

**FOTOACTIVACIÓN CON INFRARROJO CERCANO DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO**

LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

**FOTOACTIVACIÓN CON INFRARROJO CERCANO DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO**

LINDA ESPERANZA BERTEL GARAY

**Proyecto de Grado en modalidad de Trabajo de Investigación como requisito
parcial para optar al título de Química**

Director

FERNANDO MARTÍNEZ ORTEGA

Químico, Docteur en Chimie. Profesor Titular Laureado, Escuela de Química.

Co-director

JOHN JAIRO CASTILLO LEON

Químico, Candidato a doctor en Química.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres:

Rocio Garay y Julio Bertel.

*...”El amor es paciente, es bondadoso; el amor no tiene envidia; el amor no es jactancioso, no es arrogante; no se porta indecorosamente; no busca lo suyo, no se irrita, no toma en cuenta el mal recibido; no se regocija de la injusticia, sino que se alegra con la verdad; todo lo sufre, todo lo cree, todo lo espera, todo lo soporta”
(1 Corintios 13: 4-8).*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente gracias a Dios, ya que el hizo posible todo lo que soy y todo lo que he logrado.

Gracias a mi grupo de investigación, CICAT del cual obtuve herramientas valiosas para el desarrollo de la investigación. Muchas gracias profesor Fernando, por su guía paciente pero a la vez esmerada. Gracias John, por haberme guiado en mis inicios dentro del laboratorio y por trabajar conmigo.

Gracias al centro de Instrumentación química de la Universidad industrial de Santander por facilitarme el uso de sus instalaciones. Gracias Mónica y Alejandro por su hermosa paciencia y disposición para colaborar. Igualmente, gracias al laboratorio de Microscopía UIS-Guatiguará por el uso del SEM.

Sin lugar a dudas los agradecimientos más grandes son para mis padres, Julio y Rocio, ya que fueron ellos quienes creyeron en mis capacidades para estudiar esta carrera. Gracias a mis hermanos, Julio Cesar y Danny, su amor y confianza alimentaron mis ánimos para trabajar.

Gracias a mis amigos incondicionales que pusieron todo de su parte en entender el mundo químico en el que me desenvuelvo. Gracias Jota, Jesu, María Farides y María Fernanda por su preocupación e interés.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. JUSTIFICACIÓN	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 OJETIVO GENERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MARCO TEÓRICO	27
3.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO	27
3.1.1 Banda de plasmones de superficie.	28
3.1.2 Métodos de síntesis y multifuncionalidad.	30
3.1.3 Técnicas de caracterización.	33
3.1.3.1 Espectroscopia de absorción en el Ultravioleta-Visible.	33
3.1.3.2 Espectroscopia de Fluorescencia.	33
3.1.3.3 Microscopía de transmisión electrónica.	34

3.1.3.4 Microscopía electrónica de barrido.	35
3.1.3.5 Microscopía de fuerza atómica.	36
3.2 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS	36
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	40
4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	40
4.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro esféricas.	40
4.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro por un método fotoquímico.	40
4.1.3 Síntesis de nanobarras de oro.	41
4.1.4 Caracterización de los tres tipos de nanopartículas de oro preparadas.	42
4.2 FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	44
4.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.	44
4.2.2 Síntesis de nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico.	46
4.2.3 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico esféricas y en forma de barras.	47
4.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA LA FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO-ÁCIDO FÓLICO	47

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1 ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	49
5.1.1 Nanopartículas de oro esféricas.	49
5.1.1.1 Caracterización de las nanopartículas de oro esféricas.	49
5.1.1.2 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro esféricas.	51
5.1.2 Nanopartículas de oro obtenidas por un método fotoquímico.	53
5.1.2.1 Caracterización de las nanopartículas de oro.	53
5.1.2.2 Determinación del tamaño de las nanopartículas de oro.	55
5.1.3 Nanobarras de oro.	55
5.1.3.1 Caracterización de las nanobarras de oro.	55
5.1.3.2 Determinación del tamaño y concentración de las nanobarras de oro.	57
5.2 ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO	58
5.2.1 Nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.	58
5.2.1.1 Caracterización de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.	58
5.2.1.2 Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico sintetizadas por el método fotoquímico.	62

5.2.1.3 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.	64
5.2.2 Nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico.	66
5.2.2.1 Caracterización de las nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico.	66
5.2.2.2 Determinación del tamaño y concentración de los ensambles de nanobarras de oro con el ácido fólico.	69
5.2.3 Estudio de la emisión de fluorescencia de nanopartículas de oro esféricas y barras funcionalizadas con ácido fólico.	70
5.3 ESTUDIO DE LA FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO	74
6. CONCLUSIONES	78
7. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXOS	87

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tamaño y concentración de las AuNPs en solución calculados por las ecuaciones de Wolfgang Haiss <i>et al.</i>	51
Tabla 2. Diámetro y concentración de las AuNPs en solución.	53
Tabla 3. Valores R para AuNRs sintetizadas en diferentes trabajos.	57
Tabla 4. Tamaño y potencial Z de la solución de AuNRs..	58
Tabla 5. Potencial Z de la solución de AuNP-AF a diferentes días después de la síntesis.	63
Tabla 6. Diámetro de las AuNP-AF (medido por DLS) a diferentes días después de la síntesis.	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de la interacción de una AuNP con la luz. El campo electromagnético (EM) de la luz induce una oscilación coherente dipolar de los electrones de conducción a través de la NP.	29
Figura 2. A) Espectro de absorción de UV-Vis típico de Nanobarras. B) Esquema de la interacción de una Nanobarra de Au con la luz, a la izquierda se muestra el dipolo transversal y a la derecha el longitudinal. .	30
Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia de: (a) AuNPs no funcionalizadas y (b-d) AuNPs funcionalizadas con trifenilfosfina, ácido 3-mercaptopropionico relación molar MEA/AuNP=1:1 y ácido 3-mercaptopropionico relación molar MEA/AuNP=100:1 respectivamente	34
Figura 4. Equipo usado para la síntesis fotoquímica de AuNP estabilizadas por citrato. (A) micro reactor, (B) baño termostatado y (C) producto de AuNP estabilizadas con citrato.	41
Figura 5. Procedimiento experimental. (A) Solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. (B) adición de la solución de AF con agitación durante 1h. (C) fin de la adición de la solución de AF. (D) Ajuste del pH. Y (E) Calentamiento de la mezcla de reacción.	45
Figura 6. Fotografías tomadas durante la síntesis de AuNP-AF por el método fotoquímico.	46
Figura 7. Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AuNRs. (A) Sensor de temperatura, (B) solución de AuNR, (C) láser IRC (808nm), (D) y (E) reguladores de temperatura y potencia respectivamente.	48

Figura 8. Espectros de absorción UV-Vis de las soluciones de AuNP estabilizadas con soluciones 38,8mM citrato.	49
Figura 9. Patrón de machas obtenido en la pantalla para miles de partículas.	52
Figura 10. Espectros de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNPs obtenidas por el MFQ al cabo de 4 y 40 min de irradiación UV.	54
Figura 11. Espectros de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNR703 (en rojo) y AuNR832 (en negro).	56
Figura 12. Esquema de la bicapa de CTAB cargada positivamente que rodea y estabiliza a las AuNRs.	56
Figura 13. Espectro de absorción en el UV-Vis de la solución de AuNP-AF obtenida por el método químico. En el interior: fotografía de la solución de AuNP-AF.	59
Figura 14. Espectro de absorción en el UV-Vis de la solución de AuNP-AF obtenida por el MFQ. En el interior: la curva de calibración del AF, con su respectiva ecuación, usada para estimar la cantidad de ácido fólico.	60
Figura 15. Estructura química del AF.	62
Figura 16. Espectros IR del AF y del precipitado de AuNP.	62
Figura 17. Imágenes SEM de la solución de AuNP-AF al primer día (A) y al día 40 de su síntesis.	66
Figura 18. Espectro de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNR703 (en rojo) y AuNR703-AF (en negro).	67
Figura 19. Nanobarras cubiertas de CTAB son ensambladas lado a lado usando AF.	68
Figura 20. Imágenes TEM de ensamblajes extremo a extremo de AuNRs.	69

Figura 21. Espectros de fluorescencia observados para los dos sistemas. Arriba, el sistema AuNP-AF junto con el modelo de la partícula funcionalizada que modifica la intensidad del espectro. Abajo, el sistema AuNR-AF con su modelo de partícula, para interpretar el efecto de apagamiento del EF por la presencia del AF.

72

Figura 22. Diagrama típico de Jablonski y la interacción con una AuNR.

73

Figura 23. Calentamiento de: una solución de AuNR703-AF y agua como control, en presencia de radiación IRC con diferentes potencias de emisión. Para una concentración de $4,11 \times 10^{11}$ NR/mL.

74

Figura 24. Calentamiento de las soluciones AuNR703-AF con diferentes concentraciones al irradiarse con un laser de 808 nm (IRC) durante 10 min con una potencia de 800 mW.

75

Figura 25. Calentamiento de las soluciones AuNR832-AF con diferentes concentraciones al irradiarse con un laser de 808 nm (IRC) durante 10 min con una potencia de 800 mW.

76

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Imagen SEM de las AuNR832.	87
Anexo B. Imágenes SEM de los ensambles AuNR703-AF.	88
Anexo C. Certificados de participación en eventos.	90

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AF. Ácido Fólico.

AFM. (*Atomic force microscopy*) Microscopía de fuerza atómica.

APS. Absorción de Plasmones de Superficie.

ADN. Ácido Desoxirribonucleico.

ARN. Ácido Ribonucleico.

AuNP. Nanopartícula de Oro.

AuNP-FA. Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido Fólico.

AuNP-GSH. Nanopartícula de Oro cubiertas con Glutati6n.

AuNP-GSH-AF. Nanopartícula de Oro funcionalizada con Ácido Fólico usando Glutati6n.

AuNR. (*Gold nanorod*) Nanobarra de Oro.

AuNR-AF. Nanobarra de Oro funcionalizada con Ácido Fólico.

AuNR703. Nanobarra de Oro con una banda APS longitudinal en 703nm.

AuNR703-AF. AuNR703 funcionalizada con Ácido Fólico.

AuNR832. Nanobarra de Oro con una banda APS longitudinal en 832nm.

AuNR832-AF. AuNR832 funcionalizada con Ácido Fólico.

CICAT. Centro de Investigaci6n en Cat6lisis.

CINTROP. Centro de Investigaci6n en Enfermedades Tropicales.

CTAB. (*cetyltrimethylammonium bromide*) Bromuro de cetiltrimetilamonio.

DLS. (*Dynamic Light Scattering*) Dispersión dinámica de la luz.

EF. Emisión de fluorescencia.

EGFR. (*Epidermal Growth Factor Receptor*) Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal.

EM. Electromagnético (a).

GSH. (*Glutathione*) Glutati6n

IR. Infrarrojo.

IRC. Infrarrojo Cercano.

MFQ. M6todo Fotoqu6mico.

MQ. M6todo Qu6mico.

m.s.n.m. Metros sobre el nivel del mar.

NP. Nanopart6cula.

NR. (*Nanorod*) Nanobarra.

PCS. (*Photon Correlation Spectroscopy*) Espectroscopia de Correlaci6n de Fotones.

RF. Radiofrecuencia.

SEM. (*Scanning Electron Microscopy*) Microscop6a electr6nica de barrido.

TEM. (*Transmission Electron Microscopy*) Microscop6a de Transmisi6n Electr6nica.

UV-Vis. Ultravioleta Visible.

GLOSARIO

Citotoxicidad. Es la cualidad de ser tóxico para las células.

Coloide. Sistema fisicoquímico formado por dos o más componentes, principalmente: hay una fase continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas; por lo general sólidas. La fase dispersa es la que se halla en menor proporción.

Constante dieléctrica. La constante dieléctrica es la propiedad que describe el comportamiento de un dieléctrico en un campo eléctrico y permite explicar, tanto el aumento de la capacidad de un condensador como el índice de refracción de un material transparente.

Fototermicidad. Generación de calor por parte de la nanopartícula al ser sometida a una radiación electromagnética específica.

Funcionalización. Procedimiento de síntesis en el cual se une una molécula específica a la superficie de la nanopartícula para un determinado propósito.

Hipertermia. Elevación de la temperatura por encima de los valores normales.

Lisis. Destrucción de una célula por rotura de la membrana celular.

Nanopartículas. Son una dispersión de una fase sólida en otra fase continua como por ejemplo, agua, con una variación en el tamaño de entre 1-100 nm.

Oscilación. Variación, perturbación o fluctuación en el tiempo de un medio o sistema.

Plasmón. Puede referirse a la cuasipartícula, plasmón, el cual es un cuanto de las oscilaciones del plasma. O también puede referirse al fenómeno de absorción de plasmones de superficie, en el cual la radiación electromagnética entra en resonancia con la oscilación de los electrones de conducción de la nanopartícula metálica, generando una fuerte absorción.

Resonancia. Fenómeno que se produce cuando un cuerpo capaz de vibrar es sometido a la acción de una fuerza periódica, cuyo periodo de vibración coincide con el periodo de vibración característico de dicho cuerpo.

RESUMEN

TÍTULO: FOTOACTIVACIÓN CON INFRARROJO CERCANO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO.*

Autor: Linda Esperanza Bertel Garay.**

Palabras claves: Nanopartículas de oro, absorción de plasmones de superficie, funcionalización, fotoactivación.

Esta investigación describe la preparación de nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico (AuNP-AF) y su posterior fotoactivación con luz del infrarrojo cercano (IRC). Las nanopartículas de oro (AuNP) se obtuvieron por diferentes metodologías, las cuales permitieron controlar su forma y tamaño. La caracterización de las AuNP se llevó a cabo por medio de técnicas espectroscópicas (espectroscopias ultravioleta-visible, infrarroja y de fluorescencia), dispersión dinámica de la luz y microscopía electrónica de barrido. Luego de la obtención de las AuNP-AF con las propiedades requeridas de forma y tamaño, estas se sometieron a radiación IRC.

Para la preparación de las AuNPs se usaron dos métodos reportados en la literatura: el método de reducción de ácido cloroaurico por medio de citrato de sodio para producir AuNP esféricas, y la síntesis de nanobarras de oro (AuNR) usando el molde hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Para la funcionalización de las AuNP con el AF se utilizó la síntesis de AuNP en un solo paso. Sin embargo tras el estudio de las condiciones óptimas de síntesis de estos nanomateriales, se realizaron dos novedosas metodologías fotoquímicas para preparar: AuNP no esféricas estabilizadas con citrato y AuNP-AF esféricas, también se realizó un procedimiento para obtener AuNR funcionalizadas con AF (AuNR-AF) partiendo de una solución de AuNRs previamente preparada usando CTAB.

Se obtuvieron AuNR-AF (ancho 20,1 nm; largo 51,1 nm) con la banda de plasmones longitudinal en 832 nm, las cuales lograron un aumento de temperatura de 17,8°C al ser irradiadas con IRC durante 10min. Este resultado es importante en el ámbito de la biomedicina ya que permite proponer a las AuNR-AF como potenciales agentes para producir hipertermia en células infectadas con leishmaniasis.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Fernando Martínez. Codirector John Castillo León.

ABSTRACT

TITLE: PHOTOACTIVATION BY NEAR INFRARED OF GOLD NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED WITH FOLIC ACID*

AUTHOR: Linda Esperanza Bertel Garay**

KEYWORDS: Gold nanoparticle, surface plasmon absorption, functionalization, photoactivation.

This research describes the preparation of gold nanoparticles functionalized with Folic Acid (AuNP-AF) and its photoactivation by near infrared light. The gold nanoparticles (AuNPs) were produced by different methodologies which allowed controlling its shape and size. The characterization of AuNPs was carried out by means of: spectroscopic techniques (Ultraviolet-visible, infrared and fluorescence spectroscopies), Dynamic Light Scattering and Scanning Electron Microscopy. After obtaining the AuNPs with the shape, size and properties required, then they were subjected to radiation exposure.

Two methods reported in the literature were implemented to prepare the AuNPs: the gold nanoparticles were prepared by reducing chloroauric acid with sodium citrate in order to produce spherical AuNPs and synthesize gold nanorods (AuNR) by using the mold of hexadecyltrimethylammonium (CTAB). The one-step synthesis of AuNPs was used to functionalize the AuNPs with folic acid. However, the study of optimal conditions of the synthesis of these nanomaterials, were performed two photochemical methods to prepare: non spherical AuNPs stabilized by sodium citrate and spherical AuNP-AF. It also a method was performed for producing AuNR functionalized with folic acid prepared from previously prepared AuNR solution by using CTAB.

AuNR-AF were obtained (width 20,1 nm, length 51,1 nm) with a longitudinal band of surface plasmons of 832 nm, which achieved a temperature increase of 17.8 ° C when were irradiated under near infrared light during 10 min. This result is important in the field of biomedicine because AuNR-AF particles are proposed as potential agents to induce hyperthermia in cells infected with leishmaniasis.

