

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Comparación del efecto de la morfología entre esferas y  
rodillos de oro incorporados en hidrogeles en la  
biocompatibilidad en fibroblastos para su uso potencial en la  
cicatrización**

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

Presenta:

**Anahi Lezama Baldenebro**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Anahi Lezama Baldenebro**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dr. José Manuel Romo Herrera**  
Co-Director de tesis

**Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno**  
Co-Directora de tesis

**Dr. Hugo Alejandro Borbón Núñez**

**Dra. Ernestina Castro Longoria**



**Dra. Catalina López Bastidas**  
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Anahi Lezama Baldenebro** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Nanociencias.

**Comparación del efecto de la morfología entre esferas y rodillos de oro incorporados en hidrogeles en la biocompatibilidad en fibroblastos para su uso potencial en la cicatrización**

Resumen aprobado por:

Dr. José Manuel Romo Herrera  
**Co-director de tesis**

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno  
**Co-directora de tesis**

La química superficial, tamaño y forma de las nanopartículas de oro son propiedades fisicoquímicas útiles para diversas aplicaciones biomédicas, sobre todo para promover la cicatrización de heridas. Uno de los enfoques principales para probar sistemas nanocompuestos en biomedicina es combinarlos con sistemas micro/macroscópicos, logrando como resultado la sinergia de sus propiedades fisicoquímicas; por ejemplo, las nanopartículas de oro embebidas en hidrogeles para crear dispositivos multifuncionales para la ingeniería de tejidos. La biocompatibilidad es un parámetro fundamental para promover el crecimiento y reparación tisular, se ha reportado que las nanopartículas de oro pueden propiciar el crecimiento celular por lo que al encontrarse embebidas en una red de hidrogel tienen gran potencial como nuevo biomaterial para aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Este trabajo expone la síntesis y evaluación de la biocompatibilidad en fibroblastos murinos de nanopartículas de oro con morfología esférica y de rodillo, al haber introducido estos nanomateriales en hidrogeles poliméricos. La caracterización demostró el diámetro promedio para nanoesferas de oro 25 nm y la relación de aspecto de 8.62 para nanorodillos; a su vez se evaluó su citotoxicidad con base en su morfología y concentración sin obtener afecciones en la viabilidad del cultivo celular, sin embargo, al combinar las nanopartículas de oro con la síntesis de hidrogeles de alginato, la biocompatibilidad de las células se vio comprometida ante la presencia del nanocompuesto, dado que la producción de especies reactivas de oxígeno se aumentó y los sistemas AuNPs-Hidrogeles no promovieron la adhesión necesaria al material híbrido impidiendo el crecimiento de la línea celular de fibroblastos murinos.

**Palabras clave:** Nanopartículas de oro, hidrogeles, nanocompuesto, fibroblastos, regeneración de heridas

Abstract of the thesis presented by **Anahi Lezama Baldenebro** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

**Comparison of the morphological effect between gold spheres and rods incorporated into hydrogels on fibroblast biocompatibility for their potential use in healing**

Abstract approved by:

Dr. José Manuel Romo Herrera  
**Thesis Co-director**

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno  
**Thesis Co-Director**

The surface chemistry, size, and morphology of gold nanoparticles are physicochemical properties valuable for various biomedical applications, particularly in promoting wound healing. One of the main approaches to test nanocomposite systems in biomedicine is to combine them with micro/macroscale systems, resulting in the synergy of their physicochemical properties. For example, embedding gold nanoparticles in hydrogels can create multifunctional devices for tissue engineering. Biocompatibility is a fundamental parameter for promoting tissue growth and repair. It has been reported that gold nanoparticles can enhance cell growth, making them highly promising as a new biomaterial for tissue engineering applications when embedded in a hydrogel network. This work presents the synthesis and evaluation of biocompatibility in murine fibroblasts of gold nanoparticles with spherical and rod-like morphologies when introduced into polymeric hydrogels. Characterization demonstrated an average diameter of 25 nm for gold nanospheres and an aspect ratio of 8.62 for nanorods. Their cytotoxicity was evaluated based on morphology and concentration, showing no adverse effects on cell viability. However, cell biocompatibility was compromised when combining gold nanoparticles with alginate hydrogel synthesis, in the presence of the nanocomposite. This was evidenced by an increase in the production of reactive oxygen species, and the AuNPs-Hydrogels systems did not promote the required cell adhesion for the growth of murine fibroblast cell line.

**Keywords: Gold nanoparticles, hydrogels, nanocomposite, fibroblasts, wound healing**

## **Dedicado a:**

### **Los seres más leales...**

*Porque si tuviera la oportunidad de volver a ver los ojitos más bonitos del universo lo haría sin dudar, porque eras la última en verme partir y siempre eras la primera en verme llegar, incluso me recibiste una vez más antes que decidieras partir sin yo estar para poderte abrazar. Gracias por toda una vida dedicada a protegernos y a sacarnos risas con tus torpezas, eres el lugar más seguro que podrá haber en casa y ahora en tu ausencia has dejado a dos que un poco más inteligentes nos llenan de amor. Dory, sin decir nada siempre lo dijiste todo con tu mirada. Lumi, eres una aventura intrépida y sin fronteras, y Pixy, quisiera dormir tanto como tú lo haces.*

### **“Tienes la fuerza de tu grandeza”**

*Desde el momento que desarrollamos conciencia y memoria, partiendo un 02 de septiembre de 1998 y que pasados 25 años no podría no reconocer lo que ha costado, por lo que has pasado y en lo que te has convertido, antes y después con TAG, TDM, PTSD, con subidas y bajadas, con sueños y metas tan grandes como tu corazón y con la interminable lucha interna de ser cada día mejor que el anterior, sabiendo que ganar no solo se trata de victorias, sino de ver más allá, de atreverse, explorar, conocer, aprender y enseñar. Porque para verte ganar no me importa perder, solo no olvides que puedes con todo, pero no con todo a la vez.*

**Esto es tuyo Anahi, esto siempre ha sido tuyo.**

## Agradecimientos

Gracias al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN-UNAM) y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM (CFATA-UNAM), por permitirme ingresar al programa de posgrado y darme los conocimientos, herramientas e instalaciones necesarias para realizar el proyecto plasmado en esta tesis, que desde el día uno (sin saber cuánto) hizo que mi vida cambiara.

Agradezco el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN111223 de la DGAPA-UNAM y los proyectos A1-S-17539 y Fordecyt 272894 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), así como la beca de maestría (CVU 944566) otorgada para el financiamiento de mi vida como estudiante. Agradezco la participación de la Dra. Ernestina Castro y el Dr. Hugo Borbón, quienes siempre mostraron la mejor disposición y observaciones constructivas a lo largo del proyecto.

Gracias a mi asesora, la Dra. Karla O. Juárez, quien me enseñó cómo hay tanta magia y universo dentro de pequeñas cajas con vida microscópica. A mi asesor, el Dr. Pepe Romo, quien nunca me desalentó por más derrotas que obtuviera, sino que siempre veía alguna alternativa que podría funcionar y festejaba conmigo esas victorias.

Por supuesto, gracias a Dios y a mis padres por siempre apoyarme aún por encima de sus perspectivas, por permitirme crecer y por siempre tener los brazos abiertos para recibirme en casa y decirme que me aman. Gracias a mis eternos compañeros, mis hermanos Estuardo, Marie y Bradley, porque su compañía, su ayuda y su amor a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes.

Claro que agradezco las innumerables horas en soledad escuchando a Juan Gabriel, Adele y Valentín Elizalde, quienes solo convergen en la divergencia de mis gustos musicales.

A todos los personajes involucrados: Arlen, con quien las risas nunca faltan; las niñas, que nunca me dejaron sola y han sido mi pilar ante la locura del posgrado; nanotitas, mis grandes compañeros de aventuras; los funados, mi familia queretana (en particular Monse con su sonrisa y un café); los peperianos y el NanotoxLab quienes estuvieron pendientes de mis pasos (en especial Germán con su conocimiento, apoyo y risa insoportable y Christian con su objetividad y su linda amistad); gracias a Natan, el dueto perfecto para aprender lo que no hay que hacer y finalmente, gracias a Heriberto por ser mi más grande apoyo, por enseñarme a creer y porque ahora sé cómo es la paz.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas .....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	5
1.1.1 Nanopartículas de oro (AuNPs).....	5
1.1.2 Hidrogeles de alginato.....	7
1.1.3 AuNPs incorporadas en hidrogeles .....	8
1.1.4 Comportamiento celular ante AuNPs-hidrogeles .....	9
1.2 Hipótesis .....	10
1.3 Objetivos.....	10
1.3.1 Objetivo general.....	10
1.3.2 Objetivos específicos.....	10
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>11</b>
2.1 Preparación de Nanomateriales de oro en hidrogeles.....	11
2.1.1 Síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs).....	11
2.1.2 Síntesis de nanorodillos de oro (AuNRs).....	12
2.1.3 Transferencia de nanorodillos de oro .....	13
2.1.4 Síntesis de hidrogeles de alginato .....	14
2.1.5 Incorporación de nanopartículas en hidrogeles.....	15
2.2 Biocompatibilidad en modelos celulares.....	15
2.2.1 Ensayo colorimétrico de reducción del MTT.....	16
2.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en fibroblastos.....	18
2.2.3 Ensayo de reducción de la resazurina .....	19
2.2.4 Evaluación de la morfología de fibroblastos .....	20



<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>21</b>
3.1 Nanopartículas de oro incorporadas en hidrogeles de alginato .....	21
3.1.1 Síntesis y caracterización de naoesferas de oro (AuNEs).....	21
3.1.2 Estimación del tamaño óptimo de AuNEs.....	22
3.1.3 Escalamiento de la síntesis y caracterización de AuNEs.....	24
3.1.4 Estimación de la cantidad de AuNEs.....	25
3.1.5 Síntesis y caracterización de nanorodillos de oro (AuNRs) .....	26
3.1.6 Estimación de la cantidad de AuNRs.....	30
3.1.7 Transferencia de nanorodillos de CTAB a citrato .....	30
3.1.8 Hidrogeles de alginato.....	33
3.1.9 Hidrogeles de alginato con nanopartículas de oro .....	35
3.2 Modelo celular en presencia de AuNPs-Hidrogeles .....	36
3.2.1 Evaluación de la biocompatibilidad de AuNPs .....	36
3.2.2 Influencia de AuNPs-Hidrogel en la producción de ROS .....	38
3.2.3 Viabilidad celular por reducción de la rezasurina .....	39
3.2.4 Adaptabilidad morfológica de células .....	40
<b>Capítulo 4. Discusión.....</b>	<b>42</b>
4.1 Nanomateriales de oro .....	42
4.2 Hidrogeles con AuNPs.....	45
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>49</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Propiedades fisicoquímicas de AuNPs (Hammami et al., 2021). .....	2
2. Enfoques principales utilizados para obtener sistemas de nanopartículas embebidas en hidrogeles (Thoniyot et al., 2015). .....	4
3. Enfoques básicos para la preparación de nanopartículas (Elahi et al., 2018). .....	6
4. Proliferación de fibroblastos (Beanes et al., 2003). .....	9
5. Síntesis de Bastús et al., 2011, para nanopartículas de oro esféricas. ....	11
6. Síntesis de Chang & Murphy, 2018, para nanorodillos de oro. ....	12
7. Intercambio de ligandos en la superficie de nanopartículas de oro a través de la deposición el grabado de plata (Zhou et al., 2018). .....	13
8. Transferencia de ligando de AuNRs@CTAB a citrato (Zhou et al., 2018). .....	14
9. Preparación de hidrogeles de alginato de sodio. ....	14
10. Preparación de hidrogeles con nanopartículas de oro embebidas. ....	15
11. Generaciones de nanoesferas de oro con su espectro de UV-Vis. ....	21
12. A) Espectro UV-Vis del escalamiento de síntesis de AuNEs y B) tabla de datos de absorbancia y concentración de Au <sup>0</sup> . .....	24
13. A-C) Micrografías TEM de nanoesferas de oro (G1 90 mL). D) Histograma del radio promedio de nanoesferas de oro (n=127). .....	25
14. Espectro UV-Vis de AuNRs de 19 y 25 $\mu$ L de HCl. ....	26
15. Espectro UV-Vis de AuNRs en volúmenes extremos e intermedios de HCl. ....	27
16. A) Espectros y B) señales de UV-Vis de lotes A, B y C de AuNRs. ....	27
17. Regresión lineal de los datos reportados por Chang & Murphy, 2018. ....	28
18. A) Tabla con la relación de aspecto según la señal LSPR; B) Grafica de la señal LSPR y relación de aspecto teórica (datos obtenidos a partir de la regresión lineal de los datos de Chang & Murphy, 2018. ....	28
19. A-B) Micrografías TEM de nanorodillos. C-D) Histogramas del largo y ancho de nanorodillos de oro. Histograma de la relación de aspecto de nanorodillos de oro (AuNRs@CTAB Lote C (23)). .....	29

20. A) Espectros UV-Vis de la transferencia de AuNRs de CTAB a citrato; B) Espectros UV-Vis de la transferencia de AuNRs@CTAB de CTAB a citrato (V = 9.5 mL). .....	31
21. a-c) Micrografías TEM de AuNRs después de la transferencia de CTAB a citrato. ....	31
22. a) Micrografía TEM de AuNRs@Citrato, b-c) Análisis elemental (espectros EDX) de AuNRs@Citrato. ....	32
23. a) Micrografía TEM de AuNRs@Citrato, b-c) Barridos de línea de AuNRs@Citrato. ....	33
24. Curvas de secado de hidrogeles blancos con distintos pesos de alginato y tiempos de refrigeración (A) 2h, (B) 24 h y (C) 48 h. ....	34
25. Curvas de hinchamiento de hidrogeles blancos con distintos pesos de alginato y tiempos de refrigeración (A) 2h, (B) 24 h y (C) 48 h. ....	34
26. Curva de secado de hidrogeles cargados con AuNEs. ....	35
27. Curva de secado de hidrogeles blancos e hidrogeles cargados con 2 mL de solución de AuNPs. ....	36
28. A) Viabilidad y B) producción de ROS de fibroblastos de la línea 3T3-L1 en presencia de nanopartículas de oro en morfologías esféricas y de rodillo. ....	37
29. Producción de ROS de la línea 3T3-L1 posterior a 7 días de incubación en presencia de los nanosistemas AuNPs-Hidrogeles. ....	38
30. A-B) Intensidad y coloración de rezasurina reducida por fibroblastos 3T3-L1 adheridos a la placa después de la incubación con nanocompuestos (n=3). C-D) Intensidad y coloración de rezasurina reducida por fibroblastos 3T3-L1 adheridos a los nanocompuestos (n=3). ....	40
31. Micrografías de cultivos de fibroblastos murinos 3T3-L1 en presencia de nanopartículas de oro en morfologías esféricas y de rodillo. ....	41

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Datos de UV-Vis de nanoesferas de oro. ....	22
2. Diámetro de AuNEs según la señal LSPR (Bastús et al., 2011). ....	22
3. Número de partículas calculado para AuNRs. ....	30
4. Comparativa de la síntesis de nanoesferas de oro de Bastús et al., 2011. ....	42
5. Señales de LSPR para AuNRs de 19 y 25 $\mu$ L de HCl (Chang & Murphy, 2018). ....	43

## Capítulo 1. Introducción

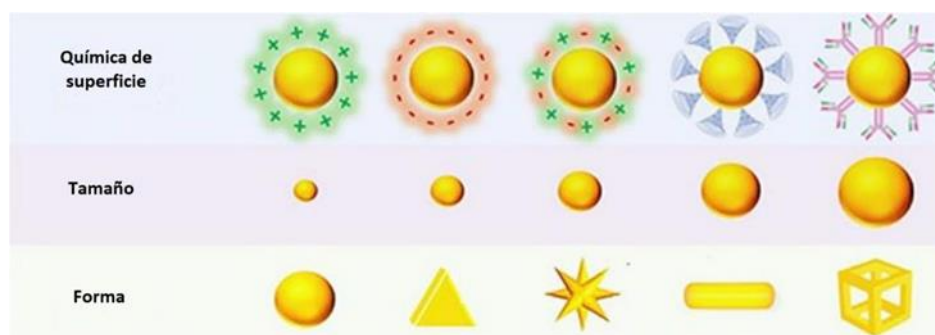
---

Mientras que la nanociencia se refiere al estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de las de una escala mayor; la nanotecnología conlleva el diseño, la caracterización, la elaboración y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño a escala nanométrica (The Royal Society, 2004). Los nanomateriales, por su parte son aquellos materiales que tienen al menos una dimensión que cae en la escala nanométrica e incluyen nanopartículas, puntos cuánticos, nanovarillas y nanocables, películas delgadas y materiales a granel hechos de bloques de construcción a nanoescala (Cao & Wang, 2011). Los nanomateriales han revolucionado nuestra perspectiva del mundo y la materia, puesto que muestran propiedades ópticas, eléctricas y químicas diferentes en comparación con los materiales macroscópicos debido a su tamaño en escala nanométrica. Además, el estudio de la nanotecnología y los nanomateriales han tenido importantes aportaciones en áreas como biomedicina, medio ambiente, electrónica, construcción, fuentes de energía limpia y alternativa, entre otros ámbitos (Debnath & Das, 2020).

Debido a sus propiedades superficiales y dependiendo del tamaño, forma y estado de agregación de los mismos, los nanomateriales pueden ejercer diferentes efectos en los sistemas biológicos que dependerán entre muchos otros factores del tipo de célula, rutas de absorción y efecto en los diferentes organelos, por lo que es primordial estudiar y considerar la interacción de los nanomateriales o nanopartículas con el entorno biológico que los rodea, ya que esto conlleva un impacto en su actividad biológica abriendo una ventana de posibilidades para una mayor comprensión de estas interacciones y el desarrollo de los nanomateriales con fines diagnósticos y terapéuticos (Zhang, 2015).

Uno de los materiales que en particular resalta dentro de la nanotecnología, son las nanopartículas metálicas, por su alto potencial de ser utilizadas en aplicaciones biológicas, ya que pueden sintetizarse y modificarse con varios grupos funcionales químicos que les permiten conjugarse con anticuerpos, ligandos y fármacos de interés. Por lo tanto, abren una gama amplia de aplicaciones potenciales en biotecnología, separación magnética y preconcentración de analitos objetivo (Amini, 2019). Las nanopartículas pueden ser sintetizadas de metales u óxidos metálicos, uno de los metales más utilizados es el oro. Las características intrínsecas de las nanopartículas de oro (AuNPs, por sus siglas en inglés) se derivan de sus propiedades de química superficial, tamaño y forma (figura 1). Entre ellas destacan el coeficiente de absorción de rayos X alto, facilidad de manipulación sintética, fuerte afinidad de unión a tioles, disulfuros

y aminas, propiedades optoelectrónicas distintas y únicas relacionadas con la forma (como la resonancia de plasmón de superficie localizado), relación superficie-volumen grande, biocompatibilidad y toxicidad baja. Estos atributos físicoquímicos hacen que las AuNPs sean materiales prometedores para aplicaciones diversas en campos terapéuticos, de detección y diagnóstico, bioetiquetado, administración de fármacos, detección química y biológica, imágenes, óptica no lineal, fotovoltaica y catálisis (Elahi et al., 2018).



**Figura 1.** Propiedades físicoquímicas de AuNPs (Hammami et al., 2021).

Cuando se trata de integrar AuNPs para aplicaciones biomédicas es primordial considerar la citotoxicidad del nanomaterial, en este sentido las propiedades físicoquímicas de los nanomateriales que afectan esta toxicidad como la forma, el tamaño, la superficie química y la concentración; además, también es importante considerar el tipo de células en los que se pretende realizar ensayos, ya que pueden tener una susceptibilidad diferente a cada tipo de nanomaterial (Hammami et al., 2021). Otro factor importante es la formación de la corona proteica sobre el nanomaterial, una vez que esté en contacto con un medio biológico, ya que este recubrimiento biológico puede modificar las propiedades físicoquímicas y la función del nanomaterial (Yadid et al., 2019).

