

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica
con orientación en Óptica Física**

**Síntesis y caracterización de nanopartículas con resonancias
plasmónicas en la primera ventana biológica**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jesús Manuel Ortega Salazar

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Jesús Manuel Ortega Salazar

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Director de tesis

Miembros del comité

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dr. Víctor Ruiz Cortes

Dra. Diana Garibo Ruiz



Dra. Karina Garay Palmett
Coordinadora del Posgrado en Óptica

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Jesús Manuel Ortega Salazar © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Jesús Manuel Ortega Salazar** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en óptica con orientación en Óptica Física.

Síntesis y caracterización de nanopartículas con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica

Resumen aprobado por:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
Director de tesis

La absorción asociada a la resonancia del plasmón localizado de superficie (RPLS) de nanopartículas metálicas produce efectos térmicos, los cuales se han utilizado para distintas aplicaciones en medicina, como el tratamiento de cáncer. En este tipo de aplicación es importante realizar un calentamiento localizado y selectivo, que no dañe a las células sanas, por lo que resulta importante sintonizarla dentro del rango espectral que comprende la primera ventana biológica (700-900 nm) en donde la absorción de los tejidos es baja. La RPLS depende del tamaño, morfología y material de las nanopartículas. Existen nanopartículas con diferentes geometrías cuyas resonancias caen dentro de dicho rango espectral. Particularmente, las nanopartículas de oro con geometría de barras presentan una RPLS que puede sintonizarse dentro del rango espectral que comprende la primera ventana biológica variando su razón de aspecto (longitud/diámetro). En esta tesis se sintetizaron nanobarras de oro con una resonancia alrededor de 800 nm mediante el método químico de crecimiento mediado por semillas y se realizó su caracterización térmica, óptica y morfológica. Posteriormente se llevó a cabo el cargado de las nanobarras en nanogeles termosensibles y se realizó la evaluación de los efectos térmicos de estos sistemas producidos por la absorción de luz a 785 nm. Además, con la finalidad de identificar otras posibles geometrías de nanopartículas que puedan ser útiles para inducir los efectos térmicos deseados, se realizó la caracterización termo-óptica de nanopartículas comerciales de diferentes geometrías con RPLS en el rango espectral de interés (700-900 nm). Adicionalmente, se obtuvieron numéricamente los espectros de atenuancia y absorbancia tanto de las nanopartículas adquiridas comercialmente como de las nanobarras de oro y se estimó el incremento de temperatura esperado de éstas últimas en estado estacionario (considerando nanobarras aisladas).

Palabras clave: Nanopartículas plasmónicas, nanobarras de oro, nanogeles termosensibles

Abstract of the thesis presented by **Jesús Manuel Ortega Salazar** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optics with orientation in Physical Optics.

Synthesis and characterization of nanoparticles with plasmonic resonance in the first biological window

Abstract approved by:

Dr. Jacob Licea Rodríguez
tesis director

The absorption associated with surface localized plasmon resonance (LSPR) of metal nanoparticles produces thermal effects, which have been used for various applications, such as cancer treatment. In this type of application, it is important to perform a localized and selective heating, which does not damage healthy cells, so it is important to tune the LSPR within the spectral range that comprises the first biological window (700-900 nm) where tissue absorption is low. The LSPR depends on the size, morphology, and material of the nanoparticles. There are nanoparticles with different geometries whose resonances fall within this spectral range. Specially, gold nanoparticles with bar geometry have an LSPR that can be tuned within the spectral range comprising the first biological window by varying their aspect ratio (length/diameter). In this thesis, gold nanorods are synthesized with a resonance around 800 nm by the chemical method of growth mediated by seeds and their thermal, optical, and morphological characterization is carried out. The nanorods are loaded into thermosensitive nanogels and the thermal effects of these systems produced by the absorption of light at 785 nm are evaluated. In addition, to identify other possible nanoparticle geometries that may be useful to induce the desired thermal effects, the thermo-optical characterization of commercial nanoparticles of different geometries is carried out with LSPR in the spectral range of interest (700-900 nm). Additionally, the attenuation and absorbance spectra of both commercially acquired nanoparticles and gold nanorods are obtained numerically and the expected temperature increase of the latter at steady state is estimated (considering isolated nanorods).

Keywords: Plasmonic nanoparticles, gold nanorods, thermo-responsive nanogels.

Dedicatoria

A mi familia porque sinceramente si ellos no me hubiesen presionado a seguir estudiando, este trabajo no se hubiera realizado o al menos no lo hubiera realizado yo.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por brindarme la oportunidad de entrar a su posgrado con la maestría en óptica, así como el de permitirme la utilización de los equipos con los que se contaba.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría con el número de apoyo 995602.

Al Dr. Jacob Licea, director de esta tesis por su apoyo y el tiempo que invirtió en todas las dudas que surgieron al estar realizar este proyecto, además de la gran disponibilidad a reunirnos en el momento que fuese necesario y seguirme motivando a avanzar cada vez más con este proyecto que de vez en cuando me costó trabajo entender al ser multidisciplinario, al Dr. Eugenio Méndez por presentarme alternativas de proyectos, ayudarme a elegir un área de trabajo que disfruto bastante y apoyarme con la parte numérica ya que el programar es una de las cosas que menos me gusta, al Dr. Ángel Licea por recibirme en el ITT y presentarme con el equipo de trabajo que tienen allá para la parte de síntesis y encapsulado, especialmente al I.Q. Jesús Eduardo Márquez por la disposición y el tiempo que invirtió para ayudarme a comprender de mejor manera la parte química de este proyecto, además de proporcionar las nanopartículas que se utilizaron.

A mi comité de tesis el Dr. Israel Rocha, el Dr. Víctor Ruiz Cortes y la Dra. Diana Garibo, ya que cada uno de ellos a lo largo de los avances se daba el tiempo para escuchar cómo iba avanzando con mi trabajo y siempre me presionaron a entender más a fondo todo el proyecto, además de aportar con sus siempre interesantes puntos de vista para complementar de mejor manera todo este trabajo.

A mis padres sin los cuales no hubiera venido a esta punta del país a estudiar, no solo por presionarme a seguir mejorando siempre, sino porque me apoyaron económicamente desde siempre y sobre todo cuando me vine a estudiar fuera, a un lugar donde no conocía a nadie y donde nunca había estado antes, muchas gracias, sin ustedes de inicio esto no fuera posible.

A todos mis compañeros, con quienes por desgracia no pude convivir tanto como me hubiera gustado debido a la contingencia sanitaria, pero el tiempo que pasamos estudiando juntos me divertí bastante y me ayudaron mucho a sobrellevar la maestría con su presencia y viviendo situaciones similares a la mía, a mi pareja con quien me tocó vivir esta cuarentena y sacar adelante los últimos cursos y el año de trabajo de tesis de la mejor manera que se pudo debido a las circunstancias, sin todos y cada uno de ellos esta experiencia no hubiera sido la misma y a pesar de todo la disfrute mucho, por todo esto muchas gracias a

todas y cada una de las personas a quienes me ayudaron también estando conmigo, comunicándose y preocupándose por mí aunque no mencione los nombres.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras:	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2 Estructura de la tesis.....	4
Capítulo 2. Antecedentes.....	5
2.1 Uso de nanopartículas para inducir efectos térmicos.....	5
2.2 Nanogeles termosensibles para la administración de fármacos	8
Capítulo 3. Marco Teórico.....	12
3.1 Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas.....	12
3.1.1 Cálculo de Mie.....	18
3.1.2 Cálculo de Mie.....	18
3.1.3 Modelos para la función dieléctrica.....	20
3.1.4 Consideraciones en los cálculos teóricos de las propiedades ópticas.....	21
3.2 Incremento de temperatura debido a la absorción en las nanopartículas.....	21
3.2.1 Estado estacionario.....	22
3.2.2 Efectos colectivos.....	24
Capítulo 4. Metodología.....	26
4.1. Síntesis de nanobarras de oro.....	26
4.2. Cargado de nanobarras en nanogeles.....	28
4.3. Caracterización térmica, óptica y morfológica.....	29
4.3.1. Caracterización térmica.....	29
4.3.2. Caracterización óptica.....	30
4.3.3. Caracterización morfológica.....	31

Capítulo 5. Resultados y discusión.....	33
5.1. Síntesis y caracterización de nanobarras de oro.....	33
5.2. Caracterización de nanopartículas con otras geometrías.....	37
5.2.1 Caracterización óptica.....	38
5.2.2 Caracterización térmica.....	40
5.3. Cargado de nanobarras en nanogeles termosensibles.....	42
Capítulo 6. Conclusiones.....	49
Literatura citada.....	51

Lista de figuras:

- Figura 1:** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y RPLS de nanopartículas de oro de diferentes geometrías: a) nanohexápodos, b) nanobarras y c) nanocajas; (imágenes obtenidas de(Wang et al., 2013)). D) Sintonización de la RPLS de nanobarras de oro variando su razón de aspecto (AR); imagen obtenida de (Huang et al., 2009).....6
- Figura 2:** a) Espectro de absorbancia b) imagen TEM de nanobarras con RPLS máxima en 846nm. c) Espectro de absorbancia y d) imagen TEM de las nanobarras con RPLS máxima a 761 nm. Imágenes obtenidas de (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019).8
- Figura 3:** Esquema de nanogeles termosensibles hechos mediante polimerización en emulsión sin tensoactivo con coraza de polietilenglicol para el suministro controlado de 5-Fluorouracil (5FU). Imagen obtenida de (González-Ayón et al., 2015).9
- Figura 4:** Esquema de un polimerosoma encapsulando nanobarras y el fármaco (DOX). La liberación del fármaco se da mediante la variación del pH o temperatura. Imagen adaptada de (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019).11
- Figura 5:** Representación esquemática de la aproximación cuasi-estática. El tamaño de la partícula es mucho menor a la longitud de onda del campo eléctrico incidente, por lo que éste último se considera uniforme sobre toda la partícula.16
- Figura 6:** Nanopartícula con geometría elipsoidal con centro en el eje coordenado.....16
- Figura 7:** Esquema de los ejes y los ángulos utilizados para las coordenadas esféricas usadas para el cálculo de Mie (imagen adaptada de (Calvillo Vázquez, 2020)).18
- Figura 8:** Esquemas de los pasos de la síntesis de nanobarras a) y b) generación de semillas y c) y d) crecimiento de semillas.27
- Figura 9:** Esquema del proceso de encapsulado para el método 1 (M1).28
- Figura 10:** Esquema del proceso de encapsulado para el método 2 (M2).29
- Figura 11:** Esquema de arreglo experimental para la caracterización térmica de las muestras.30
- Figura 12:** Arreglos para la caracterización óptica de nanopartículas para obtener a) Atenuancia y b) Absorbancia.31
- Figura 13:** Espectro de atenuancia de las nanobarras sintetizadas. a) con RPLS de 820nm a distintas concentraciones y b) con RPLS a 805nm.34
- Figura 14:** Caracterización térmica de las nanobarras de oro con RPLS a 805 y 820 nm. La irradiación se realizó durante 10 minutos con el diodo láser de 785 nm a 500 mW.....35

- Figura 15:** a) Imagen tomada por TEM de las nanobarras con RPLS en 805nm y b) gráfica de dispersión de tamaños de las nanobarras. En la adquisición de las imágenes se usó un voltaje de aceleración de 80kV y un tiempo de exposición de 2 segundos.....36
- Figura 16:** Caracterización óptica de las nanobarras de oro sintetizadas. a) Espectros obtenidos con el arreglo experimental de espectroscopia implementado. b) Espectros obtenidos numéricamente utilizando la aproximación cuasi-estática.....37
- Figura 17:** Imágenes de nanopartículas adquiridas comercialmente. a) nanoesferas de oro. b) nanoplacas de plata. Imagen proporcionada por el proveedor (Sigma-Aldrich).....38
- Figura 18:** Caracterización óptica de las nanoesferas obtenidas a) experimentalmente y b) numéricamente utilizando el cálculo de Mie.39
- Figura 19:** Caracterización óptica de las nanoplacas de plata obtenidas a) experimentalmente y b) numéricamente utilizando la aproximación cuasi-estática.40
- Figura 20:** Gráfica de la caracterización térmica de a) nanoplacas y b) nanoesferas a distintas concentraciones a lo largo de 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 21:** Caracterización térmica de las nanopartículas con distintas morfologías a una misma concentración de 0.25 mg/ml adquirido durante 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW.42
- Figura 22:** Gráfica de distribución de tamaños obtenida por DLS de los nanogeles antes del encapsulado.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 23:** a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido).44
- Figura 24:** a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido) después del proceso de liofilización y re-dispersión en agua destilada.45
- Figura 25:** a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) Imágenes TEM de los nanogeles cargados mediante el método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido).46
- Figura 26:** a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido) después del proceso de liofilización y re-dispersión en agua destilada.47
- Figura 27:** Gráfica de la caracterización térmica de las nanobarras y los nanogeles cargados con nanobarras a) a través del método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido) antes y después de la

liofilización y b) a través del método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido) previo y posterior a la liofilización a lo largo de 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW.....48

Capítulo 1. Introducción

Las nanopartículas metálicas, principalmente las compuestas de metales nobles, han sido ampliamente usadas debido a su potencial aplicación en diversas áreas tales como la nanotecnología, biología y la medicina, por mencionar algunas. De manera particular, las nanopartículas de oro y plata se han estudiado más ampliamente debido a sus propiedades únicas tanto ópticas como térmicas y que han sido aprovechadas en diversas aplicaciones, principalmente biológicas.

Cuando un gas está fuertemente ionizado, en estado de plasma, los portadores de carga libres pueden interactuar fácilmente con el campo electromagnético de la luz oscilando en resonancia con este último, produciéndose así un fenómeno vibratorio típico de los plasmas, conocido como “plasmón”. Aunque existen varios tipos de plasmones, los relevantes en esta tesis son los llamados plasmones localizados de superficie (PLS), que se deben a la excitación de resonancias en la oscilación colectiva de los electrones libres del metal que conforman las nanopartículas metálicas (Maier, 2007). Ópticamente, estas resonancias se manifiestan como picos de absorción en la luz transmitida por coloides con nanopartículas metálicas y son las responsables del color que adquieren las soluciones coloidales. Un claro ejemplo de este fenómeno se puede apreciar en los vitrales de las catedrales medievales, que deben su color a resonancias de nanopartículas metálicas embebidas en la matriz de vidrio (Sciau, 2012). Otro ejemplo de este fenómeno está presente en la legendaria copa de Licurgo fabricada en el siglo IV, la cual adquiere un tono rubí cuando es iluminada desde atrás (en transmisión) y verde cuando se ilumina frontalmente (en reflexión) (Barchiesi, 2015).

Las nanopartículas metálicas tienen la propiedad de convertir, bajo ciertas condiciones, la luz absorbida en energía térmica. A esto se le conoce como efecto fototérmico. Específicamente, la absorción asociada a la resonancia del PLS (que de aquí en adelante denominaremos RPLS) es la responsable de producir dichos efectos térmicos que pueden ser importantes (Baffou y Quidant, 2013; Govorov y Richardson, 2007; Herzog et al., 2014). De allí que las propiedades plasmónicas fototérmicas de las nanopartículas metálicas son de sumo interés, principalmente en las aplicaciones relacionadas con la terapia fototérmica, ya que es posible manipular el efecto fototérmico mediante una fuente de luz externa (Abadeer y Murphy, 2016; Huang et al., 2008; H. S. Kim y Lee, 2017; M. Kim et al., 2019). Dado que este efecto fototérmico se da principalmente en la zona circundante a la superficie de las nanopartículas, entonces resulta ser altamente localizado; por lo tanto, este puede usarse como una fuente eficiente de calor en regiones con dimensiones submicrométricas. Las nanopartículas metálicas se han utilizado, por ejemplo, para generar vapor (Neumann et al., 2013) y de mayor interés para esta tesis, para el tratamiento de cáncer (Ayala-Orozco

et al., 2014; Cole et al., 2009; Liu et al., 2017). En este tipo de aplicación es importante realizar un calentamiento localizado y selectivo, que no dañe a las células sanas, por lo que resulta importante sintonizar la RPLS a longitudes de onda en las que la absorción de los tejidos es baja. Convencionalmente, se han identificado dos ventanas biológicas que están separadas por una banda de absorción del agua.

La RPLS depende del material, tamaño y geometría de las nanopartículas. Existen nanopartículas con diferentes geometrías cuyas resonancias caen dentro del rango espectral que comprende la primera ventana biológica. Particularmente, se ha demostrado que la RPLS de nanopartículas de oro en forma de barras se puede sintonizar dentro de dicho rango espectral variando su razón de aspecto (longitud/diámetro) (Hinman et al., 2016; Mackey et al., 2014). Este tipo de nanopartículas han sido las más estudiadas y de mayor relevancia para la terapia fototérmica debido a la relativa facilidad de manipular su RPLS y a su eficiencia de conversión térmica (Hong et al., 2012; Huang et al., 2009; Pattani y Tunnell, 2012; Wang et al., 2013). En general, las nanobarras de oro presentan dos RPLS, la primera está asociado a su dirección transversal (~530 nm) y la segunda a la dirección longitudinal (600-1000 nm). Esta última es la más intensa y es sintonizable variando solamente su razón de aspecto.

Existen diversos métodos físicos y químicos de síntesis de nanopartículas metálicas. En el caso particular de las nanobarras de oro, el método químico más usado (y que se utilizará en esta tesis) es el crecimiento mediado por semillas (Jana et al., 2001; Nikoobakht y El-Sayed, 2003). Este método químico está basado en la síntesis de partículas de oro de alrededor de 2 nm denominadas "semillas", las cuales son colocadas en una solución de crecimiento cuya composición promueve el crecimiento anisotrópico de esas semillas para producir las nanobarras.

Por otro lado, en estudios recientes se ha demostrado que es posible administrar fármacos en regiones localizadas utilizando polimerosomas (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019) y nanogeles (Chacko et al., 2012; Langer, 1998; Raemdonck et al., 2009; Zha et al., 2011). Estos hidrogeles están formados por polímeros reticulados y sus tamaños son de decenas de nanómetros (Blackburn y Lyon, 2008; Soni et al., 2016). Estos son biocompatibles y tienen la habilidad de hincharse para encapsular fármacos, que posteriormente pueden ser liberados mediante la variación de pH o la temperatura. Para este trabajo de tesis serán relevantes los nanogeles sensibles a la temperatura cercana a la corporal (37 °C), la cual será la inducida por la absorción de luz de las nanopartículas encapsuladas. Recientemente, y como parte de una colaboración interinstitucional (CICESE e Instituto Tecnológico de Tijuana), se fabricaron polimerosomas y se probó su eficiencia de liberación de un fármaco mediante el incremento de temperatura inducida por la absorción de luz en nanobarras de oro (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019). Sin embargo, al probar estos

sistemas en células de cáncer no se obtuvieron los resultados esperados. Esto se debió, por un lado, a que los polímeros utilizados eran tóxicos, y por sí mismos mataban a las células y, por el otro, a que no se alcanzó la temperatura requerida para liberar el fármaco por la baja concentración de nanobarras. En este sentido, la motivación de este trabajo de tesis es, por un lado, realizar la síntesis de nanopartículas en forma de barras con una mayor concentración, así como su respectiva caracterización óptica y térmica y, por otro lado, realizar la evaluación de los efectos térmicos producidos por la absorción de luz en nanogeles cargados con las nanopartículas para su uso futuro en líneas celulares cancerígenas. Además, con la finalidad de identificar otras posibles geometrías de nanopartículas que pueden ser útiles para inducir los efectos térmicos deseados, se realiza la caracterización térmica de nanopartículas de diferentes geometrías con RPLS en el rango espectral de interés (700-900 nm) adquiridas comercialmente. Adicionalmente, se calculan las secciones transversales de absorción de estas geometrías de nanopartículas para estimar el incremento de temperatura esperado en estado estacionario (considerando nanopartículas aisladas).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Realizar estudios para optimizar efectos térmicos inducidos por la absorción de luz en nanopartículas, enfocados al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos en el tratamiento de cáncer.

1.1.2. Objetivos específicos

- Realizar la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica (700-950 nm), así como su caracterización óptica y térmica.
- Realizar la introducción de las nanopartículas fabricadas en nanogeles termosensibles para estudiar la respuesta termo-óptica de los nanogeles cargados con fármacos y nanopartículas.

1.2 Estructura de la tesis.

La tesis comprende seis capítulos y está organizada de la siguiente manera.

En el capítulo 1 se presenta una breve introducción sobre el uso y síntesis de nanopartículas de oro en forma de nanobastones para inducir efectos térmicos mediante la absorción de luz, enfocados al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos.

En el capítulo 2 se describen los antecedentes relacionados con este trabajo de tesis. De manera particular los efectos térmicos inducidos por nanopartículas metálicas, así como los nanogeles termosensibles usados para la administración de fármacos.

En el capítulo 3 se abordan los fundamentos teóricos relevantes para este trabajo, tales como la absorción de nanopartículas metálicas asociada a la RPLS para inducir efectos térmicos, los modelos usados para calcular las secciones transversales de absorción y esparcimiento de nanopartículas de diferentes geometrías y, finalmente, la estimación del incremento de temperatura en estado estacionario.

En el capítulo 4 se muestra la metodología experimental utilizada, la cual involucra la síntesis y cargado de las nanopartículas en nanogeles termosensibles, así como su caracterización térmica y óptica.

