

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO CON QUITOSANA COMO AGENTE REDUCTOR Y
ESTABILIZADOR**

Tesis para optar el Título de **Licenciada en Química**, que presenta la bachiller:

Katherinne Isabel Requejo Roque

ASESOR: Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, mayo del 2014

RESUMEN

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido la elaboración de nanomateriales para su uso en diversas áreas como óptica, catálisis, electrónica y medicina. En la actualidad, el control del tamaño, forma, composición y estabilidad de las nanopartículas sigue siendo un desafío para ciertas aplicaciones por lo que continúan las investigaciones sobre la síntesis y caracterización de nanomateriales. Entre las nanopartículas metálicas, las de oro (nAu) son consideradas las más estables aunque los métodos de síntesis tradicionales involucran el uso de reactivos tóxicos para el medio ambiente o para su uso en medicina. En el presente trabajo se obtuvieron nAu por medio de un método de síntesis verde que utilizó el biopolímero quitosana como agente reductor y estabilizador. Estas nanopartículas de oro con quitosana fueron caracterizadas por técnicas microscópicas y espectroscópicas.

En primer lugar, se sintetizaron nAu en solución acuosa por medio de la reducción de iones Au^{3+} con quitosana bajo calentamiento y agitación constante. Mediante la caracterización por espectroscopía UV-Vis, se evaluaron distintos parámetros como relación molar quitosana/ Au^{3+} , tiempo de reacción, temperatura, pH y concentración de ambos reactivos en la formación y estabilidad de las nAu. Las nAu iniciaron su formación dentro de los 20 minutos de reacción, siendo estables aquellas con relación molar quitosana/ Au^{3+} desde 95/1 hasta 367/1 que fueron sintetizadas a pH 4,46, a 75°C y con concentraciones de quitosana y HAuCl_4 de 0,27% (w/v) y $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L, respectivamente. Asimismo, para las nAu estables se observó una banda de plasmones de superficie a 522 nm. A partir de las técnicas de TEM, ELS y AFM, se concluyó que las nAu son esféricas, monodispersas, poseen tamaño entre 10 y 15 nm y su superficie tiene carga positiva.

En segundo lugar, y a modo de comparación, se sintetizaron nAu con otros agentes reductores como los monómeros de quitosana (D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina), glucosa y citrato de sodio con las condiciones de reacción reportadas en la literatura para la obtención de nAu estables. Para las síntesis con los monómeros de quitosana y glucosa se observó la reducción de los iones Au^{3+} más no la estabilización de las nAu formadas pero para la síntesis con citrato de sodio se obtuvieron nAu estables a pH 6. Luego se logró obtener a pH 4,46 nAu con quitosana y citrato al mismo tiempo para compararlas con las nAu con quitosana.

Por último, se llevó a cabo la reducción en fase heterogénea, para lo que se utilizaron perlas y películas de quitosana para la síntesis de nAu. Se observó una ligera diferencia en la velocidad de reacción a los distintos pH (4 y 8). Para las perlas de quitosana y las de quitosana entrecruzadas con epíclorhidrina la velocidad de reducción fue comparable con la de la reducción homogénea. En general, una mayor porosidad de la estructura favoreció la formación de nAu de manera más homogénea, siendo las películas las que tardaron más tiempo en formar nAu.



FACULTAD DE
CIENCIAS E
INGENIERÍAPONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ**TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA**

TÍTULO : "Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con quitosana como agente reductor y estabilizador"

ÁREA : Materiales

ASESOR : Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

ALUMNO : Katherinne Isabel Requejo Roque

CÓDIGO : 20062345.9

FECHA : 26 de Setiembre de 2012

NUMERO : 183

**DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:**

En la actualidad, las nanopartículas de metales como el oro tienen gran interés debido a que sus propiedades físicas, químicas y biológicas pueden ser aprovechadas en diversas aplicaciones como catálisis, tratamiento de aguas, electrónica, óptica y medicina. Por ejemplo, en el ámbito de la biotecnología, las nanopartículas de oro pueden utilizarse como agente fotosensibilizador en terapia fotodinámica para tratamiento del cáncer, o también como biosensor. En catálisis, dichas nanopartículas se emplean como catalizadores heterogéneos para reacciones redox en el caso de la oxidación de CO y CH₃OH, la reducción de O₂ y para hidrogenaciones de sustratos insaturados.

Estos nanomateriales pueden ser sintetizados mediante reducción química, fotoquímica o empleando técnicas electroquímicas. En la actualidad, se busca desarrollar métodos de síntesis verde ya que comúnmente las nanopartículas metálicas requieren de reactivos agresivos o tóxicos, que son perjudiciales no solo para el medio ambiente sino también para su uso en ciertas aplicaciones. La síntesis verde de nanopartículas de oro puede llevarse a cabo utilizando el biopolímero quitosana. Como se sabe, este polisacárido, además de ser soluble en agua, es biocompatible, biodegradable y no tóxico. Además, la ventaja de emplear quitosana está en que sirve no sólo como agente reductor sino que también estabiliza las nanopartículas formadas, lo cual podría influir en el tamaño de las nanopartículas producidas.

En este trabajo se estudiará la formación de nanopartículas de oro utilizando quitosana, la cual reducirá al catión metálico Au³⁺ y estabilizará las partículas formadas. Durante la síntesis, se analizará el efecto de los siguientes parámetros: relación molar quitosana:Au³⁺, tiempo de reacción, temperatura y pH, tanto en la formación de las nanopartículas como en su estabilidad. Para la caracterización del producto se utilizará espectroscopía UV-Vis (banda de plasmones de superficie) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar la forma, tamaño y distribución de las partículas.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR:

FIRMA DEL COORDINADOR:

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mis abuelos por sus consejos y por los gratos momentos compartidos. A mis padres Agurio y Maximina por su amor, ejemplo y apoyo incondicional. A mis hermanos, Kevin y Antoni por encontrar la ocasión para hacerme sonreír y por las agradables conversaciones que nos ayudan a crecer.

A mi asesor Javier Nakamatsu por su apoyo constante, dedicación y sugerencias durante la realización de la tesis. Asimismo, muchas gracias por sus interrogantes sobre el tema que me motivaron a seguir investigando en el área de nanotecnología.

A Daniel Cerrón por su trabajo en la extracción y caracterización de la quitosana utilizada en esta tesis. A Milka Cajahuanca por su colaboración y paciencia durante las mediciones por UV-Vis e IR. Al Ing. Alex Nieva por su tiempo en la realización de los experimentos de ^1H -RMN.

A la Dra. Yulán Hernández por sus consejos, por compartir su conocimiento acerca de la síntesis de nanopartículas y por ayudarme en la caracterización de las muestras por TEM. A la Dra. Suyeon Kim por su contribución en la caracterización de las muestras por ELS. A los profesores Betty Galarreta, Omar Troncoso y Fernando Torres por enseñarme los principios del AFM y por permitirme utilizar el equipo para los extensos análisis.

A Cristhian Cañari por su cariño, comprensión, consejos, por confiar en mí en todo momento y por impulsarme a conseguir mis más anhelados sueños.

A los integrantes de los Laboratorios de Investigación 211 y 212 por su amistad y por los momentos compartidos durante los años de estudio y la realización de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ABREVIATURAS	IX
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	1
1.2 Nanomateriales.....	2
Nanopartículas de oro	3
1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de oro	6
1.3.1 Métodos de síntesis tradicionales	7
1.3.2 Métodos de síntesis verde	9
Quitosana en la síntesis de nanopartículas.....	9
1.4 Formación y estabilidad de nanopartículas de oro	14
1.4.1 Nucleación y crecimiento	14
1.4.2 Estabilidad de nanopartículas	16
1.5 Caracterización de nanopartículas metálicas	17
1.5.1 Técnicas de microscopía	17
1.5.2 Técnicas espectroscópicas	19
1.5.2.1 Banda de plasmones de superficie localizados	19
1.5.2.2 Estimación del tamaño y concentración de nanopartículas de oro por espectroscopía UV-Vis	23
1.5.3 Otras técnicas de caracterización	24
1.6 Objetivos del trabajo	24
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
2.1 Reactivos, Materiales y Equipos	25
2.1.1 Reactivos y Materiales	25
2.1.2 Equipos.....	26
2.2 Metodología	27
2.2.1 Preparación de soluciones de quitosana y H _{Au} Cl ₄ en buffer.....	27
2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro con quitosana y caracterización por espectroscopía UV-Vis	27

2.2.2.1	Efecto de la relación molar Qna/Au ³⁺	28
2.2.2.2	Efecto del tiempo de reacción	29
2.2.2.3	Efecto de la temperatura	29
2.2.2.4	Efecto del pH.....	29
2.2.2.5	Efecto de la concentración de Qna-Au ³⁺	30
2.2.3	Caracterización de nanopartículas de oro con quitosana	30
2.2.3.1	Caracterización por UV-Vis	30
2.2.3.2	Caracterización por TEM.....	31
2.2.3.3	Caracterización por ELS.....	31
2.2.3.4	Caracterización por AFM.....	31
2.2.3.5	Caracterización por IR y ¹ H-RMN	32
2.2.4	Síntesis de nanopartículas de oro con otros agentes reductores y caracterización por espectroscopía UV-Vis.....	32
2.2.4.1	Síntesis y caracterización de nAu con monómeros de quitosana	32
2.2.4.2	Síntesis y caracterización de nAu con D-glucosa	33
2.2.4.3	Síntesis y caracterización de nAu con citrato trisódico	33
2.2.5	Comparación de la viscosidad intrínseca de quitosana, nAu-Qna y nAu-Qna-citrato.....	34
2.2.6	Reducción heterogénea con perlas y película de quitosana.....	34
2.2.6.1	Preparación de perlas de quitosana	34
2.2.6.2	Entrecruzamiento de perlas de quitosana con epíclorhidrina.....	35
2.2.6.3	Entrecruzamiento de perlas de quitosana con glutaraldehído	35
2.2.6.4	Preparación de película de quitosana.....	35
2.2.6.5	Síntesis de nAu con perlas y películas de quitosana	35
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1	Espectros UV-Vis de soluciones de quitosana y H ₂ AuCl ₄ en buffer	36
3.2	Síntesis de nanopartículas de oro con quitosana y caracterización por espectroscopía UV-Vis.....	37
3.2.1	Efecto de la relación molar Qna/Au ³⁺	37
3.2.2	Efecto del tiempo de reacción	45
3.2.3	Efecto de la temperatura	49
3.2.4	Efecto del pH	57
3.2.5	Efecto de la concentración de Qna-Au ³⁺	59
3.3	Caracterización de nanopartículas de oro con quitosana	62

3.3.1	Caracterización por UV-Vis	62
3.3.2	Caracterización por TEM	63
3.3.3	Caracterización por ELS	68
3.3.4	Caracterización por AFM	70
3.3.5	Caracterización por IR y ¹ H-RMN	74
3.4	Síntesis de nanopartículas de oro con otros agentes reductores y caracterización por espectroscopía UV-Vis	78
3.4.1	Síntesis y caracterización de nAu con monómeros de quitosana	78
3.4.2	Síntesis y caracterización de nAu con D-glucosa	79
3.4.3	Síntesis y caracterización de nAu con citrato trisódico	80
3.5	Comparación de la [η] de quitosana, nAu-Qna y nAu-Qna-citrato	83
3.6	Reducción heterogénea con perlas y película de quitosana	85
3.6.1	Entrecruzamiento de perlas de quitosana con epíclorhidrina	85
3.6.2	Entrecruzamiento de perlas de quitosana con glutaraldehído	86
3.6.3	Síntesis de nanopartículas de oro con perlas y películas de quitosana	86
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	88
4.1	Conclusiones	88
4.2	Recomendaciones	89
5.	BIBLIOGRAFÍA	91
6.	ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variación de las propiedades ópticas de nAu con el tamaño (De izquierda a derecha aumenta el tamaño de partícula).....	4
Figura 2. Polímeros utilizados como agentes reductores y protectores.....	8
Figura 3. Estructura del biopolímero quitosana. Unidad GluNac (x) enlazada a unidad GluN (y). Si x es mayor o igual a 90%, la estructura correspondería al polímero de quitina.	10
Figura 4. Quitosana como agente reductor: a) Hidrólisis en medio ácido de la quitosana a glucosamina, b) Equilibrio de glucosamina a cadena abierta y c) Oxidación del grupo aldehído a ácido carboxílico (oxígeno proviene del agua).	13
Figura 5. Espectro IR de quitosana oxidada por H _{Au} Cl ₄	14
Figura 6. Mecanismo de nucleación-crecimiento para nanopartículas de oro.	15
Figura 7. Doble capa eléctrica de una nanopartícula con carga negativa.....	17
Figura 8. Interacción de la luz con la superficie de una nanopartícula metálica.	20
Figura 9. Influencia del tamaño de nAu esféricas en la banda de plasmones de superficie.	21
Figura 10. Efecto de agregación de nAu en la banda de plasmones de superficie localizados.....	22
Figura 11. Espectros UV-Vis de soluciones de quitosana en buffer NaOAc/HOAc.....	36
Figura 12. Espectro UV-Vis de solución de H _{Au} Cl ₄ 1,58 x 10 ⁻⁴ mol/L en NaOAc/HOAc.	37
Figura 13. Soluciones de nAu a diferentes relaciones molares Qna/Au ³⁺	39
Figura 14. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au ³⁺ 10/1.....	40
Figura 15. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au ³⁺ 20/1 (T.amb.).	41
Figura 16. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 20/1 (2°C).....	41
Figura 17. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au ³⁺ 50/1 (T.amb.)	42
Figura 18. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 (2°C).....	42

Figura 19. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au ³⁺ 85/1 (T.amb.).	43
Figura 20. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 85/1 (2°C).	43
Figura 21. Espectros UV-Vis de nAu con diferentes relaciones molares Qna/Au ³⁺ .	44
Figura 22. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a diferentes relaciones molares.	44
Figura 23. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a distintos tiempos de reacción.	46
Figura 24. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 50/1 sintetizadas a distintos tiempos de reacción a 75°C.	46
Figura 25. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintos tiempos de reacción.	47
Figura 26. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 sintetizadas a diferentes tiempos de reacción a 75°C.	47
Figura 27. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a diferentes tiempos de reacción.	48
Figura 28. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 300/1 sintetizadas a distintos tiempos de reacción a 75°C.	48
Figura 29. Valores de longitud de onda en función al tiempo de reacción.	49
Figura 30. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.	51
Figura 31. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a 1 hora de reacción para 75°C y 100°C.	52
Figura 32. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.	53
Figura 33. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a 1 hora de reacción para 50°C, 75°C y 100°C.	53
Figura 34. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a 75°C y 100°C.	53
Figura 35. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.	54
Figura 36. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a 1 hora de reacción para 50°C, 75°C y 100°C.	55

Figura 37. Espectros UV-Vis normalizados de nAu con relación molar 300/1 a 1 hora de reacción para 75°C y 100°C.....	55
Figura 38. Efecto de relación molar Qna/Au ³⁺ 50/1, 100/1, 300/1 en la formación de nAu según tiempo de reacción y temperatura.	56
Figura 39. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintos pH.....	58
Figura 40. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a pH 4,46 y 5.....	59
Figura 41. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 sintetizadas a diferentes concentraciones Qna-Au ³⁺ a 75°C.....	60
Figura 42. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintas concentraciones Qna-Au ³⁺ , 1 hora de reacción.....	61
Figura 43. Valores de absorbancia de la banda de plasmones de superficie en función de la [Au ³⁺].	61
Figura 44. Imágenes del TEM de nAu con relación molar Qna/Au ³⁺	63
Figura 45. Imagen del TEM de nAu con sal NaOAc.	64
Figura 46. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 50/1 para N=200.	65
Figura 47. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 85/1 para N=200.	65
Figura 48. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 150/1 para N=200.	66
Figura 49. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 300/1 para N=200.	66
Figura 50. a) Imagen del AFM de soporte limpio de mica, b) perfil y c) 3D.....	70
Figura 51. a) Imagen del AFM de un recubrimiento de quitosana sobre mica, b) perfil y c) 3D.	71
Figura 52. a) y b) Imágenes del AFM de nAu-Qna sobre mica con relación molar Qna/Au ³⁺ 85/1, c) perfil y d) 3D (dilución 1:10).....	72
Figura 53. a) y b) Imágenes del AFM de muestra de nAu-Qna (lavada) sobre mica con relación molar Qna/Au ³⁺ 85/1, c) perfil y d) 3D (dilución 1:10).	73
Figura 54. Espectros IR de quitosana y nAu-Qna en pastilla de KBr.....	75

Figura 55. Espectro ^1H -RMN de quitosana liofilizada en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C .	76
Figura 56. Espectro ^1H -RMN de nAu-Qna liofilizada en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C .	77
Figura 57. Asignación de protones en estructura de la quitosana.	77
Figura 58. Espectros UV-Vis de nAu-monómeros de quitosana con relación molar monómero/ Au^{3+} 85/1	79
Figura 59. Espectros UV-Vis de nAu-monómeros de quitosana con relación molar monómero/ Au^{3+} 300/1	79
Figura 60. Espectro UV-Vis de nAu-D-glucosa con relación molar glucosa/ Au^{3+} 85/1.	80
Figura 61. Espectro UV-Vis de nAu con citrato/ Au^{3+} 10/1	81
Figura 62. Espectros UV-Vis normalizados de nAu-Qna y nAu-Qna-citrato con relación molar Qna/ Au^{3+} 100/1 (ambos casos) y citrato/ Au^{3+} 3,5/1	82
Figura 63. Valores de η_{red} en función de la [Qna].	83
Figura 64. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución + citrato + Au^{3+} (antes de reacción).	84
Figura 65. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución nAu-Qna-citrato (después de reacción).	84
Figura 66. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución nAu-Qna.	85
Figura 67. Entrecruzamiento de quitosana con epiclorhidrina.	85
Figura 68. Entrecruzamiento de quitosana con glutaraldehído.	86

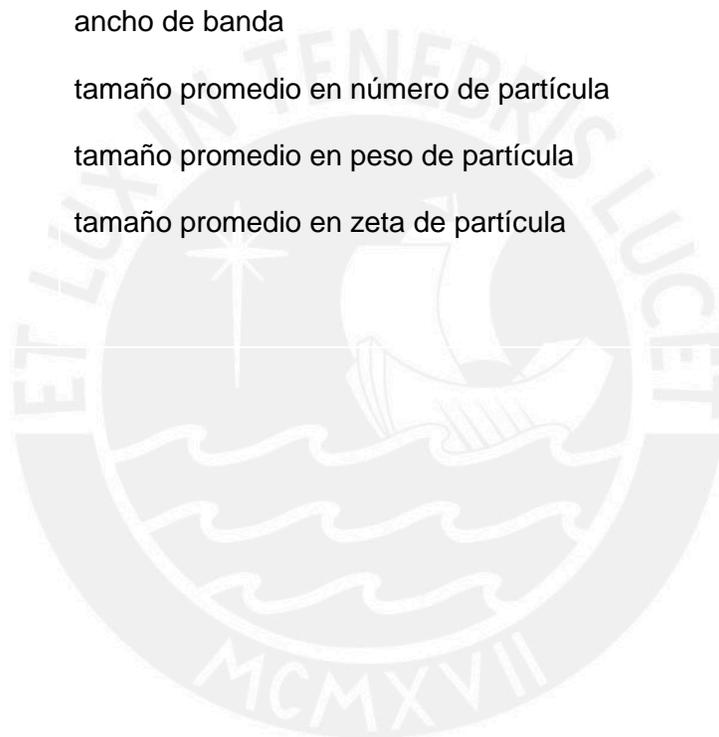
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de relación molar Qna/Au ³⁺	28
Tabla 2. Valores de concentración Qna-Au ³⁺	30
Tabla 3. Valores de concentración y relación molar monómero/Au ³⁺	33
Tabla 4. Valores de banda de plasmones de superficie según relación molar Qna/Au ³⁺ y estabilidad a temperatura ambiente.....	38
Tabla 5. Valores de banda de plasmones de superficie según relación molar Qna/Au ³⁺ y estabilidad a 2°C.	38
Tabla 6. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para dos relaciones molares en función del tiempo a 50°C.	50
Tabla 7. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para tres relaciones molares en función del tiempo a 75°C.	50
Tabla 8. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para tres relaciones molares en función del tiempo a 100°C.	51
Tabla 9. Valores de banda de plasmones de superficie al término de la reacción según concentración Qna-Au ³⁺ con relación molar 100/1.	60
Tabla 10. Diámetro de nAu a partir de espectros UV-Vis.....	62
Tabla 11. Concentración de nAu a partir de espectros UV-Vis.	63
Tabla 12. Tamaños promedios de nAu según relación molar para N=200 (TEM).	67
Tabla 13. Número de átomos de Au por nAu a partir de TEM y espectros UV-Vis.	68
Tabla 14. Valores de potencial zeta de soluciones de nAu-Qna.....	69
Tabla 15. Dimensiones de nAu-Qna con Qna/Au ³⁺ 85/1 a partir de AFM.	72
Tabla 16. Dimensiones de nAu-Qna (lavada) con Qna/Au ³⁺ 85/1 a partir de AFM.....	73
Tabla 17. Desplazamientos químicos δ para núcleos de ¹ H de quitosana y nAu-Qna en D ₂ O/DCl a 25°C.	77

ABREVIATURAS

A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
cP	centipoise
DDA	grado de desacetilación
ELS	Dispersión de luz electroforética
GluN	D-glucosamina
GluNAc	N-acetil-glucosamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de protón
IR	Infrarrojo
M_v	peso molecular promedio en viscosidad
MW	peso molecular
mM	milimolar
N	número de partículas
nM	nanomolar
$[\eta]$	viscosidad intrínseca
nAu	nanopartículas de oro
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
nm	nanómetros
η_{red}	viscosidad reducida
η_{sp}	viscosidad específica
Qna	quitosana
$\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$	relación molar (moles de unidades repetitivas de Qna/moles de Au^{3+})

s	desviación estándar
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Vis	Ultravioleta Visible
μL	microlitros
v	volumen
w	peso
λ	longitud de onda
$\Delta\lambda$	ancho de banda
\bar{X}_n	tamaño promedio en número de partícula
\bar{X}_w	tamaño promedio en peso de partícula
\bar{X}_z	tamaño promedio en zeta de partícula



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

La ciencia de los materiales es un área que abarca la investigación, el diseño y la fabricación de materiales como cerámicos, polímeros, metales y materiales no cristalinos con la finalidad de otorgarles aplicaciones en diversos ámbitos. En los últimos años, la ciencia de los materiales ha desarrollado una nueva tecnología, un campo de estudio interesante, que es la nanotecnología. Esta tecnología avanzada comprende la síntesis, caracterización, procesamiento y aplicaciones de nanomateriales [1, 2]. Los nanomateriales obtenidos pueden ser de distinto tamaño, forma y de una, dos o tres dimensiones a nanoescala según el método de síntesis elegido. Por tal motivo, la caracterización es fundamental para entender sus novedosas propiedades físicas, químicas y biológicas las cuales se distinguen de los materiales macroscópicos [3].

Las nanopartículas de metales nobles Ag, Au y Cu poseen una larga historia pues existen evidencias de su presencia como colorante en cerámicos y en vitrales, y de su uso en el tratamiento de algunas enfermedades [4, 5]. Por ejemplo, estudios de microscopía electrónica de transmisión han determinado que la copa de Lycurgus fabricada a base de vidrio durante el imperio romano, así como algunos vitrales de las catedrales de la Edad Media, poseen nanopartículas de oro y plata [6]. Además, en el siglo XVII se reportó por primera vez la obtención y uso de coloides de oro para el diagnóstico de la sífilis [7]. En la actualidad, las investigaciones se basan en la optimización de métodos de síntesis de nanopartículas que permitan controlar el tamaño, forma, dispersión y estabilidad ya que estos factores influyen en sus propiedades ópticas, térmicas, electrónicas y catalíticas. Por otra parte, como algunas técnicas emplean reactivos tóxicos que generan residuos contaminantes para el medio ambiente, se busca el desarrollo de métodos verdes con reactivos y solventes no tóxicos. Estos métodos no solo minimizan efectos adversos para el medio ambiente sino que también reducen riesgos biológicos para las distintas aplicaciones en medicina [8].

De esta manera, la presente investigación tiene como objetivo sintetizar nanopartículas de oro mediante el método verde de reducción química con el biopolímero quitosana y

caracterizarlas por técnicas espectroscópicas y microscópicas. La ventaja de utilizar quitosana está en que actúa tanto como agente reductor y como estabilizador de la superficie de las nanopartículas de oro. Además, este biopolímero posee alta biodegradabilidad, biocompatibilidad, elevada actividad antimicrobiana, no es tóxico y es obtenido a partir de fuentes naturales de gran disponibilidad [9].

1.2 Nanomateriales

Una de las investigaciones de síntesis de nanopartículas de oro más resaltantes a mediados del siglo XIX fue la de Michael Faraday quien reportó por primera vez la síntesis de coloides de oro por medio de la reducción del complejo $[\text{AuCl}_4]^-$ con fósforo en un sistema de dos fases. Posteriormente, Faraday estudió las propiedades ópticas de películas delgadas de coloides de oro mediante la compresión mecánica con lo cual observó cambios en la coloración de púrpura a verde [7]. Un siglo después, en 1960, Feynman publicó en un artículo la posibilidad de reducir los componentes electrónicos a niveles de menor escala con el objetivo de almacenar mayor información. Con el avance de la tecnología de transistores y la aplicación de la ley de Moore, la manufactura de materiales a escala cada vez más pequeña contribuyó con el desarrollo de la nanotecnología. Desde 1990, el uso de métodos de microscopía de imagen ha permitido la visualización de nanomateriales y el inicio de investigaciones para controlar su elaboración de manera más precisa [10].

Los nanomateriales son materiales con tamaño comprendido entre 1 y 100 nm al menos en una de sus dimensiones [4]. Poseen gran diversidad química ya que pueden ser metales, óxidos metálicos, polímeros, materiales de carbono y semiconductores. Asimismo, presentan gran variedad de formas, como esferas, cilindros, cubos, discos, tubos, barras, esferas huecas, estructuras núcleo-capa protectora, anillos, alambres, prismas y pirámides [5, 11, 12]. Ejemplos de nanomateriales con una dimensión a nanoescala son las películas finas y monocapas, por otra parte, los nanotubos de carbono y nanoalambres tienen dos dimensiones a nanoescala mientras que las nanopartículas, fullerenos, dendrímeros y puntos cuánticos (quantum dots) poseen sus tres dimensiones a nanoescala [4].

Estas dimensiones hacen que los nanomateriales posean propiedades físicas y químicas únicas y que los diferencian de los materiales de la misma composición pero

de mayores dimensiones [2, 13, 14]. Estas propiedades son diferentes porque los nanomateriales presentan una gran área superficial por unidad de volumen lo cual los hace más reactivos por la alta proporción de átomos en la superficie y porque los nanomateriales poseen confinamiento cuántico que les otorga propiedades ópticas y mejora las propiedades electrónicas y magnéticas [4, 5].

En la actualidad, existen dos aproximaciones para la obtención de nanomateriales. La aproximación *top-down* consiste en la reducción del tamaño de un material macroscópico por medio de técnicas físicas como litografía, grabado, pulverización [2] o deposición física de vapor la cual se emplea para producir películas finas [11]. En cambio, la aproximación *bottom-up* se refiere a la formación de nanoestructuras a partir de precursores atómicos o moleculares mediante síntesis química o auto-ensamblaje [4]. Durante la elaboración de nanomateriales es fundamental el control del tamaño, forma, estructura, composición, uniformidad y pureza, ya que estos factores influyen en sus propiedades [2].

Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas son sistemas a nanoescala interesantes, fáciles de sintetizar y modificar químicamente [15]. Las nanopartículas metálicas que han llamado más la atención son las de oro pues son consideradas las más estables en comparación con los otros metales nobles. Entre sus propiedades destacan las ópticas y catalíticas que son dependientes del tamaño de partícula. Por ejemplo, como se observa en la Figura 1, el color de las soluciones de nanopartículas de oro puede ser rojo, rosado, violeta, morado, azul o amarillo según se incrementa el tamaño de partícula hasta la formación de aglomerados y agregados [4, 7, 16]. El origen del color de las soluciones y el cambio en la coloración con el tamaño de partícula se explicará en la Sección 1.5.2.1. Para los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas de oro se han reportado tamaños en el rango de 1 a 99 nm. El uso de ligandos tiol como agente estabilizador permite obtener nAu entre 1-9 nm, citrato trisódico para nAu desde 9 nm hasta 60 nm e hidroxilamina para nAu entre 60-99 nm [17, 18, 19].



Figura 1. Variación de las propiedades ópticas de nAu con el tamaño (De izquierda a derecha aumenta el tamaño de partícula) [16].

Este cambio de las propiedades ópticas de nAu en función al tamaño ha permitido su aplicación como sensores, por ejemplo, se ha reportado el uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con éter 15-corona-5 para el reconocimiento de iones K^+ , Li^+ y metales pesados en agua. La adición de iones Li^+ a la solución de nAu estabilizadas con el ligando bidentado produce una variación en el color de rojo a azul debido a la agregación de las nAu [7]. Investigaciones recientes realizadas por Smith y colaboradores han propuesto un método para la detección de cocaína que se basa en un ensayo colorimétrico de nAu estabilizadas con aptámeros. Los aptámeros son moléculas de ADN/ARN que se unen a partículas pequeñas, péptidos, proteínas y células con elevada selectividad y sensibilidad. Inicialmente, las nAu se encuentran estabilizadas con aptámeros que poseen conformación abierta (una sola cadena) pero la unión con la cocaína modifica la conformación de cadena simple a una entrecruzada en sí misma. Esta conformación más cerrada y rígida de los aptámeros no estabiliza de manera efectiva la superficie de nAu las cuales se agregan cuando se incrementa la fuerza iónica del medio con la adición de NaCl [20].

Por otro lado, estudios llevados a cabo por Haruta y colaboradores han mostrado la alta actividad catalítica de nAu sobre soportes de óxidos metálicos como Co_3O_4 , Fe_2O_3 y TiO_2 para la oxidación de CO e H_2 , reducción de NO, hidrogenación de CO_2 , alquenos y alquinos e hidrosililación [7]. Las nanopartículas de oro de 2-4 nm de diámetro sobre soporte de Fe_2O_3 son muy buenos catalizadores heterogéneos para la oxidación de CO a baja temperatura [12]. La actividad catalítica se debe a la reactividad de los átomos de oro y es mayor a menor tamaño de partícula por la mayor cantidad de átomos en la superficie [7]. Se puede calcular que una nanopartícula de 30

nm posee 5% de sus átomos en la superficie, una de 10 nm el 20% y una de 3 nm el 50% [4]. Asimismo, películas delgadas de nanopartículas de oro con ligandos tiol encuentran aplicación en el área de electroquímica al unirse químicamente a electrodos de carbono los cuales se utilizan en la oxidación de CO y CH₃OH en medio básico para formar CO₂ [7, 12].

La inercia química, mínima toxicidad y biocompatibilidad de las nAu hacen posible su aplicación en el área de medicina. Desde el siglo XIII hasta el siglo XX, estas nanopartículas fueron utilizadas en medicina para el tratamiento de distintas enfermedades como problemas cardíacos, venéreos, epilepsia, tumores y para el diagnóstico de sífilis [7]. En los últimos años, con el desarrollo de la nanotecnología se ha mejorado la síntesis de nAu para su uso como sistemas de administración de fármacos en terapia fotodinámica de cáncer. La terapia fotodinámica es una técnica de tratamiento para varios tipos de cáncer que emplea luz y un agente fotosensibilizador que es un fármaco hidrofóbico. Debido a la insolubilidad del fármaco, en condiciones fisiológicas, se requiere de un sistema de administración como las nAu estabilizadas con polietilenglicol que es un polímero soluble en agua. Este sistema contiene el fármaco hidrofóbico de interés, se administra de manera intravenosa, se espera a que sea absorbido y luego se irradia con luz visible, así, el tiempo de administración se reduce a 2 horas comparado con los 2 días que tarda el fármaco libre en localizarse en las zonas tumorales [21].

El agente estabilizador permite obtener nAu hidrofílicas o hidrofóbicas, y además puede modificar su superficie para que pueda enlazarse a biomoléculas y moléculas de reconocimiento como secuencias de ADN, enzimas, péptidos y anticuerpos [5]. Esto se logra mediante enlaces covalentes o interacciones polares a distintas capas protectoras con grupos tiol (-SH), hidroxilo (-OH), amino (-NH₂) y fosfino (-PH₂). Incluso es posible la incorporación de fármacos dentro de la matriz polimérica biocompatible y así la funcionalización permite la utilización de las nAu en diagnóstico, terapia y en electroquímica, principalmente, como biosensores [22, 23].

Finalmente, en ciertas aplicaciones en electrónica, medicina y catálisis se requiere que las nanopartículas formadas se encuentren organizadas o ensambladas en estructuras de una, dos o tres dimensiones. Este ensamblaje de nanopartículas puede producirse

de manera espontánea por interacciones no covalentes como electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y van der Waals [11]. Por ejemplo, las cadenas de un polímero pueden formar un arreglo tridimensional aleatorio alrededor de las nanopartículas que estabilizan para obtener un nanomaterial poroso de gran utilidad en catálisis o adsorción [5].

1.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de oro

Se han reportado una variedad de métodos para la obtención de nanopartículas metálicas usando procesos físicos, químicos o mecánicos, ya sea en fase gaseosa, líquida o sólida. Entre estos métodos se encuentran la evaporación a alta temperatura, síntesis con plasma, pirólisis, irradiación con microondas, sol-gel, coprecipitación, microemulsión, auto-ensamblaje molecular y procesos de reducción de tamaño como aleación, molienda y pulverización a partir de metales y minerales [5, 11]. Sin embargo, los métodos químicos como reducción química, técnicas electroquímicas y reducción fotoquímica son los más utilizados porque la distribución de tamaño de partícula es menor con respecto a los otros procesos [3, 22].

Como se mencionó antes, las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas metálicas dependen de su tamaño, forma, estructura y estabilidad, que pueden ser controlados mediante las condiciones experimentales como la variación de parámetros durante la síntesis [24]. Pero también pueden ser afectados por la cinética de interacción entre iones metálicos y agentes reductores y por procesos de adsorción del agente estabilizador a la superficie de las nanopartículas metálicas [3].

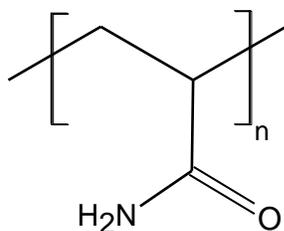
Por lo general, la síntesis de nanopartículas de oro requiere de un agente reductor, un agente estabilizador y de energía como calentamiento convencional, irradiación con microondas o ultrasonido. Por ejemplo, la reducción química de compuestos que poseen cationes de oro puede utilizar un agente reductor como borohidruro de sodio o citrato trisódico, mientras que los estabilizantes pueden ser biomoléculas como polisacáridos y proteínas y compuestos polifenólicos derivados de plantas [7, 23].

1.3.1 Métodos de síntesis tradicionales

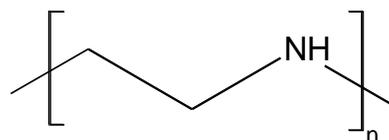
Los compuestos más comunes que actúan solo como reductores en la síntesis de nAu son borohidruro de sodio e hidracina, ambos son tóxicos [25]. Adicionalmente, todas las síntesis requieren de un agente estabilizador o protector debido a la alta reactividad de la superficie de las nanopartículas y su facilidad de agregación. El agente protector se asocia a la superficie de la partícula, proporciona carga o propiedades de solubilidad para estabilizar la superficie y evitar su agregación [24, 26]. Ejemplos de compuestos que poseen capacidad reductora y protectora son citrato trisódico, ácido tánico, ácido ascórbico y bitartrato de potasio [27].

La elección del agente estabilizador depende del tipo de síntesis y aplicación de los nanomateriales. Por ejemplo, los métodos tradicionales de síntesis utilizan ligandos tiol como agentes estabilizadores de la superficie metálica. Los grupos tiol poseen átomos de azufre que se unen fuertemente a los átomos de oro de la superficie, por lo que, las nAu muestran gran estabilidad a la agregación [7]. También, se puede modificar la química de esta capa protectora mediante reacciones de intercambio de ligandos con otros más funcionalizados para alterar las propiedades del nanomaterial [12]. Por ejemplo, se ha reportado el intercambio de ligandos con grupos tiol y ligandos tiol funcionalizados con distintos grupos como Br, CN, vinilo, fenilo, ferrocenil, OH, CO₂H, CO₂CH₃ y antraquinona, lo cual modifica las propiedades de las nAu [7].