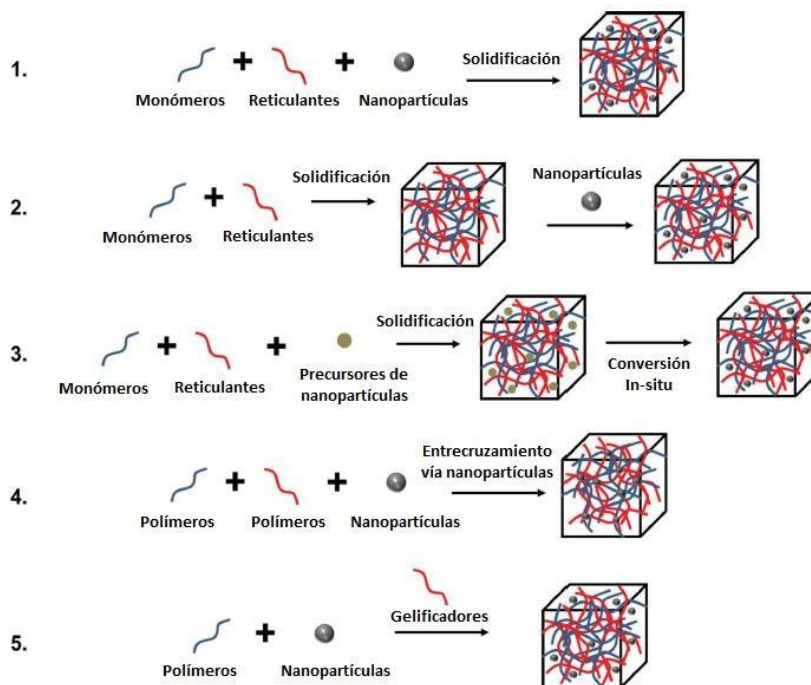
Dentro de la biomedicina, la combinación de sistemas nanométricos con sistemas a escalas mayores da como resultado la sinergia de las propiedades de cada sistema trabajando en conjunto; ejemplo de esto son las AuNPs embebidas en hidrogeles para crear dispositivos multifuncionales. La incorporación de nanomateriales en redes de hidrogel brinda diversidad estructural con propiedades biomédicas y químicas, lo cual puede conducir a aplicaciones terapéuticas prometedoras (Choi et al., 2022).

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos que pueden hincharse al absorber agua y retener una gran cantidad de esta, mientras mantienen su estructura debido al entrecruzamiento químico o físico de las cadenas de polímeros individuales (Bahram et al., 2016). Algunas de sus atributos

característicos incluyen propiedades mecánicas como la estabilidad y elasticidad, hinchazón, tamaño de red y degradación (Caliari & Burdick, 2016). Los hidrogeles poliméricos se han utilizado para encapsular fármacos y administrar productos terapéuticos debido a su capacidad para absorber agua con grupos funcionales hidrofílicos en el esqueleto del polímero. Según el polímero utilizado y la densidad de la estructura de la red, los hidrogeles poliméricos pueden contener hasta 40 veces más contenido de agua y fluidos biológicos. El hidrogel tiene una estructura y composición que podría llegar a ser comparable a la matriz extracelular (ECM) de los tejidos de los mamíferos, tienen una mecánica similar a la de muchos tejidos blandos y pueden ayudar a la adhesión celular y el secuestro de proteínas, por lo que han demostrado ser útiles en una variedad de aplicaciones de cultivo celular, lo que puede permitir la unión de células y biomoléculas, además, su excelente biodegradabilidad permite que sea excretado del cuerpo sin respuestas inmunes o inflamatorias (Caliari & Burdick, 2016; Choi et al., 2022).

Los hidrogeles sufren una transición de fase de volumen significativa, conocida como transición de fase sol-gel en respuesta a ciertos estímulos físicos (temperatura, campos eléctricos y magnéticos, composición del solvente, entre otros) y químicos (pH, iones y composiciones químicas específicas). Cabe resaltar que en la mayoría de los casos tales transiciones son reversibles; por lo tanto, los hidrogeles son capaces de volver a su estado inicial después de una reacción tan pronto como se retire el estímulo. La respuesta de los hidrogeles a los estímulos externos está determinada principalmente por la naturaleza del monómero, la densidad de carga, las cadenas sueltas y el grado de entrecruzamiento; aunado a esto, la magnitud de la respuesta también es directamente proporcional al estímulo externo aplicado (Bahram et al., 2016).

La combinación de dos materiales diferentes, por ejemplo, nanopartículas e hidrogeles, conducen a materiales avanzados con propiedades únicas, ausentes en los componentes individuales. Retomando el ejemplo, se han propuesto tres modelos supramoleculares de sistemas de nanopartículas e hidrogeles; estos son: micro o nanogeles que estabilizan nanopartículas individuales/múltiples, nanopartículas inmovilizadas no covalentemente en una matriz de hidrogel y nanopartículas inmovilizadas covalentemente en una matriz de hidrogel. En el desarrollo de sistemas de nanopartículas e hidrogel se han utilizado cinco enfoques principales para obtener una distribución uniforme (figura 2): 1) formación de hidrogel en una suspensión de nanopartículas, 2) incrustación física de las nanopartículas en la matriz de hidrogel después de la gelificación, 3) formación de nanopartículas reactivas dentro de un gel preformado, 4) reticulación usando nanopartículas para formar hidrogeles y 5) formación de gel utilizando nanopartículas, polímeros y distintas moléculas gelificadoras (Thoniyot et al., 2015).



**Figura 2.** Enfoques principales utilizados para obtener sistemas de nanopartículas embebidas en hidrogeles (Thoniyot et al., 2015).

Las propiedades impartidas a los sistemas poliméricos dependen del tipo de nanopartículas incorporadas, que a su vez está determinada por la aplicación propuesta del diseño. Varios grupos han demostrado que los sistemas compuestos de AuNPs e hidrogeles son conductores y sensibles a estímulos. Además, han demostrado su eficacia en sensores basados en resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés) y aplicaciones antibacterianas, pero el costo alto del oro ha impedido hasta ahora la implementación a gran escala de AuNPs para tales aplicaciones (Thoniyot et al., 2015).

Una aplicación potencial para estos sistemas compuestos es propiciar la cicatrización de heridas. La piel es un órgano muy importante, que a su vez es vulnerable, ya que cubre la superficie del cuerpo humano y contacta directamente con el ambiente. Además, tiene los efectos de sentir estímulos externos y regular la temperatura corporal, protegiendo así al cuerpo humano de los factores abióticos. Las heridas en la piel se refieren a una interrupción de la estructura y función del tejido que constituye la piel; en donde se pierde su mecanismo protector, lo que puede permitir que microorganismos ingresen, formen colonias, infecten el sitio herido y retrasen el proceso de curación, incluso causando complicaciones potencialmente mortales. El proceso de cicatrización de heridas consta de 4 etapas principales: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación que, en última instancia, conducen a la formación de cicatrices (Liang et al., 2021; Ramani et al., 2015).



Debido a su buena hidrofilia, biocompatibilidad y estructura porosa tridimensional (3D), que puede mimetizar el arreglo físico de la ECM, los hidrogeles se han convertido en buenos candidatos para el tratamiento de heridas (Liang et al., 2021). No obstante, las AuNP también pueden ser eficientes en la cicatrización, ya que pueden promover la curación e inhibir la colonización microbiana, al mismo tiempo que son transdérmicamente activos. Recientemente, se ha demostrado que compuestos de AuNPs e hidrogeles pueden promover el crecimiento, migración y diferenciación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, sin afectar la viabilidad celular (Mihai et al., 2019; Ramani et al., 2015). Con el aprovechamiento de las propiedades de estos materiales, es posible obtener un material compuesto impulsado por la sinergia de las cualidades de cada una de las partes. Es por lo que en este trabajo se abordará la síntesis, caracterización e impregnación de AuNPs dentro de una matriz de hidrogel para evaluar el efecto de la morfología en la biocompatibilidad de estos nanomateriales en células de la piel derivadas de fibroblastos, además de analizar su uso potencial como auxiliar en la cicatrización de heridas.

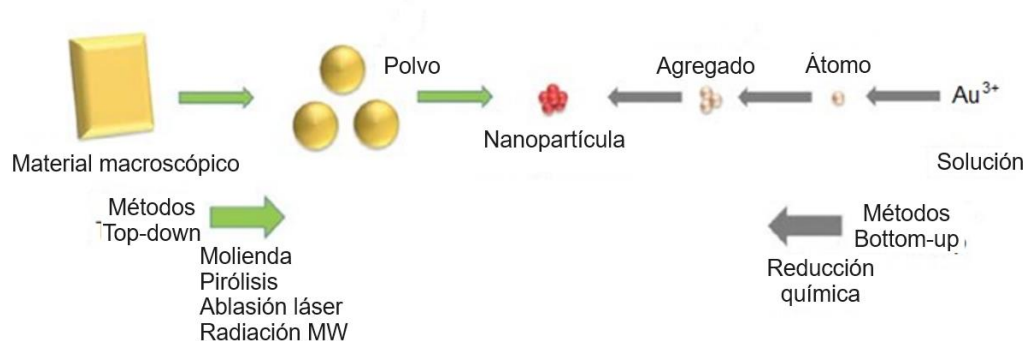
## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)**

El uso de nanopartículas de oro (AuNPs) se remonta a la época de los antiguos romanos, más adelante, en la era moderna de la síntesis de AuNPs con el trabajo de Michael Faraday, se observó que las dispersiones de oro coloidal tienen propiedades que difieren del oro macroscópico. Durante el último medio siglo, se han desarrollado métodos confiables y de alto rendimiento para la síntesis de AuNPs, incluidos aquellos con formas esféricas y no esféricas (Giljohann et al., 2010). La fisicoquímica de las AuNPs ha surgido como una nueva subdisciplina en el dominio de los coloides, ya que las propiedades ópticas inusuales de las partículas de oro pequeñas, su electroquímica dependiente del tamaño y su alta estabilidad química las han convertido en el sistema modelo de elección para explorar una amplia gama de fenómenos que incluyen autoensamblaje, biomarcage, catálisis, teorías de transferencia de electrones, transferencia de fase, fusión, ensayos de ADN y crecimiento de cristales (Sardar et al., 2009).

Hasta la fecha, existen numerosos métodos para la síntesis de AuNPs, que siguen metodologías “top-down” y “bottom up” (de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba, respectivamente), como se muestra en la figura 3. En general, los procedimientos para la síntesis de Au NP se pueden organizar en métodos químicos, físicos y biológicos, donde en cada uno se busca obtener el tamaño, forma, solubilidad, estabilidad y funcionalidad deseados. Dentro de los métodos físicos se encuentran la irradiación de rayos

y, la irradiación de microondas (MW), el método sonoquímico, la irradiación con luz ultravioleta (UV), la ablación con láser, el proceso termolítico y el proceso fotoquímico. En los métodos químicos, las reacciones químicas se realizan en un medio acuoso mediante un agente reductor y un precursor de oro. La síntesis biológica o biosíntesis pretende que el medio o solvente, los agentes reductores y estabilizantes deben ser no tóxicos y seguros, además que los compuestos y derivados de plantas, bacterias, hongos, algas, levaduras y virus sean empleados como recursos comunes (Elahi et al., 2018).



**Figura 3.** Enfoques básicos para la preparación de nanopartículas (Elahi et al., 2018).

Las nanopartículas de oro son ampliamente utilizadas como agentes antibacteriales y antimicrobianos, ya que este efecto las hace adecuadas para el uso complementario potencial con antibióticos. Las AuNPs ejercen su actividad antibacteriana a través de la formación de agujeros en la pared celular bacteriana, lo que conduce a la muerte celular debido a la pérdida del contenido celular. Además, los AuNPs pueden inhibir el proceso de transcripción al unirse al ADN bacteriano y prevenir el desenrollado del ADN durante la transcripción y pueden inhibir uropatógenos resistentes a múltiples fármacos (Arafa et al., 2018).

Las AuNPs también tienen propiedades antioxidantes, las cuales han sido evaluadas en la curación de heridas. Por lo general, durante el proceso de curación, el sistema inmune libera mediadores moleculares y produce una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) para reparar la lesión. Las ROS se generan como un subproducto activo del metabolismo celular, que funciona en vías de señalización celular, sin embargo, la cantidad excesiva de ROS que interactúa con moléculas biológicas puede dañar el ADN, el ARN, las proteínas, la función celular e inhibir el crecimiento. Un alto nivel de ROS conduce al estrés oxidativo, lo cual perjudica el proceso de curación, entonces, los antioxidantes tienen el objetivo de reducir el nivel de estrés oxidativo y atenuar los efectos dañinos de las ROS. Las AuNPs tienen efectos antioxidantes potentes en la extinción de radicales libres como hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). La actividad antioxidante de las AuNPs, con respecto a los radicales libres, va a depender en gran medida de la superficie; por ejemplo, las

nanopartículas esféricas de oro tienen una gran área superficial, lo que da como resultado una alta tendencia a aceptar electrones e interactuar con ROS para eliminarlos o desactivarlos, se convierten en un potente agente antioxidante y desempeñan un papel importante en la cicatrización de heridas (Lau et al., 2017).

El grupo de Boomi et al., 2020, mediante síntesis verde utilizando extracto de *Acalypha indica* obtuvieron AuNPs para evaluar su actividad antibacteriana, antioxidante, eliminación de radicales libres y propiedades cicatrizantes, donde se obtuvo que las AuNPs tienen actividad antioxidante eficaz contra la eliminación de radicales libres de DPPH. Esto puede deberse a su capacidad para donar electrones o iones de hidrógeno a los radicales libres DPPH para neutralizarlos. Cuando se aumenta la concentración, la eliminación de radicales también aumenta proporcionalmente. Además, la planta contiene compuestos bioactivos a los que se han atribuido capacidad antioxidante. También se reveló, que el extracto que contenía AuNPs aceleró el final de la etapa inflamatoria, la formación de vasos sanguíneos y la remodelación de la matriz de colágeno, lo que resultó en una regeneración de la piel más rápida y una mejor cicatrización de las heridas. De acuerdo con el trabajo citado, los autores concluyen que las AuNPs posiblemente aceleran la actividad de cicatrización de heridas a través de diferentes mecanismos, como la vía de la angiogénesis, alterando el potencial de membrana, inhibiendo la enzima ATP sintasa o desencadenando las ROS intracelulares óptimas.

### 1.1.2 Hidrogeles de alginato

El alginato es un polisacárido aniónico lineal derivado de algas pardas o bacterias, que consta de unidades repetitivas de ácido D-manurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) enlazados en  $\beta$ -1,4 en cantidad y distribución secuencial variable dependiendo de la fuente de obtención (Rowley et al., 1999). El alto contenido de bloques G de alginato puede formar hidrogeles rígidos con cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$ , donde cada uno de los cuales se une ordenadamente a dos bloques G opuestos para formar la llamada conformación de caja de huevo. Mientras que el alto contenido de bloque M del alginato es menos adhesivo y exhibe actividad inmunoestimuladora (M. Zhang y Zhao, 2020).

El alginato ha sido investigado y utilizado ampliamente para muchas aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, costo relativamente bajo y gelificación suave. Sin embargo, a diferencia del colágeno, el alginato carece de ligandos de adhesión celular, que son fundamentales para facilitar la unión y propagación celular, entonces, los enfoques clásicos para promover la unión celular en los

alginatos implican acoplar estos materiales a proteínas de adhesión celular como laminina, colágeno y fibronectina, o unir covalentemente el alginato con secuencias peptídicas cortas específicas como la arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y recientemente se ha investigado la incorporación de nanopartículas metálicas. Los hidrogeles de alginato se pueden preparar mediante varios métodos de reticulación. Además, su similitud estructural con las matrices extracelulares de los tejidos vivos permite una amplia aplicación en la cicatrización de heridas, la administración de agentes bioactivos, como proteínas y fármacos químicos pequeños, y el trasplante de células (Blaeser et al., 2016; Lee & Mooney, 2012).

Se han evaluado sistemas de hidrogeles con nanopartículas metálicas embebidas, para aplicaciones potenciales como ayudante en la curación de heridas. El trabajo de Blaeser et al., 2016, muestra una síntesis alternativa de estos materiales utilizando la técnica de ablación láser para la incrustación *in situ* de nanopartículas de oro y hierro en hidrogeles. La integración de nanopartículas metálicas en alginato afectó las propiedades mecánicas de los hidrogeles, favoreciendo la capacidad de hinchamiento de estos, sin embargo, su hidrofilia no se vio afectada. Además, estos nanocompuestos sirvieron como material alternativo (debido a su capacidad de biofuncionalización química) para favorecer la adhesión celular.

### 1.1.3 AuNPs incorporadas en hidrogeles

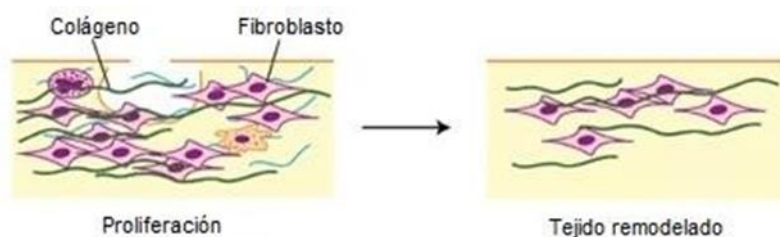
Las AuNPs pueden ser integradas a otros materiales como hidrogeles para formar materiales compuestos, donde la sinergia de sus propiedades permita la obtención de sistemas diversos y multifuncionales. Recientemente, ha tomado importancia el uso de AuNPs inmersas en hidrogeles, ya que pueden servir como andamios celulares; por ejemplo, Navaei et al., 2016, fabricaron hidrogeles híbridos de metacrilato de gelatina (GelMA) con nanovarillas de oro para investigar la retención de células cardíacas, la supervivencia, la organización del citoesqueleto, la expresión de un marcador de proteína específico, el comportamiento de latido a nivel de tejido y el tránsito de  $\text{Ca}^{2+}$ ; donde las nanovarillas integradas promovieron la conductividad eléctrica y la rigidez mecánica de la matriz de hidrogel. Además, los cardiomiocitos sembrados en hidrogeles híbridos GelMA-GNR, exhibieron una excelente retención celular, viabilidad y actividad metabólica.

Retomando y aprovechando el efecto antimicrobiano de las AuNPs, Mahmoud et al., 2019, sintetizaron, caracterizaron y cargaron en un hidrogel termosensible, AuNPs de forma esférica y de varilla con

modificaciones superficiales (polímeros cargados neutros, catiónicos y aniónicos) para realizar una comparativa sobre la morfología y superficie en la cicatrización de heridas de ratón. Los hidrogeles con AuNPs exhibieron una excelente estabilidad coloidal y demostraron un comportamiento de liberación de nanopartículas lenta y prolongada durante 48 h de exposición utilizando un modelo in vitro. Particularmente, los hidrogeles de polietilenglicol (PEG) con nanovarillas de oro (AuNRs) y clorhidrato de polialilamina catiónica (PAH)-AuNRs demostraron notables propiedades de cicatrización de heridas tras la aplicación tópica en heridas utilizando un modelo animal, además de exhibir una potente actividad antibacteriana in vitro contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

#### 1.1.4 Comportamiento celular ante AuNPs-hidrogeles

El fibroblasto es la célula predominante de los tejidos conectivos del cuerpo, además, es una célula dinámica, la cual ejerce funciones tisulares a nivel local y del sistema inmune; dentro de sus funciones principales se encuentra la formación de fibras del tejido conectivo denominadas colágeno y elastina; sin embargo, cabe destacar que el fibroblasto desempeña otros roles importantes (Acosta, 2006). En el proceso de la curación de heridas los fibroblastos juegan un papel crucial, ya que estas células migran hacia el tejido lesionado y producen colágeno de tal manera que se forma tejido conectivo fresco que rellena la herida y con esto se puede dar pie a la angiogénesis para finalizar la remodelación del tejido dañado (Arenas, 2003), como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Proliferación de fibroblastos (Beanes et al., 2003).

Uno de los enfoques principales para probar sistemas nanocompuestos en biomedicina, es probar la viabilidad de las células dependiendo del objetivo del sistema. En particular para la ingeniería de tejidos enfocado a la cicatrización de heridas, es primordial la citocompatibilidad de los materiales con fibroblastos. Por ejemplo, Nezhad-Mokhtari et al., 2020, desarrollaron un nuevo diseño de hidrogeles

inyectables a base de colágeno, celulosa nanocristalina modificada con aldehídos y quitosano cargados con nanopartículas de oro (Colágeno/ADH-CNCs/CS-Au), donde reveló que las distintas proporciones molares de colágeno/CNC y la presencia de contenido de CS-Au tienen efectos significativos en la morfología microscópica, el hinchamiento en equilibrio, la degradación *in vitro* y las propiedades mecánicas de los hidrogeles; además, las pruebas celulares mostraron una mayor proliferación y la viabilidad de las células aumentó al estar en presencia de las AuNPs como componente conductor en el sistema, ya que puede mejorar el crecimiento celular; por lo que la red de hidrogel preparada tiene un gran potencial como nuevo biomaterial para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

## 1.2 Hipótesis

La morfología de las nanopartículas de oro embebidas en hidrogeles de alginato como sustratos afecta las propiedades de adhesión y proliferación de fibroblastos murinos.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la morfología de las nanopartículas de oro incorporadas en hidrogeles en la biocompatibilidad y morfología de fibroblastos murinos.

