

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

*UNIDAD QUERÉTARO*

**Uso de nanopartículas de oro para aplicaciones biomédicas.**

Tesis que presenta

Diana Ginette Zárate Triviño

Para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Materiales

Directores de Tesis:

Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas

Dr. Evgen Prokhorov

Santiago de Querétaro, Qro.

Febrero 2014

**CINVESTAV  
IPN  
ADQUISICION  
LIBROS**

CLASIF.. CA 00232  
ADQUIS.. CA-247-551  
FECHA: 04-Febrero 2015  
PROCED.. Dm 20 E  
\$ \_\_\_\_\_

ID: 2190-4-1001

*A mi padre,*

Apretaste mi mano cuando sentí miedo,  
aun cuando mi peor miedo era perderte,  
me diste la entereza para aceptarlo.

*A mi madre,*

Tragaste tus lagrimas mientras secabas las mías,  
cada vez que te decía adiós y subía al avión.  
Desde niña me enseñaste con tu ejemplo,  
A continuar a pesar de creer que ya no hay fuerzas.

*A mi esposo y mi hija,*

Que son el regalo más hermoso que he tenido,  
por su paciencia y amor incondicional.

## **Agradecimientos**

### **Agradecimientos profesionales**

A CONACYT por el apoyo económico brindado para mi manutención, mediante la beca número 219879.

A CINVESTAV unidad Querétaro, por permitir el desarrollo experimental de este trabajo de tesis, así como el apoyo económico brindado para la difusión de este trabajo.

A CONCYTEQ por el apoyo económico brindado para la divulgación de este trabajo en foros nacionales

A mis asesores Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas y Dr. Evgen Prokhorov Federovitch investigadores titulares del Cinvestav Unidad Querétaro, por su apoyo, comprensión y dedicación en mi formación académica. Gracias por cada uno de sus consejos, observaciones, pero sobre todo por su cariño genuino.

A mis sinodales Dr. Francisco Espinoza Beltrán, Dr. Alberto Herrera Gómez y Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas, investigadores titulares del Cinvestav Unidad Querétaro, por sus atinadas observaciones y su real interés en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Investigadora titular de la Universidad autónoma de Nuevo León, por abrirme las puertas del Departamento de inmunología y virología de la Facultad de ciencias Biológicas, por creer en mi capacidad y apostar por la colaboración interinstitucional e interdisciplinaria sin la cual no hubiera sido posible el desarrollo exitoso de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña, Profesor investigador de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su apoyo, soporte y confianza incondicional tanto en lo profesional como lo personal

Al Dr. Andrés Manuel Garay Tapia, Investigador del centro de investigación en materiales avanzados y al Químico Martín Adelaido Hernández Landaverde, por su valiosa colaboración con los cálculos teóricos y análisis de difracción de rayos X, sin los cuales no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis.

Al Ingeniero Alfredo Muñoz Salas y Martín por todo el soporte brindado en el desarrollo de esta tesis, por recibirme en el Laboratorio 1 y hacerme parte del mismo, gracias por su amistad y los momentos vividos día a día.

Al Dr. Moisés Franco Molina, Profesor investigador de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por la orientación en el desarrollo de las pruebas biológicas realizadas durante esta investigación, así como su apoyo tanto en lo profesional como lo personal.

A la M. C. Reina Araceli Mauricio Sánchez, por su apoyo y asesoría tanto en lo profesional como en lo personal.

A mi grupo de trabajo: Dr. José Juan Gervacio Arciniega, M. en C. Edna Melisa Valenzuela, M en C. Moisés Oviedo, M en C. Siva Kumar, Dr. Josué Mota, Dra. Iraís Quintero y Dra. Betzabe González por su apoyo en mediciones, comentarios y discusiones que enriquecieron este trabajo y mi formación académica.

A las secretarias Margarita Escobosa Molina, Raquel Badillo, Mónica Hernández, Irene Amezcua y María Eugenia Vázquez Chávez por su apoyo en todos y cada uno de los tramites que tuve que realizar durante mi tiempo en Cinvestav, Gracias por su amistad, ustedes son ángeles caídos del cielo que cuidan nuestra espalda en cada gestión y hacen sencillo lo que es complicado.

A las señoras de intendencia en especial Doña panchita, que con tanto amor y esmero, cuida y mantiene las instalaciones de los laboratorios limpios para nuestro servicio.

A los auxiliares de investigación de CINVESTAV unidad Querétaro María del Carmen Delgado por su ayuda en los análisis térmicos, Luz Ma. Reyna Avilés Arellano por el apoyo brindado en cuanto a equipos y material de laboratorio, José Eleazar Urbina Álvarez, por su ayuda en el análisis en el Microscopio electrónico de barrido, Cyntia Zúñiga Romero, por su ayuda en el préstamo de equipos de laboratorio.

## **Agradecimientos personales**

A *Dios* por las bendiciones y protección recibidas durante este tiempo, por darme claridad y agudeza mental para continuar con mi formación, por las pruebas que me enviaste y las lecciones aprendidas.

A mi padre, *Augusto Zárate Rubio* aunque hoy no estás conmigo y tu ausencia es cada vez más grande espero que donde estés puedas sentirte orgulloso de mí, el trabajo, los sacrificios y el esfuerzo con el que enfrentaste la vida es mi mejor herencia.

A mi madre, *Amira Triviño Oicatá* por su sacrificio al dejarme partir, pero sobre todo por ser mi modelo de vida. Gracias mami, gracias por luchar para continuar a mi lado por enseñarme el valor de la fuerza y la constancia, por despertar cada día, te amo y te admiro como a ningún ser que exista sobre esta tierra, no nos rendimos y continuamos siendo una familia, ustedes son mi motor.

A *Diego Augusto Zárate Triviño*, porque sin saberlo eres mi orgullo, mi mejor amigo, mi hermano, eres un pedazo de mi corazón, gracias por tu confianza y amor, por creer en mí. Por ti, quiero ser mejor persona cada día, ser tu mejor ejemplo, alcanzar todas las metas posibles para que te sientas orgulloso de mí.

A mi hija *Audrey Renata* porque me has enseñado el valor de amar más allá de lo que se puede expresar, por desarmarme con tus abrazos, mucho tiempo dedicado a este trabajo te fue robado a ti, espero algún día poder recompensar cada minuto y llegar a ser un modelo para ti.

Al amor de mi vida *Andrés Manuel Garay Tapia*, por ser mi centro y levantarte cada día con la convicción de continuar por nuestra familia, por soportar mis frustraciones y celebrar cada triunfo pequeño, por los momentos difíciles y felices que me has permitido vivir a tu lado.

A *David Alexander Zárate Triviño* y *Pamela Borja* por sus palabras de aliento, por su compañía.

A mis tíos *Fernando Triviño Oicatá* y *Mireya Triviño Oicatá*, por su confianza y apoyo en las situaciones difíciles, por desear mejores oportunidades para mí, espero no defraudar todas las expectativas que han depositado en mí.

A la Señora *Magdalena Tapia Uribe* y el Señor *Andrés Garay Cruces*, por abrirme las puertas de su casa y darme una familia, por su apoyo en todo momento.

A mis amigos *Edna Melisa Valenzuela*, *Gerardo Arreola*, *Daysi Ivette Torres*, *José Juan Gervacio*, *Rosa Helena Dávila*, *Moisés Oviedo*, *Siva Kumar* por brindarme su apoyo en todos los momentos, por escuchar, reír y llorar juntos aun a distancia me han enseñado el valor de una amistad sólida y madura.

## Resumen

Tres grupos de nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de oro, fueron obtenidos por medio de síntesis química, usando citrato de sodio y quitosano como agentes reductores en diferentes composiciones. Las relajaciones térmicas de estos materiales fueron estudiadas por medio de la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica, así como la dependencia de la conductividad en función de la concentración de partículas y productos de reacción. En base a los resultados obtenidos se determinó un intervalo de concentración de nanopartículas de oro (AuNp's), el cual fue empleado para sintetizar un cuarto grupo de materiales desarrollados a partir de un copolímero híbrido natural sintético enriquecido con AuNp's, este último grupo de nanocompuestos fue evaluado "*in vitro*" e "*in vivo*" con el fin de determinar su capacidad como soporte celular para regeneración de heridas en piel y su posible toxicidad.

Los materiales fueron caracterizados por técnicas analíticas tales como Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR), Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos X (XRD) y Microscopia electrónica de barrido (SEM). Adicionalmente se realizó una colaboración para obtener cálculos teóricos de estructura del quitosano puro. Las mediciones realizadas por espectroscopia de infrarrojo corroboraron la interacción de la nanopartícula con la matriz de quitosano. Las mediciones de UV-vis permitieron detectar el plasmón de resonancia específico para nanopartículas de oro metálico y a su vez relacionar el valor máximo de longitud de onda con tamaños el partícula en un intervalo comprendido entre los 10 a 50 nm, estas dimensiones fueron confirmadas por medio del análisis las micrografías obtenidas por SEM.

Los análisis de difracción de rayos X, termogravimétricos y los cálculos teóricos de estructura fueron herramientas fundamentales para comprender y explicar la dependencia de la conductividad de los nanocompuestos, ya que las conformaciones moleculares del quitosano en función de la humedad generan fenómenos conductivos complejos en el polímero al interaccionar con nanopartículas metálicas. Así mismo se observó que la presencia de citrato de sodio en los materiales produce variaciones en la humedad de los mismos afectando la conductividad iónica.

El estudio "*in vivo*" reveló que los polímeros implantados no presentaron rechazo, inflamación o señas de toxicidad, por el contrario se observó que los materiales permitieron la reepitelialización del tejido con mejores resultados cosméticos comparado con el TheraForm, el cual fue usado como control debido a que este compuesto es usado de forma comercial para el tratamiento de estas lesiones. De la misma forma los resultados obtenidos de la citometría de flujo mostraron que los compósitos evaluados producen citocinas que intervienen positivamente en el proceso regeneración y reepitelialización. En los estudios "*in vitro*" se cultivaron macrófagos, células mononucleares de sangre periférica y células HEPG2 con el fin de evaluar la posible toxicidad de los nanocompósitos. Los resultados demostraron que estos materiales presentaron niveles de toxicidad bajos, lo cual se confirmó por medio de la detección de óxido nítrico en la que se observó una producción cercana a cero por parte de los macrófagos y células HEPG2

Los estudios realizados sugieren que existe una relación entre la dependencia de la conductividad de los nanocompósitos y su desempeño a nivel biológico. De la misma forma se comprobó que los compósitos con nanopartículas de oro pueden funcionar como alternativas en el proceso de cicatrización y reparación de heridas.



## Abstract

Three groups of nanocomposites based on chitosan and gold nanoparticles (AuNp's) were obtained by chemical synthesis using sodium citrate and chitosan as reducing agents with several compositions. Thermal relaxations of these materials were studied using electrical impedance spectroscopy, as well as the behavior of the conductivity as a function of particles concentration and reaction products. Based on the results obtained it was determined a range of AuNp's concentration, which was employed to synthesize a fourth group of materials. The latter group was developed from a hybrid copolymer enriched with gold nanoparticles. The last set of composites was tested "*in vitro*" and "*in vivo*" in order to determinate their capability as cellular support for the regeneration of wound skin and its possible toxicity.

