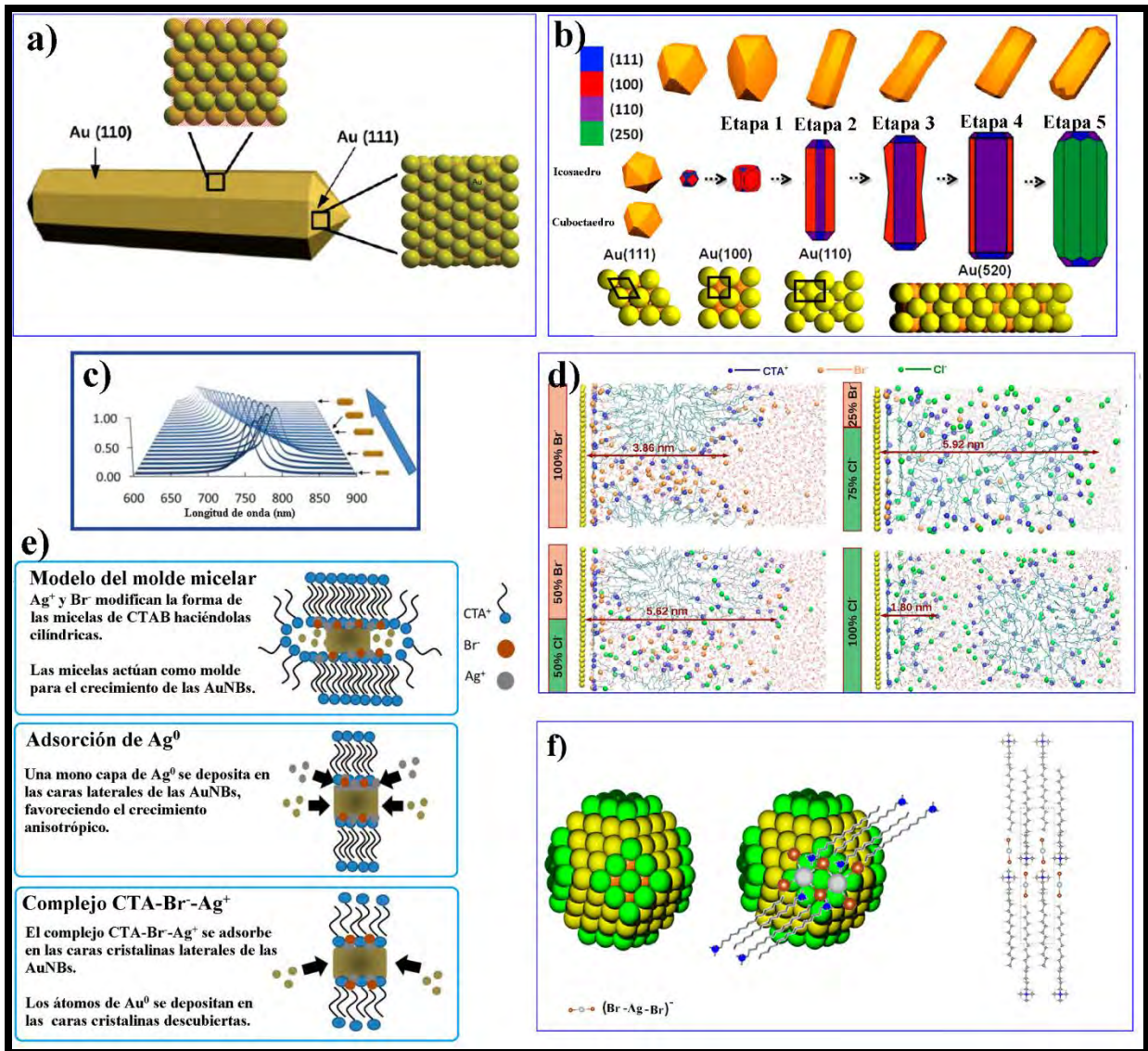


Figura 5. a) Forma y estructura cristalina de nanobarras de oro sintetizadas en ausencia de AgNO_3 , b) Estructura cristalina y progresión del crecimiento de nanobarras de oro sintetizadas en presencia de AgNO_3 (tomado de la referencia 52), c) Progresión de los espectros de absorción característicos de las nanobarras de oro en sus diferentes etapas (tomado de la referencia 57), d) Adsorción de micelas cilíndricas de CTAB sobre la superficie de oro (tomado de la referencia 64), e) Resumen de los tres mecanismos propuestos para el efecto del AgNO_3 sobre el crecimiento de las nanobarras y f) adsorción del complejo $[\text{Br-Ag-Br}]^-$ sobre las caras cristalinas $\{100\}$ de las "semillas" de oro (tomado de la referencia 62).

{111} y {100}), las primeras solo forman partículas esféricas, mientras las segundas pueden formar las nanobarras.

Etapa 2 (2-5 min); en esta se presenta un rápido crecimiento anisotrópico, el índice de crecimiento longitudinal es significativamente más rápido que el transversal, es decir, las partículas crecen en una sola dirección (longitudinal) mientras el diámetro inicial (alrededor de 6 nm) se mantiene. Etapa 3 (5-20 min). La velocidad de crecimiento longitudinal disminuye ligeramente mientras la velocidad de crecimiento transversal incrementa, a los 10 min de reacción se alcanza el máximo desplazamiento hacia el rojo del PRSL, lo cual corresponde a la mayor relación de aspecto de las AuNBs, después de este tiempo el PRSL comienza a experimentar un corrimiento al azul como resultado del crecimiento transversal de las nanobarras que provoca una disminución de la relación de aspecto, los extremos de la nanobarra se vuelven ligeramente más gruesos. Etapa 4 (20-45 min). La velocidad de crecimiento tanto longitudinal como transversal disminuye significativamente, los átomos de oro comienza a depositarse lentamente en la parte central de las caras laterales devolviéndole a la nanobarra su estructura cilíndrica. Etapa 5 (a partir de los 45 min). La estructura de la nanobarra se relaja y toma su forma final, la cual es termodinámicamente más estable.

Diversos autores⁵³⁻⁵⁷ han estudiado la progresión del crecimiento de las AuNBs usando espectroscopia de UV-Vis y sus resultados concuerdan perfectamente con la descripción hecha por Park et al., generalmente se observa que el PRSL de las nanobarras experimenta un corrimiento al rojo en los primeros minutos de reacción (8-15 min) y después un pronunciado corrimiento al azul, que en algunos casos alcanza hasta los 150 nm. Este comportamiento se muestra claramente en la Figura 7 c), donde también se observa la progresión en las diferentes formas de las nanobarras y su relación con su espectro de absorción.

El papel del CTAB va más allá de un simple estabilizante y se ha mostrado que juega un rol primordial en el desarrollo de la anisotropía de las AuNBs. Se ha sugerido que las micelas de CTAB tienen, inherentemente, una forma cilíndrica bajo las condiciones de síntesis normalmente utilizadas, y que estas micelas actúan como molde para promover el crecimiento anisotrópico de las “semillas” y la consecuente formación de las nanobarras de oro, además, que la presencia de los iones Ag^+ y Br^- tiende a modificar la estructura micelar del CTAB

ayudando de esta manera a la formación de nanobarras con una relación de aspecto más grande⁵⁸. Se ha reportado que el tamaño de las micelas de CTAB en solución acuosa es de alrededor de 4.2 nm de largo y 2.4 nm de ancho⁵⁹. Jana (2005)⁵⁸ observó que no se formaban nanobarras cuando el tamaño de las “semillas” de oro era demasiado grandes (>5 nm), el propuso que este comportamiento era debido a que las “semillas” eran demasiado grandes para entrar a la micela y por lo tanto esta no podía actuar como molde para la formación de las nanobarras.

Por otro lado se ha propuesto que el CTAB podría dirigir el crecimiento anisotrópico debido a que probablemente se adsorba de manera preferencial a ciertas caras cristalinas de las partículas de oro, de tal manera que solo permite la deposición de átomos de oro en una sola dirección promoviendo así la formación de las nanobarras⁶⁰. Aparentemente los iones Br^- juegan un papel preponderante en este proceso, Garg et al. (2010)⁶¹ observaron que si se reemplaza el CTAB por CTAC (cloruro de hexadeciltrimetilamonio) se inhibe significativamente la formación de AuNBs y, además, se pueden producir nanobarras de oro usando concentraciones de CTAB por debajo de su concentración micelar crítica si se incrementa la concentración de iones Br^- , esto claramente contrasta con el modelo que considera a la micela cilíndrica de CTAB como molde para el crecimiento de las nanobarras. Además, Almora-Barrios et al. (2013)⁶² determinaron teóricamente que la fuerza con la que se adhieren los iones haluro a las caras cristalinas características de las nanobarras es $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, esto podría explicar la razón por la que los iones Br^- son más adecuados para la síntesis de estas estructuras anisotrópicas; los iones Cl^- no se adhieren con la suficiente fuerza como para impedir la deposición selectiva de oro en una determinada cara cristalina de la partícula, mientras que los iones I^- se adhieren demasiado fuerte e impiden el rompimiento del crecimiento isotrópico de las semillas para producir las nanobarras (se sabe que pequeñas trazas de este ion impiden la formación de AuNBs⁶³).

Meena y Sulpizi (2013)⁶⁴ utilizaron simulación de dinámica molecular para entender el efecto del CTAB sobre el crecimiento anisotrópico de las AuNBs, sus resultados sugieren que el CTAB, en lugar de formar una bicapa uniforme, forma micelas cilíndricas desordenadas sobre la superficie de las AuNBs y con espacios intermicelares (los iones Br^- se encuentran en contacto con el agua y estabilizan las micelas) que hacen las veces de canales iónicos por

donde pueden difundir las moléculas de AuCl_2^- hacia la superficie de la nanobarra (Figura 7 d)). Además, las micelas están empaquetadas más densamente en las caras $\{110\}$ y $\{100\}$ con respecto a las $\{111\}$, lo cual está relacionado con un mayor índice de adsorción de átomos de oro en esta última cara cristalina y por lo tanto, con un crecimiento preferencial en esta dirección. Siguiendo este modelo, este mismo grupo de investigación propone que la diferencia en la fuerza de adhesión de los iones Br^- y Cl^- sobre la superficie de oro modifica drásticamente la estructura del CTAB, cuando se reemplaza el Br^- con Cl^- , la capa del surfactante se vuelve menos compacta y solo pocas moléculas de CTA^+ se unen a la superficie de oro y lo hacen de manera desordenada (Figura 7 d)), lo que implica que el CTAC es incapaz de proteger selectivamente la superficie de oro, y por lo tanto la deposición preferencial de oro en alguna cara cristalina determinada, impidiendo así el crecimiento anisotrópico de las partículas de oro. Sus cálculos teóricos fueron relacionados con resultados experimentales donde realizaron la síntesis de AuNBs usando CTAB y CTAC en diferentes proporciones, observaron que conforme incrementaba la relación CTAC/CTAB la proporción de AuNBs disminuía drásticamente y cuando el CTAB era reemplazado completamente con CTAC solo se formaban partículas esféricas⁶⁵. Por otro lado, otros estudios han mostrado que la micela de CTAC es mucho más pequeña y menos cilíndrica (2.9 nm de largo por 2.3 nm de ancho) que la de CTAB⁵⁹, esto también podría explicar la disminución en el rendimiento de formación de las nanobarras cuando se reemplaza el Br^- por el Cl^- si consideramos como correcto el modelo del molde micelar descrito por Jana (2005)⁵⁸.

El control de la relación de aspecto de las AuNBs por medio de la variación de la concentración de AgNO_3 en la solución de crecimiento es bien conocido desde el punto de vista experimental, sin embargo, el proceso por el cual se logra este control aún sigue siendo objeto de debate. Se han propuesto tres mecanismos para explicar este fenómeno; 1) los iones Ag^+ , junto con los iones Br^- , pueden alterar la forma micelar del CTAB para producir micelas más cilíndricas que actúan como molde para la formación de las nanobarras, 2) la deposición de una mono capa de Ag metálica en las caras longitudinales de la AuNBs, (3) la formación de un complejo CTA-Br-Ag^+ que actúa como agente protector de caras cristalinas específicas de la partícula de oro (Figura 7 e))⁶⁶.

El modelo de la deposición de plata metálica en la superficie de oro sugiere que se puede reducir los iones Ag^+ a Ag^0 para producir una submonocapa de plata metálica en determinadas caras cristalinas de las nanobarras, esto a pesar de que el potencial de reducción de la solución de crecimiento no es suficiente para reducir los iones plata por sí sola (se ha observado que los iones Ag^+ en una solución acuosa de CTAB pueden ser reducidos por el ácido ascórbico solo a pH muy altos⁵⁰), posiblemente la superficie de oro catalice esta reducción. Esta deposición de plata metálica en determinadas caras cristalinas impide la adsorción de nuevos átomos de oro y por lo tanto el crecimiento en una dirección determinada, se sugiere que este proceso es favorecido en las caras laterales de las nanobarras (debido a su mayor energía libre de superficie) y esto podría explicar el crecimiento anisotrópico característico de ellas⁶⁷.

La otra hipótesis mencionada es un tanto similar a la anterior solo que la plata no se reduce a Ag^0 sobre la superficie de oro, sino que forma un complejo de coordinación con el Br^- . Algunos estudios han confirmado experimentalmente que el complejo $[\text{Br-Ag-Br}]^-$ se encuentra adsorbido en la superficie de las nanobarras de oro^{68,69}. Este modelo sugiere que este complejo se adsorbe con mayor fuerza sobre las caras cristalinas con mayor energía libre de superficie ($\{100\}$ o $\{110\}$ dependiendo del estadio de la nanobarra), mientras que el CTA^+ actúa como contraión estabilizando el sistema⁶⁶. Algunos investigadores sugieren que la presencia de este complejo puede explicar el rompimiento de la isotropía de las “semillas” e iniciar el crecimiento anisotrópico^{62,69}, Almora-Barrios (2014)⁶² sugieren el modelo descrito en la Figura 7 f) para explicar este fenómeno, se parte de la idea de que para que se produzcan nanobarras es estrictamente necesario que las “semillas” tengan una estructura cuboctaédrica (lo cual concuerda con lo observado por Park et al. (2013)⁵²), es decir, deben estar formadas por caras $\{100\}$ (en la figura aparecen de color verde) y $\{111\}$ (en la figura aparecen de color amarillo). La interacción del complejo $[\text{Br-Ag-Br}]^-$ es termodinámicamente más favorable en la cara $\{100\}$ por lo que se adsorbe de manera específica allí, después, las moléculas de CTA^+ actúan como contraiones para estabilizar el sistema con el arreglo espacial mostrado en la figura. Nótese que bajo esta configuración, y debido al impedimento estérico de las largas cadenas alifáticas del CTA^+ , solo cuatro de las seis caras $\{100\}$ del cuboctaedro pueden ser cubiertas simultáneamente, esto deja descubiertas dos caras perpendiculares entre si donde se pueden depositar los átomos de Au^0 con mayor facilidad, esto dirige el crecimiento

anisotrópico en la dirección {100}, lo cual concuerda con los resultados de Park et al. (Figura 7 b)).

Crñec ekpgu'fg'lcu'CWp Du'gp'gñf kci p»wkeq'f'lc'igt cr lc'fgñe" pegt 0"

Debido a sus propiedades físicas y químicas, las nanopartículas de oro han sido ampliamente utilizadas en la medicina para el desarrollo de tecnología que permita el tratamiento y el diagnóstico de diversas enfermedades, sus aplicaciones en esta área incluyen la genómica, el inmunoanálisis, la química clínica, la detección y fototermólisis de microorganismos y células cancerosas, el uso como biosensores, la administración controlada de fármacos, antígenos y ADN, imagenología de células y tejidos, entre otros⁷⁰. En este trabajo se tiene especial interés en la terapia y el diagnóstico del cáncer, por lo tanto, la discusión en torno a las aplicaciones médicas de las AuNBs se acotará solo a este tópico.

Kó ci gpqrqi f'f kci p»wkec 0'

Las nanobarras de oro han sido propuestas para ser utilizadas como agentes de contraste para diversas técnicas de imagenología diagnóstica debido a su propiedad de absorber y dispersar la luz, así como a su capacidad intrínseca de fluorescer bajo ciertas condiciones. Poseen básicamente dos ventajas importantes en relación a los agentes de contraste comúnmente utilizados para la obtención de imágenes tanto *kp"xktq* como *kp"xkxq*, primero, su sección eficaz de absorción y dispersión es varios órdenes de magnitud mayor que las moléculas orgánicas convencionales, y segundo, no pierden su capacidad fluorescente (photo bleaching) tal como lo hacen los fluoróforos orgánicos⁷¹. En este sentido las AuNBs se han utilizado como agentes de contraste para microscopia de campo oscuro, tomografía computarizada, imagenología fotoacústica y microscopia de fluorescencia de dos fotones.

Oketqueqrkc'fg"eco r q'quewt q 0'

En el microscopio de campo oscuro la imagen de la muestra se obtiene a partir de la luz dispersada por la misma, por lo tanto, los lugares de la muestra donde no hay un agente que disperse la luz se observan oscuros, mientras que aquellos donde sí se dispersa aparecen brillantes. Esta es una técnica muy versátil para obtener imágenes de muestras biológicas, sin

embargo, presenta complicaciones para obtener imágenes de buena calidad debido a la baja dispersión de la luz observada, lo que implica que la muestra debe ser iluminada con mucha potencia, lo cual puede causar daños en la misma. Es aquí donde las propiedades dispersivas de las AuNBs han sido aprovechadas para utilizar este tipo de partículas como agentes de contraste, por ejemplo, Huang et al. (2006)⁷² utilizaron nanobarras de oro funcionalizadas con anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) para detectar células cancerosas y diferenciarlas de queratinocitos (Figura 5 a)). Esta estrategia ha sido utilizada con nanobarras de oro conjugadas con transferrina y péptidos de penetración celular^{73,74}. Yu et al. (2007)⁷⁵ utilizaron nanobarras de oro de diferente relación de aspecto funcionalizadas con diferentes anticuerpos para detectar cuatro marcadores celulares de metástasis diferentes al mismo tiempo en líneas de cáncer de mama usando el microscopio de campo oscuro, obtuvieron resultados muy similares en relación a estudios control realizados con citometría de flujo, ellos proponen que esta estrategia podría ser utilizada como una herramienta para examinar la distribución y evolución de marcadores celulares que potencialmente podría llevar a un más adecuado diagnóstico del cáncer de mama así como otros tipos de cáncer.

Vgo qi tclfe'ego rwctk/cfc'fg'tc/qu'Z0'

Esta es una técnica muy utilizada actualmente en muchos hospitales, el paciente es irradiado con rayos X, estos son absorbidos en diferente medida dependiendo de la composición de cada una de las partes del cuerpo y a partir de esas diferencias se obtienen imágenes que sirven para el diagnóstico de diversas enfermedades. Con el objetivo de mejorar la visualización de estructuras internas del cuerpo se han utilizado agentes de contraste con alto peso atómico, en este sentido pequeñas moléculas yodadas son comúnmente utilizadas, sin embargo, estos agentes de contraste solo permiten obtener imágenes por lapsos cortos de tiempo debido a su rápida excreción renal. Las AuNBs pueden ser utilizadas como excelentes agentes de contraste debido al alto peso atómico del oro, además de la posibilidad de proveerles mayor especificidad funcionalizándolos con moléculas guía²¹, por ejemplo, Huang et al. (2011)⁷⁶ utilizaron nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico como agentes de contraste para obtener imágenes de rayos X de tumores sólidos en modelos animales (Figura 5 b)).

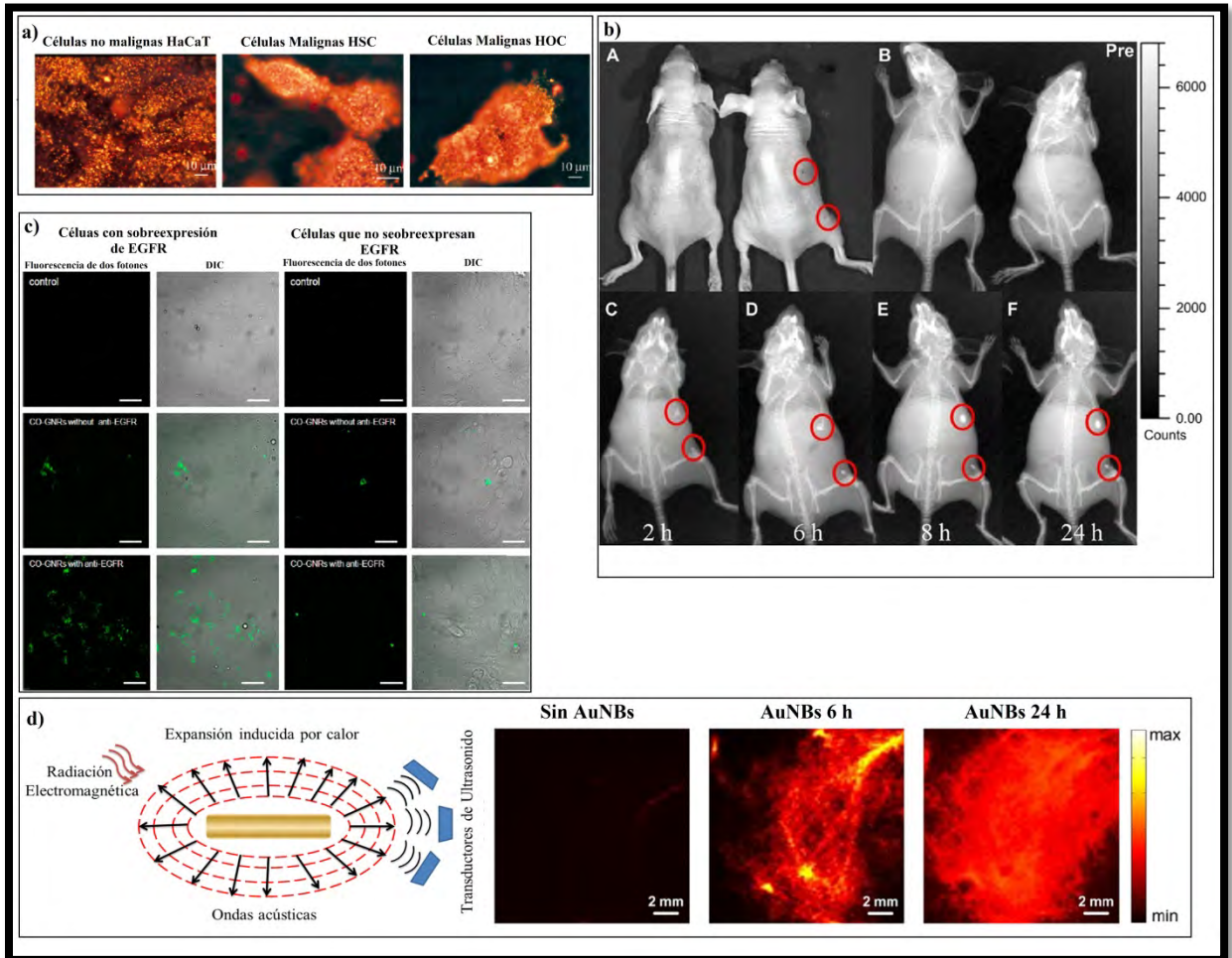


Figura 6. Aplicaciones de las AuNBs en el diagnóstico del cáncer. a) Microscopía de campo oscuro (tomado de la referencia 72), b) Tomografía computarizada de rayos X (tomado de la referencia 76), c) Microscopía de fluorescencia de dos fotones (tomado de la referencia 83), d) Imagenología fotoacústica (tomado de la referencia 86).

O ket que r k 'f g' Hwqt gue gpe k 'f g'f qu' hqv pgi O'

El oro sólido puede ser ópticamente excitado para emitir fluorescencia a través transiciones interbanda⁷⁷, esta emisión es más pronunciada cuando el oro se encuentra en forma de nanopartículas, particularmente en forma de nanobarras^{78,79}. La fluorescencia de dos fotones se basa en que algunas moléculas son capaces de ser excitadas por la absorción de dos fotones con menor energía que el de la emisión⁸⁰; la excitación por dos fotones es el resultado de la absorción simultánea (dentro de un lapso de tiempo de alrededor de 10^{-18} segundos) de dos fotones provenientes de un láser pulsado. Cualquier combinación de fotones de diferentes energías cuya suma de como resultado la diferencia de energía entre el estado base y un estado excitado puede ser utilizada, obviamente, por cuestiones prácticas, se utilizan fotones con la misma longitud de onda, por lo tanto, para poder excitar una molécula que normalmente absorbe, por ejemplo, a 400 nm es necesario utilizar un láser con una longitud de onda 800 nm^{81,82}. Esta técnica es de particular interés en el diagnóstico debido a que posibilita el uso de láseres con longitudes de onda dentro de la ventana biológica. Por medio de esta técnica Charan et al. (2012)⁸³ lograron visualizar células cancerosas que sobreexpresan EGFR y diferenciarlas de células que no lo sobreexpresan. Para ello utilizaron AuNBs funcionalizadas con anticuerpos anti-EGFR y los excitaron usando un láser pulsado de 100 femtosegundos a una longitud de onda de 780 nm (Figura 5 c)). Puvanakrishnan et al. (2012)⁸⁴ fueron capaces de visualizar células de carcinoma epitelial *kp'xkt q'* así como tumores *ip'xkxq* usando AuNBs-anti-EGFR y un láser de femtosegundos a una longitud de onda de 800 nm, las AuNBs fueron visualizadas a profundidades de hasta 100 μm del tumor.