Otros agentes protectores de nAu ampliamente utilizados son los polímeros ya que permiten obtener nanopartículas monodispersas del mismo tamaño y forma. Entre los diversos tipos destacan los homopolímeros como polietilenglicol y poli(vinil-pirrolidona), copolímeros en bloque y polímeros que responden a estímulos como pH y temperatura [7, 23]. Estas macromoléculas estabilizan de manera estérica la superficie metálica a comparación de otros agentes como el citrato y controlan mejor el tamaño de partícula. En los últimos años, ha surgido interés por utilizar polímeros que actúen tanto como agentes reductores y estabilizadores, principalmente, para minimizar costos de reactivos y tiempos de reacción. Los polímeros más utilizados, que presentan ambas características son poliacrilamida, poliaziridina (Figura 2) y dendrímeros de poli(2-metilaziridina) de tercera generación [23, 28].



Poliacrilamida



Poliaziridina

Figura 2. Polímeros utilizados como agentes reductores y protectores.

En 1951, Turkevich introdujo la síntesis de nanopartículas de oro esféricas de 20 nm mediante la reducción con citrato de sodio del precursor HAuCl_4 en agua [7]. Desde entonces se han modificado distintos parámetros como la concentración del reductor, pH y tiempo de reacción, para entender el mecanismo de formación de las nanopartículas y controlar de manera efectiva su tamaño, forma y distribución de tamaño. De esta manera, es posible obtener nanopartículas de distintos tamaños variando la relación entre citrato de sodio y el precursor, $\text{Na}_3\text{Ct}:\text{HAuCl}_4$ [18]. En cambio, el método de Brust-Schiffrin utiliza borohidruro de sodio, dodecanotiol y un agente de transferencia de fase como bromuro de tetraoctilamonio para la obtención de nanopartículas de oro de diámetro entre 1,5-5,2 nm en fase orgánica de tolueno. El tamaño de las nanopartículas es controlado por la relación $\text{tiol}:\text{HAuCl}_4$ y por la velocidad de adición del agente reductor. Una elevada relación molar $\text{tiol}:\text{HAuCl}_4$ y la adición rápida del reductor favorecen la formación de nanopartículas más monodispersas y con tamaño menor a 2 nm [7]. Ambos métodos pueden utilizar otros compuestos que controlen el tamaño de partícula y que permitan la síntesis en fase acuosa, por ejemplo [24]:

- La reducción de HAuCl_4 en solución con citrato en presencia de ácido tánico produjo una solución roja que indicó la formación de nanopartículas de oro esféricas con tamaño de partícula de 6-9 nm estabilizadas con ácido tánico.
- La reducción de HAuCl_4 en solución con NaBH_4 en presencia de polietilenglicol dio lugar a una solución naranja clara de nanopartículas de oro esféricas entre 3-4 nm estabilizadas con polietilenglicol.

1.3.2 Métodos de síntesis verde

La mayoría de agentes estabilizadores empleados en los métodos de síntesis verde también son agentes reductores, siendo los más conocidos la glucosa, sacarosa y polisacáridos como heparina, ácido hialurónico, almidón, celulosa, ácido algínico, dextrano y quitosana. En general, la capacidad reductora de los carbohidratos y polisacáridos se debe al grupo reductor aldehído que está en equilibrio con su forma hemiacetal. Sin embargo, los grupos alcohol presentes en gran cantidad en polisacáridos de ciertas algas, también, pueden ser grupos reductores, oxidándose a grupos carbonilos [29]. Por otra parte, las nanopartículas metálicas protegidas con polisacáridos son biocompatibles, poseen mayor estabilidad y encuentran aplicaciones potenciales en biotecnología, medicina y bioelectroquímica [23].

Los métodos de síntesis verde reducen el impacto ambiental pues se caracterizan por utilizar condiciones suaves de reacción y agentes reductores, agentes estabilizadores y solventes no tóxicos. En este sentido, se ha sintetizado nAu con ácido tánico (polifenol extraído de plantas) en medio acuoso y a temperatura ambiente. En este caso, la adición lenta del ácido tánico a una solución de HAuCl_4 produjo nanopartículas con menor dispersión que la adición rápida. Asimismo, la variación del pH y relación molar de reactantes influyó en la distribución de tamaño y forma de las nanopartículas [25]. Otro método de síntesis verde empleó una solución acuosa de NaAuCl_4 , un aminoácido y distintos carbohidratos, como agentes reductores no tóxicos, que afectaron el tamaño y distribución de tamaño de nAu. Por ejemplo, cuando se utilizó lactosa se formaron nAu de 3 ± 1 nm, sacarosa 10 ± 6 nm, mientras que almidón produjo diámetros de 39 ± 9 nm [30].

Quitosana en la síntesis de nanopartículas

La quitosana, como se observa en la Figura 3, es un copolímero lineal formado por unidades estructurales de D-glucosamina (GluN) y N-acetil-glucosamina (GluNAc) a través de enlaces glucosídicos β (1-4). Se obtiene por desacetilación alcalina y parcial de la quitina que es el segundo polisacárido natural más abundante [9, 31]. La quitina se encuentra en los caparazones de crustáceos, en los insectos, en la membrana celular de hongos y en la levadura [13].

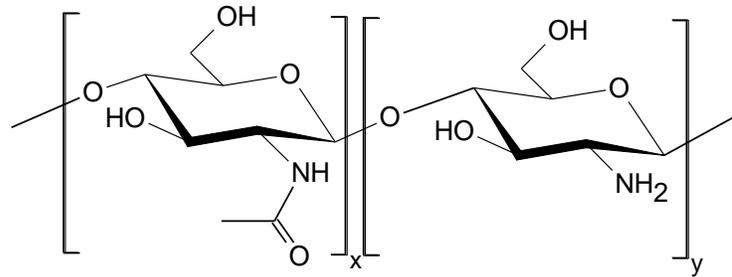


Figura 3. Estructura del biopolímero quitosana. Unidad GluNAc (x) enlazada a unidad GluN (y). Si x es mayor o igual a 90%, la estructura correspondería al polímero de quitina [32].

Las cadenas de quitosana tienen grupos amino e hidroxilo libres que le otorgan propiedades físicoquímicas únicas como solubilidad, agente quelante y capacidad para formar películas e hidrogeles [13]. La quitosana es insoluble en agua, solventes orgánicos, bases acuosas y sólo es soluble en ácidos acuosos como ácido acético, ácido nítrico y ácido clorhídrico porque los grupos amino se protonan, confiriéndole carácter catiónico al polímero, esto ocurre a pH menor a 6,2 [33]. Por otra parte, la quitosana se usa como agente quelante para la recuperación de cationes metálicos en forma de precipitados con una selectividad mayor por Cu^{2+} y Hg^{2+} [34]. En cuanto a las películas de quitosana, estas se caracterizan por ser homogéneas, estables, resistentes al agua y por poseer buenas propiedades mecánicas [32]. Otras propiedades de la quitosana son la densidad de carga y reactividad. El grado de protonación de los grupos amino o densidad de carga depende del pH y fuerza iónica. Por otro lado, la quitosana puede ser modificada químicamente por medio de reacciones de eterificación y esterificación de los grupos hidroxilo en el carbono-6, además, la reactividad de los grupos amino permite reacciones selectivas como N-alkilación, N-acilación, formación de iminas, entre otras [32].

Las propiedades de solubilidad, reactividad y adsorción de iones metálicos así como la biodegradabilidad de la quitosana dependen de la proporción entre unidades de GluN y GluNAc [9]. Esta proporción es el parámetro de grado de desacetilación (DDA), expresado como porcentaje [26]. Cuando el DDA es mayor a 50%, el polímero es soluble en medio ácido acuoso [28]. Existen varios métodos que permiten obtener el grado de desacetilación de la quitosana como ¹H-RMN, espectroscopía infrarroja, espectroscopía UV, titulación conductimétrica, titulación potenciométrica y análisis por

HPLC. La forma más común de caracterizar al biopolímero es mediante $^1\text{H-RMN}$, con D_2O como solvente, en la cual el grado de desacetilación se calcula a partir de las integrales relativas de los protones [9].

En general, la viscosidad de la quitosana en solución depende de su peso molecular, carácter catiónico, concentración, así como del pH y fuerza iónica del solvente. Así, se puede determinar el peso molecular promedio en viscosidad (M_v) mediante la técnica de viscosimetría capilar. Para ello, el biopolímero se disuelve en una solución buffer ácido acético/acetato de sodio y con un viscosímetro se miden los tiempos de flujo del solvente (t_0) y de soluciones de quitosana (t) de distinta concentración (c). Con estos datos se calculan la viscosidad específica (η_{sp}) y reducida (η_{red}), definidas por:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad ; \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

Las mediciones de los tiempos de flujo dependen del volumen hidrodinámico del polímero, el cual se relaciona con las conformaciones del polímero debido a su peso molecular y con las interacciones polímero-solvente. De la gráfica de viscosidad reducida versus concentración se obtiene la viscosidad intrínseca $[\eta]$ que se refiere a la capacidad del polímero para incrementar la viscosidad del solvente y se define como el límite de la viscosidad reducida cuando la concentración de la solución del polímero tiende a cero [32, 35].

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$$

El polisacárido quitosana actúa tanto como agente reductor y como agente estabilizador de las nanopartículas formadas. También se conoce que la quitosana actúa como agente estabilizador de la superficie de otras nanopartículas metálicas como Ag, Pd, Pt y Fe_3O_4 y evita su agregación. La estabilidad se logra porque los grupos amino del biopolímero se adsorben a las superficies de los metales mediante fisisorción [34, 36, 37]. Por otro lado, la concentración de quitosana influye en el tamaño y estabilidad de las nanopartículas [13]. Por ejemplo, el incremento de la concentración del biopolímero disminuye el tamaño y mejora la estabilidad de nanopartículas de plata [38].

Con respecto a las nanopartículas de oro con quitosana, Huang y Yang han reportado que la concentración del biopolímero influye en el tamaño y forma de partícula, mientras que su peso molecular afecta la distribución de tamaños. En ese caso, la síntesis se realizó a 70°C por dos horas con un rango de concentración de quitosana de 0,01% a 0,5% (w/v) en solución de ácido acético 1% (v/v). En su mayoría, las nAu obtenidas fueron esféricas pero la disminución de la concentración de quitosana favoreció la obtención de nanocristales de oro poligonales e incluso la formación de agregados o precipitados. El uso de quitosana de bajo peso molecular (5,4 kDa, DDA = 100%) y el aumento de su concentración de 0,05% a 0,25% disminuyó el tamaño de partícula de 20 nm a 15 nm y redujo la distribución de tamaño. Cuando se empleó quitosana de peso molecular medio (400 kDa, DDA = 84,5%), el tamaño de partícula se mantuvo alrededor de 20 nm y la distribución de tamaño varió ligeramente con el cambio de concentración [39].

Por otra parte, Fan y colaboradores han desarrollado un método rápido y eficiente para la obtención de nanoesferas de 30 nm, nanotriángulos y nanobarras de oro con quitosana 0,1% (w/v) por irradiación microondas. En este caso, los parámetros de potencia de microondas y tiempo de irradiación no afectaron el tamaño de las partículas sino el tiempo para completar la reducción de iones Au^{3+} . Ambos parámetros aumentaron la intensidad de la banda de plasmones de superficie pero no modificaron su posición (525 nm). Cuando la síntesis se efectuó con una potencia de microondas de 850 W, se necesitó 3 minutos de reacción, mientras que con una potencia de 144 W fue necesario 6 minutos. Fan y colaboradores prolongaron el tiempo de irradiación de la solución de nAu-Qna a 144 W y observaron que la intensidad de la banda de plasmones de superficie no cambió luego de 25 minutos de reacción por lo que concluyeron que la reducción se completó en ese tiempo [28].

La síntesis de nanopartículas de oro involucra una reacción redox. Sin embargo, el mecanismo de reacción con quitosana todavía no se conoce ya que existen dos grupos reductores distintos: $-\text{CH}_2\text{OH}$ (grupo hidroxilo) y $-\text{CHO}$ (grupo aldehído) [28, 29]. La Figura 4 muestra un posible mecanismo, propuesto por Sun y colaboradores, en el cual la degradación de quitosana permite que los grupos aldehídos en los extremos de la cadena se oxiden y reduzcan a los cationes metálicos a átomos neutros [40].

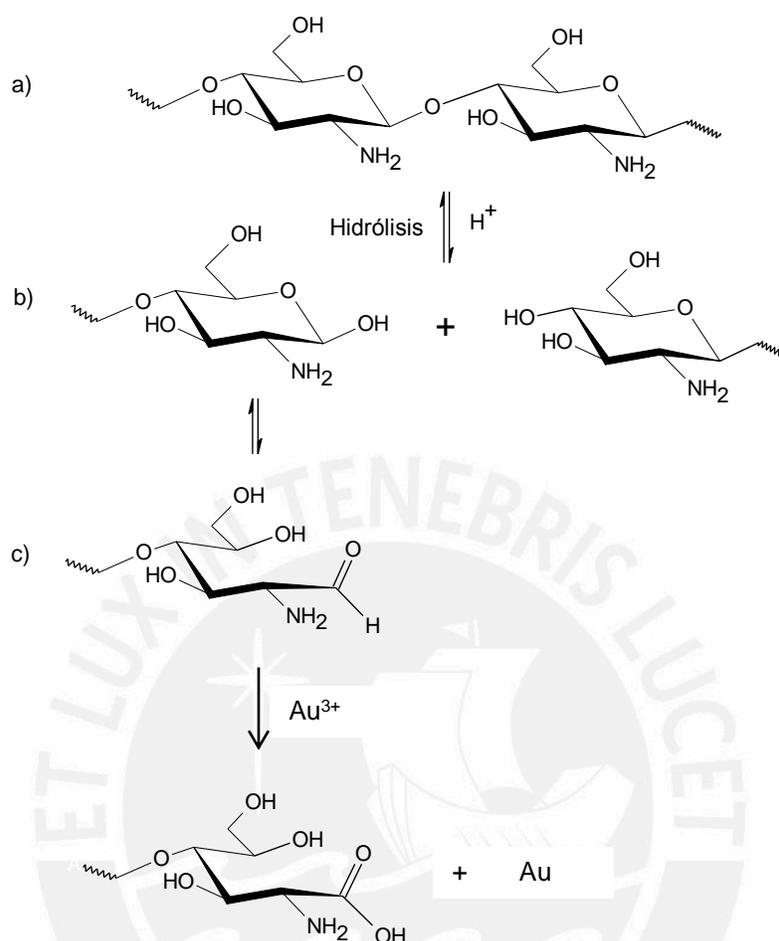


Figura 4. Quitosana como agente reductor: a) Hidrólisis en medio ácido de la quitosana a glucosamina, b) Equilibrio de glucosamina a cadena abierta y c) Oxidación del grupo aldehído a ácido carboxílico (oxígeno proviene del agua) [40].

La ruptura del enlace glucosídico también es posible en medio básico y el cambio de equilibrio de glucosamina a cadena abierta es un proceso reversible. En la Figura 5, el espectro IR de quitosana oxidada por H₂AuCl₄ muestra los picos a 1740 y 1710 cm⁻¹ que corresponden a la frecuencia de vibración de estiramiento de grupos COOH [40].

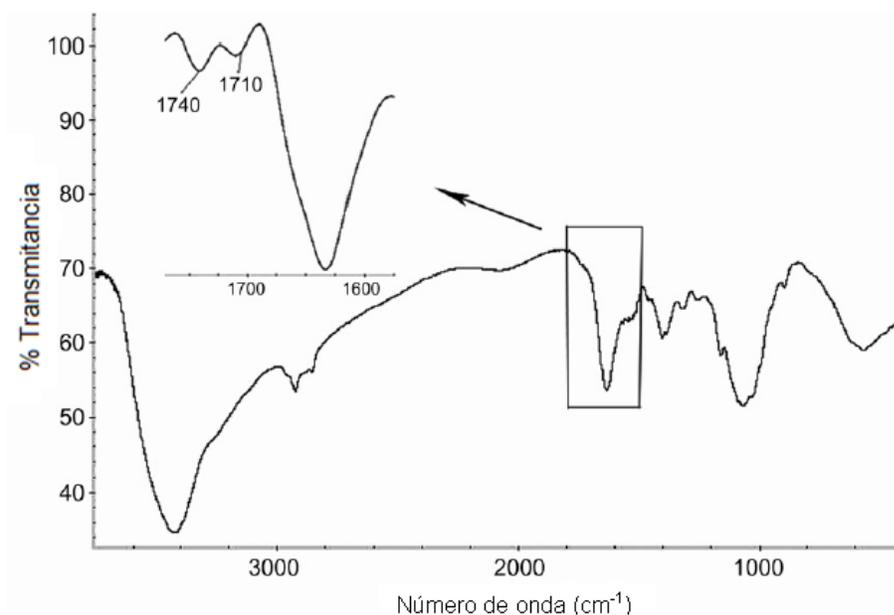


Figura 5. Espectro IR de quitosana oxidada por HAuCl_4 [40].

1.4 Formación y estabilidad de nanopartículas de oro

1.4.1 Nucleación y crecimiento

La formación de nanopartículas de oro monodispersas en solución puede explicarse mediante el mecanismo de nucleación-crecimiento propuesto por LaMer (Figura 6) [41]. Este modelo indica, en primer lugar, la reducción de los iones Au^{3+} a átomos de Au cuya concentración se incrementa hasta alcanzar un nivel de sobresaturación [42]. En este nivel ocurre la nucleación por colisiones entre los átomos de oro para formar clusters irreversibles o núcleos [43]. La siguiente etapa es el crecimiento de los núcleos por el mecanismo de maduración de Ostwald en el cual los átomos de oro individuales se difunden hacia la superficie de los núcleos para generar nanopartículas con la finalidad de disminuir la alta energía de su superficie [44]. Durante esta etapa se forman aglomerados que pueden ser asociaciones reversibles de nanopartículas que permanecen en suspensión, por ello, la presencia de un estabilizador es necesaria para controlar el crecimiento [5]. Por último, el tamaño final de partícula se logra al consumirse todo el reactivo precursor y cuando el tamaño de las nanopartículas es termodinámicamente estable [45].

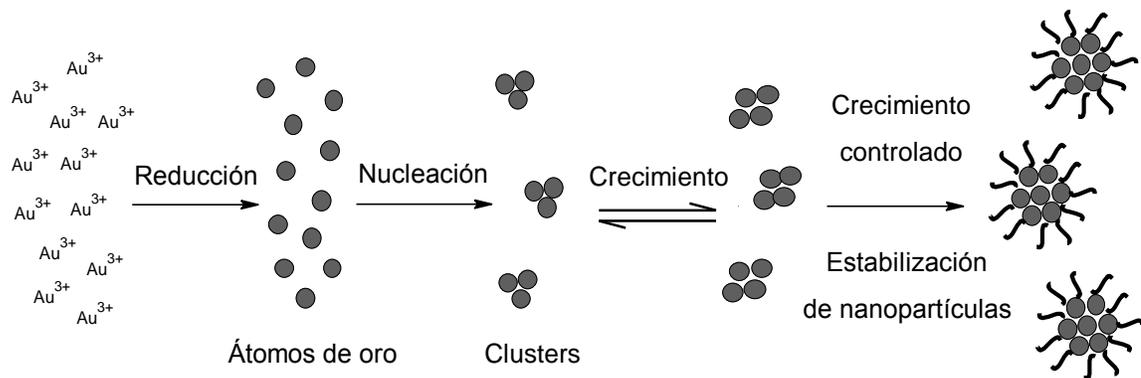


Figura 6. Mecanismo de nucleación-crecimiento para nanopartículas de oro.

La nucleación rápida, es decir, la formación simultánea de núcleos previo a su crecimiento controlado favorecen la monodispersidad de las nanopartículas de oro, mientras que una segunda nucleación contribuye a que las nanopartículas presenten distribución de tamaño bimodal. Por otro lado, cuando los procesos de nucleación y crecimiento ocurren al mismo tiempo las nanopartículas son polidispersas, es decir, de distinto tamaño y forma [41]. En general, cuando el crecimiento es uniforme se favorece el tamaño de partícula de los núcleos de oro para formar nanoesferas, en cambio, el crecimiento anisotrópico de los núcleos, en distintas direcciones, favorece otras formas como nanobarras, nanocubos y nanoprismas [22].

Sin embargo, el modelo de LaMer no explica los cambios de coloración en la síntesis por reducción con citrato y con borohidruro de sodio ya que en ambas la solución primero es oscura y luego roja. Por ello, otros mecanismos de formación de nanopartículas de oro han sido propuestos que dependen, además, de parámetros como pH y temperatura. En el mecanismo por reducción con citrato entre pH 3,7-6,5 y 100°C, la nucleación es rápida pero en la etapa de crecimiento los núcleos de oro se ensamblan para formar nanoestructuras tipo alambres que producen la tonalidad oscura en la solución. Conforme se adsorben más átomos de oro, los nanoalambres se desestabilizan al incrementar su diámetro y colapsan en partículas esféricas las cuales crecen hasta formar nanopartículas estables cuya coloración en solución es roja [18, 42].

1.4.2 Estabilidad de nanopartículas

Las dispersiones acuosas de nanopartículas de oro son consideradas coloides ya que se encuentran dentro del rango entre 10 nm y 10 μm . Las partículas pueden ser neutras o poseer carga y su estabilidad en dispersiones acuosas es explicada por la teoría DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) [46]. Esta teoría considera los distintos tipos de interacciones o fuerzas entre partículas y las representa como la energía libre total de interacciones en la siguiente ecuación:

$$G_T = G_A + G_R + G_H + G_S$$

A grandes distancias predominan las interacciones de atracción (G_A) que son las fuerzas de Van der Waals y las interacciones de repulsión (G_R) representadas por las fuerzas electrostáticas. Mientras que las interacciones entre partículas a pocos nanómetros involucran las fuerzas de hidratación (G_H) y las fuerzas estéricas (G_S) [43]. Por lo general, las nanopartículas son estables cuando las fuerzas de repulsión son más intensas que las fuerzas de atracción, de lo contrario, el sistema es inestable y se favorece la coagulación-floculación, es decir, el crecimiento de coloides hasta la formación de agregados [46]. Los agregados son asociaciones irreversibles de partículas debido a interacciones interpartículas fuertes, su crecimiento se favorece con la adición de sales y precipitan con el tiempo [5, 13].

Las nanopartículas de oro pueden ser estabilizadas, principalmente, por fuerzas electrostáticas o estéricas en medio acuoso u orgánico [43]. La estabilización electrostática se debe a la repulsión entre partículas cuando se traslapan sus dobles capas eléctricas. La doble capa eléctrica se refiere a la distribución de cargas positivas y negativas alrededor de una nanopartícula cargada y está formada por una capa fija y otra difusa. Por ejemplo, como se observa en la Figura 7, si el coloide posee carga negativa, atrae contraiones alrededor de su superficie para formar una capa fija positiva, mientras que el resto de iones se encuentran un poco alejados de la superficie formando la capa difusa. Según la teoría de Gouy-Chapman, los iones de la capa difusa presentan una distribución de Boltzmann conforme se alejan de la superficie a lo largo de la solución [41]. El movimiento por difusión o por campo eléctrico de estos iones de la capa difusa junto con las nanopartículas es diferente al movimiento de los iones en solución. De esta manera, el potencial eléctrico que limita la doble capa

eléctrica (de la solución) se conoce como potencial zeta y se asocia con la estabilidad de las nanopartículas [47]. Es posible afectar la estabilidad de las nanopartículas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. En el caso de nAu estabilizadas con ligandos citrato se ha reportado que conforme se incrementa la concentración de sales como NaCl se observa mayor agregación de las nanopartículas porque la compresión de la doble capa eléctrica favorece las fuerzas de atracción entre partículas. Esta compresión se debe a que el aumento de iones en la solución reduce el espesor de la capa difusa [41].

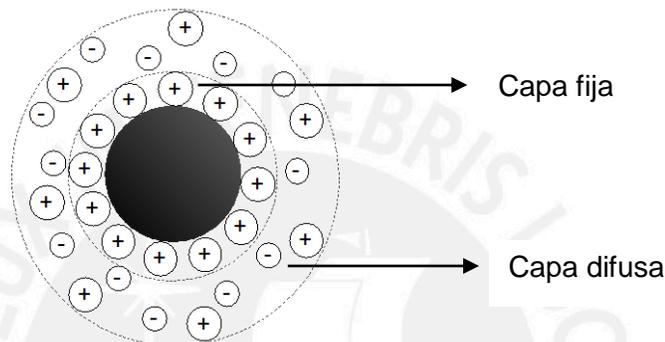


Figura 7. Doble capa eléctrica de una nanopartícula con carga negativa.

Por otro lado, la estabilización estérica se presenta cuando un polímero se adsorbe a la superficie de la nanopartícula y se encuentra preferentemente en su forma extendida en la cual predominan interacciones polímero-solvente. De esta manera, cuando dos partículas se acercan existe repulsión entre las cadenas, en cambio, si las interacciones polímero-solvente son desfavorables las cadenas del polímero se contraen y las nanopartículas se aglomeran debido a la atracción entre las cadenas. En general, un polímero que proporciona carga positiva o negativa a la superficie otorga estabilidad cinética a las nanopartículas ya que genera repulsiones electrostáticas y estéricas entre partículas [41].

1.5 Caracterización de nanopartículas metálicas

1.5.1 Técnicas de microscopía

Una de las técnicas más comunes para la caracterización de nanopartículas metálicas es la microscopía electrónica de transmisión (TEM). En este tipo de microscopía electrónica se utiliza un filamento de tungsteno para generar un haz de electrones que

es acelerado por un voltaje en el rango de 40 a 400 kV a alto vacío. El voltaje empleado determina la energía del haz de electrones así como la longitud de onda del electrón. Mediante un sistema de lentes electrostáticas y electromagnéticas este haz de electrones es dirigido hacia la muestra la cual debe ser transparente a los electrones para obtener información sobre la estructura, forma, tamaño y distribución de partículas mediante una imagen. De esta manera, el análisis por TEM requiere que la muestra posea un espesor entre 20-100 nm para que los electrones de alta energía sean transmitidos. La técnica de TEM presenta resolución de 1-2 nm y magnificación de 2 millones de veces comparada con la microscopía óptica debido a la menor longitud de onda del electrón [48, 49].

Otra de las técnicas de caracterización de nanopartículas es la microscopía de fuerza atómica (AFM), la cual permite evaluar el tamaño de partícula en cada una de las dimensiones así como la morfología de la superficie. El microscopio de fuerza atómica posee una viga flexible con una sonda afilada de diámetro menor a 8 nm que escanea la superficie de la muestra. A partir de interacciones de van der Waals entre una sonda de silicio y la superficie de la muestra se generan fuerzas de repulsión o atracción que generan deflexiones en la viga. Estas deflexiones son medidas y, como son pequeñas comparadas con las dimensiones de la viga, es posible relacionar linealmente la deflexión con el desplazamiento de la viga. Según el tipo de interacción entre sonda y superficie y la distancia de separación es posible llevar a cabo el análisis AFM en modo de contacto, intermitente (dinámico) o no-contacto. La operación en modo dinámico es preferible para la medición del tamaño de nanopartículas pues en este caso las partículas se encuentran adheridas débilmente a la superficie del soporte y se reduce el número de interacciones entre la sonda y la superficie bajo estudio. Los soportes comúnmente empleados son silicio y mica porque tienen una superficie lisa. En algunos casos es necesario realizar un tratamiento de activación de la superficie del soporte para facilitar su adhesión a la muestra. Las imágenes del AFM poseen resolución vertical (z) y resolución lateral (x, y) aunque esta última se encuentra influenciada por parámetros como radio, geometría, dureza e inclinación de la sonda [7, 47, 50, 51].

1.5.2 Técnicas espectroscópicas

En cuanto a las técnicas espectroscópicas, la caracterización se puede realizar mediante espectroscopía infrarroja y espectroscopía UV-Vis [7]. La técnica de IR no proporciona información de las dimensiones ni de la estructura de las nanopartículas metálicas pero sí de la interacción con los grupos funcionales de los agentes protectores. Investigaciones realizadas por Wei y Qian reportaron que cuando la quitosana actúa como agente estabilizador de nanopartículas de plata se observa una disminución en la intensidad de la banda de vibración de enlace N-H debido a que el átomo de nitrógeno se une a la superficie metálica [13].

En cambio, la espectroscopía de absorción ultravioleta visible es la técnica más utilizada para la caracterización de las propiedades ópticas de las nanopartículas ya que permite obtener la banda de plasmones de superficie y evaluar la estabilidad de las nanopartículas. Además, a partir de la información proporcionada por los espectros UV-Vis es posible estimar la concentración y el tamaño de las nanopartículas de oro [52]. Aparte de las espectroscopías infrarroja y UV-Vis, la resonancia magnética nuclear de protón puede brindar información sobre el grado de interacción entre el agente estabilizador y la nanopartícula. Estudios previos de nAu estabilizadas con cisteína, realizados por Aryal y colaboradores, indican que las señales de protones cercanos al centro metálico se desplazan por la interacción de los átomos de azufre con la superficie de la nanopartícula [53].

1.5.2.1 Banda de plasmones de superficie localizados

Fuera de la escala nanométrica, el oro tiene una absorbancia continua en la región UV-Vis-IR, mientras que el complejo HAuCl_4 en solución acuosa de NaCl 0,1M posee una banda de absorción en la región ultravioleta a 313 nm [24, 54]. En cambio, las nAu en medio acuoso presentan variedad de colores debido a una propiedad física denominada resonancia de plasmones de superficie localizados. Esta propiedad se define como la oscilación colectiva de los electrones libres de la banda de conducción en la superficie de la nanopartícula al absorber radiación electromagnética de una determinada energía [55]. En la Figura 8 se representa la interacción del campo eléctrico de la luz con la superficie de una nanopartícula metálica, este campo eléctrico produce el movimiento de los electrones de conducción que se desplazan hacia la

superficie generando un dipolo eléctrico cuyo campo eléctrico es opuesto al de la luz y fuerza el retorno de los electrones a la posición de equilibrio [56]. La oscilación de la densidad electrónica a una cierta frecuencia origina una banda de absorción conocida como banda de plasmones de superficie localizados y que para nAu se observa en la región visible a partir de 500 nm. Sin embargo, las nanopartículas metálicas de dimensiones menores a 1-2 nm no presentan esta banda ya que sus electrones se encuentran en niveles de energía discretos, donde la diferencia energética entre niveles es mayor [24].

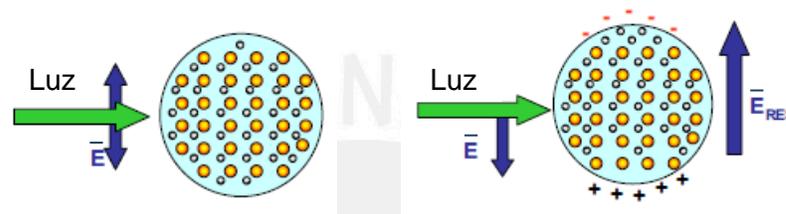


Figura 8. Interacción de la luz con la superficie de una nanopartícula metálica [56].

La forma y el tamaño de las nanopartículas metálicas son factores importantes que determinan la posición de la banda de plasmones de superficie localizados [24]. En general, las nAu esféricas muestran una sola banda de absorción alrededor de 520 nm, una banda adicional entre 600-900 nm indica la presencia de nanopartículas no esféricas [5, 39]. Por ejemplo, las nanobarras de oro poseen dos bandas de absorción, la banda cercana a 520 nm corresponde al modo de plasmón transversal y otra banda de mayor intensidad en la región infrarroja entre 700 nm y 1000 nm señala el modo de plasmón longitudinal [2]. En la Figura 9, se presentan espectros UV-Vis de nAu con citrato sintetizadas a diferentes condiciones de reacción, las cuales producen nanopartículas de distinto tamaño. Las nAu con tamaño comprendido en el rango de 9-99 nm poseen bandas de plasmones de superficie que se encuentran entre 515 y 585 nm [19]. Una posible explicación a la dependencia de la posición de la banda con el tamaño de partícula está en la magnitud de la fuerza restauradora o frecuencia de resonancia. Cuando las nanopartículas son pequeñas, la acumulación de carga en la superficie es mayor debido al menor desplazamiento de los electrones de conducción. Como la fuerza restauradora es proporcional a la acumulación de carga, la frecuencia de resonancia es mayor, lo cual corresponde a menores longitudes de onda [56].

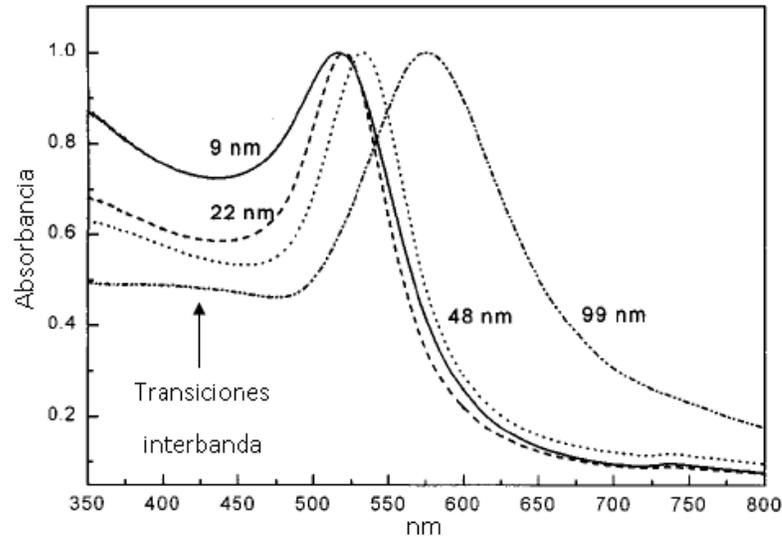


Figura 9. Influencia del tamaño de nAu esféricas en la banda de plasmones de superficie [19].

Otros parámetros que influyen en la banda de absorción son la constante dieléctrica del medio, interacciones entre nanopartículas, carga superficial, tipo de agente protector y temperatura [7, 57]. El incremento de la constante dieléctrica del medio aumenta la intensidad de la banda y, al igual que las interacciones entre partículas, desplaza la banda hacia mayores longitudes de onda. El aumento de la constante dieléctrica eleva la polarización del medio y esta acumulación de carga en la interfase nanopartícula-dieléctrico compensa en parte la acumulación de carga en la superficie de la nanopartícula. Esto ocasiona una disminución en la carga neta en la superficie así como en la frecuencia de resonancia, lo que se refleja como mayores longitudes de onda [56]. En cuanto a la temperatura, se ha reportado que para nAu de 12 nm en una matriz de vidrio, el aumento de la temperatura en el rango de 196°C a 514°C disminuye la intensidad de la banda de absorción, aumenta el ancho de banda y produce ligero desplazamiento hacia mayores longitudes de onda [19].

Como se observa en la Figura 9, además de la banda de plasmones de superficie localizados también se presenta otro tipo de transición electrónica denominada transición interbanda entre niveles internos de la banda de valencia y la banda de conducción. La absorción de las transiciones interbanda empieza a 200-300 nm y se traslapa con la banda de plasmones antes de los 500 nm [56, 57]. El ancho de la banda de plasmones de superficie localizados se asocia con el tamaño, distribución de

tamaño y las interacciones entre partículas. Para nAu menores a 25 nm, el ancho de banda se incrementa al disminuir el tamaño pero para nanopartículas mayores a 25 nm, la relación entre ancho de banda y tamaño es directa [7]. En este caso, el ensanchamiento de la banda y la aparición de un hombro señalan interacciones entre nanopartículas metálicas polidispersas o con amplia distribución de tamaños [56, 58]. Debido al ensanchamiento de banda por la dispersión del tamaño, no es posible determinar el tamaño de partícula a partir del ancho a la mitad de la banda [56]. Como se observa en la Figura 10, la adición de NaCl favorece el aumento de las interacciones entre partículas a partir de los 5 segundos hasta la formación de agregados luego de 5 minutos y 30 segundos. La banda de absorción a 520 nm disminuye en intensidad porque emerge una banda muy ancha entre 600-900 nm cuya intensidad depende del estado de agregación [58, 59]. Para comparar la distribución de tamaños entre nAu con bandas de absorción a longitudes de onda similares comúnmente se normalizan los espectros UV-Vis. Este procedimiento consiste en localizar entre los espectros la máxima absorbancia a 400 nm a la cual se le sustrae los otros valores de absorbancia a 400 nm. Luego, a esta diferencia se le adiciona cada valor de absorbancia en el rango de 300 a 800 nm para que las absorbancias a 400 nm coincidan. La normalización se efectúa a 400 nm porque en este valor la absorbancia corresponde a transiciones interbanda y no influye en la absorbancia de la banda de plasmones de superficie localizados [60].