### 1.3.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar nanoesferas de oro estabilizadas en citrato y nanorodillos de oro estabilizados en CTAB.
2. Transferir los nanorodillos de oro de CTAB a citrato.
3. Sintetizar hidrogeles de alginato.
4. Incorporar las nanopartículas en los hidrogeles.
5. Evaluar la biocompatibilidad de los hidrogeles en fibroblastos murinos.
6. Determinar el efecto de los hidrogeles en la producción de especies reactivas de oxígeno en fibroblastos murinos.
7. Visualizar la morfología de los fibroblastos cultivados sobre los hidrogeles.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Preparación de nanomateriales de oro en hidrogeles

#### 2.1.1 Síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs)

Para la síntesis de nanoesferas de oro se siguió la metodología descrita por Bastús et al., 2011, que parte de la síntesis de semillas de oro utilizándose una solución reductora de citrato de sodio (CS, 150 mL, 2.2 mM), la cual se llevó a calentamiento con agitación constante. Al alcanzar 100 °C de temperatura, se inyectó ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>, 1 mL, 25 mM) y se dejaron transcurrir 10 minutos, la solución pasó de ser incolora a ser color rosa intenso. Transcurrido el tiempo determinado, la solución se mantuvo en calentamiento a 90 °C. A continuación, se siguió el crecimiento de las semillas de oro en el mismo recipiente de reacción, diluyendo la muestra al extraer 55 mL y en su lugar agregando 53 mL de agua mQ y 2 mL de CS (2 mM). Cuando la temperatura alcance nuevamente los 90 °C, se realizarán dos inyecciones de 1 mL de HAuCl<sub>4</sub> (25 mM) en un intervalo de tiempo de 30 min. Este paso de crecimiento que comprende la dilución de la muestra más 2 inyecciones de HAuCl<sub>4</sub> se repetirá iterativamente hasta que las partículas alcancen el tamaño deseado. El procedimiento se muestra en la figura 5.

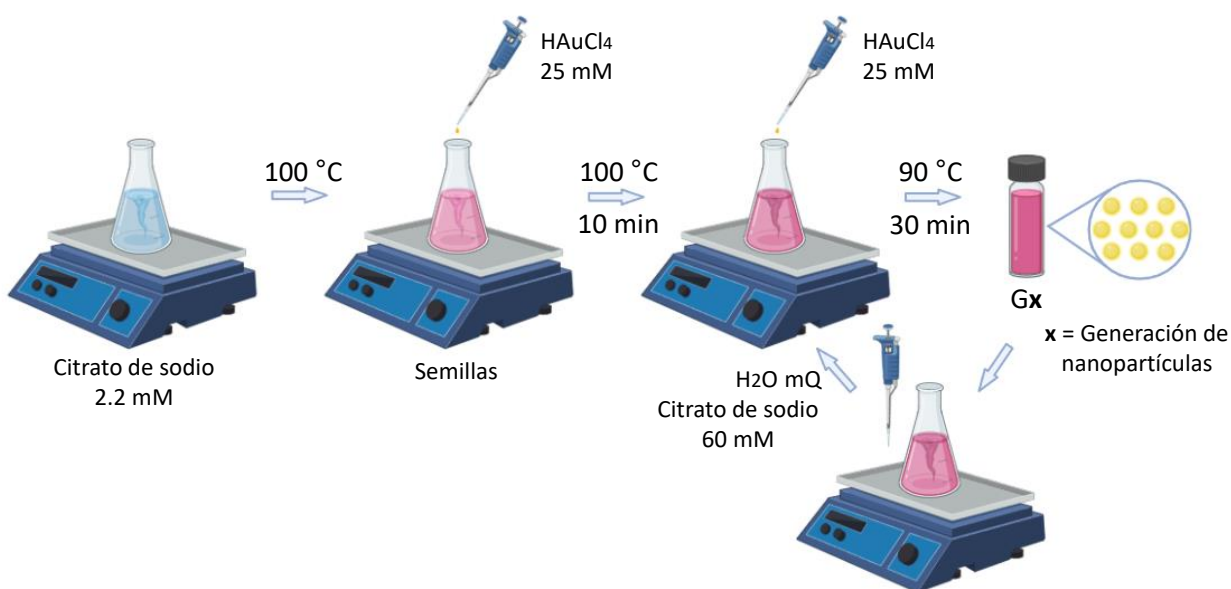
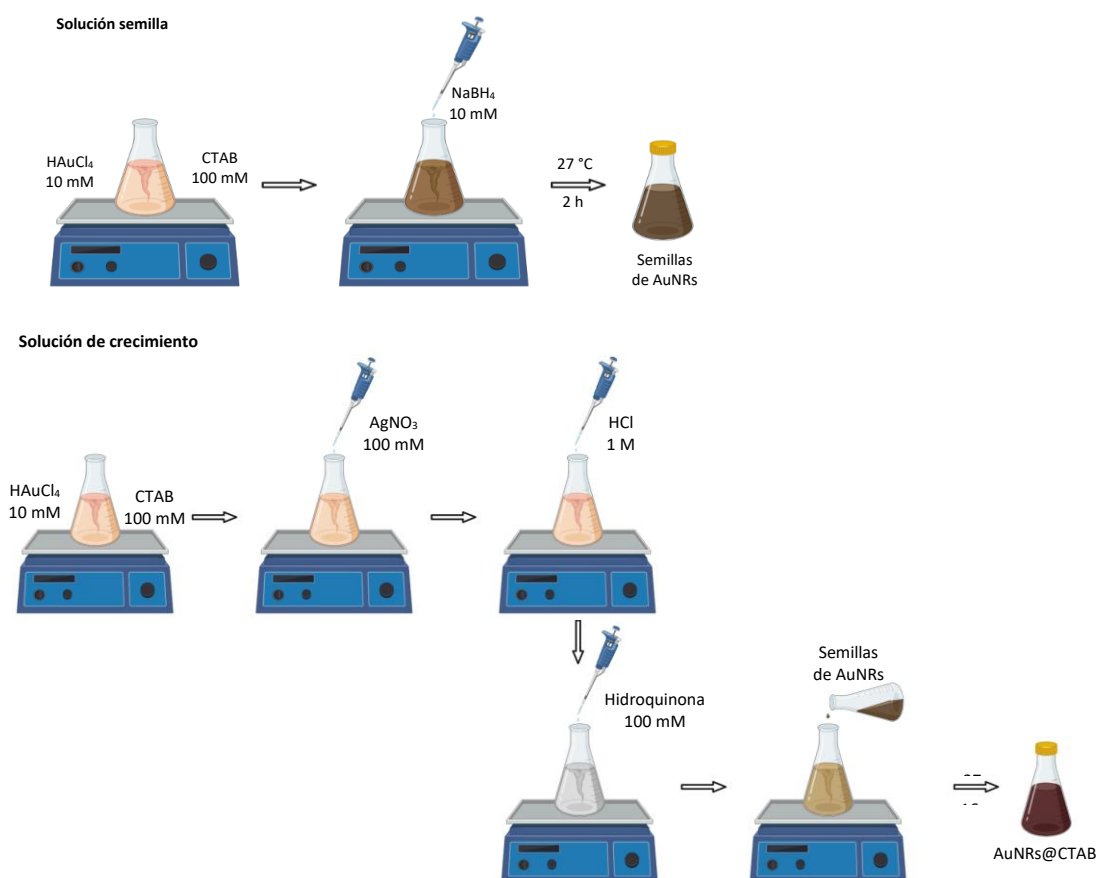


Figura 5. Síntesis de Bastús et al., 2011, para nanopartículas de oro esféricas.

## 2.1.2 Síntesis de nanorodillos de oro (AuNRs)

A partir de la metodología descrita por Chang & Murphy, 2018, ilustrada en la figura 6, se llevó a cabo la síntesis de nanorodillos de oro, partiendo de la preparación de la solución semilla. En un matraz de fondo redondo se añadió  $\text{HAuCl}_4$  (0.5 mL, 10 mM) a una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 9.5 mL, 100 mM). En seguida, se añadió de forma abrupta  $\text{NaBH}_4$  (0.46 mL, 10 mM, recién preparado con una solución de  $\text{NaOH}$  10 mM). El color de la solución cambió de amarillo a café instantáneamente. Esta solución de semillas se dejó bajo reposo a  $27^\circ\text{C}$  durante 2 horas antes de su uso. Por otro lado, la solución de crecimiento se preparó añadiendo  $\text{HAuCl}_4$  (0.5 mL, 10 mM) y CTAB (8 mL, 100 mM) en un vial de 20 mL. Posteriormente para controlar la morfología de crecimiento se añadió una solución de  $\text{AgNO}_3$  (46  $\mu\text{L}$ , 100 mM) seguido de distintos volúmenes de  $\text{HCl}$  (19, 21, 23, 25  $\mu\text{L}$ ; 1 M), los cuales permitieron la elongación de las semillas de AuNRs y subsecuentemente se agregó hidroquinona (0.5 mL, 100 mM), que funge como agente reductor dependiente del pH; por último, después de unos minutos en agitación, cuando la solución se volvió incolora, se agregó la solución de semillas de AuNRs (2 mL). Finalmente, la solución resultante se mantuvo en reposo a  $27^\circ\text{C}$  durante 16-20 horas.

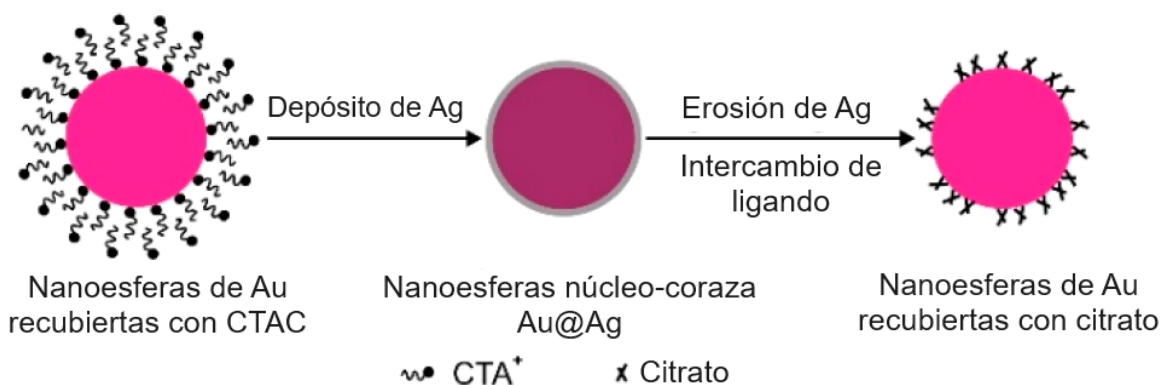


**Figura 6.** Síntesis de Chang & Murphy, 2018, para nanorodillos de oro.



### 2.1.3 Transferencia de nanorodillos de oro

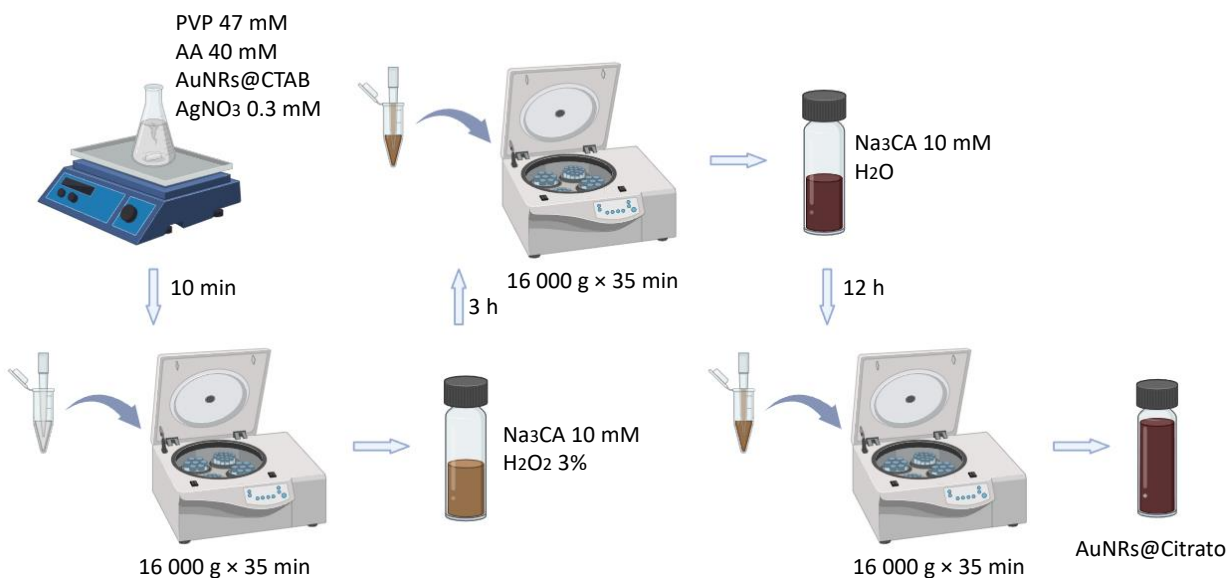
Para lograr que los nanorodillos estabilizados en CTAB ahora estuviesen estabilizados en citrato, se siguió la metodología descrita por Zhou et al., 2018, con algunas modificaciones. Este método implica el crecimiento de una delgada capa de plata sobre la superficie del nanomaterial de oro, como se esquematiza en la figura 7. El objetivo de la transferencia de agente estabilizante para los AuNRs, es reducir la toxicidad del medio en el que el nanomaterial se encuentra disperso, para posteriormente realizar pruebas de viabilidad celular.



**Figura 7.** Intercambio de ligandos en la superficie de nanopartículas de oro a través del depósito y erosión de plata (Zhou et al., 2018).

A partir de la síntesis estándar para obtener 1 mL de nanorodillos estabilizados en CTAB, se mezclaron polivinilpirrolidona (PVP, 4.8 mL, 47 mM), para reforzar la estabilidad de los rodillos, los AuNRs@CTAB (1 mL) y ácido ascórbico (AA, 0.1 mL, 40 mM), a temperatura ambiente. En seguida se añadió AgNO<sub>3</sub> (1 mL, 0.3 mM), para lo que el AA sirvió como agente reductor, y la reacción se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, como se ilustra en figura 8. Posteriormente las partículas se recolectaron mediante centrifugación a 16,000 g durante 35 min y luego se redispersaron en agua con citrato de sodio (200 µL, 10 mM). Inmediatamente se erosionó químicamente la capa de plata de los nanorodillos de Au@Ag con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.9 mL, 3%) a temperatura ambiente durante 3 h.

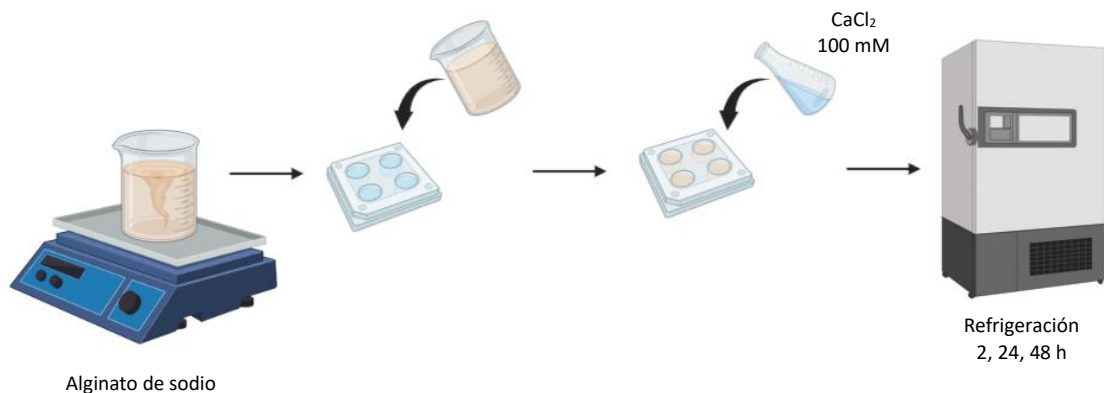
Las partículas se recuperaron por centrifugación a 16,000 g durante 35 min y luego se redispersaron en agua con citrato de sodio (100 µL, 10 mM). Las partículas se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 12 h para a continuación añadir H<sub>2</sub>O mQ (900 µL) y centrifugar a 16,000 g durante 35 min y finalmente redispersar los nanorodillos en 1 mL de H<sub>2</sub>O mQ.



**Figura 8.** Transferencia de ligando de AuNRs@CTAB a citrato (Zhou et al., 2018).

#### 2.1.4 Síntesis de hidrogeles de alginato

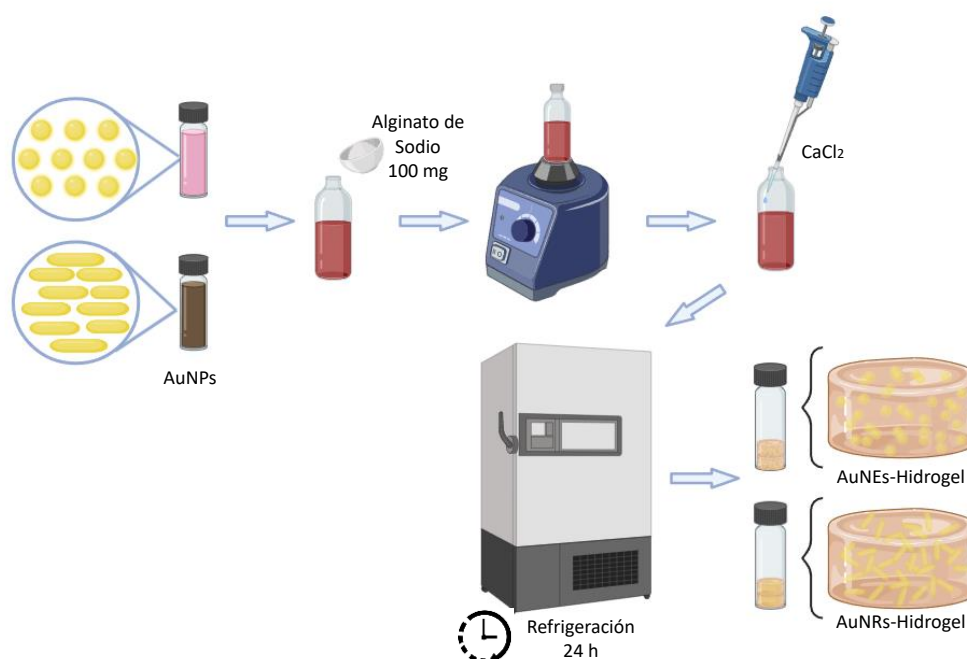
La preparación de hidrogeles se realizó con base al procedimiento descrito por Jáuregui Michel, 2021, dispersándose 50, 100 y 200 mg de alginato de sodio en 2 mL de agua desionizada bajo agitación vigorosa, obteniendo una mezcla homogénea. A continuación, se añadió cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>, 2 mL 100 mM) a la solución mediante las paredes del vial sin agitación con el fin de servir como agente entrecruzante. Posteriormente, las mezclas se refrigeraron durante 2, 24 y 48 horas antes de desmoldarse. El procedimiento se muestra esquemáticamente en figura 9.



**Figura 9.** Preparación de hidrogeles de alginato de sodio.

### 2.1.5 Incorporación de nanopartículas en hidrogeles

Al determinar la mejor relación de contenido de alginato y tiempo de refrigeración, siendo esta relación 100 mg y 24 h respectivamente, se prepararon hidrogeles con nanopartículas embebidas a partir de la metodología descrita por Jáuregui Michel, 2021. A 2 mL de dispersión de nanopartículas, se le añadió alginato de sodio y se agitó la mezcla mediante el uso de vortex hasta conseguir una solución homogénea, el procedimiento se muestra en la figura 10. Después, se prosiguió a añadir una solución de cloruro de calcio y refrigeración, de manera similar a la sección 2.1.4.



**Figura 10.** Preparación de hidrogeles con nanopartículas de oro embebidas.

## 2.2 Biocompatibilidad en modelos celulares

Se utilizó la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos aislados del embrión de un ratón. Esta línea celular es comúnmente utilizada para estudiar los mecanismos celulares básicos asociados con la diabetes, la obesidad y enfermedades relacionadas. Las células 3T3-L1 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado al 10% con suero de ternera (CALF), 1% de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomina), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y bicarbonato de sodio (2 g/L).

El cultivo celular fue realizado en una cabina de flujo laminar previamente desinfectada y esterilizada, al igual que todo el instrumental y materiales utilizados. Primero se descongeló un vial de criopreservación con la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos murinos, posteriormente se traspasó el líquido (medio de criopreservación y células) del vial a un tubo eppendorf para centrifugar la solución a 2236 g (5000 rpm) por 5 minutos, en seguida se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 mL de medio de cultivo; entonces, se repitió el proceso de centrifugación y resuspensión en 1 mL de medio de cultivo para en seguida adicionar esta solución de células en una caja de cultivo celular con 4 mL de medio de cultivo previamente añadidos. A continuación, la caja de cultivo se llevó a incubación durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, después del tiempo de incubación se observaron las células adheridas a la superficie de la caja mediante microscopia óptica y se lavaron las células con buffer de fosfatos (PBS 1x) para posteriormente reemplazar la cantidad de medio de cultivo por medio fresco, y nuevamente llevar a incubación el cultivo en las mismas condiciones. El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 horas hasta observar confluencia del 70-80% de la población celular.