Kó ci gpqrqi 'f' hqv ce AuNBc O'

Esta técnica se basa en el llamado efecto fotoacústico, el cual implica la generación de una onda acústica como resultado de la absorción de la energía óptica; la energía absorbida, por cromóforos endógenos o agentes de contraste exógenos, causa una expansión termo elástica del tejido resultando en la generación de una onda de ultrasonido originada desde el agente que absorbió la luz, este ultrasonido es detectado con un transductor que convierte la onda acústica a una señal eléctrica y posteriormente a una imagen^{21,85}. Las AuNBs poseen

propiedades fotoacústicas cuando son irradiadas con un láser pulsado, éstas generan una onda ultrasónica más fuerte que los cromóforos endógenos de los tejidos, lo que da como resultado una mejora significativa en la imagen obtenida. Por ejemplo, Zhong et al. (2015) utilizaron AuNBs funcionalizadas con ácido fólico para observar tumores *kp"xxq"* usando el efecto fotoacústico obteniendo resultados prometedores⁸⁶ (Figura 5 d)). Se pueden utilizar nanobarras de diferente relación de aspecto funcionalizadas con diversos anticuerpos e irradiarlos con diferentes longitudes de onda para detectar simultáneamente distintas moléculas diana, un principio parecido al mencionado anteriormente para la microscopia de campo oscuro⁸⁷.

Vgt crkc "lqvqv² to kec "eqpvt c "gnle^a pegt 0"

En el campo de la oncología, la hipertermia es un tratamiento que involucra un incremento artificial en la temperatura corporal con el objetivo de eliminar células cancerosas o prevenir su futuro crecimiento, generalmente se utilizan temperaturas de entre 40 y 48 °C por períodos de 1 hora o más ⁸⁸. Estas altas temperaturas causan daño directo sobre las células y/o las sensibiliza (las hace más vulnerables) a otras modalidades de tratamiento (radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia)^{89,90}, es por ello que generalmente la hipertermia se utiliza como adyuvante y no como tratamiento por sí mismo.

Cuando la temperatura excede los 39 °C las proteínas comienzan a desnaturalizarse y tienden a agregarse trayendo consecuencias negativas en la dinámica y la supervivencia celular. La aplicación de temperaturas de 41-42 °C por varias horas puede causar termo tolerancia transitoria (relacionada con la síntesis de las proteínas (generalmente chaperonas) de choque térmico). Bajo estos incrementos relativamente ligeros de temperatura se produce un incremento en la perfusión y la reoxigenación del tumor, esto incrementa la eficacia de la quimioterapia y de la radioterapia^{91,92}. Cuando la temperatura se encuentra en 43-45 °C (generalmente considerada como la temperatura óptima para la hipertermia) la velocidad de las reacciones químicas se incrementa significativamente, lo que desencadena estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno comienzan a oxidar a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que desencadena la muerte celular. Si la temperatura utilizada es de 45-48 °C se produce muerte celular por necrosis³.

Para el tratamiento térmico de tumores cancerosos es necesario inducir hipertermia localizada, de tal manera que el incremento de temperatura sea alcanzada específicamente en el tumor mientras que los tejidos alrededor del tumor se mantienen a la temperatura corporal, es aquí donde las propiedades fototérmicas de las nanopartículas de oro pueden ser explotadas para inducir hipertermia de manera localizada de una manera no invasiva a través de la irradiación láser, este método ha sido denominado terapia fototérmica plasmónica. Las AuNBs tienen la capacidad de absorber radiación electromagnética dentro de la ventana biológica por lo que han sido ampliamente investigadas para ser utilizadas para este tipo de terapia^{3-5,7,44,72}.

La terapia fototérmica usando nanobarras de oro ha sido probada en modelos animales obteniéndose resultados bastante prometedores. Dickerson et al. (2008)⁹³ mostraron la efectividad de AuNBs cubiertas con PEG para disminuir el tamaño de un tumor subcutáneo de carcinoma de células escamosas injertado en un modelo animal. Ellos administraron las AuNBs de dos formas, vía intravenosa y directamente en el tumor, después irradiaron el sitio del tumor con un láser de longitud de onda constante (808 nm) por 10 min con una densidad de potencia de 0.9-1.1 W/cm² en el caso de la administración directa y 1.7-1.9 W/cm² en el caso de la intravenosa, observaron una disminución significativa del tamaño del tumor después de la irradiación para las dos vías de administración probadas.

von Maltzahn et al. (2009)⁶ administraron, vía intravenosa, AuNBs a ratones a los que previamente se les había inducido un tumor. Después de 72 h de la administración, el tumor fue irradiado con un láser de longitud de onda de 810 nm durante 5 min con una densidad de potencia de 2 W/cm², el tamaño del tumor disminuyó significativamente y todos los ratones tratados sobrevivieron (Figura 6 a)). Choi et al. (2013)⁹⁴ sintetizaron AuNBs funcionalizadas con un aptámero anti-EGFR y probaron su eficacia para eliminar un tumor en un modelo animal por medio de terapia fototérmica. Ellos reportan una reducción significativa del tamaño del tumor después de la irradiación láser (Figura 6 b)). Heidari et al (2015)⁹⁵ administraron AuNBs funcionalizadas con un análogo de la bombesina a ratones a los que se les había injertado células de cáncer de mama, después de 6 h de la administración el sitio del tumor fue irradiado por 6 min con un láser de 830 nm usando una densidad de potencia de 2.5 W/cm², el tumor había sido erradicado completamente 15 días después del tratamiento (Figura 6 c)).

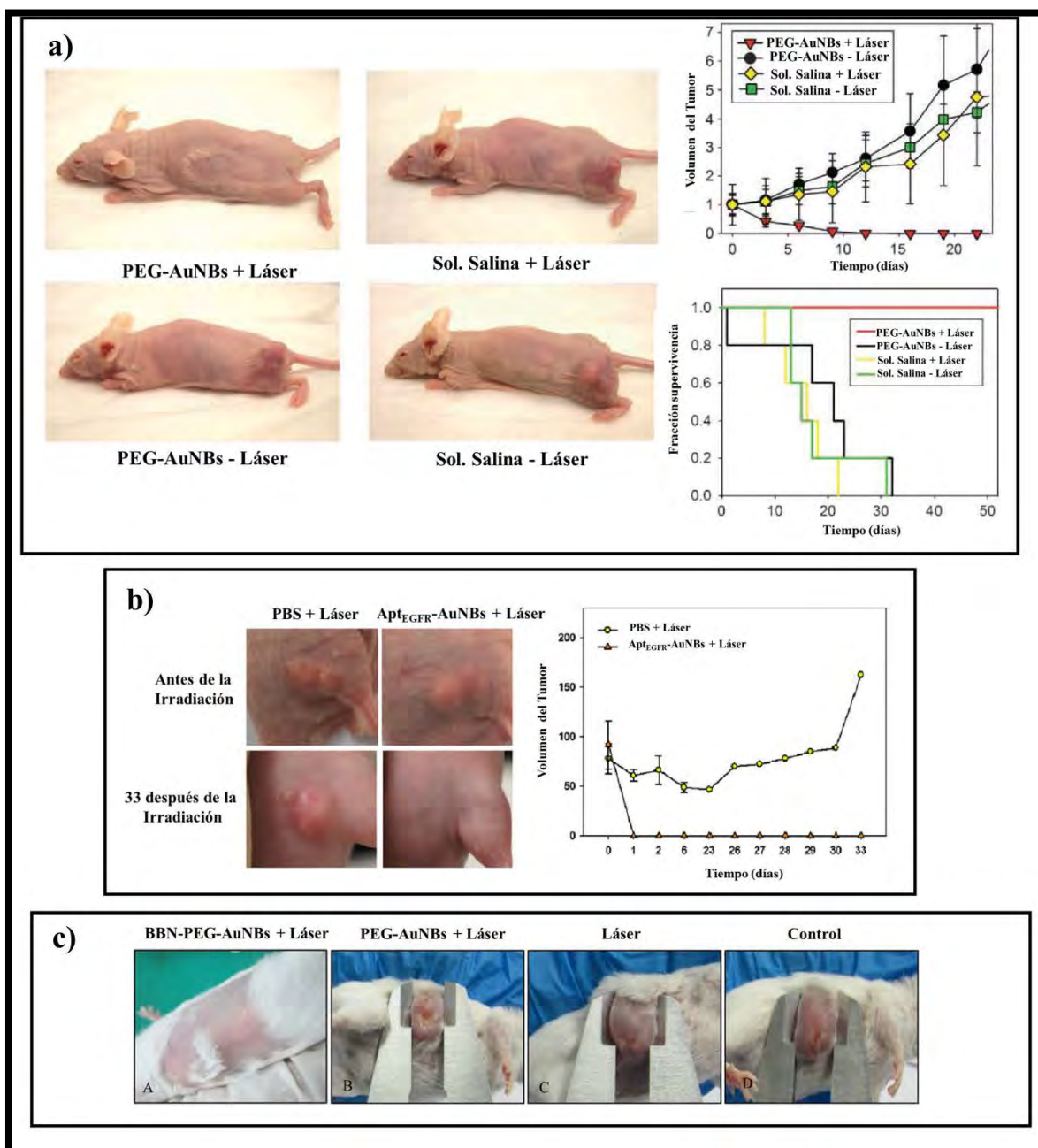


Figura 7. Aplicaciones *in vivo* de la terapia fototérmica usando nanobarras de oro e irradiación láser a) Disminución del tumor después de la irradiación láser 72 h después de la administración intravenosa de nanobarras de oro cubiertas con PEG (tomado de la referencia 6), b) Desaparición completa del tumor después de la administración de nanobarras de oro

funcionalizadas y su posterior irradiación láser (tomado de la referencia 94), c) Completa remoción del tumor después del tratamiento fototérmico usando nanobarras de oro funcionalizadas (tomado de la referencia 95).

Vqzlelf cf 't' b ² vqf qu'f g' g'nto lpcel»p' f gntEVCD0''

Como hemos visto, las potenciales aplicaciones teranósticas de las AuNBs son abundantes, sin embargo, su uso en la práctica médica es limitado debido a su alta citotoxicidad. Este no es un problema intrínseco de las partículas (las AuNBs no son citotóxicas *r gt 'ug*) y ha sido asociada exclusivamente a las moléculas de CTAB presentes en su superficie, de tal manera que la eliminación, o pasivación, de este surfactante es un requisito obligatorio antes de su aplicación clínica^{14,15,18}. Se ha mostrado que las AuNBs cubiertas con CTAB provocan daños en la mitocondria y un incremento intracelular en las especies reactivas de oxígeno, induciendo la muerte celular por apoptosis y autofagia, sin embargo, cuando la superficie de las AuNBs es modificada y el CTAB es cubierto con diversos polímeros, la inducción de muerte celular disminuye significativamente¹⁸.

Se han utilizado tres estrategias para modificar la superficie de las AuNBs con el objetivo de disminuir su citotoxicidad²¹: 1) remover el CTAB intercambiándolo con moléculas o polímeros con grupos SH (generalmente PEG-SH)⁹⁶⁻⁹⁸; 2) cubrir la superficie de las AuNBs con una capa de silica y realizar lavados exhaustivos con etanol^{99,100}; 3) cubrir el CTAB con una serie de capas poliméricas (método de capa por capa) alternando polímeros aniónicos (generalmente sulfonato de poliestireno o ácido poliacrílico) y catiónicos (usualmente polidialildimetilamonio o polialilamina)^{14,15,18}.

Los polisacáridos son candidatos ideales para reemplazar el CTAB de la superficie de las AuNBs debido a su biocompatibilidad, bajos costos y su facilidad para ser modificados químicamente^{22,23}, además, los polisacáridos con comportamiento polielectrolítico pueden ser utilizados para realizar el método de capa por capa, proveyendo una manera de manipular la carga y las características química de la superficie de las AuNBs²⁴. En este sentido, el quitosano ha sido utilizado para reemplazar el CTAB con resultados prometedores^{83,101,102}.

El quitosano es un copolímero formado por glucosaminas y N-Acetil glucosamina, es obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina (polímero abundante en el exoesqueleto de artrópodos, principalmente en los crustáceos como el camarón)¹⁰³. Gracias a su biocompatibilidad, ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones médicas, desde la formación de nanopartículas para administración de fármacos hasta la regeneración de tejidos¹⁰⁴. Este

polímero se comporta como polielectrolito en solución acuosa debido a la protonación de los grupos NH_2 de los monómeros de glucosamina. Tiene grupos funcionales (OH y NH_2) susceptibles a reaccionar químicamente, lo que lo hace muy fácil de modificar para mejorar sus propiedades fisicoquímicas¹⁰³.

Wang et al (2011)¹⁰¹ sintetizaron un quitosano con grupos SH por medio de la formación de un enlace amida entre el ácido mercaptoacético y los grupos amino del quitosano, después añadieron el polímero modificado a una suspensión de AuNBs cubiertas con CTAB y agitaron la mezcla por 2 días, finalmente eliminaron el exceso de quitosano y CTAB realizando cuatro ciclos de centrifugación-resuspensión. Charan et al. (2012)⁸³ reemplazaron el CTAB con ácido mercaptoundecanoico a través de la interacción de los grupos SH con la superficie del oro, estas AuNBs cubiertas fueron incubadas con quitosano para promover la formación de un enlace amida entre el grupo COOH del ácido mercaptoundecanoico y los grupos NH_2 del quitosano. Yang et al. (2015)¹⁰² sintetizaron AuNBs cubiertas con quitosano a través del método de capa por capa, primero depositaron, por medio de interacciones electrostáticas, una capa de sulfato de poliestireno sobre las nanobarras estabilizadas con CTAB con el objetivo de obtener una carga negativa en la superficie de estas, después de esto, ellos adsorbieron una capa de quitosano sobre las AuNBs para finalmente realizar ciclos de centrifugación-resuspensión para eliminar el exceso de CTAB.

La principal desventaja del uso de las AuNBs cubiertas con quitosano con fines médicos es que este polímero tiene un $\text{pK}_a \approx 6.3$ ¹⁰³, por lo tanto, en el pH fisiológico, los grupos amino se encuentran predominantemente desprotonados, esto plantea un serio problema de estabilidad. Se ha mostrado previamente que nanopartículas de quitosano o partículas magnéticas cubiertas con este polímero presentan un potencial zeta cercano a cero cuando el pH se acerca a 7, por lo que la repulsión electrostática entre las partículas es muy baja, esto disminuye considerablemente la estabilidad coloidal y las partículas precipitan irreversiblemente^{25,26,105}.

Esto plantea la necesidad de recubrir las AuNBs cubiertas con quitosano con moléculas o polímeros que les proporcionan más estabilidad, tanto estérica como electrostática, en este trabajo de tesis se han explorado 2 polímeros que cumplen esta función, uno aniónico (el alginato) y otro neutro (el PVA).

El alginato es un polisacárido abundante en la naturaleza que principalmente es extraído de algas pardas, se trata de un copolímero de bloque compuesto de α -L-ácido gulurónico (G) y β -D-ácido manurónico (M), unidos por enlaces α o β (1-4) (Figura 8 b))^{22,106}, los bloques están compuestos por residuos consecutivos de ácido gulurónico (GGGGG), residuos consecutivos de ácido manurónico (MMMMM) y residuos de gulurónico y manurónico alternados (GMGMGM). Este polímero ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones médicas, principalmente para mejorar la cicatrización, en trasplantes y regeneración de tejidos, para la administración de medicamentos, entre otras²². Se han desarrollado micro y nanopartículas de alginato (generalmente junto con el quitosano) para la administración de diversas moléculas bioactivas como insulina, cisplatino, doxorubicina, ADN, antibióticos, entre otras^{107,108}. El alginato también se ha utilizado como agente estabilizante de nanopartículas de oro para administración intravenosa en ratones¹⁰⁹, además, se han desarrollado nanopartículas de oro cubiertas con un complejo alginato-curcumina-metotrexato con potencial para ser utilizadas en el tratamiento del cáncer, se demostró también que esta nanopartículas de oro cubiertas son hemocompatibles y por lo tanto pueden ser administradas vía intravenosa¹¹⁰.

El poli(vinil alcohol) (PVA) es un polímero hidrofílico de estructura sencilla con grupos hidroxilos a lo largo de toda la cadena (Figura 8 c)), es obtenido a partir de la hidrólisis de los grupos acetato del poli(vinil acetato) (PVAc), esta hidrólisis no es 100 % eficiente así que, en realidad, se obtiene un copolímero con monómeros hidrolizados (OH) y no hidrolizados (acetatos)¹¹¹. Debido a su biocompatibilidad ha sido estudiado para ser utilizado en la medicina, principalmente en el campo de la regeneración de tejidos y como excipiente para la administración de fármacos por diferentes rutas^{111,112}. El PVA ha sido utilizado como agente estabilizante en diversos tipos de nanopartículas tanto poliméricas como metálicas^{113,114}, incluyendo nanopartículas de oro^{115,116}, también se ha utilizado para reemplazar el CTAB de la superficie de AuNBs proveyéndoles una estabilidad coloidal adecuada después de la eliminación del surfactante¹¹⁷.

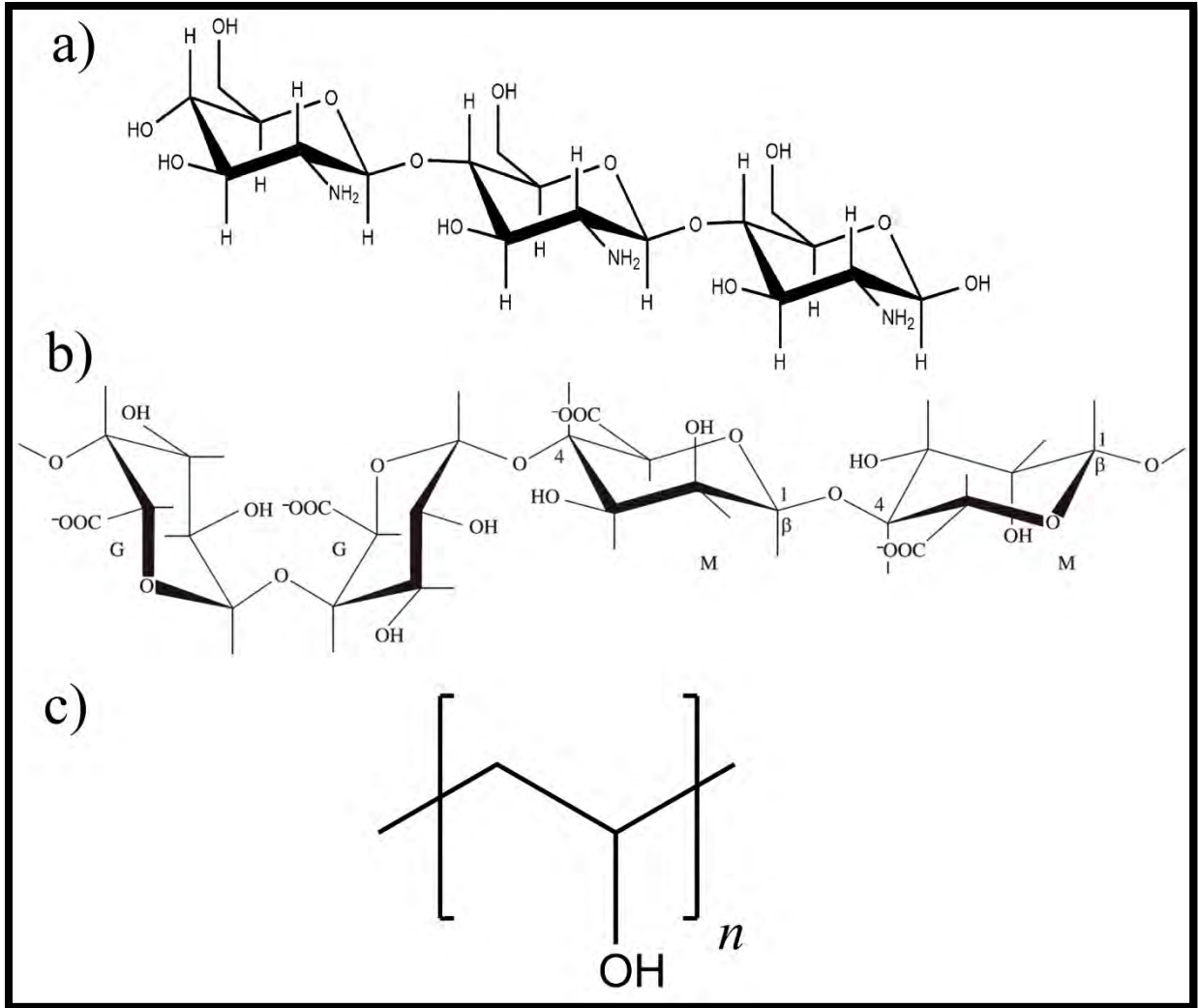


Figura 8. Estructura química del a) Quitosano, b) Alginato y c) PVA.

HIPÓTESIS

Las nanobarras de oro cubiertas con los polímeros quitosano, alginato y PVA presentan una citotoxicidad menor comparada con aquellas cubiertas con CTAB, además, poseen propiedades fototérmicas adecuadas para potencialmente ser utilizadas en terapia hipertérmica.

OBJETIVOS

General

Evaluar la citotoxicidad y las propiedades fototérmicas de las nanobarras de oro cubiertas con los polímeros quitosano, alginato y PVA.

Particulares

Sintetizar nanobarras de oro usando el método mediado por semillas.

Obtener nanobarras de oro cubiertas con quitosano.

Colocar una capa de Alginato sobre las nanobarras de oro cubiertas con quitosano.

Colocar una capa de PVA sobre las nanobarras de oro cubiertas con quitosano.

Evaluar la citotoxicidad de las nanobarras de oro cubiertas con los polímeros sobre la línea celular MDA-MB-231.

Estudiar el efecto de la presencia de estas capas poliméricas sobre la eficiencia de transducción fototérmica.

Estudiar el efecto citotóxico de las nanobarras de oro recubiertas sobre la línea celular MDA-MB-231 con y sin irradiación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

En los estudios experimentales se utilizaron los siguientes reactivos: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), quitosano oligosacárido lactato (5000 Da), Alginato de sodio de baja viscosidad, poli (vinil alcohol) (31,000 Da), PEG-SH (5000 Da) ácido mercaptopropionico (AMP), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), N,N-dimetilformamida (DMF), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich.

Primera Parte

Uppvgul'fg'Pcpqdcttcu'fg'Qtq0'

Las AuNBs fueron sintetizadas por el método mediado por semillas a pH ácido (1.25), de acuerdo al protocolo descrito por Zhu et al. (2010)¹³. Toda la cristalería se lavó con agua regia para remover cualquier contaminación que pudiera interferir con la síntesis. Todo el proceso de síntesis se llevó a cabo a una temperatura de 33 °C. Las semillas de oro se prepararon añadiendo 0.5 mL de NaBH₄ (10 mM) a 5 mL de una solución que contenía CTAB (0.1 M) y HAuCl₄ (0.48 mM) bajo agitación magnética. Después de 2 min la agitación se detuvo y la solución de semillas se dejó en reposo durante 0.5 h. Adicionalmente, se preparó una solución de crecimiento constituida por CTAB (0.1 M), HCl (0.08 M), HAuCl₄ (0.5 mM), AgNO₃ (0.08 mM) y diferentes concentraciones de ácido ascórbico (AA) (0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 y 2 mM) que corresponden a relaciones molares AA/Au⁺³ de 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4. La solución resultante se dejó en reposo durante 0.5 h y transcurrido ese tiempo se agregaron 10 µL de la solución de semillas, la mezcla se agito levemente y se dejó reposar durante 3 h.

Ectcevgth'cel'p'gur'gevt'que»r'lec0'

Para realizar la cinética de crecimiento de las AuNBs se tomaron espectros de UV-Vis cada 30 s durante un período de 3 h usando el equipo Agilent 8453. Para determinar las velocidades

aparentes de crecimiento de las nanobarras se realizó un ajuste no lineal a los datos experimentales usando la función de Boltzmann (ecuación (1)), de acuerdo a lo reportado por Bullen et al. (2011)⁵³:

$$A_t = \frac{A_f - A_i}{1 + e^{(t-t_0)/\tau}} + A_i \quad (11)$$

Donde C_k y C_h corresponden a la absorbancia inicial y final del LPRS, ν es el tiempo transcurrido durante el crecimiento, ν_2 es el tiempo al cual el 50 % del valor máximo de absorbancia es observado y $1/\tau'$ representa la constante aparente de crecimiento de las AuNBs (M_{err}).

O let que rlc 'fg' t cpuo klp 'giget »plec 0'

La suspensión de AuNBs fue centrifugada y resuspendida en agua para eliminar el exceso de CTAB, este proceso se repitió dos veces, después se tomaron 10 μ L de ella y se colocaron en una rejilla para luego dejarla secar toda la noche. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo FEI "Inspect F-50" en su modo STEM.

Segunda Parte

U p v g u k u f g 's w h x q u c p q ' t q r c f q ' * E j k U J - 0'

El quitosano tiolado fue sintetizado de acuerdo al protocolo descrito por Zhu et al. (2012)¹¹⁸.. Se realizó un enlace amida entre el grupo carboxílico del AMP y los grupos aminos de quitosano, para ello se mezclaron 21 mg de AMP, 13 mg de EDC y 15 mg de NHS en 2 mL de DMF con el objetivo de activar los grupos carboxilos del AMP, esta solución fue añadida a 40 mL de quitosano al 2.5 % en 0.1 M de HCl (pH 5.5). La mezcla se agitó durante 5 h y finalmente se lavó 3 veces con etanol, el producto fue liofilizado y almacenado a temperatura ambiente.

U'pvgukuf'g'CWPDu'ewdlgtwu'e'qp'Ej k'UJ 0'

Las AuNBs usadas para cubrirlas con quitosano fueron aquellas preparadas con una concentración de 1 mM de ácido ascórbico, en este caso se prepararon 100 mL de solución. La solución de AuNBs fue centrifugada para eliminar el exceso de CTAB y fue suspendida en 10 mL de agua, a estos se le agregó 10 mL de una solución de Chi-SH (1 mg/mL en 0.1 M de HCl) y se agito durante 3 h. Finalmente las AuNBs cubiertas con quitosano (AuNBs-Chi-SH) fueron dializadas por 2 días contra una solución de HCl 0.01 M.

U'pvgukuf'g'CWPDu'ewdlgtwu'e'qp'RGI /UJ 0'

Para fines comparativos se utilizó un método comúnmente reportado en la literatura para cubrir las nanobarras con PEG-SH: 10 mL de la suspensión de AuNBs fueron centrifugados dos veces y finalmente resuspendidos en 10 mL de CTAB (10 mM), a esta solución se agregaron 1 mL de carbonato de sodio (2 mM) y 500 μ L de PEG-SH (5000 Da, 2 μ M), la solución fue agitada durante 24 h y finalmente dializada contra agua durante 24 h⁹⁸.