Los resultados obtenidos en este trabajo y su discusión se describen en el capítulo 5. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones de esta tesis.

Capítulo 2. Antecedentes

En este capítulo se describen de manera general los trabajos de investigación realizados y que anteceden a este trabajo de tesis. De manera particular, aquellos enfocados en el uso de nanopartículas metálicas para inducir efectos térmicos que son aprovechados para aplicaciones biomédicas, principalmente en terapia fototérmica. Asimismo, se muestran los trabajos que se han desarrollado en torno al uso de nanogeles termosensibles para el encapsulamiento y la administración dirigida y selectiva de fármacos para el tratamiento de cáncer.

2.1 Uso de nanopartículas para inducir efectos térmicos

El brillo característico de los metales, así como sus propiedades de conducción térmica y eléctrica, se deben a la presencia de electrones libres en el material. Un ejemplo de esto se puede encontrar en los vitrales de las catedrales medievales, que deben su color a resonancias de nanopartículas metálicas embebidas en la matriz de vidrio. Estas resonancias se conocen como RPLS. Si bien, este fenómeno ya se presentaba desde entonces, no se comprendía bien el origen físico del mismo. No fue sino hasta 1908 cuando Gustav Mie (Mie, 1908) mostró por primera vez que al interactuar la luz con nanopartículas metálicas se da una oscilación colectiva coherente de los electrones libres del metal y en resonancia con el campo electromagnético de la luz.

La absorción asociada a la RPLS produce efectos térmicos importantes. Estos efectos térmicos son debido a las oscilaciones colectivas de las ondas elásticas que se propagan a través del material producto de las colisiones entre los electrones foto excitados y los fonones de la red cristalina del metal de la nanopartícula (Brongersma et al., 2015; Link y El-Sayed, 2000). Muchos metales tales como el oro, plata, cobre, aluminio, níquel, litio y paladio presentan fuertes RPLS dependiendo de la longitud de onda de la luz incidente (Le Ru y Etchegoin, 2008). Sin embargo, para aplicaciones de terapia fototérmica, principalmente las enfocadas al tratamiento de cáncer, en donde se requiere realizar un calentamiento localizado, selectivo y que además no dañe a las células sanas, es importante tener una RPLS de las nanopartículas en longitudes de onda en las que la absorción de los tejidos sea baja. La primera ventana es la más utilizada para dicho propósito por tener baja absorción en el infrarrojo cercano (700- 950 nm)

Aunque nanopartículas de metales como el litio, cobre y plata presentan resonancias plasmónicas en la región visible e infrarrojo cercano, estas no son las más adecuadas para aplicaciones biomédicas fototérmicas. El litio, por ejemplo, es altamente reactivo y el cobre presenta problemas de inestabilidad y toxicidad (Rycenga et al., 2011). La plata, por su parte, tiene una alta conductividad eléctrica y térmica y en principio puede utilizarse para aplicaciones fototérmicas (Wei et al., 2015; Wiley et al., 2007). Sin embargo, las nanoestructuras de plata en altas concentraciones resultan ser tóxicas debido a la alta liberación de iones Ag^+ (Wei et al., 2015).

Las nanopartículas de oro han resultado ser las más adecuadas en terapia fototérmica ya que, además de presentar una alta eficiencia de conversión térmica debido a la absorción asociada a su RPLS, tienen una alta estabilidad química/biológica y una reducida toxicidad en tejido biológico. Además, debido a sus propiedades químicas particulares, permiten su funcionalización con diversos ligandos biológicos tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y anticuerpos, entre otros (Giljohann et al., 2010). Otra ventaja de estas nanopartículas es que su RPLS puede ser sintonizable en la primera ventana biológica simplemente variando parámetros físicos tales como su tamaño y geometría. Ejemplo de estas nanopartículas son aquellas con geometrías en forma de nanoesferas, nanocajas, nanoestrellas y nanobarras, entre otros (Hwang et al., 2014; Wang et al., 2013). En la Figura 1 se muestran las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la RPLS de algunas de estas geometrías de nanopartículas.

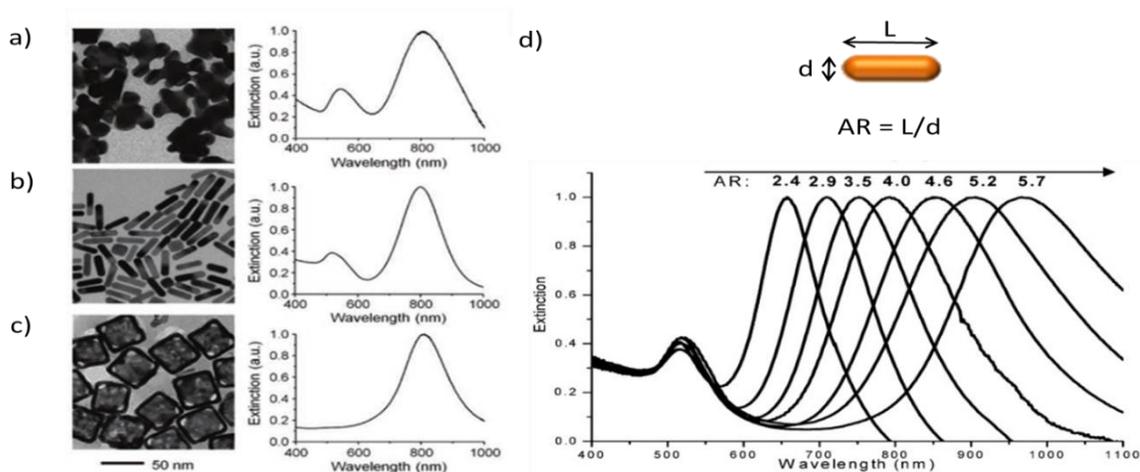


Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y RPLS de nanopartículas de oro de diferentes geometrías: a) nanohexápodos, b) nanobarras y c) nanocajas; (imágenes obtenidas de (Wang et al., 2013)). D) Sintonización de la RPLS de nanobarras de oro variando su razón de aspecto (AR); imagen obtenida de (Huang et al., 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, las nanobarras (o “nanorods”) de oro presentan dos resonancias plasmónicas: una transversal y la otra longitudinal. La resonancia correspondiente a la dirección transversal está alrededor de 530 nm; mientras que la asociada a la dirección longitudinal puede darse en el rango espectral de 650-1000 nm dependiendo de su razón de aspecto (longitud/diámetro)(Huang et al., 2009). Conforme aumenta la razón de aspecto, la resonancia asociada a la dirección longitudinal se desplaza hacia longitudes de onda del infrarrojo cercano (ver Figura 1d). La absorción asociada a esta última resonancia, que resulta ser la más eficiente, es la más adecuada para terapia fototérmica ya que las longitudes de onda en el infrarrojo tienen una mayor penetración en tejidos biológicos. Es importante mencionar que para usar las nanobarras de oro en este tipo de aplicación, estos generalmente son funcionalizados. Esto es debido a que en su síntesis se utiliza usualmente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés), que es un surfactante catiónico que puede ser altamente tóxico. En este sentido, se han desarrollado diversas estrategias para funcionalizar la superficie de este tipo de nanopartículas. De manera particular, se ha utilizado polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés) que es un polímero biocompatible y ha resultado ser altamente eficiente para aplicaciones *in vivo* (Akiyama et al., 2009; Niidome et al., 2006).

Existen diversos trabajos enfocados en el estudio y uso de nanobarras de oro para terapia fototérmica (Ali et al., 2017; Choi et al., 2012; Dickerson et al., 2008; Okuno et al., 2013; Singh et al., 2016; Xia et al., 2015). Dentro de los principales retos en este tipo de aplicación se encuentra el transporte y entrega selectiva de las nanopartículas a las regiones o células de interés para inducir el calentamiento fototérmico necesario para producir el daño requerido. En este sentido, se han utilizado diversos sistemas de transporte funcionales en los cuales se encapsulan las nanopartículas y fármacos para su transportación y posterior liberación. Un ejemplo de estos sistemas, que en su mayoría están hechos de polímeros biocompatibles, son las micelas (Zhong et al., 2013), los polimerosomas (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019) y los nanogeles (Maya et al., 2013).

Recientemente, y como parte de una colaboración interinstitucional (CICESE e Instituto Tecnológico de Tijuana), se sintetizaron nanobarras de oro con una RPLS máxima en 846 y 761 nm (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019) (ver Figura 2). Se realizaron experimentos *in vitro* de encapsulamiento de estas nanopartículas en polimerosomas termosensibles y de la liberación del fármaco doxorubicina (DOX) mediante el incremento de temperatura inducida por la absorción de luz. Sin embargo, al probar estos sistemas en células de cáncer no se obtuvieron los resultados esperados. Esto se debió, por un lado, a que los polímeros utilizados eran tóxicos, y por sí mismos mataban a las células y, por el otro, a que no se alcanzó la temperatura requerida para liberar el fármaco por la baja concentración de nanobarras.

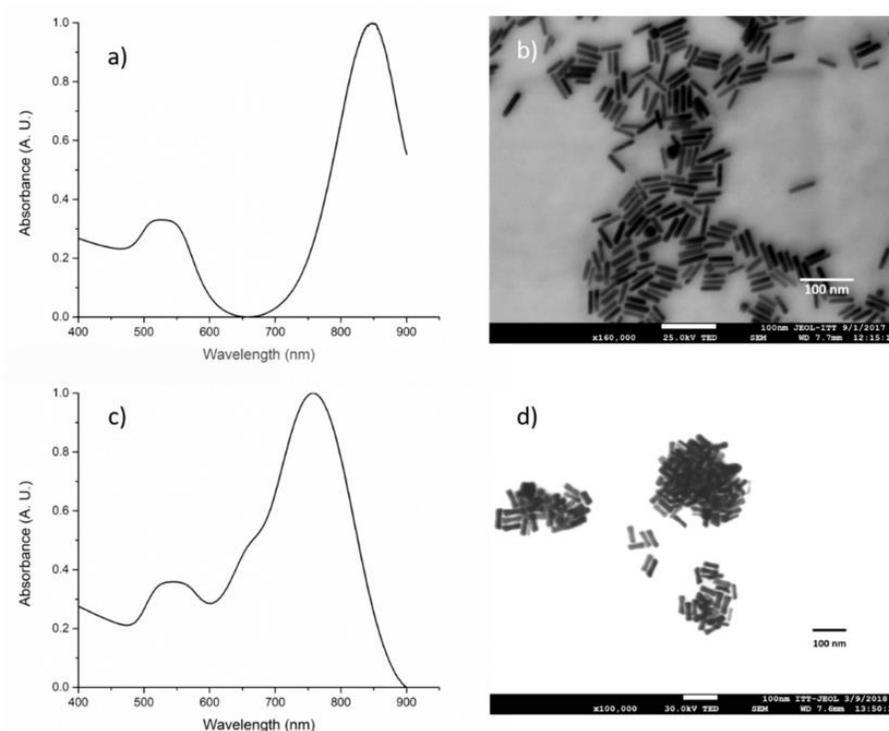


Figura 2: a) Espectro de absorbancia b) imagen TEM de nanobarras con RPLS máxima en 846nm. c) Espectro de absorbancia y d) imagen TEM de las nanobarras con RPLS máxima a 761 nm. Imágenes obtenidas de (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019).

2.2 Nanogeles termosensibles para la administración de fármacos

Los nanogeles son hidrogeles cuyos tamaños son de decenas de nanómetros y están formados por polímeros reticulados. Son diversas las propiedades que hacen a los nanogeles muy atractivos para el transporte y entrega de fármacos para diversas aplicaciones, en particular las enfocadas al tratamiento de cáncer. Estos son biocompatibles, biodegradables y tienen la habilidad de hincharse para encapsular fármacos, que posteriormente pueden ser liberados mediante la variación de pH o la temperatura. Además, su superficie puede funcionalizarse para que sean afines a moléculas específicas para optimizar la administración dirigida de dichos fármacos. Los materiales usados para su fabricación pueden ser tanto polímeros naturales (tales como la ovoalbúmina o quitosano) así como sintéticos (polietilenglicol, por ejemplo). Una característica importante de los nanogeles es que la parte interna (núcleo) es hidrofóbica mientras que su parte externa (coraza) es hidrofílica. Esto permite el encapsulamiento de fármacos insolubles en agua y los protege de su interacción con fluidos biológicos circundantes o externos

(González-Ayón et al., 2015; Maya et al., 2013). La hidrofiliidad de los nanogeles hace que estos se dispersen fácilmente en medios acuosos como puede ser el torrente sanguíneo, por ejemplo.

La liberación del fármaco encapsulado en los nanogeles puede darse mediante diferentes estímulos externos tales como la aplicación de un campo magnético (Sivaram et al., 2015), potencial redox (Bae et al., 2012), variación de pH (Arunraj et al., 2013) y temperatura (González-Ayón et al., 2015; Maya et al., 2013). Los que responden a la variación de temperatura se les conoce como nanogeles termosensibles (González-Ayón et al., 2015). Los de interés para los objetivos de esta tesis son los sensibles a la temperatura cercana a la corporal (37 °C).

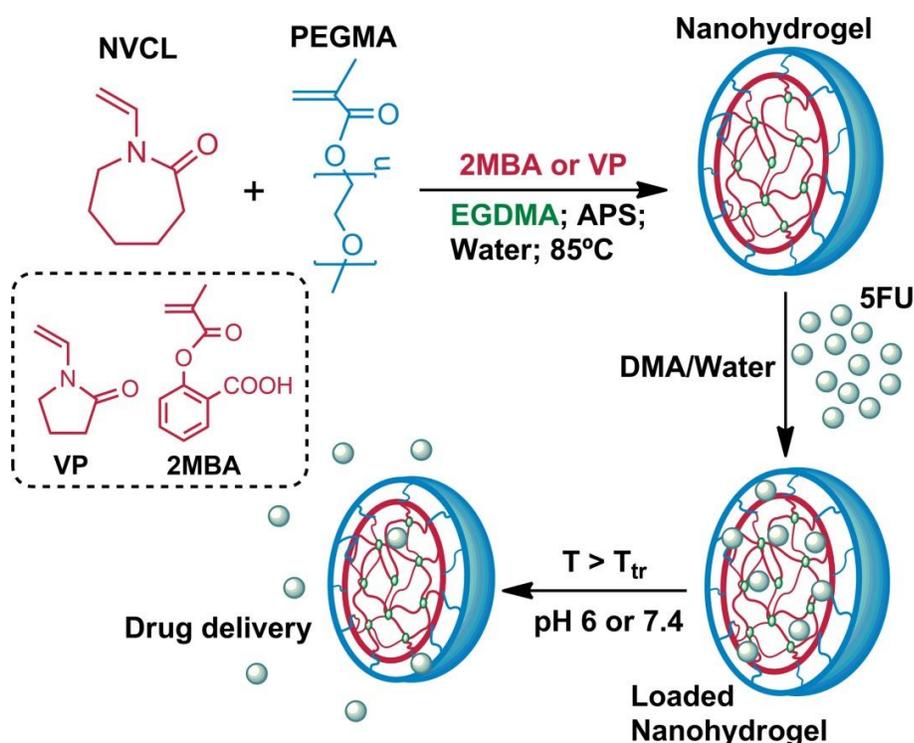


Figura 3: Esquema de nanogeles termosensibles hechos mediante polimerización en emulsión sin tensoactivo con coraza de polietilenglicol para el suministro controlado de 5-Fluorouracil (5FU). Imagen obtenida de (González-Ayón et al., 2015).

Se han reportado nanogeles sensibles a la temperatura basados en N-isopropilacrilamida (NIPAAm) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Serrano-Medina et al., 2018; Shang et al., 2013; Su et al., 2013). Por otro lado, los nanogeles sensibles al pH basados en N,N-dietilaminoetil metacrilato (DEAEM), muestran también sensibilidad a la temperatura a ciertos valores de pH cercanos a los valores fisiológicos (Pikabea

et al., 2014), así como basados en N-vinilcaprolactama (NVCL) como se muestra en la Figura 3, donde se presenta el proceso de síntesis del nanogel con NVCL, Polietilenglicol metacrilato (PEGMA), N-vinilpirrolidona (VP) y ácido 2-metacrililoiloxibenzoico (2 MBA), el cual presenta una morfología de núcleo-coraza donde el núcleo es hidrofóbico basado en NVCL-2 MBA y la coraza hidrofílica compuesta por PEGMA, el nanogel se carga con un fármaco 5-fluorouracil (5FU), una droga para el cáncer, la cual puede ser liberada del nanogel a través de dos procesos, ya sea un cambio en la temperatura o el pH (González-Ayón et al., 2015)

Otros sistemas que se utilizan para la ministración de fármacos son los polimerosomas; estos, al igual que los nanogeles, están compuestos de polímeros reticulados. Actualmente, existe un gran interés en este tipo de sistemas ya que su estructura es muy análoga a la de organelos vivos y a los liposomas. Como parte de la colaboración con el Instituto Tecnológico de Tijuana, se fabricaron polimerosomas y se probó su eficiencia de liberación del fármaco DOX mediante el incremento de temperatura inducida por la absorción de luz en nanobarras de oro (DíazDuarte-Rodríguez et al., 2019). Los polimerosomas que se obtuvieron (con diámetros entre 100 y 200 nm) fueron hechos de los copolímeros polietilenglicol-*b*-poly N,N-dietilaminoetil metacrilato (PEG-*b*-PDEAEM). Estos polímeros, debido a sus propiedades fisicoquímicas, son sensibles tanto a la variación de pH, así como a la temperatura. En este trabajo se lograron encapsular (en los polimerosomas) nanobarras de oro y el fármaco DOX con una buena eficiencia. Se realizaron experimentos *in vitro* de la liberación de DOX bajo diferentes condiciones de variación de pH e incremento de temperatura, esta última inducida por la absorción de luz debida a la RPLS de las nanobarras de oro. De manera particular, se demostró que la liberación de DOX fue más rápida y eficiente cuando se tiene un pH de 7.4 y se induce el calentamiento fototérmico mediante irradiación láser en el infrarrojo cercano (808 nm). El rango de incremento de temperatura que se logró al irradiar los polimerosomas cargados fue de entre 17 y 24 °C por encima de la temperatura ambiente. En la Figura 4 se muestra el esquema de un polimerosoma encapsulando nanobarras y un fármaco (DOX), el cual puede ser liberado a través de dos distintos procesos, el primer proceso (ver parte superior derecha) consiste en cambiar el pH del medio del polimerosoma esto provoca un hinchamiento mediante el cual el fármaco es liberado. El segundo proceso (ver parte inferior izquierda) consiste en irradiar el polimerosoma con luz de la longitud de onda cercana a la cual las nanobarras presentan su pico de absorción, dicha irradiación genera un aumento en la temperatura de lo que rodea las nanopartículas, el aumento en la temperatura produce que los polimerosomas se contraen liberando así el fármaco encapsulado.

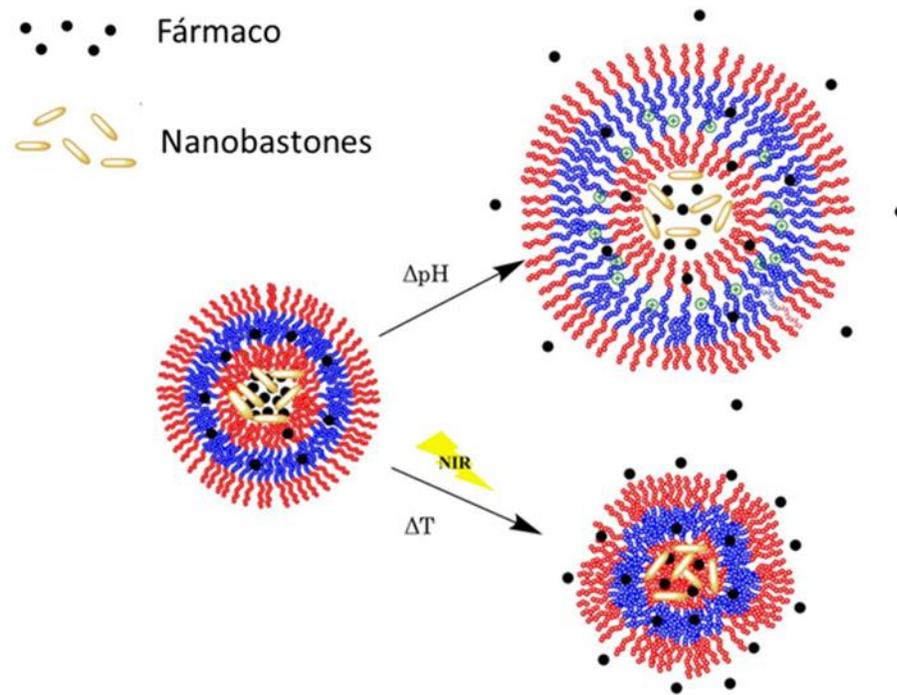


Figura 4: Esquema de un polimerosoma encapsulando nanobarras y el fármaco (DOX). La liberación del fármaco se da mediante la variación del pH o temperatura. Imagen adaptada de (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019).

Cabe mencionar que para este proyecto serán relevantes los sistemas sensibles a la temperatura cercana a la corporal (37 °C), la cual será modificada por la absorción de luz de las nanopartículas encapsuladas. Así, por ejemplo, en estos sistemas termosensibles un calentamiento inducido ópticamente cercano a los 37 °C puede liberar el fármaco; mientras que con una dosis adecuada de irradiación con la que se alcancen temperaturas superiores a los 43 °C, se puede causar daño térmico dirigido y localizado en células específicas. Es decir, se trata de un “arma selectiva” de doble acción que puede utilizarse en el tratamiento contra el cáncer de tumores sólidos.