* Undergraduate proyect

**Science Faculty. Chemistry School. Director Fernando Martínez Ortega. Codirector John Castillo León.

INTRODUCCIÓN

La investigación en nanotecnología se centra en la búsqueda de nuevas aplicaciones de los nanomateriales obtenidos, aprovechando las propiedades particulares que presenta este tipo de material comprendido entre 1 y 100nm.

En el presente trabajo de grado se propuso la preparación de nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con ácido fólico (AF) para generar un efecto de calentamiento térmico al ser irradiadas con infrarrojo cercano (IRC). La funcionalización consiste en la unión estratégica de una molécula de AF a la nanopartícula (NP) y tiene como fin permitir la internalización selectiva en las células que expresen receptores de folato, tal como algunas células cancerígenas y/o células infectadas con *Leishmania spp* por ejemplo. Una vez se logró la funcionalización, se evaluaron algunos parámetros relacionados con la irradiación de las soluciones de AuNP-AF para medir el efecto de calentamiento de la solución que contiene el sistema AuNP-AF.

La generación del efecto térmico local permite proponer el uso de este compuesto para la destrucción selectiva de células infectadas con el parásito, *Leishmania spp*, la cual se propone como una alternativa terapéutica para combatir esta enfermedad, específicamente para la leishmaniasis cutánea, principal cuadro clínico de leishmaniasis presente en la gran mayoría de los departamentos de Colombia [1].

Las AuNPs han sido ampliamente utilizadas en investigaciones para el diagnóstico [2, 3] y tratamiento del cáncer. Se han empleado radiaciones, como el infrarrojo cercano (IRC) [4] y de radiofrecuencia (RF) [5].

En el presente trabajo de investigación se buscó inicialmente controlar el tamaño y la forma de las AuNPs libres y funcionalizadas con AF (AuNP-AF), ensayando algunos métodos de síntesis que permitieran obtener AuNPs capaces de producir un aumento de la temperatura (al interactuar con IRC) y que además tuvieran un tamaño entre: 1-100nm, de tal forma que sea posible su ingreso a las células para posibles aplicaciones biomédicas. Finalmente, se determinaron las condiciones de irradiación que condujeron a un aumento en la temperatura de la solución de AuNP-AF, como ensayo previo a los experimentos que se realizarán directamente en las células por miembros del CINTROP.

1. JUSTIFICACIÓN

El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en siete países (Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria), mientras que el 90% de los casos de leishmaniasis visceral ocurren en áreas rurales y suburbanas de cinco países (Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil). Por otro lado, en Colombia, la leishmaniasis se presenta en forma endémica (para los tres tipos de leishmaniasis: visceral, cutánea y nasal) y afecta al 91% del territorio ubicado por debajo los 1750 m.s.n.m [6]. Lo anterior incentiva la investigación de tratamientos alternos y selectivos para combatir la leishmaniasis. En este sentido la evaluación de AuNPs como una alternativa podría permitir avanzar en el desarrollo de nuevas terapias contra la leishmaniasis, y el presente trabajo está relacionado con la preparación controlada de NPs funcionalizadas con el ácido fólico como paso previo a los estudios *in vitro* requeridos para evaluar su efecto tóxico.

El estudio realizado en torno a la funcionalización de las AuNPs con AF, representa un valioso aporte a la comunidad científica nacional e internacional debido a que proporcionará los métodos de síntesis necesarios para controlar el tamaño y la forma de las AuNP-AF. Estos procedimientos de preparación permitirán que el conjugado AuNP-AF se use en medios biológicos para generar un efecto térmico focalizado al permitir la interacción NP-radiación en el interior de la célula. El AF fue escogido para esta funcionalización debido a que las células necesitan folatos para llevar a cabo varias reacciones bioquímicas, por ejemplo, los cofactores folatos son requeridos para la formación de precursores purina y pirimidina para la síntesis de ADN y ARN [7]

Los receptores de folatos se expresan en la mayoría de las células de mamífero; sin embargo, se ha determinado que se sobre-expresan en más del 90% de los carcinomas de ovario no mucinosos. También se encuentran altos niveles en los

carcinomas de riñón, cerebro, pulmón y de mama, mientras que se producen niveles muy bajos en la mayoría de tejidos normales [8]. Adicionalmente, el parásito *Leishmania spp* ha desarrollado un sofisticado mecanismo de proteínas integrales transportadoras, que le ayudan a ingresar los folatos. Razón por la cual se espera que el parásito también internalice estos conjugados, AuNP-AF.

Los resultados de esta investigación servirán de guía para otros trabajos en nanomedicina, que busquen la aplicación de las AuNPs en el tratamiento de otras enfermedades (como la terapia para la lucha contra el cáncer), ó quizás para otro tipo de aplicaciones.

Por otro lado, se ha demostrado que las AuNPs no presentan citotoxicidad, no son inmunogénicas y presentan biocompatibilidad. Por ejemplo, se observó que las AuNPs no son tóxicas para las células macrófagas RAW264.7 [9]. Estas propiedades corroboran su excelente potencial en nanoimmunología, nanobiotecnología y nanomedicina.

Por último, en la literatura los trabajos que estudian métodos de síntesis para controlar la forma y el tamaño del conjugado AuNP-AF son escasos y aún más escasos los dedicados a estudiar la fotoactivación de las nanopartículas con IRC con fines terapéuticos en casos particulares como la leishmaniasis cutánea.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar métodos para preparación de nanopartículas de oro (funcionalizadas con ácido fólico) de tamaño y forma controlada y estudiar el efecto térmico generado por su interacción con la radiación IRC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro con y sin funcionalización con el ácido fólico.

- ✓ Estudiar el efecto térmico de las nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico al irradiar una solución de nanopartículas con IRC.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

El uso de AuNPs en aplicaciones biomédicas ha adquirido gran atención e interés, debido a sus significativas ventajas frente a otros agentes. Entre estas ventajas está su fácil biocompatibilidad y biomodificación, su propiedad de absorción de plasmones de superficie, etc.

Las AuNPs, también llamadas coloides de oro, son las nanopartículas metálicas más estables. Presentan aspectos fascinantes tales como: sus múltiples tipos de ensambles, involucrando a la ciencia de materiales; el comportamiento de las partículas individuales; propiedades magnéticas, ópticas (efecto del tamaño cuántico) y electrónicas (relacionadas con el tamaño) y sus aplicaciones en catálisis y biología.

En la antigüedad, los materiales eran usados en un sentido ecológico tanto para propósitos artísticos como curativos. El oro coloidal era usado para hacer vidrio rubí y cerámicas coloridas, y aún estas aplicaciones continúan en la actualidad. Tal vez el ejemplo más famoso es la Copa de Lycurgus que fue manufacturada en el siglo 5-4 a.c. Esta es de color rojo rubí con luz transmitida y verde con luz reflejada, debido a la presencia de coloides de oro. La reputación del oro soluble en la edad media estaba asociada a fabulosos poderes curativos de varias enfermedades, tales como: problemas venéreos y del corazón, disentería, epilepsia, tumores, y para el diagnóstico de sífilis [10]

En cuanto a la citotoxicidad de las AuNPs, los trabajos reportados recientemente muestran discrepancias, se ha encontrado que dicha citotoxicidad está fuertemente relacionada con el tamaño y la forma de las AuNPs investigadas, así

como con las distintas características superficiales (dependientes del tipo de moléculas estabilizadoras de la AuNP).

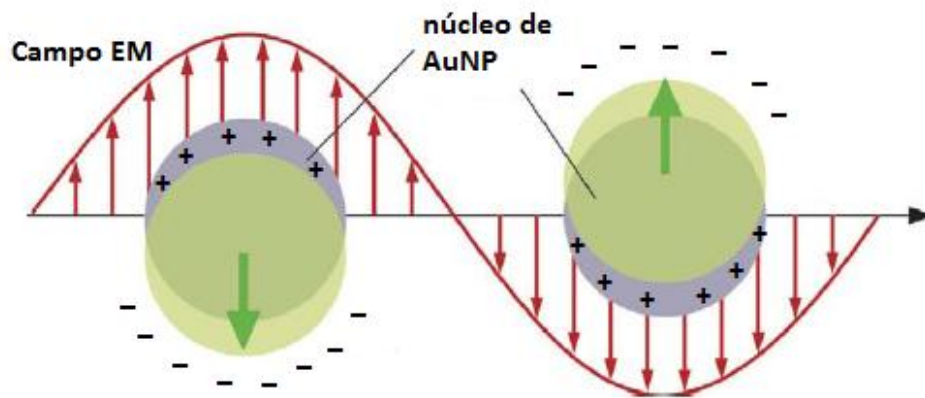
Pan et al. evaluaron el efecto del tamaño de la NP sobre la citotoxicidad de AuNPs estabilizadas con trifenilfosfina (0,8-15 nm) en varias líneas celulares (fibroblastos de tejido conectivo, células epiteliales, macrófagos y células melanoma). Estos autores encontraron que la respuesta y el mecanismo de muerte celular dependen del tamaño, todas las células investigadas fueron muy sensibles a las AuNPs de 1,4 nm de diámetro, mientras que las AuNPs con un diámetro de 15 nm y de tiosulfato de oro resultaron ser no tóxicas [11].

Se ha encontrado que el ambiente superficial de las AuNPs determina en gran medida su toxicidad. Las AuNPs catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas: las AuNPs aniónicas con núcleo de tamaño 2 nm son prácticamente no tóxicas mientras que las equivalentes catiónicas son moderadamente tóxicas, encontrándose que la toxicidad está probablemente relacionada con la lisis celular (mediada inicialmente por una unión electrostática) dependiente de la concentración [12].

3.1.1 Banda de plasmones de superficie. Las soluciones coloidales de AuNPs esféricas exhiben un profundo color rojo debido a la bien conocida banda de plasmones superficial (APS). Para las AuNPs esféricas la banda APS surge alrededor de 520nm. La APS es causada por la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción, los cuales interactúan con el campo electromagnético. La polarización de los electrones con respecto al núcleo iónico más pesado de una NP esférica es inducida por el campo eléctrico de la onda de luz incidente. Se debe tener en cuenta que existe una diferencia de carga neta solo en la superficie de la NP, que a su vez actúa como una fuerza restauradora. En un caso más simple, se crea una oscilación de todos los electrones en fase, como muestra la figura 1. El color observado se origina por la fuerte absorción de

la NP metálica cuando la frecuencia del campo electromagnético entra en resonancia con el movimiento coherente de los electrones [13].

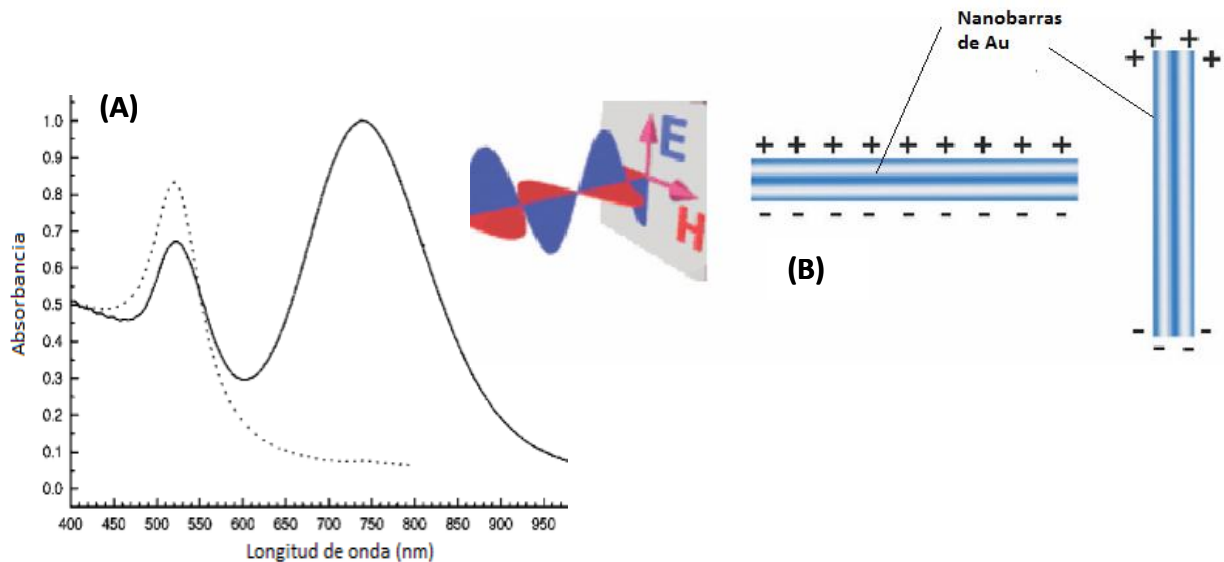
Figura 1. Esquema de la interacción de una AuNP con la luz. El campo electromagnético (EM) de la luz induce una oscilación coherente dipolar de los electrones de conducción a través de la NP.



Fuente: Adaptada de JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Au nanoparticles target cancer. En: Nano Today. 2007, Vol. 2, p. 19-29. [14].

La forma de las nanopartículas, el ambiente dieléctrico, y la distancia entre partículas, son probablemente los parámetros más importantes que determinan la frecuencia del plasmón superficial, puesto que las oscilaciones de los electrones libres son fuertemente dependientes del espacio disponible. Mientras que la forma de oscilación de las esferas metálicas tiene muy poca variabilidad, los electrones en las nanobarras pueden oscilar de una manera transversal o longitudinal, lo cual permite la formación de dos picos bien definidos debidos al plasmón de superficie, ver figura 2. Otro parámetro fundamental para la determinación del plasmón de resonancia es el ambiente en el cual las nanopartículas están embebidas. Todos estos factores deben de ser tomados en cuenta para adaptar los nanomateriales para una aplicación en particular [13].

Figura 2. A) Espectro de absorción de UV-Vis típico de Nanobarras. B) Esquema de la interacción de una Nanobarra de Au con la luz, a la izquierda se muestra el dipolo transversal y a la derecha el longitudinal.



Fuente: LIZ-MARZAN, Luis M. Nanometals: formation y color. En: Materials Today. 2004, Vol. 2, p. 26-31. [15].

3.1.2 Métodos de síntesis y multifuncionalidad. Entre los métodos convencionales de síntesis de AuNPs se usan los métodos de reducción de derivados de oro (III), el más popular, ha sido el uso del citrato para reducir el HAuCl_4 acuoso, el cual fue introducido por Turkevitch desde 1951. Esta síntesis condujo a AuNPs de 20nm. Recientemente una preparación de AuNPs estabilizadas con 3-mercaptopropionato de sodio fue indicado, en la cual se adoptó la adición simultánea de citrato y de un surfactante anfifílico; el tamaño podía ser controlado variando la relación estabilizante/oro [10].

Sin embargo, los métodos de síntesis se han modificado, según las nuevas exigencias de las aplicaciones de AuNPs. Por ejemplo, para sintetizar AuNPs de

formas diferentes a la esférica se pueden utilizar métodos químicos (donde se sigue usando el citrato para reducir el HAuCl_4 , pero se introduce un surfactante que es el CTAB) y fotoquímicos (donde se lleva a cabo una reducción fotoquímica y no se utiliza citrato). El método químico consiste en preparar una solución semilla de AuNPs esféricas (de alrededor de 5nm), a partir de HAuCl_4 y utilizando el citrato de sodio para reducir la sal y borohidruro de sodio. Además, se prepara una solución stock mezclando: HAuCl_4 , bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y ácido ascórbico. La síntesis termina cuando se mezcla la solución semilla y la solución stock, obteniéndose nanobarras de oro (AuNRs). El CTAB es el único reactivo conocido que permite moldear a la NP en forma de barra [16]. El método fotoquímico involucra una sal de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y el oxalato de sodio. La reacción ocurre en presencia de radiación (emitida por una lámpara de mercurio de 306 nm) y se producen NPs de forma poligonal. Además los autores demostraron que la solución de AuNPs poligonales sintetizada puede calentarse rápidamente hasta $\sim 50^\circ\text{C}$ bajo iluminación con luz IRC durante 5 min, usando un diodo láser de 808 nm a una densidad de potencia de $\sim 200 \text{ mW/cm}^2$. Así, estas AuNPs son potenciales agentes fototérmicos para causar hipertermia en animales mediante ensayos *in vivo* [17].

Otro método de síntesis es el de Brust-Schiffrin, publicado en 1994, el cual permite producir AuNPs térmica y aéreamente estables y de tamaño controlado (1,5-5,2 nm). La síntesis es inspirada por el sistema de dos fases de Faraday y usa ligandos tiol que se unen fuertemente al oro debido al carácter blando tanto del oro como del azufre. El AuCl^- es transferido al tolueno (usando bromuro de tetraoctilamonio como la fase transportadora de reactivos) y reducido por NaBH_4 en la presencia de dodecanotiol. La fase orgánica cambia de color naranja a marrón oscuro dentro de unos pocos segundos después de haber adicionado NaBH_4 [10].

Existen una variedad de métodos físicos para sintetizar AuNPs, tales como: los fotoquímicos, ya mencionados, en los cuales se irradia con UV o IRC; radiolisis, la cual ha sido usada para el control del tamaño de las AuNPs o para la síntesis de ellas en la presencia de radicales específicos; termólisis de preparaciones crudas de AuNPs sin remoción de la fase de transferencia de reactivos, bromuro de tetraoctilamonio, a 150-25°C llevó a un incremento del tamaño de las partículas (3,4-9,7 nm) [10].