All materials were characterized by infrared spectroscopy FT-IR, Ultraviolet- visible spectroscopy (UV-Vis) thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). Infrared spectroscopy confirmed the functionalization between the base material and the reactive molecules. Additionally, structural theoretical calculations were obtained by a collaboration. Infrared spectroscopy corroborated the interaction between the gold nanoparticles and chitosan matrix. UV- vis spectroscopy allowed to detect the resonance plasmon of metallic gold, as well as, to relate the maximum wavelength with particle size of 10 to 50 nm, these dimensions were confirmed by means of SEM micrographs analysis.

The XRD, TGA measurements and the theoretical calculations were essentials tools for understanding and explaining the nanocompósitos conductivity dependence, since, the molecular conformations of chitosan in function of moisture produce complex conductive phenomena on the polymer when it interacts with metallic nanoparticles. Besides, it was observed that the amount sodium citrate amount on materials produce variations in moisture which affect the conduction.

The "*in vivo*" test revealed the implanted polymers did not produced rejection, inflammation or toxicity signals. The evaluated materials allowed the reepithelialization process with better results compared with TheraForm, which was used as positive control, since, this commercial composite, is widely used for the treatment of skin wounds. The cytometry results showed that

these materials can produce cytokines involved in the regeneration process of the wound. For “*in vitro*” test macrophages, blood peripheral mononuclear cells, and Human hepatocellular liver carcinoma HepG2 cells were cultured for the purpose of evaluation of the nanocomposites toxicity. Obtained results showed low toxicity levels for all materials which was confirmed by detection of nitric oxide test with a production close to zero by macrophages and HepG2 cells. Results suggest that there may be a relationship between the dependence of nanocomposite conductivity and its biological performance. In addition, it was found that the chitosan composites with gold nanoparticles are good alternatives in the healing process and repair of skin wounds.

## Contenido

Agradecimientos .....	i
Agradecimientos profesionales .....	i
Agradecimientos .....	iii
Resumen.....	iv
Abstract .....	vi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de tablas .....	xv
CAPITULO 1 .....	1
1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes .....	3
1.1.1. Quitina y Quitosano .....	3
1.1.2. Propiedades básicas del quitosano.....	4
• Propiedades físico - químicas.....	4
• Propiedades eléctricas .....	5
• Propiedades Biológicas .....	5
1.1.3. Nanopartículas de Oro: desde sus inicios al día de hoy .....	6
1.1.4. Síntesis de AuNp's .....	6
1.1.5. Método de Turkevich .....	7
1.1.6. El papel del agente reductor .....	8
1.1.7. El quitosano como agente de reductor .....	9
1.1.8. La estabilidad de la partícula.....	10
1.1.9. Propiedades ópticas de las nanopartículas .....	10
1.1.10. Espectroscopia dieléctrica .....	11
1.1.11. Polarización dieléctrica.....	12
• Polarización electrónica .....	12
• Polarización iónica.....	12
• Polarización dipolar .....	13
1.1.12. Relajaciones dieléctricas.....	13
• El módulo eléctrico .....	14

1.1.13.	Teoría de Debye.....	15
•	Correcciones al modelo de Debye .....	16
•	Modelo de Cole-Cole.....	17
•	Modelo Cole- Davidson.....	18
1.1.14.	Relajaciones dieléctricas en polímeros.....	19
•	Relajación $\alpha$ .....	19
•	Relajación $\beta$ .....	20
•	Relajación $\gamma$ .....	21
•	Relajación $\beta_{wet}$ .....	21
•	Relajación $\sigma$ .....	21
1.1.15.	Influencia del agua en los procesos de relajación en polisacáridos.....	22
1.1.16.	Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	25
1.2.	Diseño de materiales complejos para regeneración de tejidos.....	26
1.3.	Introducción a la inmunología .....	27
•	La inmunidad innata o natural: .....	27
•	Inmunidad adaptativa o específica.....	28
•	Respuesta inflamatoria mediada por citocinas.....	28
•	1.3.1. Técnicas comúnmente usadas para la evaluación de la citotoxicidad .....	30
•	Células de hepatoblastoma humano Hep G2 .....	31
CAPITULO 2.....		32
2.	Justificación .....	32
2.1	Objetivos.....	33
2.1.1.	Objetivo general.....	33
2.1.2.	Objetivos específicos.....	33
CAPITULO 3.....		34
3.	Materiales y Métodos.....	34
3.1.	Síntesis de Nanocompuestos .....	34
•	Grupo 1. ....	35
•	Grupo 2 .....	35
•	Grupo 3 .....	36

• Grupo 4 .....	36
• Microscopia de barrido electrónico (SEM).....	37
• Preparación de contactos para mediciones dieléctricas .....	38
3.2. Pruebas biológicas .....	40
3.2.1. Evaluación de los materiales “ <i>in vivo</i> ” .....	40
3.2.2. Evaluación de los materiales “ <i>in vitro</i> ” .....	41
• Extracción de macrófagos peritoneales de ratón .....	41
• Conteo en cámara de Neubauer .....	41
• Cultivo de macrófagos .....	42
• Cultivo de células HEP-G2.....	42
• Ensayo de MTT.....	43
• Prueba de Azul tripano.....	43
• Detección de Óxido nítrico .....	43
• Citometría de flujo .....	44
CAPITULO 4.....	46
4. Resultados y Discusión para materiales del grupo 1 .....	46
4.1. Síntesis de Nanocompuestos .....	46
4.3. Análisis morfológico.....	49
4.4. Mediciones térmicas .....	51
4.5. Mediciones de conductividad .....	52
4.6. Mediciones dieléctricas.....	53
4.5. Conclusiones .....	58
CAPITULO 5.....	60
5. Resultados y Discusión para materiales del grupo 2 .....	60
5.1. Síntesis de Nanocompuestos .....	60
5.2. Espectroscopía de Infrarrojo.....	61
5.3. Análisis morfológico.....	63
5.4. Mediciones térmicas .....	65
5.5. Difracción de rayos X (XRD).....	66
5.6. Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	67

5.7. Mediciones de conductividad .....	69
5.8. Mediciones dieléctricas.....	73
5.9. Conclusiones.....	76
CAPITULO 6.....	77
6. Análisis Estructural del Quitosano puro .....	77
6.1. Análisis Termogravimétrico .....	77
6.2. Difracción de rayos X.....	78
6.3. Cálculos de estructura teóricos .....	79
6.4. Conclusiones.....	84
CAPITULO 7.....	85
7. Resultados y Discusión para materiales del grupo 3 .....	85
7.1. Síntesis de materiales.....	85
7.2. Espectroscopia de Infrarrojo .....	85
7.3. Análisis morfológico.....	87
7.4. Difracción de rayos X.....	88
7.5. Análisis Termogravimétrico .....	89
7.6. Mediciones de conductividad .....	90
7.7. Conclusiones.....	91
CAPITULO 8.....	93
Evaluación de la posible actividad estimuladora de los nanocompositos como cicatrizantes.....	93
8. Materiales del grupo 4 .....	93
8.1. Análisis morfológico.....	94
8.2. Evaluación "In vivo" de nanocompósitos de oro/quitosano.....	95
8.3. Evaluación "In vitro" de nanocompósitos de oro/quitosano .....	99
8.4. Citometría de Flujo .....	100
8.5. Conclusiones.....	103
9. Conclusiones finales y perspectivas.....	105
10. Publicaciones y presentaciones.....	106
Bibliografía .....	108

## Lista de Figuras

Figura 1. Estructura molecular de la quitina y el quitosano. ....	4
Figura 2. Estructura de una nanopartícula obtenida por el método de Turkevich. Tomado de P. Zhao et al. Coordination Chemistry Reviews (2013). ....	8
Figura 3. Diagrama Cole-Cole. ....	16
Figura 4. Diagrama de Cole-Cole, Cuando $\alpha = 0$ se recupera la ecuación original de Debye y por tanto las características ideales. ....	17
Figura 5. Diagrama de Cole-Cole, Cuando $\beta = 1$ se recupera la ecuación original de Debye y por tanto las características ideales ....	18
Figura 6. Macrófago atrapando bacterias por medio de flagelos. ....	27
Figura 7. Esquema de producción de citocinas. ....	30
Figura 8. Reacción de reducción del MTT a Formazán, la enzima succinato deshidrogenasa ....	31
Figura 9. Nanocompuestos sintetizados a base de quitosano y nanopartículas de oro obtenidos por el método de Turkevich. ....	34
Figura 10. Esquema representativo del método de síntesis empleado. ....	35
Figura 11. Proceso de la cirugía. La lesión próxima a la cabeza fue implantada con los materiales a evaluar, el otro segmento lesionado se usó como control negativo. Las áreas de las zonas lesionadas tanto muestra como control se midieron diariamente hasta completar los 15 días de recuperación. ....	40
Figura 12. Cámara de Neubauer. El volumen de la cámara es de $0.1 \text{ mm}^3 = 10^4 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ . ....	41
Figura 13. Espectro de infrarrojo de quitosano (CS) y compósitos $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$ , las relaciones usadas se indican en la gráfica ....	48
Figura 14. Ampliación espectro de infrarrojo. ....	49
Figura 15. Micrografías de SEM para relaciones de $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$ (a) 0.21 and (b) 1. ....	50
Figura 16. a) Histograma de tamaño de partícula. b) Relación entre tamaño de partícula y máximo de longitud de onda. ....	50
Figura 17. Porcentaje de humedad de los nanocompuestos sintetizados. ....	51
Figura 18. a) Diagrama de Cole-Cole, ajuste de la medición a frecuencia cero corriente directa. b) Dependencia de la conductividad CD en relación a los nanocompuestos con diferente relación de $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$ . ....	52
Figura 19. a) Módulo eléctrico, se observan los picos a diferentes temperaturas b) conductividad <i>versus</i> temperatura recíproca ....	53
Figura 20. Tiempo de relajación <i>versus</i> el recíproco de la temperatura ....	55
Figura 21. Temperatura de Vogel obtenida para los materiales sintetizados. ....	56
Figura 22. Estructura propuesta en base a las posibles interacciones entre la nanopartícula, el citrato de sodio, el quitosano y el ácido acético involucrados en la reacción. ....	57
Figura 23. Espectro de infrarrojo de quitosano (CS) y compósitos sintetizados variando las concentraciones de $\text{HAuCl}_4$ . ....	61

Figura 24. Ampliación del espectro de infrarrojo para los materiales del grupo 2..... 62

Figura 25. Micrografías de SEM obtenidas para materiales con concentraciones de a) 0.06 mM y b) 1 mM de H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> (después del punto de percolación ). c). Micrografía de TEM para la concentración 0.3 mM; las nanopartículas de oro se diferencian por los puntos blancos . d) histograma de distribución de tamaño de partícula obtenido del análisis de micrografías de TEM. .... 63

Figura 26. a)Espectroscopia de UV-Vis,b) fotografía de soluciones de nanopartículas de oro con concentraciones crecientes de precursor ..... 64

Figura 27. Análisis de porcentaje de humedad para materiales del grupo 2..... 65

Figura 28. Espectro de rayos X realizado a películas obtenidas con diferente concentración milimolar de H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> ..... 66

Figura 29. Patrón de difracción de rayos X obtenido para una película de 0.2 mM de ácido cloroáurico con incremento gradual de temperatura..... 67