Como ya se mencionó anteriormente, los polimerosomas fabricados resultaron tener una buena eficiencia de liberación del fármaco al incrementar la temperatura debido a la absorción de luz en las nanobarras de oro. Sin embargo, al probar estos sistemas en células de cáncer no se obtuvieron los resultados esperados. Esto se debió, por un lado, a que los polímeros utilizados eran tóxicos, y por sí mismos mataban a las células y, por el otro, a que no se alcanzó la temperatura requerida para liberar el fármaco por la baja concentración de nanobarras.

Capítulo 3. Marco Teórico.

Las propiedades ópticas de los metales dependen fuertemente del movimiento espacial de los electrones que los constituyen. Cuando la dimensión de los materiales metálicos es menor a la longitud de onda de la luz incidente, el confinamiento espacial del movimiento de los electrones da lugar a nuevas propiedades ópticas que son muy diferentes de aquellas que se dan en el material en bulto.

En este capítulo se abordan los fundamentos teóricos relevantes para este trabajo tales como: la absorción de nanopartículas metálicas asociada a la RPLS para inducir efectos térmicos; los modelos usados para calcular las secciones transversales de absorción y esparcimiento de nanopartículas de diferentes geometrías y, finalmente, la estimación del incremento de temperatura en estado estacionario.

3.1 Propiedades ópticas de nanopartículas metálicas

Ya se ha mencionado que cuando una nanopartícula metálica con dimensiones menor es a la longitud de onda (1-100 nm) es iluminada con una onda electromagnética, los electrones libres de la superficie se excitan y generan un desplazamiento de la nube electrónica con respecto al núcleo, es decir, que se da una separación de cargas. Este desplazamiento electrónico produce una fuerza de restauración tipo coulombiana entre las cargas negativas y positivas, lo cual genera una oscilación de la nube electrónica dando como resultado un plasmón localizado de superficie. De allí que un PLS no es más que una oscilación colectiva coherente de los electrones libres del metal que conforman la nanopartícula y que se da en la interfaz metal/dieléctrico. En la condición de RPLS, los PLS experimentan dos procesos de decaimiento. El primero es un decaimiento radiativo, en el cual se emiten fotones a la misma frecuencia que la luz incidente (esparcimiento); el segundo es un decaimiento no radiativo el cual se da por una interacción entre los electrones fotoexcitados con los fonones de la red cristalina del material (absorción). Ambos procesos, esparcimiento y absorción, asociados a la RPLS dependen fuertemente de las propiedades físicas de las nanopartículas como son: tamaño, geometría, composición y propiedades dieléctricas del metal; también depende del medio circundante en el cual se encuentren inmersas las nanopartículas. El esparcimiento de nanopartículas se utiliza comúnmente como mecanismo de contraste para generar imágenes, esto se ha utilizado en aplicaciones de microscopía de campo oscuro, por ejemplo. Por su parte, el proceso de absorción, que es el de interés para esta tesis, se ha utilizado principalmente para

inducir efectos térmicos localizados que resultan importantes en aplicaciones de terapia fototérmica, principalmente las enfocadas al tratamiento de cáncer.

Las propiedades ópticas más importantes para la descripción de la respuesta óptica de las nanopartículas metálicas en presencia de un campo electromagnético son las secciones transversales de absorción (C_{abs}), esparcimiento (C_{sca}), definidas en términos de las potencias esparcida y absorbida por la partícula. Definimos entonces

$$C_{abs} = \frac{P_{abs}}{I_0}, \quad (1a)$$

$$C_{sca} = \frac{P_{sca}}{I_0}, \quad (1b)$$

$$C_{ext} = \frac{P_{ext}}{I_0}, \quad (1c)$$

donde I_0 es la irradiancia de la luz incidente (potencia por unidad de área), P_{abs} , P_{sca} y P_{ext} ($P_{abs} + P_{sca}$) son las potencias de absorción, esparcimiento y extinción, respectivamente. Además, se tiene que la sección transversal de extinción está dada por la suma de las secciones transversales de absorción y de esparcimiento ($C_{ext} = C_{abs} + C_{sca}$). Estas secciones transversales se pueden interpretar como las secciones transversales efectivas presentadas por la partícula ante la luz.

Por otro lado, considerando la sección transversal geométrica (G) de la nanopartícula, se pueden definir las eficiencias de extinción (Q_{ext}), absorción (Q_{abs}) y esparcimiento (Q_{sca}) (Bohren & Huffman, 2008).

$$Q_{ext} = \frac{C_{ext}}{G}, \quad (2a)$$

$$Q_{abs} = \frac{C_{abs}}{G}, \quad (2b)$$

$$Q_{sca} = \frac{C_{sca}}{G}. \quad (2c)$$

Vale la pena resaltar que en resonancia estas eficiencias pueden ser mucho mayores que uno. También se tiene que hablar sobre la distribución angular de la intensidad de luz esparcida $\mathcal{J}(\theta_s, \varphi_s)$, esta nos permite expresar el potencial de la luz esparcida en total como

$$P_s = \int_{4\pi} \mathcal{J}(\theta_s, \varphi_s) d\Omega. \quad (3)$$

donde θ_s y φ_s son los ángulos polar y azimutal de esparcimiento respectivamente, y $d\Omega$ la diferencial de ángulo sólido. Así normalizando esta ecuación y utilizando la ecuación (1c) se puede escribir como

$$\int_{4\pi} p(\theta_s, \varphi_s) d\Omega = 1, \quad (4)$$

donde

$$p(\theta_s, \varphi_s) = \frac{\mathcal{J}(\theta_s, \varphi_s)}{I_0 C_{sca}}, \quad (5)$$

en donde $p(\theta_s, \varphi_s)$ se conoce como la función de fase que al estar normalizada se puede interpretar como una función de densidad de probabilidad que determina la probabilidad de la luz esparcida como función de los ángulos polar y azimutal sobre el ángulo sólido (Bohren y Huffman, 2008).

Otra propiedad importante para las partículas es el parámetro de anisotropía g , el cual se puede escribir como

$$g = \int_{4\pi} p(\theta_s, \varphi_s) \cos\theta_s d\Omega, \quad (6)$$

la cual es una integral sobre toda la esfera. Si la partícula esparce más luz hacia adelante, entonces $g > 0$, si esparce más hacia atrás (hacia la fuente), entonces $g < 0$. Si toda la luz es esparcida en la dirección de incidencia $g = 1$, en caso contrario $g = -1$ y si el esparcimiento es isótropo $g = 0$ (Calvillo Vázquez, 2020).

Así pues, el problema de esparcimiento de luz por partículas se describe a través de la interacción de estas con un campo electromagnético, por lo que la solución a dicho problema se encuentra en las ecuaciones de Maxwell, que en el caso de ondas monocromáticas se escribe de la forma:

$$\nabla \cdot \mathbf{D}(\mathbf{r}, \omega) = \rho(\mathbf{r}, \omega), \quad (7a)$$

$$\nabla \times \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = i\omega \mathbf{B}(\mathbf{r}, \omega), \quad (7b)$$

$$\nabla \times \mathbf{H}(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{J}(\mathbf{r}, \omega) - i\omega \mathbf{D}(\mathbf{r}, \omega), \quad (7c)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B}(\mathbf{r}, \omega) = 0. \quad (7d)$$

Las cuales se encuentran complementadas por las ecuaciones constitutivas que describen la respuesta del material, la densidad de corriente eléctrica (\mathbf{J}) y el vector de desplazamiento eléctrico (\mathbf{D}) con el campo eléctrico (\mathbf{E}) y el vector de inducción magnética (\mathbf{B}) con el campo magnético (\mathbf{H}). Es decir $\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E}$, $\mathbf{D} = \epsilon \mathbf{E}$ y $\mathbf{B} = \mu \mathbf{H}$ donde σ , μ y ϵ son la conductividad, permeabilidad magnética y la permitividad eléctrica. Estos coeficientes dependen del material y de la frecuencia de la onda electromagnética. En un medio lineal y homogéneo, estos parámetros son independientes de la posición y si el material es además isotrópico, no dependen de la dirección del campo eléctrico.

Si tomamos las ecuaciones de Maxwell para ondas monocromáticas (7a-7d) es posible mostrar que, en regiones libres de fuentes externas, los campos eléctrico y magnético satisfacen ecuaciones de Helmholtz homogéneas. Por ejemplo, si suponemos un espacio sin fuentes, aplicamos rotacional a la ecuación (7c) y la combinamos con la (7a) se obtiene para el campo eléctrico:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + k^2 \mathbf{E} = 0, \quad (8)$$

y análogamente para el campo magnético se tiene que

$$\nabla^2 \mathbf{H} + k^2 \mathbf{H} = 0, \quad (9)$$

donde $k^2 = \epsilon \mu \frac{\omega^2}{c^2}$ es el número de onda.

Así pues, el problema de esparcimiento por partículas consiste en encontrar soluciones para las ecuaciones de Helmholtz que coincidan con las condiciones de frontera para los campos electromagnéticos, y con esto describir las propiedades de extinción, absorción y esparcimiento de la partícula (Calvillo Vázquez, 2020).

3.1.1 Aproximación cuasi-estática.

Esta aproximación consiste en considerar a las partículas de un tamaño mucho menor a la longitud de onda del campo eléctrico incidente de manera que el campo se considera uniforme sobre toda la partícula como se muestra en la Figura 5, donde se puede observar que el campo incidente genera el movimiento

de las cargas dentro de la partícula creando un polo negativo y uno positivo, por lo la polarizabilidad se puede determinar a través de un cálculo electrostático. Para esto se considera que el campo aplicado induce un momento dipolar el cual es proporcional al campo eléctrico incidente, en nuestro caso será interesante calcular el caso de elipsoides (Figura 6) que pueden aproximar los resultados de barras y placas. Considerando que el campo aplicado coincide con alguno de los ejes de la elipse, se tiene que el momento dipolar incidente, $\mathbf{p}_j = \epsilon_m \alpha_j \mathbf{E}_{0j}$, donde la polarizabilidad (α_j) estaría asociada a los semiejes a , b , c del elipsoide como se muestra en la Figura 6.

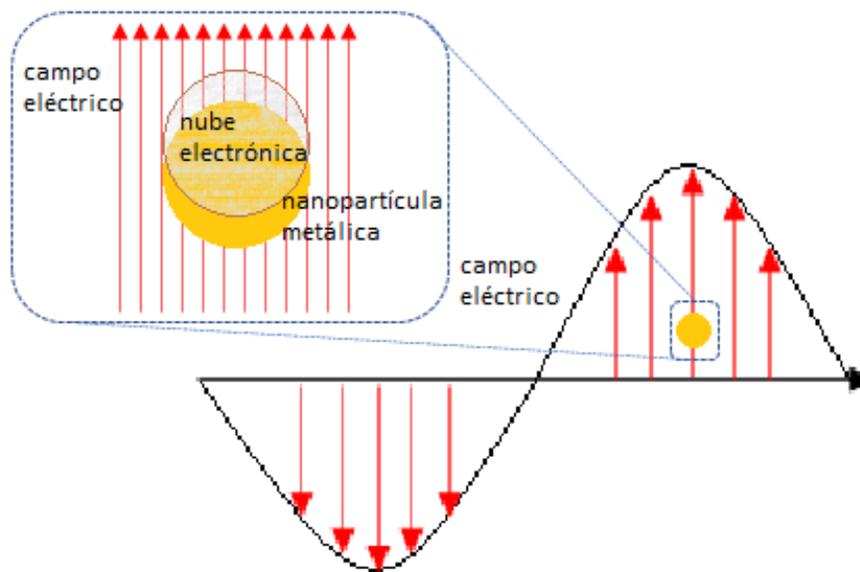


Figura 5: Representación esquemática de la aproximación cuasi-estática. El tamaño de la partícula es mucho menor a la longitud de onda del campo eléctrico incidente, por lo que éste último se considera uniforme sobre toda la partícula.

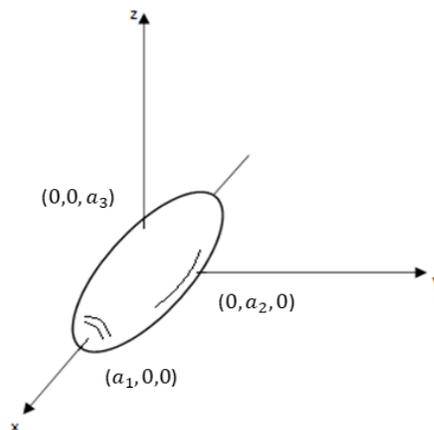


Figura 6: Nanopartícula con geometría elipsoidal con centro en el eje coordenado.

En este caso se tiene que la polarizabilidad está dada como: (Bohren y Huffman, 2008)

$$\alpha_n = 4\pi a_1 a_2 a_3 \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{3\epsilon_m + 3L_n(\epsilon_p - \epsilon_m)} \quad (10)$$

donde ϵ_p y ϵ_m son las constantes dieléctricas de la partícula y el medio, respectivamente y L_j es un parámetro geométrico definido como

$$L_j = \frac{a_1 a_2 a_3}{2} \int_0^\infty \frac{dq}{(a_j^2 + q)f(q)} \quad (11)$$

en donde el factor depende de una integral sobre cada punto de carga q sobre la superficie y siendo n la distancia de las partículas al centro para cada uno de los ejes x , y y z .

$$f(q) = \{(q + a^2)(q + a_2^2)(q + a_3^2)\}^{\frac{1}{2}}, \quad (12)$$

así se puede ver que otras geometrías pueden representarse como casos especiales del elipsoide, Las secciones transversales pueden expresarse en términos de la polarizabilidad de la nanopartícula como

$$C_{ext}^{(j)} = kIm\{\alpha_j\}, \quad (14a)$$

$$C_{sca}^{(j)} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha_j|^2, \quad (14b)$$

$$C_{abs}^{(j)} = C_{ext}^{(j)} - C_{sca}^{(j)}. \quad (14c)$$

Para el caso más general de una partícula con geometría elipsoidal, es decir, al sustituir la ecuación (10) en las ecuaciones (14a) y (14b) se tiene que

$$C_{ext}^{(j)} = 4\pi a_1 a_2 a_3 kIm\left\{\frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{3\epsilon_m + 3L_n(\epsilon_p - \epsilon_m)}\right\}, \quad (15a)$$

$$C_{sca}^{(j)} = \pi a_1 a_2 a_3 \frac{8}{3} k^4 \left| \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{3\epsilon_m + 3L_n(\epsilon_p - \epsilon_m)} \right|^2, \quad (15b)$$

Para el caso particular de una partícula esférica se tiene que $a_1 = a_2 = a_3$, y $L_1 = L_2 = L_3 = \frac{1}{3}$, por lo tanto, la polarizabilidad está dada por:

$$\alpha = 4\pi a^3 \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m}. \quad (13)$$

con lo que, las secciones transversales se pueden expresar de la forma

$$C_{ext} = \pi a^2 4x \operatorname{Im} \left\{ \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \right\}, \quad (16a)$$

$$C_{sca} = \pi a^2 \frac{8}{3} x^4 \left| \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \right|^2, \quad (16b)$$

donde $x = ka$ representa el parámetro de tamaño de la partícula.

De estas expresiones se puede ver que para partículas muy pequeñas ($x \ll 1$), el esparcimiento es despreciable y la extinción está dominada por los efectos de absorción.

3.1.2 Cálculo de Mie.

Para el caso de partículas más grandes, se utiliza el procedimiento analítico implementado por Mie en 1908, el cual en principio es válido para esferas de cualquier tamaño e índice de refracción. El desarrollo analítico se encuentra descrito a detalle en varios artículos y libros tales como (Bohren y Huffman, 2008; Cooke y Kerker, 1969), por lo que aquí solamente se presenta de manera general dicho desarrollo para llegar a las expresiones que son utilizadas en los cálculos de nuestro interés.

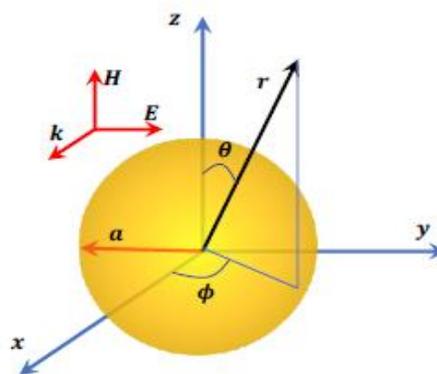


Figura 7: Esquema de los ejes y los ángulos utilizados para las coordenadas esféricas usadas para el cálculo de Mie (imagen adaptada de (Calvillo Vázquez, 2020)).

Para una solución formal se utiliza el caso de una nanopartícula esférica de radio “ a ” con una permitividad eléctrica $\epsilon_p(\omega)$, inmersa en un medio isotrópico no absorbente ϵ_m . Se supone la esfera situada en el origen del sistema coordenado y es iluminada con una onda plana ($\mathbf{E}_0 = E_0 e^{ikx} \hat{e}_y$) polarizada a lo largo del eje y y viajando en la dirección x como se muestra en la Figura 7.

Para resolver este problema se busca la solución a las ecuaciones de Helmholtz vectoriales (8) y (9) para los campos \mathbf{E} y \mathbf{H} en coordenadas esféricas. Para reducir el problema es conveniente plantearlo en términos de soluciones de la ecuación de onda en forma escalar. Para lo cual se define una función escalar arbitraria ψ de la cual se derivan funciones vectoriales que cumplen con todas las propiedades requeridas para los campos electromagnéticos. Además de esto, se cumple que, si la función escalar satisface la ecuación de onda escalar, también lo harán las funciones vectoriales derivadas de ella. Procediendo de esta manera, el problema se reduce entonces a encontrar una solución de la ecuación de onda escalar que satisfaga las condiciones del problema. Entonces se llega a que las secciones transversales de absorción y esparcimiento para esferas de cualquier material están dadas por las siguientes expresiones (Bohren y Huffman, 2008)

$$C_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \Re\{a_n + b_n\}, \quad (17a)$$

$$C_{sca} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (17b)$$

donde a_n y b_n son coeficientes definidos por

$$a_n = \frac{m\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)\psi'_n(mx)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - \xi_n(x)\psi'_n(mx)}, \quad (18)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx)\psi'_n(x) - m\psi_n(x)\psi'_n(mx)}{\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi_n(x)\psi'_n(mx)}, \quad (19)$$

donde $\psi_n(x)$ y $\xi_n(x)$ son las funciones de Ricatti-Bessel, $x = ka = nka$ es el parámetro de tamaño y $m = n_p/n_m$ es el índice de refracción de la partícula (n_p) en relación del medio (n_m).

3.1.3 Modelos para la función dieléctrica.

Para describir las propiedades ópticas de los metales se puede utilizar el modelo del gas de electrones libres o modelo de Drude, el cual considera que cerca del nivel de Fermi los electrones dentro del metal pueden ser excitados a otro nivel de energía por fotones con niveles muy bajos de energía, esto se considera básicamente un electrón libre. De esta manera, la respuesta óptica de una colección de electrones libres se puede obtener del modelo del oscilador armónico de Lorentz, obteniéndose que la función dieléctrica sería de la forma (Bohren y Huffman, 2008):

$$\epsilon = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega}, \quad (20)$$

donde $\omega_p^2 = N_e e^2 / \epsilon_0 m_e$ es la frecuencia natural de oscilación del gas de electrones o frecuencia de plasma y N_e el número de electrones, m_e la masa efectiva del electrón y γ_0 es la constante de amortiguamiento, que para el caso clásico del modelo que se describe se debe al esparcimiento de los electrones por su interacción con fonones, electrones, defectos de la red o impurezas. En este caso (Calvillo Vázquez, 2020).

$$\gamma_0 = \frac{v_F}{l_\infty}, \quad (21)$$

donde v_F es la velocidad de Fermi y l_∞ es la trayectoria libre media de los electrones de conducción en bulto.

Sin embargo, aunque el modelo de Drude describe bien la respuesta óptica de los metales a frecuencias mucho menores que la frecuencia de plasma $\omega \ll \omega_p$. Para frecuencias mayores, como el visible y el ultravioleta, el modelo pierde precisión debido a las transiciones intrabanda, introduciendo correcciones en la ecuación de movimiento para el electrón ligado, se llega al modelo llamado de Drude-Lorentz. Se tiene entonces que

$$m_e \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + m_e \gamma_0 \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} + m_e \omega_0^2 \mathbf{r} = -e \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}, \quad (22)$$

y que la función dieléctrica es de la forma

$$\epsilon(\omega) = 1 + \frac{\omega_p^2}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma_0\omega}, \quad (23)$$

3.1.4 Consideraciones en los cálculos teóricos de las propiedades ópticas.

El cálculo teórico de la absorbancia y atenuancia de las nanopartículas con diferentes geometrías se realizó con una versión modificada del programa encontrado en (Bohren y Huffman, 2008). Para el caso de nanoesferas se utilizó el cálculo de Mie, mientras que para las nanoplacas y nanobarras se utilizó el modelo cuasi-estática. El programa original está desarrollado para obtener las secciones transversales de absorción y extinción a partir de la polarizabilidad de la nanopartícula (ecuaciones 15a y 15b). La modificación al programa se realizó exclusivamente en la sección que corresponde al tipo de geometría de la nanopartícula. Por lo tanto, para las nanoplacas y nanobarras se consideró una geometría elipsoidal. Para calcular la absorbancia (A) y atenuancia (D) a partir de las secciones transversales de absorción (C_{abs}) y extinción (C_{ext}), se utilizaron las siguientes expresiones:

$$A = \frac{1}{\ln 10} \frac{C}{\rho_m V_m} C_{abs} L, \quad (24a)$$

$$D = \frac{1}{\ln 10} \frac{C}{\rho_m V_m} C_{ext} L, \quad (24b)$$

donde C es la concentración de nanopartículas (mg/mL), ρ_m la densidad del material, V_p el volumen de la nanopartícula y L la longitud de la cubeta de cuarzo donde está contenida la solución de nanopartículas.