U'pvgukuf'g'CWPDu'ewdlgtwu'e'qp'Cni k'pcw'f'RXCO'

Se agregaron 0.5 mL de la suspensión de las AuNBs cubiertas con quitosano a 0.5 mL de una solución que contenía alginato (0.5 mg/mL) o PVA (10 mg/ml), después de 10 min de agitación la suspensión fue centrifugada a 6000 rpm por 30 min y el precipitado fue resuspendido en agua (el protocolo completo es esquematizado en la Figura 9).

O gfl'ek'qp'gu'f'g'Rq'v'p'ek'ni' g'w'0'

El potencial zeta de las AuNBs fue determinado usando un Nano Zs (Nanoseries, Malvern Instruments, UK). Las partículas fueron suspendidas en agua (pH~5) o una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4, 10 mM) y cargadas en una celda para potencial zeta. Los valores de potencial zeta son reportados como media \pm desviación estándar de tres mediciones independientes.

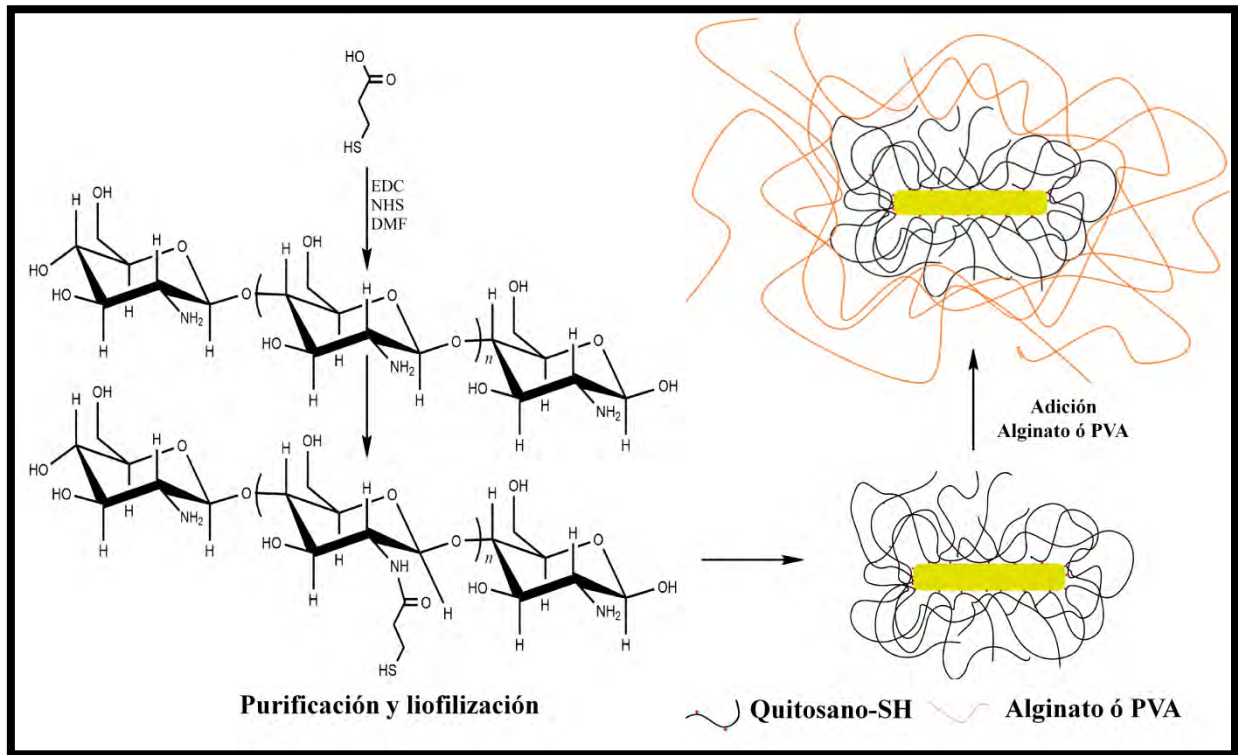


Figura 9. Representación esquemática del proceso de modificación del quitosano y del recubrimiento de las AuNBs con los polímeros.

*Okt qeqlk'fg'hwgt/c'cv>o kcc '*O HC+θ'*

Un equipo JEOL (JSPM 4210, Japan) fue usado para obtener las imágenes, se depositaron 10 μL de una suspensión diluida de AuNBs en una mica y la muestra preparada se dejó secar a temperatura ambiente, las imágenes fueron obtenidas en el modo de no contacto.

Gzrgtlo gpvqu'Hqyv²to kquθ'

Las propiedades fototérmicas de las AuNBs cubiertas con CTAB, quitosano tiolado, alginato y PVA fueron determinados llevando a cabo el siguiente experimento: se colocaron 3 mL de la suspensión de las nanobarras, a diferentes densidades ópticas (0.25, 0.5, 1 y 2), en una celda de cuarzo, la suspensión fue irradiada con un láser de longitud de onda constante de 808 nm (CNI, China). El incremento de temperatura fue determinado usando un termopar tipo *m'* conectado a un termómetro digital (AMPROBE TMD-51), el sensor de temperatura se insertó en la solución y la celda fue sellada para evitar la evaporación del agua durante el experimento. Las muestras fueron irradiadas usando diferentes potencias (1, 1.5 y 2 W) por un período de 40 min.

Ghhegpek'fg'eqpxgt ul>p'hqyv²to kcc ' -θ'*

La eficiencia de conversión fototérmica () fue determinada usando un modelo descrito previamente por Roper et al. (2007)¹¹⁹. El incremento de temperatura de la solución puede ser determinado por un balance entre, por un lado, el calor suministrado por la irradiación láser vía las nanobarras (S_{λ}) y el sistema (celda de cuarzo y agua) (S_2), y por el otro, la disipación de calor al ambiente externo por convección (S_{gzv}), esto puede ser expresado por:

$$\sum_i m_i C_i \frac{dT}{dt} = Q_I + Q_0 - Q_{ext} \quad (12)$$

Donde m_k y E_k son la masa y la capacidad calorífica de los componentes k del sistema (la celda de cuarzo, el agua utilizada, etc.), respectivamente, V es la temperatura y v es el tiempo. El

término S_K corresponde al calor producido por las AuNBs irradiadas debido a la disipación de la energía absorbida producto del PSR y puede ser expresado de la siguiente manera:

$$Q_I = I(1 - 10^{-A\lambda})\eta \quad (13)$$

Donde K es la potencia del láser, η representa la eficiencia para convertir la luz incidente a energía térmica (es decir, la porción de la luz que es absorbida por las partículas) y C es la absorbancia de las nanobarras a la longitud de onda del láser utilizado (808 nm). El calor disipado al ambiente externo (S_{gzv}) está dado por:

$$Q_{ext} = hA(T - T_{amb}) \quad (14)$$

Donde j es coeficiente convectivo de transferencia de calor y C es el área superficial de la celda de cuarzo, entonces se puede escribir la ecuación (12) como:

$$\sum_i m_i C_i \frac{dT}{dt} = I(1 - 10^{-A\lambda})\eta + Q_0 - hA(T - T_{amb}) \quad (15)$$

Roper et al. (2007) define un parámetro denominado constante de velocidad característica o constante de tiempo del sistema (τ_s) como:

$$\tau_s \equiv \frac{\sum_i m_i C_i}{hA} \quad (16)$$

Tomando en cuenta las ecuaciones (15) y (16) y considerando $V''?''*/V_{c_o d+}$ se puede resolver la ecuación diferencial para obtener:

$$\Delta T(t) \equiv \tau_s \left[\frac{I(1 - 10^{-A\lambda})\eta + Q_0}{\sum_i m_i C_i} \right] (1 - e^{-t/\tau_s}) \quad (17)$$

Esta ecuación es utilizada para obtener τ_s y Q_0 , simplemente, ajustando los datos experimentales obtenidos, para calcular S_2 el ajuste debe ser hecho en la curva de calentamiento sin AuNBs, en este caso $S_K = 0$ y la ecuación (17) se simplifica a:

$$\Delta T(t) \equiv \tau_s \left[\frac{Q_0}{\sum_i m_i C_i} \right] (1 - e^{-t/\tau_s}) \quad (18)$$

'Gpuc{qu'èkqv»zlequ0'

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231(triple negativo) fue utilizada como modelo para evaluar el efecto citotóxico de las AuNBs cubiertas y cuando además son sometidas a irradiación láser. Las células fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (10 %), y 1 % de penicilina/estreptomicina, las células fueron incubadas a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 90 % de humedad.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron mediante un método colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, este proceso produce un compuesto hidrofóbico de color azul (formazán), la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para ello, las células fueron subcultivadas en una placa de 96 pozos a una densidad de 5x10³ células/pozo, después de 24 horas de incubación, fueron tratadas con las AuNBs a concentraciones de 4.8x10¹⁰, 3.6 x10¹⁰, 2.4 x10¹⁰ and 1.2 x10¹⁰ partículas/mL o los polímeros a concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL. En el caso del ensayo con irradiación se utilizaron las mismas concentraciones de AuNBs pero en esta ocasión las células tratadas fueron irradiadas por 5 min con un láser de 808 nm usando las potencias de 1, 1.5 y 2 W. La citotoxicidad fue medida 48 h después agregando 10 µL de MTT a cada pozo e incubando por 4 horas. Después de transcurrido ese tiempo, se agregaron 100 µL de isopropanol ácido (HCl 50 mM en isopropanol) a cada pozo para solubilizar los cristales de formazán y finalmente la densidad óptica fue medida a 570 nm. La viabilidad celular fue determinada tomando en cuenta la cantidad de MTT convertida a formazán y calculada como porcentaje de viabilidad comparada con el grupo control.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Primera Parte

Ectcevgtk|celop'gur gev que»rlec'fg'fcu'CWPDuO'

En la Figura 10 se muestra la progresión del crecimiento de las AuNBs para las cinco concentraciones de ácido ascórbico utilizadas. En los primeros minutos de reacción, la intensidad de las bandas de absorción para el plasmón de resonancia de superficie transversal y longitudinal es imperceptible debido al tamaño pequeño de las semillas de oro en esta etapa del crecimiento. Después de unos minutos, la intensidad de ambas bandas comienza a incrementar de manera progresiva hasta alcanzar un valor constante antes de llegar a las tres horas de experimento.

En esta figura se muestran los dos picos de absorción característicos para las AuNBs, el primero localizado alrededor de 520 nm y el otro que oscila entre 730 y 830 nm dependiendo de la concentración de AA utilizada. También se observa la aparición de una banda de absorción alrededor de los 570 nm y la intensidad de esta se incrementa concomitantemente con la concentración de AA, este pico corresponde a productos secundarios de la síntesis, tales como partículas cúbicas y esféricas (Figura 12); generalmente estos productos indeseable aparecen en la síntesis de AuNBs y se requieren pasos adicionales de purificación para eliminarlos. Sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados en la figura 10 estos productos pueden evitarse controlando la velocidad de deposición de los átomos de oro durante el crecimiento, esto puede observarse claramente en las Figuras 10 a) y 10 b) en donde, para las relaciones molares AA/Au⁺³ de 1.5 y 2, el pico de 570 nm es imperceptible, lo cual indica que la presencia de estos productos secundarios se ha minimizado.

Otro aspecto que se observa en la Figura 10 y que se muestra más claramente en la Figura 11 a) y b) es que al incrementar la relación molar de AA/Au⁺³ se promueve un corrimiento al rojo del PRSL, las longitudes de onda máximas observadas fueron 741, 782, 812, 823, 827 y 833 nm para las relaciones molares de 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4, respectivamente.

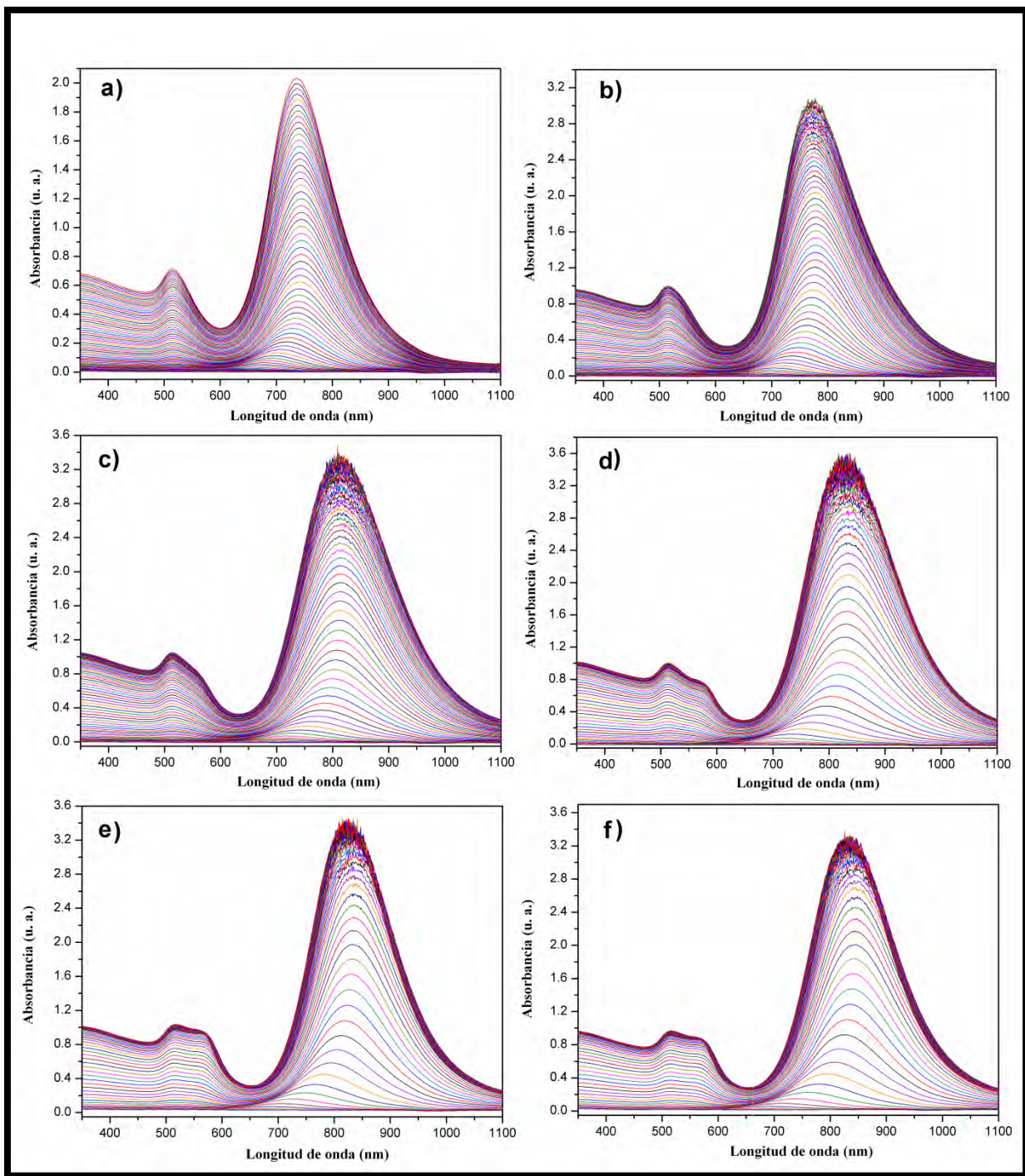


Figura 10. Evolución de los espectros de UV-Vis en la solución de crecimiento después de la adición de las semillas, los espectros fueron tomados cada 30 s durante un periodo de 3 h. La concentración de ácido ascórbico se ajustó a: a) 0,75 mM, b) 1 mM, c) 1,25 mM, d) 1,5 mM, e) 1,75 mM y F) 2 mM, que corresponden a relaciones molares de AA/Au⁺³ de 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4, respectivamente.

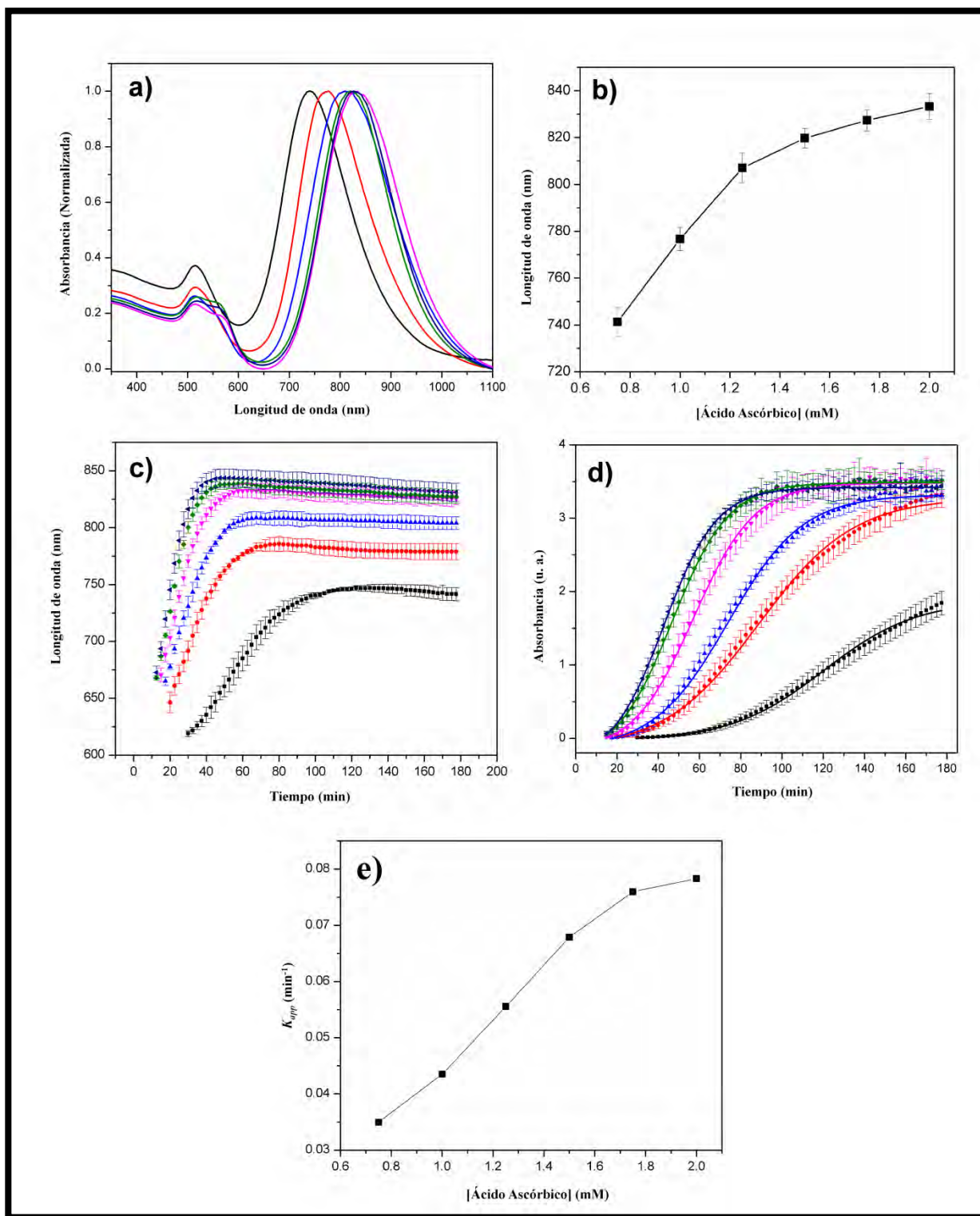


Figura 11. a) Espectro de UV-Vis de las AuNBs para las concentraciones de ácido ascórbico utilizadas. b) Desplazamiento hacia el rojo de PRSL con el incremento de la concentración de ácido ascórbico c) Posición del PRSL en función del tiempo para las concentraciones de ácido

ascórbico usados. d) La absorbancia del PRSL en función del tiempo para las concentraciones de ácido ascórbico, la línea continua corresponde al ajuste de los datos experimentales con la ecuación (17). e) Constante aparente de crecimiento en función del ácido ascórbico añadido a la solución de crecimiento. (Código de color: negro (ácido ascórbico 0,75 mM), rojo (ácido ascórbico 1 mM), azul (ácido ascórbico 1,25 mM), magenta (ácido ascórbico 1,5 mM), verde (ácido ascórbico 1.75mM) y azul marino (ácido ascórbico 2 mM).

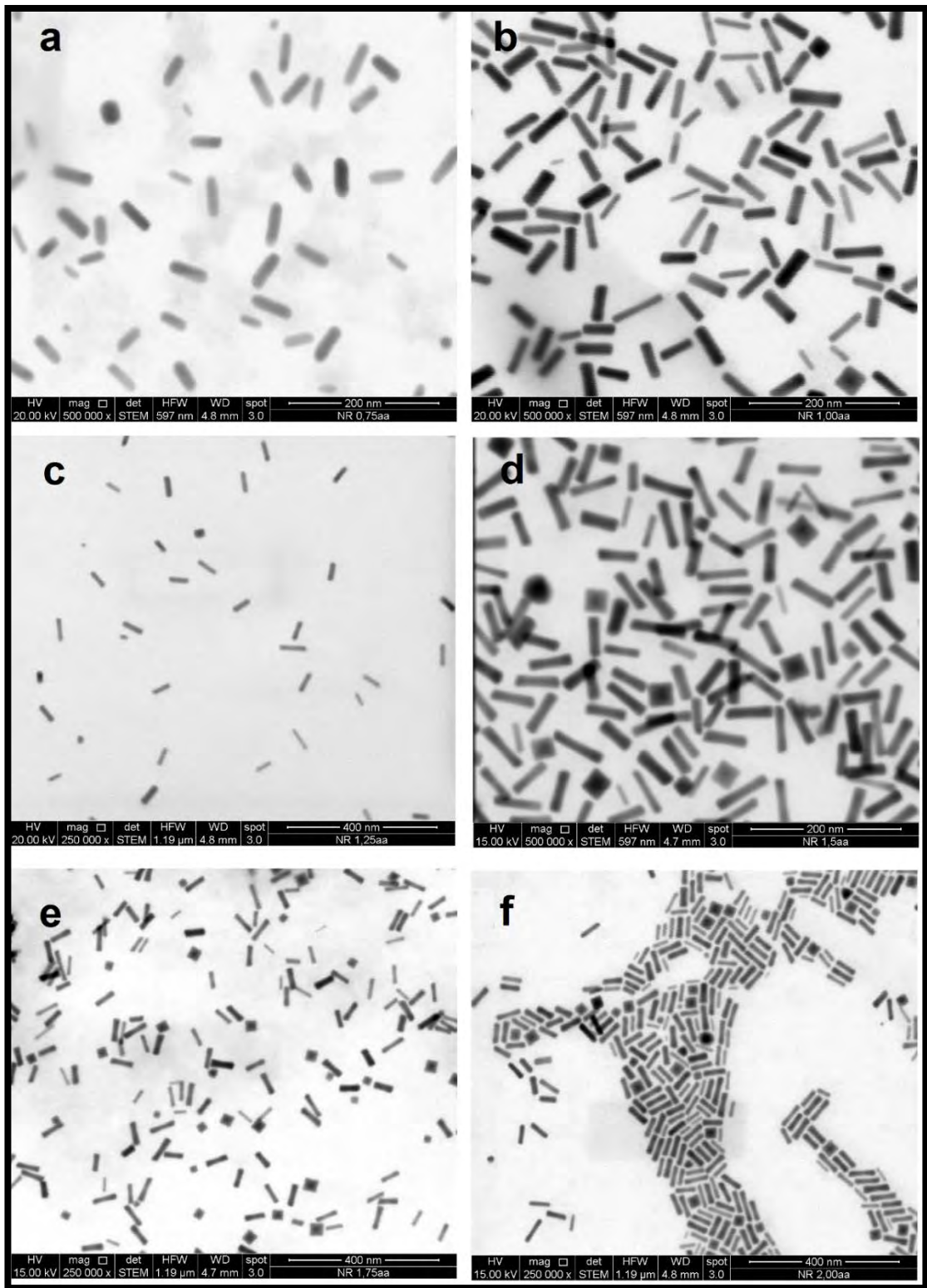


Figura 12. Imágenes de STEM de AuNBs sintetizadas en una solución de crecimiento preparada con diferente concentración de ácido ascórbico; a) 0,75 mM, b) 1 mM, c) 1,25 mM, d) 1,5 mM, e) 1,75 mM y f) 2 mM.

Et gelo kpvq'fg'tc u'CWPDu'{'glgewq'fgn^a elf q'c'ue»t dleq0''

La Figura 11 c) muestra el comportamiento del PRSL en función del tiempo para cada relación molar de AA/Au⁺³ usada. Se puede observar un corrimiento al rojo hasta alcanzar la máxima longitud de onda, y después de esto, el PRSL presenta un ligero cambio al azul. Numerosos estudios han mostrado que el crecimiento de las AuNBs en ausencia de HCl tienen un comportamiento diferente, sobre todo en la última etapa del crecimiento donde se presenta un corrimiento al azul mucho más pronunciado que en algunos casos llega a ser de hasta 150 nm⁵²⁻⁵⁷. Los corrimientos hacia el rojo implican un incremento en la relación de aspecto, mientras que los corrimientos al azul son determinados por una disminución de la misma, lo cual está relacionada con una etapa de maduración en donde el eje transversal de las AuNBs tiende a incrementar considerablemente mientras el eje transversal esencialmente permanece del mismo tamaño⁵⁷.