Figura 30. *tan δ* versus temperatura, la medición se hizo en una película obtenida con 0.2 mM de H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> durante el primer barrido el material contenía 9.8 % de humedad (triángulos abiertos), el segundo barrido se realizó con un precalentamiento de la muestra con un porcentaje de humedad de 0.2% peso (círculos abiertos)la línea continua presenta los resultados del ajuste y la línea segmentada presenta los picos obtenidos del ajuste.. ..... 68

Figura 31.a) posición del primer pico obtenido en mediciones de DMA para nanocomposites a diferente concentración de ácido cloroáurico b) temperatura de Vogel calculada a partir de las mediciones de conductividad (círculos abiertos) mediciones dieléctricas (cuadrados negros)... 69

Figura 32. Conductividad en corriente directa *Versus* el inverso de la temperatura para una película de sintetizada con una concentración de 0.3mM de H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub>. Los círculos abiertos corresponden a la dependencia de la conductividad para la película sin precalentamiento (9.5% de humedad) y los triángulos abiertos delinear el comportamiento de la conductividad para la misma película pero con un precalentamiento (0.2.% de humedad). a) Modelo de Cole-Cole usado para obtener el valor de la resistencia en corriente directa R<sub>DC</sub> b) dependencia de  $\log \sigma (T)^{1/2}$  vs  $T^{-1/4}$ .b) evaluación de la percolación por medio del modelo de VRH. .... 70

Figura 33. Dependencia de la conductividad para muestras del grupo 2, los círculos abiertos muestran la conductividad obtenida para muestras secas y los círculos negros muestran el mismo parámetro para películas a temperatura ambiente..... 72

Figura 34. Dependencia del tiempo de relajación para un nanocompósito a 0.3 mM de ácido cloroáurico. Los círculos abiertos corresponden a muestras sin precalentamiento mientras que los triángulos abiertos presentan el comportamiento de las muestras con tratamiento. La grafica insertada presenta el cambio de amplitud y corrimiento de los picos a diferentes temperaturas. 73

Figura 35. Energía de activación calculada para materiales del grupo 2. Los círculos muestran los valores obtenidos por medio de la medición de conductividad y los triángulos muestran los resultados de las mediciones dieléctricas..... 74



Figura 36. Porcentaje de humedad de muestras de quitosano, cuadrados negros películas de quitosano sintetizadas por el método de evaporación de solvente, círculos grises polvo de quitosano, muestras sometidas en cámara húmeda a diferentes tiempos..... 78

Figura 37. Análisis de difracción de rayos X realizados a películas de quitosano y polvo de quitosano hidratados a diferentes tiempos ..... 79

Figura 38. Estructura tridimensional de una molécula de quitosano, delimitación de planos a, b y c..... 80

Figura 39. Difractogramas de rayos X calculados teóricamente para muestras con diferente humedad..... 81

Figura 40. Distribución de los planos de difracción de un molécula de quitosano. Plano (200) se encuentra ubicado entre dos cadenas principales, (010) en los extremos de la cadena y (020) es el plano que pasa en el extremo de una cadena polimérica de quitosano y el punto medio de otra. 82

Figura 41. Difracción de rayos X calculada para estructuras anhidras e hidratadas hasta en un 14% de humedad..... 83

Figura 42. a. Espectroscopia de Infrarrojo realizada a los compósitos del grupo 3. b. ampliación del área más significativa del espectro en el intervalo de 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . ..... 86

Figura 43. Micrografías de TEM, a. 0.3 mM b. 3 mM. c. Histograma de tamaño de partícula para cada tipo de muestra..... 87

Figura 44. Espectro de UV-Vis obtenido para los nanocompósitos sintetizados usando quitosano como agente reductor..... 88

Figura 45. Difractograma de rayos X obtenido de los materiales sintetizados a diferentes concentraciones de  $\text{HAuCl}_4$ . ..... 89

Figura 46. Porcentaje de humedad evaluado para los materiales sintetizados usando quitosano como agente reductor..... 90

Figura 47. Dependencia de la conductividad eléctrica obtenida de las películas sintetizadas a concentraciones de 0.15 a 5 mM..... 91

Figura 48. Micrografías de SEM obtenidas para soluciones con a) 0.3 mM, b) 0.6 mM and c) 1.07 mM de  $\text{HAuCl}_4$ . ..... 95

Figura 49. Tejido cicatrizado después de 40 días de cirugía. Controles: TheraForm y CS-g-GMA. A) Materiales sin colágeno, b) Materiales con colágeno..... 97

Figura 50. Porcentaje de recuperación evaluado a 40 días para nanocompósitos sintetizados con colágeno ..... 98

Figura 51. Ensayo de MTT y azul tripano realizado a tres líneas celulares: Células mononucleares ..... 99

Figura 52. Prueba de óxido nítrico, realizada a células HEPG2 y macrófagos a 24, 48 y 72 horas ..... 100

**Lista de tablas**

Tabla 1. Nanocompuestos sintetizados variando la concentración de citrato de sodio.....	47
Tabla 2. Grupos funcionales característicos .....	47
Tabla 3. Nanocompuestos sintetizados variando la concentración de ácido cloroáurico.....	60
Tabla 4. Nanocompuestos sintetizados variando la concentración de ácido cloroáurico, usando solamente quitosano al 2% p/p como agente reductor.....	85
Tabla 5. Materiales evaluados “ <i>in vivo</i> ” .....	94
Tabla 6. Diagrama de evaluación de recuperación. 1= recuperado, 4= recuperacion limitada por factores externos. De acuerdo al puntaje de evaluacion el progreso de sanacion de la herida puede ser clasificado en 4 tipos. ....	95
Tabla 7. Promedio de la evaluación de los materiales usados como implantes para la recuperación a los 7 días de cirugía. ....	96
Tabla 8. Evaluación de la producción de citocinas en suero de ratones BALB/C sometidos a un modelo de reparación de tejido .....	101
Tabla 9. Evaluación de la producción de citocinas de bazo de ratones BALB/C sometidos a un modelo de reparación de tejido .....	103

# CAPITULO 1

## 1. Introducción

Durante la última década, la aplicación de nanopartículas de oro (AuNp's) en sistemas biológicos ha atraído la atención de distintas áreas de la ciencia, desde la física hasta la medicina incluyendo disciplinas afines. Este fenómeno se debe a que, el tamaño cien veces menor a una célula humana conjugado con las propiedades ópticas, eléctricas y mecánicas de estas partículas permiten desarrollar dispositivos altamente sensitivos que son capaces de interactuar con DNA, enzimas y proteínas receptoras de membrana. Estas interacciones dan lugar a infinidad de aplicaciones tanto en la detección como en el tratamiento de enfermedades<sup>1,2</sup>.

A pesar de los atributos que representa la nanotecnología para el mundo moderno, en los últimos años la controversia sobre la toxicidad y acumulación en sistemas biológicos ha ido incrementando exponencialmente, ya que, no se han establecido protocolos específicos que evalúen con claridad estos parámetros. Algunos estudios sugieren que la toxicidad de las nanopartículas de oro depende directamente del tamaño de partícula, concentración y método de síntesis<sup>3</sup>.

En base a lo anterior, la probabilidad de que un nanocompósito produzca una reacción adversa es bastante factible, por esta razón, es necesario emprender la búsqueda de herramientas que permitan estudiar con mayor profundidad, las propiedades de estos materiales y sus posibles interacciones tanto físico-químicas como biológicas. Investigaciones realizadas por medio de espectroscopia de impedancia eléctrica sugieren que la dependencia de la conductividad en nanocompósitos de plata puede correlacionarse con la actividad antibacterial de los mismos<sup>4</sup>. Lo cual, abre la puerta a la posibilidad de utilizar un método estandarizado que permita determinar concentraciones óptimas de Np's para su aplicación en sistemas biológicos.

Las nanopartículas metálicas pueden obtenerse por vía física o química, la primera ruta consiste en someter soluciones de sales metálicas y agentes estabilizantes a radiación ultravioleta, calentamiento por microondas y ultrasonido de alta frecuencia. La síntesis química se basa en la

reducción de una sal metálica por medio de una reacción de óxido reducción en la que se emplean distintos agentes reductores y estabilizantes para controlar el tamaño y la forma de la partícula; El método de Turkevich permite obtener partículas homogéneas en tamaño y forma, es quizá el procedimiento más conocido y estudiado en cuanto a la ruta química debido a que es fácilmente escalable y económico<sup>5</sup>, a su vez, las Np's pueden embeberse en polímeros orgánicos e inorgánicos como el alcohol poli vinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP), polietilenglicol (OPE), quitosano (CS) y almidón, lo que da lugar a disminuir la posible toxicidad de la nanopartícula y permitir la interacción con diferentes tipos de fármacos<sup>6, 7,8,9</sup>.

El quitosano es un polímero natural derivado de la quitina, este polisacárido se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable y no tóxico<sup>10,11</sup>. Debido a que el CS posee en su estructura grupos amino e hidroxilo puede presentar interacciones electrostáticas con otras moléculas, por lo que ha sido ampliamente reportado como estabilizador y reductor en sistemas nanométricos obteniendo partículas cero valentes en la matriz del mismo<sup>12,13,14</sup>.

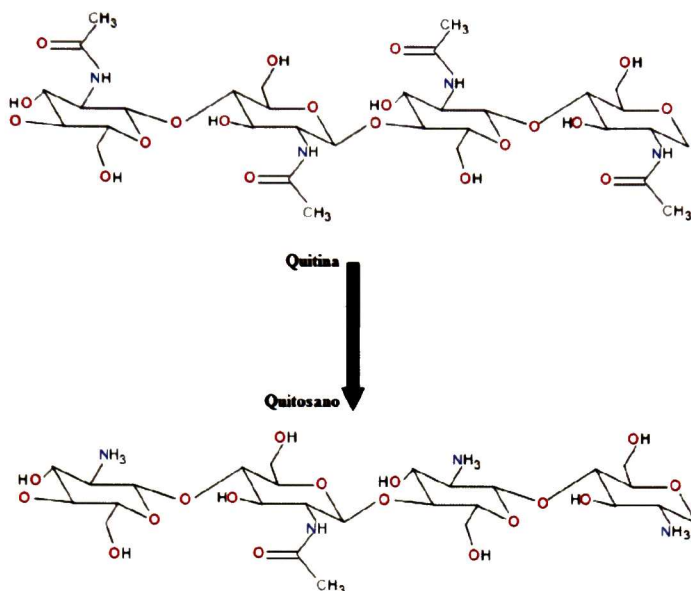
En este trabajo se estudiaron las propiedades físico-químicas de nanocompuestos sintetizados a base de quitosano y nanopartículas de oro, las cuales fueron obtenidas, usando el método de reducción química, empleando citrato de sodio y quitosano como agentes reductores. Se realizaron mediciones de espectroscopia de impedancia eléctrica para determinar si las propiedades eléctricas de los materiales dependen del método de síntesis. Adicionalmente, se evaluaron dichos materiales por medio de pruebas "*in vitro*" e "*in vivo*" para comprobar si existe una relación entre la dependencia de la conductividad y respuesta biológica (citotoxicidad y capacidad de cicatrización).