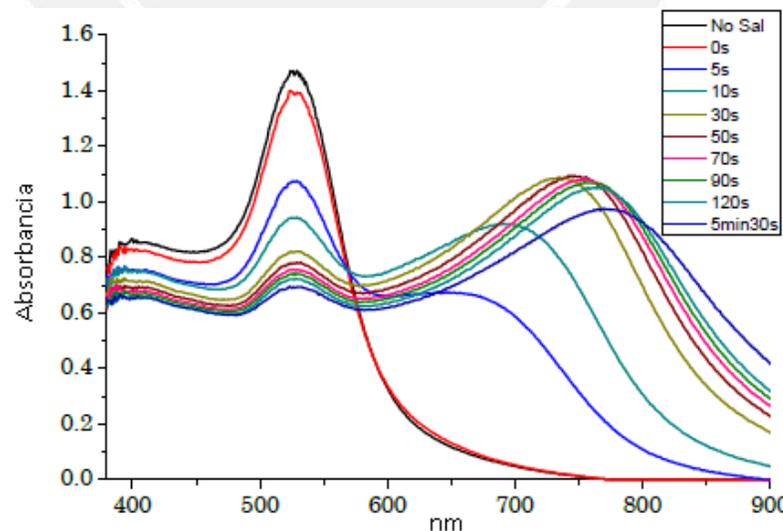


Figura 10. Efecto de agregación de nAu en la banda de plasmones de superficie localizados [58].

1.5.2.2 Estimación del tamaño y concentración de nanopartículas de oro por espectroscopía UV-Vis

Haiss y colaboradores, en base a estudios teóricos y experimentales, implementaron un método para calcular el tamaño y concentración de nAu a partir de ecuaciones que utilizan los parámetros de espectros UV-Vis [52]. Si la banda de plasmones de superficie se encuentra debajo de los 600 nm, su absorbancia así como la absorbancia de la banda a 450 nm (transiciones interbanda) se relacionan con el diámetro de la partícula (d) en el rango de tamaños de 5-80 nm mediante la ecuación (1). Donde, $B_1=3,00$ y $B_2=2,20$ son parámetros de ajuste calculados experimentalmente y que explican la función dieléctrica del metal empleado según la longitud de onda y el tamaño de partícula para nAu esféricas. La absorción depende del material (índice de refracción) y de su geometría y está relacionado con la longitud de onda mediante la eficiencia de extinción Q_{ext} (absorción y dispersión). Para una mayor precisión del tamaño de partícula en el rango de 5-50 nm se utiliza la ecuación (2) que requiere de la concentración inicial de la solución precursora (c_{Au}) en mol/L y la absorbancia de la banda de plasmones de superficie. Donde, $C_1= -4,75$ y $C_2=0,314$ son también parámetros experimentales.

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{BPS}}{A_{450}} - B_2\right) \dots (1)$$

$$d = \left[\frac{A_{BPS}(5.89 \times 10^{-6})}{c_{\text{Au}} \exp(C_1)} \right]^{1/C_2} \dots (2)$$

La estimación de la concentración (c) de las nanopartículas de oro en mol/L se realiza con la ecuación (3) de Beer-Lambert para una trayectoria del haz de 1 cm de longitud. Los valores de absorptividad molar (ϵ) en $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 450 nm están reportados para un rango de tamaño entre 2-100 nm [52].

$$c = A_{450} / \epsilon_{450} \dots (3)$$

Este método no considera la influencia de capas protectoras como citrato trisódico e hidroxilamina ya que son moléculas pequeñas, sin embargo, el índice de refracción de agentes estabilizadores poliméricos puede influir en la banda de plasmones de superficie, por ello, se necesitarían otras ecuaciones [52].

1.5.3 Otras técnicas de caracterización

La técnica de dispersión de luz electroforética (ELS) brinda información sobre la carga de la superficie y la estabilidad de las nanopartículas. La medición del movimiento de nanopartículas cargadas en una solución en presencia de un campo eléctrico determina el potencial zeta, el cual se define como el potencial eléctrico debido a los iones en el límite de la capa difusa y la solución. Valores absolutos de potencial zeta mayores a 30 mV indican que las nanopartículas poseen elevada estabilidad y aquellas con valores absolutos menores a 10 mV pueden ser consideradas neutras [47]. Como las nanopartículas con un alto valor de potencial zeta experimentan repulsión unas de otras, su interacción no es favorable. En cambio, las nanopartículas con un bajo valor de potencial zeta son más propensas a la agregación debido a que no existe una fuerza significativa de repulsión. Entre los factores que influyen en el potencial zeta se encuentran el pH y la conductividad [61].

1.6 Objetivos del trabajo

Como se ha presentado, se han reportado investigaciones sobre la síntesis y caracterización de nAu-Qna en las cuales se estudia el efecto de la relación molar Qna/Au³⁺, pH, grado de deacetilación y peso molecular del polisacárido en la forma, tamaño y distribución de tamaño de las nanopartículas. En el presente trabajo, adicionalmente al estudio del efecto de la relación molar y pH, se analizaron el efecto de otros parámetros tales como el tiempo de reacción, la temperatura y la concentración de los reactivos en la formación y estabilidad de las nAu. A partir de los resultados obtenidos mediante la caracterización se encontraron las condiciones de reacción para la obtención de nAu estables. Por otro lado, a pesar de que se cuenta con información acerca de la reducción de Au³⁺ con los monómeros de quitosana (D-glucosamina y N-acetil-glucosamina), la glucosa y el citrato, se realizaron dichas síntesis a condiciones de reacción distintas a las reportadas en la literatura. También, se realizaron experimentos de viscosimetría capilar de las soluciones de quitosana y nAu para analizar el efecto en la viscosidad intrínseca de la quitosana como se ha señalado en la literatura. Finalmente, se llevó a cabo la reducción heterogénea de los iones Au³⁺ con perlas y películas de quitosana a distintos pH, la cual ha sido poco estudiada a comparación de la reducción homogénea.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos, Materiales y Equipos

2.1.1 Reactivos y Materiales

Todos los reactivos, excepto el biopolímero, fueron de grado analítico y se emplearon sin purificación previa. A continuación se listan los reactivos empleados agrupándolos según su procedencia.

- Quitosana, MW = 456 kDa, DDA = 87,12% fue obtenida a partir de quitina de centollón IDEBIO mediante desacetilación parcial alcalina. El peso molecular promedio se determinó por viscosimetría capilar a 30°C y el grado de desacetilación por ¹H-RMN, en D₂O/DCl a 70°C.
- Quitosana, MW = 834 kDa, DDA = 79,61% de quitina de centollón IDEBIO.
- **SCP Science:** Solución de ácido tetracloroáurico en HCl 10%. Estándar de absorción atómica trazable a NIST, concentración 1000 µg/mL.
- **JT Baker:** Acetato de sodio e hidróxido de sodio.
- **Merck:** Ácido clorhídrico concentrado, ácido nítrico concentrado, ácido acético glacial, cloruro de sodio, nitrato de plata, epiclorhidrina, glutaraldehído (50%) y agua deuterada (99,9%).
- **Sigma-Aldrich:** Hidrocloruro de D-glucosamina (98%) y N-acetil-D-glucosamina (99%).
- **Riedel-de Haën:** Citrato trisódico dihidratado y D-glucosa monohidratada.
- **Mallinckrodt:** Dihidrógeno fosfato de potasio.
- Agua ultrapura (grado Milli Q, pH 6,01 y resistividad 18,2 x 10⁶ Ω·cm) obtenida de un sistema conformado por ósmosis inversa y filtración mediante filtro de fibra hueca con tamaño de poro 0,2 µm.
- Membrana de celulosa para diálisis Spectra/Por® de Spectrum Laboratories, Inc. MWCO (límite de peso molecular retenido al 90%) entre 6 y 8 kDa.

- Filtro metálico a presión con malla metálica

2.1.2 Equipos

Los equipos utilizados se encuentran en la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú a menos que se indique lo contrario.

- Espectrómetro UV-Vis de doble haz, Perkin Elmer modelo Lambda 2, cuenta con lámparas de deuterio y halogenuro de tungsteno como fuente de radiación, monocromador de rejilla holográfica cóncava de 1053 líneas/mm, par de diodos como detector y rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm.
- Espectrómetro UV-Vis de simple haz, Agilent 8453E, posee lámparas de deuterio y tungsteno como fuente de radiación, monocromador de rejilla holográfica cóncava, arreglo de fotodiodos como detector y rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm.
- Espectrómetro infrarrojo, Perkin Elmer modelo FT-IR 100, consta de una fuente de luz láser de He, Ne; detector LiTaO₃ (tantalato de litio) y una barra de carburo de silicio como fuente de radiación.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker de 300 MHz y consola Avance^{III} 300, posee un magneto superconductor Ultrashield de 7,05 T, una sonda de banda ancha de 5 mm que observa núcleos de protón (¹H) y carbono (¹³C) y una unidad de temperatura Eurotherm B-VT200 que varía entre 20°C y 200°C. Se cuenta con una sal de sodio del ácido 3-(Trimetilsilil)-propiónico-D₄ al 98% (TSP) como estándar interno para la calibración de espectros de RMN.
- Microscopio de fuerza atómica, Nanosurf Easyscan 2, posee una sonda de carburo de silicio de tipo NCLR-10 y opera de modo dinámico con una frecuencia de resonancia de 185 KHz. *Ingeniería Mecánica (PUCP)*.
- Microscopio electrónico de transmisión, FEI Tecnai T20, el equipo cuenta con rejillas de cobre recubiertas con carbono (CF200-Cu de Electron Microscopy Sciences) y opera a 200 kV. *Universidad de Zaragoza, España*.

- Analizador de potencial Z por ELS, Malvern Zetasizer Nano Series. *Universidad de Minho, Portugal.*
- pH-metro ORION modelo 420 con electrodo de Ag/AgCl y soluciones buffer MERCK pH 4, 7 y 10 para calibración del equipo.
- Liofilizador Labconco modelo 4,5 a $0,07 \times 10^{-3}$ mbar y -47°C .
- Termostato Julabo modelo MP para baño de agua.

2.2 Metodología

Todos los materiales de vidrio utilizados para la síntesis fueron lavados previamente con agua regia (HNO_3/HCl en proporción 1/3), luego con agua destilada y finalmente con agua ultrapura para retirar impurezas que pudieran afectar la formación de nAu.

2.2.1 Preparación de soluciones de quitosana y HAuCl_4 en buffer

El biopolímero quitosana de $\text{MW} = 456$ kDa y $\text{DDA} = 87,12\%$ se disolvió por completo con agitación constante en una solución buffer NaOAc/HOAc (0,10 M / 0,20 M) a pH 4,46 para obtener soluciones de quitosana en el rango de concentración de 0,03%-1,00% (w/v). La solución incolora resultante se filtró con filtro metálico para retirar impurezas. Como reactivo precursor de las nanopartículas de oro se utilizó una solución estándar acuosa de HAuCl_4 de concentración $5,08 \times 10^{-3}$ mol/L y pH 1. La dilución de la solución de HAuCl_4 en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) para una concentración de $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L resultó en una solución con ligera tonalidad amarilla. Las mediciones de los espectros UV-Vis de ambos reactivos se realizaron con agua ultrapura como blanco.

2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro con quitosana y caracterización por espectroscopía UV-Vis

A partir de la solución estándar de HAuCl_4 y de las soluciones de quitosana ($\text{MW} = 456$ kDa, $\text{DDA} = 87,12\%$) se realizaron distintos experimentos modificando los siguientes parámetros: relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$ desde 10/1 hasta 367/1, tiempo de reacción entre 20 minutos y 8 horas, temperatura a 50°C , 75°C y 100°C , pH de 1 a 5,95 y concentración de ambos reactivos desde cinco veces menos concentrado hasta cinco

veces más concentrado. El parámetro de relación molar Qna/Au^{3+} se basa en las moles de unidades repetitivas de quitosana y las moles de Au^{3+} presentes en la mezcla de reacción antes de la síntesis. El calentamiento se llevó a cabo con agitación constante en un recipiente con un baño de silicona para un adecuado control de la temperatura. Inmediatamente, se realizó la caracterización por espectroscopía UV-Vis de las soluciones de nanopartículas de oro con quitosana sin dilución. Como la síntesis fue en medio acuoso, se empleó agua ultrapura como blanco de todas las mediciones, las cuales se realizaron entre 190 y 1100 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de espesor.

2.2.2.1 Efecto de la relación molar Qna/Au^{3+}

Para obtener relaciones molares Qna/Au^{3+} entre 10/1 y 367/1 (Tabla 1) se utilizó 5 mL de soluciones de quitosana en el rango de concentración de 0,03%-1,00% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) y cada solución se mezcló con 161 μ L de solución de $HAuCl_4$ 5,08 mM. Inmediatamente, se calentó a 75°C cada mezcla de reacción con agitación constante por una hora. Al finalizar este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo para detener la reacción y se caracterizó por espectroscopía UV-Vis. Se trabajó cada síntesis por duplicado. Además se estudió la estabilidad durante 2 meses luego de almacenar las soluciones a temperatura ambiente (20°C) y a 2°C.

Tabla 1. Valores de relación molar Qna/Au^{3+} .

[Au ³⁺] (mol/L)	[Qna]		Qna/Au ³⁺
	% (w/v)	mol de unidades/L	
1,58 x 10 ⁻⁴	0,03	9,29 x 10 ⁻⁴	10/1
	0,06	1,86 x 10 ⁻³	20/1
	0,08	2,48 x 10 ⁻³	30/1
	0,11	3,41 x 10 ⁻³	40/1
	0,14	4,34 x 10 ⁻³	50/1
	0,18	5,58 x 10 ⁻³	65/1
	0,23	7,13 x 10 ⁻³	85/1
	0,26	8,06 x 10 ⁻³	95/1
	0,34	1,05 x 10 ⁻²	125/1
	0,41	1,27 x 10 ⁻²	150/1
	0,82	2,54 x 10 ⁻²	300/1
	1,00	3,09 x 10 ⁻²	367/1

2.2.2.2 Efecto del tiempo de reacción

Se empleó 5 mL de soluciones de quitosana de concentraciones 0,14%; 0,27% y 0,82% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) y a cada solución se le añadió 161 μ L de solución de HAuCl₄ 5,08 mM para obtener relaciones molares Qna/Au³⁺ 50/1, 100/1 y 300/1. Las mezclas de reacción para cada relación molar se calentaron a 75°C con agitación constante y fueron retiradas en distintos intervalos de tiempo: 10, 20 y 40 minutos; 1, 2, 4, 6 y 8 horas. Inmediatamente, las soluciones de nanopartículas de oro con quitosana se colocaron en un baño de hielo y fueron caracterizadas por espectroscopía UV-Vis. Todas las soluciones de nanopartículas se almacenaron a temperatura ambiente.

2.2.2.3 Efecto de la temperatura

Se utilizó 5 mL de soluciones de quitosana de concentraciones 0,14%; 0,27% y 0,82% (w/v) en el buffer de NaOAc/HOAc (pH 4,46) y a cada solución se le agregó 161 μ L de solución de HAuCl₄ 5,08 mM para obtener relaciones molares Qna/Au³⁺ 50/1, 100/1 y 300/1. Las mezclas de reacción para las tres relaciones molares se calentaron a 100°C a reflujo con agitación constante por 20 minutos y 1 hora. Por otro lado, las mezclas de reacción con relaciones molares 100/1 y 300/1 se calentaron a 50°C con agitación constante desde 1 hora hasta 10 horas. Al término de cada síntesis, las soluciones de nanopartículas de oro con quitosana fueron colocadas en un baño de hielo y se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis.

2.2.2.4 Efecto del pH

Para estudiar la reacción a pH 1 se preparó 5 mL de una solución de quitosana de concentración 0,27% (w/v) en una mezcla de agua ultrapura y 161 μ L de solución estándar de HAuCl₄ 5,08 mM en HCl 10%, lo que da una relación molar Qna/Au³⁺ 100/1. En cambio, para llevar a cabo las reacciones a pH 3,42, 4,46, 5 y 5,95 se prepararon distintas soluciones buffer NaOAc/HOAc. Se empleó 5 mL de soluciones de quitosana de concentración 0,27% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc a diferentes pH y a cada solución se le añadió 161 μ L de solución de HAuCl₄ 5,08 mM para obtener la relación molar Qna/Au³⁺ 100/1. Todas las mezclas de reacción se calentaron a 75°C con agitación constante durante una hora. Al concluir las síntesis, las soluciones se

colocaron en un baño de hielo, fueron caracterizadas por espectroscopía UV-Vis y luego se almacenaron a 2°C.

2.2.2.5 Efecto de la concentración de Qna-Au³⁺

Se empleó una solución de quitosana de concentración 1,32% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc (0,5 M / 1,0 M) con pH 4,46 y se añadió 3,89 mL de solución de HAuCl₄ 5,08 mM para obtener relación molar Qna/Au³⁺ 100/1. A partir de la mezcla anterior se realizaron diluciones con la solución buffer para obtener mezclas de reacción con menores concentraciones. En la Tabla 2 se muestran los valores de concentración para ambos reactivos, donde C es la concentración que representa a 5 mL de una solución de quitosana al 0,27% (w/v) y 161 µL de solución de HAuCl₄ 5,08 mM. Las mezclas de reacción se calentaron a 75°C con agitación constante durante una hora. Al finalizar este tiempo, las mezclas de reacción se enfriaron en un baño de hielo y fueron caracterizadas por espectroscopía UV-Vis. Se trabajó cada síntesis por duplicado y las soluciones se almacenaron a 2°C.

Tabla 2. Valores de concentración Qna-Au³⁺.

Qna % (w/v)	[Au ³⁺] mol/L	[Qna-Au ³⁺]
1,35	7,90 x 10 ⁻⁴	5C
0,81	4,74 x 10 ⁻⁴	3C
0,27	1,58 x 10 ⁻⁴	C
0,14	7,90 x 10 ⁻⁵	C/2
0,05	3,16 x 10 ⁻⁵	C/5

2.2.3 Caracterización de nanopartículas de oro con quitosana

2.2.3.1 Caracterización por UV-Vis

Se estimó el diámetro de nAu para cuatro relaciones molares Qna/Au³⁺ 50/1, 85/1, 150/1 y 300/1 a partir de la absorbancia de la banda de plasmones de superficie y de la absorbancia de la banda a 450 nm (espectros UV-Vis). Asimismo, se calculó la concentración de nAu para las cuatro relaciones molares mediante la ley de Beer-Lambert. Las ecuaciones utilizadas fueron las que se reportan en la Sección 1.5.2.2.

2.2.3.2 Caracterización por TEM

Se caracterizaron cuatro soluciones de nAu-Qna de relación molar Qna/Au³⁺ 50/1, 85/1, 150/1 y 300/1 sintetizadas a 75°C durante una hora de reacción. Para la obtención de imágenes del TEM, se colocó una gota de las soluciones de nAu sin dilución sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono y se evaporó el solvente a temperatura ambiente. A partir de las imágenes del TEM se determinó el tamaño de 200 unidades de nAu-Qna para cada relación molar con el programa Image J (Wayne Rasband) y se calculó el tamaño promedio de partícula así como la desviación estándar.

2.2.3.3 Caracterización por ELS

En el caso de la caracterización por potencial zeta, las mediciones se realizaron en celdas de plástico con soluciones de nanopartículas de oro sin dilución y con diluciones en agua ultrapura 1:10, 1:100 y 1:1000. El tratamiento de los datos para cada relación molar Qna/Au³⁺ se realizó con el programa Zetasizer, el cual brinda información sobre el potencial zeta en base a una distribución de potencial zeta. En el Anexo 1 se presentan los datos que fueron utilizados para la obtención de las gráficas de distribución de potencial zeta para cada una de las soluciones de nAu-Qna.

2.2.3.4 Caracterización por AFM

Previo al análisis de la muestra de nAu-Qna se obtuvieron imágenes del AFM del sustrato de mica limpio. Para ello, se marcó una circunferencia de 3 mm sobre la mica de 2,5 cm x 2 cm, se retiraron unas capas de mica y se limpió el sustrato con un flujo bajo de nitrógeno. Como blanco se analizó una muestra seca de quitosana a partir de una solución de 0,23% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc calentada a 75°C por una hora de la cual se empleó 3 µL para recubrir la circunferencia en el sustrato. Para el análisis de la muestra de nAu-Qna, se utilizó una solución con relación molar Qna/Au³⁺ 85/1 diluida en agua ultrapura en proporción 1:10. Se recubrió la circunferencia en el sustrato limpio de mica con 3 µL de la dilución y se evaporó a temperatura ambiente. Luego del análisis, esta muestra de nAu-Qna fue lavada con agua ultrapura y al secar se realizaron mediciones por AFM. Las imágenes del AFM se obtuvieron con el programa Nanosurf Easyscan 2 en modo dinámico a temperatura ambiente. La determinación del tamaño de partícula (altura y longitud) se realizó con el programa Gwyddion 2.31.

2.2.3.5 Caracterización por IR y $^1\text{H-RMN}$

Para la caracterización del agente estabilizador de las nanopartículas de oro se empleó espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear de protón. En ambos casos, se utilizaron muestras de quitosana y de nanopartículas de oro con quitosana con relación molar 95/1, previamente dializadas en agua ultrapura y liofilizadas. En cuanto a la caracterización por IR, se prepararon pastillas en KBr de las muestras liofilizadas y se obtuvieron espectros IR entre $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Con respecto a la caracterización por $^1\text{H-RMN}$, se disolvieron con agitación constante 11 mg de los sólidos liofilizados en 700 μL de D_2O más unas gotas de $\text{DCI/D}_2\text{O}$. La solución de quitosana resultante era incolora; en cambio, la solución de nanopartículas de oro con quitosana era morada.

2.2.4 Síntesis de nanopartículas de oro con otros agentes reductores y caracterización por espectroscopía UV-Vis

Se utilizaron cuatro agentes reductores los cuales fueron D-glucosamina-HCl, N-acetil-D-glucosamina (ambos monómeros de la quitosana), D-glucosa y citrato trisódico. Para la caracterización por espectroscopía UV-Vis se empleó agua ultrapura como blanco de todas las mediciones, las cuales se realizaron entre 190 y 1100 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de espesor.

2.2.4.1 Síntesis y caracterización de nAu con monómeros de quitosana

Para comparar con las síntesis anteriores se utilizaron soluciones de D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina y mezclas de ambas en distintas proporciones para asemejar la presencia de quitosana (igual DDA). Para obtener relaciones molares monómero/ Au^{3+} de 85/1 y 300/1 (Tabla 3) se emplearon soluciones de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina en el rango de concentración de 0,26%-1,058% y 0,003%-1,085% (w/v) respectivamente en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46). Cada solución de monómero y cada mezcla de monómeros en diferentes proporciones se mezclaron con 161 μL de solución estándar HAuCl_4 5,08 mM. Seguidamente, cada mezcla de reacción se calentó a 75°C con agitación constante por una hora. En el caso de las mezclas que tenían solo N-acetil-D-glucosamina se continuó la reacción hasta 4 horas. Al concluir la reacción, cada solución de nAu sin dilución se caracterizó por espectroscopía UV-Vis.

Tabla 3. Valores de concentración y relación molar monómero/Au³⁺.

[Au ³⁺] (mol/L)	GluN % (w/v)	GluN/ GluNAc %	GluNAc % (w/v)	GluNAc/ GluN %	Monómero/ Au ³⁺
1,58 x 10 ⁻⁴	0,299	100	0	0	85/1
	0,297	99	0,003	1	
	0,285	95	0,015	5	
	0,260	87	0,039	13	
	0	0	0,308	100	
	1,058	100	0	0	300/1
	0	0	1,085	100	

2.2.4.2 Síntesis y caracterización de nAu con D-glucosa

Para obtener relación molar glucosa/Au³⁺ 85/1 se utilizó una solución de D-glucosa monohidratada 0,28% en solución buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) y se mezcló con 161 µL de solución HAuCl₄ 5,08 mM. La mezcla de reacción se calentó a 75°C con agitación constante durante una hora. Inmediatamente, la solución de nAu-D-glucosa sin dilución se analizó por UV-Vis.

2.2.4.3 Síntesis y caracterización de nAu con citrato trisódico

Previamente a la síntesis, se evaporó 246 µL de solución HAuCl₄ 5,08 mM a temperatura ambiente en un recipiente con silica gel con un flujo bajo de nitrógeno para acelerar el proceso. Se obtuvieron cristales amarillos de HAuCl₄ que se disolvieron en 4,75 mL de agua ultrapura y la solución de pH 5 se calentó a 100°C con agitación constante a reflujo por 25 minutos. A esta solución de HAuCl₄ se le añadió rápidamente 64,5 µL de solución de citrato trisódico dihidratado 5% para obtener relación molar Na₃citrato/Au³⁺ 10/1. La mezcla de reacción se mantuvo a 100°C con agitación constante por 25 minutos. Al concluir la reacción, la solución de nAu-citrato se enfrió hasta temperatura ambiente y se caracterizó por UV-Vis. No se añadió la solución estándar de HAuCl₄ porque disminuye el pH de la solución acuosa de 6 a 1 y no se forman nanopartículas de oro estables.

A modo de comparación, se realizó la síntesis de nAu con citrato trisódico y quitosana al mismo tiempo a 75°C para observar el efecto de ambos agentes reductores y estabilizadores en la formación de nAu. Primero, se disolvió quitosana en solución NaOAc/HOAc (pH 4,46) para obtener una solución con relación molar Qna/Au³⁺ 100/1. A esta solución del biopolímero se le añadió citrato trisódico dihidratado para obtener solución con relación molar Na₃citrato/Au³⁺ 3,5/1 y se mezcló con solución HAuCl₄ 5,08 mM. La mezcla de reacción se calentó a 75°C con agitación constante por una hora. Al concluir la reacción, la solución sin dilución se analizó por UV-Vis. Se utilizó relación molar Na₃citrato/Au³⁺ 3,5/1 para asemejar un menor tamaño de nAu como se ha reportado para la síntesis con citrato trisódico en condiciones de ebullición [18].

2.2.5 Comparación de la viscosidad intrínseca de quitosana, nAu-Qna y nAu-Qna-citrato

Para la determinación de la viscosidad intrínseca se utilizaron soluciones de quitosana, soluciones de nAu-Qna y soluciones de nAu-Qna-Na₃citrato en el rango de concentración de quitosana $1,3 \times 10^{-3}$ g/mL a $1,988 \times 10^{-3}$ g/mL en solución NaOAc/HOAc (0,1 M / 0,2 M) a pH 4,46. Cada solución fue diluida tres veces con solución buffer hasta alcanzar una concentración entre $8,125 \times 10^{-4}$ g/mL y $1,2425 \times 10^{-3}$ g/mL. Se realizaron 4 mediciones de tiempo para cada una de las cuatro concentraciones por cada muestra. Todas las mediciones se efectuaron en un viscosímetro Ubbelohde 1C a 30°C. Como blanco se empleó la solución NaOAc/HOAc 0,1 M / 0,2 M.

2.2.6 Reducción heterogénea con perlas y película de quitosana

Las perlas y películas se elaboraron con quitosana de MW = 834 kDa y DDA = 79,61%.

2.2.6.1 Preparación de perlas de quitosana

La quitosana se disolvió en una solución HOAc 1% v/v con agitación constante. La solución ligeramente amarilla resultante al 2% w/v se filtró con filtro metálico a presión. Para formar las perlas, la solución de quitosana se goteó sobre una solución NaOH 0,70 M en etanol con agitación constante. Las perlas de quitosana obtenidas se lavaron con agua destilada hasta pH neutro.

2.2.6.2 Entrecruzamiento de perlas de quitosana con epíclorhidrina

Se lavaron perlas de quitosana con agua ultrapura, luego se sumergieron en una solución de epíclorhidrina 0,01 M en NaOH 0,067 M a 50°C por 4 horas. Al finalizar, las perlas entrecruzadas se lavaron con agua destilada y ultrapura hasta pH neutro [62]. Se realizó una prueba de solubilidad de una perla entrecruzada en solución HOAc 1% v/v.

2.2.6.3 Entrecruzamiento de perlas de quitosana con glutaraldehído

Se lavaron cinco perlas de quitosana con agua ultrapura y se sumergieron en una solución acuosa de glutaraldehído 2,5% v/v a temperatura ambiente por 17 horas. Luego, se lavaron las perlas entrecruzadas con agua destilada y ultrapura hasta pH neutro [63]. Se llevó a cabo una prueba de solubilidad de una perla entrecruzada en solución HOAc 1% v/v.

2.2.6.4 Preparación de película de quitosana

En primer lugar, la quitosana se disolvió en una solución HOAc 1% v/v con agitación constante. La solución ligeramente amarilla obtenida al 2% w/v se filtró con filtro metálico a presión y fue vertida sobre una placa petri de plástico. La película se formó después de la evaporación del solvente en una cámara ventilada. Para la desprotonación de los grupos amino, la película fue lavada sucesivamente con una solución de NH₃ en metanol y un último lavado con metanol. Finalmente, la película de quitosana fue secada en la cámara ventilada y luego al vacío.

2.2.6.5 Síntesis de nAu con perlas y películas de quitosana

Se colocaron perlas, perlas entrecruzadas con epíclorhidrina y con glutaraldehído y trozos de películas de quitosana (1,5 cm x 0,7 cm y 31,9 μm de espesor) en una solución buffer KH₂PO₄/NaOH pH 8 a la que se agregó 161 μL de solución HAuCl₄ 5,08 mM. Las distintas mezclas de reacción que contenían perlas se calentaron a 75°C con agitación suave por 30 minutos y 1 hora con 30 minutos la que contenía películas. Al término de la reacción se retiraron las perlas y películas de quitosana con nAu y se lavaron con agua destilada y ultrapura hasta pH neutro. Similarmente, se sintetizaron nAu con perlas entrecruzadas en solución buffer NaOAc/HOAc pH 4,46.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Espectros UV-Vis de soluciones de quitosana y HAuCl_4 en buffer

En la Figura 11 se presentan los espectros UV-Vis entre 220-500 nm de soluciones de quitosana a distintas concentraciones expresadas en porcentaje (w/v) en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) que se emplearon en las síntesis de nanopartículas de oro. La quitosana presenta una banda de absorción en la región ultravioleta alrededor de 294 nm que corresponde a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ del grupo C=O. Se observa que la absorbancia se incrementa de manera directa con la concentración del biopolímero en solución según la ley de Beer-Lambert. Por otro lado, el espectro UV-Vis de la solución de HAuCl_4 diluida en buffer NaOAc/HOAc (pH 4,46) para una concentración de $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L y el complejo de coordinación cuadrado plano $[\text{AuCl}_4]^-$ se muestran en la Figura 12. Estudios previos llevados a cabo por Ling, Wang y colaboradores señalan que la absorbancia intensa a 311 nm en la región ultravioleta, corresponde a la banda de transferencia de carga entre los ligandos Cl⁻ y el catión metálico Au^{3+} que representa una transferencia electrónica $p \rightarrow d$ [64, 65]. Sin embargo, la leve coloración amarilla de la solución se debe a la débil absorbancia en la región visible por encima de 380 nm. La concentración $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L de HAuCl_4 corresponde a las moles de iones Au^{3+} en el volumen final de la mezcla de reacción antes de la síntesis. Como las bandas de absorción de la quitosana y del complejo HAuCl_4 se superponen no es posible evaluar la disminución de la concentración de los iones Au^{3+} durante el transcurso de la reacción por medio de la espectroscopía UV-Vis.

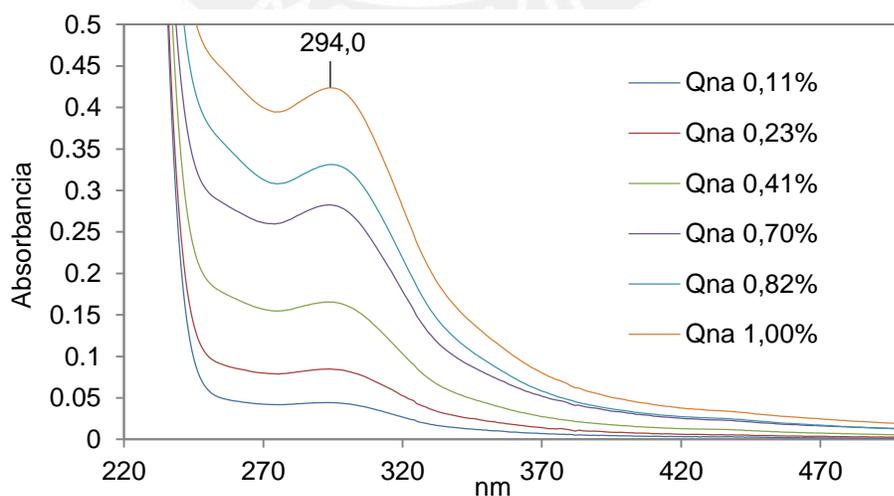


Figura 11. Espectros UV-Vis de soluciones de quitosana en buffer NaOAc/HOAc.

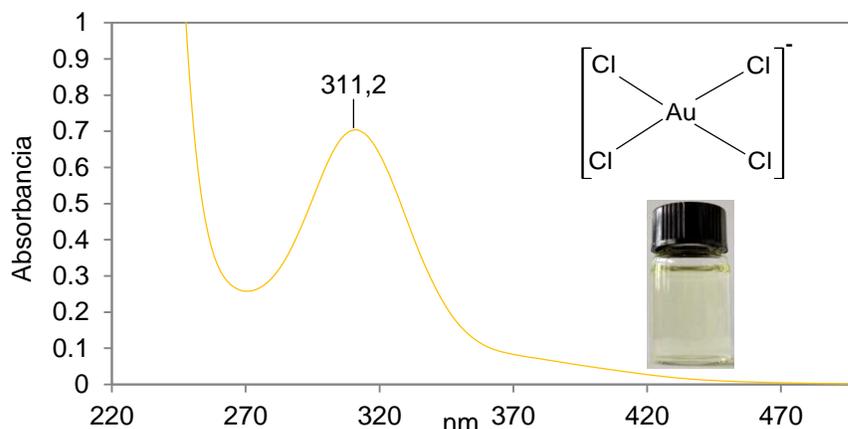


Figura 12. Espectro UV-Vis de solución de HAuCl_4 $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L en NaOAc/HOAc.

3.2 Síntesis de nanopartículas de oro con quitosana y caracterización por espectroscopía UV-Vis

3.2.1 Efecto de la relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$

La banda de plasmones de superficie localizados depende del tamaño, forma y distribución de tamaño de partícula. Su relación con el tamaño no es directa debido a la influencia de factores como la constante dieléctrica del medio, interacciones entre nanopartículas y carga superficial (Sección 1.5.2.1) en la posición de la banda de absorción [57]. A pesar de ello, se ha reportado que a mayor longitud de onda el tamaño de partícula es mayor [19, 66]. En cuanto a la forma de la partícula, una única banda de absorción en la región de 500-600 nm indica nanopartículas esféricas y una banda adicional en la región de 600-900 nm o en el infrarrojo señala nanopartículas con otras geometrías [39, 67]. En el caso de la distribución de tamaño de partículas esféricas, una banda de absorción angosta corresponde a nanopartículas monodispersas y una banda ancha indica nanopartículas polidispersas.

En la Tabla 4 se muestran los valores de longitud de onda y absorbancia de la banda de plasmones de superficie obtenidos al término de la reacción y después de almacenar las soluciones de $n\text{Au-Qna}$ a temperatura ambiente por 2 meses. En la Tabla 5 se presentan los valores de banda de plasmones de superficie para soluciones de $n\text{Au-Qna}$ que fueron almacenadas a 2°C también durante 2 meses. En ambas tablas y para cada relación molar, al comparar la longitud de onda y absorbancia al finalizar la reacción se observa similitud en los valores lo que demuestra que la síntesis es reproducible. En el rango de relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$ desde 10/1 hasta 367/1, la

quitosana actuó como agente reductor de los iones Au^{3+} en solución a pH 4,46 pero su capacidad estabilizadora depende de su cantidad.

Tabla 4. Valores de λ , A y $\Delta\lambda$ (nm) de banda de plasmones de superficie según relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$ y estabilidad a temperatura ambiente.

$\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$	Al finalizar reacción		1 mes después		2 meses después	
	λ (nm) \pm s	A ($\Delta\lambda$)	λ (nm)	A ($\Delta\lambda$)	λ (nm)	A ($\Delta\lambda$)
10/1	708,5 \pm 2,1	0,15 (244)	-	-	-	-
20/1	534,5 \pm 2,1	0,47 (98)	540,0	0,03 (93)	-	-
30/1	526,0 \pm 0,0	0,55 (63)	533,0	0,18 (92)	537,0	0,06 (104)
40/1	524,0 \pm 0,0	0,59 (57)	533,0	0,49 (93)	535,0	0,19 (93)
50/1	524,7 \pm 0,8	0,60 (55)	528,9	0,60 (77)	531,9	0,60 (92)
65/1	523,9 \pm 0,9	0,62 (53)	526,2	0,64 (59)	527,9	0,67 (67)
85/1	522,6 \pm 0,1	0,61 (48)	523,8	0,65 (50)	525,0	0,69 (52)
95/1	522,0 \pm 0,3	0,64 (48)	523,7	0,66 (49)	Liofilizado	
125/1	521,7 \pm 0,6	0,64 (48)	523,7	0,68 (48)	524,2	0,72 (48)
150/1	521,9 \pm 1,3	0,64 (49)	523,6	0,65 (49)	523,7	0,66 (48)
300/1	522,3 \pm 0,0	0,65 (48)	523,1	0,67 (48)	523,7	0,69 (48)
367/1	522,6 \pm 0,2	0,65 (48)	523,2	0,68 (47)	523,8	0,70 (48)

Tabla 5. Valores de λ , A y $\Delta\lambda$ (nm) de banda de plasmones de superficie según relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$ y estabilidad a 2°C.