Las AuNPs pueden ser funcionalizadas debido a que presentan una gran área superficial. Las AuNPs con un diámetro del núcleo en el rango de 1,5 a 5,2 nm, y que contienen ~ 110 a 4800 átomos de Au, pueden establecer entre 53 y 520 interacciones con cadenas de alcanotiolatos [18].

La funcionalización de las AuNPs se ha realizado comúnmente con ligandos tiol, que se ligan fuertemente al oro debido al carácter “blando” tanto del oro como del azufre. Los tioles orgánicos, ligados a la superficie de las nanopartículas, son particularmente efectivos para la funcionalización por la presencia de un enlace tipo σ , en el cual el azufre es el donador de densidad electrónica y el átomo metálico es el aceptor, adicionalmente un enlace tipo π , en el cual los electrones del metal están parcialmente deslocalizados con los orbitales moleculares formados entre los orbitales d llenos del metal y los orbitales d vacíos del azufre [19]. Otros ligandos que han sido utilizados y las NPs han mostrado afinidad, han sido: fosfina, oxido de fosfina, amina y ligandos carboxilatos [10].

Se ha enlazado una diversidad de moléculas en la superficie de los núcleos de las AuNPs, lo cual ha permitido su uso en un gran número de aplicaciones. Fan et al. mencionaron los detalles de la elongación de péptidos al anclarlos a la superficie de las AuNPs. Este estudio ha aportado las herramientas claves para aplicaciones biomédicas, ya que tales moléculas de péptidos e incluso proteínas, al ser ligadas

a las NPs mejoran la bioespecificidad y potencialidad de este tipo de sistemas [20].

La funcionalización de AuNPs con paclitaxel, se ha utilizado para resolver tres problemas asociados con el agente quimioterapéutico paclitaxel como una droga efectiva contra el cáncer: 1) la baja solubilidad en agua, 2) la baja biodisponibilidad para atacar selectivamente a las células cancerígenas y 3) la falta de métodos seguros para la detección y seguimiento de esta enfermedad. Los resultados encontrados usando AuNPs-paclitaxel fueron promisorios para lograr una cura del cáncer [21].

3.1.3 Técnicas de caracterización.

3.1.3.1 Espectroscopia de absorción en el Ultravioleta-Visible. Todos los compuestos orgánicos absorben radiación ultravioleta o visible. La energía UV-Vis que se absorbe puede promocionar un electrón de un orbital σ o π enlazante o antienlazante, a un orbital antienlazante vacío [22]. Adicionalmente esta técnica resulta conveniente para caracterizar a las NPs metálicas, ya que por medio de ella se puede detectar la banda APS que es propia de cada tipo de NP.

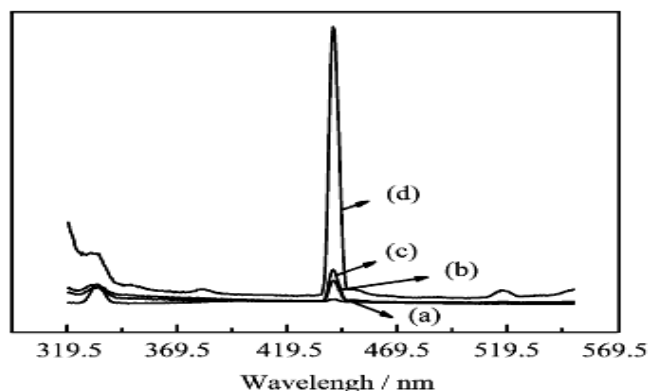
3.1.3.2 Espectroscopia de Fluorescencia. La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética y, al relajarse a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico basal, liberan el exceso de energía en forma de fotones.

Un fluorímetro consta de una fuente de luz y de un sistema de selección de longitud de onda de excitación. Cuando la muestra es excitada con una radiación de energía apropiada, emite radiación en todas las direcciones del espacio. No obstante la luz emitida se detecta mejor en ángulo recto con respecto al haz de excitación, ya que se evitan problemas de dispersión de la luz y también el haz de luz excitante que es de mucha mayor intensidad que el haz de luz emitida. La luz

emitida es recogida seleccionando una longitud de onda apropiada y conducida a un detector, donde queda registrada por sistemas similares a los de un espectrofotómetro de absorción [23].

En la figura 3, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de AuNPs con y sin funcionalización con diferentes compuestos funcionalizantes [24]. Se ha observado que las AuNPs sin funcionalización no fluorescen significativamente en comparación con los espectros observados de las AuNPs funcionalizadas con moléculas específicas.

Figura 3. Espectros de emisión de fluorescencia de: (a) AuNPs no funcionalizadas y (b-d) AuNPs funcionalizadas con trifenilfosfina, ácido 3-mercaptopropionico relación molar ácido/AuNP=1:1 y ácido 3-mercaptopropionico relación molar ácido/AuNP=100:1 respectivamente.



Fuente: ZHANG, Zhi-juan; [et al.]. Fluorescent Property of Gold Nanoparticles with Different Surface Structures. En: Chinese Journal of Chemical Physics. 2007, Vol. 20, p. 796-800. [24].

3.1.3.3 Microscopía de transmisión electrónica. La microscopía de transmisión electrónica ó TEM (por sus siglas en inglés: *Transmission Electron Microscopy*) se basa en un haz de electrones que es conducido a través de lentes electromagnéticos y se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una

columna de alto vacío. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la luz, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas.

Generalmente las muestras orgánicas carecen de contraste suficiente para poder ser visualizadas, y son atravesadas por los electrones con facilidad. Por este motivo es necesario realizar un marcaje con soluciones de metales pesados. Las muestras en suspensión (micropartículas, nanopartículas, virus, etc.) pueden estudiarse fácilmente aumentando el contraste mediante una tinción negativa. Mediante esta coloración se tiñe el entorno de la muestra impidiendo el paso de los electrones. Como resultado se obtiene imágenes con un fondo oscuro adecuado para contrastar la fotografía y observar la imagen [25].

3.1.3.4 Microscopía electrónica de barrido. Esta técnica es conocida como SEM (por sus siglas en inglés: *Scanning Electron Microscopy*). En el microscopio electrónico de barrido se construyen imágenes y contrastes, aprovechando la emisión de electrones (electrones secundarios) de una muestra, cuando sobre ella incide un haz enfocado de electrones de alta energía. La muestra también emite rayos X, los cuales pueden ser analizados para obtener información sobre la composición del material. Cada señal obtenida del SEM es captada con un detector apropiado.

Los electrones emitidos por la interacción del haz incidente y la muestra son recogidos por los correspondientes detectores para producir una señal eléctrica, la cual se utiliza para modular la intensidad de un haz de electrones que incide en la pantalla de un tubo de rayos catódicos, de manera que mediante un barrido sincronizado del haz incidente en la superficie de una muestra y del haz incidente en la pantalla del tubo de rayos catódicos, se produce en ésta una imagen de la

muestra. La emisión de electrones y de los rayos X de la muestra se origina por las colisiones de electrones del haz incidente con electrones de los átomos del material de la probeta [26].

3.1.3.5 Microscopía de fuerza atómica. La microscopia de fuerza atómica ó AFM (por sus siglas en inglés: *Atomic force microscopy*) es una técnica relativamente nueva que permite obtener imágenes de superficies a escala molecular. En realidad el microscopio de fuerza atómica pertenece a una amplia familia de microscopios basados todos ellos en la medida de las pequeñas interacciones existentes entre una punta acabada en un átomo y la superficie que se quiere estudiar.

Una de las ventajas del microscopio de fuerza atómica frente al microscopio electrónico de barrido (aparte de su mayor resolución vertical) es que su funcionamiento no requiere condiciones de vacío, pudiendo operar con la muestra en aire o inmersa en fluidos [27].

Las microscopías electrónicas han permitido caracterizar las nanopartículas de oro con y sin funcionalización, de tal manera que éstas permiten constatar si los métodos de síntesis han sido o no apropiados para obtener el compuesto.

3.2 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS

El interés creciente en la funcionalización de AuNPs, tiene sus raíces en el amplio abanico de aplicaciones biomédicas que las AuNPs proporcionan. Su propiedad más notoria y quizás más promisoría, en cuanto a estas aplicaciones, es la resonancia de plasmones de superficie. Esta propiedad permite utilizar las AuNPs

en la detección y en terapias fototérmicas de enfermedades como el cáncer. Por ejemplo, Huang et al. lograron realizar simultáneamente un diagnóstico y una terapia contra el cáncer, utilizando nanobarras de oro (AuNRs) funcionalizadas con el anticuerpo monoclonal del receptor del factor de crecimiento anti-epidérmico (anti-EGFR) incubadas en cultivos con líneas celulares epidérmicas no malignas (HaCat) y dos líneas celulares epidérmicas orales malignas (HOC 313 clon 8 y HSC 3). Las AuNR funcionalizadas con anti-EGFR, se unían específicamente a la superficie de las células malignas con mayor afinidad, debido a que los receptores del factor de crecimiento, EGFR son sobre-expresados en la membrana citoplasmática de las células malignas. Se observó por medio de un microscopio el fuerte color rojo de este conjugado en campo oscuro, las células malignas eran visualizadas claramente y distinguidas de las sanas. Además, se observó que tras la irradiación, durante 4 min de las células malignas con un laser de 800 nm y una potencia de 120mW los tres tipos de células eran destruidas [28].

La terapia fototérmica de cáncer usando AuNPs y AuNRs ha utilizado diversas radiaciones como: visible [29], radiofrecuencias [5] e infrarrojo cercano. Esta última radiación (IRC) específicamente, se ha usado en terapias *in vivo* debido a que pueden penetrar profundamente la piel y tanto la hemoglobina como las moléculas de agua en los tejidos presentan su absorción mínima en esta región del espectro.

Gaiping y et al., trabajaron en la preparación y funcionalización de AuNPs con AF por medio de un procedimiento de un solo paso y adicionalmente se evaluó la internalización del conjugado, AuNP-AF en células HeLa. Los resultados sugieren que la superficie de las AuNPs funcionalizadas con AF facilita la internalización de las NPs por las células HeLa, por medio de una endocitosis mediada por receptores folatos (RF). Esto último implicaría que el acople con la NP no afectara el reconocimiento específico del AF por los RF en la superficie celular. Por otro lado esta investigación indicó que se podría considerar que el AF no influye en la

viabilidad celular y que además los resultados de los ensayos de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) no indicaron ninguna toxicidad después de la incubación de células HeLa con las AuNP-AF. Esto puede ser debido a la esencia inerte y no tóxica del núcleo de Au y a la biocompatibilidad de la superficie compuesta por AF [30].

La funcionalización de AuNPs también ha involucrado el uso de Glutathione (GSH) como agente estabilizador y acoplador en la síntesis de AuNP cubiertas por GSH (AuNP-GSH). El GSH fue inmovilizado en la superficie de la AuNP a través del grupo tiol de la cisteína, y el AF fue enlazado a la AuNP por medio de una reacción entre el grupo carbonilo del GSH y el grupo amino del AF. A una concentración celular baja (10^1 células/mL), no hay ninguna diferencia significativa de absorbancia relativa (ΔA) a 528 nm entre las células cancerosas y las células de control ($p > 0,05$). En el intervalo de 10^2 - 10^5 células/mL, las células HeLa y FB se pueden distinguir claramente por una diferencia significativa de ΔA de los cuatro grupos ($p < 0,05$). Así, la AuNP-GSH-AF mostró sensibilidad y selectividad para la detección de células HeLa [2].

Recientemente Wei et al. demostraron que las AuNRs funcionalizadas con ligandos folatos podían ser usadas para terapias hipertérmicas de células cancerosas orales KB con un laser tipo *Ti:Sapphire*. Se diseñaron áreas en una placa de cultivo que contenían células KB tratadas con AuNR-AF, las cuales fueron expuestas a irradiación continua durante 30 segundos y a densidades de potencia que iban desde 22 hasta 176 W/cm^2 (potencias de láser incidente que iban desde 7,5 hasta 60mW). Estas células sufrieron grandes daños en sus membranas después de los 30 segundos de irradiación, a densidades de potencia tan bajas como 44 W/cm^2 . Como control, células KB no tratadas se irradiaron durante 30 segundos a 176 W/cm^2 , sin evidencia visible de lesión hipertérmica. Las células fueron incubadas con bromuro de etidio y examinadas por microscopia de fluorescencia lineal y TPL para identificar el grado de hipertermia. Las células

KB que contenían nanobarras eran impermeables al bromuro de etidio antes de la irradiación IRC, pero sus núcleos se tiñeron fuertemente después de una exposición de 30 segundos, confirmando que el tratamiento fototérmico pone en peligro la integridad de la membrana celular [31].

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

4.1.1 Síntesis de nanopartículas de oro esféricas. Para la síntesis de AuNPs se utilizó una metodología basada en la reacción de McFarland et al. [32]. Se tomó una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1mM; 10mL) y se calentó hasta ebullición, con agitación magnética constante. Posteriormente se adicionó gota a gota una cantidad de citrato de sodio (38,8mM; 0,3-2,5mL), continuando con el calentamiento y la agitación durante 10 minutos.

4.1.2 Síntesis de nanopartículas de oro por un método fotoquímico. En este caso se tomó una solución acuosa de citrato (38,8mM; 158 μL) y se disolvió en 9,7mL de agua MiliQ en un micro reactor de cuarzo (15 mL). El micro reactor (figura 4-C) permite el uso de una lámpara de longitud de onda de 254nm (UV, P/N: 90-0012-01 (Model 11SC-1), colocada dentro de un tubo cilíndrico de cuarzo rodeado por una chaqueta que facilita la circulación de agua para controlar la temperatura. Posteriormente, una solución acuosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01M (158 μL) se adicionó al micro reactor. La mezcla se irradió durante 4 y 40 min, con agitación magnética constante. Durante la irradiación la temperatura se mantuvo constante ,19°C, mediante un baño termostataado, con el fin de evitar reacciones fotoquímicas no deseadas, debido al calentamiento de la lámpara.

Figura 4. Equipo usado para la síntesis fotoquímica de AuNP estabilizadas por citrato. (A) micro reactor, (B) baño termostático y (C) producto de AuNP estabilizadas con citrato.



Fuente: Autora.

4.1.3 Síntesis de nanobarras de oro. Esta síntesis requiere la presencia de un molde, que actúa como un agente orientador de la estructura, para obtener las nanobarras. En este caso se usa el hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Se usó un procedimiento para sintetizar nanobarras cortas (largo=46,4nm) y nanobarras un poco más largas (largo=51,1nm) Las AuNRs cortas se denominarán AuNR703 y las “largas” AuNR832 por sus bandas APS longitudinales. Para la síntesis de las AuNR703 se utilizó una metodología similar a la empleada por Alekseeva et al. [33], la cual comprendió las siguientes dos etapas:

a. Preparación de una solución semilla.

Se mezcló una solución de CTAB (0,1M; 1mL) con una solución $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01M; 25 μL). Se inició la agitación magnética después de adicionar a la mezcla

de reacción, una solución de NaBH_4 (0,01M; 100 μL) previamente preparada. La solución semilla fue sometida a agitación magnética por 1 minuto más.

b. Crecimiento de las nanobarras de oro.

Se mezcló una solución de CTAB (0,1M; 9,5 mL) con una solución de AgNO_3 (0,004M; 100 μL) y se agitó magnéticamente. Posteriormente se adicionó la solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01mM; 500 μL) y una solución de ácido ascórbico (0,0788 M; 100 μL), bajo agitación. Finalmente para iniciar el crecimiento de las nanobarras, se adicionaron 12 μL de la solución semilla manteniendo la agitación durante 20 minutos.

Para la síntesis de las nanopartículas: AuNR832 se usó el mismo procedimiento pero cambiando las cantidades y las concentraciones de los reactivos. Así, para la preparación de la solución semilla se usaron soluciones de: CTAB (0,2M; 5mL), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,5mM; 5mL) y NaBH_4 (0,01M; 0,6mL). Posteriormente para la preparación de la solución de crecimiento se usaron las soluciones: CTAB (0,2M; 5mL), AgNO_3 (0,004M; 250 μL), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1mM; 5mL), ácido ascórbico (0,0788M; 70 μL) y 12 μL de la solución semilla [34].

4.1.4 Caracterización de los tres tipos de nanopartículas de oro preparadas.

Las tres soluciones de AuNPs preparadas (AuNPs esféricas, AuNRs y las sintetizadas por el MFQ) fueron caracterizadas por espectroscopia de absorción UV-Vis, en la región de 200 a 900 nm, utilizando un espectrómetro Shimadzu de doble canal modelo 2401PC.

Las técnicas de electroforesis y velocimetría Láser Doppler se utilizaron para determinar el valor del potencial Z de las soluciones estudiadas. Además, las

soluciones de AuNPs y AuNRs fueron analizadas por medio de la técnica: dispersión dinámica de la luz ó DLS (*Dynamic Light Scattering*), la cual permitió conocer el diámetro promedio de las mismas. Estas dos últimas técnicas son medidas en un equipo Zetasizer Nano Malver modelo ZS90. Para realizar estas medidas, se ingresó en el software del equipo Zetasizer el valor de la absorbancia en la banda APS, obtenida por espectroscopia UV-Vis, para el caso de las AuNPs esféricas se usó la absorbancia en la única banda APS observada, mientras que para las AuNPs sintetizadas por el MFQ y las AuNRs se usó la absorbancia en la banda APS longitudinal.