Cabe mencionar que en estos cálculos se consideró la corrección de la función dieléctrica determinada con el modelo de Drude-Lorentz.

3.2 Incremento de temperatura debido a la absorción en las nanopartículas.

Cuando se ilumina una nanopartícula metálica la absorción asociada a la resonancia del plasmón localizado de superficie (RPLS) produce un calentamiento en ésta. La disipación de la energía térmica hacia el medio circundante se da mediante tres procesos: (i) difusión, (ii) convección y (iii) radiación. En nuestro caso, dado que tenemos un sistema coloidal con nanopartículas metálicas inmersas en agua, el principal proceso de transferencia de energía es la difusión. (Baffou, 2017).

La potencia óptica absorbida por la nanopartícula está dada por la expresión (Bohren y Huffman, 2008)

$$P_{abs} = - \int_A \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{n}} dA = C_{abs} I_0, \quad (25)$$

donde la integral es sobre la superficie que define a la partícula, $\hat{\mathbf{n}}$ es un vector unitario normal a la superficie que apunta hacia afuera, \mathbf{S} es el vector de Poynting y la segunda igualdad viene de la definición de sección transversal de absorción. Esta absorción induce un cambio de temperatura tanto en la nanopartícula como en su entorno y se modela como un proceso difusivo.

Para un medio homogéneo, la distribución de temperatura obedece la ecuación de difusión

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} - \kappa \nabla^2 T = q, \quad (26)$$

donde κ es la conductividad térmica, ρ es la densidad de masa y c_p es la capacidad calorífica específica del medio a presión constante, mientras que q representa la fuente de calor (densidad de potencia calorífica). Esta es la situación que se tiene dentro de la partícula, mientras que afuera se cumple una ecuación de difusión homogénea. La validez de la ecuación de difusión para el caso que se está estudiando ha sido discutida por Baffou (Baffou, 2017), donde se concluye que para las dimensiones de las nanopartículas que se están considerando, el concepto de temperatura y el modelo difusivo constituyen herramientas apropiadas.

3.2.1 Estado estacionario.

Cuando se tiene una nanopartícula aislada en un medio uniforme y se utiliza iluminación de onda continua (cw) después de un cierto tiempo se llega a una situación de equilibrio a lo que la temperatura no cambia; una condición de estado estacionario. En este caso, las ecuaciones de difusión térmica dentro y fuera de la nanopartícula están dadas respectivamente por:

$$\kappa_p \nabla^2 T = q, \quad (27)$$

$$\nabla^2 T = 0, \quad (28)$$

donde κ_p es la conductividad térmica del metal de las nanopartículas. La ecuación (26) se le conoce como la ecuación de Poisson mientras que la ecuación (27) se le denomina la ecuación de Laplace. Considerando

el caso de una fuente térmica puntual, es decir, que $q(\mathbf{r}) = Q\delta(\mathbf{r})$, donde la intensidad de la fuente térmica Q está dada por la potencia absorbida P_{abs} . La solución para la ecuación de Laplace se puede escribir como

$$T(\mathbf{r}) = \frac{C_{abs}I_0}{4\pi\kappa_m r} + T_\infty, \quad (29)$$

donde κ_m es la conductividad térmica del medio circundante y T_∞ representa la temperatura en puntos muy alejados de la fuente.

Para el caso de partículas esféricas, la temperatura dentro y fuera de éstas está dada por (Baffou, 2017):

$$T(\mathbf{r}) = \frac{C_{abs}I_0}{4\pi\kappa_m r} + T_\infty, \quad r < a \quad (30a)$$

$$T(\mathbf{r}) = \frac{C_{abs}I_0}{4\pi\kappa_m a} + T_\infty, \quad r > a \quad (30b)$$

donde a es el radio de la nanopartícula. Entonces se puede estimar que el cambio de la temperatura justo en la superficie de la nanopartícula es.

$$\Delta T = \frac{C_{abs}I_0}{4\pi\kappa_m a}, \quad (31)$$

Para el caso de nanopartículas con geometría en forma de barra, el incremento de temperatura está dado por

$$\Delta T = \frac{C_{abs}I_0}{4\pi\kappa_m a_0 \beta'}, \quad (33)$$

donde a_0 representa un “radio equivalente” (el radio de una esfera con el mismo volumen de la nano barra) y β es un factor de corrección, que para este caso en particular es $\beta \approx 1 + 0.096587 \ln^2(L/d)$, donde L es la longitud de la nanobarra y d el diámetro (Baffou, 2017).

Considerando ahora el ejemplo de una nanobarra de longitud $L = 50nm$ y diámetro $d = 11nm$ en agua. En este caso, $a_0 = 10.4 nm$, $\kappa_m = 0.5918 Wm^{-1}K^{-1}$, $\beta = 4.11$ y, en resonancia, $C_{abs} \approx 1.5 \times 10^{-15} m^2$. De la ecuación (33), se encuentra que el cambio de temperatura de una nanopartícula en $1^\circ K$ se necesita una irradiancia

$$I_0 = \frac{4\pi\kappa_m a_0 \beta}{c_{abs}} \Delta T \approx 2.1 \times 10^8 \frac{W}{m^2}. \quad (34)$$

Por lo anterior, si se tiene un láser de $0.5W$ de potencia, se observa que para lograr efectos apreciables de temperatura es necesario enfocararlo a un diámetro de alrededor de $27\mu m$. Resulta entonces claro que es poco eficiente calentar las nanopartículas individuales.

3.2.2 Efectos colectivos

En un sistema coloidal de nanopartículas metálicas el incremento de temperatura es debido a un efecto colectivo de éstas. Considerando N nanopartículas idénticas de radio a , que aportan potencias Q_i y que están localizadas en las posiciones r_j . El incremento de temperatura que experimenta cada partícula está dado por (Baffou, 2017)

$$\delta T_j = \frac{Q_j}{4\pi\kappa_s a} + \sum_{\substack{k=1 \\ k \neq j}}^N \frac{Q_k}{4\pi\kappa_s |r_j - r_k|} = \delta T_j^{self} + \delta T_j^{ext}, \quad (35)$$

donde δT_j^{self} y δT_j^{ext} representan las contribuciones que provienen de la misma partícula y de las $N - 1$ partículas vecinas, respectivamente. Dependiendo de la contribución de estos dos términos, dos regímenes pueden ser posibles. El primero, si δT_j^{self} es dominante para cualquier nanopartícula j , se dice que el sistema está en el régimen de confinamiento de temperatura, es decir, el incremento de temperatura ocurre solamente en la vecindad de la nanopartícula. Por el contrario, si δT_j^{ext} es dominante, entonces se tiene un efecto colectivo en el cual la distribución de temperatura tiende a homogenizarse a escala macrométrica. Este último efecto es el que se presenta al tener un sistema coloidal de nanopartículas, como es el caso de nuestros experimentos.

Para determinar el tipo de régimen se utiliza un parámetro adimensional dado por (Baffou, 2017)

$$\xi_1 = \frac{p}{a \ln N}, \quad \text{si } m = 1 \quad (36)$$

$$\xi_m = \frac{p}{a N^{(m-1)/m}}, \quad \text{si } m \geq 1, \quad (37)$$

donde p es la distancia promedio entre las nanopartículas vecinas, a es el tamaño de la nanopartícula, N el número de nanopartículas en el sistema y m la dimensionalidad. Para el caso de nanopartículas dispersas en solución, $m = 3$, y por lo tanto se tiene que

$$\xi_3 = \frac{p}{aN^{2/3}}. \quad (38)$$

En general, si $\xi_m \gg 1$, el sistema está en el régimen de localización y la distribución de temperatura está confinada alrededor de cada nanopartícula. Por el contrario, si $\xi_m \ll 1$, se tiene el régimen de efectos colectivos y en este caso se puede hablar de una homogenización de la temperatura a escala macroscópica.

En un sistema coloidal de nanopartículas en solución, se tiene el régimen de efectos colectivos y por lo tanto se tiene una homogenización de la temperatura. Esto induce un incremento de temperatura mucho mayor al que se estima considerando solamente una nanopartícula, lo cual debe de considerarse en experimentos donde diversas nanopartículas son iluminadas.

Cabe mencionar que existen métodos computacionales para estimar el incremento de temperatura debido a procesos colectivos bajo diferentes condiciones de iluminación (Baffou, 2017). Sin embargo, debido a su complejidad y a la naturaleza experimental de esta tesis, en este trabajo no se desarrollan dichos cálculos y solamente se consideran los valores obtenidos experimentalmente.

Capítulo 4. Metodología

En este capítulo se describe de manera general el método de síntesis químico denominado crecimiento mediado por semillas el cual se utilizó para la fabricación de las nanobarras de oro. Se describe la metodología utilizada para el cargado de dichas nanobarras en nanogeles termosensibles. Además, se presenta el arreglo experimental implementado para realizar la caracterización térmica y óptica de las nanopartículas y de los nanogeles cargados. Finalmente, se describe el proceso de la caracterización morfológica de ambas muestras que se realizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

4.1. Síntesis de nanobarras de oro.

La síntesis de las nanobarras de oro se realizó mediante el método químico de crecimiento mediado por semillas o método de Turkevich (Gole et al., 2004), el cual consta de dos etapas: en la primera etapa se sintetizan unas nanopartículas de oro de alrededor de 2 nm que se les denominan “semillas”; en la segunda etapa se utiliza una solución de crecimiento la cual induce un crecimiento anisotrópico de las semillas dando como resultado las nanobarras. A continuación, se describen de forma más detallada cada una de estas etapas.

Las semillas de oro se prepararon mediante la reducción química de ácido cloro áurico ($HAuCl_4$) usando borohidruro de sodio ($NaBH_4$), misma que fue utilizado en (DiazDuarte-Rodriguez et al., 2019). Para esto, se vertió en un vaso de precipitado 7.5 mL de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (*CTAB*) a 0.1M y 0.25mL de $HAuCl_4$ a 10mM y se dejó en agitación magnética durante 10 minutos, después se agregaron 600 μM de $NaBH_4$ a 10mM (Figura 8a). La solución se dejó en agitación constante a 20,000 RPM durante 30 minutos para permitir la descomposición de $NaBH_4$ (Figura 8b). La solución de semillas obtenida se cubre con papel aluminio.

Una vez generadas las semillas, se preparó una solución de crecimiento para éstas, la cual consistió en mezclar 100mL de *CTAB* a 0.1M, 5mL de $HAuCl_4$ a 10mM, 1mL de nitrato de plata ($AgNO_3$) a 10mM y 1mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1 M. Esta solución se colocó en un baño de aceite a 30°C en agitación constante (a 125 RPM, aproximadamente) durante 30 minutos (Figura 8c). Posteriormente, a dicha

solución se le agregan 0.8mL de ácido ascórbico a 0.1M y 250 μ L de la solución de semillas. La solución final se mantiene bajo agitación térmica entre 5 y 6 horas a 200 RPM aproximadamente (Figura 8d), este tiempo es el estimado para obtener nanobarras con una RPLS longitudinal alrededor de 800 nm. A la solución final que contiene las nanobarras de oro se le realizó un proceso de purificación para eliminar el excedente de *CTAB*, así como también para eliminar nanopartículas de dimensiones más pequeñas que pudieran haberse formado durante el proceso de síntesis. El proceso de purificación se realizó mediante un proceso de centrifugación de la muestra en dos ciclos: el primer ciclo a 10,000RPM por 30 minutos y el segundo a 6,000RPM por 15 minutos. Posteriormente se retira de la muestra el excedente y se redispersa el sedimento en agua destilada. Finalmente, la solución purificada de nanobarras de oro se almacena a temperatura ambiente para su posterior caracterización termo-óptica.

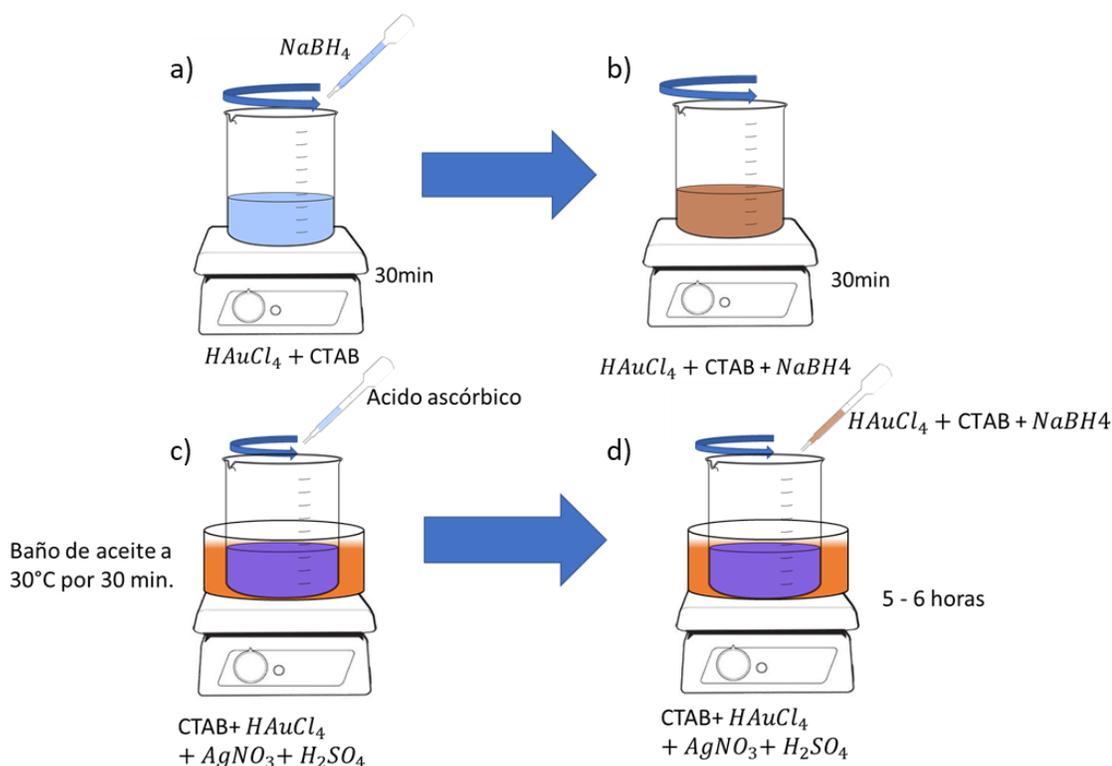


Figura 8: Esquemas de los pasos de la síntesis de nanobarras a) y b) generación de semillas y c) y d) crecimiento de semillas.

4.2. Cargado de nanobarras en nanogeles

El cargado de las nanobarras sintetizadas en nanogeles termosensibles (previamente sintetizados por (González-Ayón et al., 2015)) se realizó a través de dos métodos.

El primer método (M1) consistió en utilizar los nanogeles en sólido y las nanobarras en solución. Se tomaron 5 mL de la solución purificada de nanobarras y a ésta se le agregaron 12.5mg de nanogeles en sólido (seco). Se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente como se muestra en la Figura 9a, después se le realizó un proceso de diálisis con una membrana de 12 a 14 KDalton en agua desionizada por 30min (ver Figura 9b). Posteriormente, la solución se dejó 24 horas en un recipiente para la precipitación de las nanopartículas no encapsuladas. Finalmente, se retiró el sobrenadante y de la muestra final de nanogeles cargados se congelaron 2.5mL para su posterior liofilización y re-dispersión en agua destilada (M1-L).

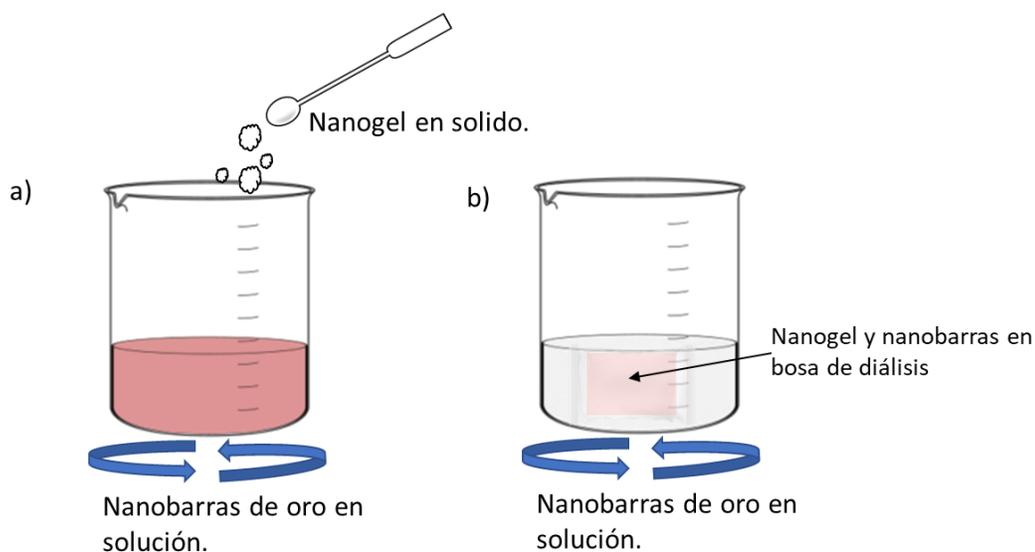


Figura 9: Esquema del proceso de encapsulado para el método 1 (M1).

El segundo método (M2) consistió en utilizar los nanogeles en solución y las nanobarras en sólido. Para esto se tomaron 12.5mg del nanogel en sólido y se agregaron en 5mL de agua destilada, esta solución se dejó en agitación por 24 horas como se muestra en la Figura 10a. Por otro lado, se liofilizó la solución purificada de nanobarras para obtenerlas en sólido. Posteriormente, a la solución de nanogeles se le agregaron las nanobarras en sólido y se dejaron en agitación por 24 horas. Al igual que en el caso anterior, a la solución final también se le realizó un proceso de diálisis con una membrana de 12 a 14 KDalton en

agua desionizada por 30min y se dejó 24 horas para la precipitación de nanopartículas no encapsuladas (ver Figura 10b). Finalmente, se pipeteó el sobrenadante y de la muestra final se congelaron 2.5mL para su posterior liofilización y re-dispersión en agua destilada (M2-L).

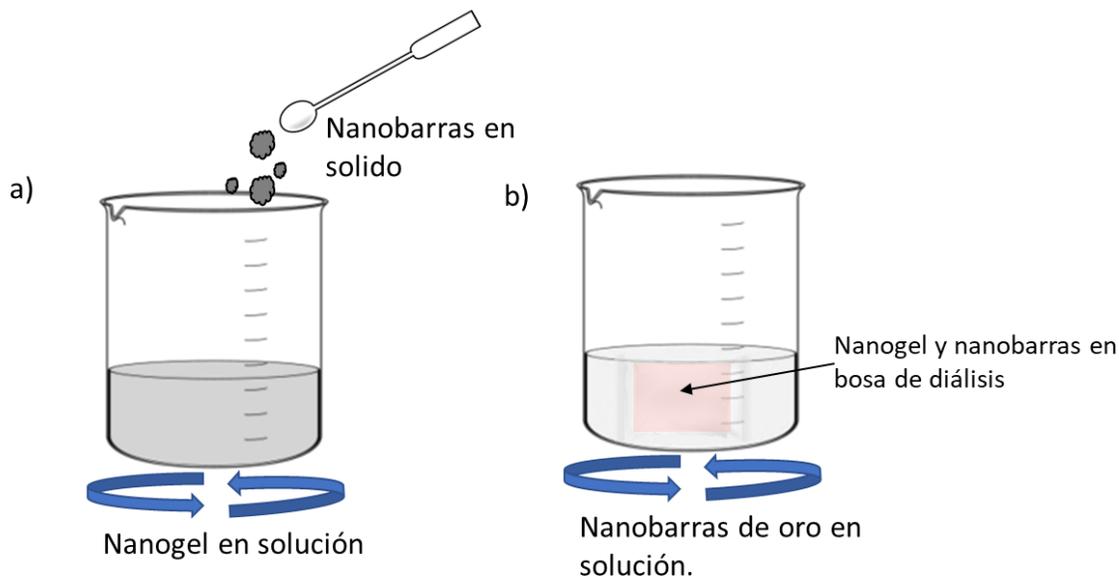


Figura 10: Esquema del proceso de encapsulado para el método 2 (M2).