Los subcultivos o pases de células se realizaron a partir de una caja de cultivo celular ya confluyente, donde primero se retiró el medio de cultivo de la caja para lavar las células no adheridas con 2 mL de PBS y comenzar el proceso de tripsinización. Se añadió 1 mL de tripsina (la cual escinde las proteínas de la membrana de adhesión) y se incubó la caja de cultivo a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se recuperó la solución de tripsina con células en un tubo eppendorf y se llevó a centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, en seguida se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 mL medio de cultivo fresco. A su vez, en otro tubo eppendorf se adicionaron 90 µL de solución azul tripano y 10 µL de células 3T3-L1 en solución ( $V_T = 100 \mu\text{L}$ ) para realizar el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Partiendo del resultado del conteo celular se realizaron los cálculos para obtener el número total de células en 1 mL de solución, según sea el factor de dilución (ec. 1)

$$\text{Concentración de cels.} = (\text{Células vivas} \div 4) \times \text{factor de dilución} \times 10,000 \quad (1)$$

Una vez obtenido el número total de células se calculó el volumen de células necesario para realizar un nuevo pase de la línea celular, para realizar un experimento en placas de 96 pocillos o para congelar en medio de criopreservación.

### 2.2.1 Ensayo colorimétrico de reducción del MTT

Para determinar la citotoxicidad de un nanomaterial, se realizó el ensayo de viabilidad celular por la reducción del reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un reactivo

llamado (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (formazán, cristales de color púrpura). Esta reducción es realizada por acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales, principalmente, por la succinato deshidrogenasa y algunas enzimas citosólicas. Por lo tanto, la cantidad de MTT reducido es un indicador indirecto de la actividad mitocondrial y, por lo tanto, también de la viabilidad celular (Salinas, 2020).

El ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT, se realizó en una placa de 96 pozos, en la cual se sembraron células de la línea 3T3-L1 de fibroblastos murinos en cada pozo, en un volumen final de 100  $\mu$ L de su respectivo medio de cultivo celular para luego incubarlo por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo de la placa de 96 pozos y se agregaron a cada pozo y por triplicado, las diferentes concentraciones de AuNPs en solución aforadas a un volumen final de 100  $\mu$ L de medio de cultivo celular para luego incubarlo por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles positivo y negativo se utilizaron medio de cultivo celular y Tween (compuesto que induce a la muerte celular), respectivamente. Al concluir las 24 horas de incubación, se decantó el medio de cultivo de la placa y se lavaron las células con 100  $\mu$ l de PBS 1x luego se agregó a cada pozo 10  $\mu$ l de MTT (3 mg/mL) y 90  $\mu$ L de medio de cultivo, la placa nuevamente se incubó por 4 horas en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, a cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol puro, la muestra se resuspendió varias veces para disolver los cristales de formazán, posteriormente, la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Finalmente, se realizó la medición de absorbancia del formazán a 595 nm de longitud de onda en el equipo de lector de placas ELISA. Para realizar los cálculos de viabilidad celular el valor de la absorbancia del control positivo fue tomado como el 100% de la viabilidad celular y a partir de ahí, se calculó el porcentaje correspondiente para cada uno de los valores de las absorbancias de cada muestra. Para calcular la viabilidad celular se utilizó la siguiente relación matemática:

$$Abs \text{ real de la muestra} = Abs_{570} - Abs_{690} \quad (2)$$

El promedio de las lecturas de las células del control negativo de viabilidad celular tratadas con Tween, (células muertas), se restaron a todos demás valores. Por último, se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la siguiente fórmula:

$$Viabilidad \text{ celular} = \frac{Abs \text{ real de la muestra}}{Abs \text{ real del control positivo}} \times 100 \quad (3)$$

### 2.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en fibroblastos

La evaluación de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), se realizó mediante la cuantificación de la fluorescencia del compuesto diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA), el cual es una sonda fluorogénica que se usa para detectar la presencia de ROS, ya que es permeable a la membrana plasmática de las células. Dentro de la célula, las moléculas de DCFDA no fluorescente son oxidadas por las ROS intracelulares generando el 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), un producto altamente fluorescente que puede analizarse por espectrofluorimetría; siendo la intensidad de fluorescencia un valor proporcional a los niveles intracelulares de ROS (Geraldo, 2021).

Para medir la producción de ROS, se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 en una placa de 96 pozos añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con células por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se decantó el medio de cultivo y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo que contenían distintas concentraciones de AuNPs; como control positivo se utilizaron células sin presencia de AuNPs. Las células se incubaron en presencia de los hidrogeles durante 24 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al finalizar los tiempos de incubación, se decantó el medio con AuNPs de todos los pozos, y la placa se lavó con solución PBS 1X. Después se agregó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de solución de medio con DCFDA y se incubó durante 1 hora a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al finalizar el tiempo de incubación se removió el medio y se lavó con PBS 1X para posteriormente agregar 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Finalmente, se realizó la lectura de la fluorescencia con una longitud de onda de excitación/emisión de 485/530 nm utilizando un espectrofluorómetro, tomando como control la fluorescencia de las ROS producidas de forma endógena, es decir en células no expuestas a AuNPs.

En el caso del desarrollo de este experimento para células en presencia de AuNPs-Hidrogeles se utilizó una placa de 12 pozos donde se colocaron rebanadas de  $\approx 0.3$  mm de grosor de cada tipo de hidrogel, posteriormente se añadió 1 mL de medio de cultivo y se incubó la placa por 24 horas a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ , después del tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo y se añadieron por goteo células 3T3-L1 en suspensión. Luego, se añadió a cada pozo el medio de cultivo necesario para quedar al nivel de la superficie del hidrogel. Las placas experimentales se incubaron por 7 días en las mismas condiciones para después, se extraer los AuNPs-hidrogeles de la placa y tripsinizar las células adheridas a cada pozo, utilizando 150  $\mu\text{L}$  de tripsina por pozo e incubación a 37 °C por 3 minutos, se recuperaron las células en suspensión y se aforo el volumen total de cada tupo a 800  $\mu\text{L}$  añadiendo medio de cultivo. Al finalizar el centrifugado se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 150  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con DCFDA. Por último, las células en suspensión se depositaron en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1

hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, para después remover el medio, lavar con PBS y agregar 100 µL de medio de cultivo, con lo que se realizó la lectura de la fluorescencia en el espectrofluorómetro.

### 2.2.3 Ensayo de reducción de la resazurina

Para evaluar la viabilidad celular se seguirá el protocolo de ensayo de resazurina, el cual se basa en la reducción, de la resazurina (compuesto de color azul, no fluorescente) a resorufina (rosado, altamente fluorescente) mediante oxidoreductasas de la cadena respiratoria mitocondrial en células vivas. La resorufina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos. La cantidad de resorufina producida es directamente proporcional al número de células vivas, además, las mediciones de proliferación se pueden controlar mediante un espectrofotómetro estándar o un lector de placas ELISA. La resorufina tiene una longitud de onda de absorción a 570 nm y longitudes de onda de Ex/Em de 530-560/590 nm (Rivera et al., 2010).

Para cuantificar el efecto citotóxico de las AuNPs-hidrogeles se aplicó la prueba fluorométrica de resazurina, para medir la actividad metabólica y determinar la proliferación de fibroblastos, siguiendo el procedimiento de Munive-Olarte et al., 2022, con algunas modificaciones. Primero se colocaron rebanadas de cada tipo de AuNPs-hidrogel en una placa de 12 pocillos, luego se añadió 1 mL de medio celular a cada pocillo para sumergir el hidrogel por completo, en seguida se llevó a incubación a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h.

Transcurrido el día de hinchamiento de los geles, se procedió a retirar el medio de cultivo y se añadieron las células 3T3-L1 en suspensión para ser sembradas mediante goteo. Luego, se añadió medio de cultivo a cada pozo, de tal manera que el nivel de medio estuviera al ras de la superficie del hidrogel. Las placas experimentales se incubaron por 7 días para finalmente, se extraer los AuNPs-hidrogeles y colocarlos en un pocillo nuevo para entonces reemplazar el medio de cultivo por medio nuevo con resazurina al 10 % (v/v) a 700 µM. La placa se incubó a 37 °C durante 4 h, y se midió la densidad óptica de las soluciones resultantes a 570/600 nm en un lector de microplacas. El cultivo de células sin AuNPs- hidrogel se utilizó como control. La proliferación de fibroblastos se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{Reducción de resazurina \%} = \left[ \frac{(E_{oxi600} \times Abs_{570}) - (E_{oxi570} \times Abs_{600})}{(E_{red570} \times C_0) - (E_{red600} \times C_{570})} \right] \quad (4)$$

#### 2.2.4 Evaluación de la morfología de fibroblastos

Para observar cómo influye la presencia de AuNPs-hidrogeles a manera de andamio de crecimiento para fibroblastos, se evaluó la morfología de estas células mediante microscopía óptica, utilizando el microscopio invertido donde se colocaron placas de 12 pozos para visualizar cada uno de los pozos con cultivo de fibroblastos en participación de AuNPs-Hidrogeles.

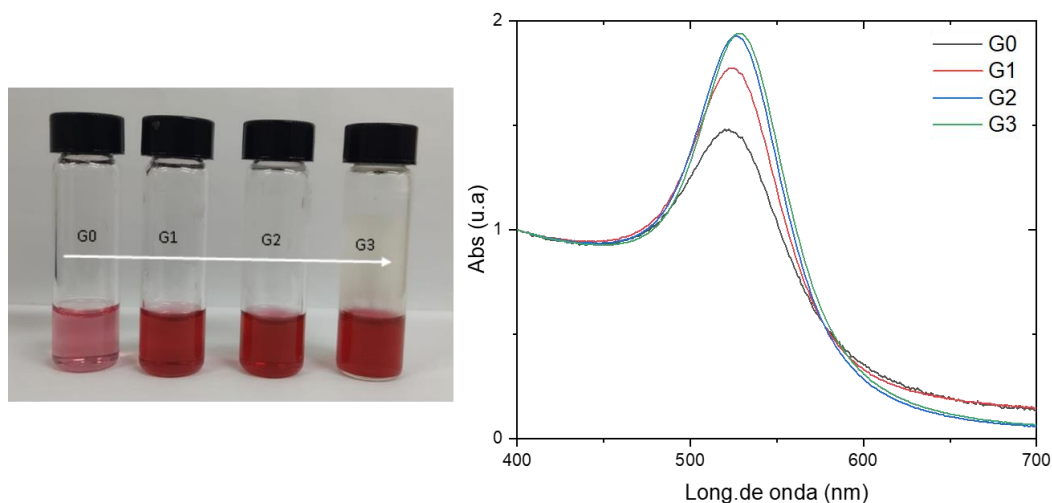


## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Nanopartículas de oro incorporadas en hidrogeles de alginato

#### 3.1.1 Síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs)

Se realizó la síntesis de nanoesferas de oro para posteriormente caracterizar el material obtenido mediante espectroscopia de absorción ultravioleta visible (UV-Vis). Las primeras síntesis obtenidas se realizaron hasta la tercera generación de nanoesferas, donde el color de la muestra incrementaba de intensidad conforme a la generación, como se muestra en la figura 11; a su vez se muestra el espectro de UV-Vis normalizado en 400 nm, donde la intensidad de la señal LSPR aumentó en absorción conforme la generación de AuNEs.



**Figura 11.** Generaciones de nanoesferas de oro con su espectro de UV-Vis.

Al obtener el espectro UV-Vis de AuNEs, se recabaron los datos de absorción a 400 nm de longitud de onda, puesto que se ha reportado que a partir de esta señal es posible estimar la concentración de oro metálico  $[Au^0]$ . Esta concentración fue calculada gracias a la relación empírica reportada por (Scarabelli et al., 2015), donde se reporta que para absorción a 400 nm de 1.2 u. a. con un paso óptico de 1 cm, la concentración de oro corresponde a 0.5 mM; por ello, realizando un ajuste pertinente para un paso óptico de 1 mm en lugar de 1 cm de espesor, fue posible estimar la concentración de oro en cada una de las muestras obtenidas (ec. 5). También se registraron las señales del pico del LSPR para cada generación como se muestra en la tabla 1.

	Abs@400 (u.a)	→	Au <sup>0</sup> [mM]
Celda 1 cm	1.2	→	0.5
Celda 1 mm	0.12	→	0.5

$$\frac{Abs_{400} \times 0.5}{0.12} = [Au^0] \quad (\text{celda de 1mm}) \quad (5)$$

**Tabla 1.** Datos de UV-Vis de nanoesferas de oro.

Muestra	Abs 400 nm	Au <sup>0</sup> [mM]	LSPR (nm)	Diámetro estimado (nm)*
G0	0.041	0.17	521	≈18
G1	0.127	0.53	523	≈22
G2	0.172	0.72	526	≈31
G3	0.198	0.83	528	≈36

\*Datos extraídos de Bastús et al., 2011 .

A partir de los datos reportados por Bastús et al., 2011 , correlacionando la posición del LSPR en longitud de onda con el diámetro promedio del coloide de AuNPs para las tres primeras generaciones de nanoesferas, se puede estimar de forma aproximada el tamaño de las nanopartículas obtenidas en nuestros coloides G0, G1, G2 y G3 (ver Tabla 1 y 2).

**Tabla 2.** Diámetro de AuNEs según lo reportado por Bastús et al., 2011.

Generación	Diámetro (nm)	Señal SPR (nm)
Semillas	8.4 ± 1.0	518
1 <sup>a</sup>	17.6 ± 1.2	521.5
2 <sup>a</sup>	22.3 ± 2.2	523.5
3 <sup>a</sup>	31.1 ± 2.8	525.5

### 3.1.2 Estimación del tamaño óptimo de AuNEs

Fue necesario determinar el tamaño óptimo requerido para las nanoesferas. Para ello, fue importante considerar a la par a los nanorodillos, buscando obtener esferas del mismo volumen (cantidad de oro) que los nanorodillos. Se realizó entonces la igualación de las ecuaciones del volumen de la esfera y del cilindro,

considerando que estas morfologías deben tener volúmenes aproximados para fines del proyecto; a partir de ello se adecuaron los datos para obtener dichos volúmenes como se muestra en las ecuaciones 6-8.

$$V_{esfera} = V_{rodillo}$$

$$\frac{4}{3}\pi r_e^3 = \pi r_r^2 L \quad (6 \text{ y } 7)$$

$r_e$  = radio de la esfera  
 $r_r$  = radio del rodillo  
 $L$  = longitud del rodillo

A partir de la igualación de las fórmulas se realizó el despeje del radio de las esferas ( $r_e$ ):

$$r_e^3 = \frac{3}{4} r_r^2 L \quad (8)$$

Considerando parámetros geométricos sintetizables para los nanorodillos, de acuerdo con lo reportado por Chang & Murphy, 2018:

$$r_r \sim 4.5 \text{ nm}$$

$$\frac{L}{D_r} \sim 9.6$$

$$\Rightarrow L \sim 86.4 \text{ nm}$$

$D_r$  = diámetro de los rodillos

$\frac{L}{D_r}$  = razón de aspecto

Entonces de la ecuación (8) se obtiene:

$$r_e^3 = \frac{3}{4} r_r^2 L$$

$$r_e^3 = \frac{3}{4} (4.5 \text{ nm})^2 (86.4 \text{ nm})$$

$$r_e^3 = 1312 \text{ nm}^3$$

$$r_e \sim 11 \text{ nm}$$

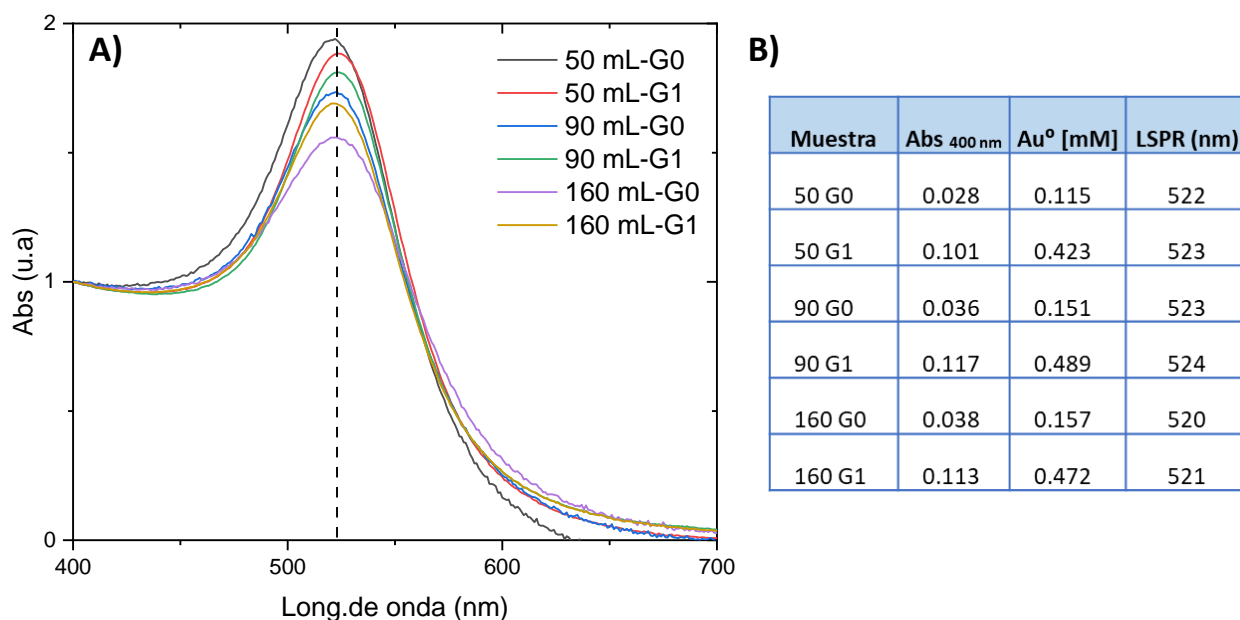
Teniendo definido el tamaño del diámetro óptimo requerido para las nanoesferas, se determinó el intervalo de la longitud de onda donde se expresa la señal LSPR correspondiente a dicho diámetro según los datos reportados por Bastús et al., 2011 (ver tabla 2). Para ello, se ajustó una línea recta con los datos de las semillas ( $D_e = 8.4 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 518 \text{ nm}$ ) y los datos ( $D_e = 17.6 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 521.5 \text{ nm}$ ), obteniéndose la ecuación:

$$\lambda_{D_e} = 0.38(D_e) + 514.81 \text{ nm} \quad (9)$$

A partir de la ecuación (9) puede estimarse una  $\lambda$  ( $D_e = 22 \text{ nm}$ )  $\sim 523 \text{ nm}$ , con lo cual se definió que el intervalo del LSPR de las nanoesferas sintetizadas debe estar entre 522 y 524 nm de longitud de onda.

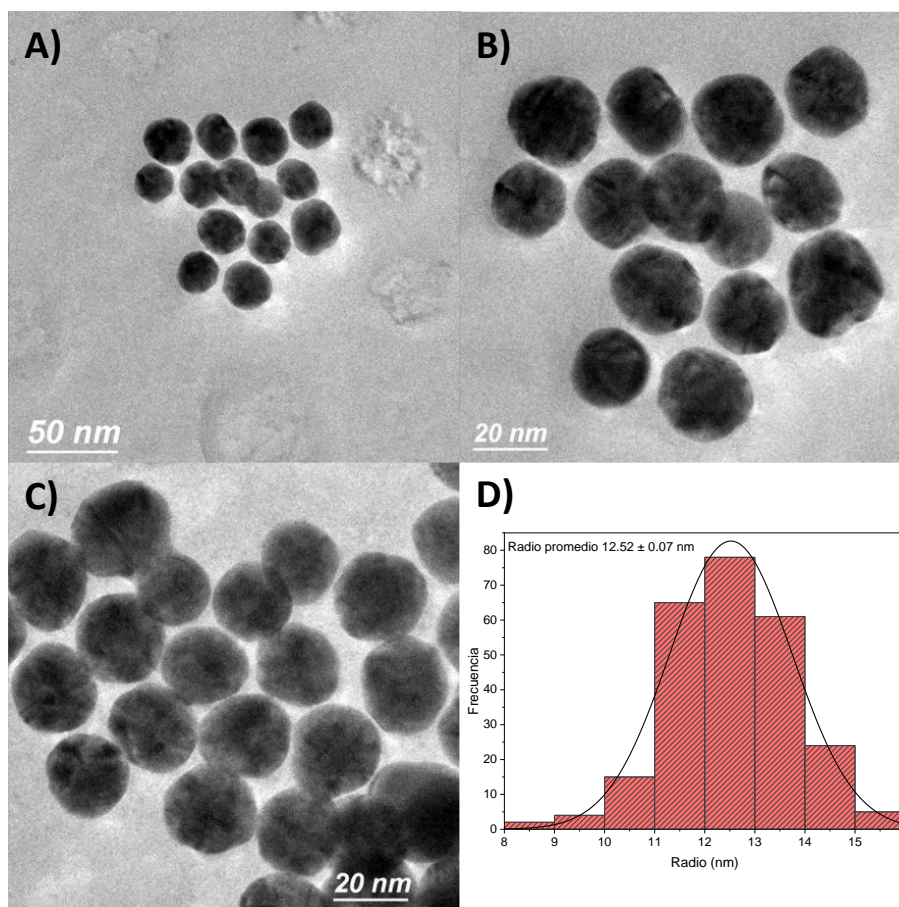
### 3.1.3 Escalamiento de la síntesis y caracterización de AuNEs

A continuación, se realizó el escalamiento de la síntesis en volúmenes de 50, 90 y 160 mL, y recabando los datos de señal LSPR y concentración de oro, los primeros dos volúmenes para G1 presentaron mejores resultados conforme a los cálculos teóricos y el intervalo de señal establecido, como se muestran en la figura 12.