El tamaño de las AuNPs esféricas también fue determinado por las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al. [35] y se comparó con el medido por DLS. Las ecuaciones Wolfgang Haiss et al. permiten el cálculo del tamaño y la concentración de las AuNPs esféricas, utilizando el dato de absorbancia a la longitud de onda APS. Entonces, el análisis del espectro UV-Vis de las soluciones preparadas y el valor obtenido de las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al., permitieron estimar el diámetro y la concentración de las AuNPs .esféricas. Para calcular el diámetro se tuvieron en cuenta dos casos:

Primer caso. Para AuNPs mayores de 35 nm se obtuvo como resultado de la regresión de los datos reportados por Wolfgang Haiss, la siguiente ecuación:

$$d = -0,02\lambda_{APS}^2 + 23,393\lambda_{APS} - 6731,5 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde d es el diámetro y λ_{APS} es la longitud de onda a la máxima absorción (banda APS). El valor R cuadrado fue de 0,9968.

Segundo caso. Para NPs menores de 35 nm, al hacer la regresión de los datos tabulados, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$d = 0,112e^{2,9986(A_{APS}/A_{450})} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde A_{APS} es la absorbancia a la longitud de onda de la APS. El valor R cuadrado fue de 0,9999.

La concentración (c) de las AuNPs también pudo calcularse usando una de las ecuaciones de Wolfgang Haiss:

$$c = A_{450}/\varepsilon_{450} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde ε_{450} es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda de 450nm.

Por otro lado, se obtuvo información sobre la forma y tamaño promedio de las AuNRs mediante la microscopía electrónica de barrido, en un equipo Quanta™ 650 FEG.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

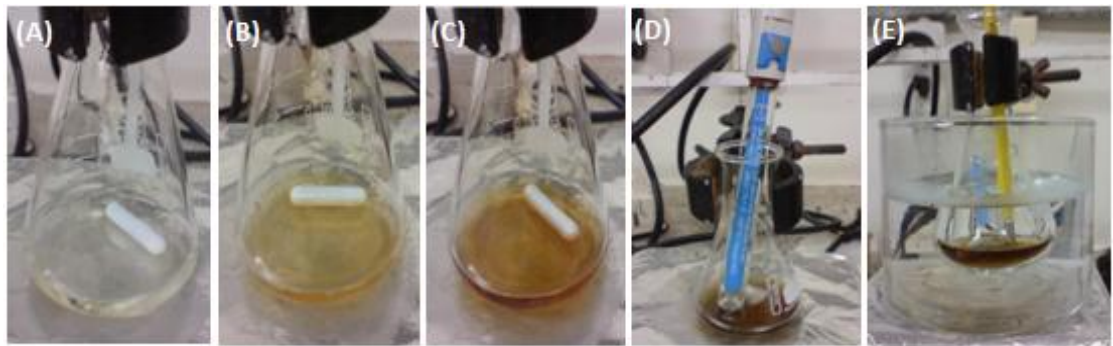
4.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico

- ✓ **Método químico (MQ).** Se adicionó (gota a gota y con agitación magnética constante) una solución de ácido fólico (2,7mM; 1,02mL) a una solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1mM; 5 mL). Posteriormente un pH de 9,12 fue ajustado adicionando una pequeña cantidad de una solución de NaOH 0,1M, hasta un

pH de 10,41. La mezcla de reacción, luego se sometió a un calentamiento cercano a 50°C durante 8 horas [30].

En la figura 5 se observan las fotografías tomadas durante el procedimiento experimental de la síntesis de AuNP-AF.

Figura 5. Procedimiento experimental. (A) Solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. (B) adición de la solución de AF con agitación durante 1h. (C) fin de la adición de la solución de AF. (D) Ajuste del pH. Y (E) Calentamiento de la mezcla de reacción.

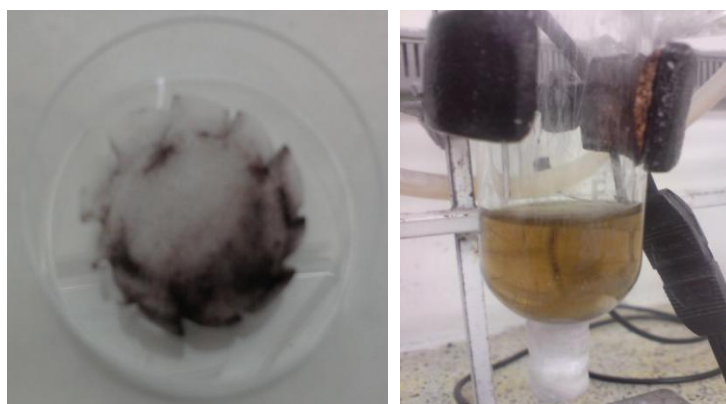


Fuente: Autora.

- ✓ **Método fotoquímico (MFQ).** Una solución acuosa (330 μL) de AF 5mM se diluyó a 9,7mL con agua miliQ en el foto-reactor de cuarzo. Luego, una solución acuosa (300 μL) de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01M se adicionó al micro reactor. La mezcla se irradió con una lámpara UV de 254nm por 10 minutos con agitación magnética constante, utilizando el baño termostatado. En ese momento se observó la aparición de un precipitado. Posteriormente se realizó una filtración de esta mezcla y el filtrado (fotografía del lado izquierdo de la figura 6) fue analizado por espectroscopia IR utilizando un equipo Infrarrojo Bruker Tensor 27. Las aguas de lavado fueron analizadas por UV-Vis.

Por último se ajustó el pH de la mezcla de reacción, adicionando una pequeña cantidad de una solución de NaOH 0,1mM, hasta un pH de 10,41. El producto obtenido se muestra en la fotografía del lado derecho de la figura 6.

Figura 6. Fotografías tomadas durante la síntesis de AuNP-AF por el método fotoquímico.



Fuente: Autora.

4.2.2 Síntesis de nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico.

Partiendo de una solución de nanobarras de oro previamente preparadas por método de Alekseeva et al [33] y Nikcobakht [34], se realizó la funcionalización de las mismas con el AF.

5mL de la solución de AuNRs se mezclaron con una solución de AF 5mM (294 μ L para el caso de las cortas o con 420 μ L para las “largas”). La mezcla se sometió a agitación magnética por 1 hora. Las nanobarras funcionalizadas con AF se denominarán AuNR703-AF y AuNR800-AF, con relación a las nanobarras de las cuales se partió para la funcionalización.

4.2.3 Caracterización de las nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico esféricas y en forma de barras.

La caracterización de las soluciones de AuNP-AF esféricas y AuNR-AF se realizó también por espectroscopia de absorción en el UV-Vis, realizando un barrido de 200 a 900 nm.

Se determinó el potencial Z y el diámetro promedio de las AuNP-AF esféricas por medio del equipo Zetasizer, este valor del diámetro fue comparado con el diámetro obtenido usando las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al. Se obtuvieron imágenes de las AuNP-AF (sintetizadas por el MFQ) y las AuNR-AF, por medio del microscopio electrónico de barrido Quanta™ 650 FEG.

Se determinaron los espectros de emisión de fluorescencia de: las AuNP-AF (sintetizadas por el MFQ), las AuNR-AF y de una solución de AF, con el fin de comparar los dos primeros espectros con el del AF. Estas mediciones se hicieron en un Espectrofluorímetro Perkin Elmer L-55.

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA LA FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO-ÁCIDO FÓLICO

Las soluciones de AuNR-AF (cortas y “largas”) fueron irradiadas con un diodo láser de 808nm. Para la primera solución de AuNR se evaluaron tres valores de potencia del láser: 400; 600 y 800 mW. Se observó que el mayor calentamiento se obtenía cuando se usaba la potencia de 800mW y por lo tanto esta fue la potencia utilizada para la irradiación de las siguientes soluciones. Se ensayaron tres concentraciones distintas para cada solución de AuNRs, llamadas solución 1, 2 y 3, la concentración es mayor para la solución 1 y disminuye en orden para las

soluciones 2 y 3. De esta forma, los experimentos de irradiación se hicieron midiendo la temperatura (con un termómetro digital con sonda de acero inoxidable sumergida en la solución estudiada) cada 30 segundos durante 10 minutos. La distancia de la solución de NP al láser fue de 2mm en todos los experimentos. La temperatura del láser se mantuvo constante (20°C). El montaje experimental usado para esta etapa de la investigación se muestra en la figura 7.

Figura 7. Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AuNRs. (A) Sensor de temperatura, (B) solución de AuNR, (C) láser IRC (808nm), (D) y (E) reguladores de temperatura y potencia respectivamente.



Fuente: Autora.

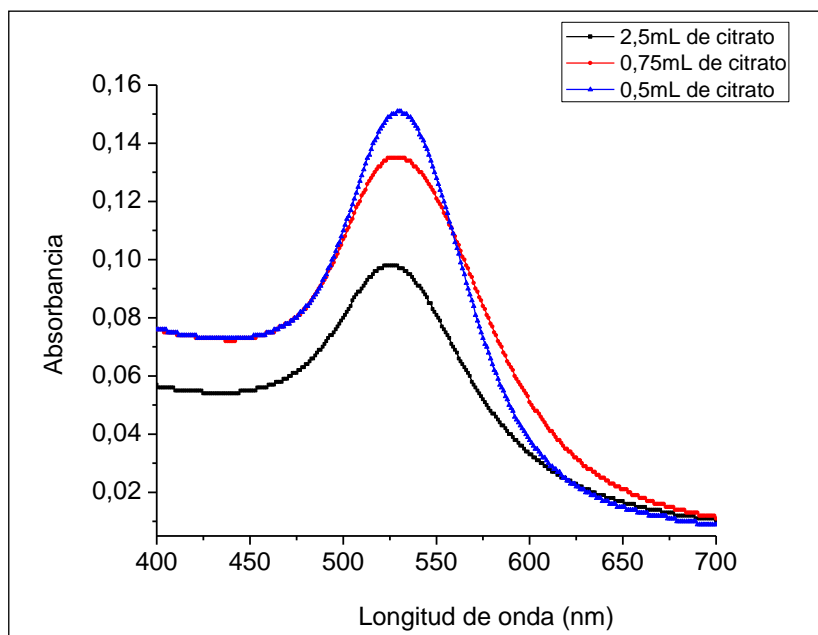
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO

5.1.1 Nanopartículas de oro esféricas

5.1.1.1 Caracterización de las nanopartículas de oro esféricas. Las AuNPs sintetizadas utilizando el método de síntesis químico (reducción con citrato) mostraron un espectro UV-Vis con una banda intensa de APS alrededor de 520 nm, lo cual es característico de AuNPs esféricas [13]. La figura 8 muestra los espectros UV-Vis de varias soluciones de AuNPs sintetizadas con diferentes cantidades de citrato de sodio. La tendencia observada fue un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores de la banda APS, al utilizar menor cantidad del agente reductor citrato de sodio.

Figura 8. Espectros de absorción UV-Vis de las soluciones de AuNP estabilizadas con soluciones 38,8mM citrato.



Fuente: Autora.

Se determinó la estabilidad de la solución AuNP preparada (midiendo el potencial Z) con 1mL de citrato de sodio y manteniendo el resto de las condiciones de síntesis constantes como concentración y cantidad de las soluciones utilizadas, calentamiento y tiempo de reacción.

El potencial Z es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundantes en la partícula para desestabilizarla [36]. La capa de líquido que rodea la partícula se divide en dos partes; una región interior, llamada capa de Stern, donde los iones se unen fuertemente a la partícula y una exterior, en la región difusa, donde están unidos con menos fuerza, por lo que una doble capa eléctrica existe alrededor de cada partícula. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve, los iones dentro del límite se mueven con ella, pero los iones más allá del límite no viajan con la partícula. Este límite se llama superficie de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como el potencial Z.

Si todas las partículas de una suspensión tienen un gran potencial Z negativo o positivo, entonces ellas tenderán a repelerse unas a otras y no habrá tendencia a la floculación. Sin embargo, si las partículas tienen un bajo valor de potencial Z entonces no habrá fuerzas que prevengan que las partículas empiecen a unirse y a flocular [37]. En general suspensiones con potencial Z dentro del intervalo comprendido entre +30mV y -30mV son consideradas inestables, mientras que las que tengan un potencial Z por fuera de este intervalo serán estables. La solución de AuNPs preparada con 1mL de citrato presentó un valor de potencial Z de -39,8mV, es decir un poco más negativo que -30mV. Así, la solución presenta un valor alto de potencial Z que prevendrá la floculación de las AuNPs y mantendrá la solución estable.

5.1.1.2 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro esféricas. El diámetro promedio de las AuNPs fue determinado de las siguientes formas:

*** Por medio del espectro UV-Vis y las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al.** Para poder usar las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al., se necesitaron los siguientes valores obtenidos por espectroscopia UV-Vis: longitud de onda de la banda APS y su absorbancia respectiva y la absorbancia en 450nm. En la tabla 1 se consigna el diámetro y la concentración de las soluciones de AuNPs estabilizadas con citrato, calculados por medio de las ecuaciones de Wolfgang et al.

Tabla 1. Tamaño y concentración de las AuNPs en solución calculados por las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al.

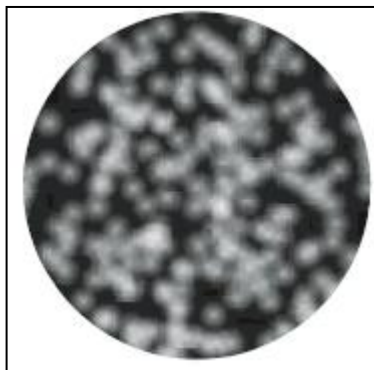
Cantidad de citrato usada para la síntesis de AuNPs (mL)	Diámetro de AuNP, (nm)	Concentración de la solución de AuNP, (nM)
2,5	23,4	$6,5 \times 10^{-2}$
0,75	44,3	$1,1 \times 10^{-2}$
0,5	53,1	6×10^{-3}

Fuente: Autora.

*** Por medio del análisis DLS.** DLS también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) mide el movimiento Browniano y lo relaciona al tamaño de las partículas. Esto se hace iluminando las partículas con un láser y analizando la intensidad de las fluctuaciones en la luz dispersada. Si una pantalla es colocada cerca a la partícula,

la pantalla será iluminada por la luz dispersada. Ahora, si se reemplaza la partícula individual por miles de partículas estacionarias la pantalla mostrará entonces, un patrón de manchas (áreas brillantes y oscuras), ver figura 9. Pero en la práctica, las partículas suspendidas en un líquido nunca son estacionarias. Las partículas están en constante movimiento debido al movimiento Browniano. El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido a que su superficie es bombardeada incesantemente por las moléculas del fluido [37]. En la tabla 2 se indica el diámetro de la AuNP medido en el equipo para la solución preparada con 1mL de citrato de sodio.

Figura 9. Patrón de machas obtenido en la pantalla para miles de partículas.



Fuente: Malvern® Instruments. Zetasizer nano series User manual. 5 ed. Inglaterra: Malver, 2009. p. 15-1,15-2, 13-1 y 13-2. MAN0317 [37].

Tabla 2. Diámetro y concentración de las AuNPs en solución.

Solución de AuNP	Diámetro (nm)		Concentración por ecuaciones de Wolfgang Haiss et al (nM)
	Ecuaciones de Wolfgang Haiss et al	DLS	
Preparada con 1mL de citrato	44,3	38,7	$2,5 \times 10^{-1}$

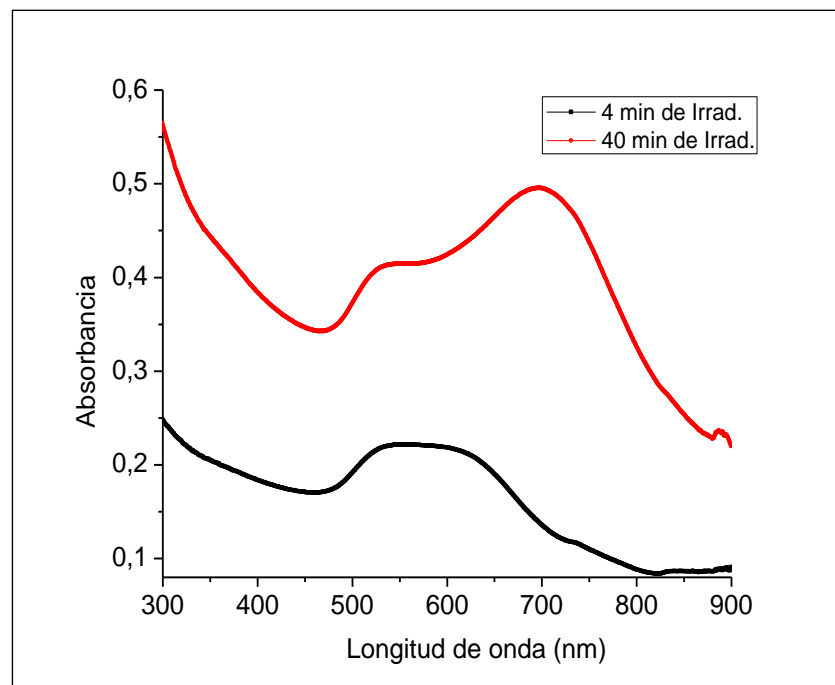
Fuente: Autora.