El tiempo al cual se alcanza la máxima longitud de onda del PRSL depende de la relación molar AA/Au⁺³ utilizada, por ejemplo, en el caso de la relación molar de 1.25 esa longitud de onda es alcanzada alrededor de los 100 min de reacción, contrario a lo observado para la relación molar de 4, donde solo le toma 40 min alcanzar la máxima longitud de onda. Para los otros casos el tiempo necesario para alcanzar esa etapa fue de 65, 60, 55 y 47 min para las relaciones molares de 2, 2.5, 3 y 3.5, respectivamente. Este comportamiento es muy diferente a lo reportado previamente para síntesis de AuNBs realizada en ausencia de HCl, donde el máximo corrimiento al rojo es alcanzado entre 1 y 10 min después de que las semillas son agregadas a la solución de crecimiento^{52,56,57}. Esta diferencia, entre lo observado en este trabajo y los resultados reportados previamente, se debe a que el pH ácido al cual se realiza la síntesis incrementa drásticamente el potencial de reducción del AA (tiene mayor preferencia por reducirse en lugar de oxidarse)¹²⁰, y por lo tanto la velocidad del crecimiento de las AuNBs disminuye considerablemente, como se discutirá más adelante.

La alta sensibilidad del PRSL a cambios en la relación de aspecto permite determinar el progreso del crecimiento de las AuNBs siguiendo la intensidad de esa banda de absorción en función del tiempo de reacción, esto es mostrado en la Figura 11 d). En ella se observa que la velocidad de crecimiento es mayor cuando la concentración de AA incrementa, la intensidad

de absorbancia alcanza un valor máximo de alrededor de 3 a las 3 h de experimento (excepto para la concentración de 0.75 mM donde aparentemente el crecimiento no se completa y la absorbancia es de alrededor de 2).

Interesantemente los resultados muestran grandes diferencias en el tiempo requerido para alcanzar la máxima longitud de onda (Figura 11 c)) y la máxima absorbancia (figura 11 (d)), por ejemplo, en el caso de las AuNBs preparadas con 1.5 mM de AA se necesitaron 55 min para alcanzar el máximo desplazamiento al rojo del PRSL en contraste con los 110 min requeridos para alcanzar la saturación de la absorbancia. Esto puede deberse a que no todas las semillas crecen al mismo tiempo, tal vez una proporción de ellas alcanza la relación de aspecto más alta cuando se alcanza el máximo desplazamiento, luego el crecimiento se detiene mientras el resto de las semillas continúa creciendo y la intensidad de absorbancia incrementa concomitantemente con la concentración de AuNBs.

El crecimiento de las AuNBs puede ser dividido en tres etapas de acuerdo a las Figuras 11 c) y d):

- a) Fase de Latencia. Esta es caracterizada por la ausencia de las bandas de absorción, esta etapa es más evidente para las relaciones molares AA/Au⁺³ de 1.5 y 2. La ausencia de las bandas de absorción está relacionada con el tamaño pequeño de las partículas en esta etapa temprana del crecimiento, previamente se ha mostrado que el PRS es fuertemente reducido cuando el tamaño de las partículas de oro se encuentra por debajo de los 5 nm^{2,36,121}. Durante esta etapa, las semillas de oro crecen isotrópicamente (la velocidad de crecimiento transversal y longitudinal es esencialmente la misma) hasta alcanzar un tamaño crítico de alrededor de 5-6 nm⁵².
- b) Fase de elongación. Las bandas de absorción características de las AuNBs comienzan a ser perceptibles, las intensidades de ambas bandas incrementan progresivamente acompañadas por un continuo desplazamiento hacia el rojo del PRSL hasta alcanzar la máxima longitud de onda, después se observa un leve corrimiento al azul. El comportamiento anterior se presenta en todas las concentraciones de AA probadas, solo que el proceso es más rápido cuando dicha concentración se incrementa. Esta

etapa inicia cuando las semillas han alcanzado un tamaño crítico (5-6 nm) a partir del cual el crecimiento isotrópico cesa para dar lugar al crecimiento anisotrópico, donde la velocidad de crecimiento longitudinal es mucho mayor que la transversal, esto es evidenciado por el rápido corrimiento al rojo observado, que es un indicativo de un incremento en la relación de aspecto de las AuNBs. El tiempo que le toma a las AuNBs alcanzar la máxima longitud de onda es de 100, 65, 60, 55, 47 y 40 min dependiendo de la concentración de AA utilizada en la solución de crecimiento, en contraste con los 10 min reportados en la literatura en experimentos realizados en ausencia de HCl^{52,54-57}; estas diferencias se deben a las condiciones de reacción bajo las cuales se llevó a cabo el crecimiento de las AuNBs en el presente trabajo, particularmente el pH ácido utilizado, la acidez en la solución de crecimiento promueve una disminución en la velocidad de crecimiento tanto transversal como longitudinal.

- c) Fase de estabilización. Durante esta fase el corrimiento al rojo cesa y se observa un ligero desplazamiento del PRSL hacia menores longitudes de onda, esto contrasta con resultados previos donde se reporta un desplazamiento más pronunciado del PRSL^{52,57}. Esto puede ser explicado considerando que cuando la velocidad de crecimiento longitudinal cesa, el crecimiento transversal es más prominente, sin embargo, este crecimiento es muy lento (debido al pH ácido de la solución de crecimiento) e impide la maduración completa de las AuNBs previniendo la disminución drástica de la relación de aspecto. La relación de aspecto disminuye y por lo tanto se observa un desplazamiento al azul de alrededor de 100 nm solo después de una semana de crecimiento (datos no mostrados).

Elp²vec'fg'btgelo lgpwq'fg'tc u'CWPDu0''

Las constantes aparentes de crecimiento (M_{crr}) de las AuNBs se obtuvieron realizando un ajuste de los datos experimentales utilizando un modelo de Boltzmann no lineal (ecuación (11)), de acuerdo a lo descrito por Bullen et al. (2010)⁵³. Los resultados son mostrados en la Figura 11 e), se puede observar una dependencia lineal de M_{crr} con el incremento de la

concentración de AA en la solución de crecimiento, hasta que una especie de saturación es alcanzada a las concentraciones de 1.8 y 2 mM, este comportamiento también se observa en las Figuras 3 c) y d) donde las gráficas que corresponden a estas dos concentraciones se muestran sobrepuestas, esto claramente muestra que mientras mayor sea la concentración de AA más rápida es la deposición de los átomos de oro y por lo tanto la velocidad de crecimiento incrementa.

Los valores de M_{err} obtenidos se encuentran entre 0.034 min^{-1} y 0.078 min^{-1} para todas las concentraciones de AA probadas, estos valores son menores a los reportados por Bullen *gv'cn* (2010)⁵³, ellos obtienen una constante de crecimiento de 0.15 min^{-1} para una relación molar AA/Au⁺³ de 1.5 (esta relación corresponde a la concentración más baja de AA utilizada en este trabajo), es decir, la K_{app} reportada por ellos es alrededor de 4 veces más grande que la obtenida en el presente estudio, esta importante diferencia se debe, como se ha mencionado en párrafos anteriores, al pH ácido utilizado durante el proceso de síntesis, Bullen *gv'cn* (2010) realizaron sus experimentos en ausencia de HCl.

Previamente Zhu *gv'cn* (2010)¹³ habían mostrado que el PRSL de las AuNBs podía ser controlado por la adición de HCl a la solución de crecimiento, sin embargo, no se tenía claro cuál era el mecanismo involucrado en tal efecto; los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la obtención de AuNBs de mayor relación de aspecto es el resultado de que el pH ácido, al cual se realiza la síntesis, disminuye la capacidad de reducción del AA y por lo tanto la velocidad de crecimiento de las AuNBs, esto previene el desplazamiento drástico al azul comúnmente observado en la síntesis realizadas en ausencia de HCl; es decir, la síntesis a pH ácido detiene el crecimiento de las AuNBs en etapas intermedias, antes de que ocurra el engrosamiento de estas.

Segunda Parte.

U'p'v'g'u'k'u'f'g'c'w'P'D'u'e'w'd'l'g't'w'u'e'q'p's'w'h'q'u'c'p'q/U'J'0'

En este trabajo se plantea el uso de un método muy fácil y reproducible para la eliminación del CTAB remplazándolo con quitosano-SH. Se ha empleado un método basado en diálisis para la completa eliminación del CTAB y además como una prueba preliminar para determinar si la

sustitución y el proceso de recubrimiento de las AuNBs han sido llevados a cabo de manera adecuada. La Figura 13 muestra las AuNBs cubiertas con CTAB (AuNBs-CTAB) y las AuNBs cubiertas con PEG-SH (AuNBs-PEG) después de 3 h de diálisis, así como las AuNBs cubiertas con quitosano-SH (AuNBs-Chi-SH) después de 48 h de diálisis.

Se puede observar la utilidad del quitosano-SH para remover el CTAB de la superficie de las AuNBs manteniendo, a su vez, la suspensión coloidal estable; la inestabilidad observada en las AuNBs-CTAB es producto de la difusión de las moléculas de CTAB hacia fuera de la membrana de diálisis, esto disminuye la concentración del estabilizante dentro de la membrana de diálisis, como la bicapa de CTAB sobre la superficie de las AuNBs se encuentra en equilibrio dinámico con las moléculas de CTAB en la solución¹²², cuando la concentración de estas disminuye por debajo de un punto crítico comienza a producirse un proceso de desorción de las moléculas de la superficie de las AuNBs, provocando la inestabilidad debido a la carencia del agente estabilizador, entonces las partículas precipitan irreversiblemente.

En el caso de las AuNBs-PEG se esperaría que si las partículas estuvieran cubiertas completamente con PEG la suspensión fuera estable a pesar de la desorción del CTAB, sin embargo, se observa el mismo comportamiento que en el caso de las AuNBs-CTAB, probablemente las moléculas de PEG-SH desplazan al CTAB solo parcialmente, de tal manera que cuando la concentración de CTAB disminuye por debajo de su valor crítico, las moléculas de PEG adheridas a la superficie no son suficientes para proveer a las AuNBs de la estabilidad coloidal necesaria. Esto concuerda con reportes previos donde se ha demostrado que las moléculas con grupos SH interactúan preferentemente con los extremos de la AuNBs mientras las moléculas de CTAB permanecen sobre las partes laterales de las partículas¹²³⁻¹²⁷.

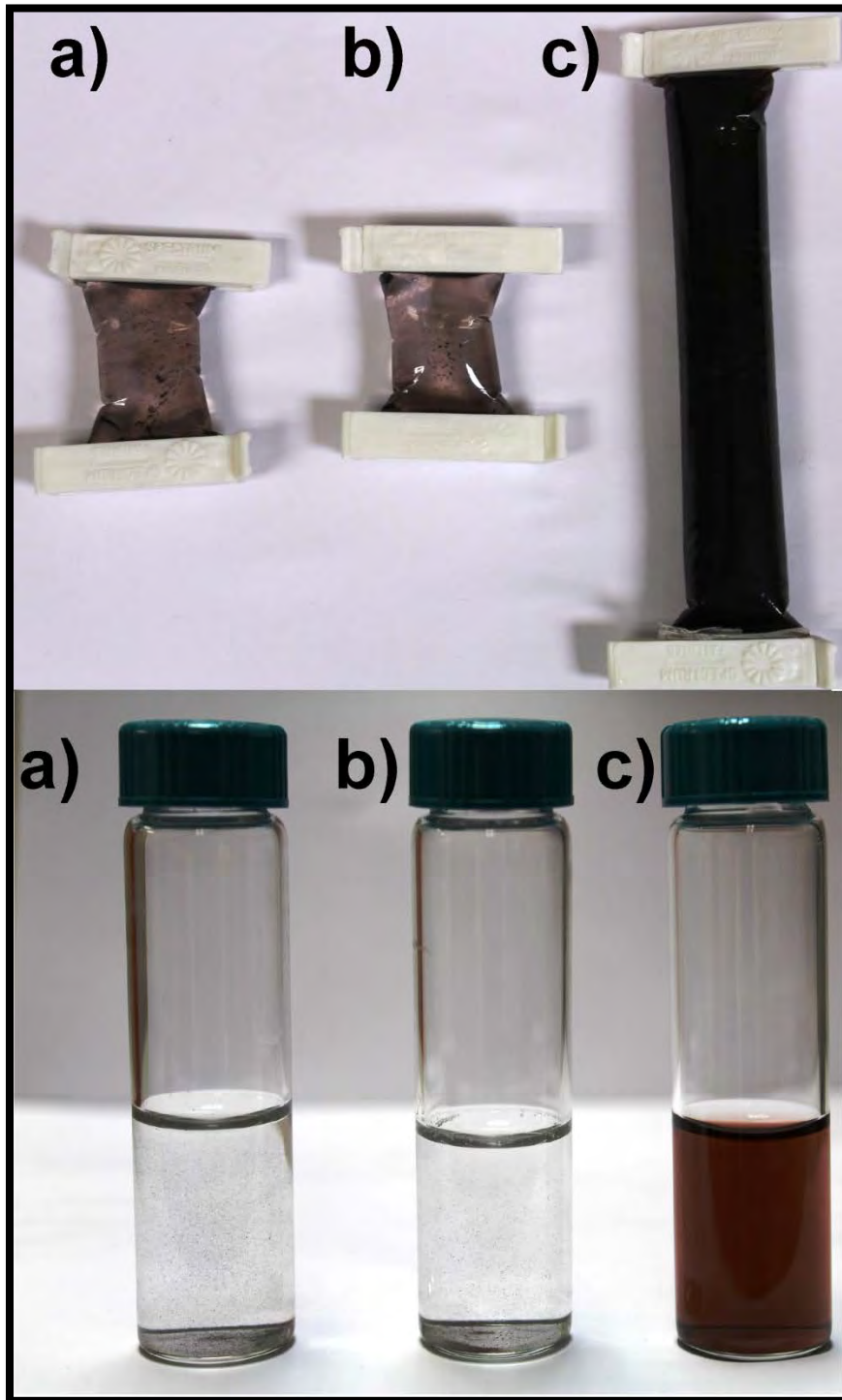


Figura 13. Imagen de las AuNBs después del proceso de diálisis. a) AuNBs-CTAB, b) AuNBs-PEG, c) AuNBs-Chi-SH.

Por otro lado, cuando el quitosano-SH es utilizado para estabilizar las AuNBs, no se observa aglomeración o precipitación incluso después de períodos relativamente largos (48 hrs) de diálisis. Los grupos SH que se encuentran a lo largo de la cadena de quitosano juegan un papel primordial en el proceso de reemplazamiento del CTAB; al igual que en el caso del recubrimiento con PEG-SH, el quitosano-SH se une en los extremos de las AuNBs, en esta etapa, las moléculas de CTAB aún permanecen adsorbidas sobre la superficie lateral de las partículas, esto evita que nuevas moléculas de quitosano-SH o grupos SH de las cadenas de quitosano-SH ya adheridas se unan a dicha superficie. Durante la diálisis ocurre el proceso de desorción de las moléculas de CTAB, dejando la superficie lateral de las AuNBs disponible para que se adhieran más moléculas de quitosano-SH o más probablemente las partes de las moléculas de quitosano-SH ya adherido que no interactuaban directamente con la superficie de oro (Figura 14), este proceso es lento y progresivo hasta que todo el CTAB es reemplazado por el quitosano-SH, los grupos aminos protonados del quitosano proveen suficiente estabilidad electrostática para mantener la suspensión coloidal ($\text{pH} \approx 4$), la cual fue estable durante 6 meses.

La Figura 15 muestra los espectros de UV-Vis de las AuNBs-CTAB y de las AuNBs-Chi-SH, se puede observar un ligero incremento del PRSL hacia mayores longitudes de onda (de 798 nm a 807 nm) debido a la unión de las moléculas de quitosano a la superficie de las AuNBs. Este comportamiento ha sido reportado previamente (usando diferentes polímeros) y se ha sugerido que puede ser el resultado de cambios en el índice de refracción local debido a la presencia de los polímeros utilizados¹²⁸⁻¹³¹.

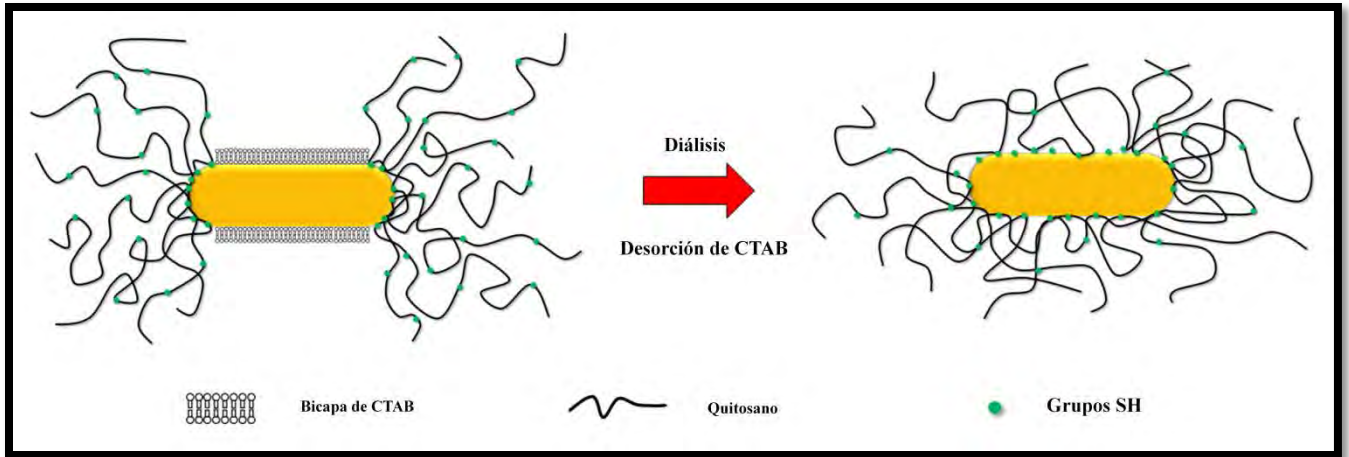


Figura 14. Representación esquemática del proceso de reemplazamiento del CTAB por el quitosano-SH.

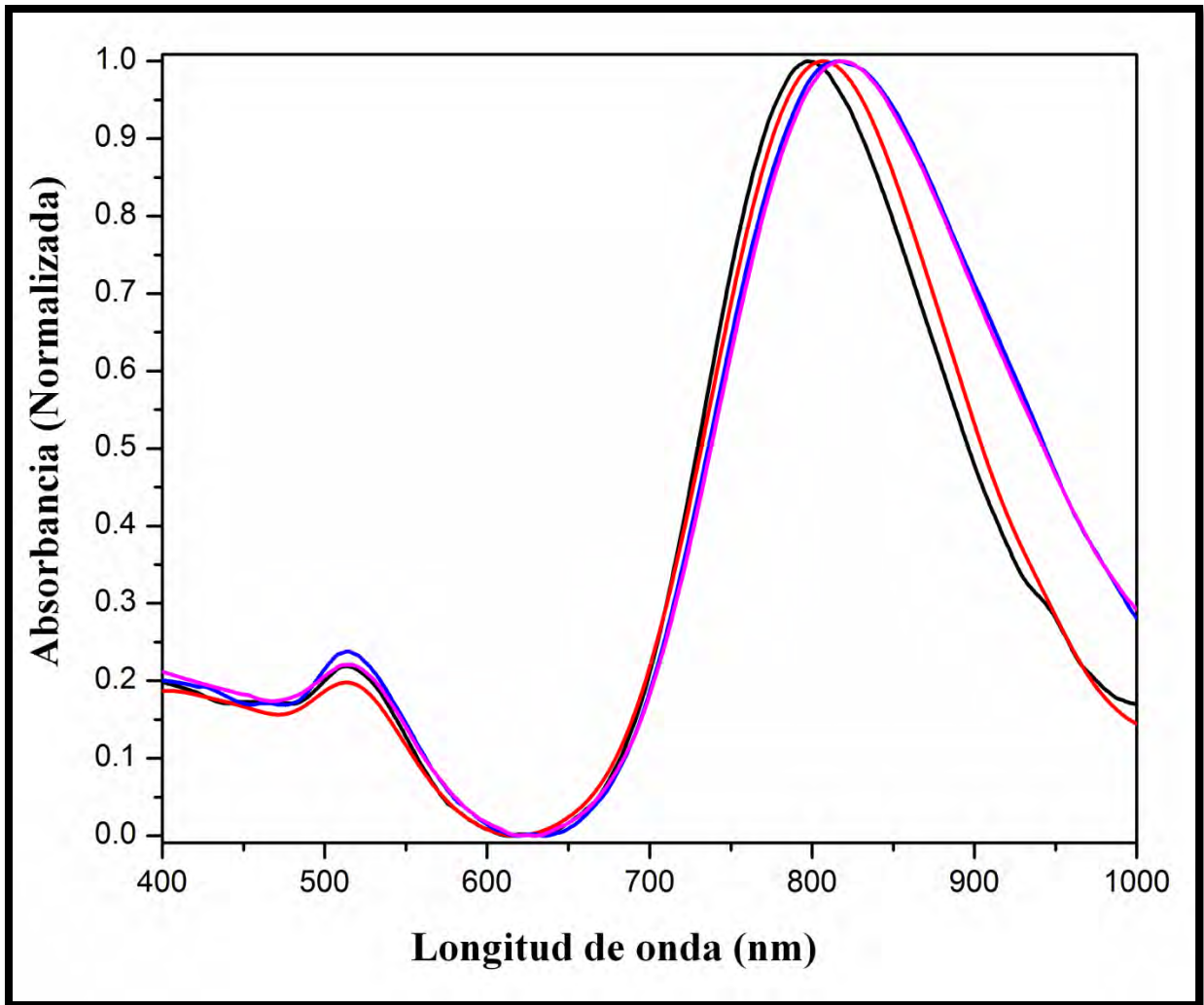


Figura 15. Espectros UV-Vis de AuNBs después del recubrimiento con los polímeros. AuNBs-CTAB (línea Negro), AuNBs-Chi-SH (línea roja), AuNBs-Chi-SH-Alg (línea azul) y AuNBs-Chi-SH-PVA (línea magenta).

''

''

U'p'v'g'u'f'g'lc'u'c'w'p'd'u'e'j'k'u'j' 'e'w'd'l'g't'w'u'e'q'p'c'ni'k'p'c'v'q'h'RXC0'

En este trabajo se ha utilizado el método conocido como capa por capa (LBL por sus siglas en inglés) para obtener las AuNBs cubiertas con alginato (AuNBs-Chi-SH-Alg) o con PVA (AuNBs-Chi-SH-PVA). La Figura 14 muestra los espectros de UV-Vis de las AuNBs-Chi-SH antes y después de ser recubiertas con los polímeros en cuestión, se puede observar claramente un cambio en el PRSL hacia mayores longitudes de onda (≈ 9 nm) tanto para las AuNBs-Chi-SH-Alg como para las AuNBs-Chi-SH-PVA; estos resultados concuerdan con estudios previos donde se han sintetizado nanopartículas de oro cubiertas con multicapas poliméricas y por cada capa adsorbida el PRSL experimenta un corrimiento hacia al rojo^{130,131}. Este cambio en el PRSL ha sido atribuido, como ya se mencionó anteriormente, a cambios en el índice de refracción en la superficie de las AuNBs como resultado de la adsorción de los polímeros.

Los espectros de FTIR de las AuNBs cubiertas con los polímeros son mostrados en la Figura 16. En la Figura 16 a), correspondiente a las AuNBs-CTAB, se pueden observar picos intensos a 1480 cm^{-1} y $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, los cuales pueden ser atribuidos a doblamientos y estiramientos de los enlaces C-H de la cadena alifática del CTAB, también se presentan picos a 910, 964 y un doblete a 725 cm^{-1} asociados al enlace C-N^{132,133}. La Figura 16 b) corresponde al espectro de las AuNBs-Chi-SH, se observa claramente que los picos correspondientes al CTAB son reemplazados por aquellos característicos al quitosano, la banda ancha localizada a 3200 cm^{-1} se debe a los estiramientos de los grupos NH_2 y OH, los picos localizados a 1571 cm^{-1} y 1620 cm^{-1} se pueden atribuir al doblamiento del enlace N-H, mientras que los estiramientos de los enlaces C-O y C-O-C de los alcoholes secundarios y de los enlaces glucósido de la estructura del polisacárido aparecen entre 950 y 1100 cm^{-1} ¹³⁴⁻¹³⁶.

El espectro de las AuNBs-Chi-SH-PVA se muestra en la Figura 16 c), en este se observa una banda a 3300 cm^{-1} debido a la presencia de los grupos OH del PVA, además aparece un pico a 1730 cm^{-1} debido al estiramiento del C=O de los grupos acetato remanentes del PVA (se utilizó un PVA con 86.7-88.7 % de hidrólisis)¹³⁷. El espectro de las AuNBs-Chi-SH-Alg aparece en la figura 16 d), en este se observan tres picos importantes a 1730, 1600 y 1400 cm^{-1} , los cuales pueden ser asignados al estiramiento del carbonilo y a los estiramientos anti simétrico y simétrico de los carboxilatos del alginato, respectivamente¹³⁸.