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Quitina y Quitosano

La quitina o poli ( $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina) es el segundo polímero de origen natural más abundante en la tierra, se encuentra principalmente en el exoesqueleto de insectos, conchas de crustáceos, camarones y en la pared celular de algunos hongos, levaduras y bacterias.<sup>15</sup> La quitina tiene una estructura fibrosa similar a la celulosa. Con base en la distribución de sus cadenas poliméricas a partir de la polaridad, este polisacárido se clasifica en dos tipos de conformaciones estructurales:  $\alpha$  y  $\beta$ . La forma  $\beta$  describe cadenas alineadas y paralelas, mientras que  $\alpha$  presenta cadenas antiparalelas, sin embargo, ambos tipos de quitina poseen laminas ordenadas en capas unidas firmemente por C-O-NH- enlace de hidrogeno manteniendo una distancia de 0.47 nm, lo que genera insolubilidad en la molécula, ya que la mayoría de grupos reactivos se encuentran ocupados<sup>16</sup>.

A nivel comercial la quitina es producida por procesos termo-químicos basados en la desmineralización y desproteización de desechos de industria camaronera<sup>17</sup>. Después de remover la proteína, calcio y componentes de bajo peso molecular, la quitina se obtiene por una hidrólisis básica y acida con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio respectivamente<sup>18</sup>. La forma desacetilada de la quitina es el quitosano (CS), se diferencia de la quitina por su capacidad de solubilizarse en medios ácidos diluidos<sup>19</sup>. Su estructura está constituida por unidades de N-acetil glucosamina ensambladas por enlaces  $\beta$  (1-4), como se observa en la figura 1 posee tres grupos funcionales un amino y dos grupos hidroxilo ubicados en los carbonos 2, 3, y 6 respectivamente.<sup>20</sup> Estos grupos reactivos le confieren al CS propiedades químicas relevantes que han permitido su aplicación en numerosas áreas<sup>21</sup>.



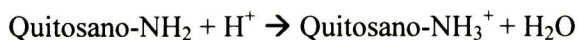
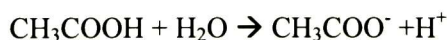
**Figura 1. Estructura molecular de la quitina y el quitosano.**

### 1.1.2. Propiedades básicas del quitosano

El grado de desacetilación (DA) representa el número de unidades de N-acetil-glucosamina desacetiladas o grupos amino libres, con respecto al total de unidades del polímero. Se le llama quitosano a la quitina con un grado de desacetilación del 60% o mayor. El DA es quizá la característica más importante del CS. Este parámetro estructural influencia directamente el peso molecular, humedad, solubilidad, y reactividad del quitosano, por lo que, sus propiedades físico químicas dependerán en gran proporción de este parámetro<sup>22</sup>.

- **Propiedades físico - químicas**

El quitosano es soluble en medios acuosos ácidos, en estas condiciones el grupo amino libre contenido en la unidad de glucosamina desacetilada, se protona generando alta densidad de cargas positivas,<sup>23</sup> como se observa en la siguiente ecuación:



Por medio de este mecanismo se obtiene soluciones ácidas del polímero, sin embargo, la solubilidad del CS depende de varios factores entre estos se encuentran el DA, la concentración iónica, el pH de la solución, la constante de disociación o pK, y la distribución de grupos acetilo a lo largo de la cadena principal<sup>24</sup>.

El CS es considerado un polieléctrolito o una polioxisal, ya que sus cargas positivas son capaces de reaccionar con infinidad de agentes orgánicos e inorgánicos. Dicha característica permite obtener una amplia gama de materiales a base de quitosano desde una película delgada hasta un hidrogel, pasando por fibras, esferas y nanoesferas<sup>25</sup>.

- **Propiedades eléctricas**

Los mecanismos de conducción del quitosano se encuentran estrechamente ligados a su propiedad como polielectrolito. En una disolución ácida los grupos polares ( $\text{NH}_2$  y  $\text{OH}$ ) del CS interactúan con iones hidronio ( $\text{H}^+$ ) libres producidos por la disociación del ácido, por lo que, la transferencia de carga dependerá de la constante de disociación del ácido y variará si el ácido es fuerte o débil<sup>26</sup>.

La conductividad del CS es de tipo iónico, típicamente se encuentra entre  $10^{-9}$  y  $10^{-11}$   $\text{S cm}^{-1}$ , sin embargo, en condiciones de humedad puede aumentar hasta  $10^{-4}$   $\text{S cm}^{-1}$ , debido a que el grupo amino tiende a protonarse dejando grupos  $\text{OH}$  libres que participan en la conductividad iónica<sup>27,28</sup>.

- **Propiedades Biológicas**

El CS es biocompatible, biodegradable, no tóxico y actúa como agente antibacterial para algunas especies<sup>29</sup>. Por sus propiedades químicas es capaz de generar enlaces con moléculas de origen biológico con carga negativa parcial o total, como por ejemplo, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos<sup>23,30</sup>. Estudios realizados por Muzzarelli demostraron que este polisacárido es quimio-atractivo, activador de macrófagos, promueve la cicatrización y la reepitelización, estimula la interacción integrina-célula, previene infecciones, puede modificarse por vía

enzimática y química, es muco-adhesivo, puede controlar la liberación de citoquinas, componentes de matriz extracelular y antibióticos<sup>31</sup>.

### **1.1.3. Nanopartículas de Oro: desde sus inicios al día de hoy**

Aunque parezca sorprendente, el uso del oro en el mundo antiguo no siempre se limitó a definir escalas sociales y políticas. Registros médicos provenientes del siglo XVI revelan que este metal fue usado como un tratamiento empírico para combatir la epilepsia, el cual sería retomado, en el siglo XIX para combatir los efectos de la terrible enfermedad del momento conocida como la sífilis, este tratamiento, consistía en aplicar una solución de oro en el área afectada para disminuir las lesiones presentes en el paciente, lo que posteriormente sería explicado y comprobado por Robert Koch, quien expuso el efecto bacteriostático que producía el cianuro de oro en el bacilo de la tuberculosis<sup>32</sup>.

En el mes de Abril de 1856, Michael Faraday obtuvo la primera solución de oro coloidal conocida a cual llamo “oro en estado dividido”, dicha solución, fue una mezcla acuosa en la que el metal se encontraba fraccionado a un grado tal, que el ojo humano no podía diferenciar las partículas que se encontraban en ella. En 1951 Turkevich publica el estudio de la nucleación y crecimiento de partículas de oro usando citrato de sodio como agente reductor del ácido cloroáurico, método que fue mejorado por Frens en 1973. A partir de este momento, la reducción química de las sales metálicas de oro fue tema de estudio para muchos científicos, el entendimiento de los sistemas que permitieran obtener partículas controlando el tamaño y la forma de las mismas generó gran interés en el mundo químico y físico<sup>33</sup>.

### **1.1.4. Síntesis de AuNp's**

Existen varios métodos para sintetizar nanopartículas pero de manera general se pueden dividir en dos tipos, el primer tipo se conoce como “top down” o de arriba abajo, que consiste en romper sistemáticamente un trozo de oro hasta obtener un tamaño específico, generalmente se emplean métodos físicos, el mayor problema de este método es la dificultad y el costo que se representa el



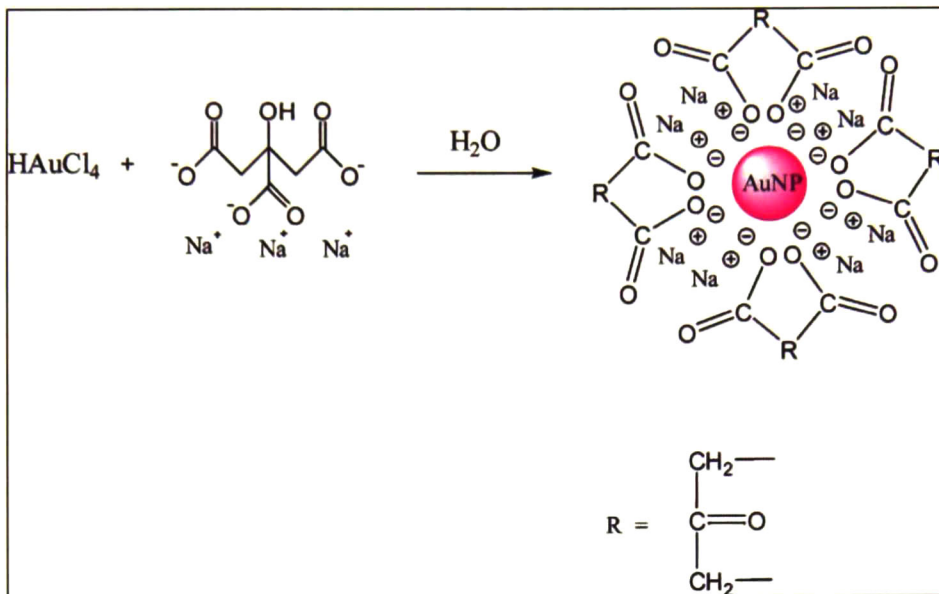
control del tamaño y la forma de la partícula, otra limitante de este procedimiento es la baja probabilidad de funcionalización del producto obtenido con otras sustancias.

El segundo tipo de síntesis “bottom up” o de abajo hacia arriba, como su nombre lo indica se fundamenta en originar Np’s a partir de moléculas individuales, por medio de síntesis química, se realiza una reacción de óxido-reducción de una sal metálica. El proceso inicia a partir de un átomo del elemento, el cual sufre una etapa recubrimiento o nucleación y posteriormente otra de crecimiento, lo que da lugar a la síntesis “*in situ*”. Específicamente, para las AuNp’s se ha propuesto que la relación de formación de las mismas está dada por  $10n^2 + 2$ , donde  $n$  corresponde al número de capas que rodearían al átomo principal, por lo que la partícula más pequeña se encontraría conformada de 13 átomos<sup>34</sup>.

#### 1.1.5. Método de Turkevich

El método de Turkevich se encuentra clasificado en el tipo de síntesis “bottom up”, ya que su principio básico consta en reducir una solución de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) usando citrato de Sodio (CS) como agente reductor y estabilizante, en una temperatura cercana a la ebullición del agua. En principio, la reacción da lugar a la formación de centros de nucleación, a los que se unirán átomos de oro formando así la nanopartícula.

Esta técnica se ha catalogado como la más famosa entre muchas, pero éxito de la misma, radica en la posibilidad de controlar tamaño de la partícula variando la relación entre citrato de sodio/ ácido cloroáurico, obteniendo partículas monodispersas estables en un intervalo de 10 a 60 nm como se observa en la figura 2. La adición de citrato de sodio modifica el pH de la reacción, influenciando directamente la distribución del tamaño de partícula, debido que al incrementar la concentración de CS se obtienen más sitios de nucleación y por lo tanto partículas con menor tamaño<sup>35</sup>.



**Figura 2.** Estructura de una nanopartícula obtenida por el método de Turkevich. Tomado de P. Zhao et al. *Coordination Chemistry Reviews* (2013).

### 1.1.6. El papel del agente reductor

Como se expuso previamente, la obtención de nanopartículas por medio de síntesis química se fundamenta en la reducción de una sal metálica usando un agente reductor y aunque el CS ha demostrado ser bastante efectivo, algunas aplicaciones exigen condiciones tanto físicas como químicas especiales, por este motivo, han propuesto múltiples variaciones al método de Turkevich que se basan en emplear otros agentes reductores con fines diversos entre los que se encuentran:

- Disminuir el tamaño de partícula
- Generar alternativas más económicas
- Escalar el procedimiento
- Aumentar la funcionalización
- Disminuir la toxicidad
- Incrementar propiedades específicas

Un ejemplo claro es el método propuesto por Brust-Schiffrin que consiste en usar bromuro de tetra-octilamonio (TOAB) en una solución de tolueno y borohidruro de sodio como agente reductor, para obtener nanopartículas en soluciones no polares, el producto de este método puede funcionalizarse con medicamentos oleosos, aceites, y polímeros hidrofóbicos. Adicionalmente se ha explorado la posibilidad de emplear aminoácidos, ácido ascórbico y polisacáridos, con el fin obtener métodos amigables con el medio ambiente, disminuir la toxicidad (5kimling).