5.1.2 Nanopartículas de oro obtenidas por un método fotoquímico

5.1.2.1 Caracterización de las nanopartículas de oro. Las AuNPs sintetizadas por el método fotoquímico y utilizando citrato de sodio, mostraron espectros UV-Vis con dos bandas APS: una en la región del visible (transversal) y la otra cercana a la región del IRC (longitudinal). La aparición de la banda en el visible es un indicio de la generación de AuNPs esféricas por la reducción fotoquímica y la banda longitudinal probablemente puede deberse a la formación de nanopartículas de formas diferentes a la esférica. Otra evidencia que se obtuvo, para sugerir que existía la presencia de AuNPs de formas diferentes a la esférica, fue el aumento de temperatura ($\Delta T=9,4^{\circ}\text{C}$ en 8min) observado al irradiar la solución con el láser IRC de 808nm y con una potencia de 800mW. En la figura 10 se muestran los espectros de absorción UV-Vis respectivos para las soluciones AuNPs sintetizadas e irradiadas durante 4 y 40 min con la lámpara UV. Aquí se observa como al aumentar el tiempo de irradiación en la síntesis, la banda APS longitudinal se vuelve más intensa y experimenta un desplazamiento hacia el rojo (698,5nm), diferenciándose de la banda APS trasversal que se mantiene en la misma longitud de onda.

El potencial Z de las dos soluciones de AuNPs obtenidas a los 4 y 40 min de irradiación fue de **-35 y -34,2 mV** respectivamente. Estas mediciones indican que ambas soluciones son estables. Además se observa que al aumentar el tiempo de irradiación no se logra una variación significativa de la estabilidad, siendo suficiente solo 4 min de irradiación para su estabilidad. Pero, se sacrifica la obtención de nanopartículas con un plasmón longitudinal. De esta forma, será la aplicación de las AuNPs la que determine el tiempo de irradiación que se deba utilizar para su síntesis.

Figura 10. Espectros de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNPs obtenidas por el MFQ al cabo de 4 y 40 min de irradiación UV.



Fuente: Autora.

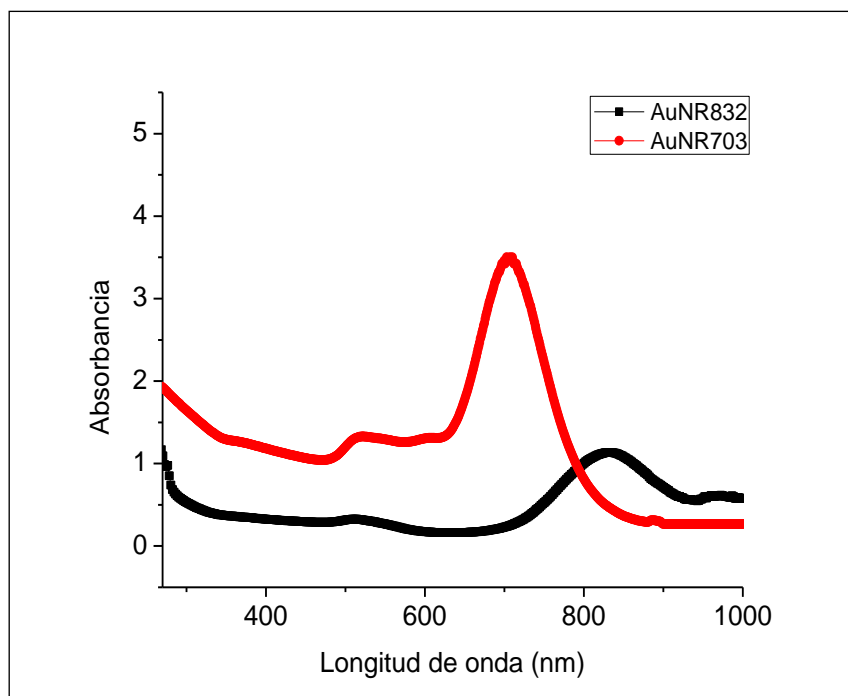
5.1.2.2 Determinación del tamaño de las nanopartículas de oro. El tamaño de las AuNP fue estimado usando el análisis por DLS. Los valores son considerados un estimativo, debido a que el equipo Zetasizer trabaja asumiendo que las partículas son esféricas. El diámetro medido fue de 72,73 y 201,8 nm para las AuNP sintetizadas con 4 y 40 min de irradiación respectivamente. Es decir, al aumentar el tiempo de irradiación se consigue aumentar el tamaño de las AuNPs.

5.1.3 Nanobarras de oro.

5.1.3.1 Caracterización de las nanobarras de oro. Los espectros UV-Vis de las soluciones de AuNRs presentaron las bandas APS, transversal y longitudinal, para nanopartículas cortas los valores de las bandas APS fueron de 539 y 703 nm respectivamente y para las nanopartículas “largas” fueron de 510 y 832nm respectivamente. Evidenciándose que la forma de dichas NPs no era únicamente esférica, además la banda APS longitudinal fue más intensa que la transversal, lo cual es característico de las AuNRs. La banda APS longitudinal de las AuNRs “largas” está más hacia el infrarrojo cercano que las AuNRs cortas, ver figura 11.

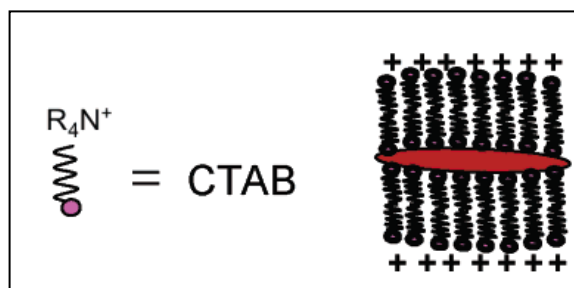
El potencial Z de las AuNRs presentó valores superiores a **+30mV**, lo cual es consistente con la carga positiva en la superficie de las barras, aportada por la bicapa de CTAB adsorbido (ver figura 12). Esto es debido a que el CTAB en la superficie de la AuNR tiene una amina cuaternaria como cabeza hidrofílica. Además estos valores de potencial Z indican que dichas soluciones son estables. En la tabla 4 se encuentra el valor de potencial Z de las AuNRs cortas y “largas”. Estos valores obtenidos están en concordancia con los resultados reportados por otros autores, como por ejemplo, las AuNRs sintetizadas por Niidome et al. cuyo potencial Z fue de $+41\pm 1\text{mV}$ [38].

Figura 11. Espectros de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNR703 (en rojo) y AuNR832 (en negro).



Fuente: Autora.

Figura 12. Esquema de la bicapa de CTAB cargado positivamente que rodea y estabiliza a las AuNRs.



Fuente: MURPHY, Catherine J.; [et al.] Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. En: J. Phys. Chem. B. 2005, Vol. 109, p. 13857-13870. [16].

5.1.3.2 Determinación del tamaño de las nanobarras de oro. Por medio del equipo Zetasizer se determinó aproximadamente el tamaño de las AuNRs preparadas. Sin embargo el tamaño también puede determinarse por medio de las imágenes SEM (en la sección 4.2.2.1 se muestra la imagen SEM de las AuNR703 y en el anexo A se puede apreciar algunas imágenes SEM de las AuNR832), obteniéndose la relación de aspecto de la nanobarra denotada por la letra R. Este valor R se obtiene al dividir el largo entre el ancho de las nanobarras. Otros trabajos han demostrado que este valor puede variar desde ~2 a ~25 y está controlado por las concentraciones relativas de los reactivos [16]. En la tabla 3 se mencionan algunos valores R de AuNRs sintetizadas por algunos autores. Aquí se puede notar la dependencia entre el valor R y la posición de la banda APS longitudinal, de tal forma que a mayor relación largo/ancho mayor es la longitud de onda asociada a la banda APS longitudinal.

Tabla 3. Valores R para AuNRs sintetizadas en diferentes trabajos.

Solución de AuNRs	Valor R	Longitud de onda de la banda APS longitudinal (nm)	Referencia
AuNR703	2,3	703	Autora
AuNR832	2,5	832	Autora
1	3,3	755	[39]
2	5,9	900	[36]
3	13	1700	[40]

Fuente: Autora.

En la tabla 4 se consigna el tamaño promedio obtenido por DLS y por SEM para las AuNR703 y AuNR832 sintetizadas.

Tabla 4. Tamaño y potencial Z de la solución de AuNRs.

Tipo de solución de AuNR	Tamaño (nm)			R	Potencial Z [mV]
	Diámetro DLS	SEM			
		Largo	Ancho		
AuNR703	8,1	46,4	19,9	2,3	+42,7
AuNR832	24,17	51,1	20,1	2,5	+54,4

Fuente: Autora.

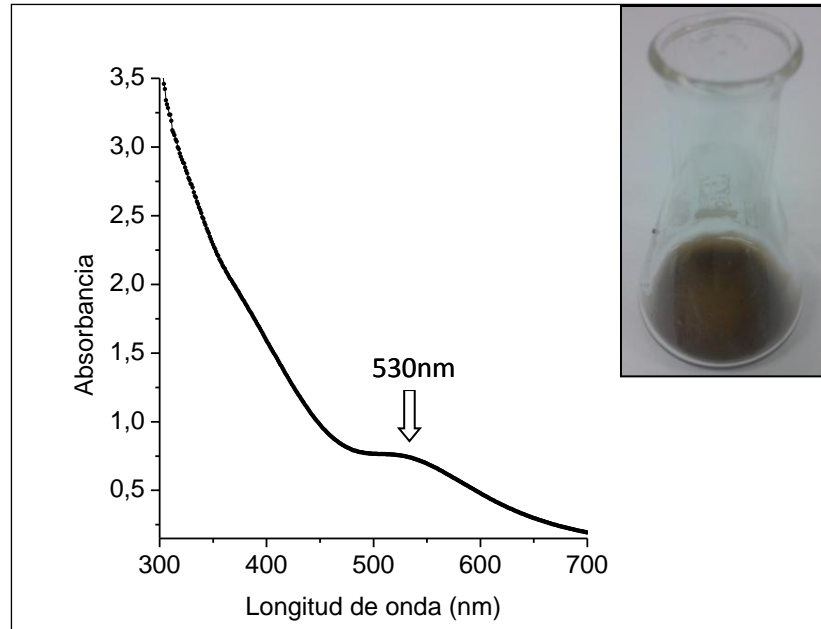
5.2 ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO

5.2.1 Nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.

5.2.1.1 Caracterización de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.

* **AuNP-AF sintetizadas por el método químico.** Las soluciones de AuNP-AF fueron analizadas por UV-Vis, observándose el espectro que se muestra en la figura 13. Aquí se evidenció una absorción alrededor de los 530nm, la cual es la banda APS característica de las AuNPs esféricas.

Figura 13. Espectro de absorción en el UV-Vis de la solución de AuNP-AF obtenida por el método químico. En el interior: fotografía de la solución de AuNP-A F.



Fuente: Autora.

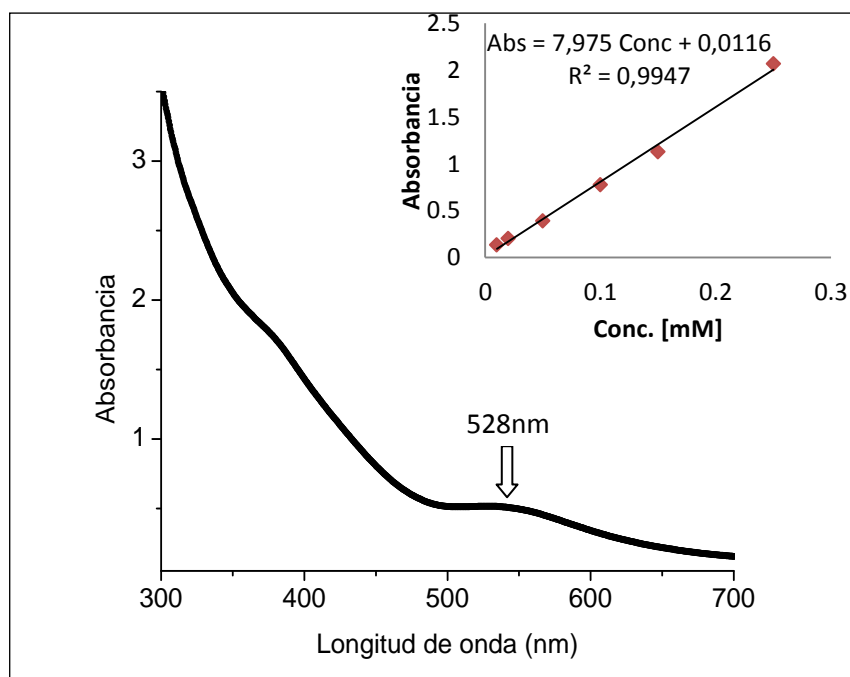
El potencial Z de la solución de AuNP-AF fue de **-0,334mV**, el cual está dentro del rango de los valores de potencial Z considerados para soluciones inestables. Así se podría esperar que en la solución de AuNP-AF preparada, se aglomeren con mayor facilidad las nanopartículas debido a que sus fuerzas de repulsión no son muy altas.

El potencial Z da información de la carga total de la superficie de las partículas, de tal forma que el valor negativo del potencial Z de la solución estudiada indica que la carga neta de la AuNP es negativa, lo cual sugiere la presencia de los grupos folatos unidos a la superficie de la AuNP, de la misma forma como lo discutieron Gaiping Li, et al. [30], ellos midieron el potencial Z de las AuNP-AF por DLS, el cual fue de $-30,6 \pm 2,0$ mV, y mencionaron que la carga superficial negativa podría

deberse a los grupos carboxilos terminales dirigidos hacia la solución circundante. Lo que puede significar que el grupo amina del AF estuviera unido a la superficie de la AuNP. Además, un enlace N-Au pudo haberse formado en este sistema.

* **AuNP-AF sintetizadas por el método fotoquímico.** Se analizó por UV-Vis la solución de AuNP-AF y se obtuvo el espectro que se muestra en la figura 14. Este espectro tiene la banda APS característica de las AuNPs (528nm), evidenciando la formación de AuNPs esféricas.

Figura 14. Espectro de absorción en el UV-Vis de la solución de AuNP-AF obtenida por el MFQ. En el interior: la curva de calibración del AF, con su respectiva ecuación, usada para estimar la cantidad de ácido fólico.

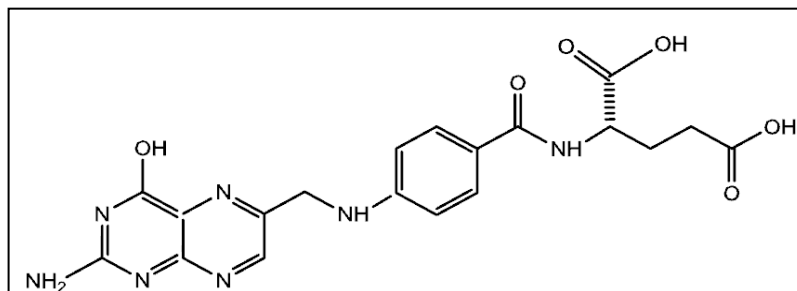


Fuente: Autora.

El precipitado que se forma durante la síntesis de las AuNPs justo antes de ajustar el pH a 10,41 fue analizado por espectroscopia IR. En la figura 16 se muestran los espectros IR del AF y del precipitado de AuNP-AF. El análisis UV-Vis de las agua de lavado comprobaron que no había presencia de AuNP-AF en el líquido de la mezcla de reacción, de esta forma se concluyó que las AuNP-AF debían formar el precipitado.