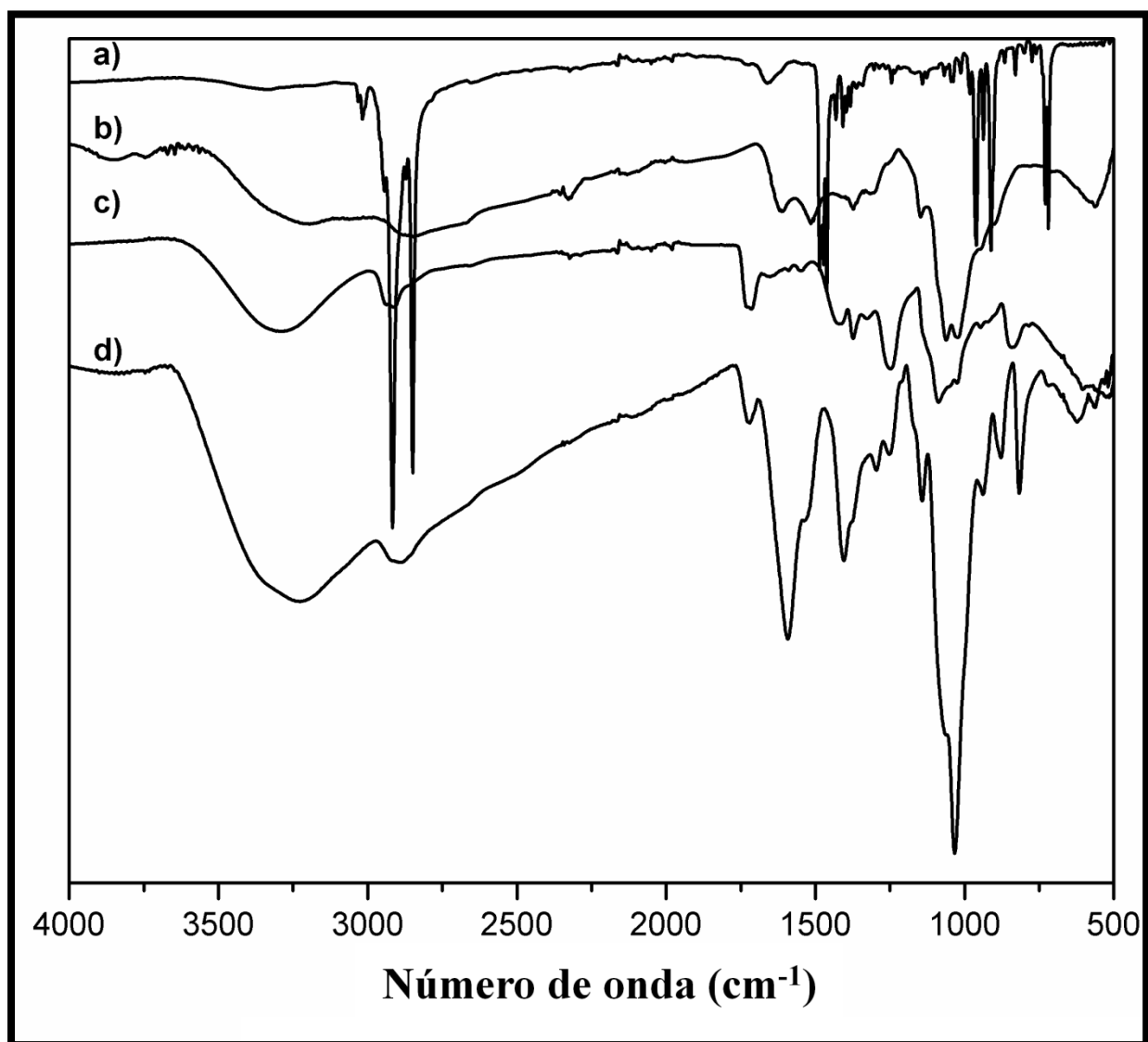


Figura 16. FTIR de las diferentes AuNBs; a) AuNBs-CTAB, b) AuNBs-Chi-SH, c) AuNBs-Chi-SH-PVA y d) AuNBs-Chi-SH-Alg.

Estos resultados confirman, en primer lugar, que las moléculas de CTAB fueron exitosamente removidas de la superficie de las AuNBs y reemplazadas por el quitosano, y en segundo lugar, que las capas de alginato y PVA fueron adsorbidas en la superficie de las AuNBs-Chi-SH.

Por otro lado, se realizó un estudio del comportamiento del potencial zeta (ζ) después de que las capas de alginato o de PVA se adsorbían en la superficie de las AuNBs, estas mediciones fueron hechas a un pH ≈ 5 para asegurar que los grupos aminos del quitosano se encontraran protonados. Las AuNBs-Chi-SH-PVA y AuNBs-Chi-SH-Alg fueron medidas a ese mismo pH para poder realizar comparaciones; por lo tanto, los cambios en los valores del potencial zeta pueden ser usados como parámetro para confirmar el éxito de la adsorción de los polímeros

Los resultados son mostrados en la Figura 17, se observa una inversión del potencial zeta de las AuNBs-Chi-SH de +35 mV a -17 mV después de la adsorción del alginato, mientras que en el caso del PVA solo se presenta una disminución a 18 mV. Este comportamiento puede ser explicado considerando las características iónicas de cada polímero a pH 5, el pK_a de los grupos carboxílicos a lo largo de la cadena de alginato es de alrededor de 3.5, por lo tanto, dichos grupos se encuentran desprotonados al pH que se realizó la lectura; estos grupos permiten la asociación electrostática con los grupos amino protonados expuestos en la capa de quitosano adsorbida en la superficie de las AuNBs, además, algunos carboxilatos permanecen disponibles en la superficie, esto provoca la inversión del potencial zeta observada^{106,139}. Por otro lado, en el caso del PVA, la adsorción es promovida través de puentes de hidrogeno entre los grupos hidroxilo del PVA y la capa de quitosano que recubre a las AuNBs, esto ocasiona un apantallamiento de la carga de los grupos amino del quitosano y, por lo tanto, una reducción del potencial zeta¹³⁴.

Los estudios de potencial zeta también se realizaron a un pH de 7.4 (solución amortiguadora de fosfatos 10 mM), los resultados también se muestran en la Figura 16. Los valores de potencial zeta obtenidos fueron +2 mV, -24 mV y -3 mV para las AuNBs-Chi-SH, AuNBs-Chi-SH-Alg y AuNBs-Chi-SH-PVA, respectivamente. El comportamiento de las AuNBs-Chi-SH se debe a la desprotonación de los grupos amino ($pK_a \approx 6.3$), a un pH de 7.4, estos grupos están predominantemente desprotonados y las partículas se vuelven inestables²⁵⁻²⁷, se observó la precipitación de estas en unos cuantos minutos.

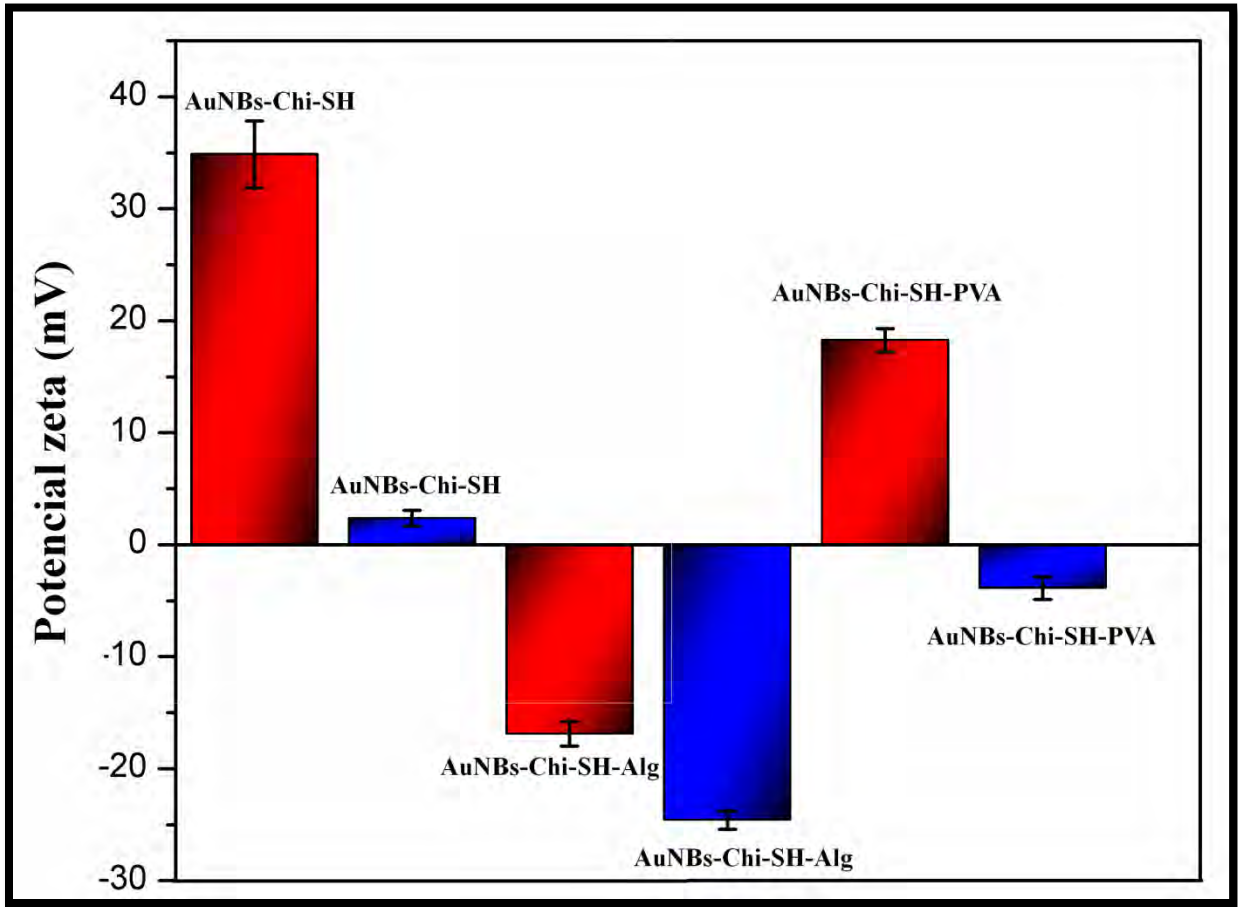


Figura 17. Potencial zeta de AuNBs dispersas en agua ($\text{pH} \approx 5$) (Rojo) o en buffer de fosfatos 10 mM ($\text{pH} 7.4$) (Azul).

En el caso de las AuNBs-Chi-SH-Alg, un potencial zeta más negativo es producto de un mayor grado de desprotonación de la cadena de alginato¹³⁹. Las AuNBs-Chi-SH-PVA presentan un potencial zeta ligeramente negativo, probablemente debido a la adsorción de iones fosfato sobre los grupos aminos aun expuestos en la superficie, sin embargo, la suspensión permaneció estable presumiblemente debido a la estabilización estérica provista por el PVA.

La adsorción de los polímeros sobre las AuNBs fue confirmada adicionalmente a través de imágenes de microscopia de fuerza atómica, en la Figura 18 se presentan las imágenes de MFA de las AuNBs cubiertas con sus respectivos análisis de tamaño tanto de la longitud como del ancho de las partículas cubiertas. Las AuNBs-Chi-SH presentan un tamaño representativo de 100 nm y 50 nm para la longitud y el ancho, respectivamente, en el caso de las AuNBs-Chi-SH-Alg y AuNBs-Chi-SH-PVA se observa un incremento de alrededor de 50 nm en comparación con las AuNBs-Chi-SH tanto en la longitud como en el ancho. Sin embargo, las AuNBs presentan, vistas por microscopia electrónica, un tamaño longitudinal de 57 nm y transversal de 15 nm (para la relación de aspecto de 3.8) (Figura 19), los polímeros no pueden ser fácilmente visualizados por el haz de electrones debido a su baja densidad electrónica y aparecen transparentes o semitransparentes en las micrografías, sin embargo, en el MFA se puede visualizar la topografía de las AuNBs incluyendo la capa polimérica, por lo tanto, la diferencia en el tamaño observado por ambas técnicas puede ser atribuido a las capas de quitosano y Alginato/PVA, sugiriendo que la adsorción se llevó a cabo de manera adecuada.

GHtegp ek 'fg'eqpxgt ulop 'hqyv² to kec ' -0'*

La eficiencia de conversión fototérmica de las AuNBs-CTAB, AuNBs-Chi-SH, AuNBs-Chi-SH-Alg y AuNBs-Chi-SH-PVA se determinó utilizando el modelo de transferencia de calor descrito por Roper et al. (2007)¹¹⁹, para ello los datos experimentales de calentamiento de las partículas, por efecto de la irradiación láser, se ajustaron utilizando la ecuación (17) con el objetivo de determinar los valores de la constante de velocidad característica (τ) y de la eficiencia de transducción fototérmica (η).

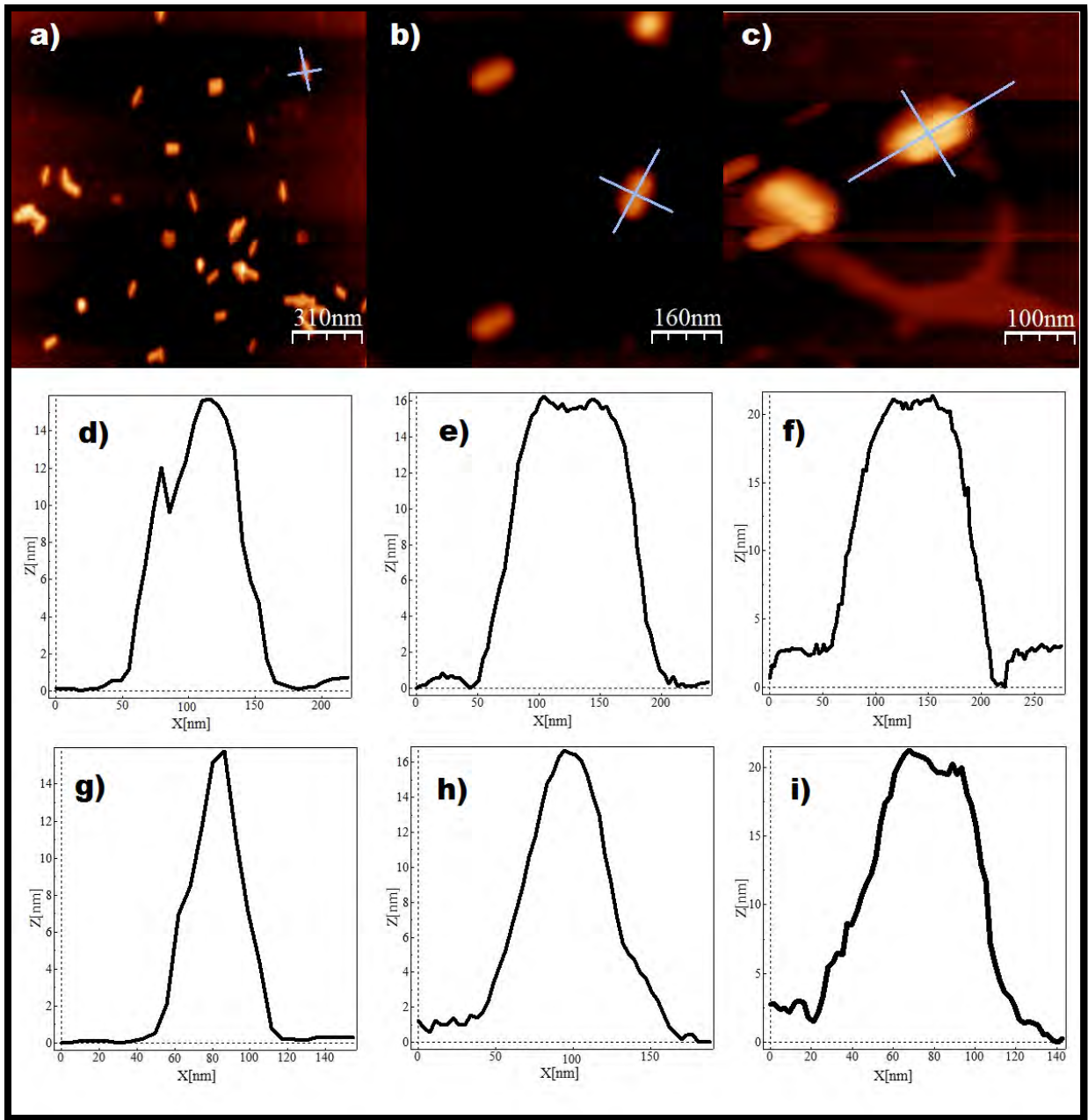


Figura 18. Imágenes de MFA y perfiles representativas longitudinales y transversales de AuNBs; a) AuNBs-CTAB, b) AuNBs-Chi-SH-Alg, c) AuNBs-Chi-SH-PVA, d), e) y f) perfiles longitudinales representativos, g), h) e i) perfiles transversales representativos (cada perfil corresponde a la imagen de MFA mostrada arriba).

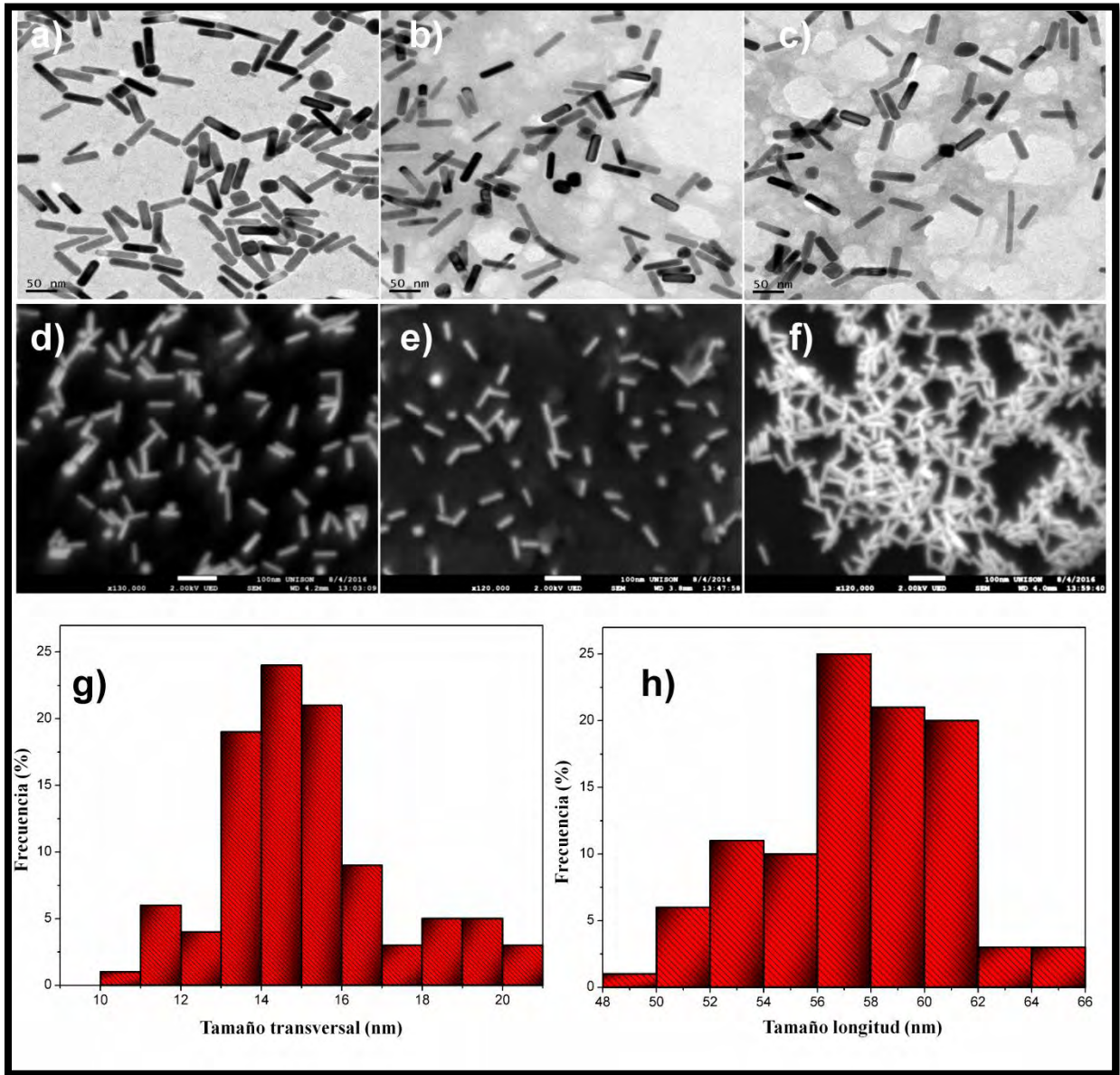


Figura 19. Imágenes de TEM y SEM de AuNBs; a) y d) Chi-SH- AuNBs, b) y e) Alg-Chi-SH- AuNBs, c) y f) de PVA-Chi-SH-AuNBs, g) y h) distribución de tamaños transversal y longitudinal AuNBs. (Escala de las imágenes de SEM 100 nm).

Es importante notar que μ depende solo del arreglo experimental (dimensiones de la celda, volumen de solución, etc.), mientras η puede ser considerada como una propiedad intrínseca de las AuNBs, es decir, la eficiencia de transducción fototérmica solo depende de la forma y del tamaño de las partículas^{43,140-143}.

Las Figuras 20-23 muestran las curvas de calentamiento de las AuNBs para diferentes absorbancias (0.25, 0.5, 1 y 2) y diferentes potencias (1 W, 1.5 W y 2 W), estos resultados se ajustaron adecuadamente a la ecuación (17) (línea continua). El comportamiento de la curva de calentamiento es similar al reportado en estudios previos^{43,119,141,142}; se observa un incremento pronunciado en la temperatura los primeros minutos de irradiación hasta que se alcanza una especie de saturación, después de la cual, el incremento de temperatura es casi nulo, en este punto el sistema alcanza un equilibrio entre el calor generado producto de la irradiación (S_K y S_2) y el calor disipado a los alrededores como resultado de un proceso de convección (S_{gv}).

Los resultados obtenidos para los valores de μ y η son mostrados en el Anexo 2, los valores de la eficiencia de transducción fototérmica para las cuatro tipos de AuNBs son mostrados en la Figura 24, estos resultados son similares a los reportados por Pattani et al.⁸ y Cole et al.⁴³, los primeros reportaron una eficiencia de 0.5 para unas AuNBs de un tamaño de 7x26 nm (PRSL 770 nm) usando un láser de 808 nm, mientras que los segundos obtuvieron una eficiencia de 0.55 para unas AuNBs de un tamaño de 13x44 nm (PRSL 780 nm), ambos usaron el modelo de transferencia de calor descrito por Roper et al.¹¹⁹, y las AuNBs estaban cubiertas con CTAB.

La eficiencia de transducción fototérmica puede ser entendida como la relación absorción/extinción de las nanopartículas y es frecuentemente usada como un parámetro importante para describir la eficiencia de estas para convertir la luz absorbida en calor. El calor producido por estas AuNBs sujetas a irradiación láser fue suficiente para producir muerte celular como resultado de la hipertermia, como se mostrara en la siguiente sección.

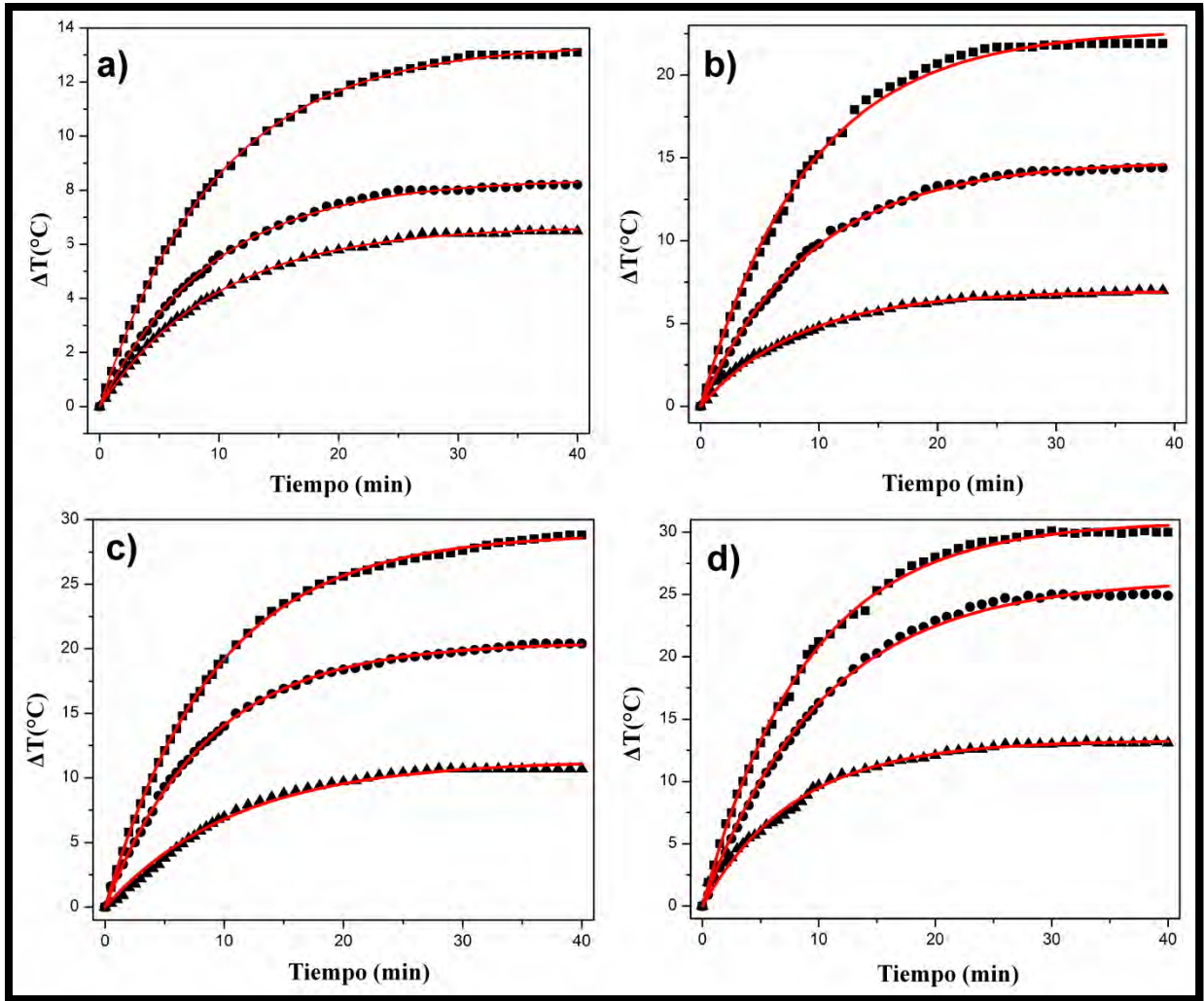


Figura 20. Perfiles de calentamiento de las AuNBs-CTAB a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).