$\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$	Al finalizar reacción		1 mes después		2 meses después	
	λ (nm) \pm s	A ($\Delta\lambda$)	λ (nm)	A ($\Delta\lambda$)	λ (nm)	A ($\Delta\lambda$)
10/1	708,5 \pm 2,1	0,18 (258)	-	-	-	-
20/1	534,5 \pm 2,1	0,51 (92)	534,0	0,29 (93)	534,0	0,22 (98)
30/1	526,0 \pm 0,0	0,54 (65)	528,0	0,54 (67)	529,0	0,52 (72)
40/1	524,0 \pm 0,0	0,55 (56)	525,0	0,55 (56)	525,0	0,54 (58)
50/1	524,7 \pm 0,8	0,59 (57)	527,8	0,57 (62)	527,9	0,57 (65)
65/1	523,9 \pm 0,9	0,61 (53)	525,7	0,60 (55)	525,1	0,60 (56)
85/1	522,6 \pm 0,1	0,62 (50)	523,6	0,62 (50)	523,5	0,61 (50)
95/1	522,0 \pm 0,3	0,63 (49)	522,7	0,62 (49)	522,4	0,62 (50)
125/1	521,7 \pm 0,6	0,63 (49)	522,2	0,63 (49)	522,5	0,63 (49)
150/1	521,9 \pm 1,3	0,63 (48)	521,4	0,63 (48)	522,2	0,63 (48)
300/1	522,3 \pm 0,0	0,64 (48)	522,8	0,65 (48)	522,7	0,65 (47)
367/1	522,6 \pm 0,2	0,64 (48)	522,5	0,65 (47)	522,9	0,65 (47)

En la Figura 13, se observa que la tonalidad de las soluciones de nanopartículas de oro con quitosana cambió desde una ligera coloración azul hasta el rojo conforme aumenta la relación molar Qna/Au^{3+} . Cuando se emplearon relaciones molares menores a 50/1, las soluciones de nAu-Qna presentaron un sólido adherido al agitador magnético al finalizar la síntesis. Para la relación molar 10/1, la solución tenía una ligera tonalidad azul con precipitado azul y al usar proporciones 20/1, 30/1 y 40/1 las soluciones tuvieron una coloración morada, violeta y rosada, respectivamente. Asimismo, para Qna/Au^{3+} 50/1 y 65/1, las soluciones fueron rosadas pero no poseían sólido al término de las síntesis. En el caso de las síntesis con relaciones molares desde 85/1 hasta 367/1, las soluciones de nAu-Qna eran rojas y tampoco presentaron sólido alguno. Este aumento del número de moles de unidades de quitosana controla el crecimiento de las nAu por medio de la estabilización electrostática y estérica, de esta manera, disminuye el tamaño de partícula lo cual se evidencia en el desplazamiento de la banda de absorción a menor longitud de onda [13, 39, 68].

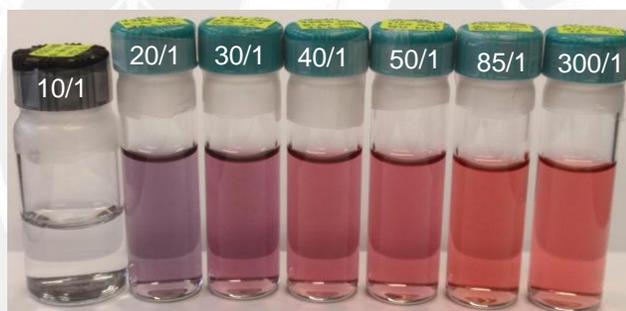


Figura 13. Soluciones de nAu a diferentes relaciones molares Qna/Au^{3+} .

Para la relación molar 10/1, durante la hora de reacción se observó una variación del color de la solución de nAu desde el rosado leve hasta el azul leve. En la Figura 14 se muestra la banda de plasmones de superficie al finalizar la síntesis. Esta banda de absorción a 710,0 nm al ser muy ancha señalaría la presencia de interacciones fuertes entre partículas de oro no esféricas en solución e indica amplia distribución de tamaño tal como se ha reportado en investigaciones realizadas por Huang y colaboradores [39]. La débil absorbancia indica una baja concentración de nAu en solución porque existen partículas que forman precipitado. Después de 1 mes a temperatura ambiente y a 2°C, las soluciones de nanopartículas resultaron casi incoloras y se observó la

presencia de un sólido azul en mayor cantidad. De esta manera, se hace evidente que la cantidad de quitosana utilizada no fue suficiente para estabilizar la superficie de las nanopartículas en la etapa de crecimiento y las fuerzas de atracción predominaron para formar agregados que al ser inestables precipitaron aun más con el tiempo.

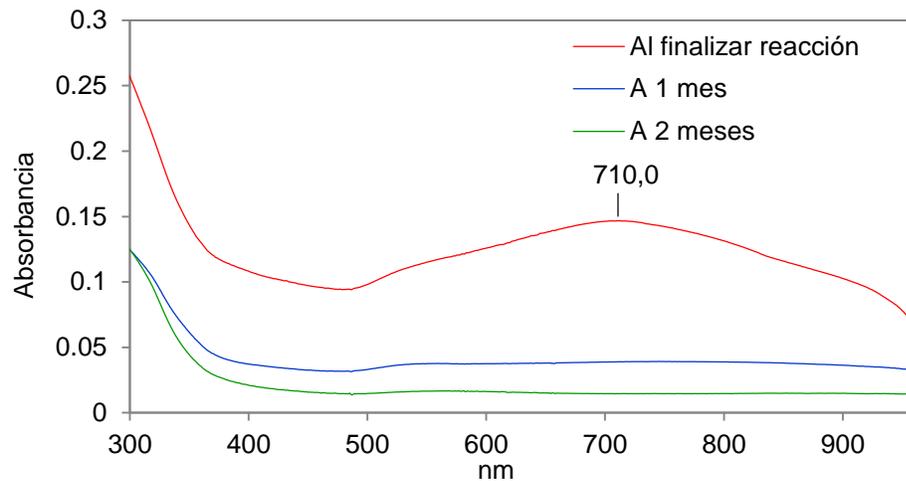


Figura 14. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au³⁺ 10/1.

Para la relación molar 20/1, la banda de plasmones de superficie se presenta en la Figura 15. La posición de la banda a 536,0 nm y su absorbancia indican la presencia de nanopartículas de oro en solución, pero el hombro a 600 nm indica agregados de nanopartículas tal como se ha reportado en estudios llevados a cabo por García, Eller y colaboradores [56, 58]. Por lo tanto, la cantidad reducida de quitosana produjo la formación de nanopartículas de oro polidispersas. Luego de 1 mes a temperatura ambiente, la solución se tornó casi incolora, lo que se verificó con la disminución de la absorbancia y la formación de un precipitado morado que indicó la formación de agregados por inestabilidad de las nanopartículas (Anexo 2). En la Figura 16, se observan las bandas de absorción que corresponden a la solución de nanopartículas de oro almacenada a 2°C después de 1 mes y 2 meses. La disminución de las absorbancias fue menor con respecto al almacenamiento a temperatura ambiente lo que mostró que las nAu son más estables a 2°C.

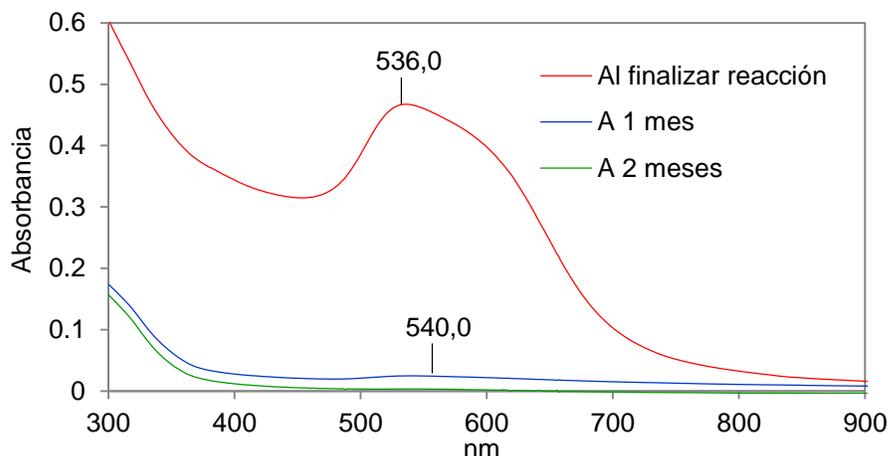


Figura 15. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au³⁺ 20/1 (T.amb.).

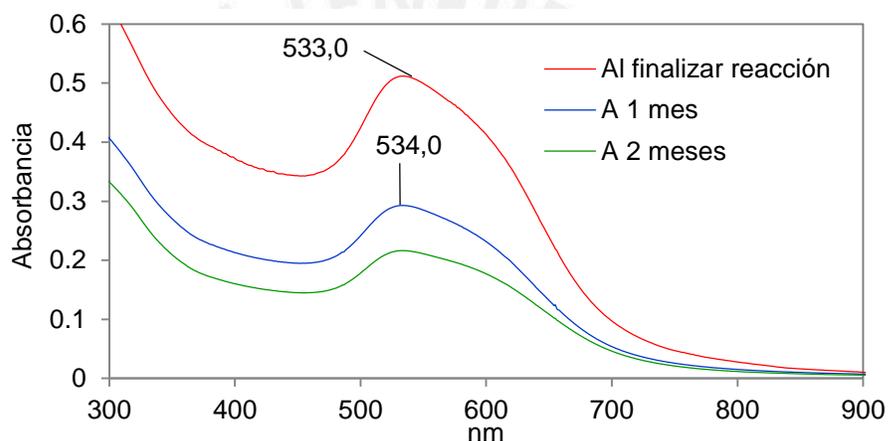


Figura 16. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 20/1 (2°C).

La banda de plasmones de superficie al término de la reacción para la relación molar 50/1 se muestra en la Figura 17. La banda ahora aparece a 524,1 nm y no posee hombro, lo que indica menor dispersión [56, 58]. Asimismo, el desplazamiento a menor longitud de onda señala nAu de menor tamaño comparado con las síntesis anteriores [19]. Sin embargo, luego de 1 mes a temperatura ambiente, las nanopartículas se agregaron y se observó la aparición de un sólido, además, la banda de absorción se desplazó a mayor longitud de onda y muestra un hombro. A pesar de ello, no se observó gran precipitación ni disminución en la absorbancia después de 2 meses. En la Figura 18, se muestran las bandas de absorción de la solución de nAu que permaneció a 2°C. En este caso se formó muy poco sólido en la solución a los 2 meses y se observó un ligero corrimiento hacia mayor longitud de onda así como un ensanchamiento de banda. Por lo tanto, las nAu a 2°C poseen más estabilidad.

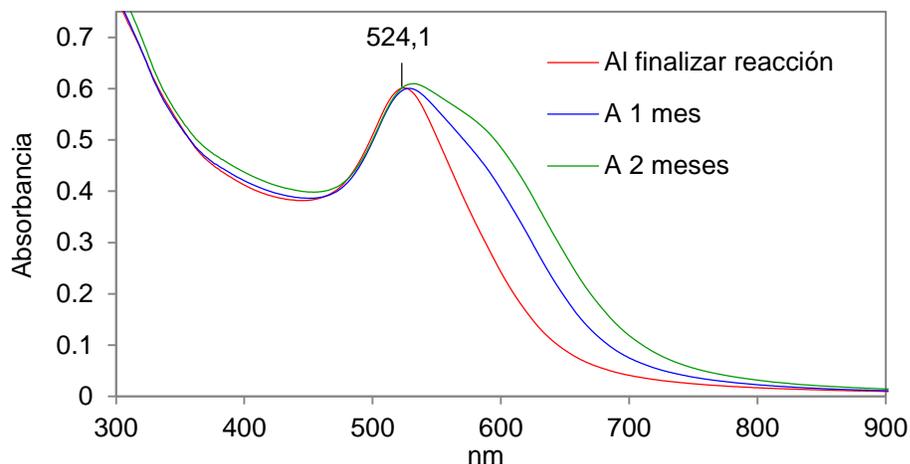


Figura 17. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au³⁺ 50/1 (T.amb.)

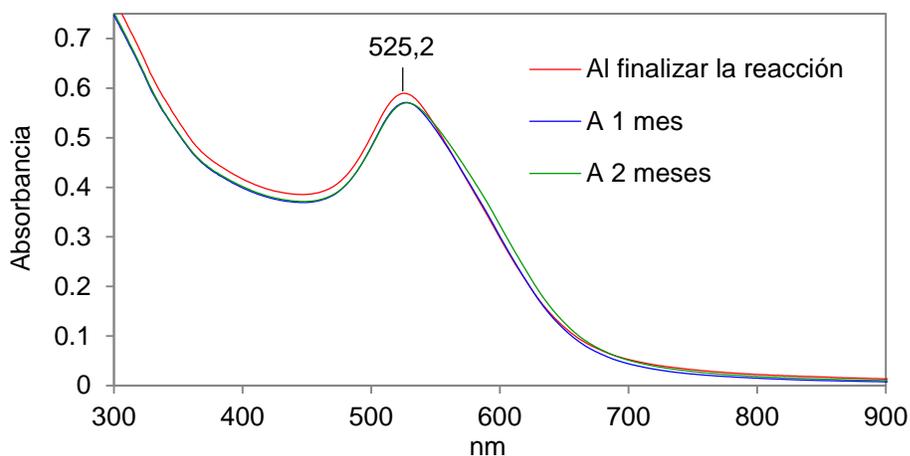


Figura 18. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 (2°C).

En la Figura 19 se muestra el espectro al finalizar la reacción para la síntesis con relación molar 85/1. A diferencia de las bandas de absorción para relaciones molares inferiores, la banda a 522,6 nm es más simétrica y angosta lo cual indica la presencia de nAu esféricas con menor dispersión de tamaños. Al almacenar la solución a temperatura ambiente, no se observó ningún sólido después de 2 meses pero se observó un incremento en la absorbancia. La concentración de nAu se elevó, probablemente, al evaporarse un poco el solvente o porque al término de la reacción quedaron iones de Au³⁺ que con el tiempo se redujeron. Por otro lado, el desplazamiento de la banda hacia mayor longitud de onda y el ensanchamiento fueron menores comparados con la síntesis 50/1 lo que muestra que estas nAu son estables. Luego de 2 meses a 2°C se observó que las tres bandas de absorción coincidieron en

longitud de onda y ancho de banda (Figura 20) lo cual indica la estabilidad de las nanopartículas a 2°C.

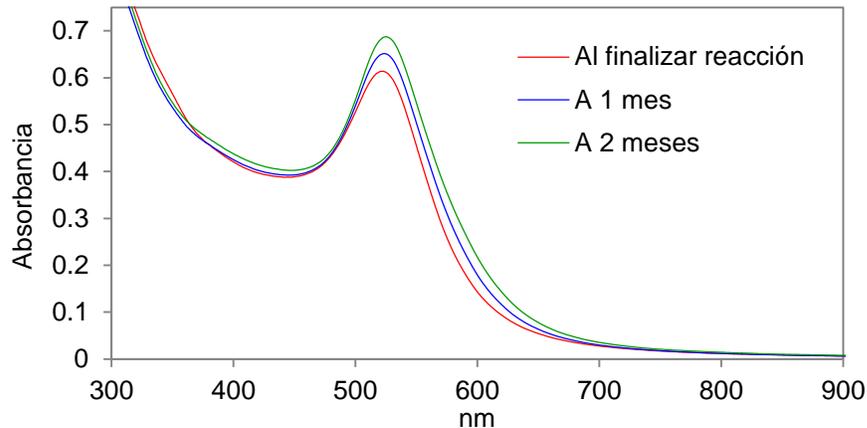


Figura 19. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar Qna/Au³⁺ 85/1 (T.amb.).

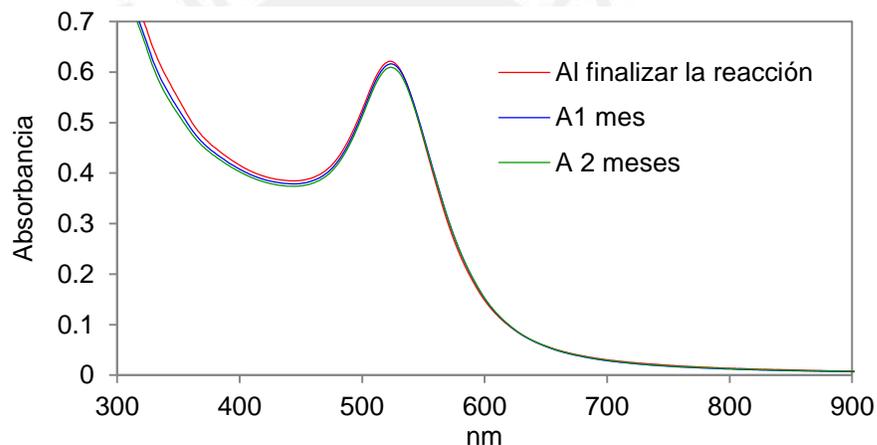


Figura 20. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 85/1 (2°C).

Como se observan en las Tablas 4 y 5, el aumento de la relación molar desde 85/1 hasta 367/1 mantiene la posición de la banda de plasmones de superficie alrededor de 522 nm al concluir la síntesis. Esto significa que los tamaños de las nAu son similares pero no necesariamente las distribuciones de tamaño. En la Figura 21 se muestran las bandas de absorción simétricas para las síntesis con Qna/Au³⁺ 85/1, 150/1 y 367/1. Los espectros UV-Vis de estas relaciones molares se normalizaron a 400 nm para comparar el ancho de banda. En la Figura 22 se observa que conforme se incrementa la relación molar, disminuye el ancho de banda, así como la absorbancia en la región de 600-700 nm. Por ello, la dispersión del tamaño de partícula es menor porque al elevar las moles de unidades repetitivas de quitosana se controla el tamaño de partícula y se favorece la monodispersidad.

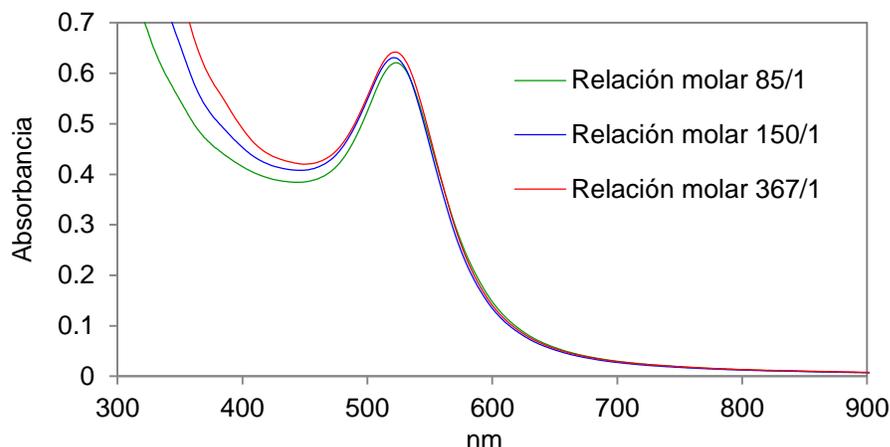


Figura 21. Espectros UV-Vis de nAu con diferentes relaciones molares Qna/Au^{3+} .

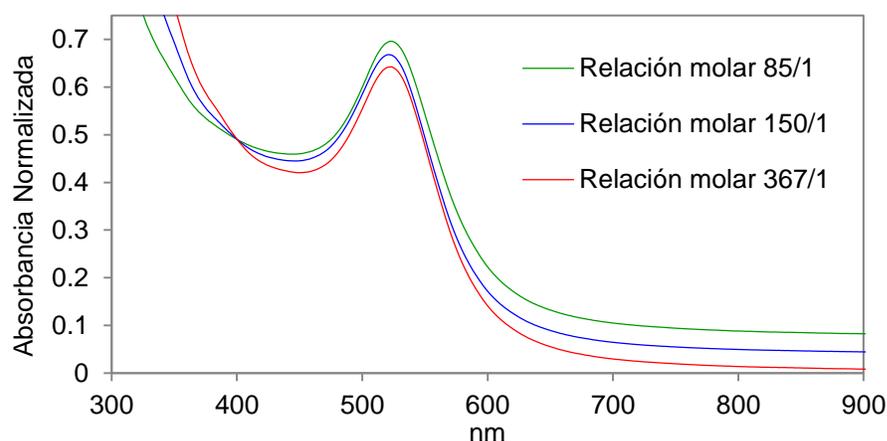


Figura 22. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a diferentes relaciones molares.

Para relaciones molares desde 95/1 hasta 367/1, las soluciones de nAu-Qna almacenadas a temperatura ambiente y a 2°C mostraron ser estables pues no presentaron sólidos en suspensión luego de 2 meses. En el caso de las soluciones de nanopartículas que permanecieron a temperatura ambiente se observó un incremento en la absorbancia de manera similar a la síntesis con Qna/Au^{3+} 85/1 y el desplazamiento de la banda de absorción a mayor longitud de onda fue mínimo. Además, para el caso de las soluciones de nAu con relación molar Qna/Au^{3+} 50/1 y 367/1 almacenadas a temperatura ambiente se continuó con el estudio de estabilidad hasta los 6 meses. A los 6 meses se observó que la solución con relación molar 50/1 se tornó azul, tenía precipitado y la banda de plasmones de superficie se desplazó de 524,7 nm hasta 600-700 nm y presentaba muy baja absorbancia. En el caso de la solución con relación molar 367/1, a los 6 meses la solución seguía con la tonalidad

roja, no se observó precipitado y la banda de plasmones se desplazó de 522,6 a 524 nm conservando su simetría.

Según lo mencionado anteriormente, el aumento del número de moles de unidades de quitosana controla el tamaño de las nAu. La relación entre la posición de la banda de absorción y el tamaño es directa, es decir, a menor longitud de onda las nAu tienen menor tamaño. Asimismo, el aumento de la relación molar Qna/Au^{3+} contribuye a la estabilidad de la superficie de las nAu. De esta manera, las nAu que poseen relación molar desde 10/1 hasta 50/1 no son estables y precipitan con el tiempo. En el caso de las soluciones con relaciones molares desde 65/1 hasta 367/1, las nAu presentan mayor estabilidad a 2°C con respecto al almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual se debería a una reducción de la cinética de agregación de las nAu.

3.2.2 Efecto del tiempo de reacción

Para todas las relaciones molares Qna/Au^{3+} , se observó que a los 20 minutos de reacción apareció la banda de plasmones de superficie y que la absorbancia aumentó conforme progresó la reacción. En la Figura 23 se muestran las bandas a diferentes tiempos de reacción para las soluciones de nAu-Qna con relación molar 50/1. El incremento de la absorbancia con el tiempo de reacción indica un aumento de la concentración de nAu en solución. En los primeros 20 minutos de reacción, la solución adquiere una ligera tonalidad violeta (Figura 24) y la banda de absorción que se encuentra a 528,9 nm muestra una absorbancia de 0,24. A los 40 minutos de reacción, la solución se torna roja (Figura 24) la banda se desplaza hacia menor longitud de onda (522,9 nm) y aumenta la absorbancia. Este cambio en la longitud de onda se correlaciona con una disminución del tamaño de las nAu, que se podría explicar por la formación de aglomerados durante la etapa de crecimiento inicial que luego se desintegran con el avance de la síntesis según lo han reportado Nagarajan [5], y Huang y colaboradores [39]. Al continuar la reacción hasta 120 minutos, la solución cambia a violeta (Figura 24) y la banda de absorción muestra un ligero desplazamiento a mayor longitud de onda (525,8 nm) lo que indica un aumento de tamaño de las partículas mientras que la absorbancia se mantiene sin mayor variación. Sin embargo, a los 120 minutos de reacción, el ancho de banda aumenta, lo que corresponde a nAu mas polidispersas lo cual ocurriría porque la superficie de la nanopartícula posee una baja estabilidad.

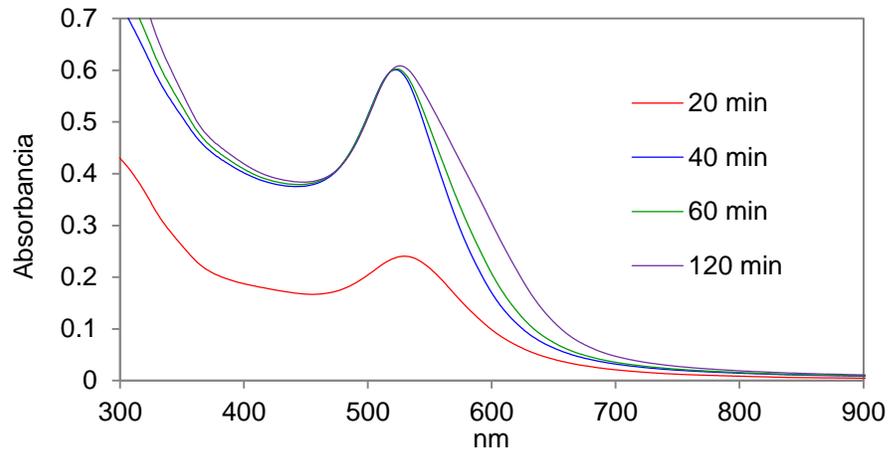


Figura 23. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a distintos tiempos de reacción.

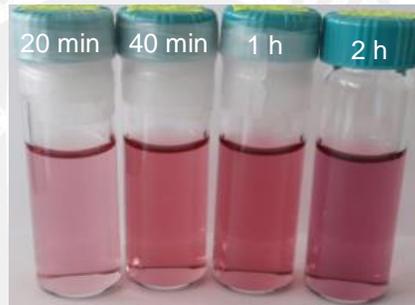


Figura 24. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 50/1 sintetizadas a distintos tiempos de reacción a 75°C.

En el caso de las soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1, el tiempo de reacción se extendió hasta 8 horas pues no se observó formación de sólidos. En la Figura 25 se observa que la tendencia de desplazamiento de la banda de plasmones de superficie es similar a la síntesis con Qna/Au³⁺ 50/1. Después de 20 minutos de reacción, aquellas nanopartículas de oro que forman aglomerados empezaron a desintegrarse y la solución inicialmente rosada se tornó roja lo que corresponde a una disminución de la longitud de onda (Figura 26). A partir de los 40 minutos de reacción, las nanopartículas crecieron hasta alcanzar un tamaño estable (igual longitud de onda). Según investigaciones realizadas por Pierre [41], esto se debe a que durante la etapa de crecimiento los iones Au³⁺ continúan siendo reducidos pero la concentración de átomos de oro no alcanza el nivel crítico para una segunda nucleación, por ello, se observa una única banda de absorción. Conforme transcurrió el tiempo de reacción, la banda de absorción mostró un ligero ensanchamiento y aumentó la absorbancia. Como

las absorbancias a 6 y 8 horas de reacción coinciden, se puede asumir que la máxima concentración de nAu se alcanzó a las 6 horas de reacción. A ese tiempo de reacción, la tonalidad de la solución fue rosada y la simetría de la banda de plasmones de superficie indicó que las nanopartículas permanecieron estables.

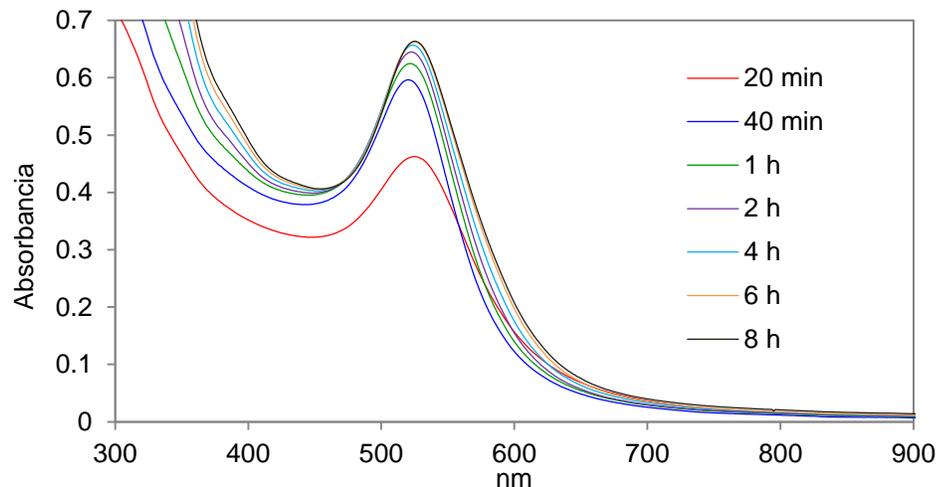


Figura 25. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintos tiempos de reacción.

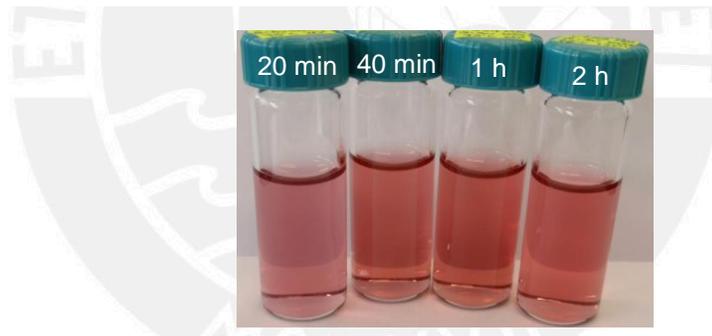


Figura 26. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 sintetizadas a diferentes tiempos de reacción a 75°C.

La Figura 27 muestra las bandas de plasmones de superficie para las soluciones de nAu-Qna con relación molar 300/1. A los 10 minutos de reacción, la solución continuó incolora (Figura 28) lo que indicó que todavía no se formaron las nAu, por ello, no se detectó absorción. A partir de los 20 minutos de reacción, se detectó la banda de absorción y esta empezó a desplazarse ligeramente hacia mayores longitudes de onda. En este caso, es posible que la etapa de crecimiento de las nAu no involucró la disociación de nanopartículas aglomeradas ya que la cantidad de quitosana utilizada podría haber evitado las interacciones por la completa estabilización estérica y electrostática. En cuanto a la concentración máxima de nAu, ésta también se alcanzó a

las 6 horas de reacción, similarmente a la síntesis con Qna/Au³⁺ 100/1, aunque la absorbancia fue mayor debido a una mayor cantidad de nanopartículas de menor tamaño. La conservación de la simetría y del ancho de banda se debería al crecimiento mas controlado de las nanopartículas de oro con quitosana.

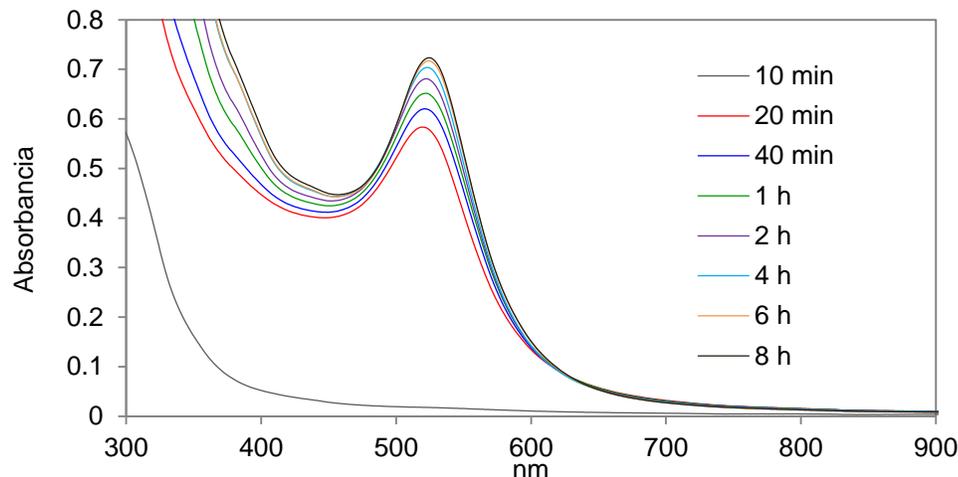


Figura 27. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a diferentes tiempos de reacción.

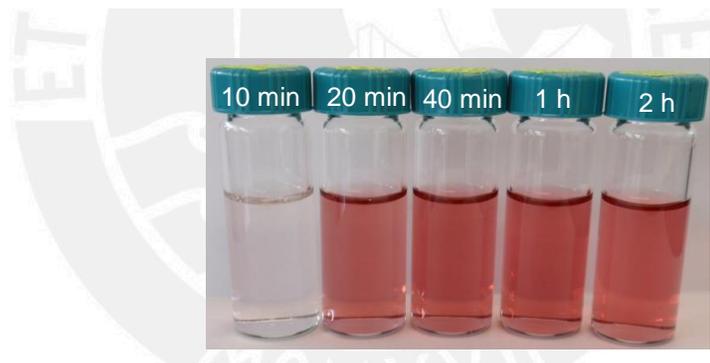


Figura 28. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 300/1 sintetizadas a distintos tiempos de reacción a 75°C.

Según lo mostrado (Figura 29), para las soluciones con relación molar 50/1, 100/1 y 300/1, las nAu se formaron poco antes de los 20 minutos de reacción. En cuanto a las soluciones con relación molar 50/1 y 100/1, es posible que al inicio de la síntesis se formen agregados, los cuales se desintegran a los 40 minutos de reacción. En cambio, para la solución con relación molar 300/1 el crecimiento de las nAu fue progresivo (ligero desplazamiento de la banda de absorción) hasta lograr un tamaño estable. Además, con el avance del tiempo de reacción, la concentración de nAu aumentó y alcanzó un valor máximo a las 6 horas de reacción.

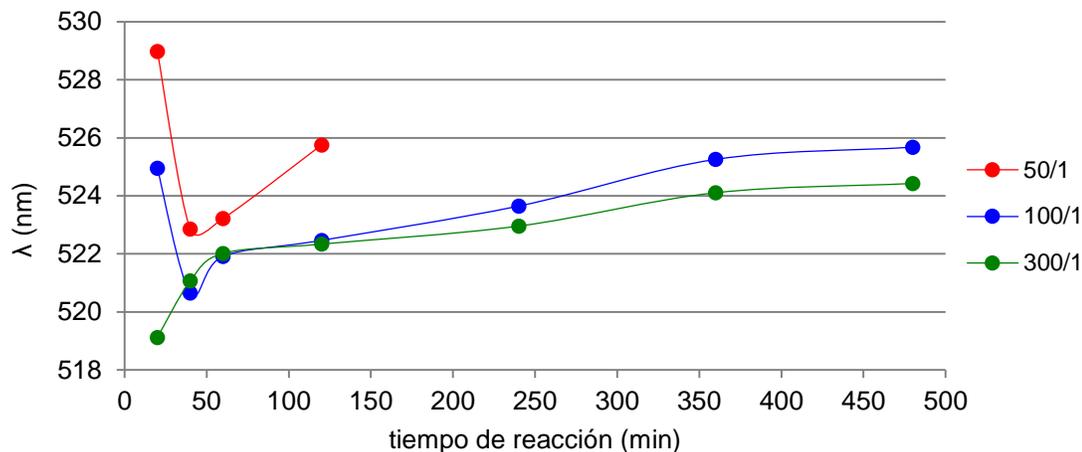


Figura 29. Valores de longitud de onda en función al tiempo de reacción.

3.2.3 Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura en la formación de las nAu-Qna a 50°C, 75°C y 100°C. En la Tabla 6 se presentan los valores de longitud de onda y absorbancia de la banda de plasmones de superficie para dos síntesis con relaciones molares Qna/Au³⁺ 100/1 y 300/1 a distintos tiempos de reacción y a 50°C. A esta temperatura se observó una diferencia en la coloración de las soluciones de nanopartículas de oro con quitosana al modificar la proporción Qna/Au³⁺. Al utilizar relación molar 100/1 y conforme transcurrió el tiempo de reacción, el color de la solución varió de una leve tonalidad morada a violeta (Anexo 3), mientras que para la relación molar 300/1 se intensificó la tonalidad rosada de las soluciones de nAu (Anexo 4). Esta variación en la longitud de onda para Qna/Au³⁺ 100/1 y 300/1 indica que el tamaño de partícula es menor en el caso de la síntesis con mayor relación molar.

De esta forma, se observó una diferencia en el tamaño de partículas entre ambas síntesis a 50°C en comparación con las síntesis a 75°C cuyos valores de longitud de onda (Tabla 7) mostraron un tamaño de partícula similar a partir de una hora de reacción. Asimismo, las longitudes de onda de la banda de absorción de nAu presentaron una tendencia distinta para las síntesis a 50°C y a 75°C ya que a las dos horas de reacción se observó un máximo de longitud de onda cuyo valor disminuyó con el avance de la reacción. Por lo tanto, la formación inicial de aglomerados de nAu-Qna tardó más tiempo a 50°C y que luego se desintegraron hasta alcanzar un tamaño estable pero mayor al tamaño alcanzado a 75°C.