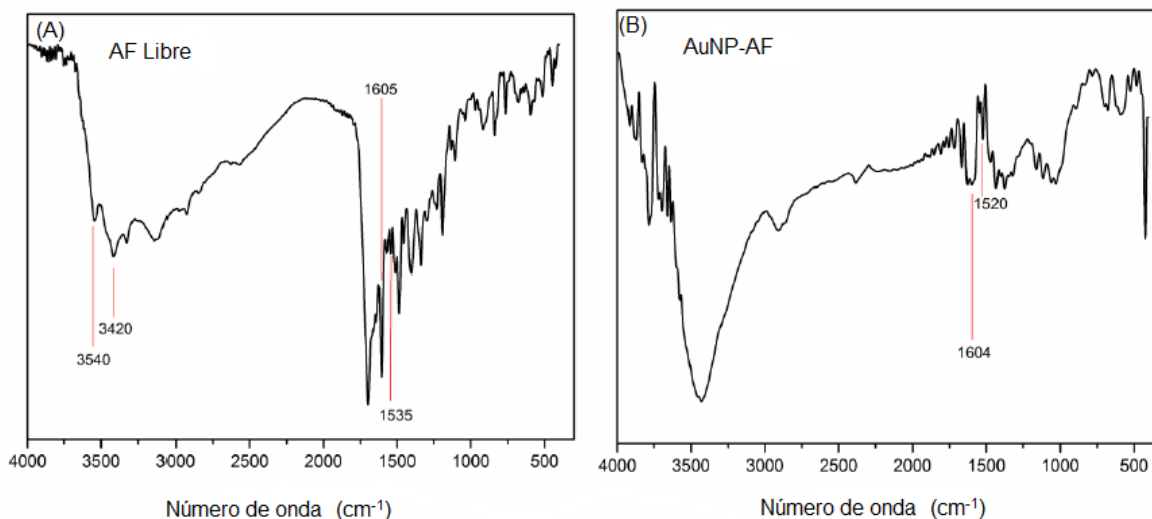
Al observar los espectros de absorción en el IR del AF libre y del conjugado AuNP-AF, se puede notar diferencias en el espectro, ver la figura 16A; la presencia de las bandas entre 3600 y 3400 cm^{-1} debidas a tensiones de los grupos hidroxilo (OH) y amino (NH) del AF libre, no se reconocen en la nanopartícula funcionalizada (ver figura 16B). Se ha mencionado que los átomos de oro pueden interactuar con grupos carboxílicos y aminos por coordinación o quelación [30], lo cual impediría la presencia de estas bandas. En concordancia, el AF es una molécula que presenta grupos carboxílicos y aminos (ver figura 15) disponibles para interactuar con el oro. Los picos de absorción IR a 1605 (vibración tipo flexión del enlace N-H) y 1635 cm^{-1} (vibración tipo tensión del C=O) del AF libre podrían estar presentes en el espectro de la AuNP-AF, pero no es muy claro dado al nivel de resolución y así evidenciar la presencia de una unión del AF a la AuNP. De igual manera se podría indicar que en el intervalo de vibraciones entre 1464 y 1535 cm^{-1} debidas al anillo benceno del AF, no se observa con suficiente claridad su presencia en el caso de AuNP-AF.

Figura 15. Estructura química del AF.



Fuente: Autora.

Figura 16. Espectros IR del AF y del precipitado de AuNP.



Fuente: Autora.

5.2.1.2 Estudio de la estabilidad de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico sintetizadas por el método fotoquímico.

Por tratarse de una síntesis particular, se hizo un estudio más exhaustivo de la estabilidad de solución de AuNP-AF, mediante mediciones del potencial Z para

diferentes tiempos después de la síntesis. En la tabla 5 se encuentran los valores de potencial Z de la solución de AuNP-AF medidos en el equipo Zetasizer.

La presencia de los valores de potencial Z de carga negativa, evidencia la posible funcionalización de las AuNPs con el AF, dado que corresponden a valores más negativos de -30mV, indicando que las soluciones son estables. Sin embargo, se observa que la estabilidad de la solución empieza a estabilizarse a medida que pasan los días ya que el potencial Z se hace más negativo, obteniéndose un valor máximo a los 26 días. Pero luego el potencial Z se vuelve menos negativo, indicando que las fuerzas repulsivas (debidas a las cargas negativas de las AuNP-AF) entre las partículas se están haciendo menores. Esta disminución de fuerzas causa que las partículas en la solución coloidal se agreguen en mayor proporción.

Tabla 5. Potencial Z de la solución de AuNP-AF a diferentes días después de la síntesis.

Tiempo [días]	Potencial Z (mV)
7	-39,6
22	-42,6
26	-46,5
42	-39,2
60	-35,9
73	-35,4

Fuente: Autora.

5.2.1.3 Determinación del tamaño y concentración de las nanopartículas de oro esféricas funcionalizadas con ácido fólico.

* **AuNP-AF sintetizadas por el método químico.** El diámetro de las AuNP-AF determinado por DLS fue de 76,7nm mientras que el calculado por medio de las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al. fue de 48,8nm. Esta posible diferencia puede deberse a que el equipo Zetasizer está incluyendo en la medida del diámetro de la NP a la longitud del AF que está unido a ella, cosa que no se hace con las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al., donde solo se reporta es el diámetro del núcleo metálico.

El valor de la concentración de la solución de AuNP-AF fue de 6×10^{-3} nM. Este valor fue calculado usando las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al.

* **AuNP-AF sintetizadas por el método fotoquímico.** El diámetro de las AuNP-AF fue determinado por DLS. En la tabla 6 se muestra el diámetro de las AuNP-AF en función del tiempo después de su síntesis.

Se observa que a medida que transcurre el tiempo de medición los valores del diámetro de partícula de la solución de AuNP-AF son cada vez más grandes, lo cual se puede deber a la aglomeración de las AuNP-AF. Es notorio al mismo tiempo que a partir del día 42 el potencial Z empieza a volverse menos negativo y por lo tanto las NPs empiezan a perder su fuerza de repulsión y se aglomeran.

La figura 17 muestra las imágenes SEM de una solución de AuNP-AF al primer día y después de 40 días de su síntesis. Aquí se observa que las NPs en el día 40 se

encuentran formando aglomerados, en contraste con la distribución individual que presentó en el primer día de síntesis.

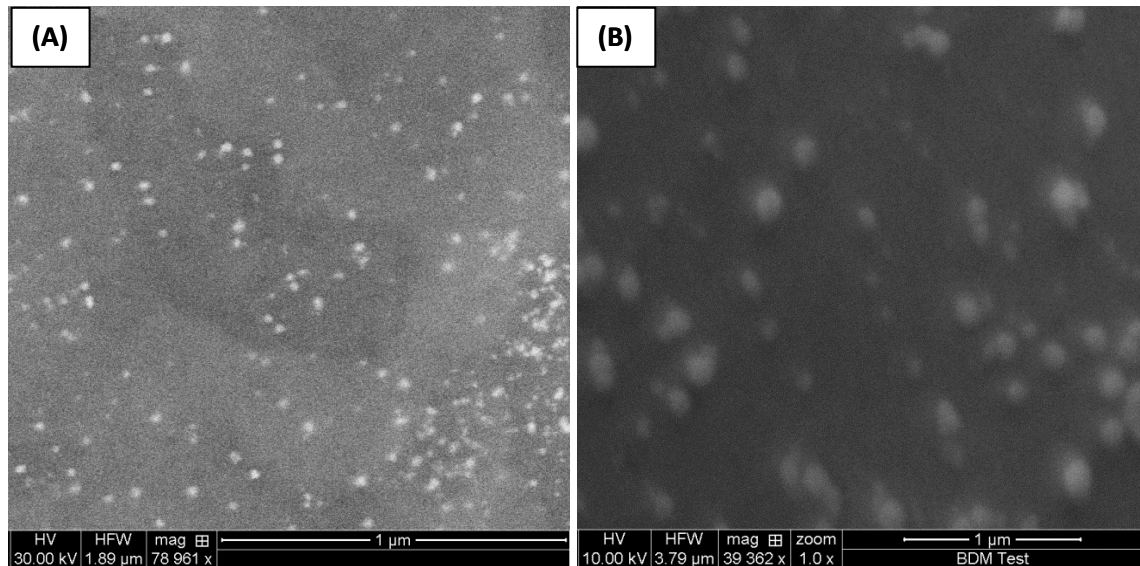
El diámetro calculado por las ecuaciones de Wolfgang Haiss et al. para la solución de AuNP-AF en los primeros días de su síntesis (7 días) fue de 44,3nm y la concentración de la solución de AuNP-AF fue de 0,122nM. Por otro lado la concentración de AF en la solución de AuNP-AF fue de 0,2mM, valor determinado por medio de la curva de calibración del AF que se muestra en el interior del espectro UV-Vis de la figura 14. Aclarando que la concentración de AuNP-AF está expresa en función de la cantidad de NPs formadas, y que en cambio la concentración de AF está expresa en función del AF total (libre y unido a la NP) en la solución de AuNP-AF.

Tabla 6. Diámetro de las AuNP-AF (medido por DLS) en diferentes días después de la síntesis.

Tiempo [días]	Diámetro, d (nm)
7	40,39
22	42,04
26	46,41
42	193,4
60	139,2
73	146

Fuente: Autora.

Figura 17. Imágenes SEM de la solución de AuNP-AF al primer día (A) y al día 40 de su síntesis.



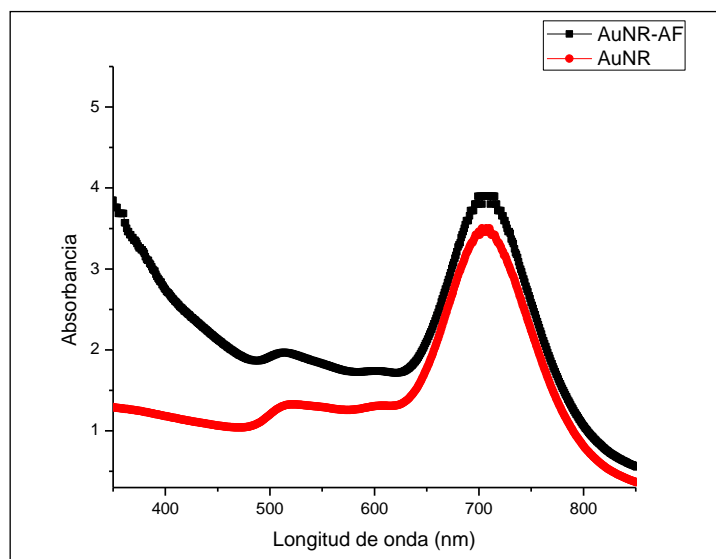
Fuente: Autora.

5.2.2 Nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico.

5.2.2.1 Caracterización de las nanobarras de oro funcionalizadas con ácido fólico. La solución del conjugado AuNR-AF fue analizada por UV-Vis y el espectro obtenido se compara con el espectro UV-Vis de la solución de AuNRs de la cual se partió para la síntesis del conjugado, ver figura 18.

Las AuNR703 tienen una débil banda de plasmón transversal a 512nm y una fuerte banda de plasmón longitudinal a 703nm. Estas bandas APS también están presentes en el espectro de las AuNR703-AF, como se muestra en la figura 18.

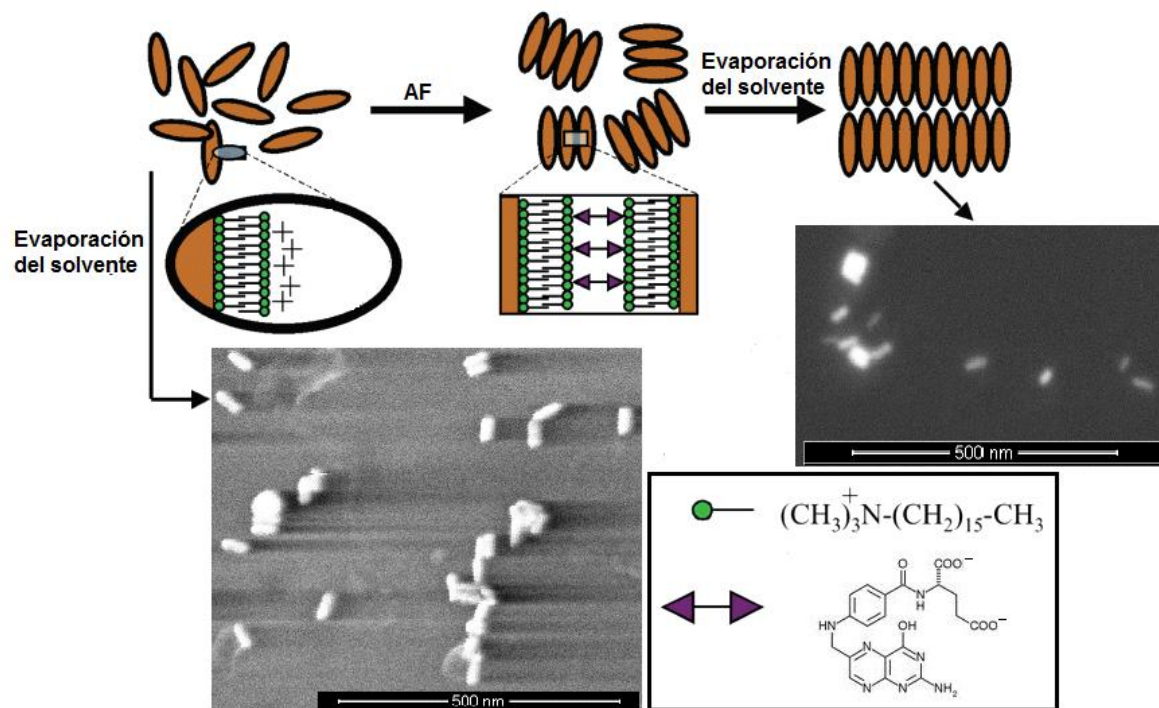
Figura 18. Espectro de absorción en el UV-Vis de las soluciones de AuNR703 (en rojo) y AuNR703-AF (en negro).



Fuente: Autora.

El potencial Z obtenido para la solución de AuNR-AF fue mayor (55,4 y 58,7 mV para las nanopartículas cortas y “largas” respectivamente) al de las nanobarras sin funcionalización (42,7 y 54,4 mV para las cortas y “largas” respectivamente), indicando posiblemente un aumento de la carga positiva de las AuNRs al funcionalizarse con el AF. La razón puede estar asociada a la unión de varias barras, para tal efecto se propone el modelo explicado en la figura 19. De esta forma, la presencia del AF en la superficie de la AuNRs puede disminuir el efecto de repulsión entre las cargas positivas de las moléculas de CTAB, ocasionando que nuevas moléculas de CTAB se adhieran a la superficie de la AuNR aumentando así la carga positiva de las AuNR-AF con respecto a las AuNRs sin funcionalizar.

Figura 19. Nanobarras cubiertas de CTAB son ensambladas lado a lado usando AF.

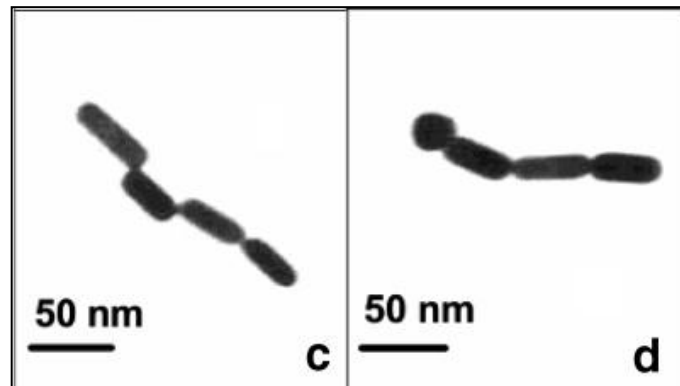


Fuente: Adaptada de MURPHY, Catherine J.; [et al.] Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. En: J. Phys. Chem. B. 2005, Vol. 109, p. 13857-13870. [16].

El modelo que se explica en la figura 19 plantea la formación de ensambles de AuNRs. El ensamble de nanopartículas coloidales para construir materiales interesantes para sus potenciales aplicaciones ha sido sujeto de gran interés recientemente [13]. Super redes de nanopartículas pueden ser obtenidas por evaporación lenta del solvente en el cual están disueltas las nanopartículas monodispersas [13]. El ensamble de extremo a extremo de las nanobarras (ver figura 20) es un requerimiento muy atractivo para diversas aplicaciones. El campo eléctrico en los extremos de las nanobarras, tras la excitación de los plamones, se

calcula que es grande y debería ser útil para mejorar la fluorescencia o Raman superficial en aplicaciones de detección [16].

Figura 20. Imágenes TEM de ensamblajes extremo a extremo de AuNRs.



Fuente: BURDA, Clemens; [et al.] Chemistry and Properties of Nanocrystals of different Shapes. En: Chem. Rev. 2005, Vol. 105, p. 1025-1102.

5.2.2.2 Determinación del tamaño de los ensamblajes de nanobarras de oro con el ácido fólico. El equipo Zetasizer permitió conocer preliminarmente el tamaño promedio de los ensamblajes de AuNR703-AF formados por la funcionalización de las nanopartículas con el ácido fólico. El diámetro medido para los ensamblajes estuvo entre 30 y 117nm para las AuNR703.

Posteriormente, se realizaron mediciones en el microscopio electrónico de barrido para conocer el tamaño de los mencionados ensamblajes AuNR703-AF. Este tamaño concordó con el determinado por DLS ya que estuvo entre los valores de 40 y 100 nm como se muestra en las imágenes SEM en el anexo B.

5.2.3 Estudio de la emisión de fluorescencia de nanopartículas de oro esféricas y barras funcionalizadas con ácido fólico. Una evidencia adicional de la funcionalización de las AuNPs (sintetizadas por el MFQ) y AuNR703 con el AF fue mediante la espectroscopia de fluorescencia. Al comparar los espectros de emisión de fluorescencia (EF) de las AuNP-AF y AuNR703-AF con el espectro de AF libre (cada solución de AF libre debe tener la misma concentración del AF en la solución de NP respectiva), usando como longitud de onda de excitación 364nm, se puede notar que existe una modificación en la intensidad de EF cuando la NP está asociada al AF. La figura 21 muestra los resultados de la caracterización de la funcionalización de las AuNPs y AuNR703 funcionalizadas con AF.