### **1.1.7. El quitosano como agente de reductor**

El CS se caracteriza por ser un polication que en presencia de sales metálicas puede actuar como agente reductor y estabilizante. Estudios realizados por Huang & Yang en 2004 demostraron que, este polisacárido es efectivo en la síntesis de nanopartículas de oro y plata, ya que variando tanto el peso molecular como la concentración del mismo se pueden obtener sitios de nucleación, y estabilizar la solución coloidal simultáneamente. Aunque existían estudios previos sobre el uso de algunos azúcares como agentes estabilizadores de Np's, el uso del quitosano como reductor en estos sistemas representa grandes ventajas<sup>36</sup>.

En primer lugar, los boratos, citratos y demás surfactantes utilizados en la síntesis, pueden incrementar la probabilidad de obtener respuestas adversas en sistemas biológicos. Aunque se conoce que el tamaño de partícula puede inducir daño celular, también es un hecho que la carga superficial de una nanopartícula está dominada por medio en el que se encuentra, al ser biocompatible, biodegradable y no tóxico, se obtienen partículas recubiertas fáciles de funcionalizar con infinidad de moléculas y baja probabilidad de reacciones desfavorables. En segundo lugar la fuente de este recurso es un desecho de la industria camaronera por lo que es bastante económico en relación a otros agentes reductores usados convencionalmente lo que da lugar a desarrollar partículas usando un solo componente que además de reducir estabiliza la partícula por medio de un proceso amigable con el medio ambiente<sup>37, 38</sup>.

### 1.1.8. La estabilidad de la partícula

Al obtener partículas tan pequeñas algunos electrones presentes en el átomo pasan a la superficie del medio generando una carga superficial levemente positiva o potencial de Nernst, este efecto provoca la adsorción de aniones presentes en el medio inmediato que rodea la nanopartícula confiriéndole una carga levemente negativa casi cercana a cero, lo que se conoce como el potencial zeta negativo. Lo que implica que una nanopartícula de oro requiere cargas muy pequeñas tipo Van der Waals, para generar repulsiones electrostáticas entre partículas y fuerzas de atracción leves entre las mismas para lograr a un sistema estable que dependerá de la absorción de los iones presentes en el medio y serán suministrados por el agente estabilizante empleado en la síntesis<sup>39</sup>.

La teoría de DLVO propuesta por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek, explica la interacción entre las partículas de un coloide justificando la estabilidad por medio fuerzas de atracción tipo Van Der Waals y fuerzas electrostáticas repulsivas de Coulomb. Dicha teoría expone que cuando la distancia entre dos partículas disminuye, la fuerza de interacción que se produce, puede calcularse como una combinación de fuerzas (atracción Van der Waals, repulsión electrostáticas de Coulomb). Así pues, cuando disminuye la distancia entre dos partículas tanto las fuerzas atractivas como las de repulsión electrostática aumentan, teniendo en cuenta que la nanopartícula se encuentra en un medio líquido y está compuesta de  $n$  cantidad de átomos, estas fuerzas se anularan en su mayoría, sin embargo, la polarización en la partícula dependerá del medio en el que se encuentre, si dicho medio genera una carga superficial dominante en la partícula, incrementando la barrera energética, entonces se obtendrá un estabilidad coloidal debido a que las fuerzas repulsivas impedirán la agregación de las partículas.

### 1.1.9. Propiedades ópticas de las nanopartículas

Cuando una partícula interacciona con un haz luz incidente, el campo electromagnético induce una polarización de los electrones de conducción o libres en la superficie de la partícula (banda de conducción), de esta manera la diferencia de carga que se genera produce una oscilación dipolar de los electrones a una frecuencia determinada, lo que se conoce como el plasmón de

resonancia superficial. La energía que se produce por esta oscilación depende de la densidad de electrones libres y del medio dieléctrico que rodea la partícula, y se encuentra en el rango de luz visible para los metales.

Las nanopartículas de oro con un intervalo de tamaño de entre 10 a 60 nm presentan un color rojo brillante característico y su máximo de absorbancia se observa entre los 520 y 540 nm. La teoría de Mie para la absorción y dispersión de la luz por esferas explica la relación existente entre la coloración y el tamaño de partícula, por medio de la relación entre la ley de Lambert-Beer y el número de partículas por unidad de volumen<sup>40</sup>.

### 1.1.10. Espectroscopia dieléctrica

Para comprender el concepto de espectroscopia dieléctrica o espectroscopia de impedancia es necesario conocer algunos conceptos básicos. La impedancia es la suma de dos componentes: la resistencia (R), la cual se mide en ohmios en honor a Georg Simon Ohm y la reactancia (X). Matemáticamente la impedancia puede representarse como lo muestra la ecuación donde la parte real está dada por R y la imaginaria por X.

$$Z = R + jX$$

Es un hecho que todos los materiales se componen de moléculas que están compuestas de electrones, lo que implica que todos los materiales conducen electricidad en mayor o menor medida. Los materiales conductores, generalmente metálicos poseen una alta densidad de electrones libres, por lo que, la resistividad al paso de la corriente será baja, y dichos electrones podrán moverse fácilmente generando un flujo constante. A diferencia de un material dieléctrico o aislante que presenta una R alta por lo que tiene baja concentración de electrones, sin embargo cuando un dieléctrico es sometido a un campo eléctrico los electrones y a su vez los iones presentes el material serán los responsables de la aparición de la corriente y la polarización.

La espectroscopia de impedancia eléctrica puede ser una herramienta poderosa, debido a que puede medir la tendencia que presenta un material a polarizarse cuando es sometido a un campo eléctrico en función de la temperatura y la frecuencia desde frecuencias bajas o lentas de  $\mu\text{Hz}$  pasando por medias y llegar hasta altas o rápidas  $\text{THz}$ . Esta técnica es sensible a especies

dipolares y cargas localizadas en un material, puede determinar sus fuerzas, su cinética e incluso su estructura.

### 1.1.11. Polarización dieléctrica

Tradicionalmente se distinguen tres mecanismos básicos que pueden contribuir a la polarización: polarización electrónica, iónica y dipolar

- **Polarización electrónica**

Un material compuesto por átomos posee una nube electrónica de carga negativa unida a una carga puntual positiva en el centro, en presencia de un campo eléctrico esta nube se distorsiona dando lugar una redistribución de cargas o formación de un dipolo, el cual a su vez genera un momento dipolar que puede ser o no permanente. La polarización electrónica se establece de inmediato ( $\tau = 10^{-15}$  seg) el fenómeno específico descrito es el desplazamiento de una nube de electrones con respecto al núcleo formando un dipolo.

- **Polarización iónica**

En un material aislante ideal, el valor de la conductividad es cero, lo que significaría que no existen moléculas cargadas eléctricamente en su estructura. Sin embargo, estos materiales poseen diferentes fases y por lo tanto existirán iones y electrones en la interface de los mismos. En este caso al someter el material a un campo eléctrico las moléculas se desplazaran hasta encontrar posiciones de equilibrio para que la fuerza del campo y la fuerza de oposición elástica sean iguales entre ellas y se anulen. Esta polarización así como la electrónica se da instantáneamente ( $\tau = 10^{-13}$  seg), se describe por el desplazamiento de un ion con respecto a otros.

- **Polarización dipolar**

La polarización dipolar o de orientación consiste en el cambio de orientación de los dipolos permanentes de las moléculas al aplicar un campo eléctrico. Todos los átomos y moléculas pueden presentar un momento dipolar, cuando un material es sometido a un campo eléctrico se produce un momento dipolar inducido. Sin embargo, en materiales dieléctricos, amorfos y líquidos polares se presenta un momento dipolar permanente, en el cual, los dipolos se orientan en la dirección del campo eléctrico inducido. Al retirar el campo eléctrico los dipolos en materiales polares no regresan a su posición inicial instantáneamente, por lo que los momentos dipolares se mantienen en un estado de inercia y el reordenamiento de los mismos es muy lento, al tiempo que requiere la molécula para regresar a su origen se le llama conoce como tiempo de relajación.

### **1.1.12. Relajaciones dieléctricas**

Específicamente la relajación dieléctrica define el tiempo que requiere un dipolo llegar a una polarización cuando son sometidos a un campo eléctrico externo. La relajación se escribe en términos de permitividad compleja como una función de la frecuencia por las ecuaciones de Debye, Cole-Cole, Havryliak-Negami, etc.

El tiempo característico constante de un proceso de relajación define el intervalo que requiere el átomo para encontrar el equilibrio después de una excitación a este tiempo se le llama tiempo de relajación  $\tau$ , que es dependiente de la temperatura ya que está directamente relacionado con la viscosidad del material. En sólidos amorfos como los polímeros estos parámetros pueden variar desde segundos a horas e incluso hasta años, dependiendo de la temperatura.

Los mecanismos de polarización que influyen los polímeros estudiados por espectroscopia de impedancia eléctrica se pueden definir en dos tipos, el primero de estos es la polarización debida a la migración de iones, este fenómeno produce un aumento en la conductividad del material y comprende migraciones de carga tanto intrínsecas (transferencia de protones por acción de los enlaces de hidrógeno), como extrínsecas (iones e impurezas).

El segundo tipo es la polarización dada por la orientación de dipolos permanentes, como se explicó anteriormente, el dipolo permanente se da cuando la polarización del material se orienta en dirección al campo eléctrico aplicado, producido por movimientos cooperativos en los segmentos moleculares del material, y pueden medirse por medio de impedancia eléctrica, siempre y cuando se encuentren en un medio viscoso.

Un polímero en condiciones no ideales es un material heterogéneo, el quitosano por ejemplo posee en su estructura una fase amorfa y otra cristalina las cuales se separan por interfaces o barreras internas del material y los contactos. Los portadores de carga pueden moverse por fuerzas eléctricas entre las fases del material, dando lugar a fenómenos interfaciales, como resultado de las diferencias de conductividad y permitividad de cada fase. El fenómeno de relajación interfacial se explica por una carga de polarización o lo que se conoce como polarización de Maxwell- Wagner.

- **El módulo eléctrico**

La expresión del módulo eléctrico es empleada comúnmente para interpretar los datos experimentales, obteniendo información de los procesos de relajación en materiales que presentan conductividad iónica. En esta representación, la polarización interfacial y las contribuciones de los electrodos se desprecian, la parte imaginaria del módulo depende de la temperatura y puede relacionarse con movimientos iónicos del material por medio del tiempo donde  $f_p$  es la frecuencia máxima del pico<sup>41</sup>.