Tabla 6. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para dos relaciones molares en función del tiempo a 50°C.

Qna/Au ³⁺	100/1		300/1	
	λ (nm)	A	λ (nm)	A
Tiempo de reacción (horas)				
1	534,9	0,01	528,0	0,05
2	540,5	0,11	531,2	0,22
4	537,5	0,40	528,8	0,64
6	534,8	0,62	527,8	0,75
8	531,7	0,73	527,9	0,74
10	531,7	0,72	527,9	0,76

Tabla 7. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para tres relaciones molares en función del tiempo a 75°C.

Qna/Au ³⁺	50/1		100/1		300/1	
	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A
Tiempo de reacción						
20 min	528,9	0,24	524,9	0,46	519,1	0,58
1 hora	523,2	0,60	521,9	0,62	522,0	0,65
6 horas	Se detuvo a 2 h		525,3	0,66	524,1	0,72

En la Tabla 8 se muestran los valores de banda de plasmones de superficie para nAu sintetizadas a 100°C para las mismas relaciones molares que las síntesis a 75°C. El incremento de la temperatura produjo soluciones rojas a los 20 minutos de reacción independientemente de la relación molar utilizada, sin embargo, en todos los casos se observó la formación de un sólido rojo con forma alargada que se adhirió al balón de reacción (Anexo 5). Este sólido rojo, que se encontró alrededor de la superficie de la solución, podría ser la quitosana con nAu que se concentra debido a la evaporación de la solución durante el reflujo. Al extender el tiempo de reacción hasta una hora, también se formó el sólido. Cuando se emplearon relaciones molares altas de Qna/Au³⁺, las soluciones adquirieron color rojo y los valores de longitud de onda no variaron significativamente. En el caso de la relación molar 50/1, se obtuvo una solución rosada con un sólido del mismo color adherido al agitador magnético y la banda de absorción se encontró a mayor longitud de onda.

Tabla 8. Valores de banda de plasmones de superficie de nAu para tres relaciones molares en función del tiempo a 100°C.

Qna/Au ³⁺	50/1		100/1		300/1	
Tiempo de reacción	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A
20 min	520,2	0,62	520,2	0,62	520,2	0,66
1 hora	524,1	0,46	521,2	0,65	522,4	0,67

El incremento de la temperatura a 100°C aumenta la velocidad de reacción, por ello, permite obtener nAu en menos tiempo. En las Figuras 30 y 31 se observan las bandas de plasmones de superficie a 75°C y 100°C para soluciones de nanopartículas con relación molar 50/1 al finalizar la síntesis a 20 minutos y 1 hora de reacción, respectivamente. A los 20 minutos de reacción a 100°C, la banda de absorción se encuentra a menor longitud de onda que la banda a 75°C lo que indica que se obtienen nAu de menor tamaño. Como la velocidad de reacción a 100°C es mayor, también aumentan las velocidades de nucleación y de crecimiento para formar mayor cantidad de nanopartículas lo que genera una mayor concentración. Para una hora de reacción, las longitudes de onda son parecidas tanto a 75°C como a 100°C lo que señala que las nAu poseen un tamaño similar. Sin embargo, la absorbancia a 100°C es menor lo que indica una menor concentración de nAu, que podría deberse a que la relación molar 50/1 no logra evitar la agregación de las partículas con el avance de la reacción (aparición de sólido).

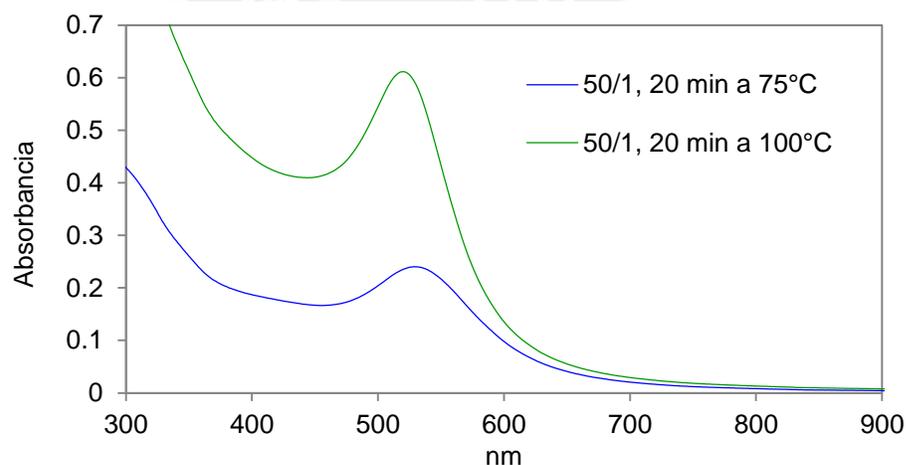


Figura 30. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.

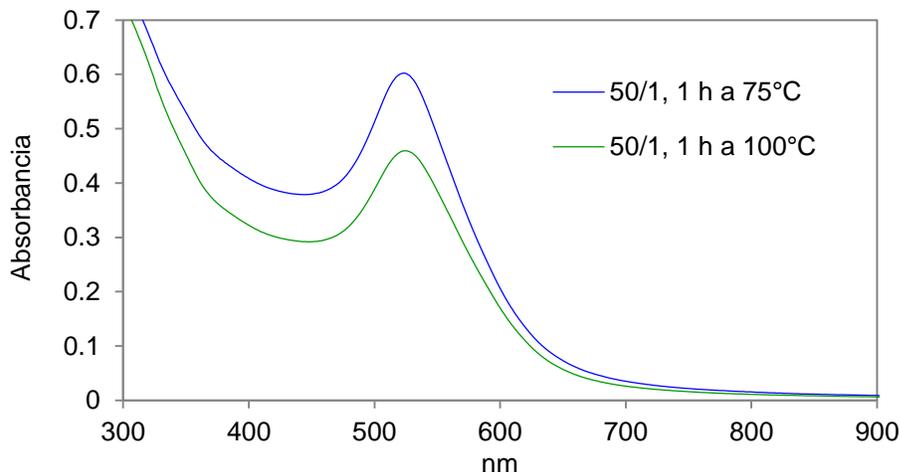


Figura 31. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 50/1 a 1 hora de reacción para 75°C y 100°C.

Las bandas de plasmones de superficie para soluciones de nanopartículas de oro con relación molar 100/1 luego de 20 minutos de reacción, a 75°C y 100°C, se muestran en la Figura 32. Para este tiempo de reacción, el aumento de temperatura produjo el desplazamiento a menor longitud de onda y la disminución del tamaño de partícula porque la nucleación, al ser más rápida, generó mayor cantidad de núcleos. En la Figura 33 se observan las bandas de absorción para las soluciones de nAu con relación molar 100/1 después de una hora de reacción, a 50°C, 75°C y 100°C. La baja absorbancia o concentración de nAu a 50°C confirmó que a esta temperatura la velocidad de reacción es muy lenta. En cambio, las bandas de absorción de las soluciones de nAu sintetizadas a 75°C y 100°C mostraron similitud en su longitud de onda, lo cual indicó que el tamaño de partícula es semejante. La absorbancia es ligeramente mayor a 100°C, posiblemente, por la evaporación de parte de la solución durante el reflujo. En la Figura 34 se presentan los espectros UV-Vis normalizados a 400 nm de las soluciones de nAu obtenidas a 75°C y 100°C. La diferencia en los espectros al realizar la normalización está en que para 100°C el ancho de banda es ligeramente menor así como la absorbancia a partir de 600 nm, por ello, estas nanopartículas de oro tienen una distribución más estrecha de tamaño de partícula.

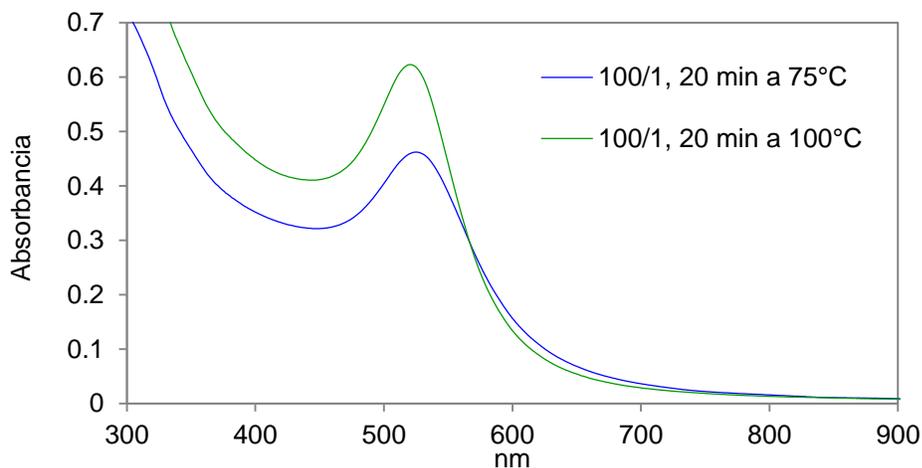


Figura 32. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.

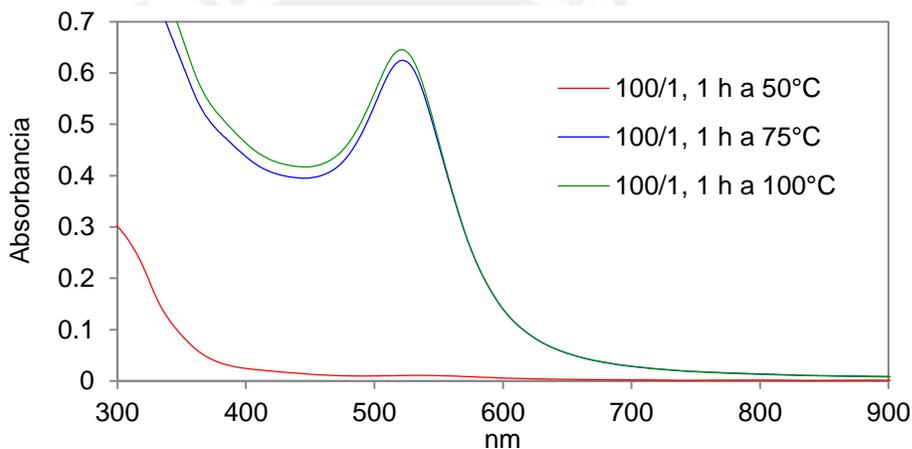


Figura 33. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a 1 hora de reacción para 50°C, 75°C y 100°C.

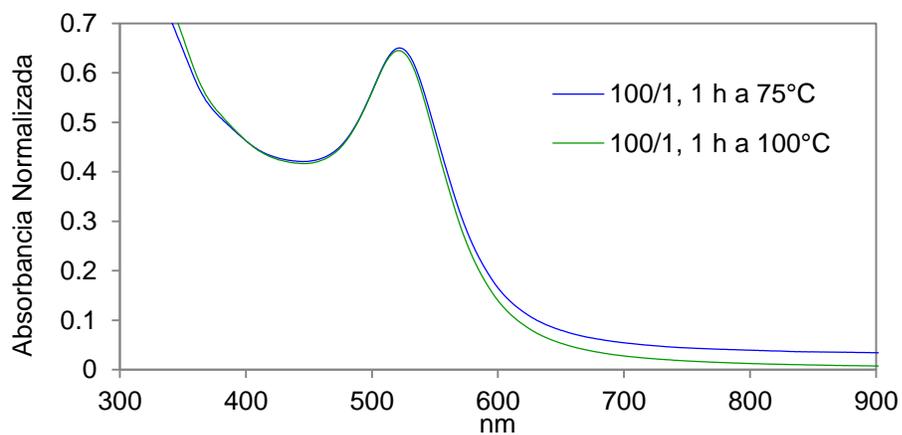


Figura 34. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a 75°C y 100°C.

En la Figura 35 se presentan las bandas de plasmones de superficie de soluciones de nAu con relación molar 300/1 al término de 20 minutos de reacción a 75°C y 100°C. Como las longitudes de onda de las bandas de absorción son cercanas entre sí, la diferencia en tamaño de partícula es mínima pero la mayor absorbancia a 100°C señaló una diferente velocidad de reacción. En la Figura 36 se observa que cuando se efectuó la síntesis a 50°C por una hora, la banda de absorción presentó muy baja absorbancia a mayor longitud de onda (528,0 nm). Debido a que la velocidad de crecimiento a 50°C es lenta con respecto a las otras temperaturas, se formaron pocas nAu y de mayor tamaño. Para las síntesis a 75°C y 100°C, las longitudes de onda de las bandas de plasmones de superficie a una hora de reacción coincidieron con una ligera diferencia en absorbancia. En la Figura 37 se muestran los espectros UV-Vis normalizados para las soluciones de nanopartículas sintetizadas a 75°C y 100°C. Para ambas temperaturas, las nAu muestran igual distribución de tamaño de partícula y son monodispersas.

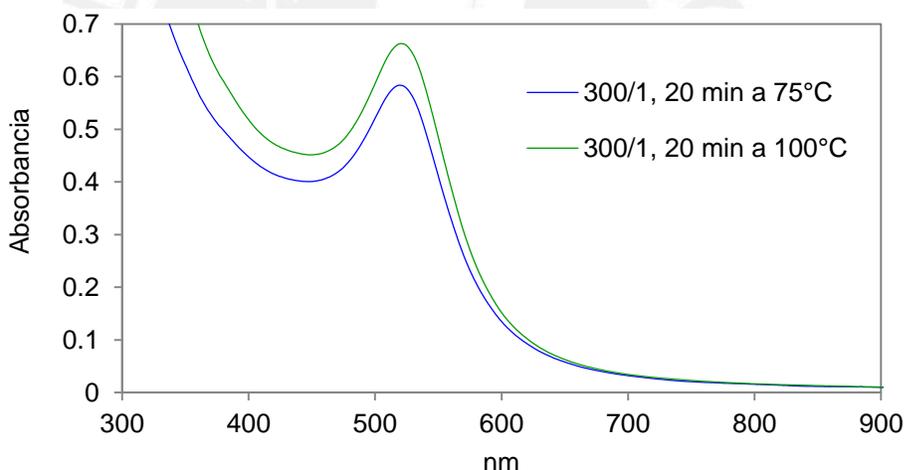


Figura 35. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a 20 minutos de reacción para 75°C y 100°C.

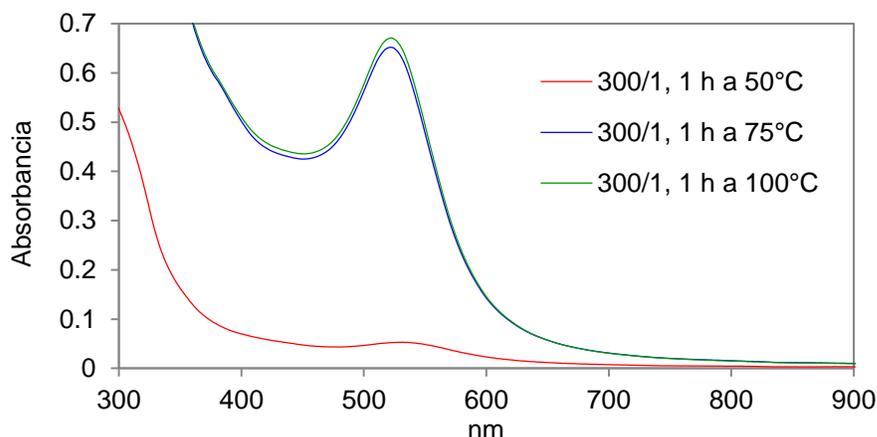


Figura 36. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 300/1 a 1 hora de reacción para 50°C, 75°C y 100°C.

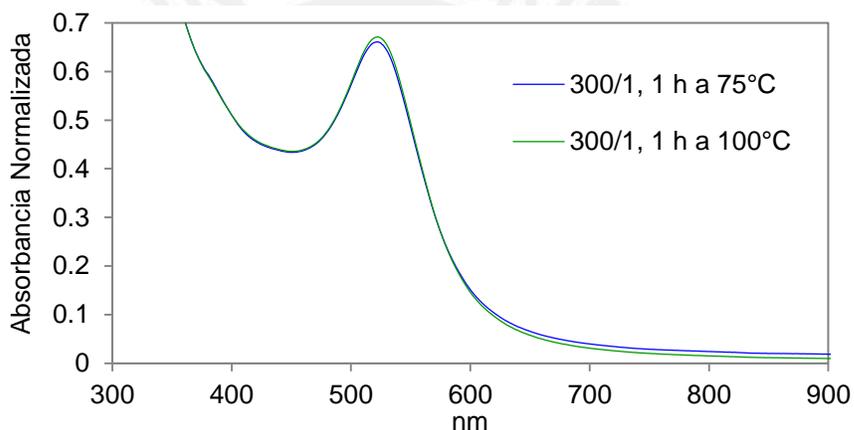


Figura 37. Espectros UV-Vis normalizados de nAu con relación molar 300/1 a 1 hora de reacción para 75°C y 100°C.

De lo anterior se concluye que la velocidad de reacción a 50°C fue lenta y que las longitudes de onda obtenidas para relaciones molares 100/1 y 300/1 a 50°C correspondieron a nAu de mayor tamaño con respecto a las otras temperaturas. En este sentido, para las síntesis con relaciones molares 50/1, 100/1 y 300/1 luego de 20 minutos de reacción a 100°C se observó una mayor absorbancia comparada con las síntesis a 75°C debido a la diferencia en velocidad de reacción. A pesar de ello, no existe mucha diferencia entre las síntesis a 75°C y 100°C para alta relación molar y una hora de reacción ya que las nAu con relación molar 300/1 sintetizadas a 75°C y 100°C presentan tamaño semejante (20 minutos de reacción). Similarmente, a una hora de reacción tanto las soluciones de nAu con relación molar 100/1 como 300/1 a 75°C y 100°C tienen valores de concentración de nAu y de tamaños similares.

En la Figura 38 se presentan la banda de plasmones de superficie localizados para tres relaciones molares Qna/Au^{3+} según el tiempo de reacción y a tres temperaturas diferentes. De esta figura se puede inferir que las condiciones de reacción a $75^{\circ}C$ y 1 hora de reacción con Qna/Au^{3+} 300/1 permiten obtener nAu más pequeñas y de tamaño homogéneo.

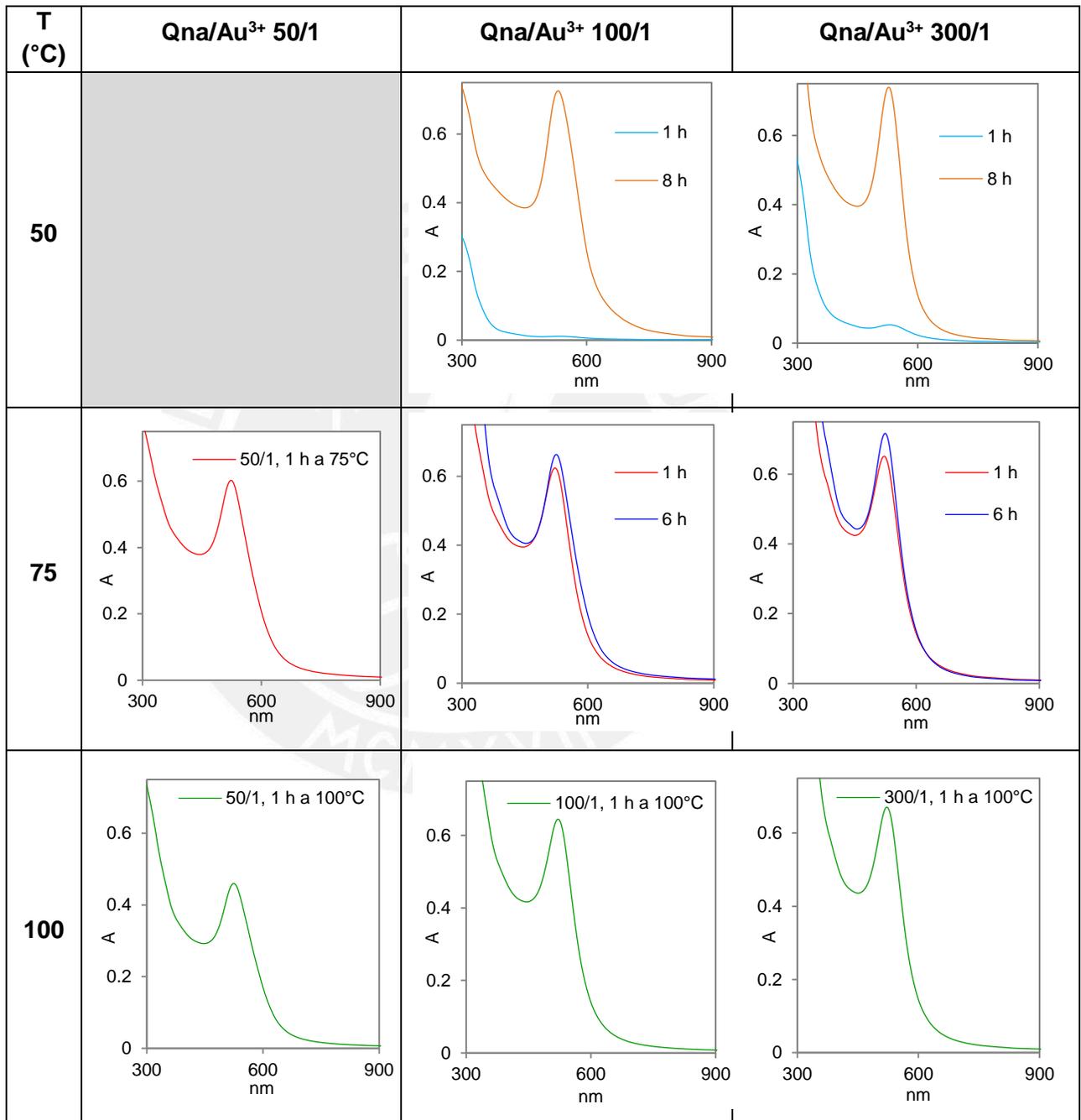


Figura 38. Efecto de relación molar Qna/Au^{3+} 50/1, 100/1, 300/1 en la formación de nAu según tiempo de reacción y temperatura.

3.2.4 Efecto del pH

Cuando se realizaron las síntesis a pH 1 y 3,42, a los 20 minutos de reacción se observó una ligera coloración rosada en ambas soluciones, pero luego de una hora de reacción las soluciones de nanopartículas cambian a una tonalidad violeta y morada, respectivamente, y muestran turbidez (Anexo 6). Para la síntesis a pH 4,46, la solución presentó una leve coloración rojiza a los 15 minutos de reacción que con el avance de la reacción se intensificó. Similarmente a la síntesis anterior, la solución a pH 5 adquirió un color rojo desde los 10 minutos de reacción. Por lo tanto, al modificar el pH en la región de 1 a 5 se produce una diferencia en la velocidad de reducción de los iones Au^{3+} . Estos iones se encuentran como complejos $[\text{AuCl}_4]^-$ a pH menores a 6 y su reactividad en el rango ácido podría estar influenciada por la presencia del biopolímero catiónico [18]. Conforme se reduce el pH, la cantidad de grupos amino protonados en la quitosana aumenta y genera mayor repulsión entre las cadenas por lo que éstas tienden a estar extendidas y pueden atraer más a los aniones $[\text{AuCl}_4]^-$ por fuerzas electrostáticas. Dicha atracción impide que los sitios de reducción, ubicados en los extremos de las cadenas poliméricas, interaccionen con los iones $[\text{AuCl}_4]^-$. Por ello, disminuye la velocidad de la reacción redox, así como las velocidades de nucleación y crecimiento que influyen en el tamaño de las partículas [39]. Por otro lado, no se logró sintetizar nanopartículas de oro en solución a pH 5,95 debido a la baja solubilidad de la quitosana a estas condiciones.

En la Figura 39 se presentan las bandas de plasmones de superficie de las soluciones de nAu con relación molar 100/1 sintetizadas a 75°C entre pH 1 y 5. A pH 1 la posición de la banda a 555,7 nm y la gran absorbancia en la región de 700-900 nm indicaron la presencia de nAu mayores a 50 nm y la formación de agregados [19]. En cambio, a pH 3,42 las dos bandas de absorción a 545,9 nm y 722,0 nm indicaron distribución de tamaño bimodal (dos tamaños de partícula con geometrías esféricas y no esféricas) así como agregados [39]. Para estos valores de pH, la turbidez de las soluciones se debió a la presencia de partículas grandes que dispersan la luz con gran intensidad. La polidispersidad de las nAu a pH bajos podría deberse en parte porque al elevar la concentración de ácido se incrementa la hidrólisis de las cadenas de quitosana, y este acortamiento de cadenas disminuye la estabilidad estérica de la superficie de las nAu [40]. Además a pH bajos se afecta la afinidad del nitrógeno (grupo amino) por oro pues existen más grupos con nitrógeno protonado que con pares de electrones libres. De

esta manera, la polidispersidad a pH 1 y 3,42 puede explicarse cuando la velocidad de crecimiento resulta mayor que la velocidad de nucleación. Posiblemente, la forma del espectro a pH 3,42 se debe a la mayor protonación de grupos amino que redujo la estabilidad estérica y a la presencia del buffer que contribuyó a la compresión de la doble capa eléctrica lo que ocasionó la gran polidispersión. En el caso de la síntesis a pH 1 que se realizó en medio acuoso acidificado con HCl 10% (3,26 M) también ocurrió la hidrólisis de la quitosana y la protonación de grupos amino pero no se observó gran dispersión debido a la ausencia del buffer. Por otro lado, como se ve en la Figura 39, cuando se llevó a cabo la síntesis a pH 4,46 y 5 se obtuvieron bandas de plasmones de superficie a 521,9 y 521,0 nm, respectivamente, que indican menores tamaños de partícula. Asimismo, la simetría de ambas bandas indicó la formación de nAu esféricas estables pues en ambos casos la degradación de las cadenas de quitosana es menor y la presencia de especies iónicas no afecta a la estabilización estérica. La diferencia de tamaño de partícula entre las nAu obtenidas a pH 4,46 y 5 es pequeña. En la Figura 40 se muestran los espectros UV/Vis normalizados a 400 nm de soluciones de nAu a pH 4,46 y 5. La banda de absorción a pH 4,46 posee un mayor ancho de banda, lo que indica que las nAu tienen distribución más amplia de tamaño de partículas que las sintetizadas a pH 5.

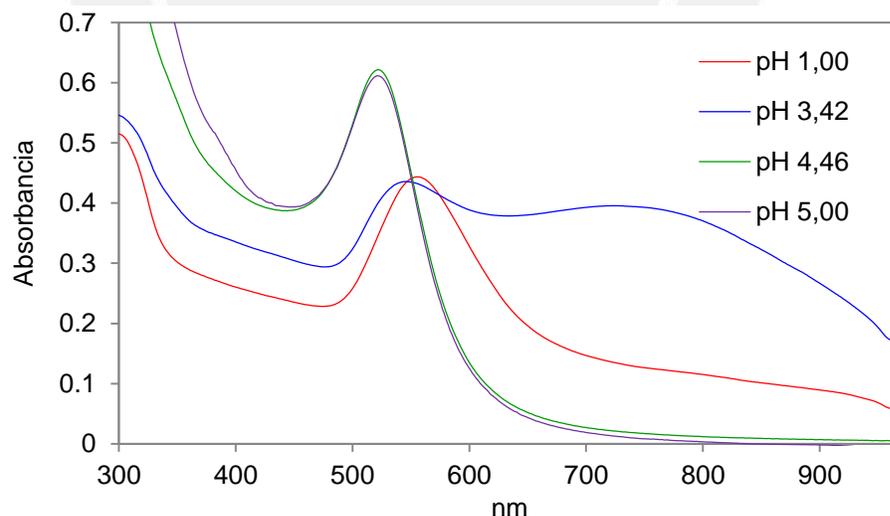


Figura 39. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintos pH.

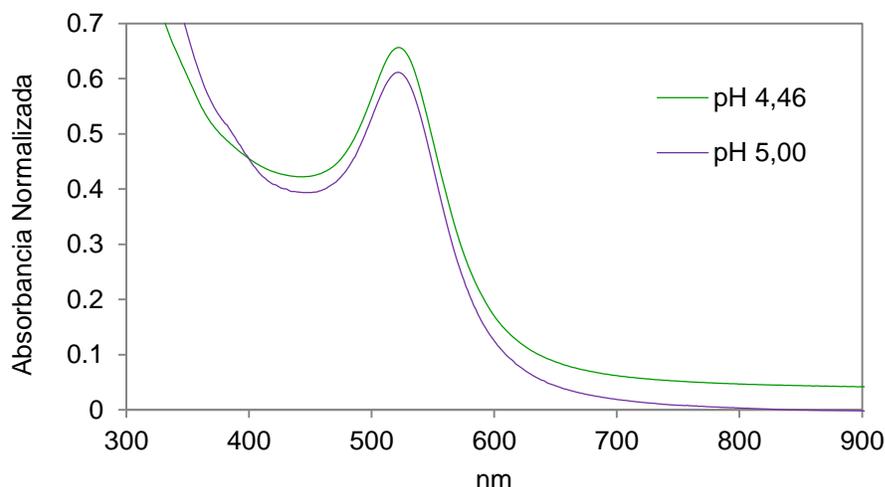


Figura 40. Espectros UV-Vis normalizados de nAu a pH 4,46 y 5.

A partir de la explicación previa se concluye que la disminución del pH desplaza la banda de plasmones de superficie a mayor longitud de onda lo que señala incremento del tamaño de partícula. De esta manera, las soluciones de nAu a pH 1 y 3,42 muestran turbidez debido a la presencia de partículas grandes. Como la degradación es menor a pH 4,46 y 5, las nanopartículas de oro obtenidas son más estables, siendo pH 5 la condición con la cual se obtuvo un menor ancho de banda.

3.2.5 Efecto de la concentración de Qna-Au³⁺

Se utilizó una solución buffer NaOAc/HOAc 0,5 M / 1,0 M para mantener el pH 4,46 de la mezcla de reacción ya que menores concentraciones no pueden mantener este pH al añadir los 3,89 mL de solución de HAuCl₄. En la Tabla 9 se muestran los valores de longitud de onda y absorbancia de la banda de plasmones de superficie luego de 1 hora de reacción para soluciones con nAu a cinco concentraciones manteniendo la relación molar constante (100/1). Al considerar a C como la concentración de referencia (5 mL de solución de quitosana al 0,27% (w/v) y 161 µL de solución de HAuCl₄ 5,08 mM), se observó que las soluciones de nAu concentradas y diluidas mostraron absorbancias mayores y menores, respectivamente, de manera proporcional a la concentración. Además, al comparar los valores de absorción de dos reacciones se observó que la síntesis es reproducible.

Tabla 9. Valores de banda de plasmones de superficie al término de la reacción según concentración Qna-Au³⁺ con relación molar 100/1.

[Qna-Au ³⁺]	[Au ³⁺] mol/L	Reacción 1		Reacción 2	
		λ (nm)	A	λ (nm)	A
5C	7,90 x 10 ⁻⁴	525,0	3,42	527,5	3,39
3C	4,74 x 10 ⁻⁴	524,1	1,98	524,2	2,06
C	1,58 x 10 ⁻⁴	521,2	0,62	522,0	0,64
C/2	7,90 x 10 ⁻⁵	521,0	0,28	522,6	0,33
C/5	3,16 x 10 ⁻⁵	521,9	0,13	521,3	0,12

En la Figura 41 se observan las coloraciones, que variaron desde ligeramente roja hasta guinda, para concentraciones Qna-Au³⁺ en el rango de C/5 a 5C y ninguna solución mostró precipitado alguno al concluir la reacción. En la Figura 42 se presentan las bandas de plasmones de superficie para cada concentración Qna-Au³⁺ con la misma relación molar Qna/Au³⁺ 100/1. La posición de la banda de absorción para las concentraciones más diluidas (C/5, C/2 y C) se encuentra entre 521-522 nm, lo cual indica un tamaño de partícula similar. En cambio, el incremento de la concentración a 3C y 5C, desplaza la banda de absorción hacia mayores longitudes de onda (524-527 nm) lo que corresponde a nAu de mayor tamaño. Como la absorción en la región de 600-700 nm señala la presencia de partículas grandes, estas soluciones concentradas de nAu dispersan la luz de un láser de 650 nm (Anexo 7). Luego de 6 horas de reacción, se observó la aparición de un sólido rojo en las soluciones de nanopartículas de concentración 3C y 5C, lo que significa que, a pesar que la relación molar Qna/Au³⁺ sea constante en las síntesis, la elevada concentración de ambos reactivos reduce las fuerzas de repulsión entre nAu-Qna y causa su inestabilidad.

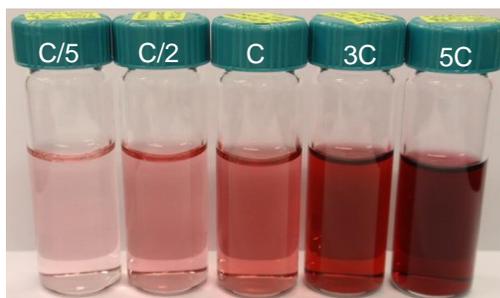


Figura 41. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 sintetizadas a diferentes concentraciones Qna-Au³⁺ a 75°C.

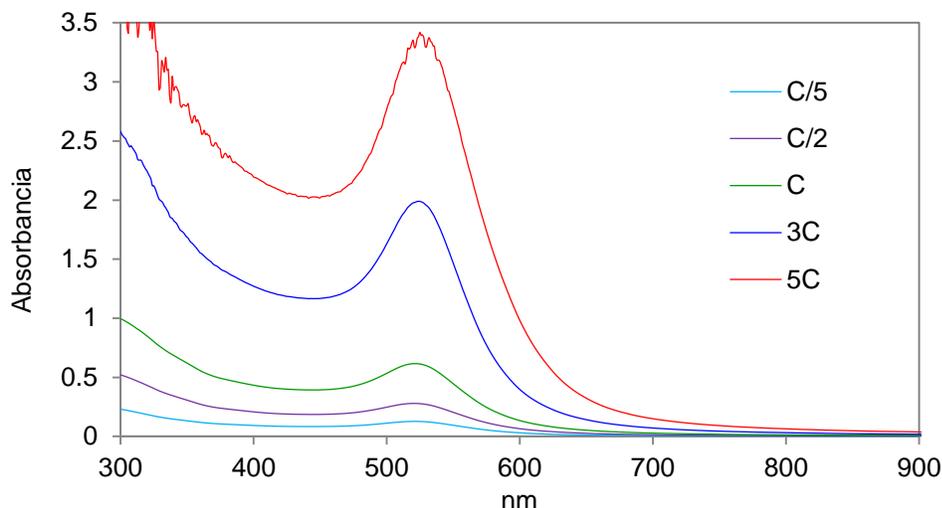


Figura 42. Espectros UV-Vis de nAu con relación molar 100/1 a distintas concentraciones Qna-Au³⁺, 1 hora de reacción.

En la Figura 43 se muestra una gráfica que relaciona los valores de absorbancia de la banda de plasmones de superficie de soluciones de nAu con los valores de concentración inicial de iones Au³⁺ en las mezclas de reacción con relación molar 100/1. Los valores graficados se ajustan a una recta cuya ecuación permite determinar la absorbancia de soluciones de nAu-Qna sintetizadas a 75°C por una hora para concentraciones de Au³⁺ en el rango de $3,16 \times 10^{-5}$ mol/L a $7,90 \times 10^{-4}$ mol/L.

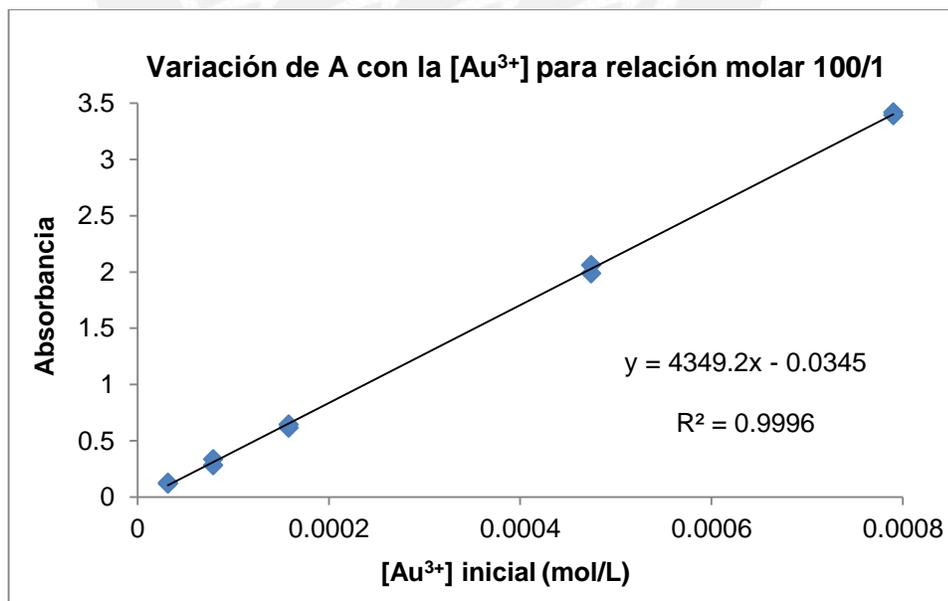


Figura 43. Valores de absorbancia de la banda de plasmones de superficie en función de la [Au³⁺].