**Figura 12.** A) Espectro UV-Vis del escalamiento de síntesis de AuNEs y B) tabla de datos de absorbancia y concentración de Au<sup>0</sup>.

Para corroborar el tamaño de las nanoesferas de oro y poder observar su distribución se analizó la muestra de G1 en volumen de 90 mL mediante microscopía electrónica de transmisión (figura 13 A-C). Las fotografías obtenidas muestran la morfología cuasi-esférica del material, además de una buena distribución de tamaños y dispersión entre partículas. A su vez, se realizaron mediciones de las micrografías para obtener el diámetro promedio de las esferas mediante el uso del programa ImageJ, el histograma de datos se muestra en la figura 13D, donde se reporta el radio promedio de las nanoesferas siendo  $12.52 \pm 0.07$  nm. A partir de los resultados de síntesis de nanopartículas esféricas se plantearon las ecuaciones para estimar la cantidad de partículas presentes en solución y decidir su uso en los siguientes experimentos, lo cual se aborda en las próximas secciones.



**Figura 13.** A-C) Micrografías TEM de nanoesferas de oro (G1 90 mL). D) Histograma del radio promedio de nanoesferas de oro ( $n=127$ ).

### 3.1.4 Estimación de la cantidad de AuNEs

Al contar con la estimación de la concentración de oro metálico  $[Au^0]$  en el coloide y el tamaño promedio de las nanopartículas, es posible aproximar el número de partículas en dispersión, comenzando por el cálculo de moles de oro en dispersión coloidal ( $n_{Au}$ ).

$$n_{Au} = M \times V \quad (10)$$

Donde  $M$  es la concentración de oro en moles por litro obtenida a partir de la ecuación 5 y  $V$  es el volumen total de la dispersión coloidal. A continuación, se calcula la masa de oro en gramos, multiplicando el peso molecular del oro ( $MW_{Au}$ ) por el número de moles previamente obtenido:

$$m_{Au} = MW_{Au} \times n_{Au} \quad (11)$$

Subsecuentemente, se obtiene el equivalente del volumen de oro metálico en el coloide ( $V_{Au}$ ) a partir del cociente de la masa de oro y la densidad del oro metálico ( $\rho_{Au}$ ):

$$V_{Au} = \frac{m_{Au}}{\rho_{Au}} \quad (12)$$

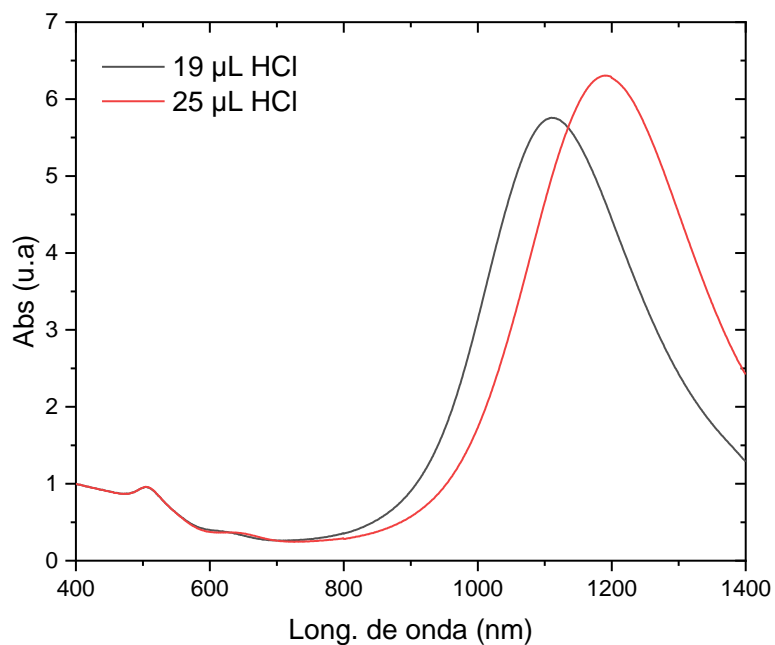
Finalmente es posible obtener el número de partículas promedio en dispersión coloidal mediante la división de el volumen de oro obtenido entre el volumen de una nanoesfera, el cual se calcula a partir del radio promedio de las nanopartículas.

$$\#NPS = \frac{V_{Au}}{V_{AuNPS}} \quad (13)$$

Para la síntesis de 90 mL de nanoesferas de oro se obtuvo que hay  $5.49 \times 10^{13}$  partículas en 90 mL de dispersión.

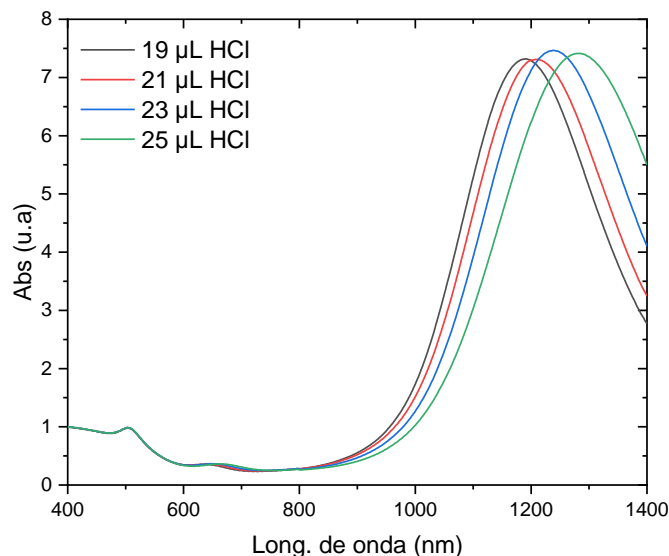
### 3.1.5 Síntesis y caracterización de nanorodillos de oro (AuNRs)

Para sintonizar la razón de aspecto (Longitud/Diámetro) de los nanorodillos, se sintetizaron nanorodillos de oro con variaciones de volumen de HCl adicionado. Como primer experimento se realizó la síntesis adicionando volúmenes de HCl de 19 y 25  $\mu$ L, el espectro de UV-Vis se muestra en la figura 14.



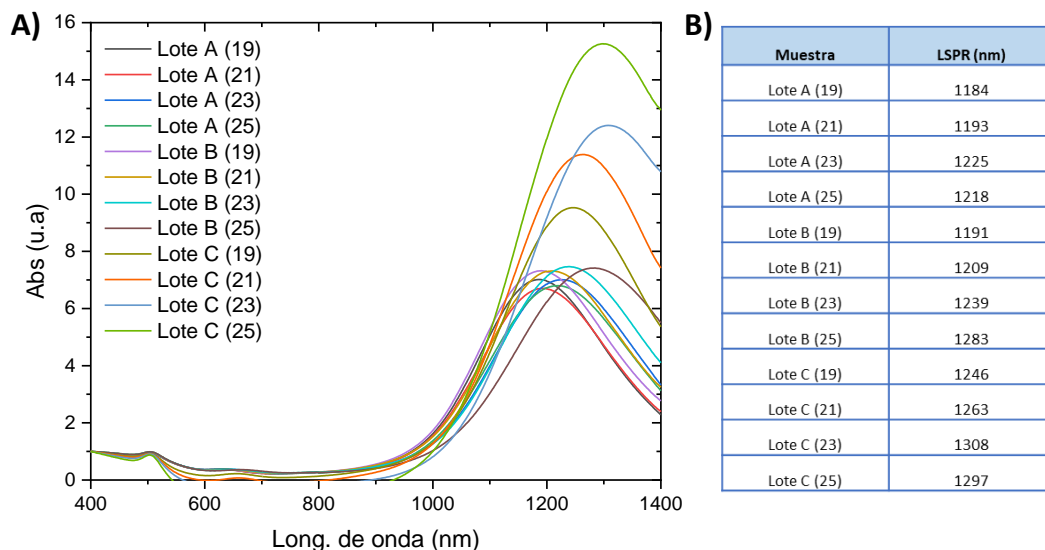
**Figura 14.** Espectro UV-Vis de AuNRs sintetizados adicionando 19 y 25  $\mu$ L de HCl.

Las señales de LSPR transversales se presentaron a 504 nm, mientras que las señales longitudinales para los materiales sintetizados se presentaron a 1110 nm y 1190 nm respectivamente. Se realizó nuevamente el experimento tomando valores intermedios entre los extremos de los volúmenes de HCl adicionado, siendo estos 19, 21, 23 y 25  $\mu\text{L}$ , donde las señales LSPR se presentaron entre 1191 y 1283 nm (figura 15).



**Figura 15.** Espectro UV-Vis de AuNRs sintonizando el volumen de HCl a añadirse.

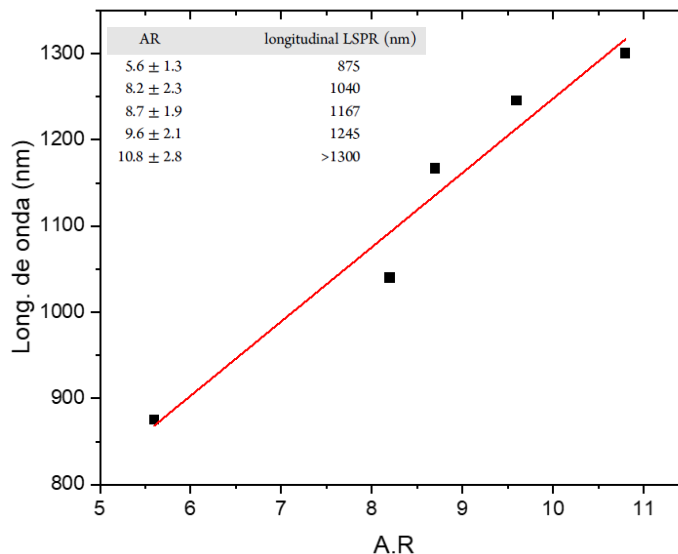
Entonces, se replicó el experimento un par de ocasiones más, obteniendo tres lotes de nanorodillos para un total de 12 muestras con señales LSPR entre 1191 y 1308 nm, como se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** A) Espectros UV-Vis y B) señales de LSPR de lotes A, B y C de AuNRs.

Conforme a los datos LSPR obtenidos mediante espectrofotometría UV-Vis se realizó un análisis con los datos reportados por Chang & Murphy, 2018. Este estudio partió de la regresión lineal de los datos de

relación de aspecto contra la longitud de onda de la señal LSPR de las muestras de nanorodillos reportadas por Chang & Murphy, 2018, (figura 17).

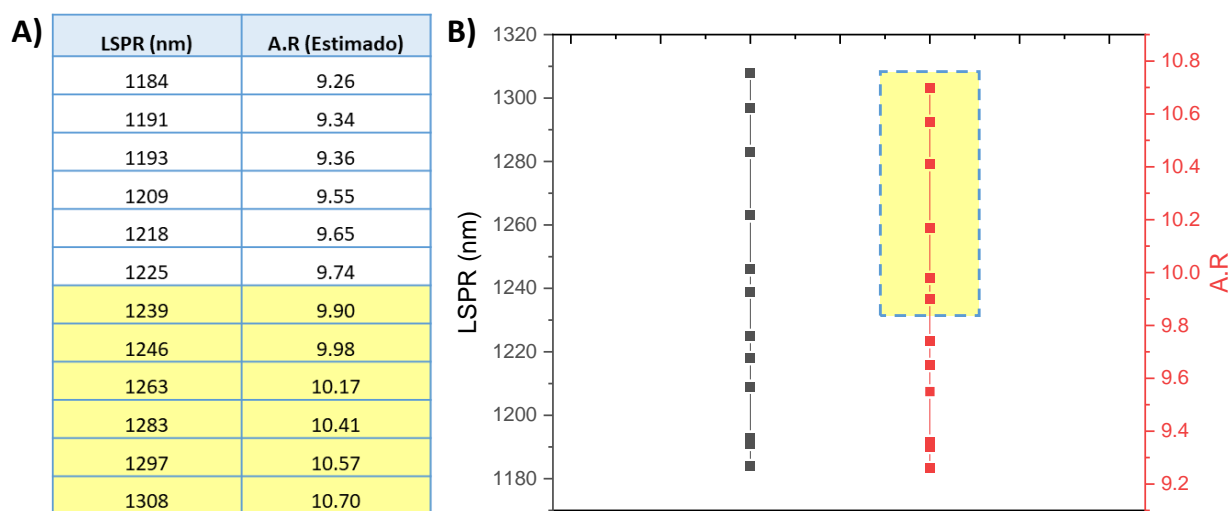


**Figura 17.** Regresión lineal de los datos reportados por Chang & Murphy, 2018.

Gracias al ajuste anterior se obtuvo la ecuación de la recta de los datos de A.R y LSPR (ecuación 14 y 15), con la cual se calculó la relación de aspecto estimada según la longitud de onda en que se presentó el LSPR de las muestras de AuNRs sintetizadas por nosotros. Los datos calculados se presentan en inciso A de la figura 18 y la comparativa de los mismos se muestra en el inciso B.

$$y = 86.17x + 386.06 \quad (14)$$

$$x = \frac{y - 386.06}{86.17} \quad (15)$$

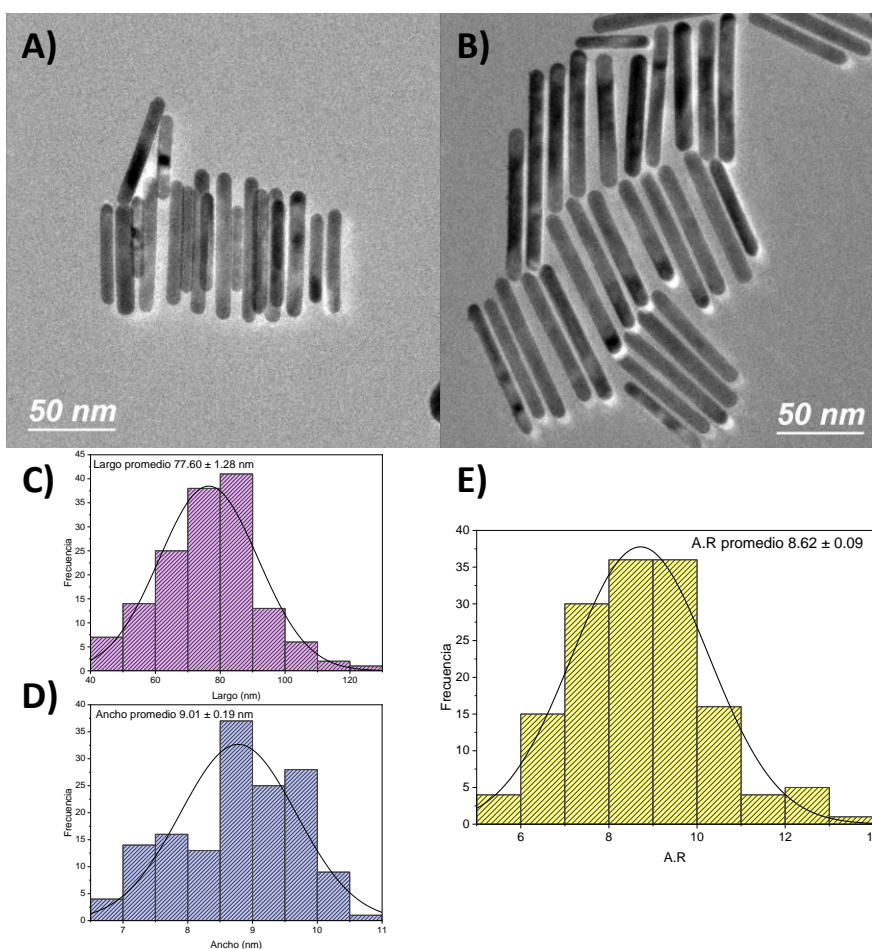


**Figura 18.** A) Tabla con la relación de aspecto de los AuNRs sintetizados según la señal LSPR; B) Gráfica de la señal LSPR y relación de aspecto estimada (datos obtenidos a partir de la regresión lineal de los datos de Chang & Murphy, 2018).



A partir de los parámetros de los nanorodillos elegidos para la estimación del tamaño óptimo de las AuNEs en la sección 3.1.2 ( $r_r \sim 4.5$  nm, razón de aspecto  $\sim 9.6$  y  $L \sim 86.4$  nm), se decidió elegir las muestras con razón de aspecto  $> 9.8$  de acuerdo con la tabla mostrando en Figura 18.A y 18.B. Recordando que estos parámetros óptimos de la geometría de las NPs de oro resultan importantes para poder mantener una comparativa equitativa entre las nanoesferas y los nanorodillos obtenidos con respecto a sus volúmenes de oro.

Se seleccionó la muestra de nanorodillos con señal LSPR más cercana al infrarrojo (AuNRs@CTAB Lote C (23), LSPR  $\approx 1308$  nm) para observarla mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), las micrografías ilustradas en la figura 19A-B se muestran la morfología y distribución de AuNRs en la rejilla de carbono. A partir de las fotografías obtenidas se realizaron histogramas para conocer la distribución de tamaños de largo y ancho (figura 19C-D), a partir de las mediciones realizadas se obtuvo que la longitud promedio de AuNRs es de  $77.60 \pm 1.28$  nm con ancho promedio de  $9.01 \pm 0.19$  nm.



**Figura 19.** A-B) Micrografías TEM de nanorodillos. C-D) Histogramas del largo y ancho de nanorodillos de oro. E) Histograma de la relación de aspecto de nanorodillos de oro (AuNRs@CTAB Lote C (23)).

Tomando la longitud y ancho de cada medición a cada nanorodillo de oro fue posible obtener la relación de aspecto (A.R) al calcular el cociente de estos datos (ecuación 16); en la figura 19E se muestra el histograma con la distribución de A.R donde se obtuvo que el dato promedio es de  $8.62 \pm 0.09$ .

$$A.R = \frac{L}{a} \quad (16)$$

### 3.1.6 Estimación de la cantidad de AuNRs

Una vez obtenidos los datos de longitud y ancho promedio es posible calcular el volumen promedio de un nanorodillo utilizando la ecuación 8. Dicho volumen promedio de nanorodillo, permitió calcular el número de partículas en dispersión utilizando las ecuaciones 10-13. El resultado de cada muestra se registró en la tabla 3.

**Tabla 3.** Número de partículas calculado para AuNRs.

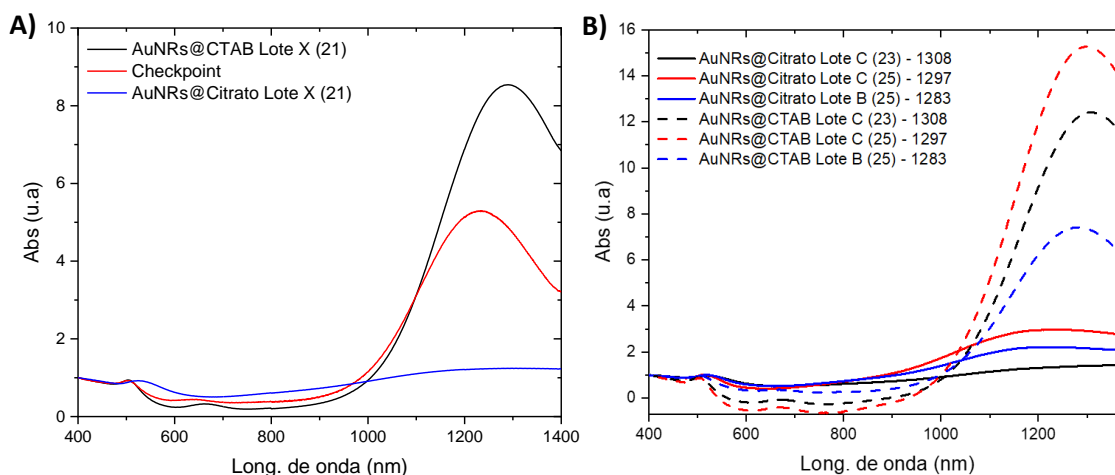
LSPR (nm)	Número de partículas
1308	$9.40 \times 10^{11}$
1297	$1.45 \times 10^{13}$
1283	$1.99 \times 10^{13}$
AuNEs	$5.49 \times 10^{13}$

### 3.1.7 Transferencia de nanorodillos de CTAB a citrato

El intercambio de ligando de CTAB a citrato para los nanorodillos de oro fue monitoreado mediante espectrofotometría UV-Vis, donde se tuvo un punto de revisión (checkpoint) del comportamiento de la muestra al pasar 10 min de haber añadido  $\text{AgNO}_3$ , puesto que el método debería implicar que se forme un recubrimiento de plata sobre la superficie del nanorodillo de oro; posteriormente al finalizar la reacción se analizó la muestra nuevamente para observar si hubo cambios en la señal LSPR.