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_p}$$

La permitividad compleja ( $\epsilon^*$ ) y el factor de pérdida ( $\epsilon''$ ) son propiedades de gran interés debido a que estos parámetros permiten conocer la posibilidad que tiene un material para una aplicación. En materiales con inclusiones conductoras, la corriente iónica y los efectos interfaciales podrían enmascarar los procesos de relajación dieléctrica en intervalos de baja frecuencia, por esta razón, para analizar el proceso dieléctrico, la permitividad compleja  $\epsilon^*$  puede determinarse en términos del módulo eléctrico  $M$  por la siguiente ecuación:



$$M^* = \frac{1}{\varepsilon^*} = M' + iM'' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2} + i \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2}$$

Donde  $M'$  es la parte real y  $M''$  la imaginaria del módulo eléctrico,  $\varepsilon'$  es la parte real y  $\varepsilon''$  la imaginaria de la permitividad.

### 1.1.13. Teoría de Debye

La teoría de Debye asume de forma ideal, que las moléculas presentes en un medio poseen una forma esférica y al aplicar un campo eléctrico externo, estas no se verán afectadas por el mismo, debido a que el eje de rotación de la molécula no será influenciado por el campo y por lo tanto el valor de  $\varepsilon^*$  no se modificara. En un caso real las moléculas presentes en un medio pueden tener infinidad de formas, en polímeros las moléculas están ordenadas en cadenas lineales y muchos de estos presentan ramificaciones. En fase sólida los dipolos tienen mayor probabilidad de interactuar y su respuesta no depende de un campo eléctrico alternante. El tiempo de relajación de estos materiales es de diferentes valores ya que depende de los ejes de rotación de las moléculas presentes, dando lugar a que la dispersión se encuentre en un intervalo de frecuencias amplio.

Un dieléctrico polar poseerá a varias frecuencias, se puede describir por:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau}$$

Donde  $\varepsilon_s$  y  $\varepsilon_\infty$  son constantes dieléctricas en el límite de frecuencia cero a una frecuencia infinita respectivamente,  $\omega$  es la frecuencia que está dada por  $\omega = 2\pi f$  y  $\tau$  es el tiempo de relajación. La ecuación de Debye describe al espectro dieléctrico como una relajación simple de Debye. La parte real de la permitividad relativa  $\varepsilon'$  es usualmente se le llama constante dieléctrica  $\varepsilon''$  es la pérdida dieléctrica que está relacionada con la energía disipada en el material debido a fricciones internas del mismo.

Al representar la permitividad en un plano complejo donde  $\varepsilon''$  corresponde al eje de las Y y  $\varepsilon'$  al de las abscisas obtenemos un diagrama de Cole-Cole como se muestra en la figura 3. Cole-Cole

mostro que para un material con relajación tipo Debye, al graficar  $\varepsilon''$  versus  $\varepsilon'$ , cada punto corresponde a una frecuencia, particularmente se genera un círculo que al intersectar el eje horizontal ( $\varepsilon'$ ) a  $\varepsilon_s$  y  $\varepsilon_\infty$  se obtiene un semicírculo.

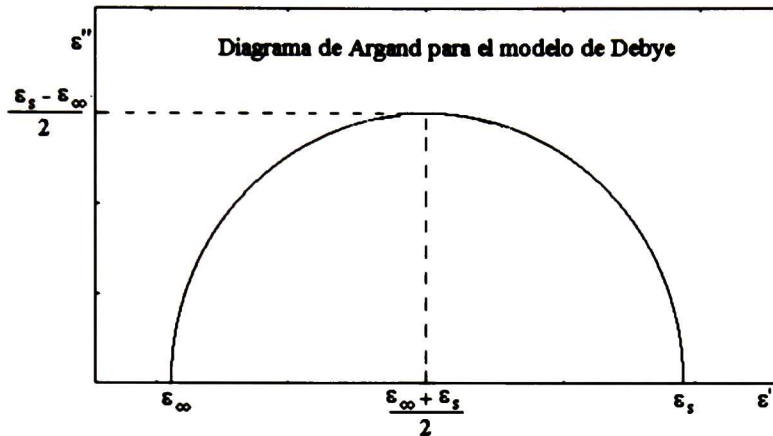


Figura 3. Diagrama Cole-Cole.

- **Correcciones al modelo de Debye**

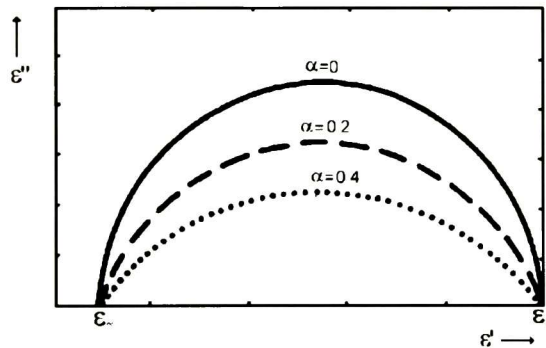
Muy pocos materiales cumplen con las condiciones ideales de la ecuación de Debye, entre estos los dieléctricos polares, ya que las moléculas presentes en estos carecen de simetría esférica. Al aplicar un campo en estos materiales, existirá una variabilidad en la frecuencia de relajación que como se explicó previamente es dependiente del eje de rotación. Bajo estas condiciones al graficar  $\varepsilon''$  vs  $\varepsilon'$  se observará una distorsión en el semicírculo graficado. En base a esto se han propuesto modelos alternativos Cole- Cole y Cole- Davison, los cuales están basados en ecuaciones empíricas que describen variantes más cercanas a los materiales no ideales.

- **Modelo de Cole-Cole**

Las condiciones que propone este modelo son adecuadas para polímeros o materiales orgánicos de cadena larga ya que la relajación es más lenta, el pico de pérdidas tiene un ancho mayor y una altura menor. La ecuación propuesta para este modelo es la siguiente:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau_{c-c})^{1-\alpha}}; 0 \leq \alpha \leq 1;$$

Donde la expresión  $\tau_{c-c}$  es tiempo de relajación y  $\alpha$  es una constante dada por el material que induce un ensanchamiento simétrico, cuyos valores  $0 \leq \alpha \leq 1$ , son directamente al número de grados de libertad internos de la molécula. Cuando  $\alpha = 0$  se obtiene nuevamente la ecuación de Debye. En la figura 4 se compara la función de distribución para la aproximación de Debye y para la corrección hecha por Cole-Cole, cuando se varía  $\alpha$ . para las frecuencias de relajación Cole-Cole se observa que  $\varepsilon''$  disminuye más lentamente en comparación con la relajación de Debye. Cuando hay un incremento de  $\alpha$ , el factor de pérdida  $\varepsilon''$  es más ancho para la relajación del modelo Cole-Cole y el valor de pico  $\varepsilon_{\max}$  es menor.



**Figura 4.** Diagrama de Cole-Cole, Cuando  $\alpha = 0$  se recupera la ecuación original de Debye y por tanto las características ideales.

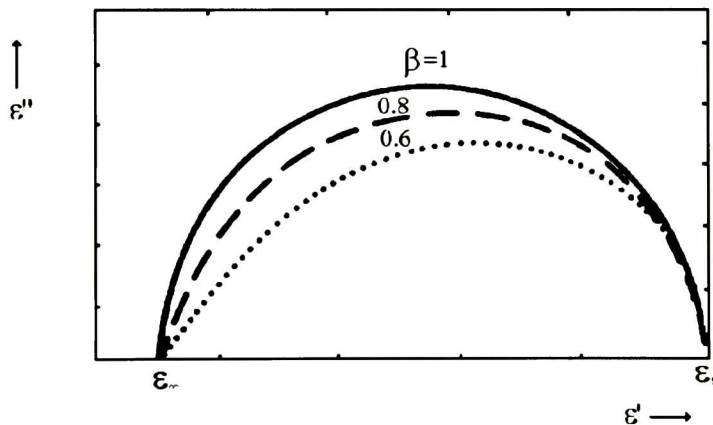
- **Modelo Cole- Davidson**

Este modelo representa fenómenos de relajación también para materiales orgánicos pero con la variación de que presenten estructuras asimétricas y por lo tanto relajaciones asimétricas en base a su eje de rotación. La fórmula empírica propuesta es:

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{(1 + j\omega\tau_{d-c})^\beta}$$

Donde  $0 \leq \beta \leq 1$  es una constante característica del material que describe la asimetría del mismo, a baja frecuencia la parte de  $\epsilon'$  se mantiene sin cambios hasta que  $\beta$  incrementa de 0 a 1, sin embargo, a frecuencias altas la parte de  $\epsilon'$  inferior a  $\beta$  incrementa. Cuando  $\beta = 1$  (Debye) se obtienen valores aún más bajos ya que la temperatura disminuye pues la asimetría de su relajación aumenta y por lo tanto el valor de  $\beta$  disminuye.

Para la parte de  $\epsilon''$ , a bajas frecuencias incrementa  $\beta$  y para altas frecuencias  $\beta$  decrece. El punto principal a notar es que la curva de  $\epsilon''$  versus  $\epsilon'$  pierde la simetría



**Figura 5. Diagrama de Cole-Cole, Cuando  $\beta = 1$  se recupera la ecuación original de Debye y por tanto las características ideales**

### 1.1.14. Relaxaciones dieléctricas en polímeros

Un material polimérico se caracteriza por ser una macromolécula compuesta por unidades repetitivas que forman cadenas lineales unidas entre sí, adicionalmente presentan grupos químicos ramificados a la cadena principal generando estructuras complejas. Los procesos de relajación que se presentan en polímeros sólidos, involucran cambios de orientación molecular en el material, descenderando variaciones en las propiedades mecánicas y eléctricas de los mismos. Sin embargo debido a la complejidad de estos materiales, el estudio de los múltiples procesos de relajación requiere herramientas especiales.

La espectroscopia de impedancia eléctrica permite detectar diferentes procesos de relajación determinando variaciones de conductividad en función de la temperatura. Retomando el principio de polarización, al someter el material bajo la acción de un campo eléctrico, la orientación de los grupos polares cambia en dirección al campo empleado, al incrementar o disminuir la temperatura, se genera un cambio en la movilidad molecular. Tanto en polímeros sintéticos como biológicos se puede observar una relajación primaria o relajación  $\alpha$  y una serie de relajaciones secundarias ( $\beta$ ,  $\beta_{wet}$  y  $\gamma$ ), las cuales se han atribuido a movimientos locales específicos en la molécula poliméricas, sin embargo, en caso de los polisacárido dichas relajaciones pueden presentar variaciones debido a la capacidad higroscópica que poseen.

- **Relajación  $\alpha$**

La relajación  $\alpha$  a nivel molecular se relaciona con el movimiento cooperativo de segmentos de cadena principal, por esta razón se asocia con la transición vítrea ( $T_g$ ), aunque la ciencia de polímeros aún no ha podido establecer con claridad una relación específica que explique la dependencia de estos parámetros, en la práctica, es bastante común relacionar la  $T_g$  de polímeros sólidos con el movimiento cooperativo de las moléculas, lo que macroscópicamente se observa como el cambio de la viscosidad en un polímero, representa un aumento en el tiempo de relajación ya que la distribución molecular del material cambia por efecto de la temperatura, este fenómeno, es de tipo no lineal, y puede describirse por medio de la ecuación de Vogel Fulcher Tamman Hess (VFTH)

$$f(T) = \frac{1}{2\pi\tau(T)} = f_{\infty} \exp\left(-\frac{A}{T - T_0}\right)$$

Donde  $\log f_{\alpha,\infty} = 10^{10}-10^{13}\text{Hz}$  y  $A$  son constantes,  $T_0$  es la temperatura de Vogel, que generalmente es de 50-70°K menor que la temperatura de transición vítrea  $T_g$ .