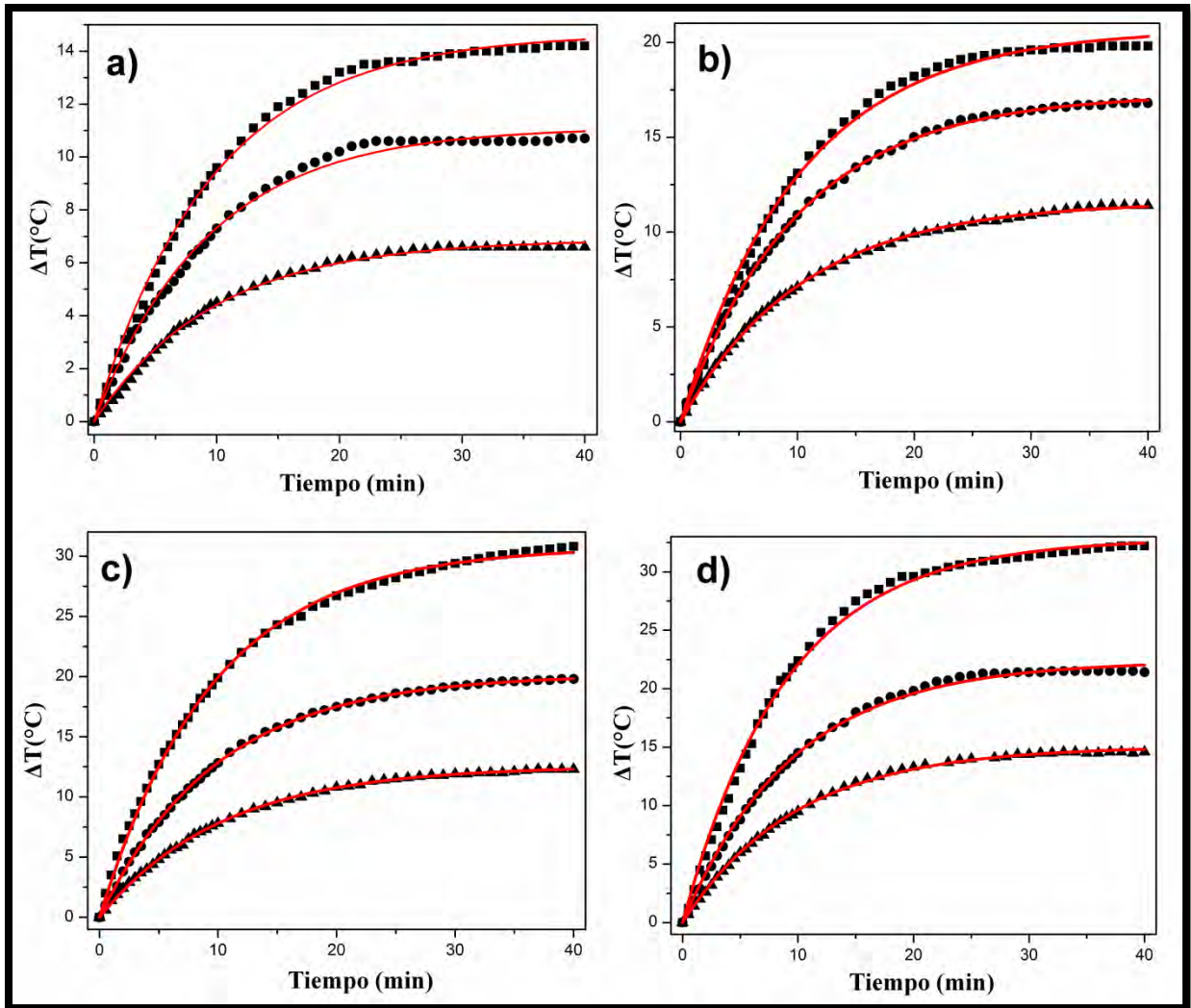


Figura 21. Perfiles de calentamiento de las AuNBS-Chi-SH a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).

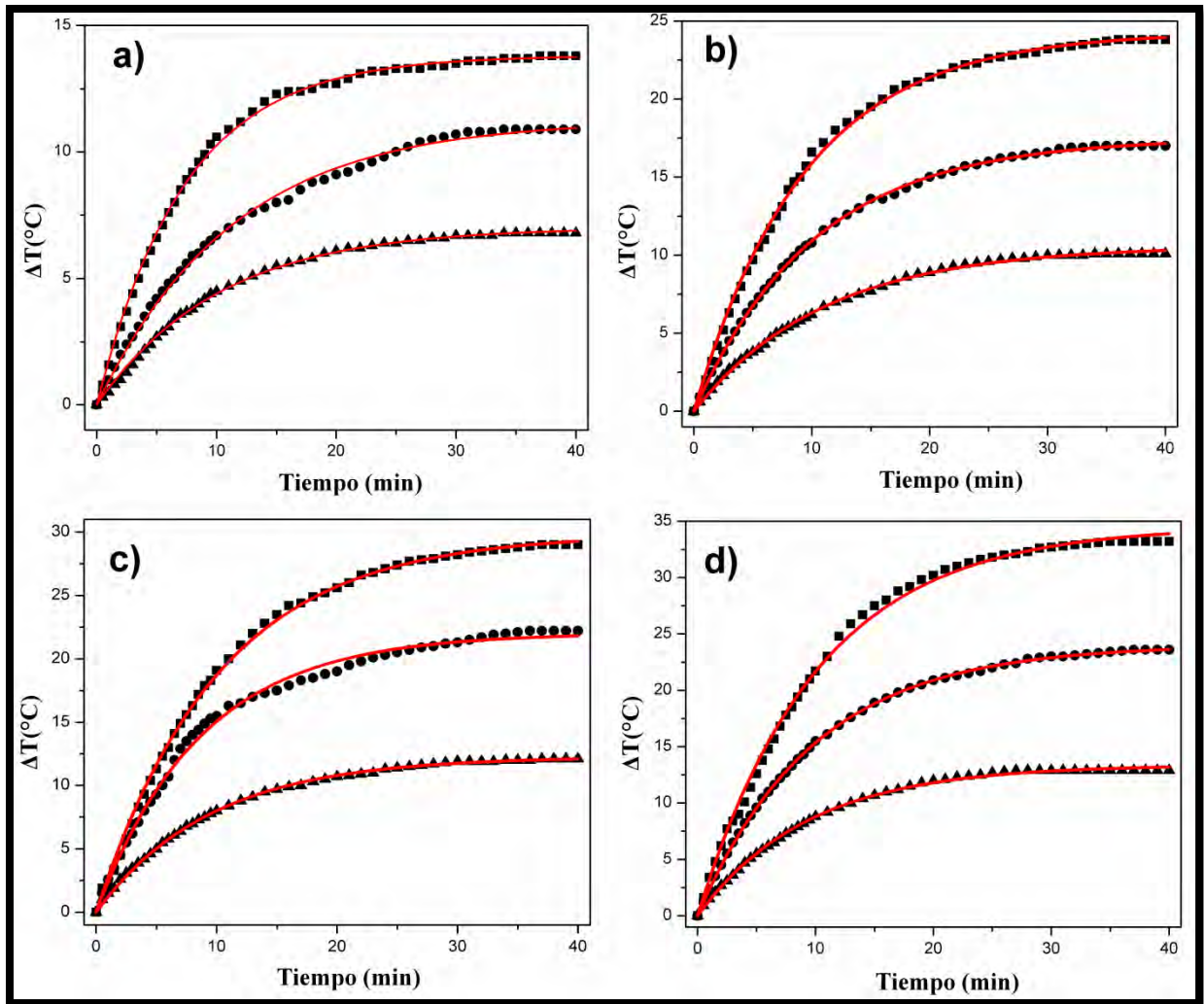


Figura 22. Perfiles de calentamiento de las AuNBs-Chi-SH-Alg a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).

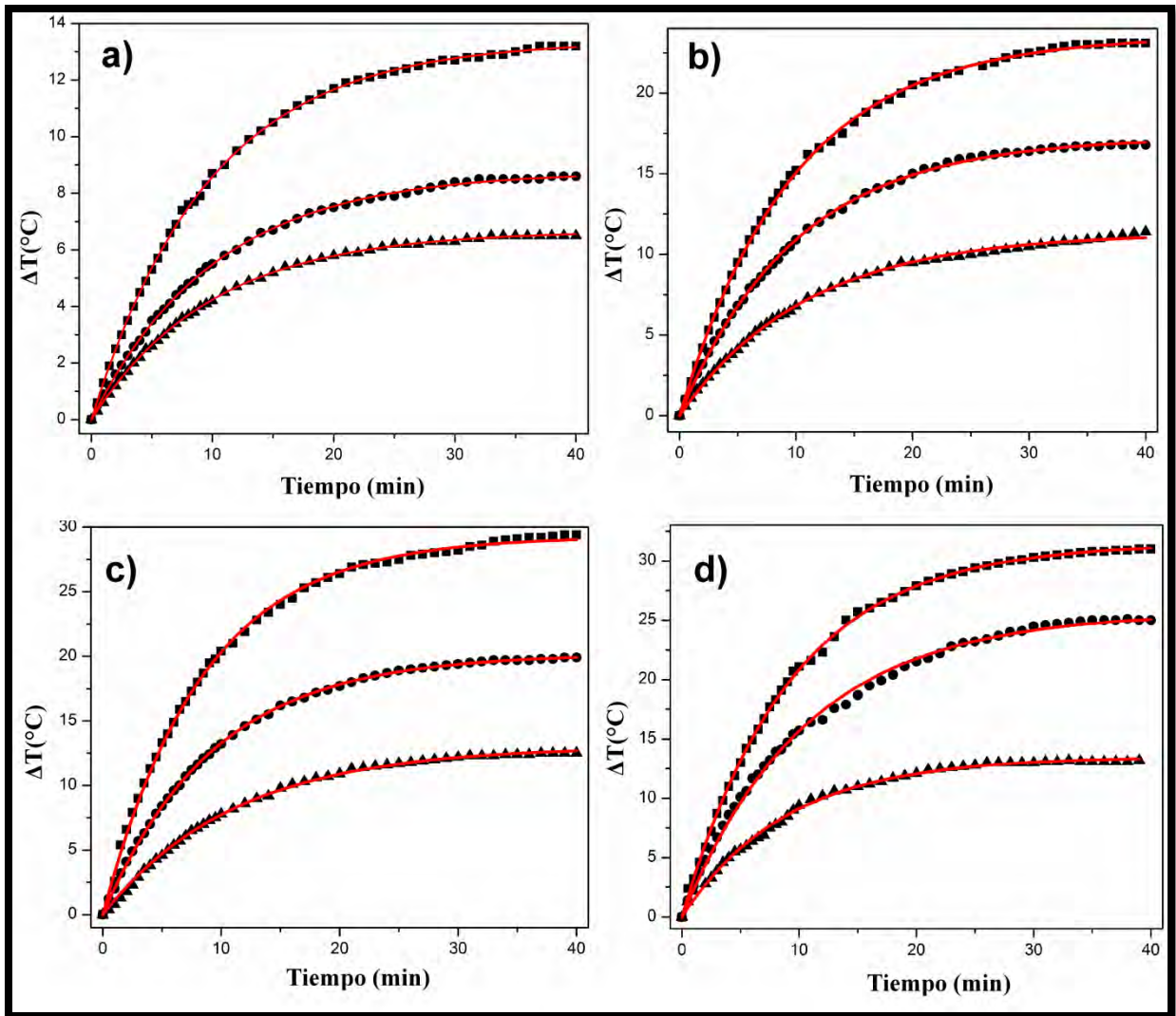


Figura 23. Perfiles de calentamiento de las AuNBs-Chi-SH-PVA a diferentes absorbancias; a) 0.25, b) 0.5, c) 1 y d) 2, y usando diferentes potencias; ▲ (1 W), ● (1.5 W) y ■ (2 W). La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).

Interesantemente, no se observan diferencias significativas en los valores de ϵ para las cuatro tipos de AuNBs (Fig. 24), lo cual sugiere que la cubierta polimérica no afecta en absoluto la capacidad de las nanopartículas para transformar la radiación electromagnética en calor, es decir, aparentemente la cubierta polimérica, a pesar de ser relativamente grande, no incrementa de manera significativa la dispersión de la luz, lo cual es positivo dado que estas AuNBs cubiertas pueden ser utilizadas para la terapia foto térmica sin detrimento en su capacidad para producir calor. Este comportamiento se puede deber a que la cubierta polimérica es transparente a la longitud de onda utilizada (808 nm), o bien, a que la porción de la luz extinguida por la cubierta polimérica es muy pequeña, y por lo tanto despreciable, comparada con aquella atenuada por las AuNBs *rgt'ug*.

Gpuc {qu'èkq}»z.lequ0'

En este trabajo se utilizaron tres polímeros considerados como biocompatibles para recubrir las AuNBs con el objetivo de disminuir la citotoxicidad asociada al CTAB adsorbido en la superficie de las mismas¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Estas partículas pueden ser utilizadas potencialmente para la aplicación en terapia fototérmica, en particular para el tratamiento contra el cáncer, en este sentido, es necesario determinar si son efectivas para inducir muerte celular cuando son sometidas a irradiación láser, es por ello que realizamos algunos estudios de citotoxicidad utilizando la línea celular MDA-MB-231.

En la Figura 25 se muestran los resultados de citotoxicidad de los polímeros alginato y PVA (el quitosano no fue utilizado en estos estudios debido a la insolubilidad asociada a él a pH fisiológico), se observa claramente que ninguno de los polímeros ejercen algún efecto tóxico incluso a concentraciones tan altas como 1 mg/mL. En la Figura 26 se muestra la citotoxicidad asociada a las AuNBs-CTAB, AuNBs-Chi-SH-Alg y AuNBs-Chi-SH-PVA, se puede notar que ésta disminuye de manera significativa cuando el CTAB se ha reemplazado por los polímeros, estos resultados concuerdan con estudios previos donde se ha mostrado que la toxicidad asociada a las AuNBs está directamente relacionada al CTAB y no a un efecto intrínseco de las mismas¹⁴⁻¹⁷, en este sentido, la modificación de la superficie de las partículas realizada en el presente trabajo presentan una ventaja importante y mejora el panorama para futuras aplicaciones médicas.

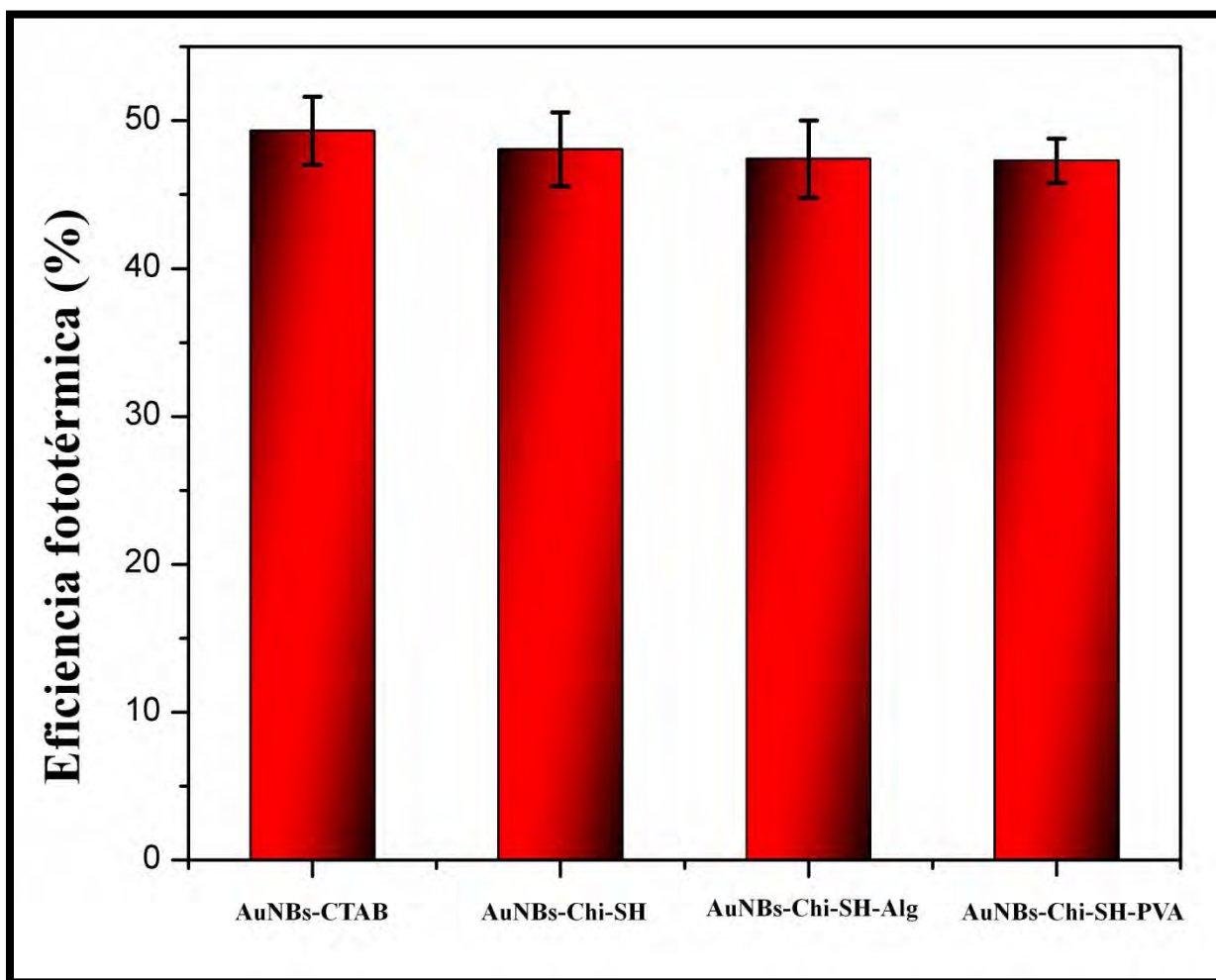


Figura 24. Eficiencia de transducción fototérmica de las AuNBs.

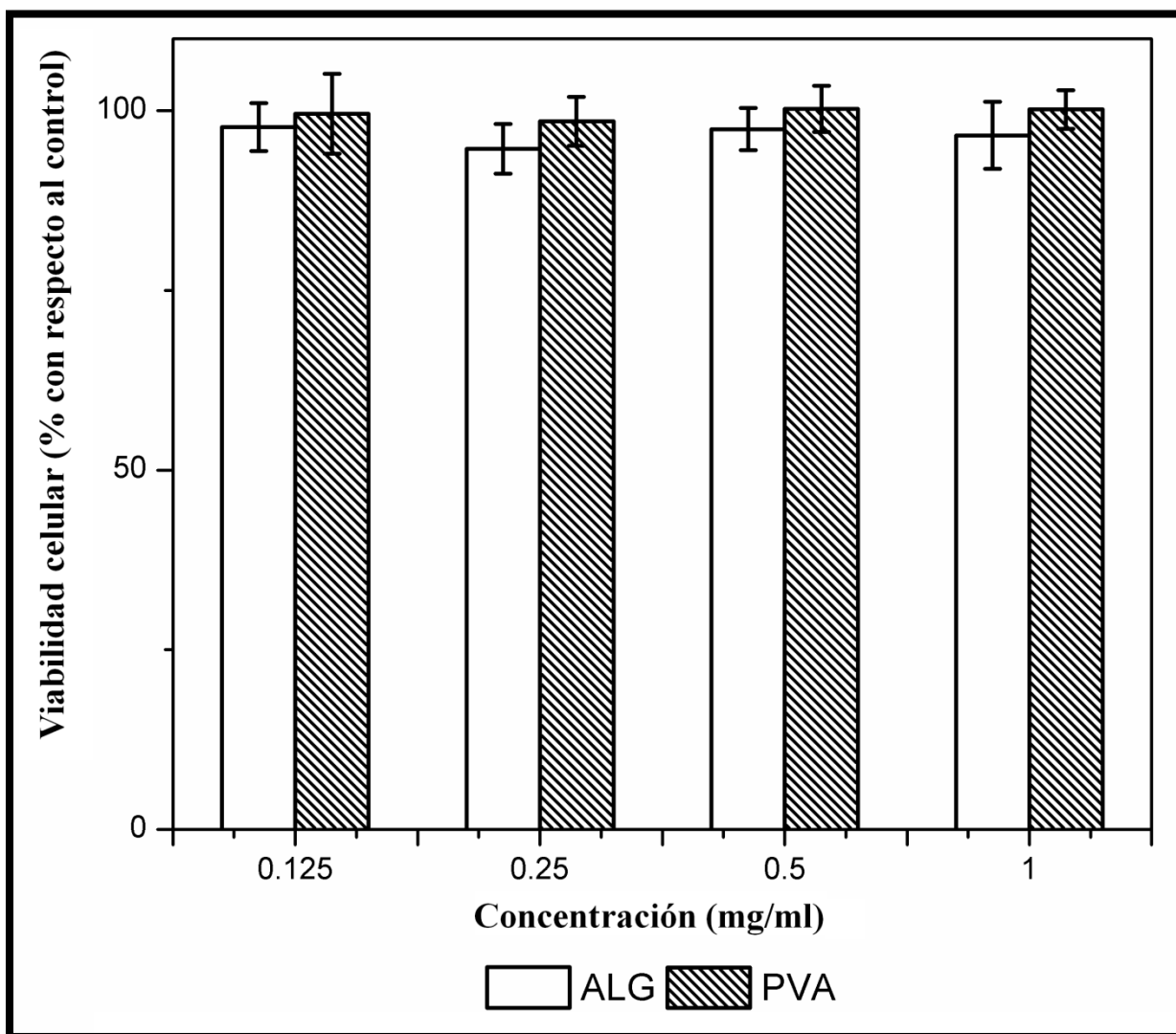


Figura 25. Citotoxicidad de los polímeros Alginato y PVA sobre la línea celular MDA-MB-231.

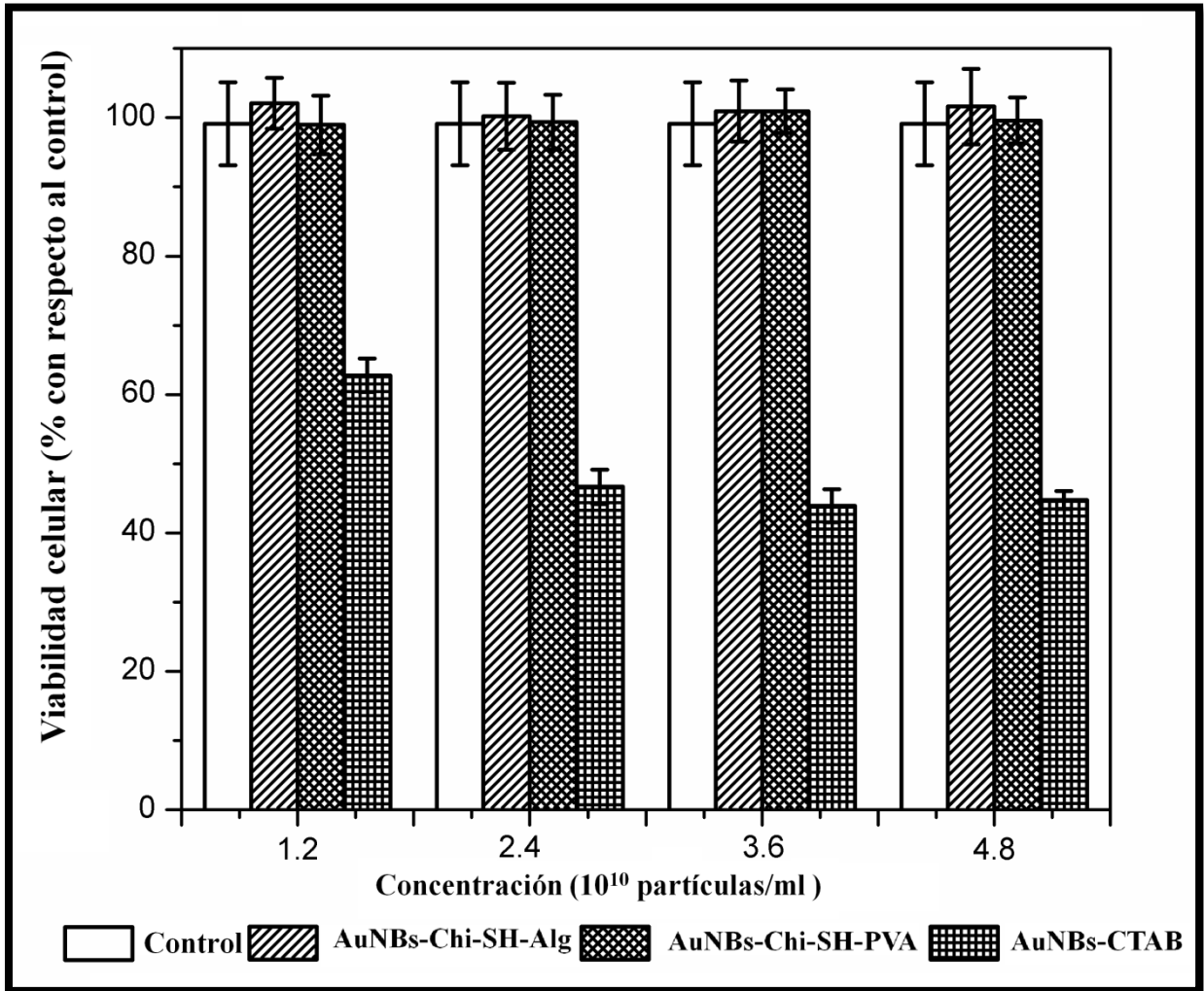


Figura 26. Citotoxicidad de las AuNBs sobre la línea celular MDA-MB-231.

También se evaluó la citotoxicidad de las partículas sometidas a irradiación láser a diferentes potencias, los resultados se muestran en la Figura 27. A primera instancia se puede observar que la potencia de 2 W disminuye de manera significativa la viabilidad celular, mientras las potencias de 1 W y 1.5 W no afectan en absoluto la supervivencia celular, esto se debe a que la potencia de 2 W induce, por sí sola, un incremento en la temperatura del medio de cultivo y por lo tanto la supervivencia de las células se ve comprometida debido a la hipertermia.