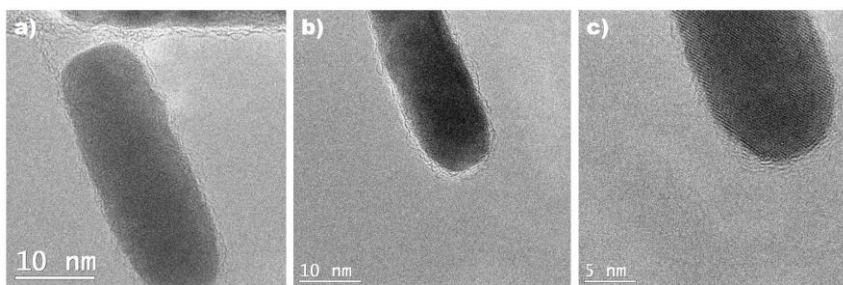
Para los primeros experimentos se tomó una muestra de AuNRs@CTAB con señal LSPR a 1290 nm. En la figura 20 se muestran los espectros UV-Vis de la muestra de nanorodillos. Antes de comenzar la reacción,

la muestra presentaba la señal LSPR transversal a 504 nm mientras que la señal longitudinal se presentó a 1290 nm (curva negra). Para el checkpoint de la metodología, nuevamente se presentaron estas dos señales, con ligeros corrimientos hacia el azul situándose en 500 y 1234 nm respectivamente (curva roja). Por último, el espectro final de la reacción muestra las señales transversal y longitudinal a 524 y 1416 nm respectivamente (curva azul). El corrimiento hacia el azul observado durante el checkpoint es imputable a la capa de Ag, la cual produce corrimientos a menores longitudes de onda en nanopartículas tipo núcleo-coraza de Au-Ag (Horiguchi et al., 2014). Se muestra también la presencia de una señal intermedia entre 600 y 700 nm, en el primer espectro, la cual desaparece al finalizar la reacción, por lo que esta podría atribuirse a nanopartículas de otras morfologías formadas al inicio en la síntesis de nanorodillos, las cuales al realizar los lavados correspondientes de la muestra fueron desechados con el sobrenadante. Por su parte el corrimiento final nuevamente hacia el rojo está correlacionado con la pérdida de la capa de Ag, aunque la considerable disminución de la intensidad de la señal resulta difícil de descifrar.



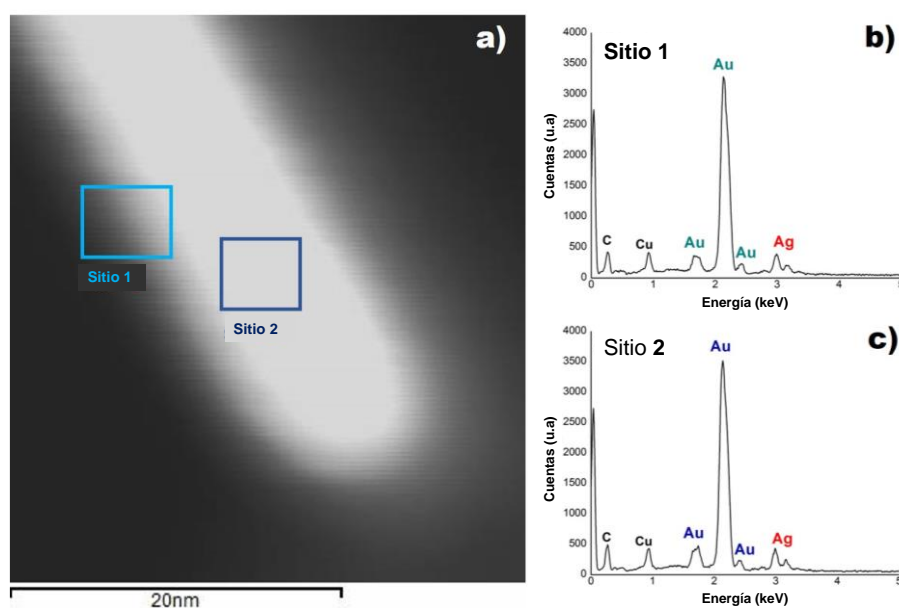
**Figura 20.** A) Espectros UV-Vis de la transferencia de AuNRs de CTAB a citrato; B) Espectros UV-Vis de la transferencia de AuNRs@CTAB de CTAB a citrato ( $V = 9.5$  mL).

No obstante, se observó el funcionamiento de la transferencia mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 21), donde se verificó que la morfología del material no hubiese cambiado posterior a la transferencia de ligando o que propiciara el aglomeramiento del nanomaterial. En las imágenes de alta resolución se pretendió visualizar si después de la transferencia aun existía una coraza remanente de Ag, observándose la ausencia de una capa de menor contraste asociada a la presencia de Ag.



**Figura 21.** a-c) Micrografías TEM de AuNRs después de la transferencia de CTAB a citrato.

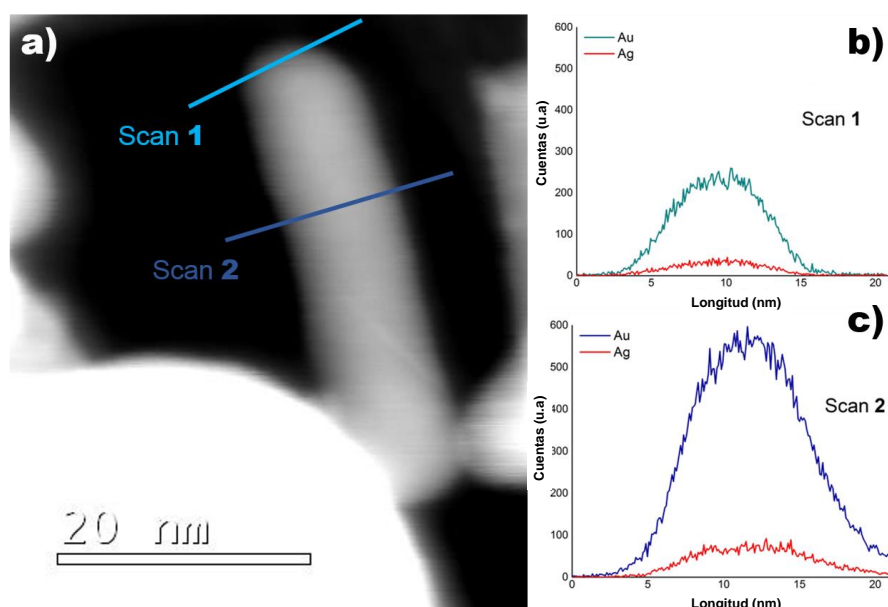
La composición elemental de los nanorodillos de oro post-transferencia fue analizada mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX), como se muestra en la figura 22; con el objetivo de monitorear la presencia de Ag, aunque fuese en cantidades traza como remanentes. La figura 22 muestra dos sitios (periferia y centro) de un AuNR representativo, donde ambas regiones mostraron señales intensas de Au y señales pequeñas de Ag como remanentes presentes. La presencia de otros elementos como el C y Cu, pueden ser consecuencia de las rejillas donde se depositó la muestra.



**Figura 22.** a) Micrografía TEM de AuNRs@Citrato, b-c) Análisis elemental (espectros EDX) de AuNRs@Citrato.

A su vez, en la figura 23b-c se muestran los barridos de línea de la micrografía 23a con la señal de Ag y Au, donde se analizaron dos regiones de nanorodillo de oro, una en la punta del AuNR y otra cruzando por el centro de esta, intentando tener más información de la distribución espacial de la Ag remanente. En ambos perfiles en la figura 23b-c se muestran resultados similares de la señal de Au y Ag (aunque con una intensidad considerablemente menor para la Ag), lo cual nos permite suponer que los remanentes de Ag debieran estar presentes en cantidades aproximadamente del orden o menor a la monocapa atómica;

puesto que de haberse encontrado en mayores cantidades, el perfil del centro del AuNR para la señal de Ag debió haber presentado dos máximos en cada orilla donde estaría acumulando mayor cantidad de Ag. Además, la proporción de señal de Ag con respecto a la de Au no se incrementó significativamente en los perfiles de la punta con respecto a los perfiles del centro. Consistente con la falta de un cambio de contraste perceptible debido a la Ag. Con ello puede concluirse que la coraza de Ag formada durante el intercambio de ligando fue eliminada a partir del tratamiento de los nanorodillos con  $H_2O_2$  y lavados con  $H_2O$  mQ, permaneciendo solo ciertos remanentes de Ag presumiblemente a un nivel aproximadamente del orden o por debajo de mono-capa atómica, lo cual está estrechamente relacionado con el espectro de UV-Vis de la figura 20A y los datos reportados por Zhou et al., 2018.



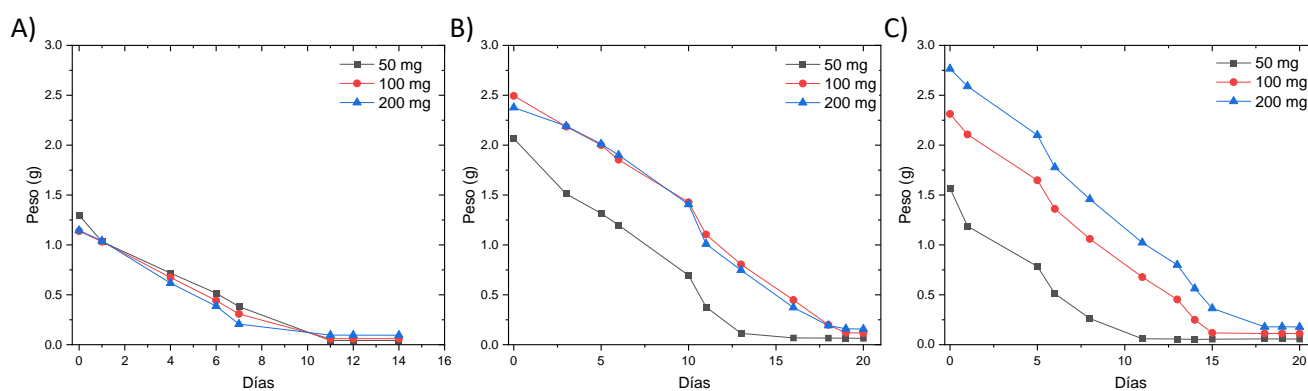
**Figura 23.** a) Micrografía TEM de AuNRs@Citrato, b-c) Barridos de línea de AuNRs@Citrato.

Posteriormente, se realizó la transferencia de 3 dispersiones de AuNRs@CTAB en volúmenes de 9.5 mL, donde los espectros de UV-Vis (figura 20B) presentan los corrimientos correspondientes al intercambio de ligando de los nanorodillos.

### 3.1.8 Hidrogeles de alginato

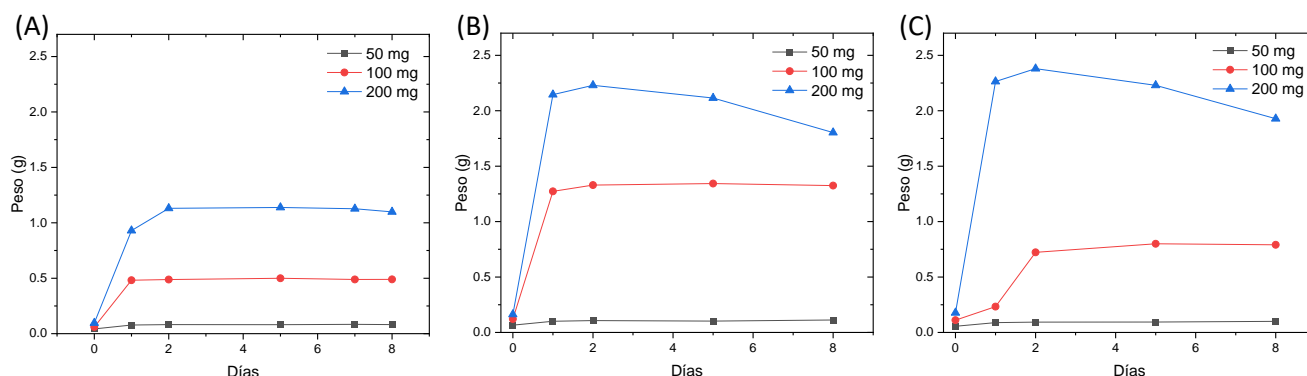
La preparación de hidrogeles de alginato blancos fue realizada con dos variables: la cantidad de alginato de sodio (50, 100 y 200 mg) y el tiempo de refrigeración (2, 24 y 48 horas). Posteriormente se procedió a

deshidratar los nueve hidrogeles obtenidos a temperatura ambiente, llevando un monitoreo del peso durante el secado como se muestra en la figura 24. Puesto que los hidrogeles fueron preparados con 2 mL de agua y 2 mL de solución de  $\text{CaCl}_2$  y despreciando las variaciones en la densidad del agua, tomando esta como  $\rho = 1 \text{ g/mL}$ , entonces cada hidrogel debería pesar alrededor de 4 g al entrecruzarse. Los hidrogeles de 2 horas de refrigeración presentaron poco entrecruzamiento, por lo cual su peso inicial no fue mayor a 1.5 g, a diferencia de los hidrogeles de 24 y 48 horas de refrigeración, que al estar más tiempo en reposo y temperatura baja hubo más entrecruzamiento entre sus redes, provocando que pudieran retener mayor cantidad de agua y por ende que los pesos de estos hidrogeles llegaron a superar los 1.5 g de peso, hasta los 2.7 g. Debe mencionarse que, en estos casos, aunque hubo mayor entrecruzamiento, el peso obtenido se mantuvo por debajo de los 4 g estimados.



**Figura 24.** Curvas de secado de hidrogeles blancos con distinta cantidad de alginato y tiempos de refrigeración (A) 2h, (B) 24 h y (C) 48 h.

El secado para los hidrogeles de 24 y 48 horas de refrigeración tuvo un comportamiento similar con tiempo aproximado de 20 días para obtener convergencia a un peso constante; a diferencia de los hidrogeles de 2 horas de refrigeración que tuvieron un peso constante en menor tiempo, debido a la menor cantidad de agua retenida inicialmente. Subsecuentemente, todos los xerogeles se llevaron a hinchamiento con agua, para evaluar su comportamiento, las curvas de hinchamiento se muestran en la figura 25.

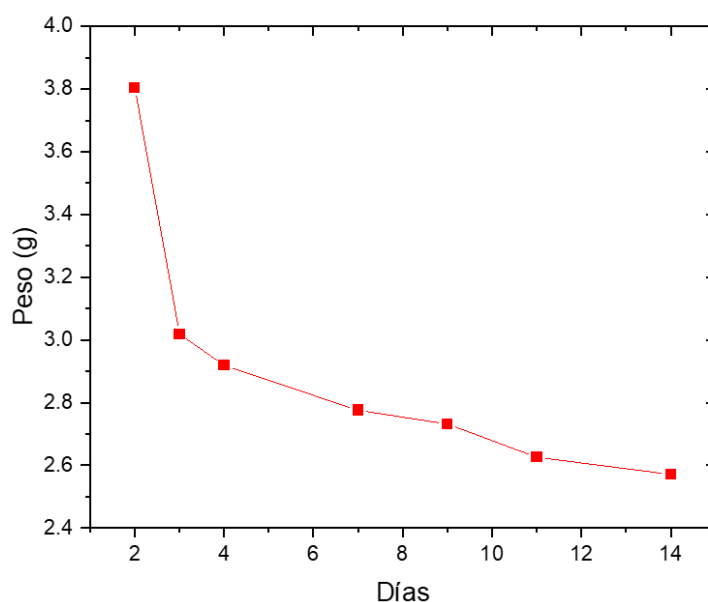


**Figura 25.** Curvas de hinchamiento de hidrogeles blancos con distinta cantidad de alginato y tiempos de refrigeración (A) 2h, (B) 24 h y (C) 48 h.

El hinchamiento fue variado en cada caso, para aquellos con 50 mg de alginato no hubo gran absorción de agua a diferencia de los de mayor cantidad de alginato. Para el caso de los hidrogeles de 100 y 200 mg de alginato y 24 y 48 horas de refrigeración, hubo absorción de agua significativa, siendo la mayor absorción en los hidrogeles de 200 mg de alginato y 48 horas de refrigeración, pero el inconveniente con estos hidrogeles fue que al absorber tanta agua comenzaron a romperse. En el caso de los hidrogeles de 100 mg de alginato, los hidrogeles de 24 horas de refrigeración lograron una mayor cantidad de absorción de agua con respecto a los de 48 h, presumiblemente debido a una mayor elasticidad de sus cadenas poliméricas ante un menor entrecruzamiento, además que el comportamiento de este material ante el hinchamiento se mantuvo constante y no se degradó el material, por lo que esta fue la combinación seleccionada para la integración de nanopartículas.

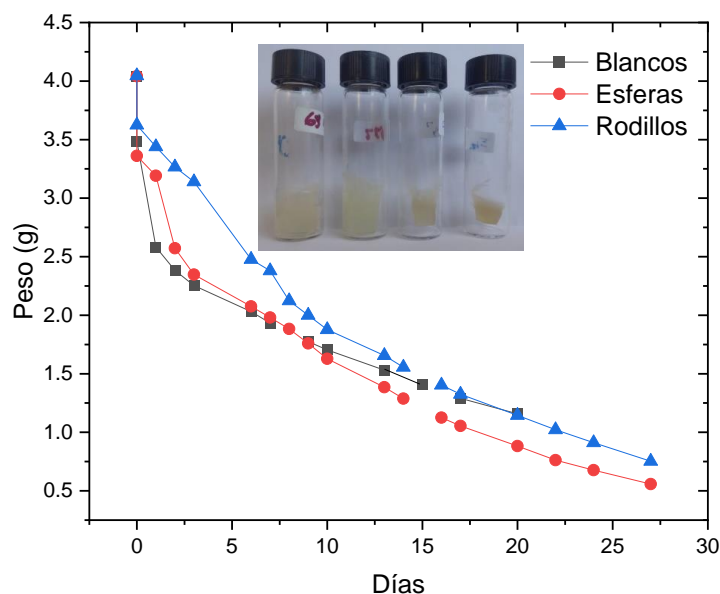
### 3.1.9 Hidrogeles de alginato con nanopartículas de oro

La preparación de hidrogeles de alginato con nanopartículas de oro embebidas fue realizada con AuNEs, se utilizaron viales de 8 mL de volumen siguiendo la metodología de Jáuregui Michel, 2021), con algunas modificaciones. Los hidrogeles preparados presentaron coloración rosa intenso; estos materiales se dejaron secar a temperatura ambiente donde hubo una disminución en el peso del hidrogel en 14 días de secado (figura 26).



**Figura 26.** Curva de secado de hidrogeles cargados con AuNEs.

Se repitió el experimento partiendo de la dilución de AuNEs y AuNRs en dispersión acuosa conforme a la cantidad de  $100 \times 10^6$  nanopartículas en dispersión. El número de partículas seleccionado fue determinado a partir de los ensayos de viabilidad celular en la sección 3.2.1. Los hidrogeles sintetizados fueron monitoreados en su secado en presencia de temperatura a  $37^\circ\text{C}$ , como se muestra en la figura 27, donde se observó un decremento de la masa de cada hidrogel en menor tiempo, gracias a la asistencia de calor en el ambiente. El secado de los hidrogeles es perceptible macroscópicamente ya que el volumen que estos ocupan dentro de los viales se ve reducido conforme pasa el tiempo de secado asistido con temperatura (ver fotografía de la figura 27).