4.3. Caracterización térmica, óptica y morfológica.

4.3.1. Caracterización térmica

La caracterización térmica de las nanopartículas y los nanogel cargados con estas, se realizó utilizando el arreglo experimental mostrado en la Figura 11. Se utilizó un diodo láser con salida a fibra (CNI, MDL-III-785) de 785nm de longitud de onda con potencia de salida variable de 0-500mW. A la salida de la fibra se acopló un sistema compuesto por una lente de colimación (Thorlabs, F240SMA-780) y una lente esférica (Thorlabs, A397TM-B), esto con la finalidad de enfocar el haz del láser sobre la muestra e inducir el calentamiento debido a la absorción asociada a la RPLS de las nanopartículas. El cabezal del extremo final de la fibra se montó sobre un sistema de traslación micrométrica xyz para ajustar el foco y la posición del haz de excitación. Las muestras de nanopartículas y nanogel se colocaron dentro de una cubeta de cuarzo para su caracterización térmica. La medición del incremento de la temperatura se realizó a través de un termómetro comercial (RDXL4SD 4-Channel Datalogger Thermometer) cuyos termopares se sumergieron en la solución y se posicionaron a una distancia de aproximadamente 500 μm del foco del

láser. Los datos de la medición de la temperatura se guardan en un archivo .xls en una tarjeta SD que está integrada al termómetro para su posterior procesamiento y análisis.

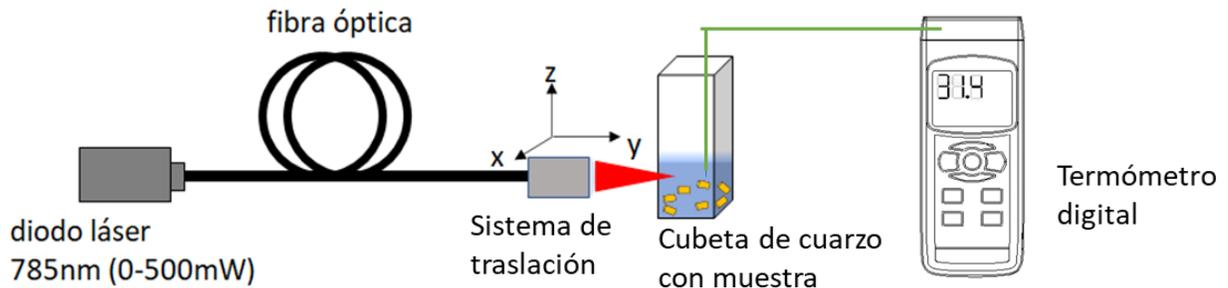


Figura 11: Esquema de arreglo experimental para la caracterización térmica de las muestras.

4.3.2. Caracterización óptica

La caracterización óptica de nanopartículas en solución coloidal consiste básicamente en la medición espectroscópica de su transmitancia y reflectancia (difusa o direccional) en la región visible del espectro. Es decir, se mide la luz que atraviesa la muestra y a partir de ahí se obtienen las pérdidas por absorción y esparcimiento. En la Figura 12 se muestra el diagrama esquemático de las dos configuraciones del arreglo experimental implementado para medir la extinción y absorción de las muestras. En ambas configuraciones (Figura 12a y Figura 12b) se utilizó una lámpara de luz blanca (lámpara halógena de xenón USHIO FDS 24V 150W). El haz de luz blanca es colimado utilizando la lente L1 (lente colimadora) y después, mediante la lente L2 (lente biconvexa con foco de 15cm), se enfoca en el espectrómetro (Ocean Optics, USB4000-VIS-NIR). La cubeta que contiene a la muestra se coloca a la entrada de una esfera integradora (ISP-50-8-R-GT de 50mm de diámetro), el tamaño del haz de luz que ilumina la muestra se ajusta con un diafragma (D) colocado enfrente de ésta.

En el primer arreglo (Figura 12a), la luz que pasa a través de la muestra es captada por el detector. La señal es una medida de la extinción (que se reduce tanto por pérdidas de absorción como de esparcimiento) y permite estimar lo que se conoce como atenuancia (D), la cual se define como $D = -\log_{10} T_D$, donde T_D es la señal normalizada que se obtiene del cociente de la medición de una muestra de nanopartículas y la muestra de referencia (agua).

Para medir la absorbancia (A), que cuantifica sólo las pérdidas por absorción, es necesario coleccionar la luz esparcida. Para esto, se tiene una esfera integradora con la abertura trasera cerrada, de esta manera toda la luz que atraviesa la muestra es colectada (tanto la luz esparcida como la luz que pasa directamente por la muestra). Este caso se muestra esquemáticamente en la Figura 12b. Para el caso de nanopartículas cuyos tamaños sean mucho menores a la longitud de onda, la absorbancia se puede obtener como $A \approx -\log T_A$, donde T_A es la señal normalizada del cociente de la muestra de nanopartículas y la muestra de referencia (agua) medidas a través de la fibra.

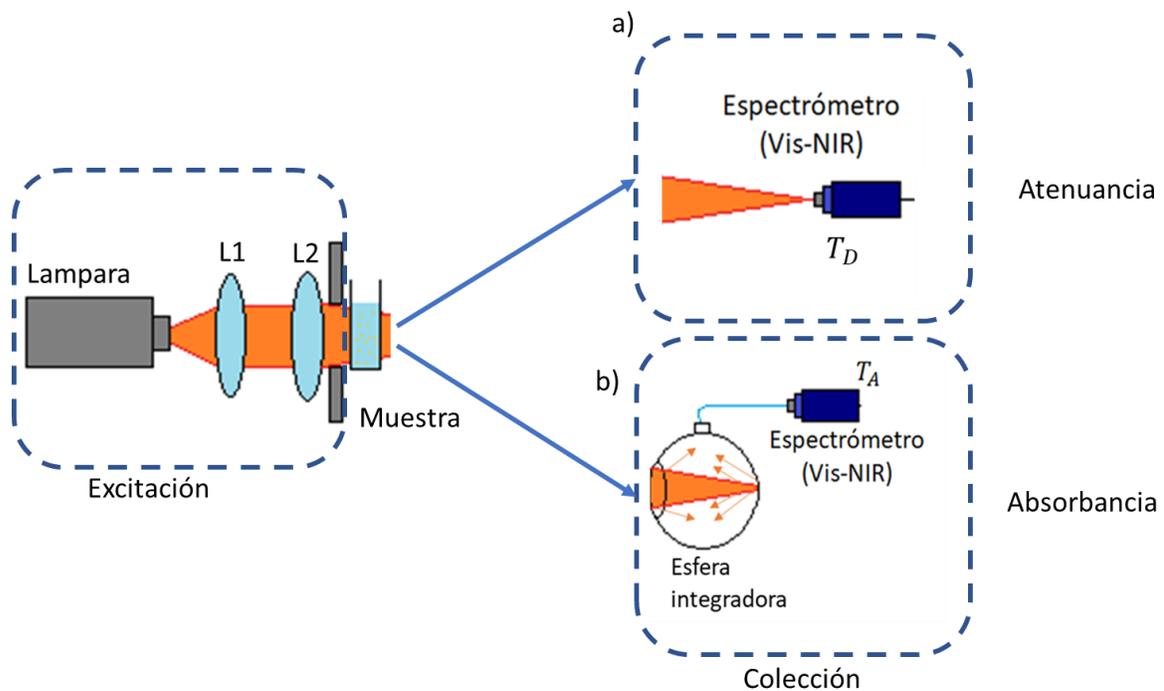


Figura 12: Arreglos para la caracterización óptica de nanopartículas para obtener a) Atenuancia y b) Absorbancia.

4.3.3. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las nanobarras y de los nanogeles termosensibles cargados se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Para esto, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión H7500 (Hitachi Co. Ltd., Tokyo Japan) que opera a un voltaje de aceleración de 80kV. Las muestras fueron preparadas utilizando $0.1\mu L$ de la muestra, esta fue puesta sobre una "rejilla de cobre del 75" recubierta con una capa delgada de carbón, seguido de una remoción de exceso de líquidos a temperatura ambiente. Después, las muestras que contenían nanogeles fueron

“tintadas” usando acetato de uranilo al 4% por un minuto, para luego retirar el excedente del líquido, en el caso de las nanopartículas solas no es necesaria la “tinción”.

Capítulo 5. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y su discusión, los cuales son referentes a la síntesis de las nanobarras de oro y su cargado en los nanogeles termosensibles, así como su caracterización térmica, óptica y morfológica.

5.1. Síntesis y caracterización de nanobarras de oro

La síntesis de las nanobarras de oro se realizó mediante el método químico denominado crecimiento mediado por semillas descrito previamente en el capítulo 4 (sección 4.1). Se sintetizaron dos tipos de nanopartículas: una con RPLS en 820nm y la otra en 805nm. Cabe mencionar que con la metodología de síntesis ya establecida las concentraciones de nanobarras que se obtienen son de alrededor de 0.25 mg/mL. Para aumentar la concentración de las nanopartículas directamente a través del método de síntesis se requería de un cambio mayor en la metodología, el cual hasta el momento no se ha hecho en el grupo de Polímeros del ITT. En su lugar, se optó por probar un método para aumentar la concentración a partir de la concentración original. Para esto, se utilizó la muestra purificada de las nanobarras con RPLS en 820nm. A esta muestra se le realizó un proceso de liofilización, el cual consistió básicamente en “desechar” la muestra; es decir, se retiró la mayor cantidad posible de solución líquida para dejar solamente las nanopartículas en estado sólido. Una vez se tuvo las nanobarras en sólido, se procedió a suspenderlas en líquido con distintas concentraciones. Para obtener una concentración de 1 mg/mL se utilizó una relación de 1:1 (nanobarras en sólido: agua destilada), para el caso de la concentración de 0.5 mg/mL se utilizó una relación de 1:2 (nanobarras en sólido: agua destilada) y finalmente para la concentración de 0.25 mg/mL se utilizó una relación de 1:4 (nanobarras en sólido: agua destilada). Experimentalmente las concentraciones que se obtuvieron fueron de 1 mg/mL , 0.533 mg/mL y 0.233 mg/mL.

En la Figura 13a se muestran los espectros de atenuancia de las muestras de las nanobarras sin concentrar y a las diferentes concentraciones, los cuales se obtuvieron con un espectrofotómetro comercial (UV-Vis Varian Cary 100). De estos espectros es claro que el método utilizado para aumentar la concentración de nanobarras no resultó ser muy eficiente ya que al aumentar la concentración la RPLS en 820 nm disminuye. Esto se atribuye a una aglomeración de las nanobarras en forma de cúmulos, lo cual incluso podía apreciarse visiblemente. Por lo tanto, no es difícil deducir que una disminución en la RPLS inducirá un

menor efecto térmico debido a la absorción de las nanopartículas. Por esta razón, para el encapsulamiento en los nanogeles (que se describe en la sección 5.2 se decidió utilizar las nanobarras purificadas obtenidas directamente del proceso de síntesis, de manera particular las que presentan la RPLS en 805 nm cuyo espectro de atenuancia se muestra en la Figura 13b).

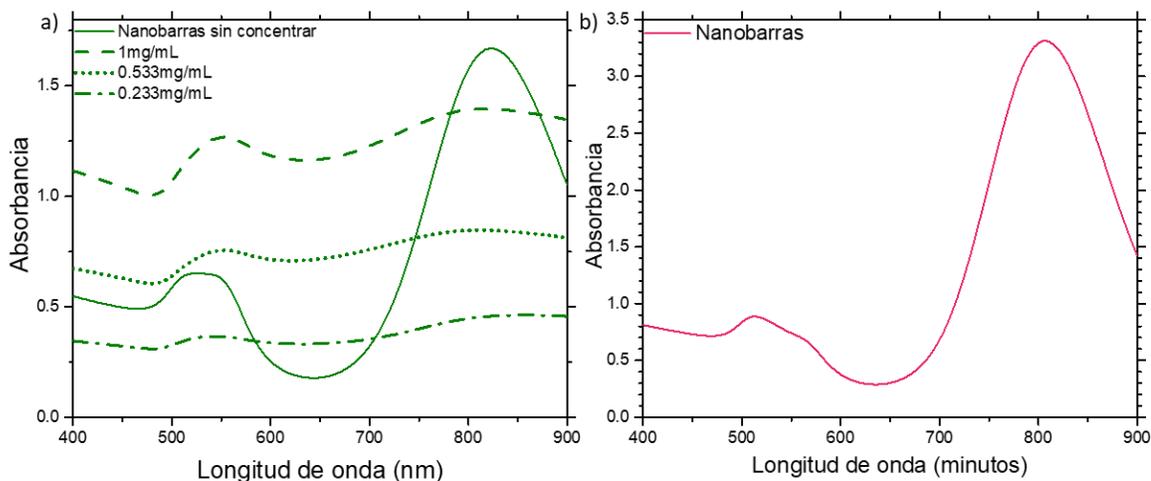


Figura 13: Espectro de atenuancia de las nanobarras sintetizadas. a) con RPLS de 820nm a distintas concentraciones y b) con RPLS a 805nm.

La caracterización térmica de las nanobarras sin concentrar con RPLS a 805 y 820 nm, así como las diferentes concentraciones que se realizaron (1, 0.533 y 0.233 mg/mL) se muestra en la Figura 14. Para la caracterización térmica la potencia de irradiación fue de 500 mW y la medición de la temperatura se adquirió cada 2 segundos por un tiempo de 10.5 minutos. Dentro de este lapso, los primeros 30 segundos no se irradió la muestra con la finalidad de tener la referencia de la temperatura ambiente, después de este tiempo se comenzó la irradiación de manera continua durante 10 minutos. De la Figura 14 se observa que la mayor eficiencia térmica se obtuvo con las nanobarras sin concentrar con RPLS a 805 nm, lográndose un incremento de temperatura de aproximadamente 16 °C. Para el caso de las nanobarras con RPLS a 820 nm, la eficiencia térmica de las nanobarras para la concentración de 0.533 mg/mL es muy similar a las nanobarras sin concentrar que se obtienen directamente de la síntesis (0.25 mg/mL), con una diferencia menor a 1 °C. Sin embargo, para la muestra de 1 mg/mL la eficiencia térmica no aumentó significativamente (menos de 1 °C), siendo muy similar a las nanobarras sin concentrar. La baja eficiencia térmica de esta última concentración, como ya se mencionó anteriormente, se debe a la aglomeración de las nanopartículas que se obtuvo al utilizar el método para realizar las concentraciones. De hecho, esto se observa en el espectro de atenuancia (Figura 13a), en donde a 785 nm (longitud de onda del láser de

irradiación) el valor es muy cercano entre la muestra sin concentrar y la concentrada a 1 mg/mL. Por su parte, para la muestra de 0.233 mg/mL, la diferencia fue más notoria, en este caso el incremento de temperatura estuvo por debajo de 4 °C con respecto a las nanobarras sin concentrar. Esto, también tiene congruencia con lo que se observa en el espectro de atenuancia de la Figura 13a, en donde el valor a 785 nm está muy por debajo del resto. Cabe mencionar que la muestra sin concentrar se mantuvo sin precipitarse alrededor de 3 meses, mientras que las que se obtuvieron con el método de concentración se empezaban a precipitar al cabo de un par de horas. Por esta razón, se determinó que para el encapsulado en los nanogeles es más conveniente utilizar las nanopartículas que se obtienen directamente de la síntesis, ya que presentaron una mayor eficiencia térmica y estabilidad. Finalmente, en el caso del agua (usada como referencia), prácticamente no hubo un calentamiento significativo, lo cual es de esperarse debido a la ausencia de nanopartículas.

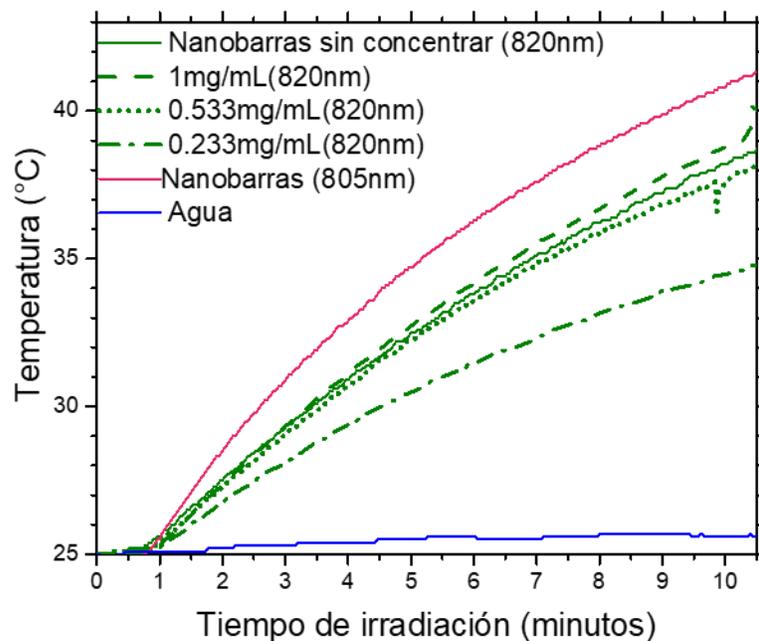


Figura 14: Caracterización térmica de las nanobarras de oro con RPLS a 805 y 820 nm. La irradiación se realizó durante 10 minutos con el diodo láser de 785 nm a 500 mW.

En la Figura 15a se muestra la imagen TEM de las nanobarras con RPLS en 805 nm, en la cual se usó un voltaje de aceleración de 80kV y un tiempo de exposición de 2 segundos. Nótese que existe un número reducido de nanopartículas con geometría de paralelepípedo y esferas, esto puede ser debido a que durante la síntesis en éstas no se dio de manera eficiente el crecimiento anisotrópico que da origen a la formación de las nanobarras. También cabe la posibilidad de que algunas de estas geometrías sean debido

a nanobarras que estén orientadas de manera vertical. En la Figura 15b se muestra la gráfica de dispersión de tamaños de 70 nanopartículas, en donde la longitud está representada en el eje de las abscisas y el diámetro en el eje de las ordenadas. De esta gráfica se observa que la mayoría de las nanobarras tienen dimensiones de entre 50 y 70 nm de longitud y un diámetro entre 12 y 20 nm, lo cual corresponde a un rango de razón de aspecto de 3 a 4. Esto coincide con el trabajo reportado (Huang et al., 2009) en donde obtuvieron que para nanobarras con una razón de aspecto de 4, la RPLS está alrededor de 800 nm. Las dimensiones de las nanopartículas con geometría de paralelepípedo y esferas están alrededor de 30 nm.

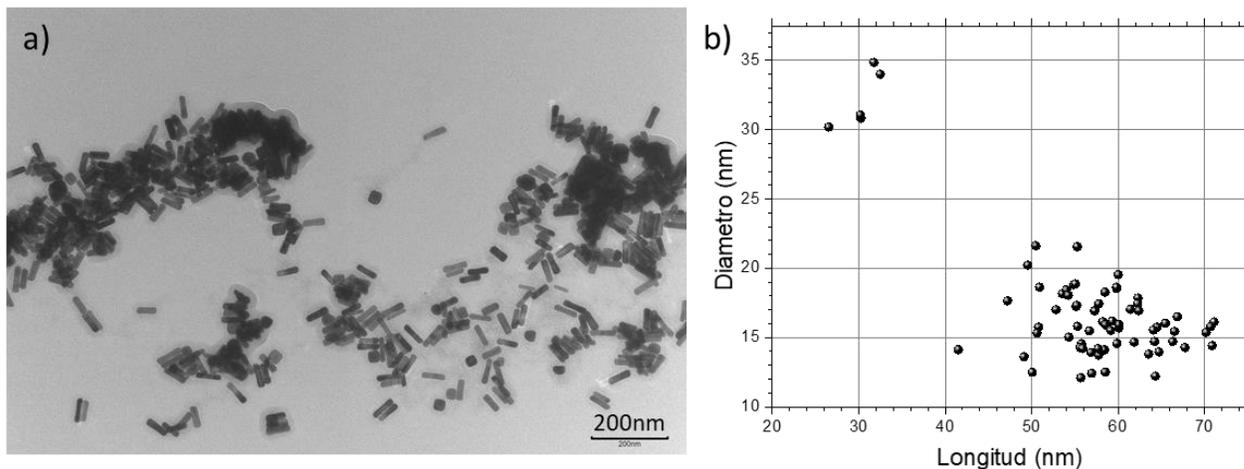


Figura 15: a) Imagen tomada por TEM de las nanobarras con RPLS en 805nm y b) gráfica de dispersión de tamaños de las nanobarras. En la adquisición de las imágenes se usó un voltaje de aceleración de 80kV y un tiempo de exposición de 2 segundos.

La caracterización óptica de las nanobarras de oro sintetizadas con RPLS a 805 nm se muestra en la Figura 16. Los espectros de atenuancia y absorbancia obtenidos mediante el arreglo experimental de espectroscopía implementado (descrito en el capítulo 4, sección 4.3.2) se muestran en la Figura 16a. En estos espectros se observan las dos resonancias plasmónicas típicas de este tipo de geometría, la que está alrededor de 520 nm es debida a la contribución transversal y la principal que está alrededor de 805 nm es debida a la contribución longitudinal de las nanobarras. La diferencia entre los espectros de atenuancia y la absorbancia es mínima (similar a las nanoplacas), lo que indica un grado de esparcimiento mínimo. Esto se corrobora con los resultados obtenidos numéricamente y que se muestran en la Figura 16b, en donde se obtiene un espectro cuya resonancia se encuentra localizada alrededor de los 800nm de la misma forma que en la Figura 16a, con la diferencia que el programa arroja un espectro normalizado a diferencia del resultado obtenido de manera experimental. En este caso, al igual que las nanoplacas, se utilizó la

aproximación cuasi-estática y una geometría elipsoidal con las dimensiones de las nanobarras obtenidas experimentalmente (50 nm de longitud y 12 nm de diámetro).