En 1994 Edwards y Evans propusieron que la relación entre la relajación  $\alpha$  y la temperatura de transición vítrea podían explicarse basándose en el modelo del tubo reptante, el cual contempla que un polímero puede representarse como un conjunto de puntos a lo largo de un plano unidos entre sí (cadena principal o primitiva), donde cada esfera se encuentra rodeada máximo de 12 estructuras vecinas similares ( $N_n < 12$ ), confinando la estructura a un tubo flexible que presenta movimientos brownianos a lo largo de la cadena.

De la misma manera observaron que el modelo del tubo reptante podía compararse fácilmente con un fluido en movimiento, por esta razón, se relacionó el fenómeno de difusión constante con un sistema de tubos o varillas orientados al azar y por medio de aproximaciones matemáticas se comprobó que la Temperatura de Vogel puede encontrarse en una región cercana a la  $T_g$ , debido a que el fenómeno físico se genera por una naturaleza molecular similar, y probablemente en condiciones ideales estas dos temperaturas serían equiparables, sin embargo, se debe tener en cuenta que para casos no ideales, el peso molecular del polímero afecta el valor de la  $T_g$  ya que las estructuras no serán del todo lineales y los extremos de cadena serán propensos a enlazarse o liberarse de otras cadenas, dominando entonces los movimientos de cadena principal y por tanto, la viscosidad, el tiempo de relajación y la temperatura de transición vítrea<sup>42</sup>.

- **Relajación  $\beta$**

La relajación  $\beta$  es el fenómeno más observado en polisacáridos puros a bajas temperaturas en el intervalo de (-135 a 20°C), se ha relacionado con movimiento de segmentos cadena mediado por enlaces glucosídicos típicos de glucopiranosas, así mismo a esta relajación se le atribuye la dinámica local de la cadena polimérica.

- **Relajación  $\gamma$**

Se relaciona con el movimiento de radicales de cadena, particularmente grupos OH, -O-CH<sub>2</sub>-OH, -NH<sub>2</sub>. Este proceso es muy rápido y solo se observa en polímeros que tienen un volumen alto de ramificaciones susceptibles a presentar momento dipolar. Detectar esta relajación puede ser un proceso complejo debido a que se requiere trabajar en frecuencias mayores de 1MHz para las unidades repetitivas alcances una orientación completa.

- **Relajación  $\beta_{wet}$**

Esta relajación se asocia con el grado de humedad presente en un polisacárido, a temperaturas menores de 100° C, aunque no está claramente descrito el fenómeno físico que produce se relaciona con el movimiento de segmentos de cadenas principales unidas a moléculas de agua.

- **Relajación  $\sigma$**

Esta relajación se presenta a temperaturas mayores a 60°C y es parte del grupo de las relajaciones secundarias en polímeros, se relaciona principalmente con el proceso de migración de protones que ocurre después de la relajación  $\alpha$ . En perspectiva, al incrementar la temperatura el primer proceso que ocurrirá será el movimiento de las cadenas principales que componen la matriz polimérica, a continuación, se presentará un reacomodo de la estructura y finalmente existirá migración de protones a través de la misma. La relajación  $\sigma$  se reconoce como una dependencia de lineal de la conductividad, por medio de una regresión lineal tipo Arrhenius se obtiene el valor de la pendiente con el fin de calcular la energía de activación que requiere el sistema por medio de la siguiente ecuación:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{RT}\right)$$

Donde  $\tau_0$  es el tiempo de relajación R es una constante y T es la temperatura. Einfeldt y colaboradores afirman que este proceso de relajación se relaciona con el potencial de barrera que se presenta en materiales con fases diferentes en las cuales se genera migración de iones<sup>43</sup>.

### 1.1.15. Influencia del agua en los procesos de relajación en polisacáridos

Aunque el origen de las relajaciones térmicas se atribuye directamente al movimiento de cadenas, radicales, y migración de iones, en el caso de los polisacáridos, las interacciones de estos materiales con moléculas de agua distorsionan los procesos de relajación alterando las propiedades físicas, micro mecánicas y el comportamiento dieléctrico de los polímeros biológicos. Estudios realizados en celulosa y quitosano demostraron que los grupos hidroxilo y amino promueven la absorción de moléculas de agua causando hidratación del material, dando lugar a interacciones de diferente tipo entre la matriz polimérica y la molécula de agua, haciendo complejo el análisis de estos materiales. Sin embargo para el entendimiento de estos fenómenos se han utilizado técnicas complementarias, como la difracción de rayos X y análisis termogravimétricos, para conocer la distribución y porcentaje de absorción de agua en el material.

Particularmente en quitosano se ha determinado que las moléculas de agua pueden encontrarse en tres estados diferentes:

- Agua Ligada (no congelable): En este estado las moléculas de agua se unen fuertemente a los grupos hidrófilos, se le denomina agua no congelable, debido que solo llega a congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ , además, no muestra transición térmica por DSC.
- Agua ligada (congelable): es agua que está unida débilmente a la cadena polimérica o a moléculas de agua no congelable. Este tipo de agua se funde por calentamiento a temperaturas mayores a  $0^{\circ}\text{C}$ .
- Agua libre (capilar): Este tipo de agua se volatiliza fácilmente durante el calentamiento y hasta una temperatura de  $100$  a  $110^{\circ}\text{C}$ , es la porción de agua que se congela con mayor rapidez, debido a que las moléculas de agua se encuentran débilmente ligadas, este estado es el principal responsable de la actividad de acuosa en un polímero.



Generalmente, los polímeros que contienen grupos amida como el quitosano presentan una relajación dieléctrica y mecánica a temperaturas bajas cercanas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y 1 MHz, esta relajación es comúnmente llamada relajación  $\beta_{wet}$ , ya que es altamente sensible al contenido de humedad. Einfieldt y colaboradores han relacionado los movimientos de cadena por medio de enlaces glucosídicos entre cadenas vecinas correspondientes a dinámicas de cadenas locales con la relajación  $\beta$ , dichas moviidades aparecen cerca de  $10^6$  Hz, por otra parte, Nishinari y Montes en estudios independientes atribuyen el origen de la relajación  $\beta$  a la rotación de grupos metilo en unidades de glucosa, aunque existen múltiples publicaciones que atribuyen ciertos tipos de relajación a movimientos típicos de una parte de la cadena o ramificación de la misma, lo cierto es que, en polisacáridos las relajaciones secundarias ( $\beta$ ,  $\beta_{wet}$ ,  $\sigma$ ) y por consiguiente las propiedades dieléctricas y mecánicas se encuentran estrechamente ligadas a su grado de hidratación.

En el caso particular que compete a esta tesis, se expone el contexto del quitosano como un polisacárido semicristalino que puede presentar dos fases: una región hidratada o tendón asociada con la fase amorfa y una región anhidra o templada, relacionada con la fase cristalina, que dan lugar a tres tipos de sales acidas de CS:

- Tipo I: es una estructura anhidra por completo que se presenta en una doble hélice plegada y rígida
- Tipo II: comprende una doble hélice relajada e hidratada
- Tipo III: es un complejo, hidratado de cuatro hélices y otro anhidro de 5 hélices

En condiciones ambientales este polisacárido tiene la capacidad de captar moléculas de agua presentes en su entorno (higroscópico), generando una compresión y descompresión de la estructura que modifica drásticamente su porcentaje de cristalinidad, debido a que, la interacción entre el quitosano y el agua se forma por medio de enlaces de hidrogeno a partir de grupos radicales ( $-\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ), los cuales pueden estar presentes entre cadena y cadena o en los extremos de las mismas, lo que genera una variación dependiente de la humedad en las fases amorfa y cristalina del polímero.

Estudios realizados por Kobasi y colaboradores mostraron que el grado de cristalinidad del quitosano disminuye a medida que aumenta el entrecruzamiento y el porcentaje de humedad, ubicando los planos hkl respectivos del quitosano anhidro  $\{(110),(020),(012),(120),(121)\}$  y quitosano hidratado  $\{(012),(120),(200),(210)\}$ , se demostró que la celda unitaria (4 unidades para la estructura anhidra, 8 unidades para la hidratada) sufre una expansión incrementando la distancia interplanar en función de la humedad. Dichas expansiones pueden asociarse con las relajaciones térmicas que se observan por espectroscopia de impedancia eléctrica.

El efecto plastificante originado por la absorción de agua en los polisacáridos afecta la viscosidad del material desencadenando variaciones en las relajaciones térmicas y demás parámetros que se derivan de esta, un ejemplo claro se observa en la variabilidad de la  $T_g$  en el quitosano en función de la temperatura de Vogel y por tanto del pico correspondiente a la relajación  $\alpha$ . Para quitosano anhidro el valor de la resistividad es muy alto (probablemente  $10^{-12} \Omega \times \text{cm}$ ) lo que implica un comportamiento no conductivo debido a la ausencia de portadores de carga, sin embargo al hidratar la molécula, los grupos polares ( $\text{NH}_3^+$ ) y los iones  $\text{OH}^-$  débilmente unidos promueven procesos iónicos que permiten detectar resistividades menores<sup>44</sup>

Crofton y Pethrick estudiaron el comportamiento de la pérdida dieléctrica a bajas y altas temperaturas en el polisacárido de la celulosa y su relación con el contenido de agua, observando que existen dos fenómenos importantes gobernados por el porcentaje de humedad que afectan directamente a las relajaciones dieléctricas de polímeros biológicos. En muestras con bajo contenido de humedad se observó que al incrementar la temperatura se obtuvo una dependencia de la conductividad casi lineal, lo que indica que en la estructura no se presentaron movimientos de cadena principal, sino de sitios específicos. Dicho efecto fue atribuido a la reorientación de radicales iónicos, incluyendo hidroxilos y acetilos provenientes de solventes orgánicos, en contraste con muestras hidratadas que presentaron un aumento en la amplitud del pico obtenido, en función del porcentaje de humedad de la muestra, y fue relacionada la movilidad de protones, lo que implica movimientos de cadenas principales<sup>45</sup>.

### 1.1.16. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

El DMA es una técnica de análisis térmico que mide las propiedades de los materiales sometidos a esfuerzos periódicos, esta metodología es usada comúnmente en materiales de naturaleza visco elástica (polímeros) y consiste en medir el tiempo de desplazamiento (deformación sinusoidal) producido cuando al aplicar una tensión, por tanto es posible, determinar el módulo de la muestra y la propiedad amortiguante de la misma. El tiempo de retraso en la deformación se reporta como la fase de retraso y físicamente es el ángulo al que se orientan las cadenas del polímero cuando reciben un esfuerzo, también llamado tangente de delta ( $\tan \delta$ ).

Los materiales viscoelásticos presentan dos fases simultáneas (liquido-sólido) dependientes del tiempo, lo que significa que la velocidad de deformación del material depende de la conformación del mismo. Las propiedades vítreas se producen en módulos mayores y temperaturas bajas y las elásticas en módulos bajos y temperaturas altas. La temperatura de transición vítrea puede ser determinada por medio del análisis dinámico mecánico en función de la temperatura y puede relacionarse con la relajación  $\alpha$ , por medio de la frecuencia dependiente de la naturaleza de transición.