Durante la hipertermia, la velocidad de las reacciones químicas se incrementa significativamente provocando estrés oxidativo, lo cual promueve la oxidación de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, además se produce la desnaturalización de proteínas, todo ello desencadena la muerte celular³. La hipertermia puede producir muerte celular por apoptosis o por necrosis dependiendo de la temperatura utilizada, por ejemplo, Harmon et al.¹⁴⁷ observaron que al incrementar la temperatura a 42-44 °C durante 30 min en un cultivo celular, las células comienzan a morir principalmente por apoptosis, la cual es más pronunciada a 44 °C. Cuando utilizaron una temperatura de 45 °C observaron muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis, mientras a temperaturas de 46 y 47 °C las células murieron solo por necrosis. Por otro lado, se ha mostrado que las células con alta tasa de división celular son más susceptibles a presentar apoptosis inducida por hipertermia¹⁴⁸, además, se ha reportado que células en la fase M y S del ciclo de división celular son más susceptibles a la hipertermia que células en la fase G1, aparentemente debido a daños en el aparato mitótico y en los cromosomas durante la mitosis y la replicación del ADN¹⁴⁹.

En la Figura 27 también se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre AuNBs-Chi-SH-Alg y AuNBs-Chi-SH-PVA sometidas a irradiación en ninguna de las tres potencias utilizadas, lo cual concuerda perfectamente con los resultados mostrados en la Figura 24 donde no se muestran diferencias en la eficiencia de transducción fototérmica, esto significa que, bajo las mismas condiciones experimentales, ambas partículas generan la misma cantidad de calor y por lo tanto las células son sometidas a condiciones de hipertermia similares. No existen diferencias significativas entre las células tratadas con las AuNBs e irradiadas con potencias de 1 y 1.5 W, pero ambas son diferentes de aquellas irradiadas con 2 W, este comportamiento se debe, como ya se mencionó anteriormente, a que esta última potencia tiene la capacidad intrínseca de elevar la temperatura del medio de cultivo e inducir

muerte celular por hipertermia, esto provoca que el incremento de la temperatura en las células tratadas con AuNBs sea mayor cuando se usa esta potencia, promoviendo ampliamente la muerte celular por necrosis. Esto nos indica que esta potencia no es adecuada para futuras aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, así como en potenciales aplicaciones médicas.

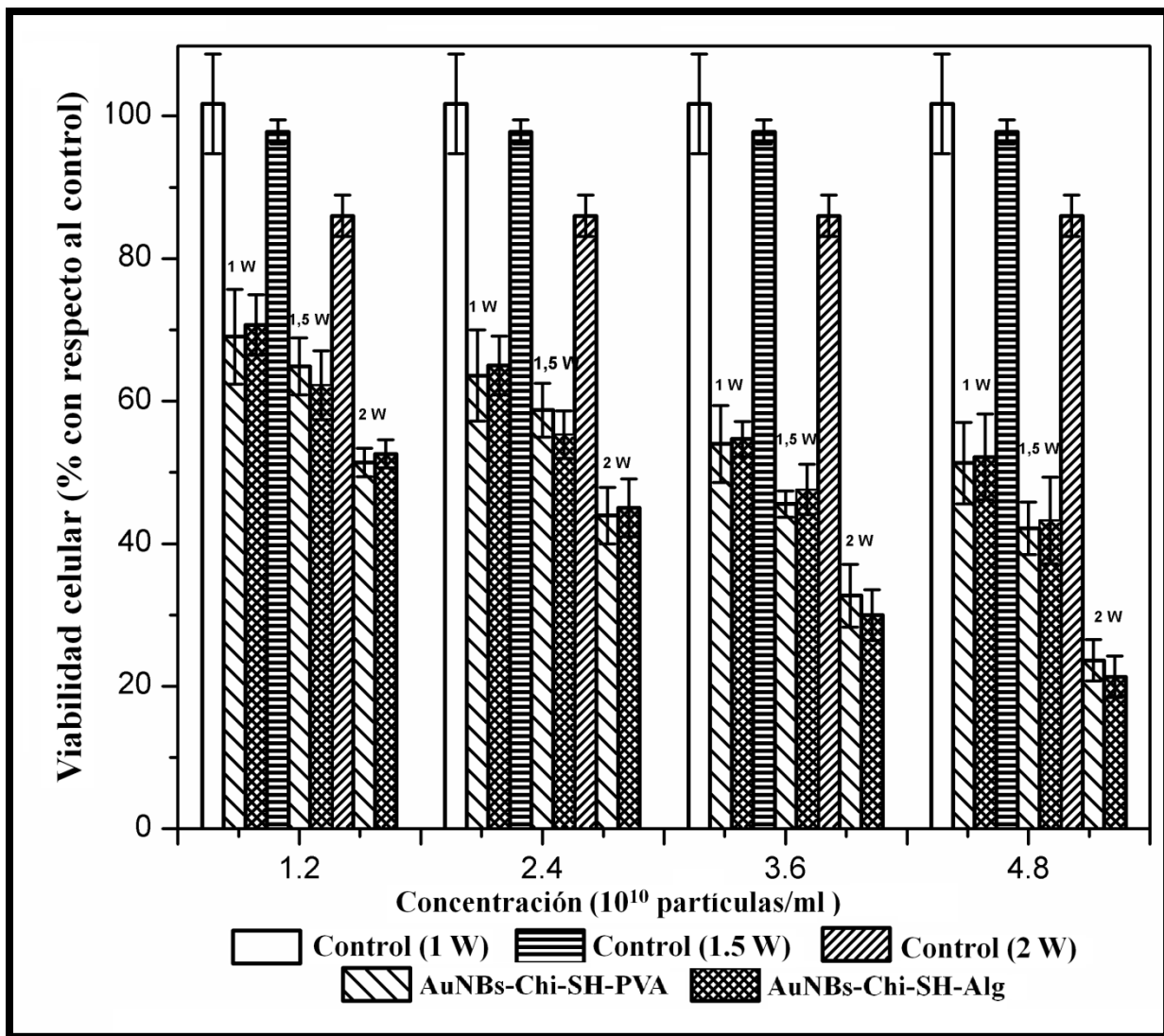


Figura 27. Citotoxicidad observada en las células MDA-MB-231 tratadas con las AuNBs cubiertas con Alginato y PVA e irradiadas con el láser a 808 nm durante 5 min.

CONCLUSIONES

La síntesis de AuNBs mediante el método mediado por semillas puede ser optimizada usando HCl como aditivo para controlar la relación de aspecto debido al incremento del potencial de reducción del ácido ascórbico, esto provoca una disminución en la velocidad de crecimiento tanto transversal como longitudinal, originando que el crecimiento de las AuNBs se detenga en etapas intermedias del proceso, de tal manera que no se produce el corrimiento al azul del PRSL característico en las síntesis realizadas en ausencia de HCl. El incremento en la concentración del ácido ascórbico en el rango utilizado provoca un desplazamiento del PRSL hacia longitudes de onda más altas, esto proporciona una manera adicional de manipular la posición de dicho plasmón, sin embargo, mientras más alta es la concentración del agente reductor se producen una mayor cantidad de productos secundarios (partículas cúbicas y esféricas). En este sentido, el estudio presentado en este trabajo proporciona nuevas pistas en relación al control del crecimiento de las AuNBs.

Por otro lado, el quitosano-SH puede ser utilizado para modificar la superficie de las AuNBs y, a su vez, eliminar totalmente las moléculas de CTAB, a través de un procedimiento sumamente simple y altamente reproducible, la adsorción del quitosano-SH en la superficie de las AuNBs produce un nanosistema muy versátil con grupos funcionales muy reactivos (-NH₂ y -OH) susceptibles de ser modificados, sin embargo, la aplicación de las AuNBs-Chi-SH en medicina es limitada debido al pK_a (6.3) del quitosano, lo cual provoca que los grupos aminos estén predominantemente desprotonados a pH fisiológico. Es posible mejorar la estabilidad a pH 7.4 cubriendo las AuNBs-Chi-SH con polímeros como el PVA y el alginato, estas cubiertas poliméricas no afectan en absoluto la eficiencia de transducción fototérmica () de estas partículas de oro, los estudios celulares muestran que estos sistemas recubiertos disminuyen la citotoxicidad de manera considerable (en comparación con las AuNBs-CTAB), además de ser eficaces para producir muerte celular por hipertermia cuando son sometidos a irradiación láser. Basados en estos resultados se puede considerar que las AuNBs cubiertas con quitosano-alginato y quitosano-PVA tienen potencial para ser utilizados en aplicaciones médicas debido a sus propiedades fisicoquímicas y fototérmicas.

PERSPECTIVAS

El nanosistema sintetizado en el presente trabajo es bastante versátil y presenta varias oportunidades para desarrollar futuras investigaciones, en particular, las AuNBs-Chi-SH-Alg. Es posible adicionar agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, en este caso se plantea la posibilidad de unir químicamente al cisplatino con los grupos carboxilos del alginato a través de enlaces de coordinación, además los grupos carboxilos también pueden ser utilizados para unir químicamente moléculas guías (péptidos, anticuerpos, etc.) para proveer al sistema de una mayor especificidad por las células blanco. Este nanosistema también puede ser utilizado como agente de administración de oligonucleótidos antisentido o de RNA de interferencia, aprovechando la presencia del quitosano en la superficie de las AuNBs, en este sentido, es posible hacer interaccionar electrostáticamente estos ácidos nucleicos con los grupos amino del quitosano para posteriormente ser cubiertos con el alginato, de nuevo, los grupos carboxilos del alginato quedarían expuestos para la unión química de moléculas guías. Finalmente, es necesario realizar estudios *in vivo*, para probar la toxicidad, la biodistribución y la eficacia de estos sistemas en un modelo animal.

"

ANEXO 1

Valores obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales usando la ecuación (17).

		Valor	Error Estándar	R ²			Valor	Error Estándar	R ²
AuNBs-CTAB Absorbancia 0.25					AuNBs-Chi-SH Absorbancia 0.25				
1 W	"	0.4708	0.0026	0.99932	1 W	"	0.48761	0.00554	0.99725
	' u'	9.85039	0.07293			' u'	9.75124	0.14777	
1,5 W	"	0.44053	0.00256	0.99913	1,5 W	"	0.50091	0.0078	0.9956
	' u'	9.44909	0.07796			' u'	9.30353	0.17319	
2 W	"	0.47171	0.00169	0.99971	2 W	"	0.50464	0.00607	0.99711
	' u'	9.81112	0.04713			' u'	9.68123	0.14923	
AuNBs-CTAB Absorbancia 0.5					AuNBs-Chi-SH Absorbancia 0.5				
1 W	"	0.4674	0.00431	0.99671	1 W	"	0.4929	0.00289	0.99924
	' u'	9.38317	0.12634			' u'	9.4047	0.08321	
1.5 W	"	0.44792	0.00317	0.999	1.5 W	"	0.48797	0.00213	0.99961
	' u'	9.33077	0.08384			' u'	9.02387	0.05666	
2 W	"	0.49766	0.00606	0.99741	2 W	"	0.49105	0.00545	0.99693
	' u'	9.03412	0.12917			' u'	9.16819	0.16652	
AuNBs-CTAB Absorbancia 1					AuNBs-Chi-SH 1 Absorbancia 1				
1 W	"	0.4995	0.00638	0.99339	1 W	"	0.4905	0.00211	0.99941
	' u'	8.94419	0.27807			' u'	9.317	0.07241	
1.5 W	"	0.5181	0.00279	0.99936	1.5 W	"	0.44151	0.00146	0.99977
	' u'	8.60999	0.05784			' u'	9.89412	0.04254	
2 W	"	0.48458	0.00208	0.99965	2 W	"	0.46905	0.00211	0.99941
	' u'	9.17662	0.04707			' u'	9.317	0.07241	
AuNBs-CTAB Absorbancia 2					AuNBs-Chi-SH 2 Absorbancia 2				
1 W	"	0.50867	0.00856	0.99283	1 W	"	0.4688	0.00298	0.99913
	' u'	8.98718	0.16894			' u'	9.82662	0.0836	
1.5 W	"	0.50597	0.00507	0.99797	1.5 W	"	0.46164	0.00424	0.99827
	' u'	9.26383	0.13592			' u'	9.57685	0.11317	
2 W	"	0.48894	0.00416	0.99858	2 W	"	0.5178	0.0066	0.99695
	' u'	8.90258	0.09067			' u'	8.97587	0.13784	

		Valor	Error Estándar	R ²		Valor	Error Estándar	R ²	
AuNBs-Chi-SH-Alg Absorbancia 0.25					AuNBs-Chi-SH-PVA Absorbancia 0.25				
1 W	"	0.4781	0.0042	0.99835	1 W	"	0.46748	0.0017	0.99971
	u'	9.15009	0.12079			u'	9.91537	0.04848	
1,5 W	"	0.44663	0.00508	0.99732	1,5 W	"	0.39688	0.0017	0.99959
	u'	9.36371	0.17793			u'	10.18162	0.05922	
2 W	"	0.52407	0.00496	0.99861	2 W	"	0.47329	0.00168	0.99972
	u'	8.37957	0.06985			u'	9.75421	0.04615	
AuNBs-Chi-SH-Alg Absorbancia 0.5					AuNBs-Chi-SH-PVA Absorbancia 0.5				
1 W	"	0.46425	0.00312	0.99883	1 W	"	0.46042	0.00355	0.9987
	u'	10.02749	0.11308			u'	9.88129	0.11648	
1.5 W	"	0.4839	0.00196	0.99967	1.5 W	"	0.48797	0.00213	0.99961
	u'	10.23819	0.05393			u'	10.02387	0.05666	
2 W	"	0.51034	0.00453	0.99861	2 W	"	0.47086	0.00243	0.99954
	u'	9.43379	0.0991			u'	9.82543	0.0603	
AuNBs-Chi-SH-Alg Absorbancia 1					AuNBs-Chi-SH-PVA Absorbancia 1				
1 W	"	0.45594	0.00297	0.99892	1 W	"	0.49383	0.00295	0.99884
	u'	9.45401	0.08522			u'	10.12713	0.11679	
1.5 W	"	0.50304	0.00824	0.99455	1.5 W	"	0.46868	0.00144	0.9998
	u'	9.68283	0.16203			u'	9.34555	0.03669	
2 W	"	0.47007	0.00402	0.99859	2 W	"	0.51722	0.00395	0.99892
	u'	10.12761	0.11112			u'	9.45066	0.07314	
AuNBs-Chi-SH-Alg Absorbancia 2					AuNBs-Chi-SH-PVA Absorbancia 2				
1 W	"	0.45703	0.00335	0.99866	1 W	"	0.46433	0.00536	0.99679
	u'	9.34892	0.09443			u'	8.87965	0.13387	
1.5 W	"	0.48396	0.00143	0.99982	1.5 W	"	0.47823	0.00506	0.99762
	u'	9.82889	0.03774			u'	10.62421	0.15028	
2 W	"	0.47866	0.00557	0.99753	2 W	"	0.47987	0.00245	0.9995
	u'	10.15888	0.14741			u'	9.23481	0.05693	

ANEXO 2

Growth Kinetics of Gold Nanorods Synthesized by a Seed-Mediated Method Under pH Acidic Conditions

M. Almada¹, E. D. Ruiz¹, J. Ibarra-Hurtado¹, N. Hassan^{2,3}, M. J. Kogan^{2,3},
R. D. Cadena-Nava⁴, M. A. Valdés¹, and J. Juárez^{1,*}

¹*Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, 83000, México*

²*Laboratorio de Nanobiotecnología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile, 8380494, Chile*

³*Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), Santiago de Chile, 8380492, Chile*

⁴*Center for Nanosciences and Nanotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada s/n, Baja California 22800, México*

A systematic study of the effect of ascorbic acid concentration on the growth kinetics of gold nanorods under pH acidic conditions was done. We employed the seed-mediated approach at pH 1.25 using different ascorbic acid/Au⁺³ molar ratios. We monitored the gold nanorods growth using UV-Vis spectroscopy and the apparent growth rates were determined fitting the experimental data with a theoretical non-linear Boltzmann function. We found that, under the conditions proven, an increase of the ascorbic acid/Au⁺³ molar ratio induces a red-shift in the longitudinal surface plasmon resonance, as well as the formation of undesirable by-products. The apparent growth rates show a linear dependence with the increment of ascorbic acid concentration. We determined a range of growth rates from 0.034 to 0.078 min⁻¹, from the lowest to the highest molar ratio used, respectively; which corresponds to deposition rates from 0.128 to 0.235 atoms per second. A low pH in the growth solution promotes a slower growth nanorods rate, which prevents the drastic blue-shift observed in the synthesis at higher pH and provides an aspect ratio tuning.

Keywords: Gold Nanorods, Kinetic Growth, Anisotropic, SPR.

1. INTRODUCTION

The exceptional physical and chemical properties of metal nanoparticles, such as optical, electronic, magnetic and catalytic, have promoted their potential uses in different areas of chemistry, physics, biology, and medicine, among others.^{1–3} For over a decade, many research groups have paid great attention in gold nanoparticles (GNP) because of their peculiar localized surface plasmon (SPR), which can be exploited in the production of innovative devices, especially in biomedicine areas, for sensing, diagnostic and photothermal treatments,⁴ where the SPR of metallic nanoparticles play an important role in their potential medical uses. It is known, that the SPR behavior of GNP is strongly dependent on their size, shape, composition and local surrounding environment.^{4–6} Therefore, non-spherical gold nanoparticles are one of the most interesting nanosystem for technological application, because of their optical

features, showing multiple SPR bands that have correlated with the shape of the nanoparticle. Moreover, the adsorption of electromagnetic radiation by non-spherical gold nanoparticles can be manipulated from the visible to the near-infrared region (600–1000 nm).⁷ For instance, gold nanorods (GNR) show two different SPR modes, which arise from the oscillation of electrons across the transverse and longitudinal axes of the surface nanorod. The longitudinal surface plasmon resonance (LSPR) of the GNR is extremely sensitive to the aspect ratio of the rod. This fact provides great opportunities in a wide range of innovative applications of GNRs in biomedical areas such as sensing, imaging, or, photothermal therapy.⁸ These properties have generated great interest of many research groups, who realized great efforts for controlling the anisotropy growth of GNRs.^{9–15}

The most common chemical method used in the synthesis of GNRs is the seed-mediated approach, developed by Jana et al.¹⁶ However, this method have been suf-

*Author to whom correspondence should be addressed.



Photothermal conversion efficiency and cytotoxic effect of gold nanorods stabilized with chitosan, alginate and poly(vinyl alcohol)



M. Almada ^a, B.H. Leal-Martínez ^a, N. Hassan ^b, M.J. Kogan ^{c,d}, M.G. Burboa ^e, A. Topete ^f, M.A. Valdez ^a, J. Juárez ^{a,*}

^a Departamento de Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

^b Programa Institucional de Fomento a la Investigación, Desarrollo e Innovación, Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), Chile

^c Laboratorio de Nanobiotecnología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Chile

^d Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), Chile

^e Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Rosales y Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

^f Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, 44340 Guadalajara, Jalisco, Mexico.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2016

Received in revised form 2 February 2017

Accepted 23 March 2017

Available online 30 March 2017

Keywords:

Gold nanorods

Photothermal efficiency

Chitosan

Alginate

Cytotoxicity

ABSTRACT

Gold nanorods (GNR) use has been proposed in medical applications because of their intrinsic photothermal properties. However, the presence of CTAB molecules adsorbed onto the surface of GNRs results in a highly cytotoxic GNR system. In this work we replace the CTAB molecules with a thiolated chitosan. Once chitosan coated GNRs (Chi-SH-GNR) were attained, a film of alginate (Alg-Chi-SH-GNR) or polyvinyl alcohol (PVA-Chi-SH-GNR) was deposited onto the surface of Chi-GNR by a layer-by-layer process. The photothermal conversion efficiency for the GNR systems was determined irradiating the GNRs suspended in aqua media with a CW 808 nm diode laser (CNI, China). The cytotoxicity effect and the photothermal cellular damage of GNR systems were evaluated on a breast cancer cell line. Results show that polymer coats did not affect the transduction photothermal efficiency. Values around 50% were obtained for the different coated gold nanorods. The cytotoxicity of coated gold nanorods diminished significantly compared with those GNR stabilized with CTAB. The laser irradiation of cells treated with gold nanorods showed a decrease in their viability compared with the cells treated but no irradiated.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decades, gold nanoparticles (GNP) have been extensively studied due to their unique optical properties that arise from the surface plasmon resonance phenomena (the collective oscillation of the electron gas due the interaction with the electromagnetic field) [1,2]. When electromagnetic energy is absorbed by GNPs, commonly, a nonradiative mechanism is carried out to dissipate the absorbed energy, inducing a rise in the temperature of the local environment, called photothermic effect. Photothermic properties of GNP systems can be used to promote the death of cancer cells or stimulate the destruction of aberrant functional protein by hyperthermia; this has been called photothermal therapy [3–5].

In particular, gold nanorods (GNRs) are one of most studied nanoparticle systems because of the ease of their synthesis in aqueous media [6–9]. Moreover, the experimental protocols used in the synthesis of GNRs allow tuning their surface plasmon resonance into the biological window of the electromagnetic spectrum. Generally, GNRs are synthesized by seed-mediated growth assisted by

cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), however, it has been demonstrated that the presence of CTAB adsorbed onto the surface of GNRs is related with a high cytotoxicity, limiting the potential use of this nanoparticles in biological applications [10–14]. The excess of CTAB can be eliminated by several steps of centrifugation; although, it is advisable to keep the remaining CTAB absorbed onto the surface of nanorods to avoid the uncontrollable aggregation of gold nanorods [15]. Thus, it is recommendable replace the CTAB by a biocompatible stabilizer to maintain stable the GNR suspension. At this regard, many efforts have been carried out to replace the CTAB from the surface of gold nanorods with different biocompatible and biodegradable polymeric materials in order to enhance the biocompatibility of nano-systems, allowing the use of GNRs in medical fields [16–23]. Polymers, synthetic or natural, such as polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), chitosan, among others, have been used to stabilize and replace the CTAB from the GNR, the chemical and physical properties of this kind of polymers have been widely used on the preparation of polymeric nanodevices and to overcoat the surface of inorganic nanoparticles [18,21,23–25].

Polysaccharides are ideal candidates to replace the CTAB from gold nanorods surface due to their biocompatibility, low costs and easiness to be modified [26,27]. Furthermore, polysaccharides with poly-

* Corresponding author.

E-mail address: josue.juarez@correo.fisica.uson.mx (J. Juárez).

REFERENCIAS

- (1) Hartland, G. V. Optical Studies of Dynamics in Noble Metal Nanostructures. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3858–3887.
- (2) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy. *J. Adv. Res.* **2010**, *1* (1), 13–28.
- (3) Jaque, D.; Martínez Maestro, L.; del Rosal, B.; Haro-Gonzalez, P.; Benayas, A.; Plaza, J. L.; Martín Rodríguez, E.; García Solé, J. Nanoparticles for Photothermal Therapies. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9494–9530.
- (4) Jabeen, F.; Najam-ul-Haq, M.; Javeed, R.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. Au-Nanomaterials as a Superior Choice for near-Infrared Photothermal Therapy. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20580–20593.
- (5) Hwang, S.; Nam, J.; Jung, S.; Song, J.; Doh, H.; Kim, S. Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Current Status and Future Perspective. *Nanomedicine (Lond)*. **2014**, *9* (13), 2003–2022.
- (6) Maltzahn, G. Von; Park, J.; Agrawal, A.; Bandaru, N. K.; Sarit, K.; Sailor, M. J.; Bhatia, S. N. Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res.* **2009**, *69* (9), 3892–3900.
- (7) Huang, X.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photo-Thermal Therapy (PPTT). *Alexandria J. Med.* **2011**, *47* (1), 1–9.
- (8) Pattani, V. P.; Tunnell, J. W. Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: A Comparative Study of Heating for Different Particle Types. *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44* (8), 675–684.
- (9) Hong, Y.; Lee, E.; Choi, J.; Oh, S. J.; Haam, S.; Huh, Y. M.; Yoon, D. S.; Suh, J. S.; Yang, J. Gold Nanorod-Mediated Photothermal Modulation for Localized Ablation of Cancer Cells. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*.

- (10) Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A. Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (16), 3073–3077.
- (11) Jana, N. R.; Jana, N. R.; Gearheart, L.; Gearheart, L.; Murphy, C. J.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (19), 4065–4067.
- (12) Nikoobakht, B.; Sayed, a El. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed - Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (16), 1957–1962.
- (13) Zhu, J.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Hu, R.; Ding, H.; Zhao, L.; Swihart, M. T.; He, G. S.; Cui, Y.; Prasad, P. N. Additive Controlled Synthesis of Gold Nanorods (GNRs) for Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells. *Nanotechnology* **2010**, *21* (28), 285106.
- (14) Hauck, T. S.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Assessing the Effect of Surface Chemistry on Gold Nanorod Uptake, Toxicity, and Gene Expression in Mammalian Cells. *Small* **2008**, *4* (1), 153–159.
- (15) Alkilany, A. M.; Nagaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701–708.
- (16) Grabinski, C. M.; Schaeublin, N. M.; Wijaya, A.; D’Couto, H.; Baxamusa, S. H.; Hamad-Schifferli, K.; Hussain, S. M. Effect of Gold Nanorod Surface Chemistry on Cellular Response. *ACS Nano* **2011**, *5* (4), 2870–2879.
- (17) Zhang, Y.; Xu, D.; Li, W.; Yu, J.; Chen, Y. Effect of Size, Shape, and Surface Modification on Cytotoxicity of Gold Nanoparticles to Human HEp-2 and Canine MDCK Cells. *J. Nanomater.* **2012**, 2012.
- (18) Wan, J.; Wang, J.-H.; Liu, T.; Xie, Z.; Yu, X.-F.; Li, W. Surface Chemistry but Not Aspect Ratio Mediates the Biological Toxicity of Gold Nanorods in Vitro and *In vivo*.