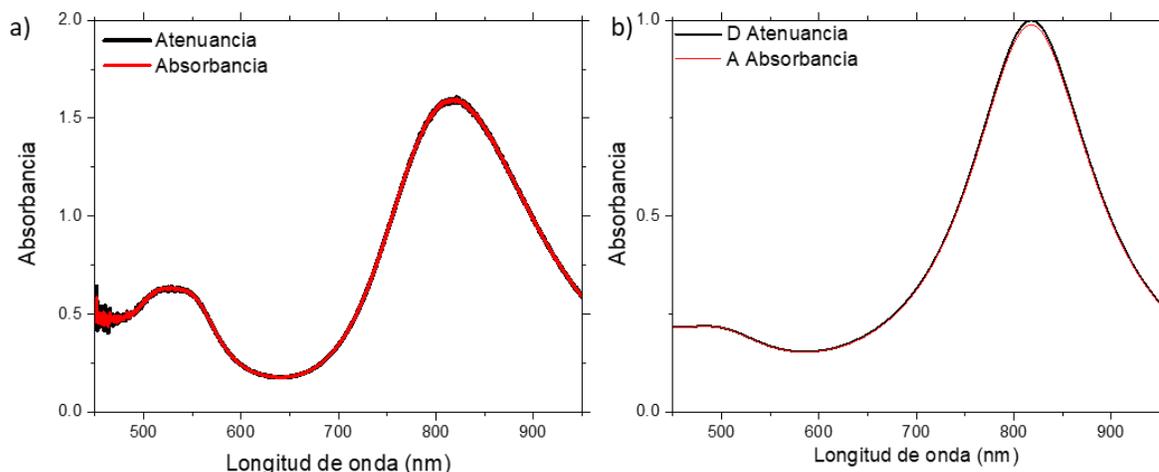


Figura 16: Caracterización óptica de las nanobarras de oro sintetizadas. a) Espectros obtenidos con el arreglo experimental de espectroscopia implementado. b) Espectros obtenidos numéricamente utilizando la aproximación cuasi-estática.

5.2. Caracterización de nanopartículas con otras geometrías

Con la finalidad de identificar otras posibles geometrías de nanopartículas con RPLS en el rango espectral de interés (700-900 nm) y que pudieran ser útiles para inducir los efectos térmicos deseados, se realizó la caracterización óptica y térmica de nanopartículas con geometría de nanoesferas (de oro) y nanoplacas (de plata) adquiridas comercialmente.

De acuerdo con los datos proporcionados por el proveedor, las nanoesferas presentan una RPLS en 800 nm y las dimensiones del núcleo (sílice) y de la coraza (oro) son $120 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ y $20 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$, respectivamente. Las nanoplacas de plata tienen una RPLS máxima en 750 nm y su tamaño promedio es alrededor de 100 nm, estas tienen una coraza de sílice de aproximadamente 20 nm.

En la

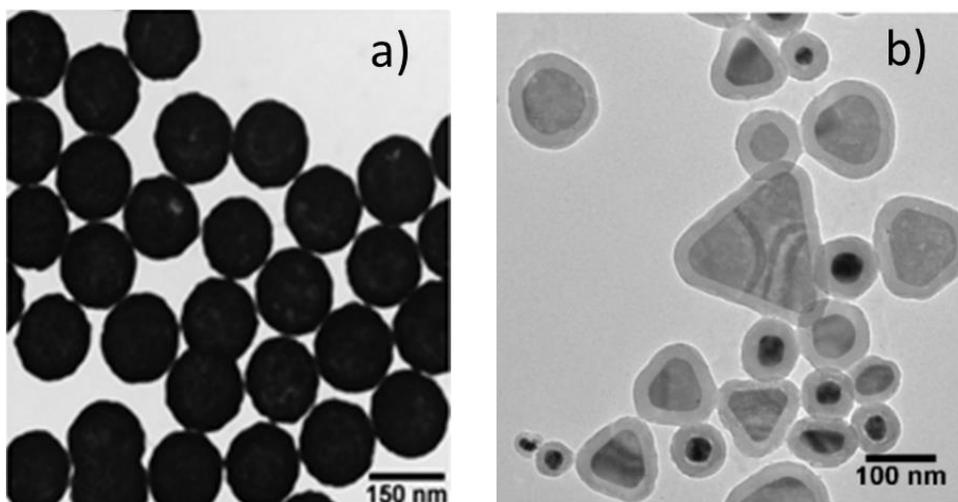


Figura 17 se muestran las imágenes de ambas nanopartículas también proporcionadas por el proveedor.

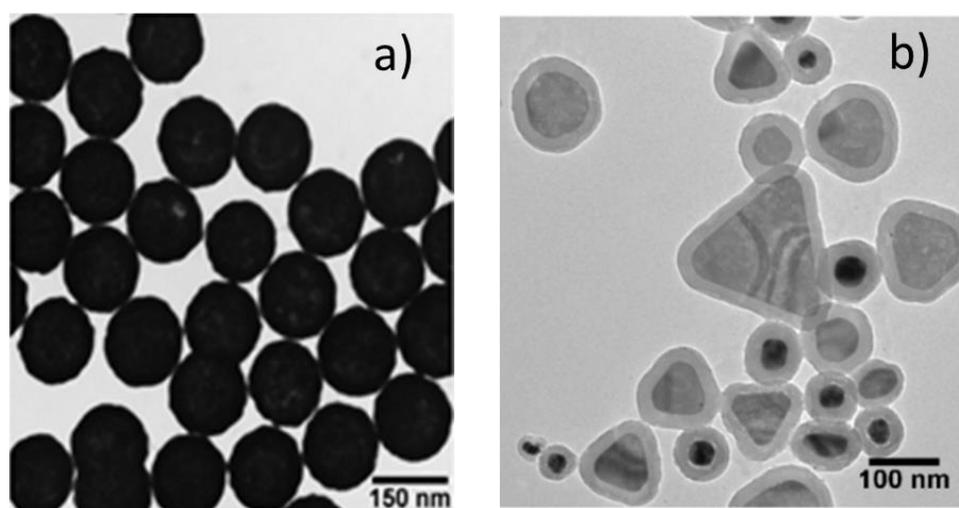
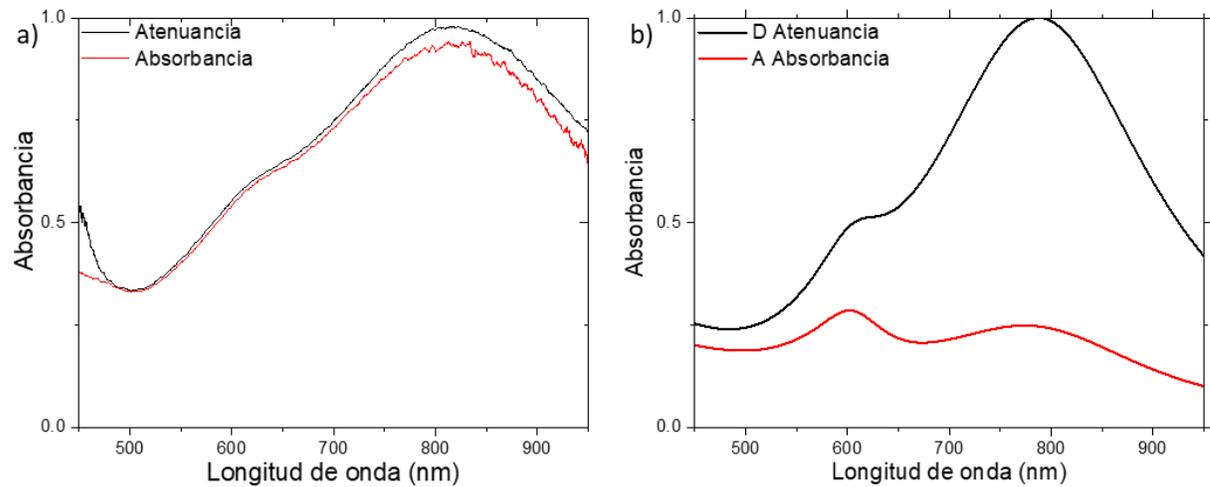


Figura 17: Imágenes de nanopartículas adquiridas comercialmente. a) nanoesferas de oro. b) nanoplacas de plata. Imagen proporcionada por el proveedor (Sigma-Aldrich).

5.2.1 Caracterización óptica

La caracterización óptica de las nanopartículas en solución coloidal se realizó mediante el arreglo experimental de espectroscopía implementado descrito previamente en el capítulo 4 (sección 4.3.2). Asimismo, se obtuvo el espectro utilizando el modelo numérico descrito en la sección 3.1.4 del capítulo 3.

En la Figura 18a se muestra el espectro de atenuancia y absorbanza de las nanoesferas de oro obtenido experimentalmente, en donde se puede apreciar que la RPLS principal está alrededor de 800 nm lo cual



coincide con el dato proporcionado por el proveedor. De esta gráfica se observa que el espectro de atenuancia es ligeramente mayor que el de absorbanza, esto indica que estas nanopartículas presentan esparcimiento, lo cual es de esperarse dadas sus dimensiones (~ 150 nm). En la Figura 18b se muestran los espectros de absorbanza (A) y atenuancia (D) obtenidos numéricamente para una sola nanoesfera de las mismas características (dimensión y composición) de la muestra adquirida comercialmente. En este caso se utilizó el cálculo de Mie descrito en el capítulo 3 (secciones 3.1.2 y 3.1.4). La RPLS principal está cercana a los 800 nm, la cual es cercana a la obtenida experimentalmente y a la proporcionada por el fabricante. No obstante, a diferencia del caso experimental, en los espectros obtenidos numéricamente existe una diferencia bastante considerable entre el espectro de atenuancia y absorbanza, lo que indica un mayor esparcimiento.

Figura 18: Caracterización óptica de las nanoesferas obtenidas a) experimentalmente y b) numéricamente utilizando el cálculo de Mie.

Los espectros de atenuancia y absorbanza de las nanoplacas de plata obtenidos experimentalmente se muestran en la Figura 19a. La resonancia máxima está cercana a los 750 nm que es el valor proporcionado por el fabricante. Nótese que la diferencia entre ambos espectros es mínima (visiblemente equiparable) y mucho menor que en las nanoesferas, lo que indica que el esparcimiento que presentan las nanoplacas es mínimo, lo cual tiene sentido ya que sus dimensiones son menores (~ 100 nm).

En

la

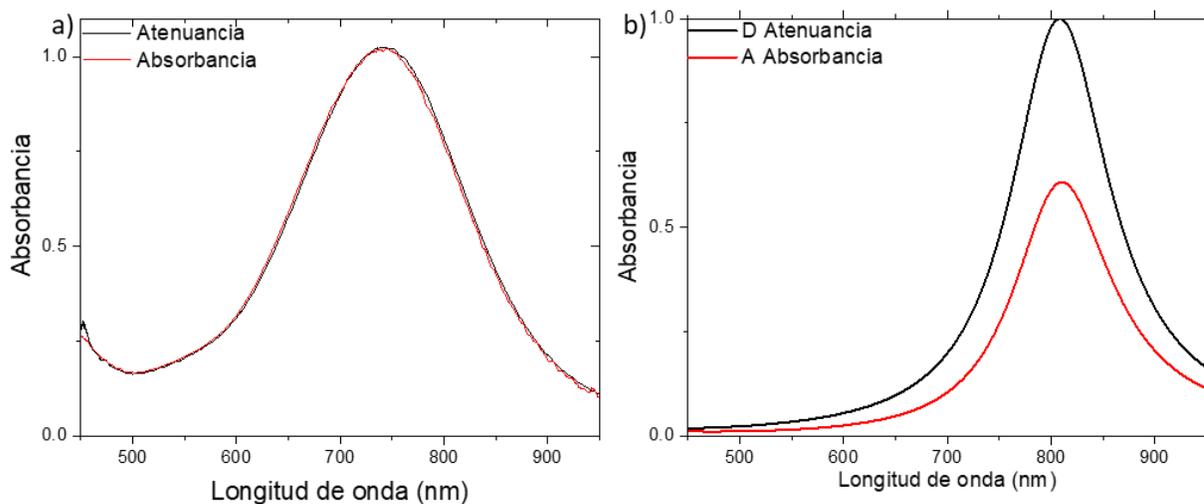


Figura 19b se muestran los espectros de atenuancia y absorción obtenidos numéricamente. En este caso se utilizó la aproximación cuasi-estática descrita en el capítulo 3 (sección 3.1.1) y fue debido a que las dimensiones de las nanoplacas se encontraban justamente en el límite para las cuales dicha aproximación aún es aplicable. La geometría que se utilizó para modelar las nanoplacas fue un elipsoide con las dimensiones proporcionadas por el fabricante. La resonancia máxima está alrededor de 800 nm, es decir, 50 nm más desplazada hacia el infrarrojo con respecto a la obtenida experimentalmente. Esta diferencia se atribuye a que en la simulación se utilizó una geometría elipsoidal, mientras que en realidad las nanoplacas es una combinación de varias geometrías como se puede observar en la (

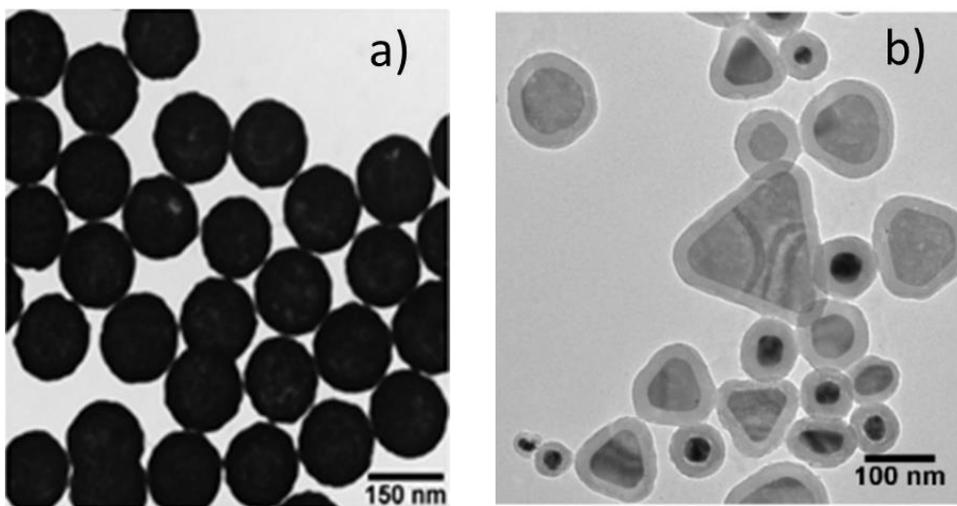


Figura 17b), lo que indica un menor espaciamiento debido a los tamaños de las nanoplacas (~100 nm).

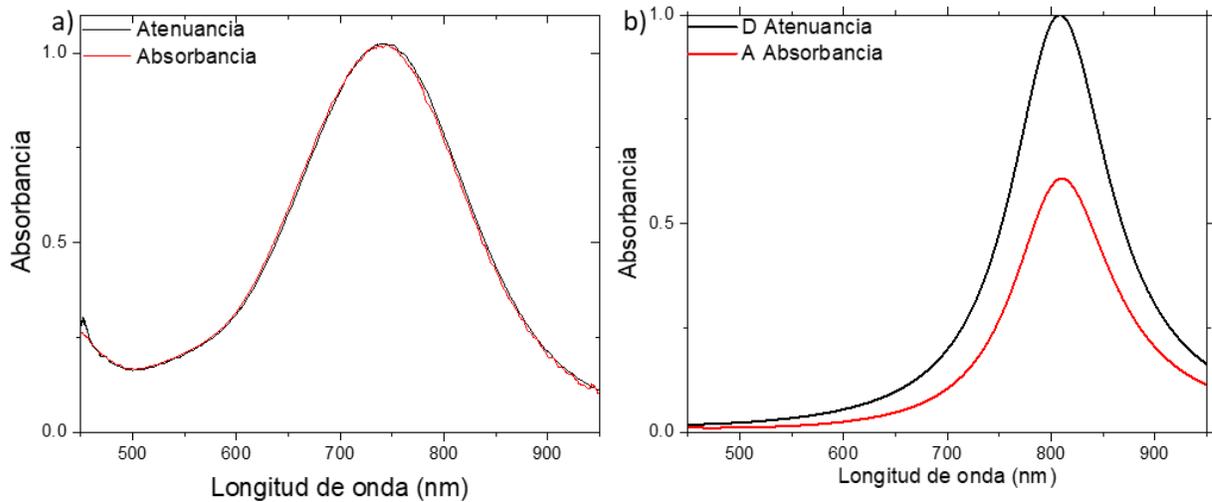


Figura 19: Caracterización óptica de las nanoplacas de plata obtenidas a) experimentalmente y b) numéricamente utilizando la aproximación cuasi-estática.

5.2.2 Caracterización térmica

La concentración original de las nanopartículas adquiridas comercialmente (nanoesferas y nanoplacas) fue de 1 mg/mL. A partir de esta concentración, se realizaron adicionalmente dos concentraciones en agua destilada: 0.5 y 0.25 mg/mL. La caracterización térmica de las nanoesferas y nanoplacas a las diferentes concentraciones se muestra en la Figura 20. La potencia de irradiación fue de 500 mW y la medición de la temperatura se adquirió durante 10.5 minutos cada 2 segundos. Dentro de este lapso, los primeros 30 segundos se obturó el láser para tener la referencia de la temperatura ambiente, después de este tiempo se comenzó la irradiación de manera continua durante 10 minutos. Para el caso de las nanoplacas (Figura 20a), se obtuvo un incremento de temperatura de 20 °C para la concentración de 1 mg/mL. Como es de esperarse, este incremento disminuye conforme se reduce la concentración. Para la muestra de nanoesferas (Figura 20b), la eficiencia térmica para la mayor concentración es muy similar. Sin embargo, para la menor concentración (0.25 mg/mL), las nanoplacas presentaron ligeramente una mayor eficiencia térmica de aproximadamente 2 °C con respecto a las nanoesferas. Finalmente, en el caso del agua (usada como referencia), no hubo un calentamiento significativo debido a la ausencia de nanopartículas.

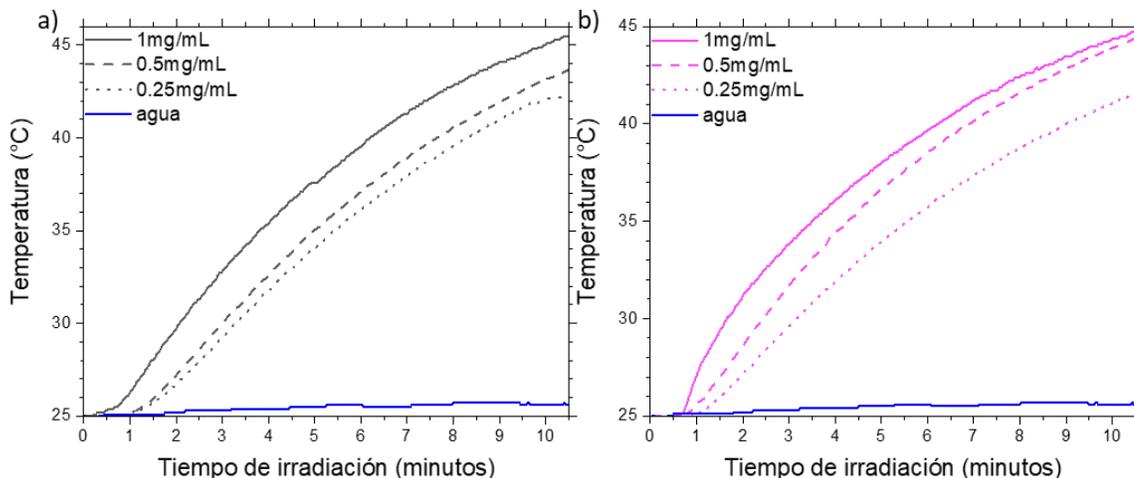


Figura 20: Gráfica de la caracterización térmica de a) nanoplacas y b) nanoesferas a distintas concentraciones a lo largo de 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW.

Como ya se mencionó anteriormente, la concentración de nanobarras que se obtiene directamente de la síntesis es de 0.25 mg/mL. Por esta razón se realizó la concentración a este mismo valor de las nanopartículas comerciales. En la Figura 21 se muestran las gráficas de la caracterización térmica de las nanobarras (con RPLS a 805 nm), nanoesferas y nanoplacas a dicha concentración. De estas gráficas se observa que, por debajo de los 5 minutos de irradiación, las nanobarras presentan ligeramente una mayor eficiencia térmica con un incremento de aproximadamente 1 °C con respecto a las otras dos. Sin embargo, después de 5 minutos las nanoplacas son las que presentan ligeramente una mejor respuesta térmica (incremento de ~ 1 °C). Si bien, la eficiencia térmica de las nanoesferas y nanoplacas es muy similar a la de las nanobarras sintetizadas, las dos primeras no serían la mejor opción para su encapsulamiento en los nanogeles, ya que sus dimensiones son muy cercanas a la de los nanogeles cuyos tamaños están en el rango de 200 a 400 nm. Por esta razón, se optó por cargar las nanobarras en los nanogeles termosensibles.