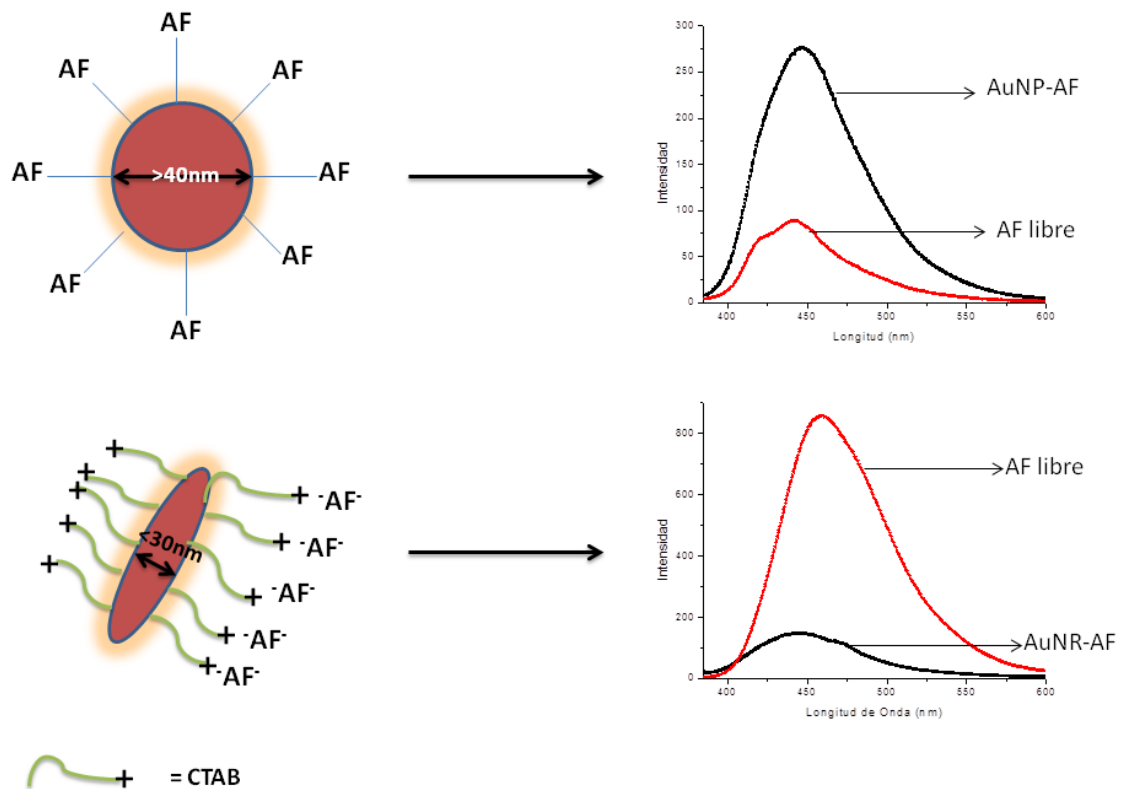
Al observar el espectro de EF de las AuNP-AF y del AF libre se puede notar que la intensidad de la emisión es mucho mayor para la AuNP-AF que para el AF libre, es decir, se logra un efecto de aumento de la EF del AF. Se ha indicado un estudio acerca del aumento de la EF al enlazar una proteína con AuNPs. Este trabajo demostró que las AuNPs con diámetros mayores o iguales a 40 nm mejoraban la Fluorescencia de los fluoróforos con una distancia de separación entre la molécula y la superficie metálica menor a 4nm, y explicó que el aumento de la EF es atribuido principalmente al incremento del campo eléctrico cerrado en la NP metálica inducido por la luz incidente [41]. En analogía con el estudio mencionado es probable que en el presente trabajo el efecto del aumento de la Fluorescencia este asociado el efecto de la asociación AF-AuNP y al diámetro de partícula, el cual es de 40,39nm en promedio. Además se esperaría que la distancia entre el AF y la superficie de la NP sea menor a 4nm, favoreciendo la formación de un enlace estable entre el AF y el oro, tal como es sugerido por la literatura [30].

Por otro lado, para las nanobarras el espectro EF de las AuNR703-AF indica que la unión de la AuNR703 al AF provoca un efecto de apagamiento de la

Fluorescencia debido a la presencia del AF. Estudios realizados indican que el EF de un fluoróforo ubicado a una distancia cercana ($<10\text{nm}$) a la superficie de coloides (con diámetros menores a 30nm) sufre un efecto de apagamiento, debido a la transferencia no radiativa de energía desde el estado excitado del fluoróforo a la superficie metálica [41]. Como se observó el ancho promedio de las AuNR703-AF fue de $19,9\text{nm}$, razón por la cual se puede presentar una transferencia de energía. Sin embargo para que esto ocurra la distancia entre el AF y la superficie de la NP debe ser menor a 10nm , lo cual está en concordancia con el espesor observado de la bicapa de CTAB de $\sim 4\text{nm}$ [42], ya que el CTAB separa el AF de la superficie metálica y por lo tanto su longitud es equivalente a la distancia entre el AF y la superficie de la NP.

Cuando un compuesto absorbe energía éste debe emitir dicha luz, a través de dos procesos luminiscentes como la fluorescencia y la fosforescencia [43]. Sin embargo, también existen diversos procesos no radiativos que le permiten al compuesto regresar al estado fundamental, como son: la relajación vibracional, la conversión interna (transición no radiativa entre estados del mismo espín inducida por colisiones) y el cruce de sistemas [43] (ver figura 22). Estos procesos ocurren, por lo general, de forma más rápida que la emisión de fotones, por lo que es más probable que una molécula excitada vuelva al estado fundamental mediante mecanismos de desactivación no radiantes que radiantes.

Figura 21. Espectros de fluorescencia observados para los dos sistemas. Arriba, el sistema AuNP-AF junto con el modelo de la partícula funcionalizada que modifica la intensidad del espectro. Abajo, el sistema AuNR-AF con su modelo de partícula, para interpretar el efecto de apagamiento del EF por la presencia del AF.

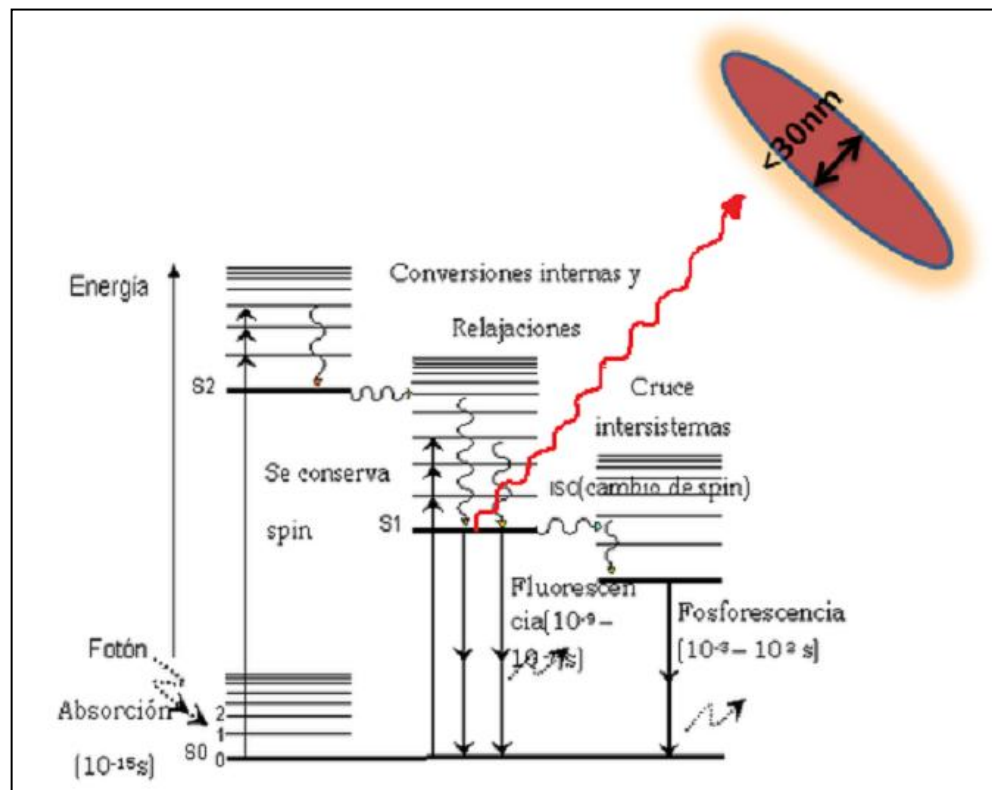


Fuente: Autora.

Para que ocurra la fluorescencia, el resto de mecanismos que compiten en el proceso de relajación deben actuar de forma ineficiente, o sea, deben tener una constante de velocidad baja [43]. Como se describe en el diagrama de Jablonski, ver la figura 22, la fluorescencia ocurre cuando un fotón excita a un electrón desde su estado electrónico basal (S_0) a un estado de mayor energía (dependiente de la energía de la luz incidente), llamado "singulete". Después de la excitación pueden

ocurrir diversos procesos de relajación hasta que el electrón excitado regresa al estado fundamental y produce la emisión de fluorescencia, cuya intensidad decae rápidamente con tiempos del orden de nanosegundos hasta microsegundos. Entonces, cuando un fluoróforo (el AF para este caso) está unido a la NP (AuNR703) la energía desde el estado electrónico excitado del fluoróforo no se emite en forma de un fotón sino que se transfiere a la superficie de la NP de forma no radiativa, así como se ilustra en la figura 22.

Figura 22. Diagrama típico de Jablonski y la interacción con una AuNR.

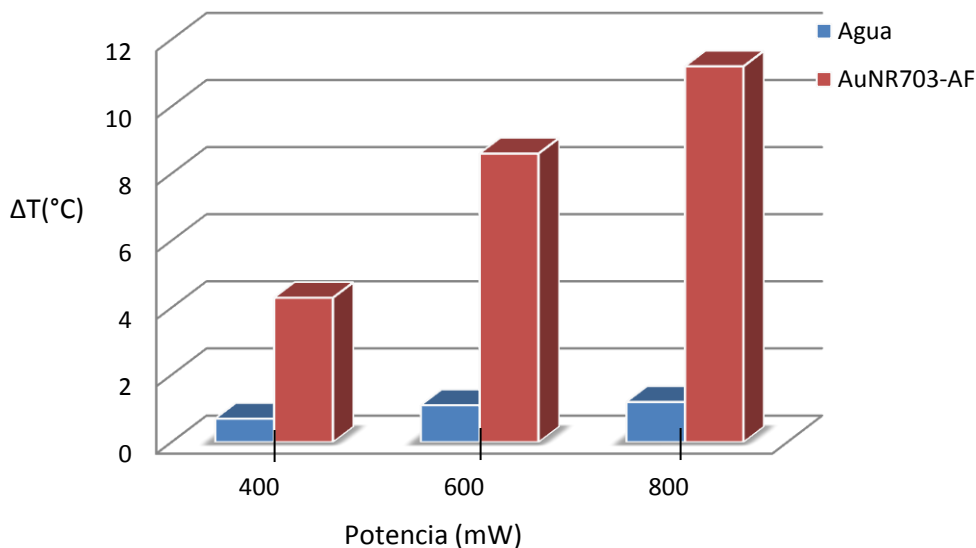


Fuente: adaptado de Laboratorio de Nanotecnología. <http://www.labnano.org.mx/esp%20espectroscopia%20de%20fluo.htm>. Fecha de consulta: 7 de Agosto de 2012.

5.3 ESTUDIO DE LA FOTOACTIVACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO

La primera solución estudiada fue la solución de AuNR703-AF más concentrada (solución 1). Para esta solución se evaluaron tres valores de potencia del láser: 400, 600 y 800mW, con los cuales se observó que el mayor calentamiento se obtiene con la potencia de 800mW ($\Delta T = 11,2^{\circ}\text{C}$ en 10 min, $1,12^{\circ}\text{C}/\text{min}$), ver figura 23.

Figura 23. Calentamiento de: una solución de AuNR703-AF y agua como control, en presencia de radiación IRC con diferentes potencias de emisión. Para la solución 1.



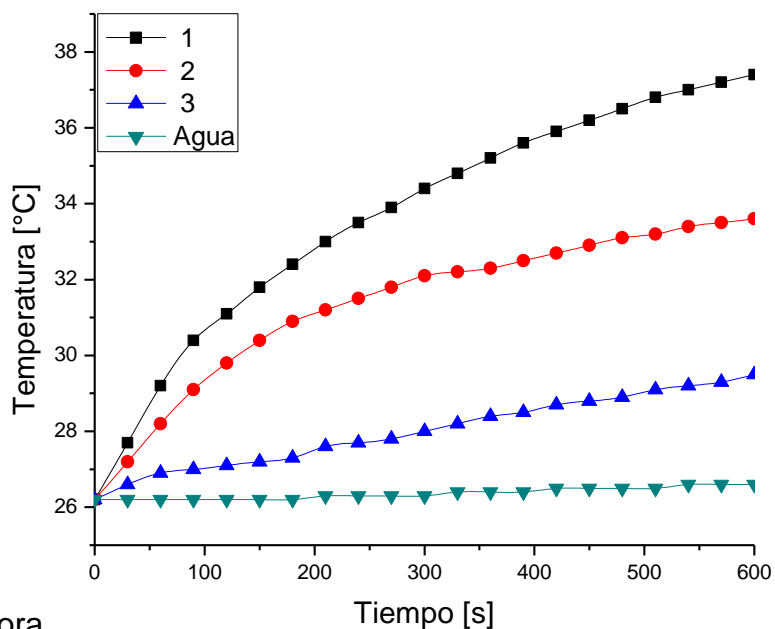
Fuente: Autora.

Al comparar el efecto de la irradiación (con una potencia de 800mW) sobre las tres soluciones de AuNR703-AF con concentraciones diferentes (soluciones 1, 2 y 3),

se observa que a mayor concentración de nanobarras el aumento de temperatura es mayor. Así, el mejor calentamiento se obtuvo con la solución de AuNR703-AF número 1, ver figura 24.

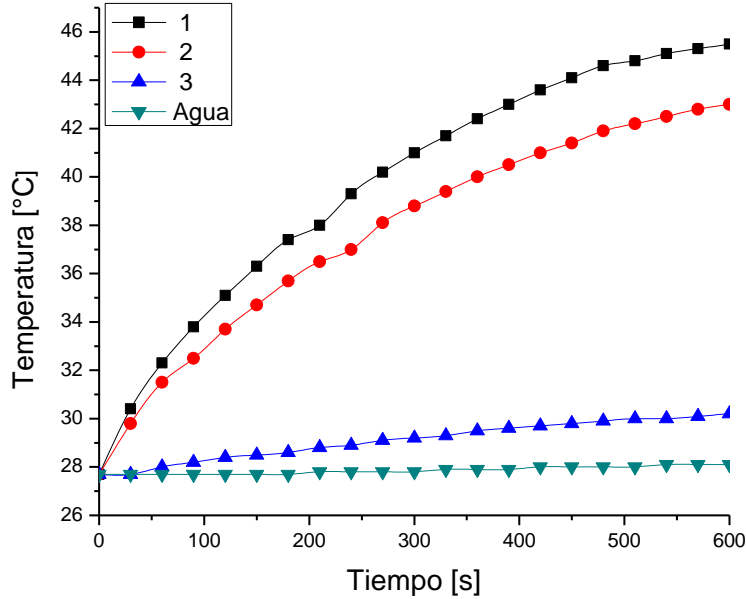
De la misma forma para las soluciones de AuNR832-AF (soluciones 1, 2 y 3), se obtuvo que el mayor calentamiento se consigue con la solución AuNR832-AF número 1 ($\Delta T = 17,8^\circ\text{C}$ en 10 min, $1,78^\circ\text{C}/\text{min}$), ver figura 25.

Figura 24. Calentamiento de las soluciones AuNR703-AF con diferentes concentraciones al irradiarse con un laser de 808 nm (IRC) durante 10 min con una potencia de 800 mW.



Fuente: Autora.

Figura 25. Calentamiento de las soluciones AuNR832-AF con diferentes concentraciones al irradiarse con un laser de 808 nm (IRC) durante 10 min con una potencia de 800 mW.



Fuente: Autora.

Al comparar los resultados del aumento de temperatura obtenidos para las soluciones de AuNR703-AF y AuNR832-AF, se puede notar que el mayor aumento de temperatura ($\Delta T = 17,8^{\circ}\text{C}$ en 10 min) se consigue con la solución de NRs con una mayor longitud de onda de la banda APS longitudinal, 832nm. Debido a que las bandas APS están determinadas por la forma de las partículas, el ambiente dieléctrico y la distancia entre partículas [13], se puede concluir que: el tamaño de las barras con ancho=14,9nm y largo=45,3nm (valores determinados por medio de imágenes SEM, se calculó el ancho y el largo promedio de 14 NRs) y la concentración de la solución 1 son los parámetros necesarios para que se pueda obtener la banda APS longitudinal de 832nm, y por ende el mejor aumento de temperatura. Con esta solución de AuNR832-AF, se logra un mejor acople entre

las longitudes de onda de: emisión del diodo láser y plasmón longitudinal de las NRs.