3.3 Caracterización de nanopartículas de oro con quitosana

3.3.1 Caracterización por UV-Vis

Como se mencionó en la Sección 1.5.2.2, existe un método reportado por Haiss y colaboradores para estimar el tamaño y la concentración de nAu a partir del espectro UV-Vis [52]. En la Tabla 10 se muestran los valores de diámetro de nAu para cuatro relaciones molares Qna/Au^{3+} . Diámetros entre 11 y 12 nm fueron calculados mediante la ecuación 1 de la Sección 1.5.2.2 a partir de los valores de absorbancia de la banda de plasmones de superficie y de absorbancia a 450 nm. Cuando la posición de la banda de plasmones de superficie de nAu coincide para nAu con diferentes agentes estabilizadores no significa igual tamaño de partícula debido a la influencia del índice de refracción del agente protector (Anexo 1) en la banda de absorción. Por ejemplo, al utilizar quitosana o citrato se pueden obtener nAu que presentan una banda a 525 nm pero a partir de la estimación del tamaño por espectroscopía UV-Vis se calcula que las nAu-Qna tienen un diámetro de 12 nm y aquellas con citrato poseen 32 nm [52].

Tabla 10. Diámetro de nAu a partir de espectros UV-Vis.

Qna/Au^{3+}	d (nm)
50/1	11,89
85/1	12,14
150/1	12,35
300/1	10,89

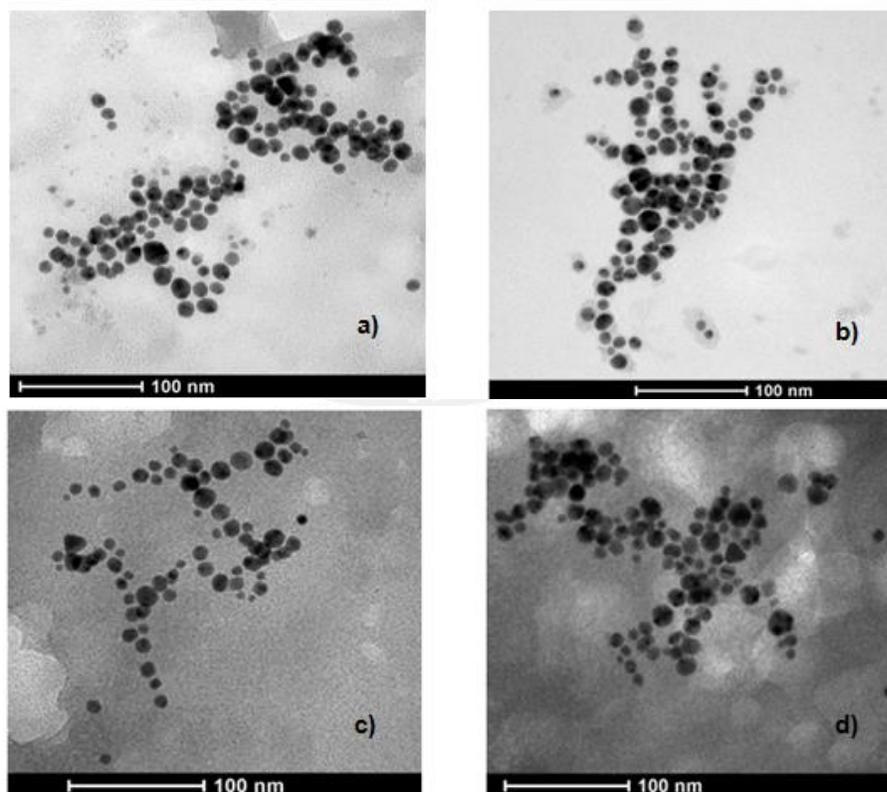
Por otro lado, en la Tabla 11 se presentan los valores de concentración de nAu que fueron determinados con los datos de absorbancia y absortividad molar a 450 nm (ecuación 3, Sección 1.5.2.2). Se observa que la concentración de nAu aumenta en el rango de 3,5 a 5,0 nM conforme se incrementa la relación molar Qna/Au^{3+} debido a la mayor cantidad de nAu de menor tamaño. Los valores calculados de tamaño y concentración de nAu son coherentes a pesar que las ecuaciones reportadas son utilizadas para agentes estabilizadores de bajo peso molecular, como citrato trisódico.

Tabla 11. Concentración de nAu a partir de espectros UV-Vis.

Q_{na}/Au^{3+}	A_{450}	$\epsilon_{450} M^{-1} cm^{-1}$	$[nAu] mol/L$
50/1	0,38	$1,09 \times 10^8$	$3,51 \times 10^{-9}$
85/1	0,39	$1,09 \times 10^8$	$3,57 \times 10^{-9}$
150/1	0,40	$1,09 \times 10^8$	$3,68 \times 10^{-9}$
300/1	0,42	$8,27 \times 10^7$	$5,04 \times 10^{-9}$

3.3.2 Caracterización por TEM

En la Figura 44 se muestran las imágenes del TEM de nanopartículas de oro con relación molar Q_{na}/Au^{3+} 50/1, 85/1, 150/1 y 300/1. Se observa en su mayoría nAu esféricas y que no están aglomeradas pero también se observan, en menor cantidad, nanopartículas de oro con otras geometrías como triangular, elipsoidal y rómbica, y cierta agregación entre nanopartículas. Estos agregados se pueden formar cuando se evapora el solvente y no necesariamente porque las nanopartículas sean inestables. De esta manera, el crecimiento de las nAu puede ser considerado uniforme.


Figura 44. Imágenes del TEM de nAu con relación molar Q_{na}/Au^{3+}

a) 50/1, b) 85/1, c) 150/1 y d) 300/1.

En la Figura 45 se presenta una sección de imagen del TEM (ampliación de a, Figura 44) en la cual es posible observar cristales de la sal NaOAc del buffer que se forman al evaporarse el solvente y que al encontrarse aislados se diferencian de las nAu que tienen quitosana alrededor de la superficie. Estos cristales poseen tonalidad gris clara, menores dimensiones y se encuentran en menor cantidad que las nAu con quitosana.

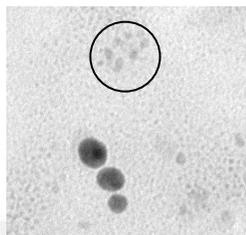


Figura 45. Imagen del TEM de nAu con sal NaOAc.

En las Figuras 46, 47, 48 y 49 se presentan los histogramas de distribución de tamaño de partícula para cada muestra obtenidos a partir de las imágenes del TEM. Conforme aumenta la relación molar Qna/Au³⁺, disminuye el número de nAu con quitosana que presentan diámetros entre 15 nm y 23 nm y se incrementa la cantidad de aquellas con tamaño entre 6 nm y 10 nm. En general, los histogramas no son simétricos y presentan una cola hacia tamaños grandes por lo que las distribuciones de tamaño se ajustan a una distribución logarítmica normal (curva roja). Investigaciones anteriores han reportado este tipo de distribución para el crecimiento de nanopartículas por medio del transporte, principalmente, por agitación de los núcleos hacia las zonas de crecimiento. Cuando la intensidad de la agitación es fuerte, la distribución de tamaño de partícula resultante se ajusta mejor a la distribución logarítmica normal [57, 69]. Por otra parte, en la Figura 22 de la Sección 3.2.1 cuando se comparan los espectros UV-Vis normalizados de Qna/Au³⁺ 85/1 y 150/1, el menor ancho de banda para la relación molar 150/1 indica una menor distribución de tamaño de partícula y la disminución de la absorbancia en la región de 600-700 nm señala pequeña cantidad de partículas grandes lo que coincide con los histogramas de las Figuras 47 y 48.

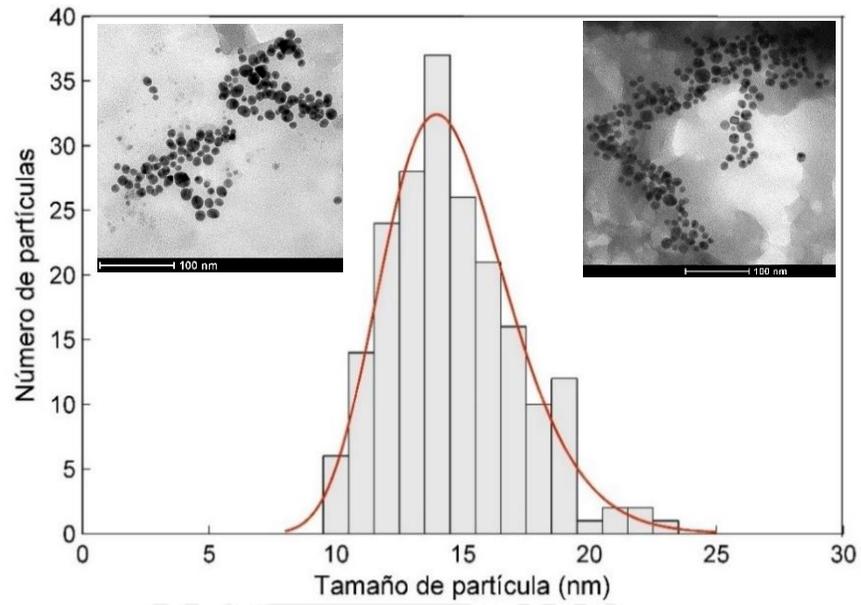


Figura 46. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 50/1 para N=200.

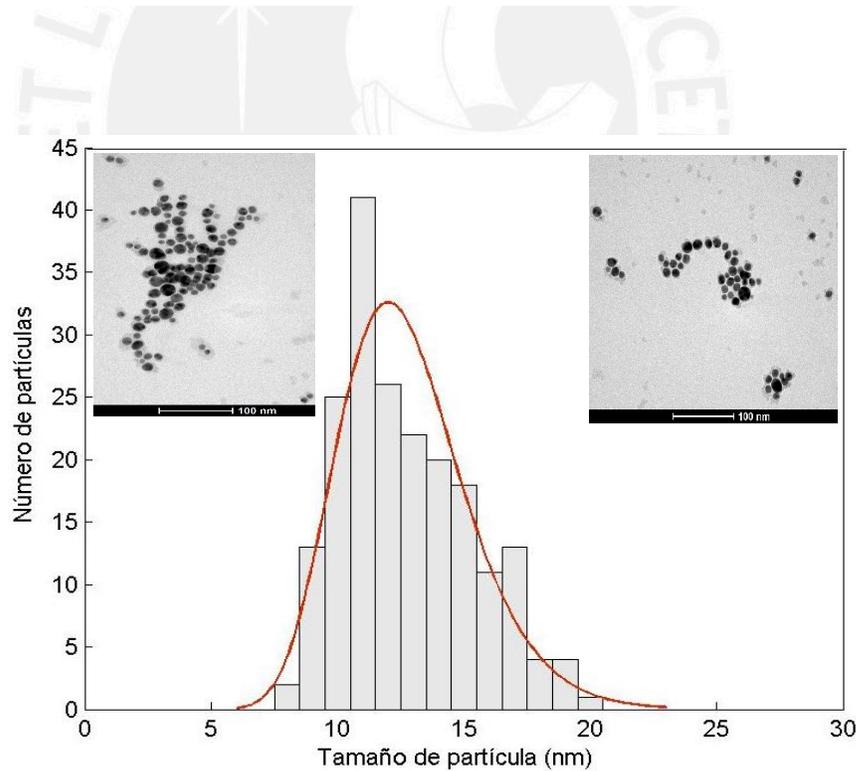


Figura 47. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 85/1 para N=200.

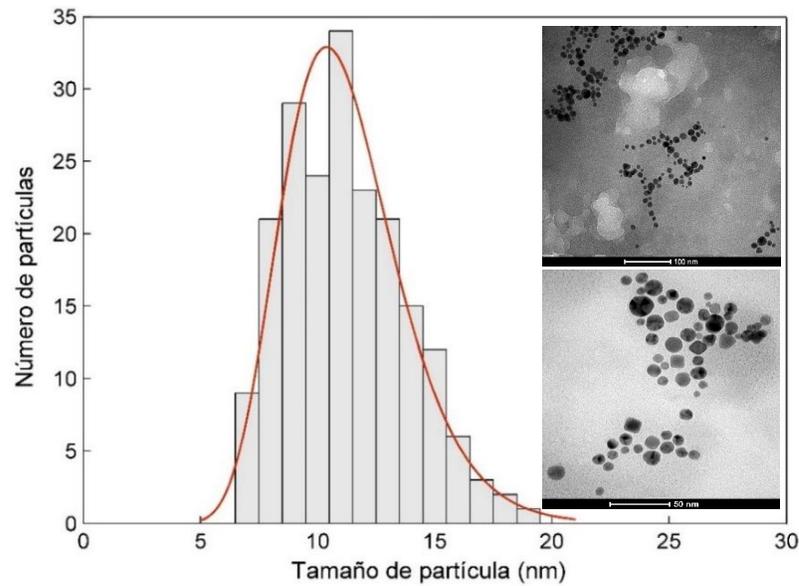


Figura 48. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 150/1 para N=200.

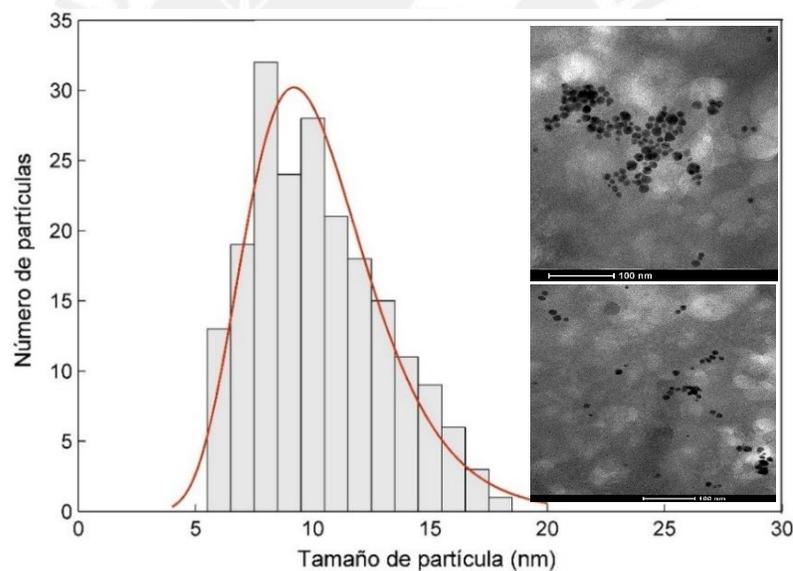


Figura 49. Histograma de distribución de tamaño de partícula de nAu con relación molar 300/1 para N=200.

En la Tabla 12 se presentan los tamaños promedios de nAu así como la desviación estándar para las diferentes relaciones molares Q_{na}/Au^{3+} . Se observa que los valores de tamaño promedio en número, en peso y en zeta son similares. El aumento de la relación molar Q_{na}/Au^{3+} de 50/1 a 85/1 aumenta la estabilización por lo que el tamaño promedio de partícula disminuye de 14,61 nm a 12,75 nm. Al emplear Q_{na}/Au^{3+} 150/1 las nAu son de 11,22 nm y para una relación molar 300/1 el tamaño promedio es 10,31

nm. En cuanto a la desviación estándar ésta resulta semejante para las cuatro relaciones molares porque el rango de distribución de tamaño de partícula es igual. Estos valores de desviación estándar son similares a los obtenidos en otras síntesis de nAu-Qna reportadas. Bakar sintetizó a reflujo nAu con relación molar Qna/Au³⁺ 10:1 en una mezcla de ácido acético y metanol como solvente y obtuvo nAu con tamaño promedio de 11,9 ± 3,6 nm. También, realizó la síntesis en microondas con Qna/Au³⁺ 10:1 en el mismo solvente a pH 5,5 y obtuvo nAu de 11,0 ± 2,0 nm [70, 71].

Tabla 12. Tamaños promedios de nAu según relación molar para N=200 (TEM).

Qna/Au ³⁺	\bar{X}_n (nm)	\bar{X}_w (nm)	\bar{X}_z (nm)	s
50/1	14,61	15,05	15,53	2,59
85/1	12,75	13,28	13,82	2,60
150/1	11,22	11,82	12,41	2,57
300/1	10,31	11,06	11,82	2,85

Según la Tabla 4 de la Sección 3.2.1, para relaciones molares Qna/Au³⁺ 85/1, 150/1 y 300/1, las bandas de plasmones de superficie se encuentran alrededor de 522 nm lo cual indica un tamaño de partícula similar, aunque el análisis por TEM señala valores de tamaño promedio de partícula más cercanos entre Qna/Au³⁺ 150/1 y 300/1. A diferencia de la determinación del tamaño promedio de partícula a partir del espectro UV-Vis para el caso de nAu con citrato, no se ha reportado una ecuación para el caso de quitosana. Sin embargo, al utilizar la ecuación 1 de la Sección 1.5.2.2 se obtienen diámetros (d) de nAu entre 11 y 12 nm (Tabla 10, Sección 3.3.1) similares a los tamaños de partícula determinados por TEM.

Con el tamaño promedio de partícula obtenido por TEM es posible determinar el número de átomos en una nAu mediante el siguiente cálculo:

$$\frac{4}{3}\pi r^3 nm^3 \times 10^{-21} \frac{cm^3}{nm^3} \times 19,3 \frac{g}{cm^3} \times \frac{1 \text{ átomo de Au}}{200 \times 1,66 \times 10^{-24} g} \dots (4)$$

La fórmula 4 anterior utiliza el volumen de una nanopartícula esférica con radio de partícula (r), la densidad del oro y la relación de masa por átomo de oro [9]. Por otro lado, el número de átomos de oro (fórmula 5) también se puede calcular a partir de la concentración inicial de Au³⁺ (1,58 x 10⁻⁴ mol/L) y la concentración de nAu en mol/L (Tabla 11, Sección 3.3.1) obtenida del espectro UV-Vis. Esta fórmula asume que todos los iones Au³⁺ son reducidos por completo a átomos de oro [72].

$$N^{\circ} \text{ átomos en una } nAu = \frac{N^{\circ} \text{ total de átomos de Au}}{N^{\circ} \text{ de } nAu} \dots (5)$$

En la Tabla 13 se muestra el número de átomos de oro por nanopartícula obtenido con las fórmulas 4 y 5 calculados para las cuatro relaciones molares Qna/Au^{3+} . En ambos casos, se observa que el número de átomos de oro en una nanopartícula disminuye conforme se reduce el tamaño de partícula. Además, existe similitud en el cálculo del número de átomos de oro a partir de la información de TEM y UV-Vis para relaciones molares 150/1 y 300/1.

Tabla 13. Número de átomos de Au por nAu a partir de TEM y espectros UV-Vis.

Qna/Au^{3+}	N° átomos de Au (TEM)	N° átomos de Au (UV-Vis)
50/1	94 728	45 040
85/1	63 833	44 307
150/1	42 763	42 946
300/1	34 239	31 368

De acuerdo a lo observado, al utilizar quitosana como agente reductor y estabilizador se obtienen nanopartículas de oro monodispersas, en su mayoría esféricas y depende de la cantidad de moles de unidades repetitivas del biopolímero. Sin embargo, es posible obtener nAu con quitosana de otras geometrías como triangulares y hexagonales en presencia de sustancias como tripolifosfato o glutaraldehído [39, 67]. Según otros estudios, cuando se realiza la síntesis con D-glucosa y almidón, las nAu son hexagonales y al emplear glucosamina en medio acuoso con una relación $[Glucosamina]/[HAuCl_4]$ de 1/60, las nAu resultantes tienen forma de estrellas [73, 74].

3.3.3 Caracterización por ELS

La técnica de dispersión de luz electroforética mide la movilidad electroforética de las partículas en solución para determinar el potencial zeta y la carga de la superficie de las nanopartículas. El potencial zeta es el potencial eléctrico en el límite de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula. Cuando el valor absoluto es mayor a 30 mV la superficie posee alta estabilidad y un valor absoluto menor a 5 mV señala agregación [47, 75]. En la Tabla 14 se presentan los valores de potencial zeta de soluciones de nAu con quitosana con relación molar Qna/Au^{3+} 50/1, 85/1, 150/1, 300/1 sin dilución y con dilución en agua ultrapura. La carga de la superficie de las nAu es

positiva debido al carácter catiónico de la quitosana. En el caso de la solución con relación molar 85/1 sin dilución, el valor de potencial zeta fue bajo, posiblemente, debido a la presencia de aniones (buffer) adsorbidos en la superficie de la nanopartícula que disminuyen la carga positiva. A pesar de ello, el valor de 23 mV para esta solución indica cierta estabilidad. Por otro lado, el incremento del potencial zeta al realizar diluciones se debe a un reordenamiento de cargas alrededor de la superficie de la nanopartícula que se pueden relacionar con cambios de conformación del polímero. (Aunque para la solución con relación molar 50/1 con dilución 1:100, el potencial zeta disminuye ligeramente). Investigaciones realizadas por Tantra y colaboradores han reportado que diluciones sucesivas de una solución de nAu (20 nm) de concentración 0,01% (w/w) hasta $1,96 \times 10^{-4}$ % (w/w) no modifica el valor de potencial zeta inicial que permanece alrededor de -43mV. Sin embargo, al continuar con las diluciones hasta obtener concentraciones de nAu de $4,98 \times 10^{-5}$ % y $8,33 \times 10^{-6}$ % (w/w) el potencial zeta disminuye de -30 mV a -25 mV [76]. Otro estudio llevado a cabo por Prow sobre el potencial zeta de nanopartículas de sílica (40-50 nm) señala un incremento del valor de potencial zeta desde -54 mV a -62 mV al diluir la solución de nanopartículas en agua desionizada en proporción 1:10 [75].

Tabla 14. Valores de potencial zeta de soluciones de nAu-Qna.

Qna/Au ³⁺	Dilución	Potencial Zeta (mV)
50/1	Sin dilución	30,8
	1:10	34,3
	1:100	27,3
85/1	Sin dilución	22,6
	1:100	43,0
150/1	Sin dilución	28,2
	1:100	33,2
300/1	Sin dilución	32,2
	1:10	42,3
	1:100	42,7

Así, según lo observado, todas las soluciones de nAu-Qna poseen carga positiva en la superficie y valores de potencial zeta que indican estabilidad. Además, es posible que al diluir las soluciones de nAu se favorezca la separación de cargas en la capa difusa por lo que su espesor se incrementa ligeramente y contribuya a la estabilidad.

3.3.4 Caracterización por AFM

La microscopia de fuerza atómica proporciona imágenes topográficas que pueden ser visualizadas en tres dimensiones por lo cual la técnica brinda información sobre el tamaño de partícula, morfología, textura y rugosidad de la superficie analizada. Para la determinación de la altura y el diámetro de la partícula se realizan cortes transversales, diagonales o verticales sobre la partícula en la imagen topográfica con lo cual se obtiene un perfil de dos dimensiones. La resolución en el eje vertical (eje Z) está limitada por el entorno vibracional del instrumento y la resolución en el eje horizontal se encuentra limitada por el diámetro de la sonda (menor a 8 nm) que escanea la superficie [51]. En la Figura 50 se presentan las imágenes del AFM de un área de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, el perfil y la imagen en 3D del soporte limpio de mica. La imagen topográfica corrobora la superficie lisa de la mica y el perfil indica una altura menor a 4 nm por lo que es posible observar las nAu-Qna.

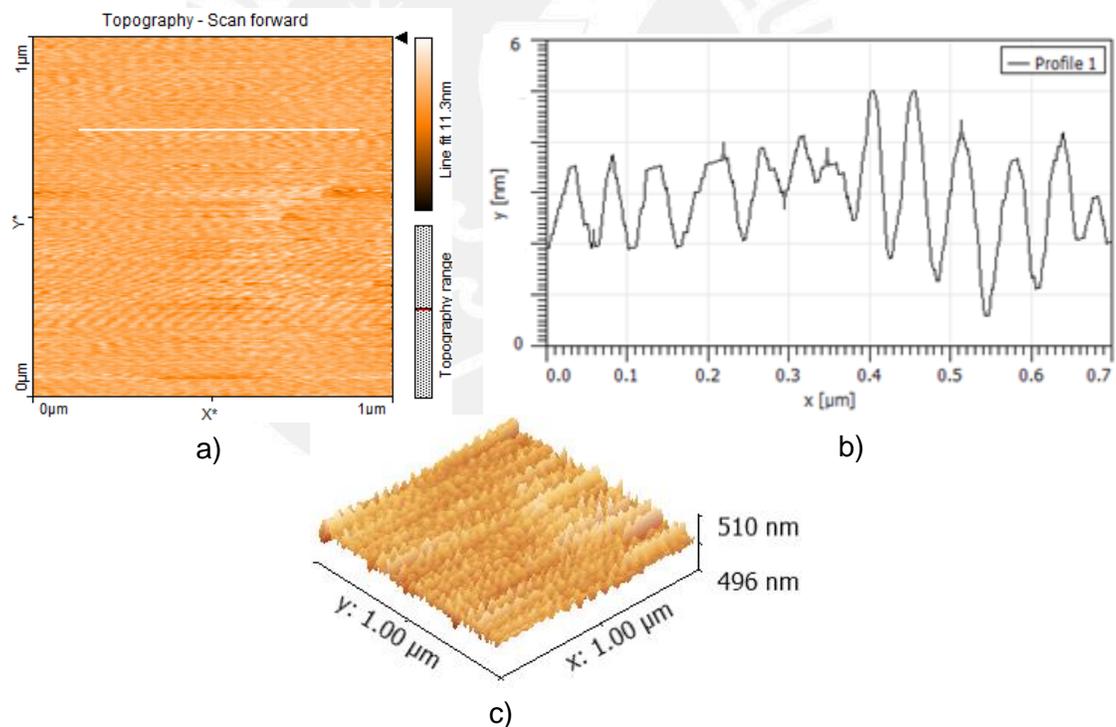


Figura 50. a) Imagen del AFM de soporte limpio de mica, b) perfil y c) 3D.

En la Figura 51 se observa la imagen del AFM del área de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, dos perfiles y la imagen en 3D de un recubrimiento de quitosana a partir de una solución 0,23% (w/v) en buffer NaOAc/HOAc sobre el soporte de mica. En las imágenes topográfica y 3D se observa que la superficie de quitosana es amorfa y posee regiones con aglomeración

por lo cual no es del todo uniforme. El perfil 1 en b) que corresponde al corte superior en a) señala alturas de 40 nm y 70 nm para los aglomerados de quitosana. En cambio, el perfil 2 en b) obtenido del corte inferior en a) indica alturas entre 10 y 20 nm para la región con menos quitosana.

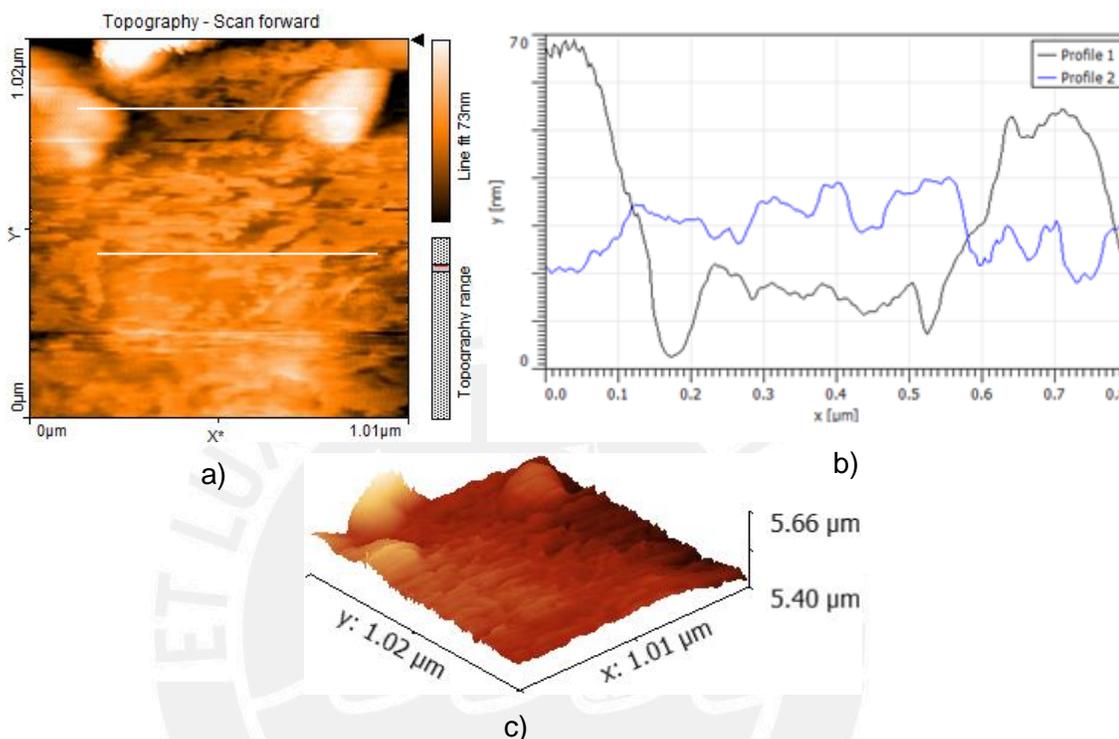


Figura 51. a) Imagen del AFM de un recubrimiento de quitosana sobre mica, b) perfil y c) 3D.

Debido a la interacción electrostática entre las nAu-Qna y el soporte de mica (superficie alcalina) no fue necesario activar previamente la mica para lograr la adhesión entre muestra y soporte como se reporta en la literatura [47, 51, 77]. La región de análisis para la muestra de nAu-Qna fue en el borde de la película de quitosana sobre la mica, que es donde se concentran las nAu-Qna al evaporarse el solvente, pues al realizar mediciones al interior no se observaron nanopartículas. En la Figura 52 se presentan las imágenes del AFM de áreas de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ y de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, los perfiles y la imagen en 3D de nAu-Qna sobre mica con relación molar $\text{Qna}/\text{Au}^{3+}$ 85/1 diluidas con agua ultrapura. Esta dilución permitió observar mejor la distribución de las nanopartículas después de comparar con imágenes del AFM de una muestra de nAu-Qna sin dilución y con una muestra más diluida (1:100). De esta manera, la imagen a) de área de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ muestra nAu-Qna esféricas y dispersas aunque la presencia

de quitosana en exceso o de buffer favorece interacciones entre las nanopartículas como se observa en la imagen b) de área de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. En la Tabla 15 se presentan las dimensiones para tres nAu-Qna determinadas a partir de los perfiles de la imagen c). La longitud (eje X) de 60 nm y 100 nm se deberían a quitosana alrededor de las nAu (imagen d)) que tienen una altura de 13 nm. Este valor de 13 nm es comparable con el diámetro de partícula de 12,75 nm obtenido a partir de las imágenes del TEM (Sección 3.3.2).

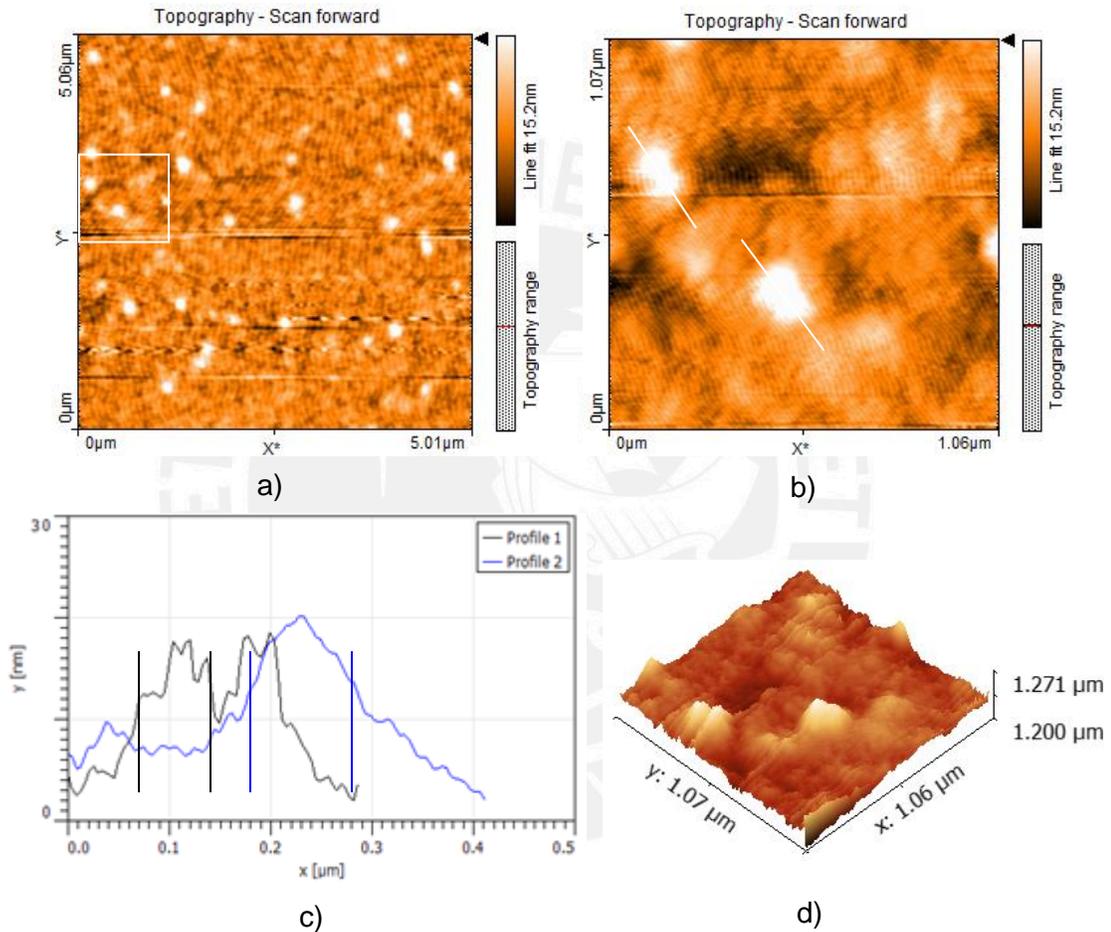


Figura 52. a) y b) Imágenes del AFM de nAu-Qna sobre mica con relación molar Qna/Au³⁺ 85/1, c) perfil y d) 3D (dilución 1:10).

Tabla 15. Dimensiones de nAu-Qna con Qna/Au³⁺ 85/1 a partir de AFM.

Perfil	Longitud (nm)	Altura (nm)
1	62,7	12,61
1	59,0	12,63
2	100,0	12,77

En la Figura 53 se observan las imágenes del AFM de áreas de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ y de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, los perfiles y la imagen en 3D de la muestra anterior de nAu-Qna que fue lavada con agua ultrapura. Las imágenes topográficas a) y b) muestran nAu-Qna esféricas con menos interacciones entre nanopartículas por la remoción del buffer y parte del exceso de quitosana ya que los valores de longitud de partícula (Tabla 16) son menores y los perfiles están más definidos. En el caso de la altura los valores son similares a los de la Tabla 15. El lavado permitió obtener una superficie más uniforme como se observa en la imagen d).