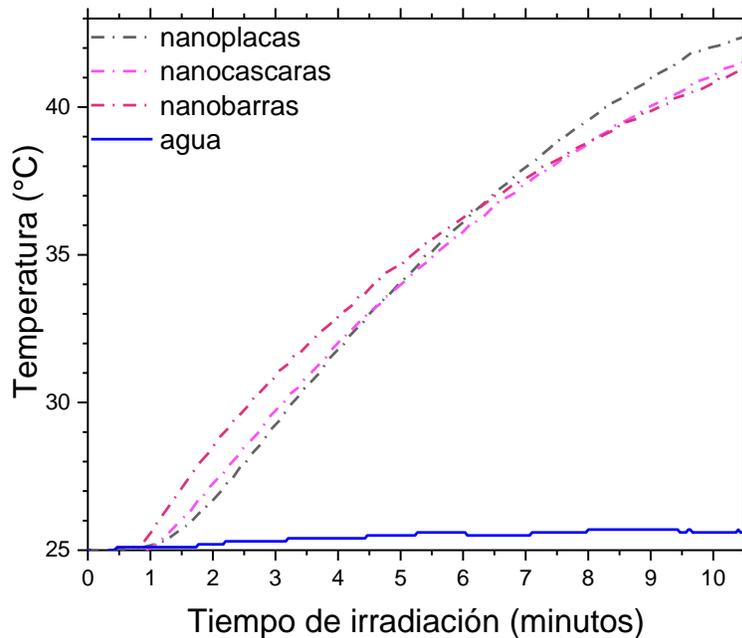


Figura 21: Caracterización térmica de las nanopartículas con distintas morfologías a una misma concentración de 0.25 mg/ml adquirido durante 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW.

5.3. Cargado de nanobarras en nanogeles termosensibles.

El cargado de las nanobarras con RPLS a 805 en los nanogeles se realizó a través de los dos métodos descritos a detalle en el capítulo 4 (sección 4.2). De manera breve, el primer método (M1) consistió en utilizar los nanogeles en sólido y las nanobarras en solución; en el segundo método (M2) se utilizó los nanogeles en solución y las nanobarras en sólido. Además, a las muestras obtenidas con ambos métodos se le realizó un proceso de liofilización y se les etiquetó como M1-L y M2-L.

A los nanogeles se les realizó una medición de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) para determinar su distribución de tamaños antes y después del proceso de cargado con las nanobarras. En principio, se espera que debido al cargado de las nanopartículas el tamaño del nanogel aumente. De hecho, esta es una prueba preliminar que comúnmente se realiza después del proceso de cargado para predecir de manera cualitativa si hubo o no cargado de nanopartículas. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra la gráfica de distribución de tamaños obtenida por DLS de los nanogeles antes del cargado. De esta gráfica se obtiene que la distribución predominante del tamaño está

alrededor de 150 nm. Cada una de las curvas de distribución corresponde a una medición, estas se obtienen directamente del equipo y es con la finalidad de garantizar la reproducibilidad de la medición, o bien, para tener la posibilidad de promediarlas.

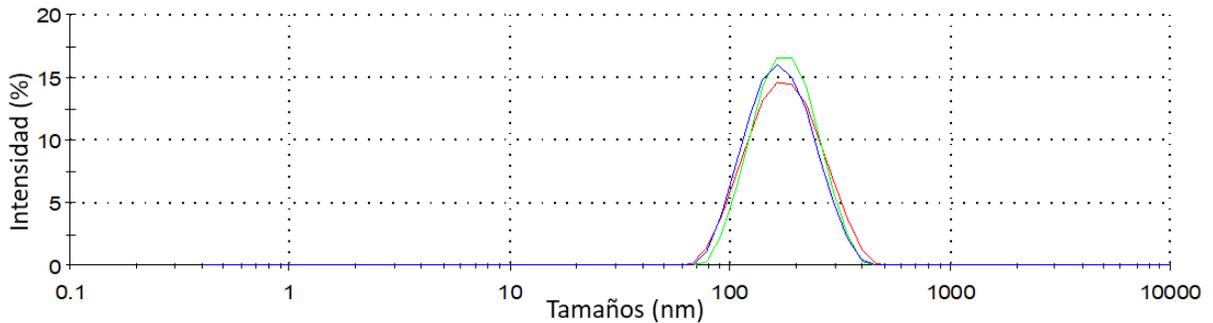


Figura 22: Gráfica de distribución de tamaños obtenida por DLS de los nanogeles antes del encapsulado.

En la Figura 23 se muestran las curvas de dispersión de tamaños obtenida por DLS y las imágenes TEM de los nanogeles cargados mediante el método M1. De las curvas de dispersión (Figura 23a) se observa que el tamaño predominante es similar al obtenido con los nanogeles antes del proceso de cargado (alrededor de 150 nm), lo que en principio indicaría que no hubo tal cargado de las nanopartículas. Sin embargo, al observar las muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se encontró que, contrario a lo indicado por DLS, si hubo cargado de nanobarras en los nanogeles como se puede observar en la Figura 23b. Un aspecto bastante interesante que se encontró es el que se muestra en la Figura 23c, en donde se observó un cúmulo de nanobarras en el núcleo de lo que parece ser un gel de dimensiones de alrededor de 6 μm . Sobre esto, existen dos posibilidades: 1) dado que las imágenes TEM se realizaron hasta tres meses después de su cargado (por cuestiones técnicas con el microscopio TEM), entonces durante este lapso de tiempo pudo haberse dado un proceso de fusión o aglomeración de los nanogeles, en cuyo caso sería un indicativo del intervalo de tiempo en el cual los nanogeles cargados pierden su estabilidad; 2) los geles con estas dimensiones micrométricas pudieron generarse durante el proceso de cargado, esto lo soporta el hecho de que en la curva de dispersión de tamaños por DLS aparecen estructuras entre 5 y 6 μm . Para corroborar o descartar lo dicho anteriormente, se tendría que tomar las imágenes TEM en un

lapso más corto (1-5 días) después de su cargado, o bien, realizar un estudio previo de la estabilidad de los nanogeles encapsulado, esto es algo que se contempla realizar en un futuro (no incluido en esta tesis).

En esta misma muestra de nanogeles cargados con el método M1 también se encontraron zonas en las que se observaron algunas nanobarras sin encapsular, o bien, algunas de ellas incrustadas en los nanogeles (ver Figura 23d). En este sentido, cabe la posibilidad de que la banda entre 10 y 20 nm en la curva de dispersión por DLS esté asociada a las nanobarras sin encapsular. Finalmente, de las imágenes TEM se observa que los diámetros de los nanogeles están entre 300 y 600 nm.

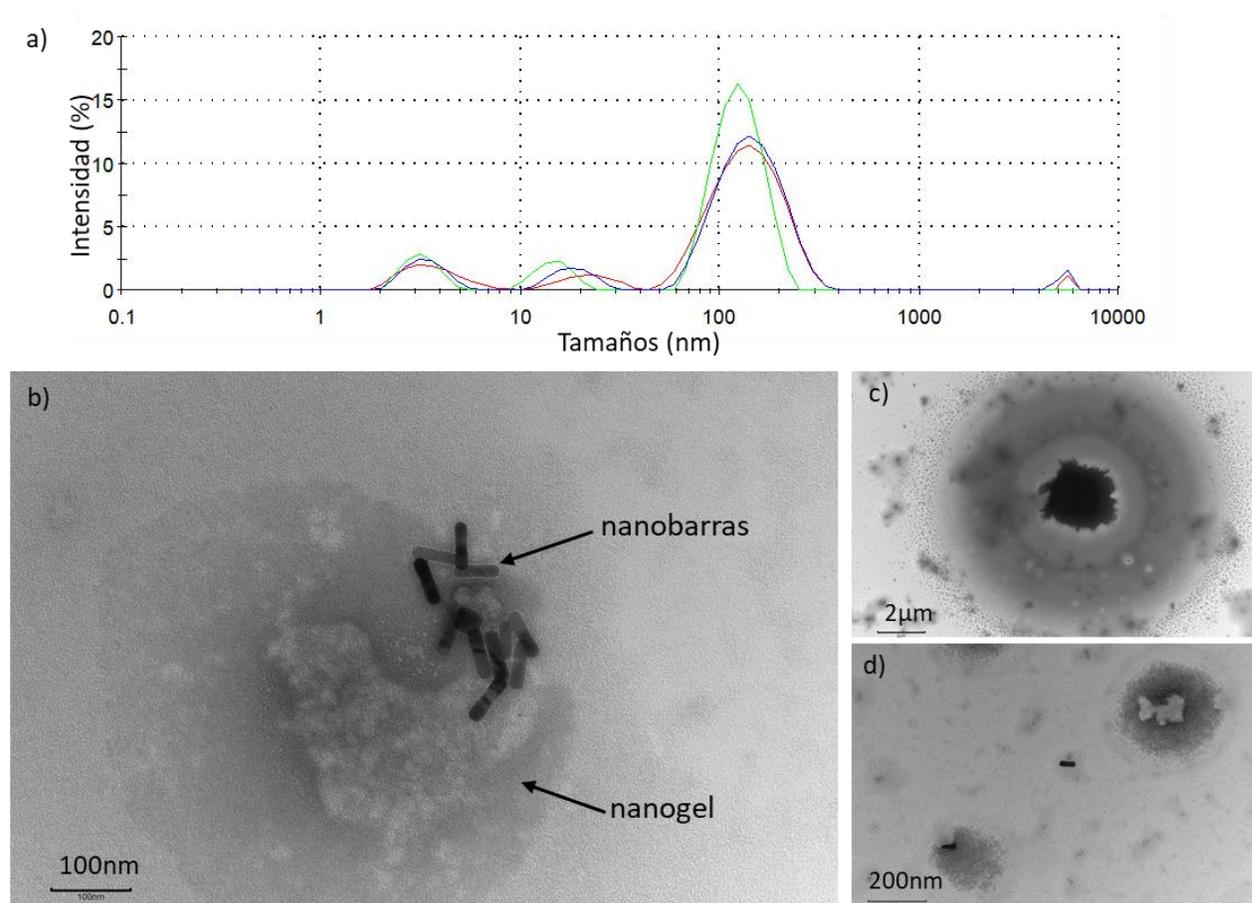


Figura 23: a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido).

A la muestra de nanogeles cargados con nanobarras con el método M1 se le realizó un proceso de liofilización y después se volvieron a dispersar en agua destilada. En la Figura 24 se muestra la curva de dispersión de tamaños por DLS, así como las imágenes TEM. De la curva de dispersión por DLS (Figura 24a)

se tiene una distribución máxima de tamaños entre 250 y 300 nm, este incremento de tamaño con respecto a los nanogeles sin cargar indica que en este caso hubo cargado de las nanobarras. En efecto, esto se corrobora en la imagen de la Figura 24b, donde de hecho se observa una aglomeración de nanobarras. Entonces, esto nos lleva a pensar que tanto los nanogeles como las nanobarras se acumulan al liofilizarse y dispersarse, lo cual también observamos cuando se realizó la caracterización óptica de las nanobarras al intentar aumentar su concentración, De manera similar a la muestra sin liofilizar, también se encontraron zonas en las que se observaron algunas nanobarras sin encapsular (Figura 24d) y cúmulos de mayor tamaño ($\sim 5 \mu\text{m}$) de nanogeles (ver Figura 24c). Cabe la posibilidad de que estos cúmulos pudieran estar asociados a la banda de $5 \mu\text{m}$ de la curva obtenida por DLS.

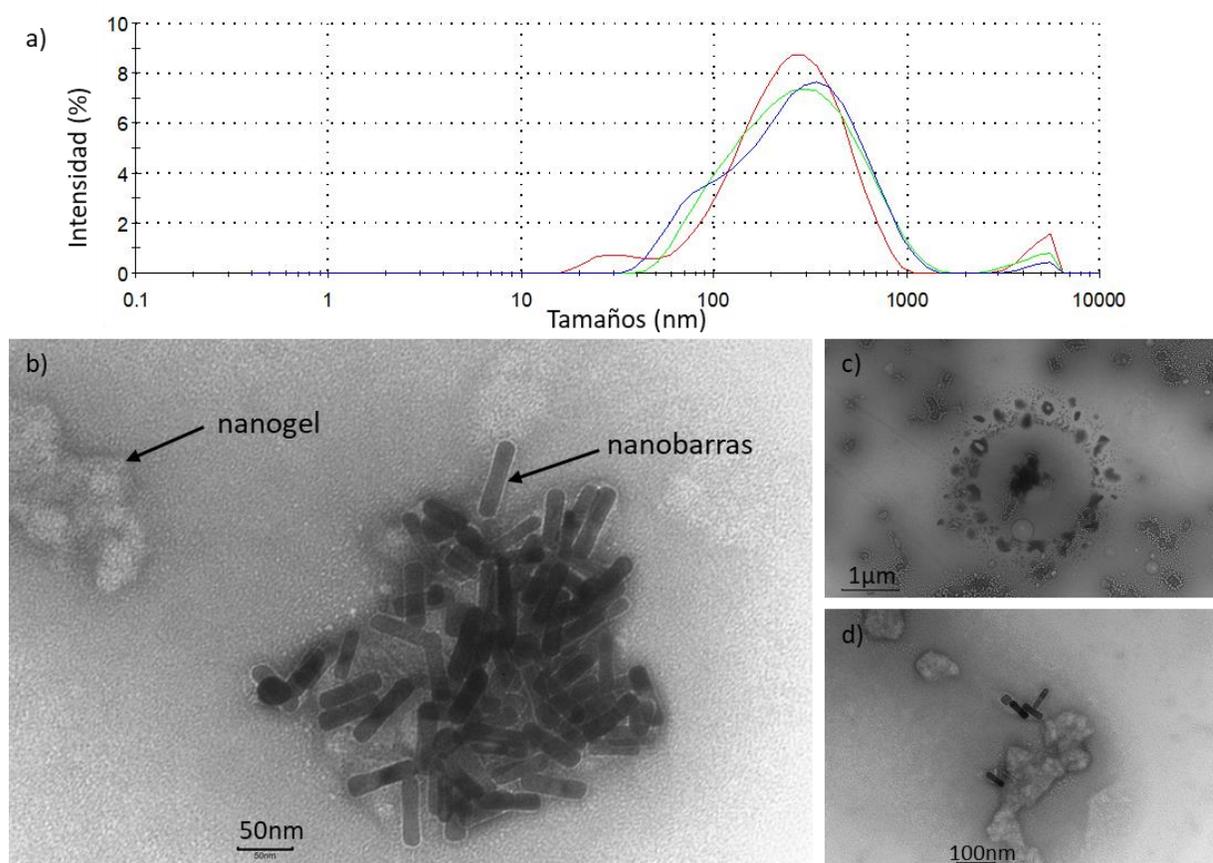


Figura 24: a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido) después del proceso de liofilización y re-dispersión en agua destilada.

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos mediante el método de cargado M2. De las curvas de dispersión de tamaños obtenida por DLS (Figura 25a) se tiene que la distribución máxima de tamaños está

alrededor de 200 nm, lo que en principio indicaría que hubo cargado y que se comprueba con las imágenes en las Figura 25b y d. En esta muestra, al igual que las del método M1, también se observaron nanobarras sin encapsular como se aprecia en la Figura 25c. De estas imágenes se deduce que la eficiencia de cargado con este método resultó ser menor que con el método M1, incluso se observa que la estructura de los nanogeles resultó deteriorada.

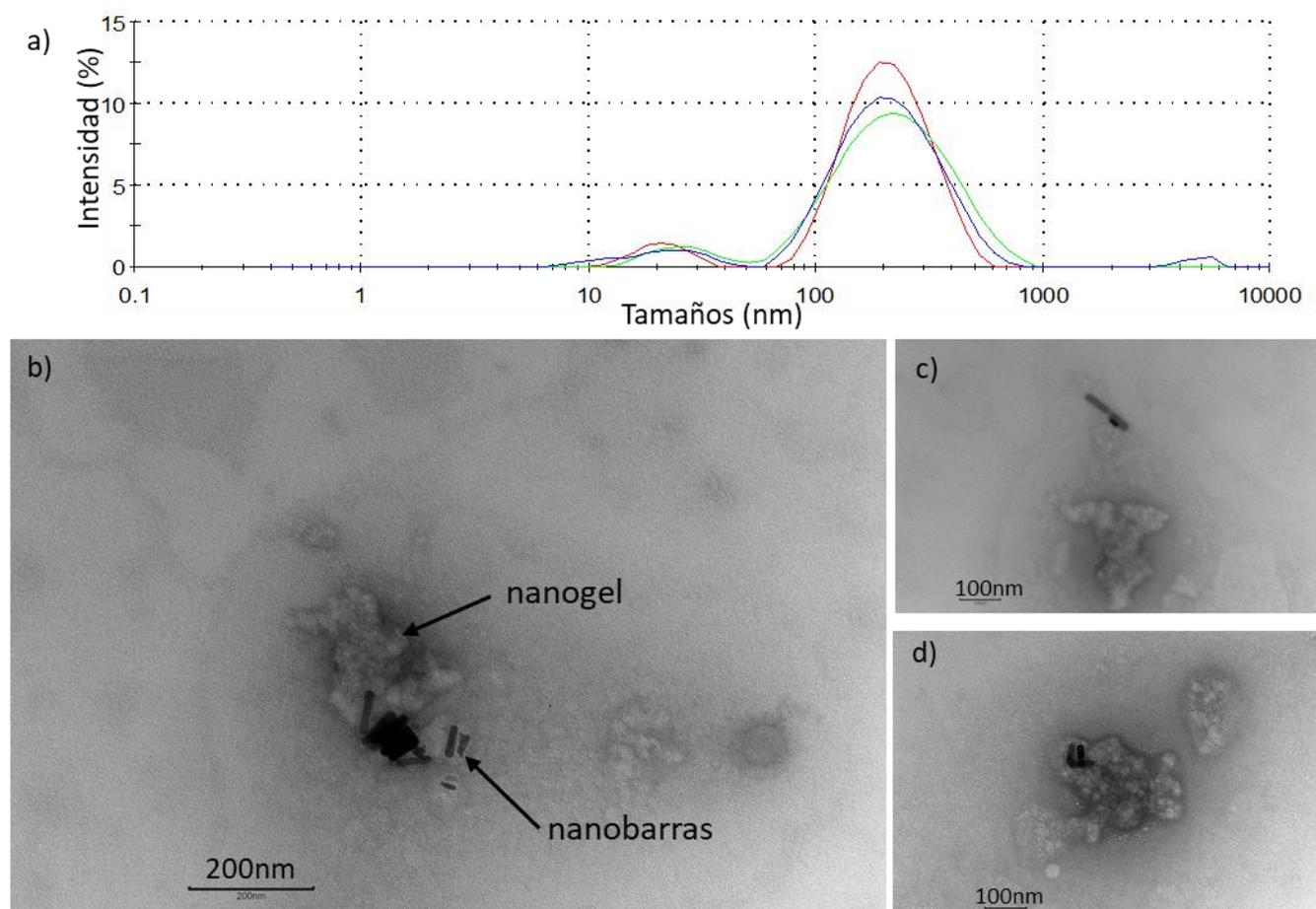


Figura 25: a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) Imágenes TEM de los nanogeles cargados mediante el método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido).

Los resultados de la muestra de nanogeles cargados con nanobarras a través del método M2 después del proceso de liofilización se muestran en la Figura 26. En este caso, la gráfica de la Figura 26a indica una distribución máxima de tamaños alrededor de 200 nm. Sin embargo, lo que se observa en las imágenes TEM (Figura 26b-d) son cúmulos de nanogeles y nanobarras fuera de estos.

La caracterización térmica de los nanogeles cargados a través de los dos métodos se muestra en la Figura 27. La potencia de irradiación fue de 500 mW y la medición de la temperatura se adquirió durante 10.5 minutos cada 2 segundos. En este lapso, los primeros 30 segundos se obturó el láser para tener un “offset” de referencia de la temperatura ambiente, después de este tiempo se comenzó la irradiación de manera continua durante 10 minutos.