**Figura 27.** Curva de secado de hidrogeles blancos e hidrogeles cargados con 2 mL de solución de AuNPs.

## 3.2 Modelo celular en presencia de AuNPs-Hidrogeles

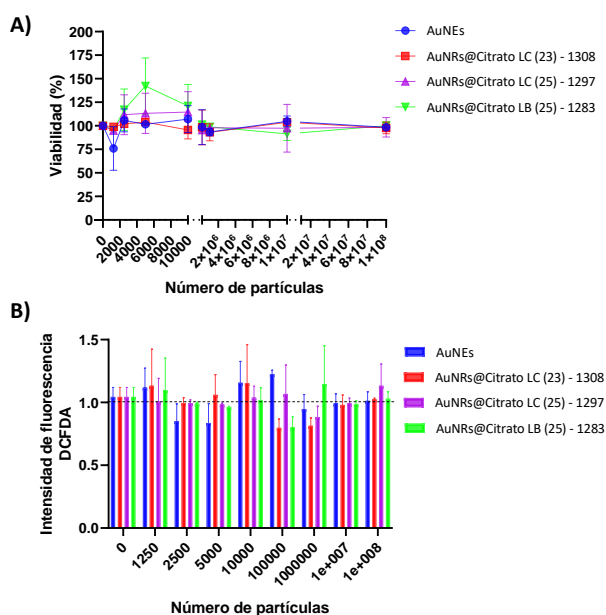
### 3.2.1 Evaluación de la biocompatibilidad de AuNPs

La cuantificación de la citotoxicidad de los AuNPs previo a su incorporación en los andamios celulares, fue llevada a cabo estableciendo un intervalo de concentraciones, el cual fue determinado con base en el número estimado de nanopartículas obtenido (tabla 3) de esferas y rodillos, por lo tanto, al determinar que el intervalo de nanopartículas requerido sería desde  $1 \times 10^3$  hasta  $100 \times 10^6$  partículas, se realizaron diluciones de cada coloide a manera de solución madre (cada una de las diluciones fue preparada con agua destilada estéril).



Se cuantificó la viabilidad del cultivo de la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos murinos, al ser expuestos a las concentraciones de nanopartículas utilizadas. También fue cuantificada la intensidad de fluorescencia del reactivo DCFDA oxidado, con la finalidad de analizar la presencia de ROS intracelulares en los fibroblastos 3T3-L1 expuestos a las diferentes concentraciones de AuNPs. Las células producen ROS de manera intrínseca, como producto de la respiración aerobia, aunque también se sabe que las ROS pueden reproducirse como resultado del estrés oxidante, por lo que la medición de la producción de ROS es un factor determinante para identificar procesos de toxicidad de las AuNPs, y comparar esta producción con las ROS intrínsecas, producidas por las células que no han sido expuestas a las nanopartículas. De tal manera que aquellas concentraciones de AuNPs que no indujeron un considerable estrés oxidativo, fueron utilizadas para la síntesis de hidrogeles con nanopartículas embebidas.

En la figura 28A se muestra la gráfica del porcentaje de viabilidad celular, los resultados indican que la viabilidad celular tiene una tendencia a mantenerse en el 100% en todas las concentraciones de nanopartículas evaluadas. El análisis estadístico ANOVA de dos vías no indicó alguna diferencia significativa entre las diferentes muestras, por lo que se puede decir que tanto las diferentes muestras como las distintas concentraciones de nanopartículas de oro, fueron biocompatibles. En la figura 28B, se muestran los resultados de la generación de ROS en células 3T3-L1 incubadas con diferentes concentraciones de AuNPs. La mayor parte de las concentraciones de esferas utilizadas indujo una menor producción de ROS respecto al control (células sin tratamiento con NPs), mientras que las tres muestras de rodillos en sus diversas concentraciones indujeron una producción de ROS similar o por encima del control. Sin embargo, el análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre los resultados de cada grupo de muestras.



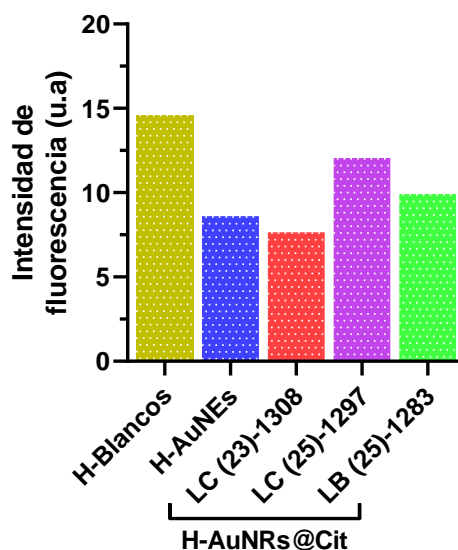
**Figura 28.** A) Viabilidad celular y B) producción de ROS en fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 en presencia de nanopartículas de oro de morfologías esféricas (AuNEs) y de rodillo (AuNRs).

A partir de estos resultados, se determinó que, para la síntesis de los hidrogeles de alginato con nanopartículas de oro embebidas, se utilizaría la concentración mayor de partículas en solución para el stock de esferas y los stocks de rodillos, es decir  $100 \times 10^6$  partículas.

### 3.2.2 Influencia de AuNPs-Hidrogel en la producción de ROS

Para la síntesis de hidrogeles con nanopartículas de oro de morfología esférica y de rodillo, se optó por utilizar  $100 \times 10^6$  partículas en solución. Posterior a la síntesis de los nanocompuestos finales (AuNPs-Hidrogeles), y dado que las AuNPs demostraron ser biocompatibles en todas las concentraciones evaluadas, se midió la influencia que estos nanocompuestos podrían tener en la producción de ROS en las células 3T3-L1.

Los resultados de la producción de ROS mostraron que todos los hidrogeles tienen gran influencia en la producción de ROS. En la figura 29 se ilustra de manera comparativa que los hidrogeles blancos (sin nanopartículas embebidas), fueron los que mayor incremento en la producción de ROS originaron, es por ello que también los hidrogeles con AuNPs tuvieron producciones considerables de ROS, sin embargo, la menor generación fue ocasionada por los nanosistemas con nanopartículas esféricas (AuNEs) y nanorodillos del lote con mayor señal LSPR (H-AuNRs LC (23)-1308).



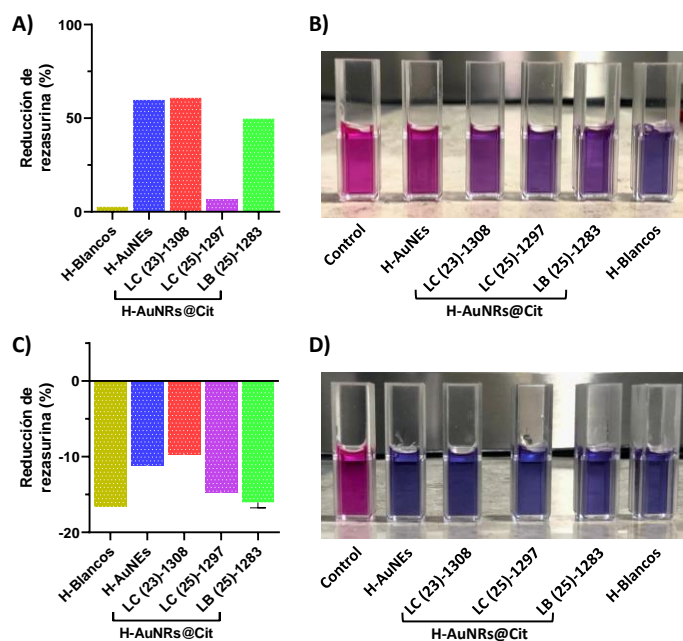
**Figura 29.** Producción de ROS inducida en la línea celular de fibroblastos 3T3-L1 posterior a 7 días de incubación en presencia de los nanosistemas AuNPs-Hidrogeles.

### 3.2.3 Viabilidad celular por reducción de la rezasurina

Al cuantificar la citotoxicidad de los nanomateriales de oro se obtuvieron respuestas favorables para concentraciones altas de nanopartículas, no obstante, la respuesta citotóxica de los nanocompuestos también fue evaluada. Nuevamente se utilizó el protocolo de la reducción de rezasurina, debido a que la actividad mitocondrial es un indicador directo de la supervivencia y proliferación celular, entonces, ahora se analizó el efecto del nanosistema completo después de 7 días de incubación. Se identificó que hubo mayor efecto citotóxico para los fibroblastos 3T3-L1 en contacto con los nanosistemas de hidrogeles, a diferencia de los ensayos realizados anteriormente solo con AuNPs, pudiendo deberse a la complejidad del nanocompuesto. En la figura 30 se reporta la biocompatibilidad de los cuatro AuNPs-Hidrogeles y adicionalmente se evaluó la toxicidad de hidrogeles blancos al igual que en la sección 3.2.2.

Por su parte, la figura 30A ilustra la intensidad de la absorbancia, atribuida al porcentaje de reducción de la rezasurina en resorufina, sirviendo como control e indicador directamente proporcional a la cantidad de células vivas disponibles para llevar a cabo procesos celulares. Después de estar en contacto con los nanosistemas, la gráfica muestra que los hidrogeles blancos (sin AuNPs), presentan alta toxicidad, pues el porcentaje de reducción de la rezasurina es cercano a cero. En contraste, los cultivos de fibroblastos que estuvieron en presencia de los cuatro nanocompuestos presentaron porcentajes de reducción de la rezasurina más altos, en los casos particulares de los hidrogeles con AuNEs y AuNRs@Cit LC(23) se obtuvieron los mayores porcentajes de reducción fueron de  $\approx 60$  u. a., mientras que los nanocompuestos con AuNRs@Cit LC(25) y AuNRs@Cit LB(25) presentaron % de reducción menores de  $\approx 50$  u. a. y  $\approx 6$  u. a., respectivamente.

Cabe destacar que, al tratarse de un ensayo colorimétrico, es posible visualizar de manera macroscópica los cambios en las soluciones experimentales, en un resultado donde la supervivencia celular es alta, el medio de cultivo adopta una coloración rosa intensa, mientras que en el caso contrario adopta una coloración azul. En consecuencia, la figura 30B muestra el color de cada uno de los volúmenes de medio de cultivo al finalizar el ensayo; la celda con la solución de color rosa intenso, corresponde al control positivo de células sin contacto con nanosistemas, de manera contigua están las celdas que contienen medio de cultivo correspondientes a la incubación con los nanosistemas AuNEs, AuNRs@Cit LC(23), AuNRs@Cit LC(25) y AuNRs@Cit LC(23), finalmente en el extremo derecho se encuentra la cubeta con medio de cultivo del ensayo con hidrogeles blancos.



**Figura 30.** A-B) Intensidad y coloración de resazurina reducida por fibroblastos 3T3-L1 adheridos a la placa después de la incubación con nanocompuestos ( $n=3$ ). C-D) Intensidad y coloración de resazurina reducida por fibroblastos 3T3-L1 adheridos a los nanocompuestos ( $n=3$ ).

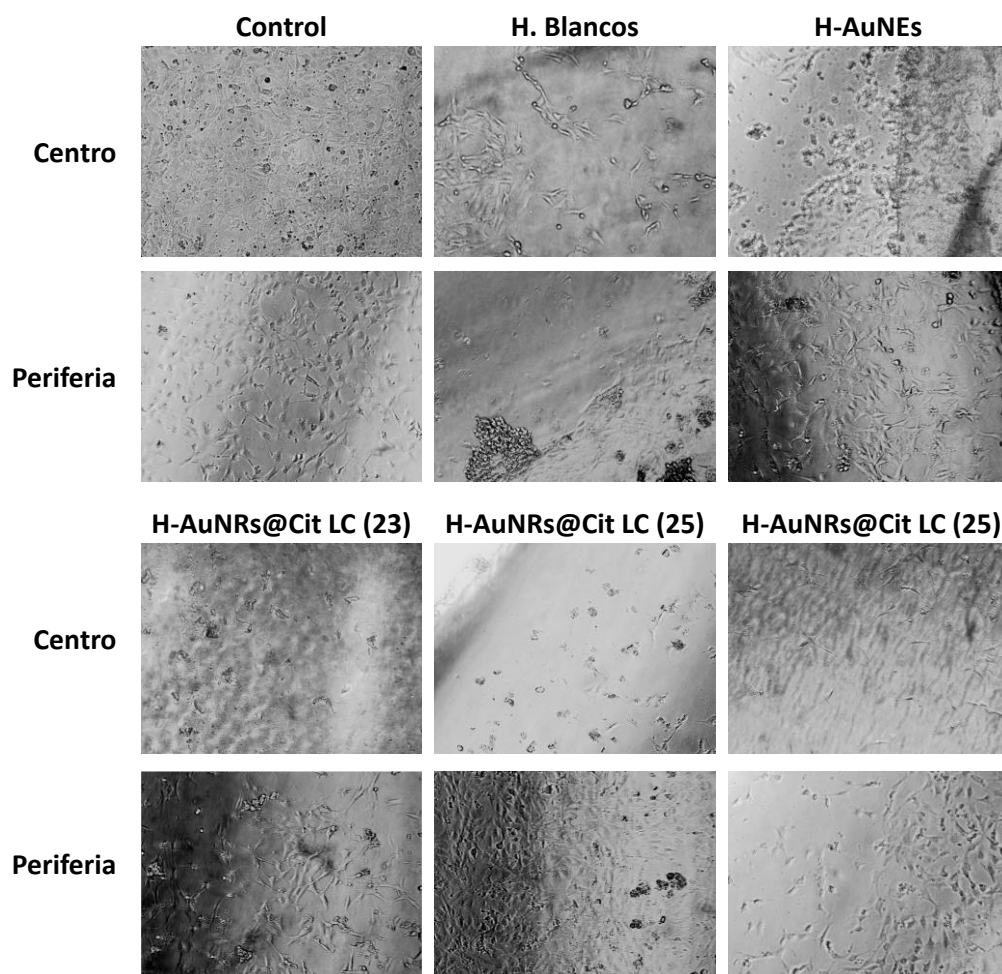
Durante el ensayo los nanosistemas fueron retirados de su pozo original y reubicados en un pozo nuevo de la placa experimental, dichos nanocompuestos también fueron evaluados mediante la reducción de resazurina con el objetivo de cuantificar si había células adheridas a los AuNPs-Hidrogeles y si estas estaban en disposición de realizar sus procesos celulares. Las figuras 30C y 30D muestran la gráfica y coloración de los resultados del ensayo, obteniendo unánimemente valores negativos de manera significativa y coloraciones azules en los medios de cultivo, lo cual indica que no hay células vivas presentes en los hidrogeles después de reubicarlos.

### 3.2.4 Adaptabilidad morfológica de células

Cuando se trata de analizar el efecto que los nanomateriales pueden tener en cultivos celulares no solo es importante realizar análisis de citotoxicidad, sino que también es indispensable evaluar su morfología ante la exposición mediante la visualización de las células por microscopía, de esta manera es posible observar cambios notorios en la morfología celular.

En la figura 31 se ilustran las micrografías obtenidas para cada pozo de la placa, para evidenciar si la morfología de los fibroblastos 3T3-L1 en presencia de AuNPs-Hidrogeles cambiaba. El pozo control mostró

gran confluencia al centro del área con ligera disminución sobre la periferia, la morfología celular era alargada pretendiendo el contacto entre células adyacentes. Por su parte, el pozo que contenía hidrogeles sin nanopartículas no presentó gran confluencia celular, en cambio las células sembradas formaron agrupaciones con células de morfología esférica características de muerte celular. En cuanto a los fibroblastos en contacto con hidrogeles con nanopartículas de oro esféricas o rodillos un común denominador resultó el observar que se adhirieron pocas células a la superficie del gel, ya que se adhirieron al fondo del pozo donde a pesar de tener contacto con el nanocompuesto, la proliferación celular no se vio afectada como para el caso de los hidrogeles sin nanopartículas; de igual manera se observó menor crecimiento en el área céntrica del pozo a diferencia de la periferia donde la mayor cantidad de células optó por adherirse y proliferar. Invariablemente el crecimiento de fibroblastos 3T3-L1 sobre los nanosistemas, fue menor al control.



**Figura 31.** Micrografías de cultivos de fibroblastos murinos 3T3-L1 en presencia de hidrogeles embebidos con nanopartículas de oro en morfologías esféricas o de rodillo.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Nanomateriales de oro

Las nanopartículas de oro también son conocidas como oro coloidal, son sintetizadas en un intervalo de diámetro de 3 a 200 nm, así como en diferentes morfologías, como cubos, estrellas y rodillos. La morfología común obtenida en la síntesis de estos nanomateriales es la cuasi-esférica, porque la energía superficial favorece la formación de partículas esféricas (Tan et al., 2019). El objetivo de este trabajo se enfocó en utilizar dos morfologías de nanopartículas para comparar los efectos atribuidos a cada forma, por ejemplo, la señal LSPR en UV-Vis, el tamaño de partícula y relación de aspecto, además de sus efectos biológicos, sobre todo en la viabilidad celular.

La síntesis de nanoesferas de oro (AuNEs) reportada por Bastús et al., 2011, aporta modificaciones al método tradicional de síntesis de nanopartículas de Turkevich, explicando un método iterativo por generaciones de nanopartículas según su diámetro, con señales específicas en el espectro de UV-Vis para cada tamaño, desde la generación cero hasta la generación 14, o bien, desde 8.4 nm hasta 180.5 nm de diámetro, respectivamente. Entonces, se planteó la búsqueda de la síntesis de AuNEs de  $\approx 22$  nm de diámetro, de acuerdo con el planteamiento de las ecuaciones 6-8 de la sección 3.1.2, para obtener un volumen aproximado que sea similar con la morfología de rodillos. En consecuencia, según los reportes de Bastús (tabla 2) el tamaño buscado presentaría una señal LSPR alrededor de 523.5 nm en la tercera generación. No obstante, al realizar la metodología experimental y adecuarla en nuestro laboratorio, se obtuvieron señales en mayores longitudes de onda en menos generaciones de manera reproducible. La comparación de lo reportado en la literatura y los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparativa de la síntesis de nanoesferas de oro de Bastús et al., 2011.

Síntesis de Bastús			Síntesis realizada	
Generación	LSPR	Diámetro (nm)	Generación	LSPR
G0	518	8.4 ± 1.0	G0	521
G1	521.5	17.6 ± 1.2	G1	523
G2	523.5	22.3 ± 2.2	G2	526
G3	525.5	31.1 ± 2.8	G3	528

Se decidió entonces que independientemente de la generación de síntesis, el principal indicador sería buscar obtener la señal LSPR en el intervalo de [522, 524] nm de longitud de onda correspondiente a un tamaño esperado (según Bastús et al., 2011) de 22 nm de diámetro. Al realizar la caracterización por TEM se corroboró que la morfología fuera cuasi-esférica y además se reportó que el diámetro promedio obtenido fue de 25 nm, con señal en UV-Vis a 524 nm.

Otro de los nanomateriales de oro que ha llamado la atención son los nanorodillos de oro (AuNRs), principalmente por su morfología, ya que a partir de sus dimensiones (longitud y diámetro) es posible calcular la relación de aspecto, que a diferencia de la morfología de esfera tiene un valor distinto a 1. Entonces, la relación de aspecto de este nanomaterial cobra relevancia para evaluar tanto sus efectos de superficie e interacciones biológicas, por ejemplo, con células de mamífero, como sus propiedades ópticas al interactuar con la luz.

Para obtener nanorodillos que fueran de acuerdo con la comparativa en volumen con las nanoesferas, se realizaron variaciones en la cantidad de HCl adicionado durante la síntesis, ya que la metodología reportada por Chang & Murphy, 2018, hace hincapié en que a mayor volumen de HCl se obtienen AuNRs con mayor relación de aspecto debido al potencial reductor de la hidroquinona dependiente del pH, y de acuerdo con las ecuaciones 6-8 se estimó que la longitud debería ser aproximada a 88 nm de acuerdo con el diámetro de 9 nm.

En los AuNRs se presentan dos señales de LSPR, la primera de ellas se refiere al modo transversal y la segunda al longitudinal. Al finalizar la síntesis se caracterizaron los nanomateriales por UV-Vis, en donde se obtuvo la señal transversal a 504 nm mientras, que las señales longitudinales de acuerdo a los datos reportados por Chang & Murphy, 2018, para los volúmenes de 19 y 25  $\mu\text{L}$ , debieron encontrarse a señales LSPR  $\geq 1167$  nm; sin embargo, aunque en nuestra síntesis las señales LSPR fueron obtenidas a valores de longitud de onda ligeramente menor que en la literatura, el intervalo entre ambas muestras es alrededor de 80 nm, por lo que la diferencia entre cada muestra se mantiene similar, como se presenta en la comparativa de la tabla 5.

**Tabla 5.** Señales de LSPR para AuNRs de 19 y 25  $\mu\text{L}$  de HCl (Chang & Murphy, 2018).

$V_{\text{HCl}}$	$\text{LSPR}_{\text{síntesis}} \text{ (nm)}$	$\text{LSPR}_{\text{reportado}} \text{ (nm)}$
19 $\mu\text{L}$ HCl	1110	1167
25 $\mu\text{L}$ HCl	1190	1245

Otro punto importante para tener una mayor similitud en las características fisicoquímicas de ambas morfologías nanométricas de oro, es tomar en cuenta su carga superficial de acuerdo con el agente estabilizante que las recubre. Para el caso de las AuNEs fueron estabilizadas con citrato de sodio, esta sal aniónica también cubre la función de agente reductor durante la nucleación de las nanopartículas; en cambio el estabilizante de los AuNRs es CTAB, esta es una sal catiónica de amonio que comúnmente es utilizada como surfactante.