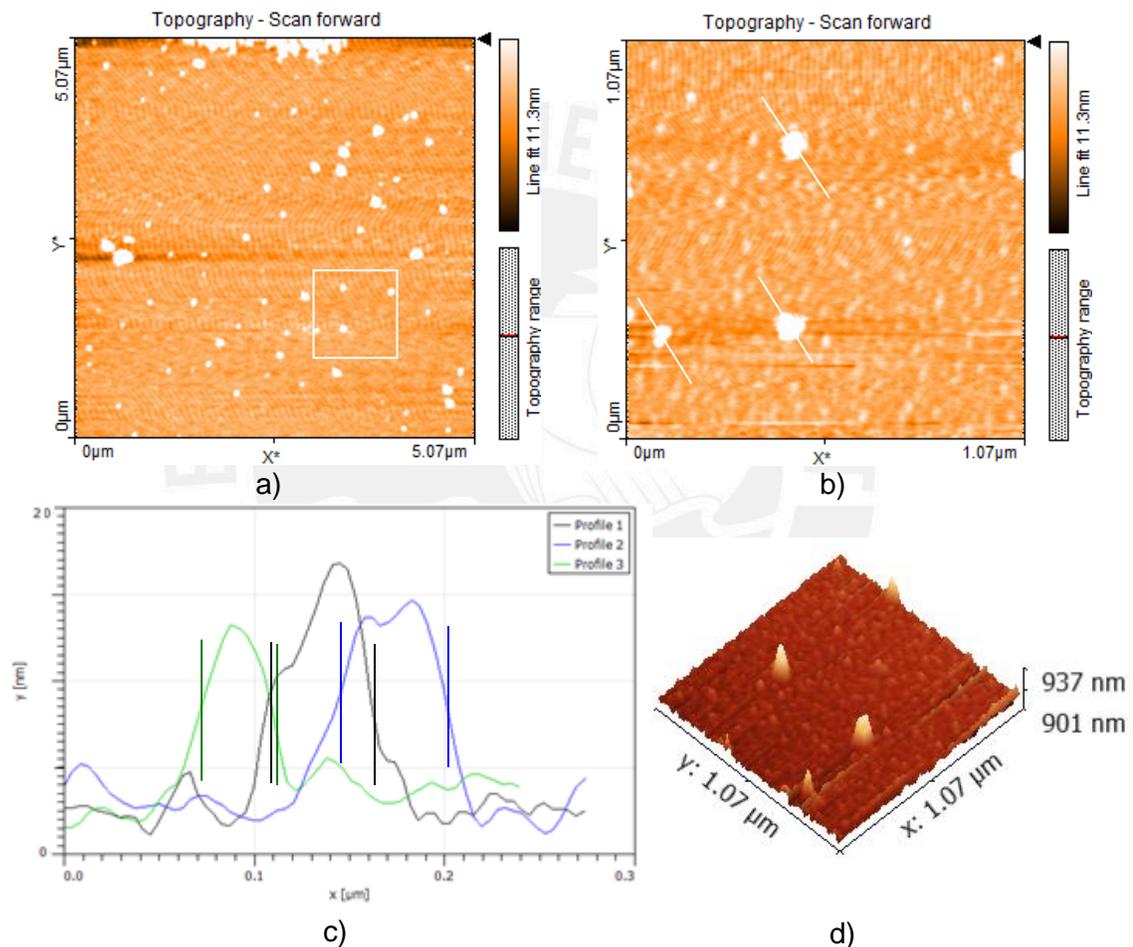


Figura 53. a) y b) Imágenes del AFM de muestra de nAu-Qna (lavada) sobre mica con relación molar Qna/Au³⁺ 85/1, c) perfil y d) 3D (dilución 1:10).

Tabla 16. Dimensiones de nAu-Qna (lavada) con Qna/Au³⁺ 85/1 a partir de AFM.

Perfil	Longitud (nm)	Altura (nm)
1	49,8	12,20
2	54,9	11,94
3	41,9	11,26

De lo anterior se concluye que la quitosana sobre mica es amorfa y que la superficie es poco uniforme mientras que las nAu-Qna se encuentran dispersas en la matriz polimérica. El efecto del lavado de la muestra de nAu-Qna reduce la cantidad de sales del buffer y parte del exceso de quitosana por lo que se observa una superficie más uniforme. En ambas muestras de nAu-Qna con relación molar 85/1, la altura obtenida por AFM coincide con el diámetro de partícula obtenido por TEM aunque la longitud (eje X) entre 40 y 100 nm se deba, posiblemente, a la gran cantidad de quitosana adsorbida en las nAu.

3.3.5 Caracterización por IR y $^1\text{H-RMN}$

Al dializar las soluciones de nAu con quitosana no solo se retiró el NaOAc sino también los iones cloruro presentes en el reactivo de partida. En el transcurso de la diálisis se observó un cambio en la coloración de las soluciones de nanopartículas. Así, las soluciones con relación molar 95/1 y 300/1 que inicialmente tenían tonalidad roja adquirieron coloraciones morada y rosada, respectivamente. Una explicación a estos cambios de color está en que los iones cloruro interaccionan electrostáticamente con las cargas positivas (grupos NH_3^+) de las cadenas de quitosana formando un par iónico ($-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$), el cual estabiliza la superficie de la nanopartícula. Estudios anteriores llevados a cabo por Ding y colaboradores reportaron este tipo de estabilización con N,N,N-trimetil quitosana y explicaron que los iones Cl^- se adsorben en la superficie de las nAu e interaccionan con los grupos $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ del polímero [78]. De esta manera, conforme se retiran los iones cloruro de la solución se observa cambios de coloración porque se incrementa el tamaño de partícula por agregación. En el caso de la solución morada con relación molar 95/1, se observó un poco de sólido morado lo cual señala ligera agregación de las nAu.

En la Figura 54 se observan los espectros IR entre $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ de la quitosana y de nAu-Qna en pastilla de KBr. La diferencia entre ambos espectros se encuentra en la región de $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Para la quitosana el pico menos intenso a 1632 cm^{-1} corresponde a la frecuencia de estiramiento del enlace C=O de la amida y el pico intenso a 1575 cm^{-1} es de la frecuencia de flexión del enlace N-H de la amida (Anexo 8). Luego de la reacción redox, el espectro IR de las nAu-Qna presenta ambos picos con menor intensidad. La posición del pico a 1632 cm^{-1} se mantiene pero se observa un pico adicional a 1600 cm^{-1} para la frecuencia de estiramiento del enlace C=O [79]. Además, el pico que corresponde a la frecuencia de flexión del enlace N-H (amida) se

ha desplazado de 1575 a 1560 cm^{-1} y ha disminuido considerablemente su intensidad hasta ser un hombro. Según estudios previos reportados por Sun y colaboradores sobre el mecanismo de reacción, el espectro IR de D-glucosamina oxidada muestra dos picos a 1740 y 1710 cm^{-1} que son las frecuencias de estiramiento de grupos COOH [40]. Ambos picos se obtuvieron mediante un tratamiento adicional de auto-deconvolución de Fourier en la región de 1800-1600 cm^{-1} . Con esta información ellos propusieron que el grupo aldehído terminal de la quitosana se oxida a ácido carboxílico previa apertura del anillo. Sin embargo, en el espectro IR obtenido a partir de nuestra muestra de nAu-Qna (95/1) liofilizada no es posible observar ninguno de los picos mencionados tal vez por la relación molar Qna/ Au^{3+} que es cinco veces mayor a la reportada [40]. De esta manera, no se puede corroborar que el mecanismo redox implica la oxidación del grupo aldehído a ácido carboxílico. Por otro lado, Fan y colaboradores han propuesto otro posible mecanismo de reacción en el cual el grupo -OH se oxida a C=O ya que observaron aumento en intensidad del pico de C=O [28]. Adicionalmente a la estabilización del par iónico $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$, el desplazamiento de la frecuencia de flexión del enlace N-H a un menor número de onda y la disminución de la intensidad del pico indican que el enlace se encuentra afectado por la presencia de nAu. Por tal motivo, es probable que los grupos N-H tanto de la amida como de la amina contribuyan a la estabilización de la superficie por medio de una interacción débil, no covalente. Este tipo de estabilización mediante los grupos N-H se ha reportado para nanopartículas de plata con quitosana a partir de espectros IR [13, 37].

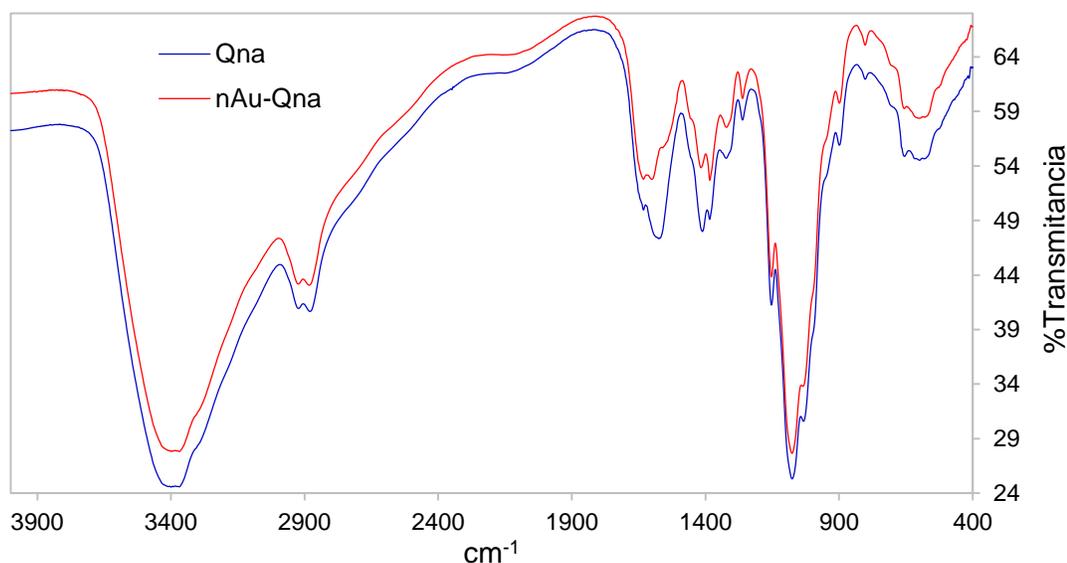


Figura 54. Espectros IR de quitosana y nAu-Qna en pastilla de KBr.

En cuanto a la caracterización por ^1H -RMN, en las Figuras 55 y 56 se presentan los espectros de las muestras liofilizadas de quitosana y nAu-Qna en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C entre 1,5-5,5 ppm. Además, en la Figura 57 se observan las asignaciones de los protones en la unidad estructural repetitiva de la quitosana y en la Tabla 17 se muestran los desplazamientos químicos para los núcleos de protón de quitosana y nAu-Qna. En ambos espectros se observa la señal intensa del agua a 4,81 ppm que a 25°C oculta la señal de H_1 de GluNAc porque es de baja intensidad [31]. Por otro lado, a 2,04 y 2,07 ppm se observan las señales para los protones de metilo del ácido acético el cual se forma debido a la hidrólisis en medio ácido de los grupos N-acetilo. Para la muestra de nAu-Qna analizada, la presencia de nAu tiene un efecto mínimo sobre la densidad electrónica de los protones de la quitosana, posiblemente, por la relación molar utilizada. Las señales de los núcleos de ^1H de la quitosana se desplazan ligeramente a campo alto (menor ppm) lo cual indica un pequeño incremento de la densidad electrónica alrededor de los protones de la quitosana. Adicionalmente, se observa un ligero desdoblamiento de las señales de los núcleos de H_2 (GluNAc) y H_3 - H_6 (GluN, GluNAc) debido a la presencia del núcleo metálico. En estudios realizados por Zhang y colaboradores la diferencia en desplazamientos químicos entre ambos espectros, así como el desdoblamiento de las señales de los protones fue más notoria. Zhang y colaboradores reportaron que para las señales de H_1 de GluNAc y H_2 de GluN los cambios en desplazamiento químico son de 0,5 ppm y 0,4 ppm respectivamente. En el caso de las señales de H_2 (GluNAc) y H_3 - H_6 (GluN, GluNAc) el cambio es de 0,3 ppm. El desplazamiento a menor ppm de las señales de protón de quitosana se debe a la cercanía del centro metálico [80].

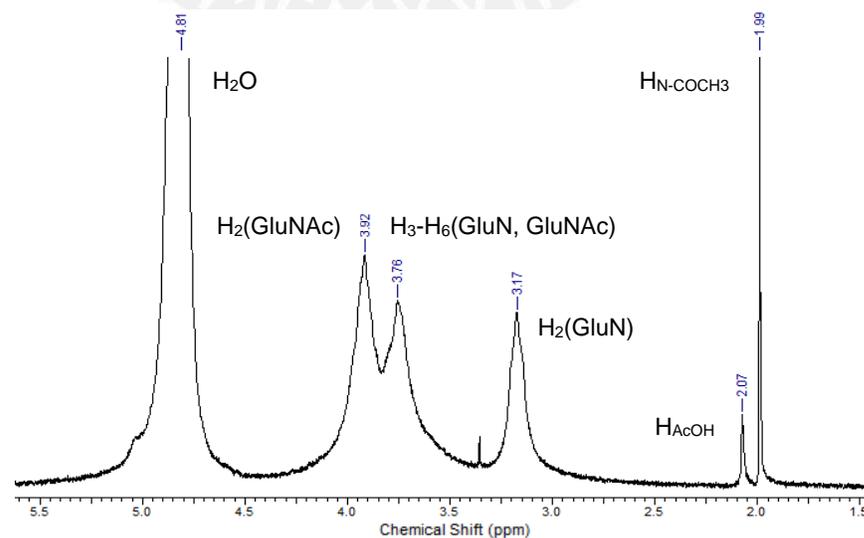


Figura 55. Espectro ^1H -RMN de quitosana liofilizada en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C .

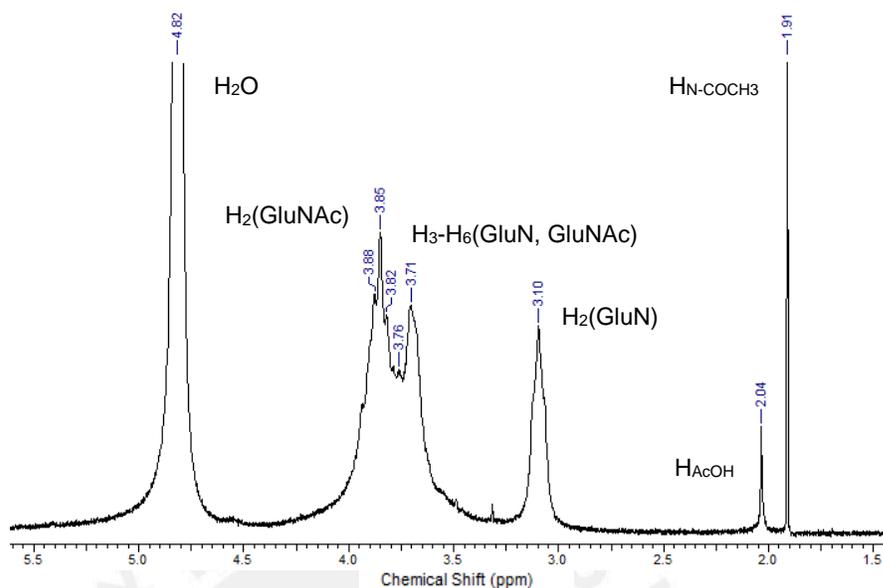


Figura 56. Espectro ^1H -RMN de nAu-Qna liofilizada en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C .

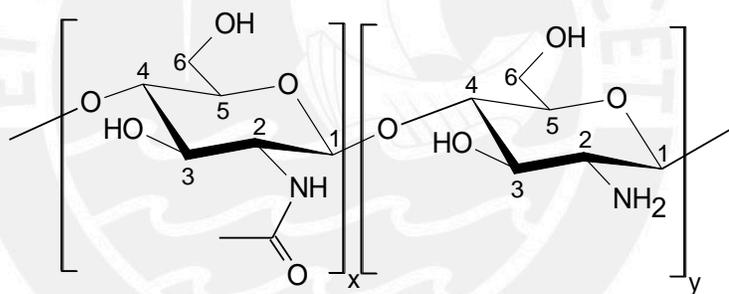


Figura 57. Asignación de protones en estructura de la quitosana.
Unidades de GluNAc y GluN.

Tabla 17. Desplazamientos químicos δ para núcleos de ^1H de quitosana y nAu-Qna en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 25°C .

Señal	Quitosana (δ , ppm)	nAu-Qna (δ , ppm)
$\text{H}_\text{N}-\text{COCH}_3$	1,99	1,91
CH_3COOH (AcOH)	2,07	2,04
H_2 (GluN)	3,17	3,10
H_3-H_6 (GluN, GluNAc)	3,76	3,71-3,76
H_2 (GluNAc)	3,92	3,82-3,88

3.4 Síntesis de nanopartículas de oro con otros agentes reductores y caracterización por espectroscopía UV-Vis

3.4.1 Síntesis y caracterización de nAu con monómeros de quitosana

A diferencia de las soluciones de nAu-Qna, las soluciones de nAu con D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina y las mezclas de ambos presentaron coloración tenue y formaron un precipitado. En el Anexo 9 se observa que la solución de nAu-GluN tiene una ligera tonalidad violeta así como un sólido del mismo color. En cambio, la solución de nAu-GluNAc posee una leve coloración rosada y un sólido de la misma tonalidad. De esta manera, es evidente que si bien los monómeros de quitosana actúan como agentes reductores, no estabilizan las nAu. Esto ocurre porque el tamaño de los monómeros no permite la estabilización estérica la cual sí se da con la quitosana. Por otra parte, únicamente, las síntesis con N-acetil-D-glucosamina necesitaron reaccionar por 4 horas ya que la solución permanecía incolora. En este caso la velocidad de reacción fue lenta debido a que los iones $[AuCl_4]^-$ no son atraídos por las moléculas neutras de reductor en medio ácido [39].

En la Figura 58 se muestran los espectros UV-Vis de las soluciones de nAu con los monómeros D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina y las mezclas de ambos al finalizar la reacción a 75°C. Todos los espectros muestran una banda de absorción en la región UV alrededor de 275 nm que corresponde a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ del grupo C=O de los monómeros oxidados pero no se observa la banda de plasmones de superficie característica de nAu a 522 nm. Para el espectro de nAu-GluN es posible observar una banda alrededor de 555 nm de muy baja absorbancia que indica muy poca concentración de nAu grandes en solución. Estas nAu solo poseen estabilización por par iónico $-NH_3^+Cl^-$, sin embargo, la estabilización por carga no es suficiente para vencer las fuerzas de atracción entre nAu. Para soluciones con relación molar monómero/ Au^{3+} 85/1, se observa que conforme se reduce la concentración de D-glucosamina y se incrementa la concentración de N-acetil-D-glucosamina disminuye la absorbancia de la banda a 275 nm debido a la menor velocidad de reacción. Por otro lado, al elevar la relación molar a 300/1, la intensidad de la banda de absorción aumenta por la mayor cantidad de moles de monómero. En la Figura 59 se observa que el incremento de absorbancia es apreciable para la solución de nAu-GluN comparada con la solución de nAu-GluNAc. Para ambas soluciones también se

observó formación de un sólido aunque en este caso la precipitación de nAu no permitió observar la banda de plasmones de superficie.

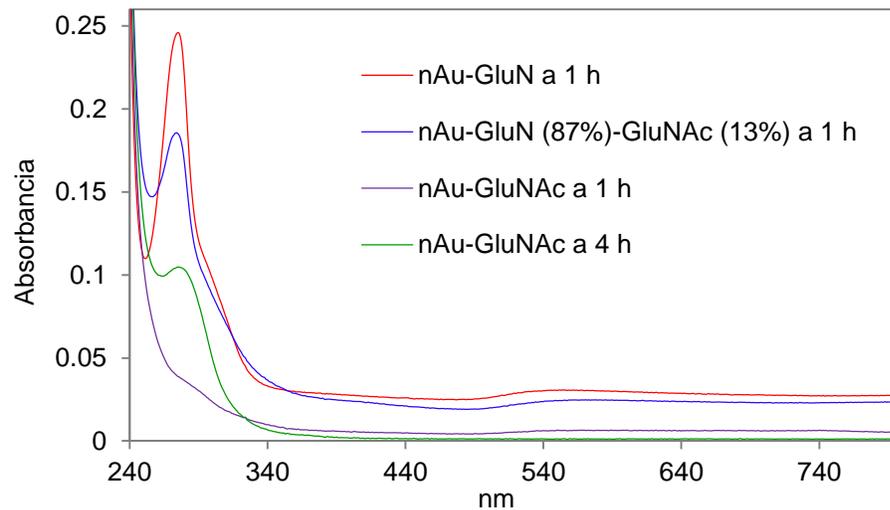


Figura 58. Espectros UV-Vis de nAu-monómeros de quitosana con relación molar monómero/ Au^{3+} 85/1.

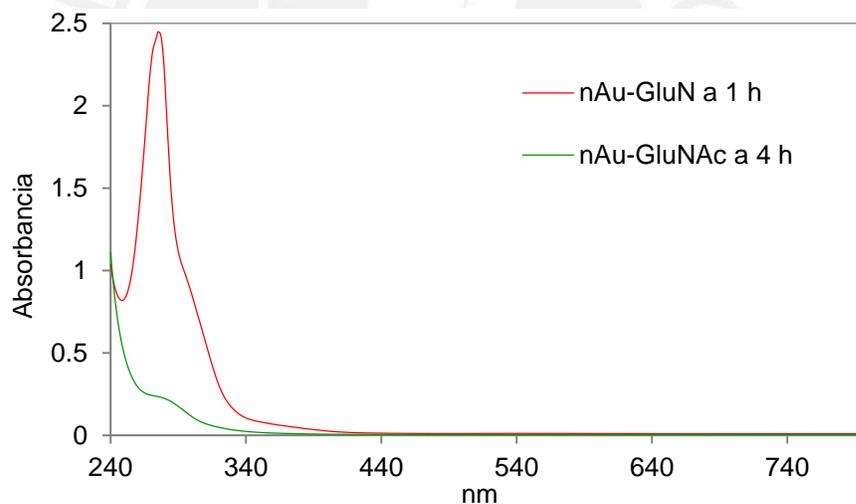


Figura 59. Espectros UV-Vis de nAu-monómeros de quitosana con relación molar monómero/ Au^{3+} 300/1.

3.4.2 Síntesis y caracterización de nAu con D-glucosa

La solución de nAu-D-glucosa presenta una ligera tonalidad rosada y un precipitado del mismo color. Similarmente a la síntesis de nAu con los monómeros de quitosana, la D-glucosa actúa como agente reductor pero no como estabilizador de las nAu. La estabilización por carga no es posible porque ninguno de los grupos de la glucosa se

protona en medio ácido, tampoco existe estabilización estérica por el tamaño del compuesto. En la Figura 60 se muestra el espectro UV-Vis de la solución de nAu-D-glucosa al concluir una hora de reacción a 75°C. Se observa la banda de plasmones de superficie a 564 nm que posee baja absorbancia debido a la poca concentración de nAu en solución. La posición de la banda de absorción en la región visible indica que el tamaño de estas nAu es mayor al de las nAu-GluN ($\lambda = 555$ nm). Por lo tanto, la capacidad de estabilización de la D-glucosa, que tiene solo grupos OH, es menor que la de la D-glucosamina-HCl, que posee grupos NH_2 . Por otra parte, la banda de absorción en la región UV a 271 nm corresponde a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ del grupo C=O de la D-glucosa oxidada.

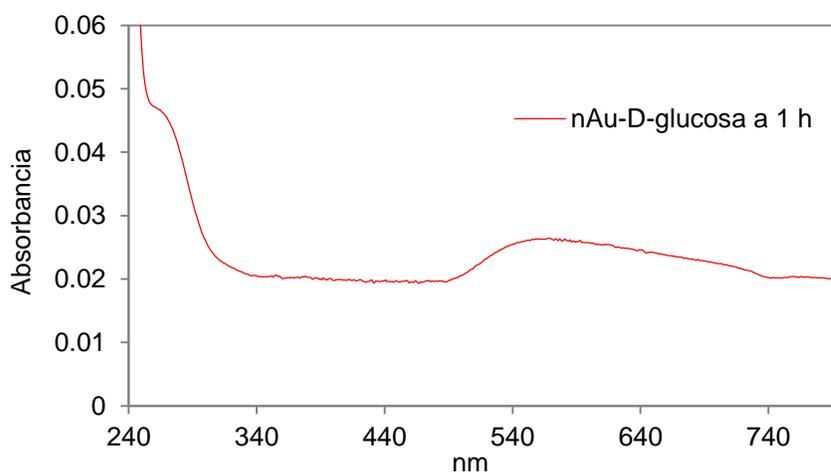


Figura 60. Espectro UV-Vis de nAu-D-glucosa con relación molar glucosa/ Au^{3+} 85/1.

3.4.3 Síntesis y caracterización de nAu con citrato trisódico

Investigaciones anteriores sobre la síntesis de nAu-citrato han reportado el efecto de la relación molar sobre el tamaño de las nAu. El incremento de la relación molar hasta 3,5/1 disminuye el tamaño de partícula pero para valores de citrato/ Au^{3+} mayores a 3,5/1 el tamaño de partícula se incrementa en el rango de 14-30 nm [18]. Asimismo, se han propuesto dos mecanismos diferentes de formación de nAu que dependen del pH (Sección 1.4.1). En primer lugar, la síntesis de nAu con citrato trisódico se realizó con citrato/ Au^{3+} 3,5/1 en agua ultrapura a 100°C y se observó un precipitado marrón de Au sobre el agitador magnético y en la pared del balón de reacción, así como turbidez en la solución. Esto se debe a que la adición de la solución HAuCl_4 5,08 mM en HCl 10% disminuyó el pH inicial de 6 a 1 en el cual el citrato se encuentra protonado (H_3Ct) y no estabiliza electrostáticamente la superficie de nAu. De igual manera, en la síntesis con

la misma relación molar citrato/ Au^{3+} 3,5/1 en solución NaOAc/HOAc (pH 4,46) a 100°C también se observó un precipitado. En este caso, la presencia de cargas adicionales favorecería la agregación de las nAu debido a la compresión de la doble capa eléctrica o porque la sal desestabiliza a las nAu mediante el desplazamiento de los iones citrato (H_2Ct^-) de su superficie ya que la interacción es electrostática. Por ello, para formar nAu estables se retiró el HCl 10% mediante la evaporación de la solución de HAuCl_4 .

En la síntesis de nAu con citrato trisódico, la adición del agente reductor debe ser rápida para favorecer la formación de nanopartículas monodispersas. Para la síntesis con relación molar citrato/ Au^{3+} 10/1, a los 3 minutos de reacción se observó un color negro y a los pocos segundos la solución se tornó rojo claro. La solución de nAu resultante dio un pH 6, tonalidad rojo intenso y un poco de sólido negro que corresponde a estructuras agregadas de oro (Sección 1.4.1). En la Figura 61 se muestra el espectro UV-Vis de la solución de nAu-citrato luego de 25 minutos de reacción a 100°C . La banda de plasmones de superficie se encuentra a 520 nm y posee una absorbancia de 0,9347. La simetría de la banda indica la formación de nanopartículas monodispersas cuya estabilidad se debe a los grupos COO^- del citrato (HCt^{2-}) que estabilizan electrostáticamente la superficie de las nAu. En este caso, es posible determinar el tamaño y la concentración de las nAu a partir del espectro UV-Vis con los datos y las fórmulas de la Sección 1.5.2.2. Cuando se utilizan las ecuaciones 1 y 2, se obtienen tamaños de partícula de 20,59 nm y 20,43 nm respectivamente. Por otro lado, para calcular la concentración de nAu se emplean los valores de $A_{450} = 0,5367$ y $\epsilon_{450} = 5,41 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ el cual corresponde a nAu de 20 nm de diámetro [52]. La concentración de nAu resultante es $9,92 \times 10^{-10} \text{ M}$ (1 nM).

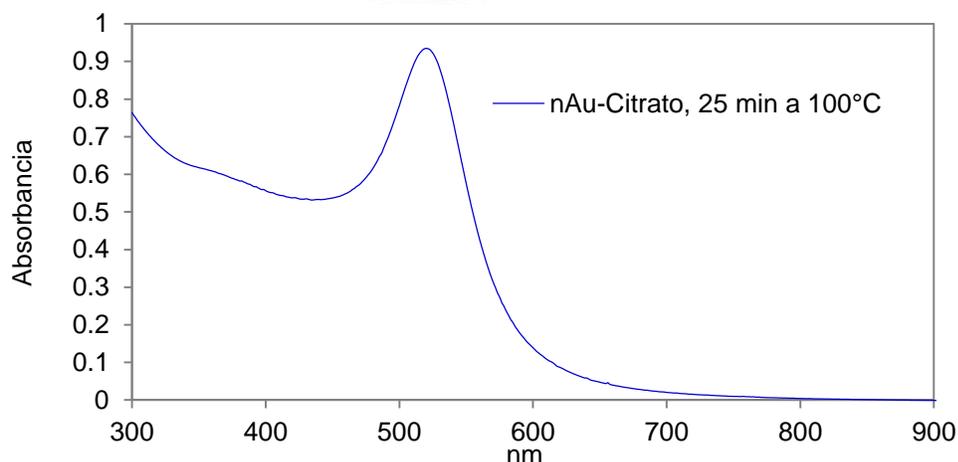


Figura 61. Espectro UV-Vis de nAu con citrato/ Au^{3+} 10/1.

En comparación con las nAu con quitosana obtenidas a 100°C y a 20 minutos de reacción, las nAu con citrato se formaron en menos tiempo lo cual indica mayor velocidad de reducción en la síntesis con citrato respecto a la síntesis con quitosana.

En cuanto a la síntesis de nAu-Qna-citrato con relación molar Qna/Au³⁺ 100/1 y citrato/Au³⁺ 3,55/1, a los 13 minutos de reacción la solución mostró leve coloración roja y al finalizar la reacción se tornó más oscura pero no se formó sólido. En la Figura 62 se presenta el espectro UV-Vis normalizado de la solución de nAu-Qna-citrato luego de una hora de reacción a 75°C. Además, se muestra el espectro UV-Vis normalizado de la solución de nAu-Qna con relación molar 100/1 a las mismas condiciones de reacción. A diferencia del espectro UV-Vis normalizado de nAu-Qna (522 nm, 0,62), la banda de plasmones de superficie de nAu-Qna-citrato se encuentra ligeramente desplazada a 520 nm y tiene menor absorbancia (0,54). Una posible explicación es que la presencia de mayores sitios de reducción acelera la formación de nAu, por ello, se observa que la absorbancia se incrementa a partir de 600 nm lo cual indica la presencia de mayores tamaños para nAu-Qna-citrato lo que causa disminución de la absorbancia alrededor de 520 nm. A pesar de que la presencia de ambos agentes estabilizadores debería favorecer el control del tamaño de partícula (menores dimensiones) debido a las distintas velocidades de reacción y modo de acción, la diferencia en concentración de nAu de tamaño promedio no es significativa.

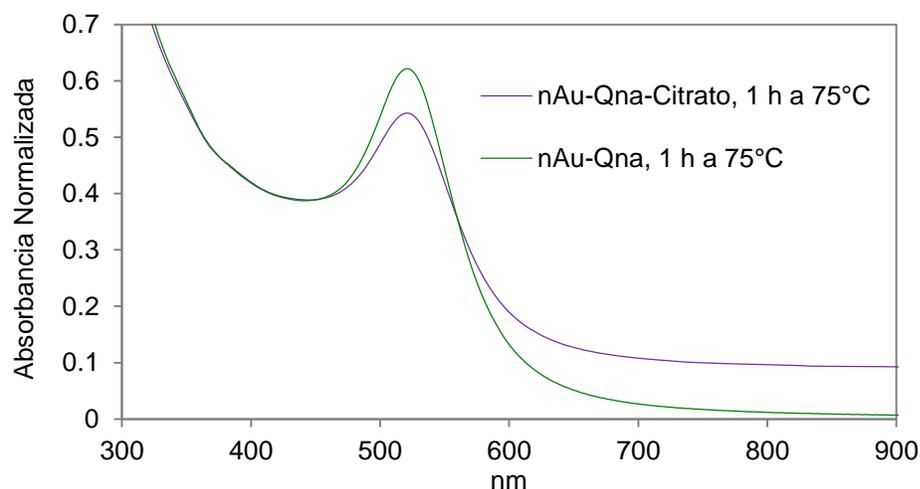


Figura 62. Espectros UV-Vis normalizados de nAu-Qna y nAu-Qna-citrato con relación molar Qna/Au³⁺ 100/1 (ambos casos) y citrato/Au³⁺ 3,5/1.

3.5 Comparación de la $[\eta]$ de quitosana, nAu-Qna y nAu-Qna-citrato

A partir de las mediciones de tiempo de flujo para cada solución y para el solvente se calcularon las viscosidades específicas (η_{sp}) y la viscosidad reducida (η_{red}). En la Figura 63 se observa la gráfica que relaciona los valores de viscosidad reducida con la concentración de soluciones de quitosana en el rango de $8,125 \times 10^{-4}$ - $1,3 \times 10^{-3}$ g/mL. Los valores se ajustaron a una recta de cuya ecuación se determinó la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de la quitosana, 394,44 mL/g a 30°C. Para estudiar el efecto del calentamiento de la solución de quitosana durante la reacción en la $[\eta]$, esta se calentó a 75°C por una hora. La viscosidad intrínseca disminuyó ligeramente a 388,78 mL/g. Por otro lado, también se determinó la viscosidad reducida para la solución de quitosana que contiene citrato trisódico. La viscosidad intrínseca resultante fue 387,79 mL/g, similar al valor de la solución de quitosana que fue calentada a 75°C.

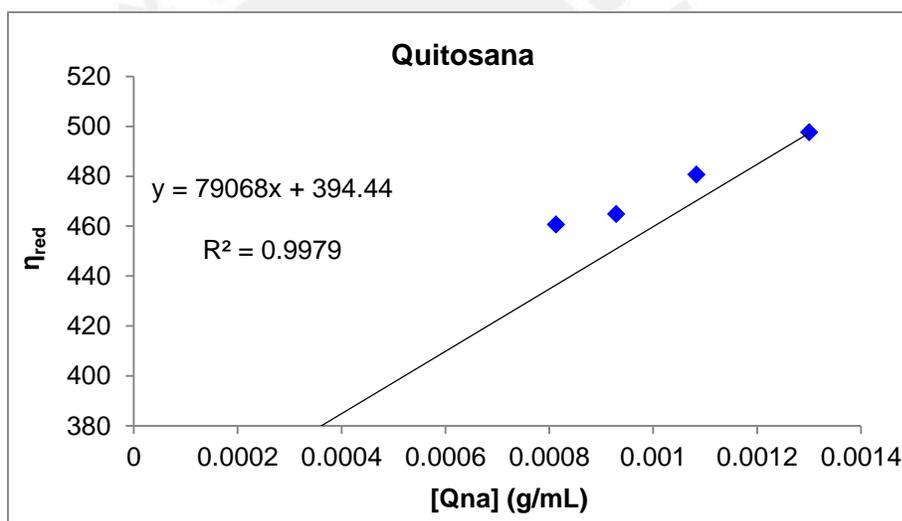


Figura 63. Valores de η_{red} en función de la $[Qna]$.

En la Figura 64 se presenta la gráfica que relaciona los valores de η_{red} con la concentración de quitosana para la solución de quitosana que posee citrato y $H AuCl_4$ en relación molar Qna/Au^{3+} 100/1 y citrato/ Au^{3+} 3,5/1. La presencia del complejo $H AuCl_4$ afectó ligeramente la conformación de la quitosana pues la viscosidad intrínseca disminuyó de 387,89 mL/g a 314,85 mL/g. Además, se realizó la medición para la solución de nAu-Qna-citrato luego de la síntesis durante una hora a 75°C. En la Figura 65 se observa una disminución considerable de la $[\eta]$ de 314,85 mL/g a 135 mL/g.

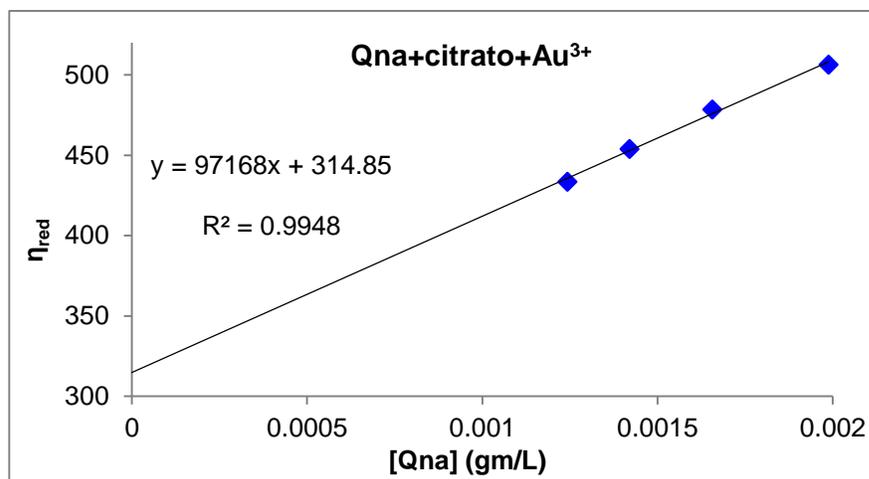


Figura 64. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución + citrato + Au^{3+} (antes de reacción).

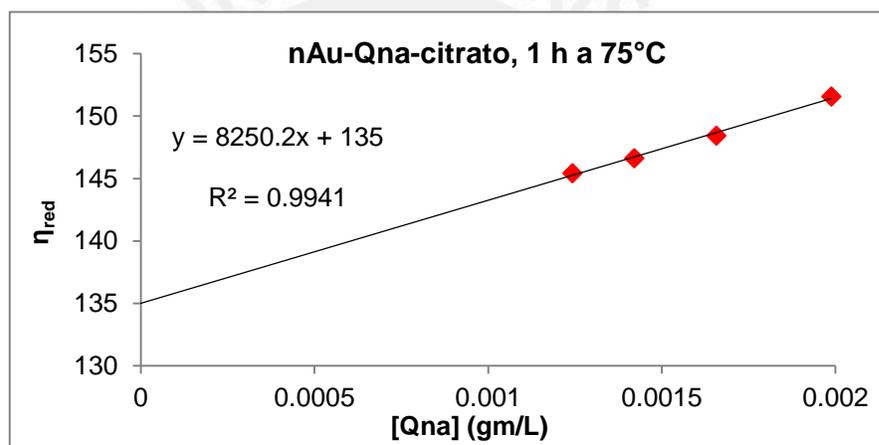


Figura 65. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución nAu-Qna-citrato (después de reacción).