- Sci. Rep.* **2015**, 5 (November 2014), 11398.
- (19) Gong, T.; Goh, D.; Olivo, M.; Yong, K. T. In Vitro Toxicity and Bioimaging Studies of Gold Nanorods Formulations Coated with Biofunctional Thiol-PEG Molecules and Pluronic Block Copolymers. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, 5 (1), 546–553.
- (20) Gui, C.; Cui, D.-X. Functionalized Gold Nanorods for Tumor Imaging and Targeted Therapy. *Cancer Biol. Med.* **2012**, 9 (4), 221–233.
- (21) Zhang, Z.; Wang, J.; Chen, C. Gold Nanorods Based Platforms for Light-Mediated Theranostics. *Theranostics* **2013**, 3 (3), 223–238.
- (22) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37 (1), 106–126.
- (23) Pati, M. K.; Dash, D.; Pati, M. K. Chitosan: A Versatile Biopolymer for Various Medical Applications. *Int. J. Sci. Eng. Res.* **2013**, 4 (1), 1–16.
- (24) Pissuwan, D.; Niidome, T. Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods and Their Biomedical Applications. *Nanoscale* **2015**, 7 (1), 59–65.
- (25) Nasti, A.; Zaki, N. M.; De Leonardis, P.; Ungphaiboon, S.; Sansongsak, P.; Rimoli, M. G.; Tirelli, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. *Pharm. Res.* **2009**, 26 (8), 1918–1930.
- (26) Fan, W.; Yan, W.; Xu, Z.; Ni, H. Erythrocytes Load of Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles as a Potential Vascular Drug Delivery System. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, 95, 258–265.
- (27) Huang, Y.; Cai, Y.; Lapitsky, Y. Factors Affecting the Stability of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogels: Resolving the Opposing Findings. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 5957–5970.
- (28) Boisseau, P.; Loubaton, B. Nanomedicine, Nanotechnology in Medicine. *Comptes Rendus Phys.* **2011**, 12 (7), 620–636.

- (29) Freitas, R. A. What Is Nanomedicine? *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2005**, *1* (1), 2–9.
- (30) Wegner, K. D.; Hildebrandt, N. Quantum Dots: Bright and Versatile in Vitro and *In vivo* Fluorescence Imaging Biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4792–4834.
- (31) Ghazanfari, M. R.; Kashefi, M.; Shams, S. F.; Jaafari, M. R.; Ghazanfari, M. R.; Kashefi, M.; Shams, S. F.; Jaafari, M. R. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochem. Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–32.
- (32) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (5), 1310–1316.
- (33) Louis, C.; Pluchery, O. *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology*; 2012.
- (34) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (48), 4880–4910.
- (35) Garcia, M. A. Surface Plasmons in Metallic Nanoparticles: Fundamentals and Applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2011**, *44*, 283001.
- (36) Link, S.-S.; El-Sayed, M. A. *Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals*; 2000; Vol. 19.
- (37) Johnson, P. B.; Christy, R. W. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B* **1972**, *6* (12), 4370–4379.
- (38) Guan, Y.; Xue, Z.; Liang, J.; Huang, Z.; Yang, W. One-Pot Synthesis of Size-Tunable Hollow Gold Nanoshells via APTES-in-Water Suspension. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *502*, 6–12.
- (39) Navarro, J. R. G.; Manchon, D.; Lerouge, F.; Blanchard, N. P.; Marotte, S.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Chaput, F.; Micouin, G.; Gabudean, A.-M.; et al. Synthesis of PEGylated Gold Nanostars and Bipyramids for Intracellular Uptake. *Nanotechnology* **2012**, *23* (46), 465602.

- (40) Skrabalak, S. E.; Chen, J.; Sun, Y.; Lu, X.; Au, L.; Cobley, C. M.; Xia, Y. Gold Nanocages: Synthesis, Properties, and Applications. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1587–1595.
- (41) Loo, C; Lin, A; Hirsch, L; Lee, Mh; Barton, J; Halas, N; West, J and Drezek, R. “Nanoshell- Enabled Photonics-Based Imaging and Therapy of Cancer.” *Technol. Cancer Res. Treat.* **2004**, *3* (1), 33–40.
- (42) Sharma, V.; Park, K.; Srinivasarao, M. Shape Separation of Gold Nanorods Using Centrifugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (13), 4981–4985.
- (43) Cole, J. R.; Mirin, N. A.; Knight, M. W.; Goodrich, G. P.; Halas, N. J. Photothermal Efficiencies of Nanoshells and Nanorods for Clinical Therapeutic Applications. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (28), 12090–12094.
- (44) Abadeer, N. S.; Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (9), 4691–4716.
- (45) Papavassiliou, G. C. Optical Properties of Small Inorganic and Organic Metal Particles. *Prog. Solid State Chem.* **1979**, *12* (3–4), 185–271.
- (46) Weissleder, R. A Clearer Vision for *In vivo* Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317.
- (47) Frangioni, J. V. *In vivo* near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (5), 626–634.
- (48) Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V. Gold Nanorod-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors: A Review. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *195*, 332–351.
- (49) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17–18 SPEC. ISS.), 1870–1901.
- (50) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (18), 1389–1393.

- (51) Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. A.; Murphy, C. J.; Mann, S. Growth and Form of Gold Nanorods Prepared by Seed-Mediated, Surfactant-Directed Synthesis. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12* (6), 1765–1770.
- (52) Park, K.; Drummy, L. F.; Wadams, R. C.; Koerner, H.; Nepal, D.; Fabris, L.; Vaia, R. A. Growth Mechanism of Gold Nanorods. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (4), 555–563.
- (53) Bullen, C.; Zijlstra, P.; Bakker, E.; Gu, M.; Raston, C. Chemical Kinetics of Gold Nanorod Growth in Aqueous CTAB Solutions. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (8), 3375–3380.
- (54) Alekseeva, A. V.; Bogatyrev, V. a.; Dykman, L. a.; Khlebtsov, B. N.; Trachuk, L. a.; Melnikov, A. G.; Khlebtsov, N. G. Preparation and Optical Scattering Characterization of Gold Nanorods and Their Application to a Dot-Immunogold Assay. *Appl. Opt.* **2005**, *44* (29), 6285–6295.
- (55) Keul, H. A.; Möller, M.; Bockstaller, M. R. Structural Evolution of Gold Nanorods during Controlled Secondary Growth. *Langmuir* **2007**, *23* (20), 10307–10315.
- (56) Wang, Y.; Li, B.; Vdovic, S.; Wang, X.; Xia, A. Kinetic Simulation of Gold Nanorod Growth in Solution Based on Optical Spectra. *Chinese J. Chem. Phys.* **2012**, *25* (2), 135–141.
- (57) Edgar, J. A.; Mcdonagh, A. M.; Cortie, M. B. Supporting Information : Formation of Gold Nanorods by a Stochastic “ Popcorn ” Mechanism. **2012**, No. 2, 1–8.
- (58) Jana, N. R. Gram-Scale Synthesis of Soluble, near-Monodisperse Gold Nanorods and Other Anisotropic Nanoparticles. *Small* **2005**, *1* (8–9), 875–882.
- (59) Aswal, V. K.; Goyal, P. S.; Amenitsch, H.; Bernstorff, S. Counterion Condensation in Ionic Micelles as Studied by a Combined Use of SANS and SAXS. *Pramana - J. Phys.* **2004**, *63* (2), 333–338.
- (60) Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857–13870.

- (61) Garg, N.; Scholl, C.; Mohanty, A.; Jin, R. The Role of Bromide Ions in Seeding Growth of Au Nanorods. *Langmuir* **2010**, *26* (12), 10271–10276.
- (62) Almora-Barrios, N.; Novell-Leruth, G.; Whiting, P.; Liz-Marzán, L. M.; López, N. Theoretical Description of the Role of Halides, Silver, and Surfactants on the Structure of Gold Nanorods. *Nano Lett.* **2014**, *14* (2), 871–875.
- (63) Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. A. Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9518–9524.
- (64) Meena, S. K.; Sulpizi, M. Understanding the Microscopic Origin of Gold Nanoparticle Anisotropic Growth from Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2013**, *29* (48), 14954–14961.
- (65) Meena, S.; Celiksoy, S.; Schäfer, P.; Henkel, A.; Sönnichsen, C.; Sulpizi, M. The Role of Halide Ions in the Anisotropic Growth of Gold Nanoparticles: A Microscopic, Atomistic Perspective. *Phys Chem Chem Phys.* **2016**, *18* (19), 13246–13254.
- (66) Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (8), 1250–1261.
- (67) Grzelczak, M.; Perez-Juste, J.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M. Shape Control in Gold Nanoparticle Synthesis. *Chem Soc Rev* **2008**, *37* (9), 1783–1791.
- (68) Niidome, Y.; Nakamura, Y.; Honda, K.; Akiyama, Y.; Nishioka, K.; Kawasaki, H.; Nakashima, N. Characterization of Silver Ions Adsorbed on Gold Nanorods: Surface Analysis by Using Surface-Assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Chem. Commun.* **2009**, 1754–1756.
- (69) Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O. Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Bromide Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods. *Langmuir* **2008**, *24* (17), 9219–9222.
- (70) Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* **2011**, *3* (2), 34–55.
- (71) Wang, Z. Plasmon - Resonant Gold Nanoparticles for Cancer Optical Imaging. *Sci.*

China Physics, Mech. Astron. **2013**, *56* (3), 506–513.

- (72) Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. a. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2115–2120.
- (73) Oyelere, A. K.; Chen, P. C.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Peptide-Conjugated Gold Nanorods for Nuclear Targeting. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (5), 1490–1497.
- (74) Ding, H.; Yong, K.; Roy, I.; Pudavar, H. E.; Law, W. C.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. Gold Nanorods Coated with Multilayer Polyelectrolyte as Contrast Agents For.pdf. **2007**, 12552–12557.
- (75) Yu, C.; Nakshatri, H.; Irudayaraj, J. Identity Profiling of Cell Surface Markers by Multiplex Gold Nanorod Probes. *Nano Lett.* **2007**, *7* (8), 2300–2306.
- (76) Huang, P.; Bao, L.; Zhang, C.; Lin, J.; Luo, T.; Yang, D.; He, M.; Li, Z.; Gao, G.; Gao, B.; et al. Folic Acid-Conjugated Silica-Modified Gold Nanorods for X-ray/CT Imaging-Guided Dual-Mode Radiation and Photo-Thermal Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9796–9809.
- (77) Mooradian, A. Photoluminescence of Metals. *Phys. Rev. Lett.* **1969**, *22* (5), 185–187.
- (78) Wang, H. F.; Huff, T. B.; Zweifel, D. A.; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J. X. In Vitro and *In vivo* Two-Photon Luminescence Imaging of Single Gold Nanorods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (44), 15752–15756.
- (79) Mohamed, M. B.; Volkov, V.; Link, S.; El-Sayed, M. A. The “Lightning” Gold Nanorods: Fluorescence Enhancement of over a Million Compared to the Gold Metal. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *317* (6), 517–523.
- (80) Oheim, M.; Michael, D. J.; Geisbauer, M.; Madsen, D.; Chow, R. H. Principles of Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy and Other Nonlinear Imaging Approaches. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (7), 788–808.
- (81) Piston, D. W. Imaging Living Cells and Tissues by Two-Photon Excitation Microscopy.

Trends Cell Biol. **1999**, 9 (2), 66–69.

- (82) Svoboda, K.; Yasuda, R. Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience. *Neuron* **2006**, 50 (6), 823–839.
- (83) Charan, S.; Sanjiv, K.; Singh, N.; Chien, F. C.; Chen, Y. F.; Nergui, N. N.; Huang, S. H.; Kuo, C. W.; Lee, T. C.; Chen, P. Development of Chitosan Oligosaccharide-Modified Gold Nanorods for *In vivo* Targeted Delivery and Noninvasive Imaging by NIR Irradiation. *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23 (11), 2173–2182.
- (84) Puvanakrishnan, P.; Diagaradjane, P.; Kazmi, S. M. S.; Dunn, A. K.; Krishnan, S.; Tunnell, J. W. Narrow Band Imaging of Squamous Cell Carcinoma Tumors Using Topically Delivered Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanorods. *Lasers Surg. Med.* **2012**, 44 (4), 310–317.
- (85) Li, W.; Chen, X. Gold Nanoparticles for Photoacoustic Imaging. *Nanomedicine (Lond)*. **2015**, 10 (2), 299–320.
- (86) Zhong, J.; Wen, L.; Yang, S.; Xiang, L.; Chen, Q.; Xing, D. Imaging-Guided High-Efficient Photoacoustic Tumor Therapy with Targeting Gold Nanorods. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2015**, 11 (6), 1499–1509.
- (87) Li, P.-C.; Wang, C.-R. C.; Shieh, D.-B.; Wei, C.-W.; Liao, C.-K.; Poe, C.; Jhan, S.; Ding, A.-A.; Wu, Y.-N. *In vivo* Photoacoustic Molecular Imaging with Simultaneous Multiple Selective Targeting Using Antibody-Conjugated Gold Nanorods. *Opt. Express* **2008**, 16 (23), 18605–18615.
- (88) Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M. Hyperthermia - Description of a Method and a Review of Clinical Applications. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **2007**, 12 (5), 267–275.
- (89) Falk, M. H.; Issels, R. D. Hyperthermia in Oncology. *Int. J. Hyperthermia* **2001**, 17 (1), 1–18.
- (90) Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol.*

Hematol. **2002**, *43* (1), 33–56.

- (91) Song, C. W.; Shakil, A.; Osborn, J. L.; Iwata, K. Tumour Oxygenation Is Increased by Hyperthermia at Mild Temperatures. *Int. J. Hyperthermia* **2009**, *25* (2), 91–95.
- (92) Rau, B.; Wust, P.; Tilly, W.; Gellermann, J.; Harder, C.; Riess, H.; Budach, V.; Felix, R.; Schlag, P. M. Preoperative Radiochemotherapy in Locally Advanced or Recurrent Rectal Cancer: Regional Radiofrequency Hyperthermia Correlates with Clinical Parameters. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2000**, *48* (2), 381–391.
- (93) Dickerson, E. B.; Dreaden, E. C.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Chu, H.; Pushpanketh, S.; McDonald, J. F.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorod Assisted near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice. *Cancer Lett.* **2008**, *269* (1), 57–66.
- (94) Choi, J.; Park, Y.; Choi, E. B.; Kim, H.-O.; Kim, D. J.; Hong, Y.; Ryu, S.-H.; Lee, J. H.; Suh, J.-S.; Yang, J.; et al. Aptamer-Conjugated Gold Nanorod for Photothermal Ablation of Epidermal Growth Factor Receptor-Overexpressed Epithelial Cancer. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 51203.
- (95) Heidari, Z.; Salouti, M.; Sariri, R. Breast Cancer Photothermal Therapy Based on Gold Nanorods Targeted by Covalently-Coupled Bombesin Peptide. *Nanotechnology* **2015**, *26* (19), 195101.
- (96) Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y. PEG-Modified Gold Nanorods with a Stealth Character for *In vivo* Applications. *J. Control. Release* **2006**, *114* (3), 343–347.
- (97) Kinnear, C.; Dietsch, H.; Clift, M. J. D.; Endes, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Gold Nanorods: Controlling Their Surface Chemistry and Complete Detoxification by a Two-Step Place Exchange. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (7), 1934–1938.
- (98) Zhang, Z.; Lin, M. Fast Loading of PEG–SH on CTAB-Protected Gold Nanorods. *RSC Adv.* **2014**, *4* (34), 17760–17767.
- (99) Gorelikov, I.; Matsuura, N. Single-Step Coating of Mesoporous Silica on

- Cetyltrimethyl Ammonium Bromide-Capped Nanoparticles. *Nano Lett.* **2008**, 8 (1), 369–373.
- (100) Wu, W. C.; Tracy, J. B. Large-Scale Silica Overcoating of Gold Nanorods with Tunable Shell Thicknesses. *Chem. Mater.* **2015**, 27 (8), 2888–2894.
- (101) Wang, C. H.; Chang, C. W.; Peng, C. A. Gold Nanorod Stabilized by Thiolated Chitosan as Photothermal Absorber for Cancer Cell Treatment. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, 13 (7), 2749–2758.
- (102) Yang, Z.; Liu, T.; Xie, Y.; Sun, Z.; Liu, H.; Lin, J.; Liu, C.; Mao, Z. W.; Nie, S. Chitosan Layered Gold Nanorods as Synergistic Therapeutics for Photothermal Ablation and Gene Silencing in Triple-Negative Breast Cancer. *Acta Biomater.* **2015**, 25, 194–204.
- (103) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31 (7), 603–632.
- (104) Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.* **2013**, 49 (4), 780–792.
- (105) Arias, J. L.; Reddy, L. H.; Couvreur, P. Fe₃O₄/chitosan Nanocomposite for Magnetic Drug Targeting to Cancer. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 7622.
- (106) Draget, K.; Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. Alginates from Algae. *Polysaccharides Polyamides Food Ind. Prop. Prod. Patents.* **2005**, 1–30.
- (107) Paques, J. P.; Van Der Linden, E.; Van Rijn, C. J. M.; Sagis, L. M. C. Preparation Methods of Alginate Nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, 209, 163–171.
- (108) Venkatesan, J.; Anil, S.; Kim, S.-K.; Shim, M. Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery. *Polymers (Basel).* **2016**, 8 (2), 30.
- (109) Sonavane, G.; Tomoda, K.; Makino, K. Biodistribution of Colloidal Gold Nanoparticles after Intravenous Administration: Effect of Particle Size. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, 66 (2), 274–280.

- (110) Dey, S.; Sherly, M. C. D.; Rekha, M. R.; Sreenivasan, K. Alginate Stabilized Gold Nanoparticle as Multidrug Carrier: Evaluation of Cellular Interactions and Hemolytic Potential. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 71–80.
- (111) Hassan, C. M.; Peppas, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In *Biopolymers {·} PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2000; pp 37–65.
- (112) Muppalaneni, S. Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. *J. Dev. Drugs* **2013**, *2* (3), 1–5.
- (113) Halayqa, M.; Domańska, U. PLGA Biodegradable Nanoparticles Containing Perphenazine or Chlorpromazine Hydrochloride: Effect of Formulation and Release. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (12), 23909–23923.
- (114) Goel, A. Effect of PVP, PVA and POLE Surfactants on the Size of Iridium Nanoparticles. *Open J. Inorg. Chem.* **2012**, *2* (July), 67–73.
- (115) Khanna, P. K.; Gokhale, R.; Subbarao, V. V. V. S.; Vishwanath, A. K.; Das, B. K.; Satyanarayana, C. V. V. PVA Stabilized Gold Nanoparticles by Use of Unexplored Albeit Conventional Reducing Agent. *Mater. Chem. Phys.* **2005**, *92* (1), 229–233.
- (116) Alkilany, A. M.; Bani Yaseen, A. I.; Kailani, M. H. Synthesis of Monodispersed Gold Nanoparticles with Exceptional Colloidal Stability with Grafted Polyethylene Glycol-G-Polyvinyl Alcohol. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*.
- (117) Kinnear, C.; Burn, D.; Clift, M. J. D.; Kilbinger, A. F. M.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Polyvinyl Alcohol as a Biocompatible Alternative for the Passivation of Gold Nanorods. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (46), 12613–12617.
- (118) Zhu, X.; Su, M.; Tang, S.; Wang, L.; Liang, X.; Meng, F.; Hong, Y.; Xu, Z. Synthesis of Thiolated Chitosan and Preparation Nanoparticles with Sodium Alginate for Ocular Drug Delivery. *Mol. Vis.* **2012**, *18* (April), 1973–1982.
- (119) Roper, D. K.; Ahn, W.; Hoepfner, M. Microscale Heat Transfer Transduced by Surface

- Plasmon Resonant Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (9), 3636–3641.
- (120) Goia, D. V.; Matijević, E. Tailoring the Particle Size of Monodispersed Colloidal Gold. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *146* (1–3), 139–152.
- (121) Lee, K. S.; El-Sayed, M. A. Dependence of the Enhanced Optical Scattering Efficiency Relative to that of Absorption for Gold Metal Nanorods on Aspect Ratio, Size, End-Cap Shape, and Medium Refractive Index. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (43), 20331–20338.
- (122) Burrows, N. D.; Lin, W.; Hinman, J. G.; Dennison, J. M.; Vartanian, A. M.; Abadeer, N. S.; Grzincic, E. M.; Jacob, L. M.; Li, J.; Murphy, C. J. Surface Chemistry of Gold Nanorods. *Langmuir* **2016**, *32* (39), 9905–9921.
- (123) Nie, Z.; Fava, D.; Kumacheva, E.; Zou, S.; Walker, G. C.; Rubinstein, M. Self-Assembly of Metal-Polymer Analogues of Amphiphilic Triblock Copolymers. *Nat. Mater.* **2007**, *6* (8), 609–614.
- (124) Sethi, M.; Joung, G.; Knecht, M. R. Linear Assembly of Au Nanorods Using Biomimetic Ligands. *Langmuir* **2009**, *25* (3), 1572–1581.
- (125) Wang, L.; Zhu, Y.; Xu, L.; Chen, W.; Kuang, H.; Liu, L.; Agarwal, A.; Xu, C.; Kotov, N. A. Side-by-Side and End-to-End Gold Nanorod Assemblies for Environmental Toxin Sensing. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (32), 5472–5475.
- (126) Lee, A.; Ahmed, A.; Santos, D. P.; Coombs, N.; Park, J. II; Gordon, R.; Brolo, A. G.; Kumacheva, E. Side-by-Side Assembly of Gold Nanorods Reduces Ensemble-Averaged SERS Intensity. *Scanning* **2012**.
- (127) Adura, C.; Guerrero, S.; Salas, E.; Medel, L.; Riveros, A.; Mena, J.; Arbiol, J.; Albericio, F.; Giralt, E.; Kogan, M. J. Stable Conjugates of Peptides with Gold Nanorods for Biomedical Applications with Reduced Effects on Cell Viability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 4076–4085.
- (128) Gittins, D. I.; Caruso, F. Tailoring the Polyelectrolyte Coating of Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (29), 6846–6852.
- (129) Salgueiriño-Maceira, V. Luis L.-M. Coated Colloids with Tailored Optical Properties. *J.*

Phys. ... **2003**, *107*, 10990–10994.

- (130) Mayya, K. S.; Schoeler, B.; Caruso, F. Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13* (3), 183–188.
- (131) Gole, A.; Murphy, C. J. Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (6), 1325–1330.
- (132) Choi, B.-S.; Iqbal, M.; Lee, T.; Kim, Y. H.; Tae, G. Removal of Cetyltrimethylammonium Bromide to Enhance the Biocompatibility of Au Nanorods Synthesized by a Modified Seed Mediated Growth Process. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2008**, *8*, 4670–4674.
- (133) Shokuhfar, a; Afghahi, S. S. S. The Heating Effect of Iron-Cobalt Magnetic Nanofluids in an Alternating Magnetic Field: Application in Magnetic Hyperthermia Treatment. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 1–25.
- (134) Jin, L.; Bai, R. Mechanisms of Lead Adsorption on chitosan/PVA Hydrogel Beads. *Langmuir* **2002**, *18* (25), 9765–9770.
- (135) Almada, M.; Burboa, M. G.; Robles, E.; Gutiérrez, L. E.; Valdés, M. A.; Juárez, J. Interaction and Cytotoxic Effects of Hydrophobized Chitosan Nanoparticles on MDA-MB-231, HeLa and Arpe-19 Cell Lines. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 692–701.
- (136) Le Tien, C.; Lacroix, M.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M. A. N-Acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release. *J. Control. Release* **2003**, *93* (1), 1–13.
- (137) Mansur, H. S.; Sadahira, C. M.; Souza, A. N.; Mansur, A. A. P. FTIR Spectroscopy Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel with Different Hydrolysis Degree and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28* (4), 539–548.
- (138) Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2533–2541.

- (139) Harnsilawat, T.; Pongsawatmanit, R.; McClements, D. J. Characterization of Beta-Lactoglobulin-Sodium Alginate Interactions in Aqueous Solutions: A Calorimetry, Light Scattering, Electrophoretic Mobility and Solubility Study. *Food Hydrocoll.* **2006**, *20* (5), 577–585.
- (140) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248.
- (141) Chen, H.; Shao, L.; Ming, T.; Sun, Z.; Zhao, C.; Yang, B.; Wang, J. Understanding the Photothermal Conversion Efficiency of Gold Nanocrystals. *Small* **2010**, *6* (20), 2272–2280.
- (142) Jiang, K.; Smith, D. A.; Pinchuk, A. Size-Dependent Photothermal Conversion Efficiencies of Plasmonically Heated Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (51), 27073–27080.
- (143) Mackey, M. A.; Ali, M. R. K.; Austin, L. A.; Near, R. D.; El-sayed, M. A. The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy : Theory and In Vitro Experiments The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy : Theory and In Vitro Experiments. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1319–1326.
- (144) George, M.; Abraham, T. E. Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan - a Review. *J. Control. Release* **2006**, *114* (1), 1–14.
- (145) Rafiee, A.; Alimohammadian, M. H.; Gazori, T.; Riazi-rad, F.; Fatemi, S. M. R.; Parizadeh, A.; Haririan, I.; Havaskary, M. Comparison of Chitosan, Alginate and Chitosan/alginate Nanoparticles with Respect to Their Size, Stability, Toxicity and Transfection. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2014**, *4* (5), 372–377.
- (146) Baker, M. I.; Walsh, S. P.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. A Review of Polyvinyl Alcohol and Its Uses in Cartilage and Orthopedic Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2012**, *100 B* (5), 1451–1457.

- (147) Harmon, B. V.; Corder, A. M.; Collins, R. J.; Gobé, G. C.; Allen, J.; Allan, D. J.; Kerr, J. F. R. Cell Death Induced in a Murine Mastocytoma by 42–47°C Heating in Vitro: Evidence That the Form of Death Changes from Apoptosis to Necrosis Above a Critical Heat Load. *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, *58* (5), 845–858.
- (148) Khan, V. R.; Brown, I. R. The Effect of Hyperthermia on the Induction of Cell Death in Brain, Testis, and Thymus of the Adult and Developing Rat. *Cell Stress Chaperones* **2002**, *7* (1), 73–90.
- (149) Narita, K.; Hanakawa, K.; Kasahara, T.; Hisamitsu, T.; Asano, K. Induction of Apoptotic Cell Death in Human Leukemic Cell Line, HL-60, by Extremely Low Frequency Electric Magnetic Fields: Analysis of the Possible Mechanisms in Vitro. *In vivo (Brooklyn)*. **1997**, *11* (4), 329–335.