Se debe indicar que al no coincidir totalmente la longitud de onda de excitación del laser con la longitud de onda del plasmon de la nanopartícula, el aumento de la temperatura no es tan elevado, sin embargo se observa un aumento de la temperatura de la solución en presencia de la nanopartícula con respecto al blanco, en el cual no hay un aumento significativo de la temperatura.

Por otro lado, los resultados de aumento de temperatura obtenidos aquí no son tan altos como los de algunos trabajos reportados, como por ejemplo, el de Elliott et al., en el cual se logró un aumento de temperatura de 21°C de tejidos incrustados con nanocapas de oro, al irradiar el sistema durante 3min con un láser IRC de una potencia de 1,5W [44]. Sin embargo esta diferencia en los resultados obtenidos con los de la literatura se debe a que la potencia del láser usado en este trabajo fue más baja que la que estos utilizaron, por ende es posible mejorar el aumento de temperatura de las soluciones de NPs utilizando un láser IRC con una potencia mayor a 800mW.

6. CONCLUSIONES

Se sintetizaron AuNPs esféricas estabilizadas con citrato. Se pudo controlar el tamaño de partícula en función directa de la posición de la banda APS. Entre mayor cantidad de agente reductor (citrato de sodio) usada en la mezcla de reacción, mayor era el diámetro de partícula obtenido.

Se sintetizaron AuNRs estabilizadas con CTAB. El tamaño de partícula se pudo controlar cambiando las cantidades y concentraciones de algunos reactivos usados en la síntesis. Entre mayor fue la longitud de onda de la banda APS longitudinal, mayor era el largo de las barras.

Se obtuvieron algunas evidencias indirectas de la funcionalización de AuNPs esféricas con el AF por medio de espectroscopia IR, de emisión de fluorescencia y mediciones del potencial Z. La síntesis de este conjugado se llevó a cabo por medio de un método químico. La banda APS observada estuvo posicionada a 530 nm y el tamaño promedio obtenido fue de 76,7nm.

Mediante un método fotoquímico se obtuvo en solución de AuNP-AF esféricas. La banda APS estuvo ubicada a 528 nm y el diámetro de partícula promedio fue de 40,39nm. Esta solución de AuNP-AF mostró ser estable hasta 73 días después de su síntesis.

También se evidenció indirectamente la funcionalización de las nanopartículas AuNR-AF por medio de espectroscopia de emisión de fluorescencia y mediciones

del potencial Z. Además se propuso un modelo de ensambles de AuNR por medio del AF. Se obtuvieron ensambles con tamaños entre 40 y 100nm para las AuNR703.

Se logró aumentar la temperatura de una solución de AuNR832-AF ($\Delta T = 17,8^{\circ}\text{C}$) al irradiarla con el diodo láser de 808 nm con una potencia de 800mW por 10 min.

7. RECOMENDACIONES

Las AuNR-AF sintetizadas con el método propuesto en esta investigación, fueron debidamente caracterizadas y se obtuvieron evidencias de la funcionalización. Sin embargo el estudio del tamaño de los ensambles formados solo se pudo determinar para las AuNR703-AF y no para las AuNR832-AF. Sería ideal poder analizar por medio de microscopia electrónica el tamaño de los ensambles AuNR832-AF.

Sería interesante utilizar una fuente IRC que pudiese suministrar una mayor potencia que la utilizada en este trabajo (800mW), ya que como se demostró: entre mayor es la potencia suministrada mayor es el efecto de calentamiento de las soluciones de AuNR-AF. Así, se podría obtener un mayor calentamiento usando incluso las AuNR703-AF. Usar las AuNR703-AF sería ideal para los fines biológicos, debido a que estos ensambles tienen tamaños nanométricos.

BIBLIOGRAFÍA

[1] ECHEVERRY, María C.; [et al.] GUÍAS DE PROMOCIÓN DE LA SALUD Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES EN LA SALUD PÚBLICA. En: 21. Guía de atención de la leishmaniasis. Ministerio de la protección Social. p. 175-213.

[2] ZHANG, Zhaowu; [et al.] Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. En: Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010, Vol. 18, p. 5528–5534.

[3] HE, Hua; XIE, Chao; REN, Jicun. Nonbleaching Fluorescence of Gold Nanoparticles and Its Applications in Cancer Cell Imaging. En: Anal. Chem. 2008, Vol. 80, p. 5951-5957.

[4] MAKSIMOVA, Irina L.; [et al.] Near-infrared laser photothermal therapy of cancer by using gold nanoparticles: Computer simulations and experiment. En: Medical Laser Application. 2007, Vol. 22, p. 199–206.

[5] CARDINAL, Jon.; [et al.] Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. En: Surgery. 2008, Vol. 144, p. 125-132.

[6] ROMERO, Marlyn; SÁNCHEZ, Jorge A. Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. En: Biosalud. 2007, Vol. 6, p. 99-111.

[7] JHAVERI, Mona S.; WAGNER, Conrad; TREPEL, Jane B. Impact of Extracellular Folate Levels on Global Gene Expression. En: Mol Pharmacol. 2011, Vol. 60, p.1288-1295.

[8] KAMEN, Barton A.; SMITH, Angel K. A Review of Folate Receptor Alpha Cycling and 5-Methyltetrahydrofolate Accumulation with an Emphasis on Cell Models in vitro. En: Adv. Drug Delivery Rev. 2004, Vol. 56, p. 1085-1097.

[9] SHUKLA, Ravi; [*et al.*] Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. En: Langmuir. 2005, Vol. 21, p. 10644-10654.

[10] DANIEL, Marie-Christine; ASTRUC, Didier. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. En: Chem. Rev. 2004, Vol. 104, p. 293-346.

[11] PAN, Yu; [*et al.*] Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. En: Small. 2007, Vol. 3, no. 11, p. 1941-194.

[12] GOODMAN, Catherine M.; [*et al.*] Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. En: Bioconjugate Chem. 2004, Vol. 15, p. 897-900.

[13] BURDA, Clemens; [*et al.*] Chemistry and Properties of Nanocrystals of different Shapes. En: Chem. Rev. 2005, Vol. 105, p. 1025-1102.

[14] JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A. Au nanoparticles target cancer. En: Nano Today. 2007, Vol. 2, p. 19-29.

[15] LIZ-MARZAN, Luis M. Nanometals: formation y color. En: Materials Today. 2004, Vol. 2, p. 26-31.

[16] MURPHY, Catherine J.; [et al.] Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. En: J. Phys. Chem. B. 2005, Vol. 109, p. 13857-13870.

[17] HUANG, Wei-Chieh; CHEN, Yu-Chie. Photochemical synthesis of polygonal gold nanoparticles. En: J. Nanopart Res. 2008, Vol. 10, p. 697-702.

[18] HOSTETLER, Michael J.; [et al.] Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. En: Langmuir. 1998, Vol.14, p. 17-30.

[19] AMENDOLA, Vincenzo. Synthesis of gold and silver nanoparticles for photonic applications. Tesis de doctorado en ingeniería de materiales. Padua: Universita´Degli Studi di Padova. Facultad de ciencias, 2008. 21-22 p.

[20] FAN, Jinda, CHEN, Shaowei W.; GAO, Yong. Coating gold nanoparticles with peptide molecules via a peptide elongation approach. En: Colloids Surf., B Biointerfaces. 2003, Vol. 28, p. 199-207.

[21] Hwu, Jln R. Targeted Paclitaxel by Conjugation to Iron Oxide and Gold Nanoparticles. En: J. Am. Chem. Soc. 2009, Vol. 131, p. 66-68.

[22] WEININGER J, STERMITZ F. Química Orgánica. Barcelona: Reverté S.A., 1988. 538 p.

[23] SOGORB M, GISBERT E. Técnicas analíticas de contaminantes químicos. España: Díaz de Santos S.A., 2004. 87 p.

[24] ZHANG, Zhi-juan; [et al.]. Fluorescent Property of Gold Nanoparticles with Different Surface Structures. En: Chinese Journal of Chemical Physics. 2007, Vol. 20, p. 796-800.

[25] SKOOG D, West D. Fundamentos de química analítica. 8 ed. Madrid: Thomson, 2005. 823 p.

[26] SABÍN F., Juan D. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Tesis de doctorado en física. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Física, 2007. 67 p.

[27] HERNÁNDEZ, Hector; ESPEJO, Edgar. Mecánica de fractura y análisis de falla. 1 ed. Bogotá D.C.:El Malpensante S.A. Universidad Nacional de Colombia, 2002. 238 p.

[28] HUANG, Xiaohua; [et al.] Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanoparticles. En: J. Am. Chem. Soc. 2006, Vol. 128, p. 2115-2120.

[29] EL-SAYED, Ivan H.; HUANG, Xiaohua; EL-SAYED, Mostafa A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. En: Cancer Lett. 2006, Vol. 239, p. 129–135.

[30] LI, Gaiping; [et al.]. One-Step Synthesis of Folic Acid Protected Gold Nanoparticles and Their Receptor-Mediated Intracellular Uptake. En: Chem. Eur. J. 2009, Vol. 15, p. 9868–9873.

[31] HUFF, Terry B. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. En: Nanomedicine. 2007, Vol. 2, p.125-132.

[32] MCFARLAND, Adam; [et al.]. Color My Nanoworld. En: Journal of Chemical Education. 2004, Vol. 81, p. 544A-544B.

[33] ALEKSEEVA, Anna; [et al.]. Preparation and optical scattering characterization of gold nanorods and their application to a dot-immunogold assay. En: Applied Optics. 2005, Vol. 44, p. 6285-6295.

[34] NIKOOBAKHT, Babak; EL-SAYED, Mostafa. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. En: Chem. Mater. 2003, Vol. 15, p. 1957-1962.

[35] HAISS, W; [et al.]. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. En: Anal. Chem. 2007, Vol. 79, p. 4215-4221.

[36] NAVARRO, Patricia. Estudio de suspensiones de Zirconato de Bario en medio acuoso. Tesis de pregrado en química. Zaragoza: Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial de Zaragoza. Departamento de Química, 2010. 7 p.

[37] Malvern® Instruments. Zetasizer nano series User manual. 5 ed. Inglaterra: Malver, 2009. p. 15-1,15-2, 13-1 y 13-2. MAN0317.

[38] NIIDOME, Takuro; [et al]. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. En: journal of controlled release. 2006, Vol. 114, p. 343-347.

[39] LIAO, Hongwei; HAFNER, Jason. Gold nanorod bioconjugates. En: Chem. Mater. 2005, Vol. 17, p. 4636-4641.

[40] OBARE, Sherine; [et al]. Preparation of polystyrene- and silica-coated gold nanorods and their use as template form the synthesis of hollow nanotubes. En: Nano Letters. 2001, Vol. 1, p. 601-603.

[41] ASLAN, Kadir; *[et al.]*. Metal-Enhanced Fluorescence from Gold Surfaces: Angular Dependent Emission. En: J Fluoresc. 2007, Vol. 17, p. 7-13

[42] GABUDEAN, Ana; *[et al.]*. Gold Nanorods Performing as Dual-Modal Nanoprobes via Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). En: The journal of physical chemistry. 2012, Vol. 116, p. 12240-12249.

[43] GARCÍA, Beatriz. Sensores químicos cromogénicos y fluorogénicos para la detección de iones y moléculas neutras. Tesis de doctorado en química. Valencia: Universidad politécnica de Valencia. Departamento de Química, 2007. 6-7 p.

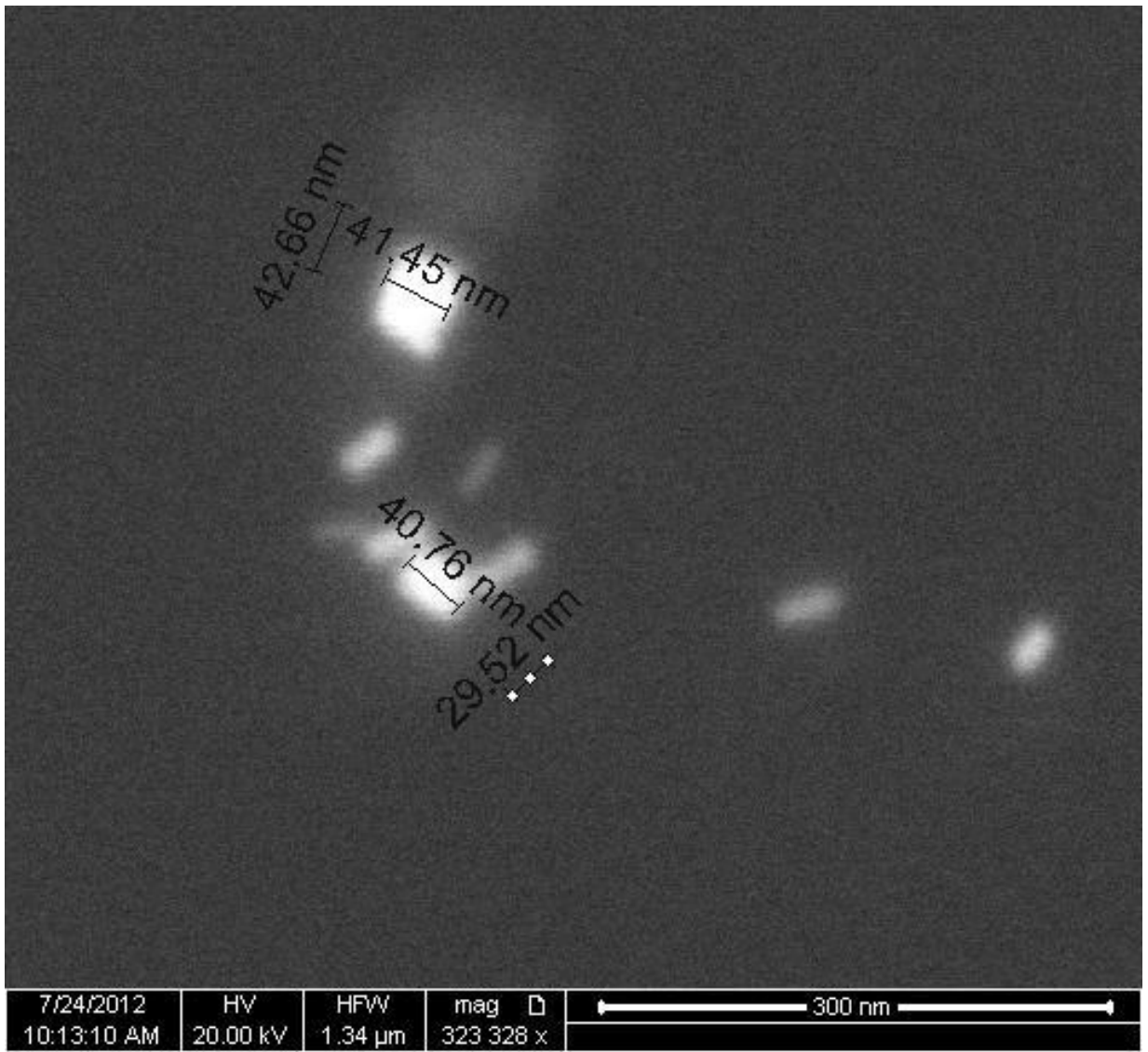
[44].KENNEDY, Laura; *[et al.]*. A New Era for Cancer Treatment: Gold NanoparticleMediated Thermal Therapies. En: Small. 2010, Vol. 10, p. 1-15.

Anexo A. Imagen SEM de las AuNR832.



ANEXO B. Imágenes SEM de los ensambles AuNR703-AF.





Anexo C. Certificados de participación en eventos.



Escuela de Química | Facultad de Ciencias



Universidad Industrial de Santander

**I Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Química Pura y Aplicada
XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química - UIS 2012
CONLEQ - ENEQUIM**



Organiza:
ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA

**LA ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA
Y
LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

CERTIFICAN QUE:

Linda Esperanza Bertel Garay
C.C : 1,102,828,187

Participó
En calidad de Ponente Oral

I CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA - UIS 2012
Realizado los días 6,7,8 y 9 de noviembre de 2012 en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander




Dra. Sofia Pinzón Durán
Decana Facultad de Ciencias


Dr. Hermisul de Jesús Cano Calle
Director Escuela de Química


John Alexander Gómez Álvarez
Presidente ASEQ





Escuela de Química | Facultad de Ciencias | Universidad Industrial de Santander

I Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Química Pura y Aplicada XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química - UIS 2012 CONLEQ - ENEQUIM

Organiza:

ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA

LA ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA
y
LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

CERTIFICAN QUE:

Linda Esperanza Bertel Garay
C.C : 1,102,828,187

Participó

En calidad de Ponente Oral

XIV ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA - UIS 2012
Realizado los días 6,7,8 y 9 de noviembre de 2012 en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander



Dra. Sofía Pinzón Durán
Decana Facultad de Ciencias



Dr. Hermínsul de Jesús Cano Calle
Director Escuela de Química



Johan Alexander Gómez Álvarez
Presidente ASEQ



Estefanni Caguazango Montenegro
Presidenta ANEQ