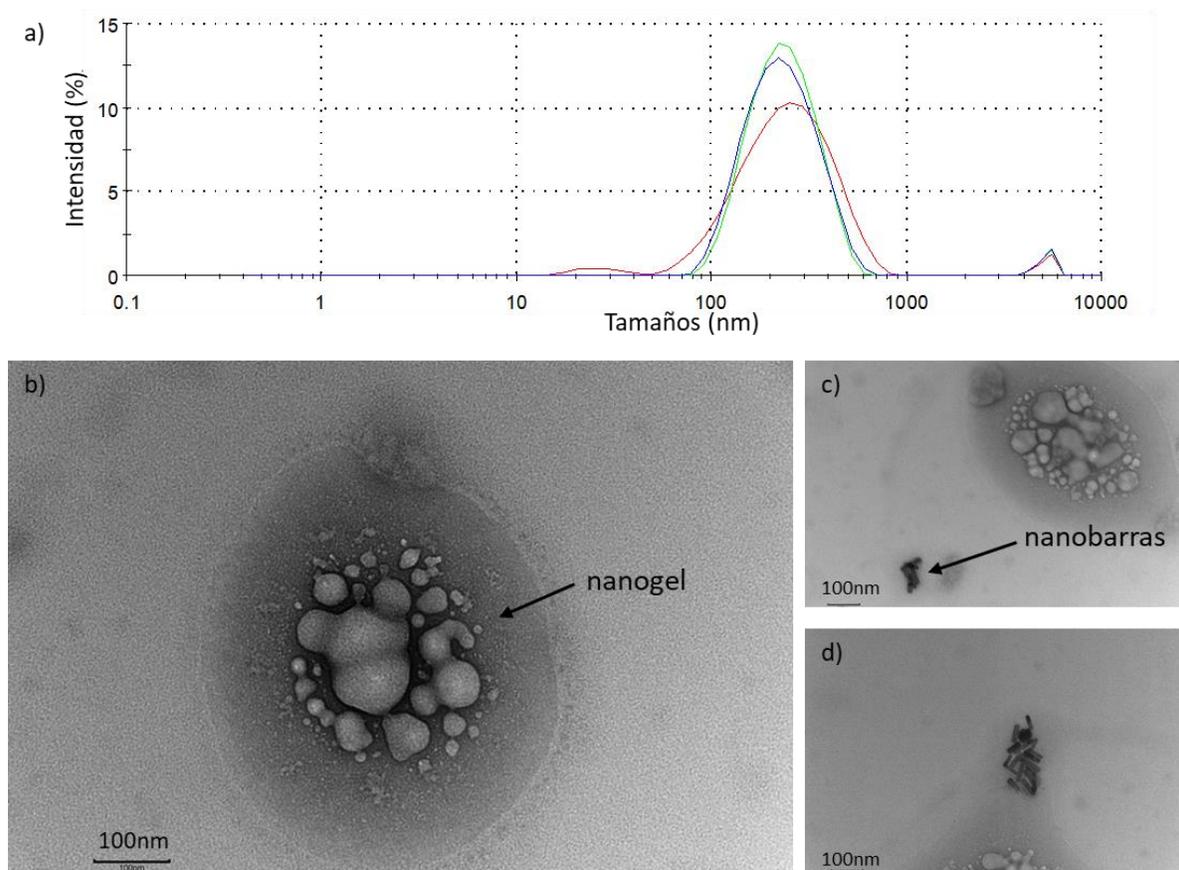


Figura 26: a) Gráfica de dispersión de tamaños obtenida por DLS. b-d) imágenes TEM de los nanogeles cargados con nanobarras mediante el método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido) después del proceso de liofilización y re-dispersión en agua destilada.

En la Figura 27a se muestra el incremento de temperatura de las nanobarras (sin encapsular) y de los nanogeles cargados con éstas mediante el método M1. Con las nanobarras sin encapsular se alcanzó un incremento de temperatura (ΔT) de 16 °C en el lapso de 10 minutos. La muestra de nanogeles cargados

sin liofilizar fue la que presentó un mayor incremento de temperatura que fue cercano a los 14 °C, mientras que con la muestra liofilizada (M1-L) el incremento fue de alrededor de 3 °C. Con el método M2 el incremento de temperatura que se logró fue alrededor de 5 °C y 1.5 °C para la muestra sin liofilizar (M2) y liofilizada (M2-L), respectivamente. En el caso del agua, usada como referencia, prácticamente no hubo un calentamiento significativo, lo cual es de esperarse debido a la ausencia de nanopartículas. Considerando la Figura 27a y las imágenes TEM de las Figura 23b y Figura 24b, entonces se deduce que el calentamiento inducido por la absorción de luz de las nanopartículas es mayor cuando se tienen varias nanobarras mono dispersas en el nanogel, lo que se atribuye a efectos colectivos entre éstas. Si bien, en el caso del método M1 liofilizado (M1-L) se tiene una mayor cantidad de nanobarras (ver Figura 24b); sin embargo, al estar de manera aglomerada, esto hace que la RPLS de las nanopartículas disminuya (similar a lo observado en la Figura 13a) y por lo tanto también su eficiencia térmica.

En el caso del método M2, con la muestra sin liofilizar el incremento fue alrededor de 5 °C, mientras que con la muestra liofilizada (M2-L) fue menor a 2 °C (Figura 27b). De manera general, el incremento de temperatura fue mucho menor comparado con el método M1, esto es de esperarse ya que como se ve en las imágenes TEM de la Figura 25 y Figura 26, el cargado de las nanobarras en los nanogeles con el método M2 fue mínimo.

Finalmente, es importante mencionar que posteriormente se pretende cargar un fármaco en estos nanogeles cargados con las nanopartículas y realizar experimentos de liberación en líneas celulares. De manera particular, estos nanogeles son sensibles a temperatura cercana a la corporal (37 °C). Por lo tanto, un calentamiento inducido ópticamente puede liberar el fármaco y más aún, con una dosis adecuada de irradiación, se puede causar daño térmico dirigido y localizado en células cancerígenas, el cual se sabe que ocurre a una temperatura mayor a 40 °C. En este sentido, los nanogeles cargados con el método M1 parecen ser los más prometedores.

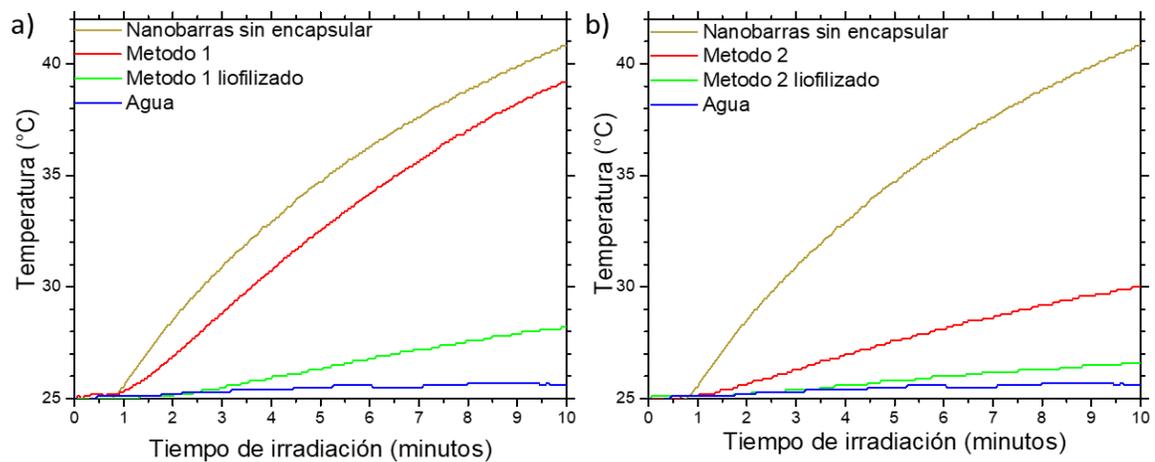


Figura 27: Gráfica de la caracterización térmica de las nanobarras y los nanogeles cargados con nanobarras a) a través del método M1 (nanogeles en sólido y nanobarras en líquido) antes y después de la liofilización y b) a través del método M2 (nanogeles en líquido y nanobarras en sólido) previo y posterior a la liofilización a lo largo de 10 minutos con un láser de 785nm a 500mW.

Capítulo 6. Conclusiones.

En este proyecto de tesis se planteó la realización de estudios para optimizar efectos térmicos inducidos por la absorción de luz en nanopartículas con resonancias plasmónicas en la primera ventana biológica (700-900 nm), enfocados al desarrollo de técnicas de administración dirigida de fármacos en el tratamiento de cáncer. Sobre los resultados obtenidos en este trabajo se deducen las siguientes conclusiones.

- El método químico de crecimiento mediado por semillas resultó ser adecuado para la síntesis de nanobarras con resonancias en el rango espectral de interés (700-900nm).
- El método de concentración mediante el proceso de liofilización no resultó ser muy eficiente ya que se obtuvieron aglomeraciones de las nanobarras en forma de cúmulos. Esto generó una disminución de la resonancia plasmónica de las nanobarras y como consecuencia una baja eficiencia térmica de éstas.
- La eficiencia térmica de las nanopartículas comerciales resultó ser muy similar a la de las nanobarras de oro sintetizadas. Sin embargo, dado que sus dimensiones (~140 nm) son cercanas al tamaño de los nanogeles (200-400 nm), dichas nanopartículas no resultaron ser la mejor opción para su encapsulamiento. Por esta razón, se optó por realizar el cargado de las nanobarras en los nanogeles termosensibles.
- El método de cargado M1 resultó ser el más eficiente, ya que se obtuvo un buen cargado de nanobarras distribuidas de manera monodispersa lo que indujo un incremento de temperatura mayor (cercano a los 14 °C) con respecto al método M2 (alrededor de 5°C). Con el proceso de liofilización, el cargado (y por lo tanto el incremento de temperatura) para ambos métodos fue mucho menor con respecto a las muestras sin liofilizar.
- Finalmente, es importante mencionar que, como continuación a este trabajo de tesis, posteriormente se pretende cargar un fármaco en estos nanogeles cargados con las nanobarras y realizar experimentos de liberación en líneas celulares. De manera particular, estos nanogeles son sensibles a temperatura cercana a la corporal (37 °C). Por lo tanto, un calentamiento inducido ópticamente puede liberar el fármaco y más aún, con una dosis adecuada de irradiación, se puede causar daño

térmico dirigido y localizado en células cancerígenas, el cual se sabe que ocurre a una temperatura mayor a 40 °C. En este sentido, los nanogeles cargados con las nanobarras de oro mediante el método M1 parecen ser los más prometedores.

Literatura citada

- Abadeer, N. S. y Murphy, C. J. 2016. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, 120(9), pp. 4691–4716.
- Akiyama, Y., Mori, T., Katayama, Y. y Niidome, T. 2009. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, 139(1), pp. 81–84.
- Ali, M. R. K., Wu, Y., Tang, Y., Xiao, H., Chen, K., Han, T., Fang, N., Wu, R. y El-Sayed, M. A. 2017. Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, 114(28), pp. E5655–E5663.
- Arunraj, T. R., Rejinold, N. S., Kumar, N. A. y Jayakumar, R. 2013. Doxorubicin-chitin-poly (caprolactone) composite nanogel for drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, 62, pp. 35–43.
- Ayala-Orozco, C., Urban, C., Knight, M. W., Urban, A. S., Neumann, O., Bishnoi, S. W., Mukherjee, S., Goodman, A. M., Charron, H. y Mitchell, T. 2014. Au nanomatryoshkas as efficient near-infrared photothermal transducers for cancer treatment: benchmarking against nanoshells. *ACS nano*, ACS Publications, 8(6), pp. 6372–6381.
- Bae, H. H., Cho, M. Y., Hong, J. H., Poo, H., Sung, M.-H. y Lim, Y. T. 2012. Bio-Derived Poly (γ -Glutamic Acid) Nanogels as Controlled Anticancer Drug Delivery Carriers. *Journal of microbiology and biotechnology*, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 22(12), pp. 1782–1789.
- Baffou, G. 2017. *Thermoplasmonics. Heating Metal Nanoparticles Using Light*. World Scientific.
- Baffou, G. y Quidant, R. 2013. Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser & Photonics Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, 7(2), pp. 171–187. doi:<https://doi.org/10.1002/lpor.201200003>
- Barchiesi, D. 2015. Lycurgus Cup: inverse problem using photographs for characterization of matter. *JOSA A*, Optical Society of America, 32(8), pp. 1544–1555.
- Blackburn, W. H. y Lyon, L. A. 2008. Size-controlled synthesis of monodisperse core/shell nanogels. *Colloid and Polymer Science*, Springer, 286(5), pp. 563–569.
- Bohren, C. F. y Huffman, D. R. 2008. *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons.
- Brongersma, M. L., Halas, N. J. y Nordlander, P. 2015. Plasmon-induced hot carrier science and technology. *Nature nanotechnology*, Nature Publishing Group, 10(1), pp. 25–34.

- Calvillo-Vázquez, J. G., Guillén-Ramírez, H. A., DíazDuarte-Rodríguez, M., Licea-Claverie, A. y Méndez, E. R. 2019. Particle size distribution from extinction and absorption data of metallic nanoparticles. *Applied Optics*, Optical Society of America, 58(36), p. 9955. doi:10.1364/ao.58.009955
- Calvillo Vázquez, J. G. 2020. Resonancias plasmónicas en nanopartículas: Esparcimiento inverso y aspectos térmicos. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, pp. 115 .
- Chacko, R. T., Ventura, J., Zhuang, J. y Thayumanavan, S. 2012. Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced drug delivery reviews*, Elsevier, 64(9), pp. 836–851.
- Choi, W. Il, Sahu, A., Kim, Y. H. y Tae, G. 2012. Photothermal cancer therapy and imaging based on gold nanorods. *Annals of biomedical engineering*, Springer, 40(2), pp. 534–546.
- Cole, J. R., Mirin, N. A., Knight, M. W., Goodrich, G. P. y Halas, N. J. 2009. Photothermal efficiencies of nanoshells and nanorods for clinical therapeutic applications. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, 113(28), pp. 12090–12094.
- Cooke, D. D. y Kerker, M. 1969. Light scattering from long thin glass cylinders at oblique incidence. *JOSA*, Optical Society of America, 59(1), pp. 43–48.
- DíazDuarte-Rodríguez, M., Cortez-Lemus, N. A., Licea-Claverie, A., Licea-Rodríguez, J. y Méndez, E. R. 2019. Dual Responsive Polymersomes for Gold Nanorod and Doxorubicin Encapsulation: Nanomaterials with Potential Use as Smart Drug Delivery Systems. *Polymers*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 11(6), p. 939.
- Dickerson, E. B., Dreaden, E. C., Huang, X., El-Sayed, I. H., Chu, H., Pushpanketh, S., McDonald, J. F. y El-Sayed, M. A. 2008. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer letters*, Elsevier, 269(1), pp. 57–66.
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C. y Mirkin, C. A. 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, Wiley Online Library, 49(19), pp. 3280–3294.
- Gole, A. y Murphy, C. J. 2004. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, 16(19), pp. 3633–3640.
- González-Ayón, M. A., Sañudo-Barajas, J. A., Picos-Corrales, L. A. y Licea-Claverie, A. 2015. PNVC-PEGMA nanohydrogels with tailored transition temperature for controlled delivery of 5-fluorouracil. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, Wiley Online Library, 53(22), pp. 2662–2672.
- Govorov, A. O. y Richardson, H. H. 2007. Generating heat with metal nanoparticles. *Nano today*, Elsevier, 2(1), pp. 30–38.
- Herzog, J. B., Knight, M. W. y Natelson, D. 2014. Thermoplasmonics: quantifying plasmonic heating in single nanowires. *Nano letters*, ACS Publications, 14(2), pp. 499–503.

- Hinman, J. G., Stork, A. J., Varnell, J. A., Gewirth, A. A. y Murphy, C. J. 2016. Seed mediated growth of gold nanorods: towards nanorod matryoshkas. *Faraday discussions*, The Royal Society of Chemistry, 191, pp. 9–33.
- Hong, Y., Lee, E., Choi, J., Oh, S. J., Haam, S., Huh, Y.-M., Yoon, D. S., Suh, J.-S. y Yang, J. 2012. Gold nanorod-mediated photothermal modulation for localized ablation of cancer cells. *Journal of Nanomaterials*, Hindawi, 2012.
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. y El-Sayed, M. A. 2008. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science*, Springer, 23(3), pp. 217–228.
- Huang, X., Neretina, S. y El-Sayed, M. A. 2009. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced materials*, Wiley Online Library, 21(48), pp. 4880–4910.
- Hwang, S., Nam, J., Jung, S., Song, J., Doh, H. y Kim, S. 2014. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: current status and future perspective. *Nanomedicine, Future Medicine*, 9(13), pp. 2003–2022.
- Jana, N. R., Gearheart, L. y Murphy, C. J. 2001. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, 105(19), pp. 4065–4067.
- Kim, H. S. y Lee, D. Y. 2017. Photothermal therapy with gold nanoparticles as an anticancer medication. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, Springer, 47(1), pp. 19–26.
- Kim, M., Lee, J. y Nam, J. 2019. Plasmonic photothermal nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Science*, Wiley Online Library, 6(17), p. 1900471.
- Langer, R. 1998. Drug delivery and targeting. *Nature*, 392(6679 Suppl), pp. 5–10.
- Le Ru, E. y Etchegoin, P. 2008. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier.
- Link, S. y El-Sayed, M. A. 2000. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International reviews in physical chemistry*, Taylor & Francis, 19(3), pp. 409–453.
- Liu, X., Shan, G., Yu, J., Yang, W., Ren, Z., Wang, X., Xie, X., Chen, H. y Chen, X. 2017. Laser heating of metallic nanoparticles for photothermal ablation applications. *AIP Advances*, AIP Publishing LLC, 7(2), p. 25308.
- Mackey, M. A., Ali, M. R. K., Austin, L. A., Near, R. D. y El-Sayed, M. A. 2014. The most effective gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: theory and in vitro experiments. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, 118(5), pp. 1319–1326.
- Maier, S. A. 2007. *Plasmonics: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.

- Maya, S., Sarmiento, B., Nair, A., Rejinold, N. S., Nair, S. V y Jayakumar, R. 2013. Smart stimuli sensitive nanogels in cancer drug delivery and imaging: a review. *Current pharmaceutical design*, Bentham Science Publishers, 19(41), pp. 7203–7218.
- Mie, G. 1908. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der physik*, Wiley Online Library, 330(3), pp. 377–445.
- Neumann, O., Urban, A. S., Day, J., Lal, S., Nordlander, P. y Halas, N. J. 2013. Solar vapor generation enabled by nanoparticles. *ACS nano*, ACS Publications, 7(1), pp. 42–49.
- Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y. y Niidome, Y. 2006. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, 114(3), pp. 343–347.
- Nikoobakht, B. y El-Sayed, M. A. 2003. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, 15(10), pp. 1957–1962.
- Okuno, T., Kato, S., Hatakeyama, Y., Okajima, J., Maruyama, S., Sakamoto, M., Mori, S. y Kodama, T. 2013. Photothermal therapy of tumors in lymph nodes using gold nanorods and near-infrared laser light. *Journal of controlled release*, Elsevier, 172(3), pp. 879–884.
- Pattani, V. P. y Tunnell, J. W. 2012. Nanoparticle-mediated photothermal therapy: A comparative study of heating for different particle types. *Lasers in surgery and medicine*, Wiley Online Library, 44(8), pp. 675–684.
- Raemdonck, K., Demeester, J. y De Smedt, S. 2009. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter*, Royal Society of Chemistry, 5(4), pp. 707–715.
- Rycenga, M., Cobley, C. M., Zeng, J., Li, W., Moran, C. H., Zhang, Q., Qin, D. y Xia, Y. 2011. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical reviews*, ACS Publications, 111(6), pp. 3669–3712.
- Sciau, P. 2012. Nanoparticles in ancient materials: the metallic lustre decorations of medieval ceramics (Vol. 115). INTECH Open Access Publisher.
- Serrano-Medina, A., Oroz-Parra, I., Gomez-Resendiz, V. E., Licea-Navarro, A., Licea-Claverie, A. y Cornejo-Bravo, J. M. 2018. Temperature-and pH-sensitive core-shell nanogels as efficient carriers of doxorubicin with potential application in lung cancer treatment. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Taylor & Francis, 67(1), pp. 20–26.
- Shang, T., Wang, C., Ren, L., Tian, X., Li, D., Ke, X., Chen, M. y Yang, A. 2013. Synthesis and characterization of NIR-responsive Au rod@ pNIPAAm-PEGMA nanogels as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Nanoscale research letters*, SpringerOpen, 8(1), pp. 1–8.
- Singh, M., Harris-Birtill, D. C. C., Zhou, Y., Gallina, M. E., Cass, A. E. G., Hanna, G. B. y Elson, D. S. 2016. Application of gold nanorods for photothermal therapy in ex vivo human oesophagogastric

- adenocarcinoma. *Journal of biomedical nanotechnology*, American Scientific Publishers, 12(3), pp. 481–490.
- Sivaram, A. J., Rajitha, P., Maya, S., Jayakumar, R. y Sabitha, M. 2015. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol*, 7, pp. 509–533.
- Soni, K. S., Desale, S. S. y Bronich, T. K. 2016. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, 240, pp. 109–126.
- Su, S., Wang, H., Liu, X., Wu, Y. y Nie, G. 2013. iRGD-coupled responsive fluorescent nanogel for targeted drug delivery. *Biomaterials*, Elsevier, 34(13), pp. 3523–3533.
- Wang, Y., Black, K. C. L., Luehmann, H., Li, W., Zhang, Y., Cai, X., Wan, D., Liu, S.-Y., Li, M. y Kim, P. 2013. Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS nano*, ACS Publications, 7(3), pp. 2068–2077.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.-S. y Chen, G. 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, Elsevier, 20(5), pp. 595–601.
- Wiley, B., Sun, Y. y Xia, Y. 2007. Synthesis of silver nanostructures with controlled shapes and properties. *Accounts of chemical research*, ACS Publications, 40(10), pp. 1067–1076.
- Xia, K., Zhang, L., Huang, Y. y Lu, Z. 2015. Preparation of gold nanorods and their applications in photothermal therapy. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, American Scientific Publishers, 15(1), pp. 63–73.
- Zha, L., Banik, B. y Alexis, F. 2011. Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*, Royal Society of Chemistry, 7(13), pp. 5908–5916.
- Zhong, Y., Wang, C., Cheng, L., Meng, F., Zhong, Z. y Liu, Z. 2013. Gold nanorod-cored biodegradable micelles as a robust and remotely controllable doxorubicin release system for potent inhibition of drug-sensitive and-resistant cancer cells. *Biomacromolecules*, ACS Publications, 14(7), pp. 2411–2419.