De manera similar, se hizo la medición para una solución de nAu-Qna con relación molar Qna/Au^{3+} 100/1 después de una hora de reacción a 75°C. En la Figura 66 se observa que la $[\eta]$ es 111,62 mL/g, menor a la $[\eta]$ de 135 mL/g de nAu-Qna-citrato. En ambos casos, la disminución de la $[\eta]$ pudo ocurrir por la degradación de las cadenas de quitosana durante la reacción o por el efecto de las nAu que cambiaron la conformación lineal del polímero a una más compacta [40]. De esta manera, la degradación de la quitosana o el cambio de conformación fueron mayores cuando la quitosana se encontraba como único agente reductor y estabilizador. Aunque la diferencia es pequeña, las capacidades de la quitosana para reducir y estabilizar cambian cuando otro agente reductor y estabilizador adicional como el citrato trisódico está presente en la síntesis.

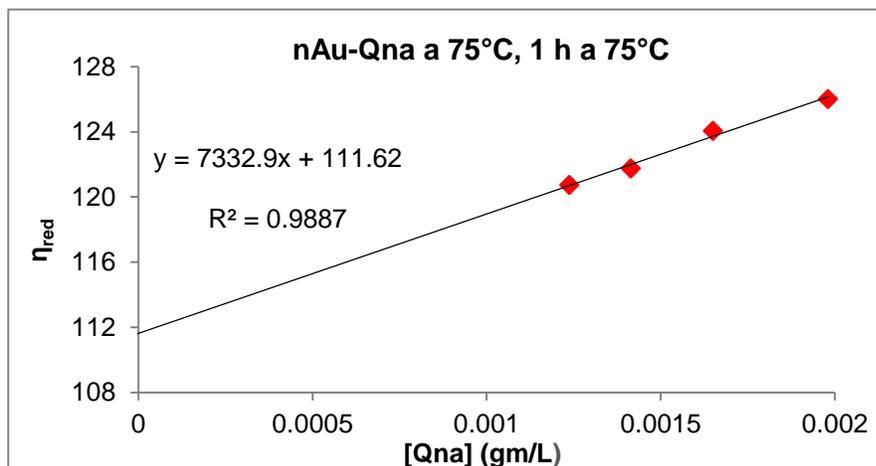


Figura 66. Valores de η_{red} en función de la [Qna], solución nAu-Qna.

3.6 Reducción heterogénea con perlas y película de quitosana

3.6.1 Entrecruzamiento de perlas de quitosana con epíclorhidrina

La epíclorhidrina es un reactivo que se emplea como agente de entrecruzamiento de quitosana [62]. En la Figura 67 se observan dos cadenas de quitosana entrecruzadas con epíclorhidrina en las cuales el carácter catiónico del polímero se mantiene. La insolubilidad de las perlas en $\text{HOAc}_{(ac)}$ luego del tratamiento es prueba del entrecruzamiento.

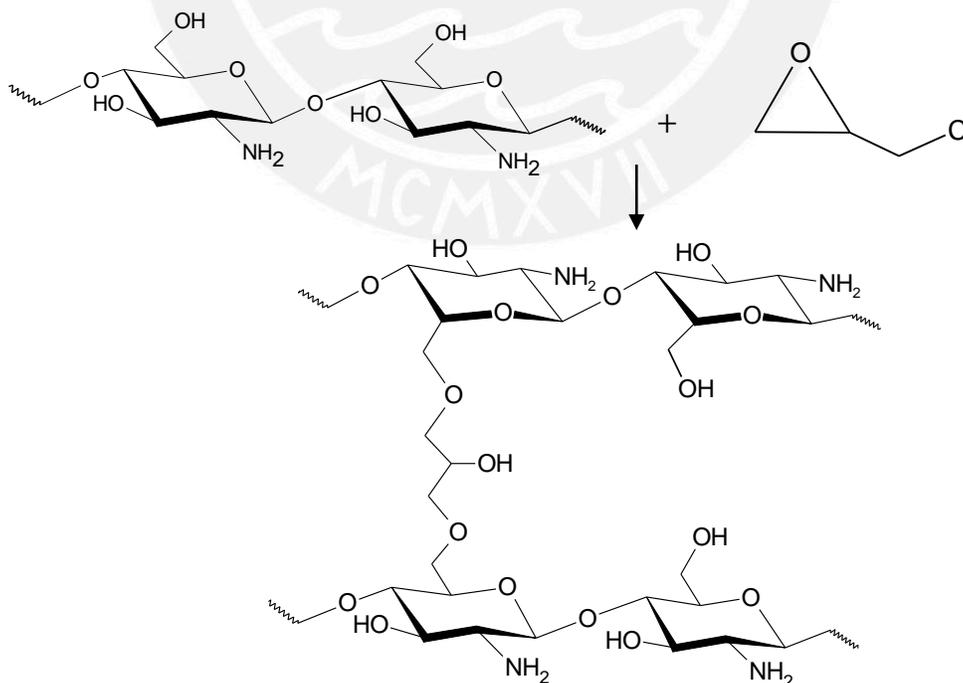


Figura 67. Entrecruzamiento de quitosana con epíclorhidrina [81].

3.6.2 Entrecruzamiento de perlas de quitosana con glutaraldehído

El glutaraldehído es un reactivo que también se utiliza como agente de entrecruzamiento de quitosana. Los grupos amino de la quitosana reaccionan con los grupos aldehídos del glutaraldehído formando iminas [62]. En la Figura 68 se muestran dos cadenas de quitosana entrecruzadas con glutaraldehído. La perla de quitosana-glutaraldehído resultante no se disolvió en solución acuosa de ácido acético lo que comprobó el entrecruzamiento. A diferencia de las perlas entrecruzadas con epiclorhidrina que son de color blanco, las perlas de Qna-glutaraldehído presentan coloración amarillenta (Anexo 10).

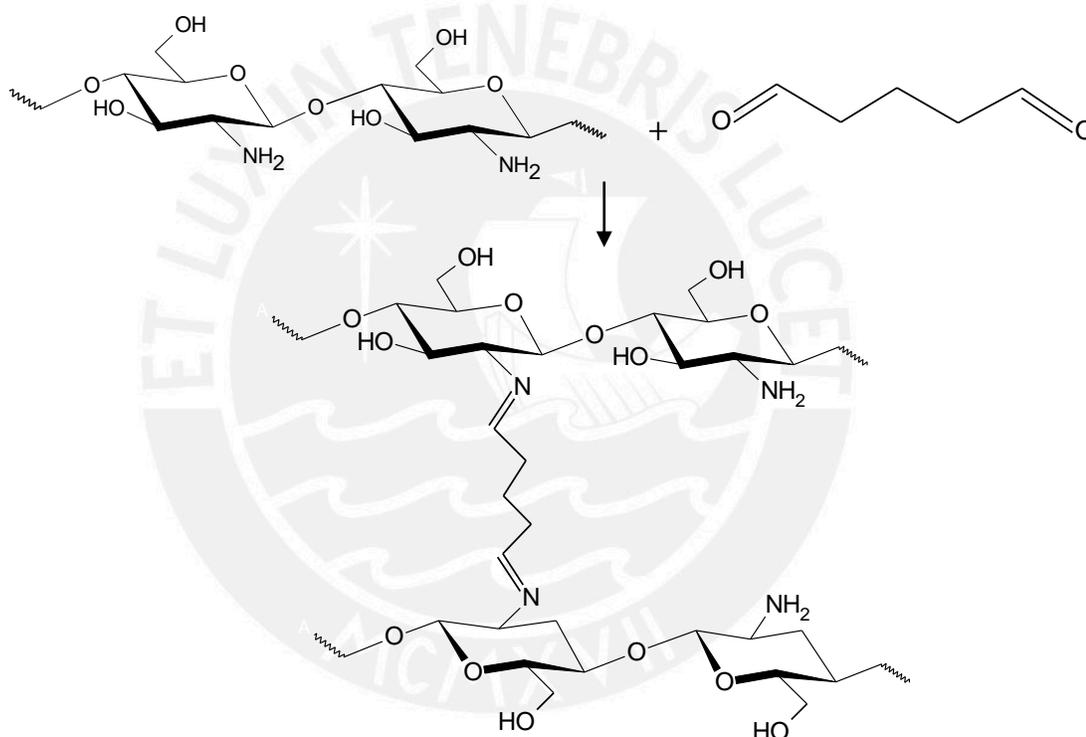


Figura 68. Entrecruzamiento de quitosana con glutaraldehído [81].

3.6.3 Síntesis de nanopartículas de oro con perlas y películas de quitosana

Todas las perlas de quitosana y perlas entrecruzadas adquirieron coloración roja a pH 4 y pH 8 aunque la formación de nAu fue ligeramente más rápida a pH 4. Esto se explica porque conforme se eleva el pH, los ligandos cloruro del complejo $[\text{AuCl}_4]^-$ son reemplazados por ligandos hidroxilo $[\text{AuCl}_x(\text{OH})_{4-x}]^-$ ($x=0-4$) y a pH 8 predomina el complejo $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ el cual es menos reactivo que los complejos a pH inferiores [18, 65]. Además, cuando se efectuó la síntesis a 75°C con perlas de quitosana se observó

diferencia en la velocidad de reacción según la composición de la perla, fue más rápida con perlas de quitosana-glutaraldehído pues adquirieron ligera coloración roja a los 4 y 5 minutos de reacción a pH 4 y 8, respectivamente. Para las perlas de quitosana se observó tonalidad roja a los 8 minutos de reacción a pH 8. En cambio, las perlas de quitosana-epiclorhidrina alcanzaron leve coloración roja a los 13 y 15 minutos de reacción a pH 4 y 8, respectivamente. Luego de 30 minutos de reacción, el color de las perlas fue homogéneo pero más intenso para las de quitosana-glutaraldehído y quitosana (Anexo 10). Posterior al lavado de las perlas con agua ultrapura se efectuaron cortes transversales y se observó la coloración roja homogénea al interior de las perlas de quitosana y quitosana-epiclorhidrina, a diferencia del interior de las perlas de quitosana-glutaraldehído que permanecieron amarillos. Esto muestra que para las perlas de quitosana entrecruzadas con glutaraldehído, la reacción redox ocurre mayormente en la superficie y que la difusión de los iones $[\text{AuCl}(\text{OH})_3]^-$ a pH 8, y de los iones $[\text{AuCl}_4]^-$ a pH 4 al interior de una estructura más densa está impedida.

En el caso de la síntesis con películas de quitosana a pH 8, se observó una leve tonalidad rojiza a los 8 minutos de reacción y después de 30 minutos de reacción a 75°C la coloración rojiza de la película no fue tan homogénea. Esto se debe a que la película de 31,9 μm de espesor presenta zonas que varían en 1,3 μm . Como el color de las películas se intensificó lentamente porque la estructura de las películas es más compacta y menos porosa que la de las perlas, el tiempo de reacción se prolongó a 1 hora y 30 minutos con lo cual la tonalidad rojiza fue más intensa.

Según lo mencionado anteriormente, la formación de nAu en perlas de quitosana y perlas entrecruzadas es ligeramente más rápida a pH 4 con respecto a pH 8 y depende de la composición de la perla. La velocidad de reacción es mayor para perlas de quitosana con glutaraldehído; sin embargo, las nAu se concentran más en la superficie que en el interior. Cuando se lleva a cabo la síntesis con perlas de quitosana con epiclorhidrina, el color rojo también es homogéneo al interior debido a la porosidad de la estructura. Por otro lado, se requiere de mayor tiempo de reacción para la síntesis de nAu con películas de quitosana debido a la menor porosidad de la estructura.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Las nAu obtenidas con quitosana muestran una banda de plasmones de superficie alrededor de 522 nm que presenta corrimiento hacia mayores o menores longitudes de onda y ensanchamiento según los parámetros de relación molar Qna/Au^{3+} , tiempo de reacción, temperatura, pH y concentración. Las mejores condiciones para obtener nAu más estables y monodispersas se logra con una relación molar Qna/Au^{3+} mayor o igual a 100/1, a una hora de reacción, a pH 5, a 75°C y con concentraciones de 0,27% (w/v) para quitosana y de $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L para $HAuCl_4$.
- El aumento del número de moles de unidades de quitosana favoreció la obtención de nAu de menor tamaño así como una mayor estabilidad de las nAu. Se observó que a pH 4,46 las soluciones de nAu con relación molar Qna/Au^{3+} a partir de 95/1 fueron estables tanto a temperatura ambiente como a 2°C por al menos 2 meses. En el caso de la solución de nAu con relación molar 367/1, está fue estable luego de 6 meses a temperatura ambiente comparada con la solución con relación molar 50/1 en la cual se observó precipitado.
- El inicio de la formación de nAu con quitosana ocurrió dentro de los 20 minutos de reacción y concluyó a las 6 horas de reacción pues no se observó modificación en la banda de plasmones de superficie.
- La síntesis a 50°C produjo nAu de mayor tamaño de partícula comparada con las síntesis a 75°C y 100°C. Aunque no existe diferencia en la banda de plasmones para la síntesis a 75°C y 100°C a una hora de reacción, se obtuvieron nAu en menos tiempo a 100°C.
- La disminución del pH de 5 a 1 produjo nAu poco estables (mas grandes y una distribución de tamaños mas amplia), lo que se podría deber a la hidrólisis de las cadenas de quitosana o al mayor grado de protonación de los grupos amino. En el caso de las síntesis a pH 4,46 y 5, las nAu fueron estables.
- Para una misma relación molar Qna/Au^{3+} , las nAu se formaron sin importar la concentración de reactivos. Para soluciones de concentración mayor a 3C y 5C (C es la concentración de referencia para una solución de quitosana al 0,27% w/v y $1,58 \times 10^{-4}$ mol/L de $HAuCl_4$) se formaron nAu mas grandes. Para concentraciones de C y menores no hubo variación en el tamaño.

- Los tamaños promedio de partícula, determinados por TEM, variaron desde 10,31 nm hasta 14,61 nm según disminuyó la relación molar Qna/Au³⁺ desde 300/1 hasta 50/1. En todos los casos las nAu tuvieron forma esférica y presentaron distribución de tamaño similar. Los tamaños promedio determinados a partir de espectros UV-Vis (11-12 nm) y a partir de las alturas en el eje Z de imágenes del AFM (12 nm) están en concordancia con los valores obtenidos por TEM.
- Por medio de la técnica de ELS, se verificó que la carga en la superficie de las nAu es positiva debido a la interacción y estabilización de la quitosana que tiene carácter catiónico en medio acuoso ácido.
- Tanto los monómeros de quitosana (GluN y GluNAc), como la glucosa, redujeron los iones Au³⁺ pero no lograron estabilizar las nAu por lo que se observó precipitación en ambos casos. Por otro lado, se logró sintetizar nAu estables con citrato y se calculó un tamaño promedio de 20,5 nm. Además, se obtuvieron nAu con quitosana y citrato al mismo tiempo que presentaron una distribución de tamaño mas amplia con respecto a las nAu con quitosana.
- La viscosidad intrínseca a 30°C de la solución inicial de quitosana fue de 394,44 mL/g la cual se redujo ligeramente a 387,89 mL/g y 314,85 mL/g por la presencia de citrato y de H₂AuCl₄, respectivamente. La [η] disminuyó a 135 mL/g para nAu-Qna-citrato y a 111,62 mL/g para nAu-Qna, lo cual sería una indicación de una menor degradación de la quitosana en presencia de un agente reductor o de un cambio de conformación de las cadenas de quitosana por la presencia de las nAu.
- La velocidad de la reducción heterogénea, tanto para las perlas de quitosana como para las de quitosana con epíclorhidrina, fue similar a la velocidad de reducción homogénea. Se obtuvieron nAu con perlas y películas de quitosana y la velocidad de reacción fue ligeramente mayor a pH 4 que a pH 8. Asimismo, se observó una coloración más homogénea sobre estructuras porosas, siendo las películas de quitosana las que requirieron de mayor tiempo de reacción.

4.2 Recomendaciones

- Se propone buscar métodos como la electroforesis para la separación de la quitosana en exceso que puede influir en los resultados de la caracterización por técnicas diferentes de la espectroscopía UV-Vis.

- Para los análisis por AFM, se recomienda realizar lavados de las muestras para observar mejor la dispersión de las nanopartículas de oro.
- Se recomienda utilizar el sólido de HAuCl_4 . El ácido a pH 1 hace necesario emplear soluciones buffer para aumentar el pH durante la síntesis de nAu con monómeros de quitosana y glucosa y es posible que la presencia de sales favorezca la agregación.
- Se debe continuar con la caracterización de las nanopartículas de oro con perlas y películas de quitosana para determinar el tamaño o distribución de tamaño de partículas y si se encuentran distribuidas de manera homogénea en toda la estructura o no.



5. BIBLIOGRAFÍA

1. Bandyopadhyay, A.K. *Introduction: What is Nanotechnology?* en *Nano Materials*, A.K. Bandyopadhyay. New age international limited publishers: New Delhi, **2008**, pp 1-2.
2. Martín-Palma, R.J.; Lakhtakia, A. *Nanotechnology: a crash course*. Spie Press: Bellingham, **2010**, pp 1-53.
3. Sharma, V.; Yngard, R.; Lin, Y. *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2009**, 145, 84-86.
4. The Royal Society and The Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and nanotechnologies*. Clyvedon Press: Cardiff, **2004**, pp vii-viii, 5-25.
5. Nagarajan, R. *Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology* en *Nanoparticles: Synthesis, stabilization, passivation and functionalization*, R. Nagarajan, T. Hatton. American Chemical Society, ACS Symp. Series No. 996: Washington DC, **2008**, pp 2-14, 16-30.
6. DiscoverNano, <http://discovernano.org/whatis/History/HistoryPopup/> 21/01/14.
7. Daniel, M.; Astruc, D. *Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. *Chemical Reviews*, **2004**, 104, 297-326.
8. Huang, H.; Yang, X. *Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method*. *Carbohydrate Research*, **2004**, 339, 2627-2631.
9. Fernandez, E.; Novoa, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ¹H-NMR*. *Carbohydrate Polymers*, **2005**, 61, 155-156.
10. Colvin, V.; Mittleman, D. *Nanotechnology: The Basics*. Rice University, **2013**. <https://class.coursera.org/nanotech-001>.
11. Guo, Z.; Tan, L. *Synthesis of nanoparticles and their self-assembly: bottom-up approach* en *Fundamentals and Applications of Nanomaterials*. Artech House: Boston, **2009**, pp 95-106, 129-150.
12. Sardar, R.; Funston, A.; Mulvaney, P.; Murray, R. *Gold nanoparticles: past, present and future*. *Langmuir*, **2009**, 25, 13840-13851.
13. Wei, D.; Qian, W. *Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent*. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, **2008**, 62, 136-142.

14. Zhu, M.; Wang, L.; Exarhos, G.; Li, A. *Thermosensitive gold nanoparticles*. Journal of American Chemical Society, **2004**, 126, 2656-2657.
15. Feldheim, D.; Foss, C. *Metal nanoparticles: Synthesis, characterization and applications*. Marcel Dekker, Inc: New York, **2002**, pp 1.
16. Kim, J.; Lee, J. *Synthesis and thermally reversible assembly of DNA-Gold nanoparticle cluster conjugates*. Nano Letters, **2009**, 9, 4564-4569.
17. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D.; Whyman, R. *Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, **1994**, 801-802.
18. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X. *Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate*. Journal of the American Chemical Society, **2007**, 129, 13939-13948.
19. Link, S.; El-Sayed, M. *Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloid gold nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry B, **1999**, 103, 4212-4217.
20. Smith, J.; Griffin, D.; Leny, J.; Hagen, J.; Chávez, J.; Kelley, N. *Colorimetric detection with aptamer-gold nanoparticle conjugates coupled to an android-based color analysis application for use in the field*. Talanta, **2014**, 121, 247-255.
21. Cheng, Y.; Samia, A.; Meyers, J.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C. *Highly efficient drug delivery with gold nanoparticles vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer*. Journal of American Chemical Society, **2008**, 130, 10643-10647.
22. Nguyen, D.; Kim, D.; Kim, K. *Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles*. Micron, **2011**, 42, 207-227.
23. Guo, S; Wang, E. *Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles*. Analytica Chimica Acta, **2007**, 598, 181-192.
24. Philip, D. *Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles*. Spectrochimica Acta A, **2008**, 71, 80-85.
25. Sivaraman, S.; Kumar, S.; Santhanam, V. *Room-temperature synthesis of gold nanoparticles-size-control by slow addition*. Gold Bulletin, **2010**, 43, 275-286.
26. Steed, J.; Turner, D.; Wallance, K. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. Wiley: Chichester, **2007**, pp 266.
27. Qi, Z.; Zhou, H.; Matsuda, N.; Honma, I.; Shimada, K.; Takatsu, A.; Kato, K. *Characterization of gold nanoparticles synthesized using sucrose by seeding*

- formation in the solid phase and seeding growth in aqueous solution.* Journal of Physical Chemistry B, **2004**, 108, 7006-7011.
28. Fan, C.; Li, W.; Zhao, S.; Chen, J.; Li, X. *Efficient one pot synthesis of chitosan induced gold nanoparticles by microwave irradiation.* Materials Letters, **2008**, 62, 3518-3520.
29. Park, Y.; Hong, Y.N.; Weyers, A.; Kim, Y.S.; Linhardt, R.J. *Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles.* Institution of Engineering and Technology, Nanotechnology, **2011**, 5, 69-78.
30. Katti, K.K.; Kattumuri, V.; Bhaskaran, S.; Katti, K.V.; Kannan, R. *Facile and general method for synthesis of sugar coated gold nanoparticles.* International Journal of Green Nanotechnology Biomedicine, **2009**, 1, 53-59.
31. Kasaai, M. *Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review.* Carbohydrate Polymers, **2010**, 79, 801-803.
32. Badawy, M.; Rabea, E. *A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection.* International Journal of Carbohydrate Chemistry, **2011**, 1-17.
33. Santiago, E.; Pereira, C.; Bellato, C. *An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan.* Carbohydrate Polymers, **2010**, 80, 1155-1160.
34. Shih, C.; Shieh, Y.; Twu, Y. *Preparation of gold nanopowders and nanoparticles using chitosan suspensions.* Carbohydrate Polymers, **2009**, 78, 309-315.
35. Lu, Y.; An, L.; Wang, Z. *Intrinsic viscosity of polymers: general theory based on a partially permeable sphere model.* Macromolecules, **2013**, 46, 5731-5740.
36. Kaushik, A.; Khan, R.; Solanki, P.; Pandey, P.; Alam, J.; Ahmad, S.; Malhotra, B. *Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor.* Biosensors and Bioelectronics, **2008**, 24, 676-683.
37. Murugadoss, A.; Chattopadhyay, A. *A "green" chitosan-silver nanoparticles composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst.* Nanotechnology, **2008**, 19, 1-2.
38. Tran, H.; Tran, L.; Ba, C.; Vu, H.; Ngoc, T.; Pham, D.; Nguyen, P. *Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan-based silver nanoparticles.* Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**, 360, 32-40.

39. Huang, H.; Yang, X. *Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate*. *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 2340-2346.
40. Sun, C.; Qu, R.; Chen, H.; Ji, C.; Wang, C.; Sun, Y.; Wang, B. *Degradation behavior of chitosan chains in the “green” synthesis of gold nanoparticles*. *Carbohydrate Polymers*, **2008**, 343, 2595-2599.
41. Pierre, A. *Introduction to sol-gel processing*. Kluwer Academic Publishers: Norwell, **2002**, pp 101-156.
42. Pong, B.; Elim, H.; Chong, J.; Ji, W.; Trout, B.; Lee, J. Y. *New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (III) salt: formation of the Au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties*. *Journal of Physical Chemistry C*, **2007**, 111, 6281-6287.
43. Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. *Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability*. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2009**, 331, 251-262.
44. Tran, T.; Nguyen, T. *Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: Aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 88, 1-22.
45. Polte, J.; Ahner, T.; Delissen, F.; Sokolov, S.; Emmerling, F.; Thunemann, A.; Kraehnert, R. *Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation*. *Journal of the American Chemical Society*, **2010**, 132, 1296-1301.
46. Birdi, S. K. *Surface and colloid chemistry: Principles and applications*. CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton, **2010**, pp 141-158.
47. Clogston, J.; Patri, A. *Zeta Potential measurement*, Grobelny, J. et al. *Size measurement of nanoparticles using Atomic Force Microscopy en Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 697, McNeil, S. Humana Press: New York, **2011**, pp 35-51, 61-73.
48. Guo, Z.; Tan, L. *Nanomaterials characterization en Fundamentals and applications of nanomaterials*. Artech House: Norwood, **2009**, pp 82-89.
49. Ayache, J.; Beaunier, L.; Boumendil, J.; Ehret, G.; Laub, D. *Sample preparation handbook for transmission electron microscopy*. Springer: New York, **2010**, pp 1.
50. Wilson, R.; Bullen, H. *Introduction to Scanning Probe Microscopy (SPM): Atomic Force Microscopy (AFM)*. Department of Chemistry, Northern Kentucky University:

- Kentucky, **2006**, <http://asdlb.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMAFMtheory.pdf>
51. Scalf, J.; West, P. *Part I: Introduction to nanoparticle characterization with AFM*. Pacific Nanotechnology, Inc., **2006**, <http://www.nanoparticles.pacificnanotech.com>
52. Haiss, W.; Thanh, N.; Aveyard, J.; Fernig, D. *Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis Spectra*. *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 4215-4221.
53. Aryal, S.; B.K.C., R.; Dharmaraj, N.; Bhattarai, N.; Kim, C.; Kim, H. *Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteines capped gold nanoparticles*. *Spectrochimica Acta A*, **2006**, 63, 160-163.
54. Yu, C.; Liu, Y.; Yang, K.; Li, C.; Wang, C. *A new and clean method on synthesis of gold nanoparticles from bulk gold substrates*. *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, 125, 109-112.
55. Long, N.; Vu, L.; Kiem, C.; Doanh, S.; Nguyet, C.; Hang, P.; Thien, N.; Quynh, L. *Synthesis and optical properties of colloid gold nanoparticles*. *Journal of Physics: Conference Series*, **2009**, 187, 1-8.
56. Garcia, M. *Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2011**, 44, 1-20.
57. Amendola, V.; Meneghetti, M. *Size evaluation of gold nanoparticles by UV-Vis Spectroscopy*. *Journal of Physical Chemistry C*, **2009**, 113, 4227-4285.
58. Eller, P.; Hastrup, S. *Preparation and characterization of metal nanoparticles*. *Fysik og Nanoteknologi, Danmarks Tekniske Universitet*, **2011**, [http://www.fysik.dtu.dk/~media/Institutter/Fysik/Undervisning/Nanoteket/Images/projekter/overfladeplasmoner_preparationandcharacterizationofmetaln nanoparticles-\(povlplussten2011\)s092978ands093013.ashx](http://www.fysik.dtu.dk/~media/Institutter/Fysik/Undervisning/Nanoteket/Images/projekter/overfladeplasmoner_preparationandcharacterizationofmetaln nanoparticles-(povlplussten2011)s092978ands093013.ashx).
59. Amendola, V.; Meneghetti, M. *Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation*. *Journal of Material Chemistry*, **2007**, 17, 4705-4710.
60. Rodríguez, J.; Pérez, J.; García, F.; Liz, L. *Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes*. *Langmuir*, **2006**, 22, 7007-7010.
61. *Zeta Potential: An introduction in 30 minutes*. Zetasizer Nano series technical note, Malvern Instruments.
62. Zeng, X.; Ruckenstein, E. *Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **1996**, 35, 4169-4175.

63. Guibal, E.; Milor, C.; Tobin, J. *Metal-anion sorption by chitosan beads: Equilibrium and kinetics studies*. Industrial & Engineering Chemistry Research, **1998**, 37, 1454-1463.
64. Liang, X.; Wang, Z.; Liu, C. *Size-controlled synthesis of colloidal gold nanoparticles at room temperature under the influence of glow discharge*. Nanoscale Research Letters, **2010**, 5, 124-129.
65. Wang, S.; Qian, K.; Bi, X.; Huang, W. *Influence of speciation of aqueous HAuCl_4 on the synthesis, structure and property of Au colloids*. Journal of Physical Chemistry C, **2009**, 113, 6505-6510.
66. Njoki, P.; Lim, I.; Mott, D.; Park, H.; Khan, B.; Mishra, S.; Sujakumar, R.; Luo, J.; Zhong, C. *Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry C, **2007**, 111, 14664-14669.
67. Wei, D.; Qian, W.; Shi, Y.; Ding, S.; Xia, Y. *Effects of cooling treatment and glutaraldehyde on the morphology of Au nanostructures synthesized from chitosan*. Carbohydrate Research, **2008**, 343, 512-520.
68. Potara, M.; Maniu, D.; Astilean, S. *The synthesis of biocompatible and SERS-active gold nanoparticles using chitosan*. Nanotechnology, **2009**, 20, 1-7.
69. Kiss, L.; Soderlund, J.; Niklasson, G.; Granqvist, C. *New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles*. Nanotechnology, **1999**, 10, 25-28.
70. Bakar, A.; Bakar, M. *Preparation of chitosan-gold nanoparticles: part 1 (of 2) Effect of reducing technique*. Indonesian Journal of Chemistry, **2008**, 8, 184-188.
71. Bakar, A.; Bakar, M. *Preparation of chitosan-gold nanoparticles: part 2 (of 2) The role of chitosan*. Indonesian Journal of Chemistry, **2008**, 8, 320-326.
72. Yu, L. *Estimate the population density of gold nanoparticles in suspensions from experimental data*. Biochemistry & Physiology, **2012**, 1, 1-2.
73. Hu, J.; Wang, Z.; Li, J. *Gold nanoparticles with special shapes: controlled synthesis, surface-enhanced Raman Scattering, and the application in biodetection*. Sensors, **2007**, 7, 3299-3311.
74. Moukarzel, W.; Fitremann, J.; Marty, J. *Seed-less amino-sugar mediated synthesis of gold nanostars*. Nanoscale, **2011**, 3, 3285-3290.
75. Leary, J. *The importance of zeta potential for drug/gene delivery in nanomedicine*. Malvern Instruments workshop, Purdue University, Indiana, **2011**.
76. Tantra, R.; Schulze, P.; Quincey, P. *Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility*. Particuology, **2010**, 8, 279-285.

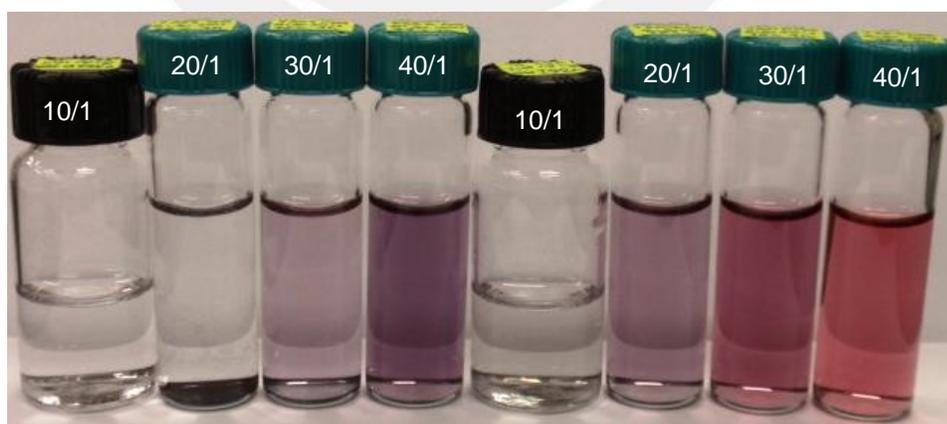
77. Sun, X.; Zhang, Z.; Zhang, B.; Dong, X.; Dong, S. *Preparation of gold nanoparticles protected with polyelectrolyte*. Chinese Chemical Letters, **2003**, 14, 866-869.
78. Ding, Y.; Xia, X.; Zhang, C. *Synthesis of metallic nanoparticles protected with N,N,N-trimethyl chitosan chloride via a relatively weak affinity*. Nanotechnology, **2006**, 17, 4156-4162.
79. Duarte, M.L.; Ferreira, M.C.; Marvao, M.R.; Rocha, J. *An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, **2002**, 31, 1-8.
80. Pornpattananangkul, D.; Zhang, L.; Olson, S.; Aryal, S.; Obonyo, M.; Vecchio, K.; Huang, C.; Zhang, L. *Bacterial toxin-triggered drug release from gold nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection*. Journal of the American Chemical Society, **2011**, 133, 4132-4139.
81. Torres, M.; Silveira, R.; Masumi, M. *Production of chemically modified chitosan microspheres by a spraying and coagulation method*. Materials Research, **2007**, 10, 347-352.

6. ANEXOS

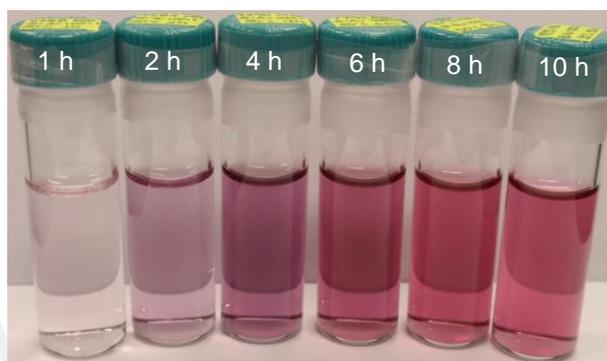
Anexo 1. Datos para la obtención de las gráficas de distribución de potencial zeta de soluciones de nAu-Qna.

Índice de refracción del material	1,59
Absorción del material	0,01
Viscosidad (cP)	0,8872
Temperatura (°C)	25,0
Medio de dispersión (solvente)	H ₂ O
Índice de refracción del solvente	1,33
Constante dieléctrica del solvente	78,5

Anexo 2. Estabilidad de soluciones de nAu-Qna a distintas relaciones molares Qna/Au³⁺ posterior al almacenamiento de 1 mes a temperatura ambiente (izquierda) y a 2°C (derecha).



Anexo 3. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 sintetizadas a diferentes tiempos de reacción a 50°C.



Anexo 4. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 300/1 sintetizadas a diferentes tiempos de reacción a 50°C.



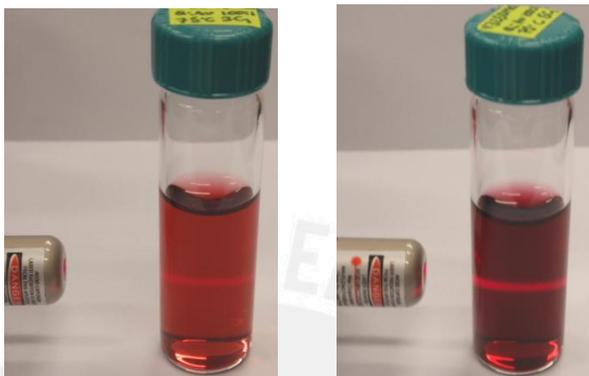
Anexo 5. Sección de sólido rojo de nAu-Qna (dentro del balón de reacción) al concluir la síntesis a 100°C.



Anexo 6. Soluciones de nAu-Qna con relación molar 100/1 a pH 1 y 3,42 a 75°C.



Anexo 7. Dispersión de luz láser de soluciones de nAu-Qna a concentraciones Qna-Au³⁺ 3C y 5C con relación molar 100/1.

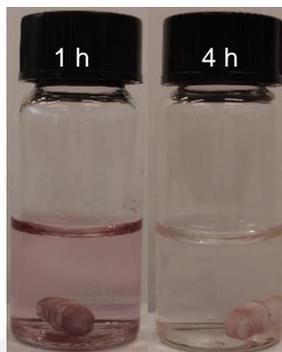


Anexo 8. Principales frecuencias de vibración en la región infrarroja y números de onda (cm⁻¹) de la quitosana liofilizada.

Tipo de frecuencia de vibración y enlace	cm ⁻¹
st O-H	3399,85
st N-H (amina)	
st C-H	2924,50
st C-H	2880,07
st C=O (amida)	1632,00
δ N-H (amida)	1574,64
st C-N	1411,59
δ N-H (amina)	1384,45
st C-O	1075,52
st C-O-C	1032,73

st: estiramiento, δ: flexión

Anexo 9. Soluciones de nAu-GluN a 1 h y nAu-GluNac a 4 h de reacción con relación molar 85/1.



Anexo 10. Perlas y películas de quitosana antes de la reacción y después de la síntesis a 75°C a pH 8.