El hecho que las nanopartículas no tengan el mismo estabilizante en su superficie y en especial, que tengan cargas superficiales opuestas, evitaría una comparativa justa, principalmente para la segunda parte del proyecto donde se involucra la evaluación de la biocompatibilidad de ambas morfologías de oro, ya que se ha reportado en numerosas ocasiones que el CTAB presenta efectos citotóxicos elevados (Alkilany & Murphy, 2010). Ejemplo de ello es el trabajo reportado por Jia et al., 2020; en el que se describe la nanotoxicología de AuNRs estabilizados con CTAB y AuNRs modificados con PEG en la línea celular de fibroblastos murinos NIH-3T3. La evaluación de la citotoxicidad indicó que los CTAB-AuNRs de diferentes proporciones de aspecto inducen citotoxicidad, mientras que los PEG-AuNRs tienen un efecto de biocompatibilidad mejorada. Además, se investigó cómo las características de superficie influyen en los efectos tóxicos de los AuNRs en estudios *in vivo*, debido a que se reportó que los CTAB-AuNRs pueden inducir necrosis celular aguda causada por la despolarización de la membrana celular gracias a la carga positiva que recubre las partículas, puesto que para los PEG-AuNRs (los cuales tienen carga negativa), la citotoxicidad se redujo considerablemente.

Con base en la evaluación citotóxica de CTAB reportada por diversos autores, se realizó el intercambio de ligando estabilizante de CTAB a citrato según la metodología de Zhou et al., 2018. Se tomó una alícuota en la parte intermedia del experimento de transferencia (checkpoint), debido a que involucra el uso de  $\text{AgNO}_3$ , el cual se deposita en la superficie de los AuNRs y consecuentemente tiene efectos en el plasmón de superficie. Dentro de los cambios reportados está el corrimiento de la señal de UV-Vis hacia longitudes de onda menores (azul), y al finalizar la reacción y tener los AuNRs estabilizados en citrato, el plasmón de superficie nuevamente presenta un corrimiento de la señal, pero ahora hacia longitudes de onda mayores.

En conformidad con el intercambio de estabilizante a citrato para los nanorodillos de oro, las condiciones comparativas con las nanoesferas de oro fueron más equilibradas, dado que ambas morfologías presentan carga superficial negativa gracias a la presencia de la sal aniónica, siendo así que la evaluación de ambos materiales en la siguiente etapa del proyecto no se vería sesgada por esta propiedad.



## 4.2 Hidrogeles con AuNPs

Las nanopartículas inorgánicas embebidas en hidrogeles poliméricos han resultado ser un método eficaz para mejorar la funcionalidad de las NPs en sistemas biológicos. Un material híbrido de este tipo también presenta la doble ventaja de tener las propiedades tanto del hidrogel como de las NPs. Si bien mejoran las propiedades físicas y químicas del hidrogel, la mayoría de las NPs metálicas son bioactivas y poseen naturalmente acciones antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias (Heo et al., 2014; Tan et al., 2019).

En la última década ha sido un foco de atención la nanotecnología aplicada para la curación de heridas, donde un sistema biocompatible es fundamental para este objetivo. Para ello, los nanocompuestos de AuNPs-hidrogeles resultan idóneos para poder llevar a cabo investigaciones en el área. Distintos autores han reportado la indiscutible biocompatibilidad del oro coloidal en cultivos celulares o tejidos, sin embargo, dicha biocompatibilidad va de la mano con la concentración de partículas utilizada, su superficie y su morfología, además del rol que conllevan inmersas en la red polimérica, es decir, el hidrogel.

Anteriormente Mahmoud, Al-Kharabsheh, et al., 2019, investigaron la citotoxicidad, captación celular y cicatrización de heridas de fibroblastos dérmicos humanos CCD-1064Sk a partir del tratamiento con nanorodillos de oro decorados con diferentes ligandos. Los AuNRs neutros y catiónicos decorados con PEG, demostraron la menor citotoxicidad e internalización celular, mientras que los AuNRs recubiertos con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) aniónica mostraron citotoxicidad significativa; además de que la tasa de cicatrización fue potenciada en los estudios *in vitro* donde se utilizaron AuNRs neutros y con PEG, a diferencia de los AuNRs con BSA que ocasionaron una cicatrización más lenta e indujeron una liberación significativa de citocinas pro-inflamatoria. Por otro lado, Wang et al., 2017 notó que la presencia superficial de AuNPs esféricos de 27 nm, en los hidrogeles de alginato con carga multivalente, propiciaba el aumento de la adhesión de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs), en contraste con los hidrogeles que no contenían AuNPs en su superficie. Adicionalmente Ren et al., 2017 sintetizaron hidrogeles a base de PEG con AuNEs de 20 y 42 nm de diámetro en su superficie, lo que este grupo pudo notar mediante microscopia óptica fue que en cultivo celular con fibroblastos murinos de la línea celular L-929 había una notable adhesión celular en estos nanocompuestos. Aparentemente, las AuNPs soportadas en estos hidrogeles, sirven como puntos de anclaje para la unión celular, siendo mayor este efecto en los nanocompuestos con partículas de 20 nm de diámetro.

En ese sentido, se corroboró que la biocompatibilidad de las nanopartículas de oro en la línea celular de fibroblastos murinos 3T3-L1, y con base en reportes previamente publicados, es válido afirmar que en el

intervalo alrededor de 20 nm se pueden obtener efectos beneficiosos para la viabilidad y la adhesión celular (Ren et al., 2017). Sin embargo, aunque las AuNPs no sean citotóxicas, los AuNPs-hidrogeles sintetizados no tuvieron el mismo efecto, puesto que no se observó adhesión ni proliferación celular mayor al 60% después de 7 días de incubación, tanto para los sistemas con nanopartículas esféricas como para nanorodillos, por lo que la morfología de ambos nanomateriales de oro no derivó en un efecto mayor o menor en cuanto a su biocompatibilidad. Sin embargo, las nanopartículas de oro inducen una respuesta celular de manera dependiente del tamaño y la línea celular que se esté trabajando puesto que se obtienen diferentes respuestas celulares incluso para nanopartículas de tamaño similar.

No obstante, también se ha comparado la citotoxicidad entre nanopartículas metálicas dentro de nanocompuestos. En particular, Marsich et al., 2011 realizaron la investigación de nanocompuestos homogéneos basados en polisacáridos naturales (alginato) y nanopartículas metálicas (de oro y plata) formadas en soluciones de quitosano modificado con lactosa (Chitlac), mediante la reducción de iones al calentar la solución de polisacárido con  $\text{HAuCl}_4$  o  $\text{AgNO}_3$ . En este estudio se evaluó la citotoxicidad en las líneas celulares de hepatocarcinoma y osteosarcoma humano (HepG2 y MG63, respectivamente), mediante un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). Previamente en los hidrogeles con nanopartículas de plata (AgNPs), no se detectó ningún efecto citotóxico en las mismas líneas celulares y, por el contrario, se descubrió que los hidrogeles AuNPs ejercen actividad citotóxica por contacto directo con las células, de tal manera que se llegó a la conclusión que las mitocondrias son el principal objetivo intracelular de las nanopartículas metálicas, dado que median su toxicidad a través de un estrés oxidativo con aumento de los niveles de ROS. En este caso las células incubadas con hidrogeles de Alginato-Chitlac-AuNPs, AuNPs y solución coloidal de Chitlac-AuNPs demostraron un aumento significativo del nivel de ROS después de 24 h de exposición en todos los materiales probados, cabe destacar que el nivel de ROS fue aproximadamente el doble que el del control (células sin tratar). Entonces, que los ensayos de viabilidad LDH hayan señalado un efecto tóxico hacia las líneas celulares HepG2 y MG63, en contraste con los hidrogeles a base de plata, se ve relacionado con un mecanismo apoptótico inducido por el aumento intracelular del nivel de ROS.

De manera retrospectiva, el común denominador de nanocompuestos de tipo AuNPs-hidrogel reportados con efectos positivos para el cultivo celular, es la funcionalización con los nanomateriales de oro sobre la superficie del hidrogel, donde la interacción nanopartícula-célula es efectuada de forma directa y los efectos por cargas superficiales pueden ser más fuertes, mientras que el hidrogel sirve de soporte y aporta estabilidad y difusión de líquidos, por ejemplo, del medio de cultivo. Por el contrario, la síntesis de AuNPs-Hidrogel que conlleva el embeber las nanopartículas en la red polimérica podría impedir la interacción

directa con las células al tener las nanopartículas insertadas dentro del hidrogel, por lo que las interacciones provocadas por las cargas de las AuNPs y las células resulten débiles al no tener contacto directo en la superficie, además que la elección de 100 mg alginato y 24 h de tiempo de entrecruzamiento resultó en que estos materiales tuvieran mayor absorción de agua, lo cual puede traducirse a mayor volumen de poro, lo cual también dificulta la adhesión celular. Otro efecto que pudo haber sucedido es que el alginato y el entrecruzante del hidrogel pueden estar teniendo otro tipo de interacciones con los nanomateriales de oro que no permitan la adhesión al nanocompuesto ni a la placa de cultivo, además que en consecuencia se derive el incremento de la producción de ROS y la citotoxicidad.

A partir de la investigación desarrollada en este trabajo es posible destacar puntos a considerar en el futuro, por ejemplo, el reducir el volumen de poros de los hidrogeles para evaluar si al contar con menor absorción de agua podría inducir un cambio en las propiedades de adhesión celular. También, podría considerarse el aumento de concentraciones de nanopartículas ya que al plantear la reducción en la cantidad de absorción de los hidrogeles será necesario contar con más puntos de adhesión en su superficie, donde las nanopartículas de oro pueden intervenir y propiciar el anclaje y proliferación celular.

Finalmente el desarrollo científico y nanotecnológico representa un futuro prometedor para la mejora de todas las áreas, principalmente las que implican beneficios para la calidad de vida de la población mundial; pese a las limitaciones actuales, las investigaciones disponibles proporcionan una guía para la mejora y creación de sistemas con mayor progreso y las nanociencias tienen un papel protagónico en ello, pues la manipulación y comprensión a esta escala nos acerca hacia el conocimiento sobre el fundamento de la materia y de la vida.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Se obtuvo la síntesis de nanoesferas de oro con morfología cuasi-esférica y radio promedio de 12.5 nm, así como nanorodillos de oro con relación de aspecto promedio de 8.5.

El intercambio de estabilizante de los nanorodillos de oro fue realizado exitosamente con corrimientos de las señales de UV-Vis conforme a lo reportado en la literatura.

Se diseñaron hidrogeles de alginato con secado e hinchamiento buscando la mayor absorción de agua sin rupturas de la matriz polimérica.

La incorporación de los nanomateriales sintetizados en los hidrogeles dio como resultado un material nanocompuesto.

Las AuNEs y AuNRs no ejercen un efecto citotóxico en las células de fibroblastos murinos.

Las células 3T3-L1 expuestas a AuNEs y AuNRs mantienen la producción de especies reactivas de oxígeno similar al control.

Los nanocompuestos AuNEs-Hidrogel y AuNRs-Hidrogel aumentan significativamente la producción de ROS intracelulares.

Los sistemas AuNEs-Hidrogel y AuNRs-Hidrogel no presentan adhesión celular impidiendo que promuevan el crecimiento de las células 3T3-L1.

## Literatura citada

---

- Acosta A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*, 25(57), 26–33. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/6603>
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7), 2313–2333. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- Amini, S. M. (2019). Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109809. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109809>
- Arafa, M. G., El-Kased, R. F., & Elmazar, M. M. (2018). Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Scientific Reports*, 8(1), 13674. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31895-4>
- Arenas, J. (2003). Las heridas y su cicatrización. *Offarm*, 22(5), 126–132. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-las-heridas-su-cicatrizacion-13047753>
- Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. En S. B. Majee (Ed.), *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64301>
- Bastús, N. G., Comenge, J., & Puntès, V. (2011). Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir*, 27(17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
- Beanes, S. R., Dang, C., Soo, C., & Ting, K. (2003). Skin repair and scar formation: the central role of TGF- $\beta$ . *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(8), 1–22. <https://doi.org/10.1017/S1462399403005817>
- Blaeser, A., Million, N., Campos, D. F. D., Gamrad, L., Köpf, M., Rehbock, C., Nachev, M., Sures, B., Barcikowski, S., & Fischer, H. (2016). Laser-based in situ embedding of metal nanoparticles into bioextruded alginate hydrogel tubes enhances human endothelial cell adhesion. *Nano Research*, 9(11), 3407–3427. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1218-3>
- Boomi, P., Ganesan, R., Prabu Poorani, G., Jegatheeswaran, S., Balakumar, C., Gurumalles Prabu, H., Anand, K., Marimuthu Prabhu, N., Jeyakanthan, J., & Saravanan, M. (2020). Phyto-Engineered Gold Nanoparticles (AuNPs) with Potential Antibacterial, Antioxidant, and Wound Healing Activities Under in vitro and in vivo Conditions. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 7553–7568. <https://doi.org/10.2147/IJN.S257499>
- Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
- Cao, G., & Wang, Y. (2011). *Nanostructures and Nanomaterials* (2nd ed.). World Scientific. <https://doi.org/10.1142/7885>

- Chang, H. H., & Murphy, C. J. (2018). Mini Gold Nanorods with Tunable Plasmonic Peaks beyond 1000 nm. *Chemistry of Materials*, 30(4), 1427–1435. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b05310>
- Choi, C. E., Chakraborty, A., Coyle, A., Shamiya, Y., & Paul, A. (2022). Contact-Free Remote Manipulation of Hydrogel Properties Using Light-Triggerable Nanoparticles: A Materials Science Perspective for Biomedical Applications. *Advanced healthcare materials*, 11(8), e2102088. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102088>
- Debnath, N., & Das, S. (2020). Nanobiosensor: Current Trends and Applications. En S. M. P. Saxena Shailendra K. and Khurana (Ed.), *NanoBioMedicine* (pp. 389–409). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9_16)
- Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018a). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537–556. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.02.088>
- Geraldo, J. A. (2021). *Efecto de la exposición aguda y subcrónica a nanopartículas de óxidos metálicos en el sistema antioxidante de células hepáticas* [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3613>
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2010). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(19), 3280–3294. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>
- Hammami, I., Alabdallah, N., Jomaa, A. Al, & Kamoun, M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University*, 33(7), 101560. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560>
- Heo, D. N., Ko, W.-K., Bae, M. S., Lee, J. B., Lee, D.-W., Byun, W., Lee, C. H., Kim, E.-C., Jung, B.-Y., & Kwon, I. K. (2014). Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle–hydrogel complex. *J. Mater. Chem. B*, 2(11), 1584–1593. <https://doi.org/10.1039/C3TB21246G>
- Horiguchi, Y., Kanda, T., Torigoe, K., Sakai, H., & Abe, M. (2014). Preparation of Gold/Silver/Titania Trilayered Nanorods and Their Photocatalytic Activities. *Langmuir*, 30(3), 922–928. <https://doi.org/10.1021/la404370s>
- Jáuregui Michel, M. Y. (2021). *Nanopartículas plasmónicas embebidas en hidrogeles para la evaluación de moléculas inorgánicas en aguas costeras* [Tesis de Maestría, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3549882>
- Jia, Y. P., Shi, K., Liao, J. F., Peng, J. R., Hao, Y., Qu, Y., Chen, L. J., Liu, L., Yuan, X., Qian, Z. Y., & Wei, X. W. (2020). Effects of Cetyltrimethylammonium Bromide on the Toxicity of Gold Nanorods Both In Vitro and In Vivo: Molecular Origin of Cytotoxicity and Inflammation. *Small Methods*, 4(3). <https://doi.org/10.1002/smt.201900799>
- Lau, P., Bidin, N., Islam, S., Shukri, W. N. B. W. M., Zakaria, N., Musa, N., & Krishnan, G. (2017). Influence of gold nanoparticles on wound healing treatment in rat model: Photobiomodulation therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 49(4), 380–386. <https://doi.org/10.1002/lsm.22614>

- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.06.003>
- Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano*, 15(8), 12687–12722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04206>
- Mahmoud, N. N., Al-Kharabsheh, L. M., Khalil, E. A., & Abu-Dahab, R. (2019). Interaction of Gold Nanorods with Human Dermal Fibroblasts: Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Wound Healing. *Nanomaterials*, 9(8), 1131. <https://doi.org/10.3390/nano9081131>
- Mahmoud, N. N., Hikmat, S., Abu Ghith, D., Hajeer, M., Hamadneh, L., Qattan, D., & Khalil, E. A. (2019). Gold nanoparticles loaded into polymeric hydrogel for wound healing in rats: Effect of nanoparticles' shape and surface modification. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.079>
- Marsich, E., Travan, A., Donati, I., Di Luca, A., Benincasa, M., Crosera, M., & Paoletti, S. (2011). Biological response of hydrogels embedding gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.002>
- Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., & Holban, A. M. (2019). Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(13), 2176. <https://doi.org/10.3390/ma12132176>
- Munive-Olarte, A., Hidalgo-Moyle, J. J., Velasquillo, C., Juarez-Moreno, K., & Mota-Morales, J. D. (2022). Boosting cell proliferation in three-dimensional polyacrylates/nanohydroxyapatite scaffolds synthesized by deep eutectic solvent-based emulsion templating. *Journal of Colloid and Interface Science*, 607, 298–311. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.149>
- Navaei, A., Saini, H., Christenson, W., Sullivan, R. T., Ros, R., & Nikkhah, M. (2016). Gold nanorod-incorporated gelatin-based conductive hydrogels for engineering cardiac tissue constructs. *Acta Biomaterialia*, 41, 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.05.027>
- Nezhad-Mokhtari, P., Akrami-Hasan-Kohal, M., & Ghorbani, M. (2020). An injectable chitosan-based hydrogel scaffold containing gold nanoparticles for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.112>
- Ramani, D., R, P., Sivaranjani, K., Chandra, J. H., & Sastry, T. (2015). Nanoparticles embedded biomaterials in wound treatment: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 324–329. [https://www.researchgate.net/publication/282682998\\_Nanoparticles\\_embedded\\_biomaterials\\_in\\_wound\\_treatment\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/282682998_Nanoparticles_embedded_biomaterials_in_wound_treatment_A_review)
- Ren, F., Yesildag, C., Zhang, Z., & Lensen, M. C. (2017). Functional PEG-Hydrogels Convey Gold Nanoparticles from Silicon and Aid Cell Adhesion onto the Nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 29(5), 2008–2015. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b03548>
- Rivera, A., Escobar, L., & Aristizábal, F. (2010). Estudio Comparativo De Los Métodos De Resazurina Y MTT En Estudios De Citotoxicidad En Líneas Celulares TumORAles Humanas. *Vitae*, 17(1), 67–74. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815395009>

- Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00107-0)
- Salinas, G. (2020). *Análisis comparativo de la citotoxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y su efecto en el ciclo celular de fibroblastos, osteoblastos y melanoma* [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3311>
- Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., & Murray, R. W. (2009). Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir*, 25(24), 13840–13851. <https://doi.org/10.1021/la9019475>
- Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2015). A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(21), 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02123>
- Tan, H.-L., Teow, S.-Y., & Pushpamalar, J. (2019). Application of Metal Nanoparticle–Hydrogel Composites in Tissue Regeneration. *Bioengineering*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010017>
- The Royal Society. (2004). *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. <https://royalsociety.org/news-resources/publications/2004/nanoscience-nanotechnologies/>
- Thoniyot, P., Tan, M. J., Karim, A. A., Young, D. J., & Loh, X. J. (2015). Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science*, 2(1–2), 1400010. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/advs.201400010>
- Wang, B., Wang, W., Yu, Y., Zhang, Y., Zhang, J., & Yuan, Z. (2017). The study of angiogenesis stimulated by multivalent peptide ligand-modified alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.049>
- Yadid, M., Feiner, R., & Dvir, T. (2019). Gold Nanoparticle-Integrated Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Nano Letters*, 19(4), 2198–2206. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00472>
- Zhang, M., & Zhao, X. (2020). Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1414–1428. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2020.07.311>
- Zhang, X. (2015). Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(3), 771–775. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0529-4>
- Zhou, S., Huo, D., Goines, S., Yang, T.-H., Lyu, Z., Zhao, M., Gilroy, K. D., Wu, Y., Hood, Z. D., Xie, M., & Xia, Y. (2018). Enabling Complete Ligand Exchange on the Surface of Gold Nanocrystals through the Deposition and Then Etching of Silver. *Journal of the American Chemical Society*, 140(38), 11898–11901. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b06464>