Para obtener la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de un material se emplean tres parámetros importantes: la parte real del módulo

- $E'$ : de inicio (módulo de almacenamiento): es la parte real del módulo y se da a bajas temperaturas, generalmente se relaciona con fallas mecánicas del material.
- $E''$ : es la parte imaginaria del módulo, se observa en temperaturas intermedias y se ha relacionado con el cambio de las propiedades físicas atribuidas a la  $T_g$  en plásticos, se asocia a la temperatura a que se inicia el proceso de movimiento de segmentos de cadena que se correlaciona con la aparición de la temperatura de transición vítrea.
- $\tan \delta$ : Algunos autores emplean esta expresión para comparar los resultados de las mediciones de DMA y espectroscopia eléctrica. Se observa a altas temperaturas y se ha determinado como un punto intermedio entre los estados elásticos y vítreos de los polímeros. Lo más importante de este parámetro es que tanto el ancho como la forma del pico cambian drásticamente en relación al grado de cristalinidad de la muestra.

## 1.2. Diseño de materiales complejos para regeneración de tejidos

El avance tecnológico en la síntesis y caracterización de materiales ha desatado una lista interminable de nuevas propuestas en el área biomédica, algunos autores describen esta tendencia como la era de la medicina personalizada, ya que a partir de una necesidad específica se desarrolla una alternativa de tratamiento. Un biomaterial perfecto es aquel se usa como herramienta en la detección, diagnóstico o tratamiento de un padecimiento, por medio de sistemas “inteligentes”, lo que implica que responden a un factor determinado sin producir alteraciones o daño al organismo<sup>46</sup>.

Particularmente en la regeneración de tejidos se han desarrollado soportes celulares tridimensionales a partir de polímeros y proteínas específicas, obteniendo buena adhesión y viabilidad celular, sin embargo, con la llegada de la nanotecnología se ha abierto un sinfín de posibilidades para perfeccionar dichos materiales agregando estructuras nanométricas que permitan potenciar diferentes sus características. En 2009, Zhang y colaboradores demostraron que nanocompuestos a base de quitosano y nanopartículas de oro poseen biocompatibilidad, aunque el quitosano por sí mismo promueve la adhesión y proliferación celular de queratinocitos, al adicionar nanopartículas de oro se obtienen mejores resultados disminuyendo la probabilidad de desdiferenciación a fibroblastos<sup>47</sup>.

Estudios adicionales señalaron que el uso de nanopartículas disminuye el oxígeno reactivo dependiendo de la dosis usada, adicionalmente pueden catalizar la oxidación de NADH a NAD aumentando la actividad antioxidante de la vitamina E, además, inhiben la formación de osteoclastos que inducen la activación del factor nuclear potenciador  $\kappa\beta$  que está relacionado con la respuesta inflamatoria producida por estrés oxidativo derivado de macrófagos. Nanopartículas entrecruzadas con antioxidantes disminuyeron la expresión de CD68 e incrementaron la expresión de SOD1 lo que sugiere esta combinación disminuye la respuesta inflamatoria en lesiones de piel provocadas en ratones<sup>48</sup>.

### 1.3. Introducción a la inmunología

El sistema inmune es el mecanismo natural del organismo compuesto por órganos, células y moléculas que funcionan de manera coordinada, este sistema diferencia lo propio de lo extraño, su acción principal es proteger nuestro cuerpo de agentes que pueden generar algún daño, como bacterias, patógenos y células tumorales. Una de sus principales cualidades es la capacidad de aprender y acoplarse a diversos y nuevos ambientes externos, además de poseer memoria y selectividad.

Para su estudio podemos separar en inmunidad innata e inmunidad humoral:

- **La inmunidad innata o natural:**

Está compuesto por diferentes órganos que nos protegen del medio ambiente externo tal como la piel, así como de compuestos químicos derivados de nuestro cuerpo enfocados a la destrucción de patógenos tal como el óxido nítrico y peróxido de hidrogeno y células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células NK, plaquetas y proteínas encargadas de la homeostasis del cuerpo. Los cuales en conjunto conforman la primera línea de defensa de nuestro cuerpo ante la entrada de cualquier sustancia extraña a nuestro cuerpo. Como se muestra la figura 6.

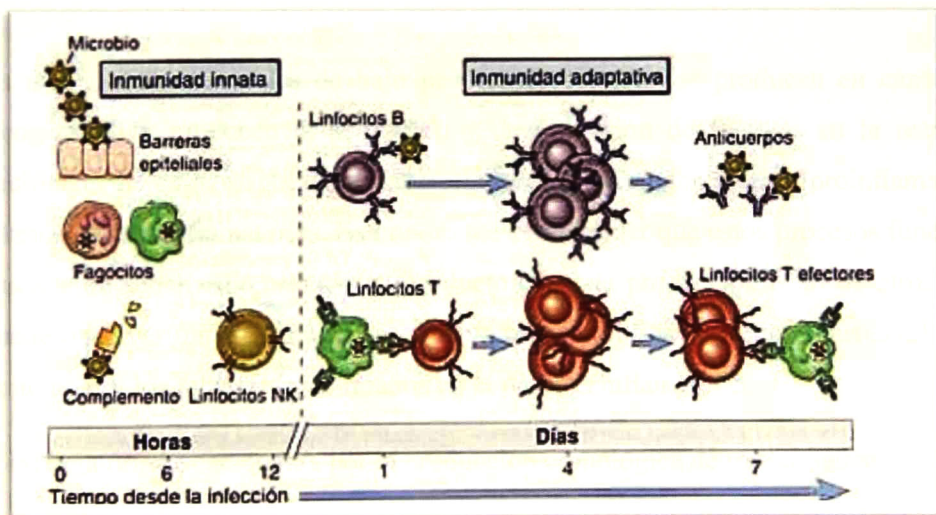


Figura 6. Mecanismos de la innata y adaptativa.

- **Inmunidad adaptativa o específica**

Esta inicia de las 4 a las 12 horas de haber entrado el agente extraño al cuerpo y está a cargo de las células B y T, con la finalidad de tener una respuesta específica de antígeno, esto dependiendo de la intensidad de la antigenicidad de la sustancia o microorganismo, puede montar una respuesta de memoria hacia el antígeno que le dio origen o no, esto con la finalidad de tener una respuesta más rápida cuando se presenta de nuevo el microorganismo o sustancia extraña. Una respuesta de este tipo es muy efectiva para la eliminación de manera específica del patógeno. Los linfocitos B ejercen una respuesta humoral en base a anticuerpos específicos e inespecíficos de antígeno y los linfocitos T ejercen un papel regulatorio del sistema inmune así como de toxicidad celular hacia microorganismos de manera directa o por mediadores moleculares liberados al medio ambiente extracelular.

Cabe mencionar que tanto la inmunidad innata como la específica tienen la facultad de producir moléculas solubles conocidas como citocinas, las cuales además de mediar la respuesta inmune, están involucradas en los procesos de crecimiento celular<sup>49</sup>.

- **Respuesta inflamatoria mediada por citocinas**

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que se producen en cantidades mínimas (picogramos) y producen la activación y desactivación de factores en la respuesta inmune, específicamente en la respuesta inflamatoria se encuentran dos grupos: proinflamatorias e inmunosupresoras o antiinflamatorias. Es importante comprender que estos procesos funcionan como una cascada de señalización donde un producto causa la producción o no de otro. En la figura 7 se puede observar un esquema representativo que simplifica y relaciona las células que originan las citocinas y los factores involucrados en el proceso inflamatorio.

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la producción cronológica de tres citocinas:

- Factor de necrosis tumoral (TNF): se puede producir por monocitos, macrófagos, linfocitos T, B células NK y fibroblastos, como su nombre lo indica su función principal

es la necrosis de tejido tumoral, aunque también se le atribuye el aumento de temperatura corporal.

- interleucina 1 (IL-1): Producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliales, NK entre otros, esta proteína induce la producción de histamina generando dilatación en los vasos sanguíneos y aumento de la permeabilidad vascular además promueve el incremento de temperatura corporal.
- interleucina 6 (IL-6): se produce por monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T, particularmente está relacionada con la producción del fibrinógeno en la fase aguda de la inflamación.

Por otro lado la actividad antiinflamatoria esta mediada por otro grupo de citocinas que activan la acción de linfocitos B inhibiendo la respuesta inflamatoria, entre estas se encuentran:

- Interleucina 4 (IL-4): Esta citocina es producida por linfocitos T y basófilos, interviene en los procesos inflamatorios de los macrófagos y bloquea la acción de la IL-1.
- Interleucina 13 (IL-13): se produce por linfocitos T y actúa en conjunto con la IL-4, inhibe las citocinas producidas por los monocitos entre estas la IL-6 contrarrestando la acción inflamatoria
- Interleucina 10 (IL-10): producida por macrófagos y linfocitos B, es la citocina inmunosupresora más importante ya que inhibe la producción del factor de necrosis tumoral y otras citocinas que median la diferenciación celular.

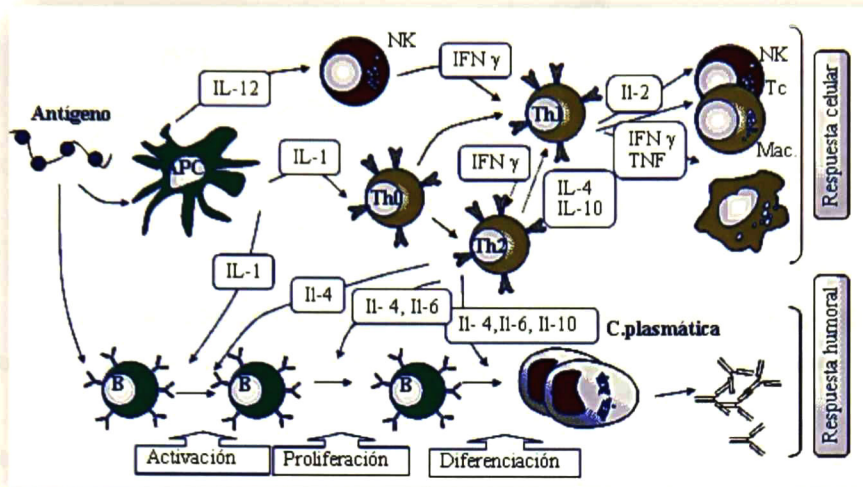
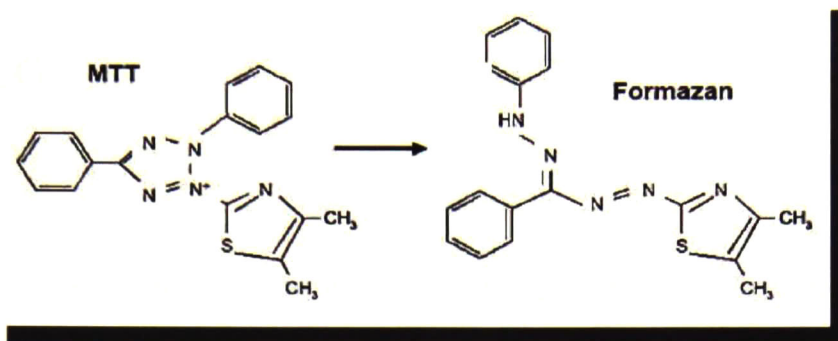


Figura 7. Esquema de producción de citocinas.

### • 1.3.1. Técnicas comúnmente usadas para la evaluación de la citotoxicidad

La citotoxicidad celular se define como la alteración celular en una o más funciones principales, promovida por un cuerpo extraño, lo que conlleva a un daño estructural o metabólico. Como se expuso anteriormente el efecto producido por un antígeno esta mediado por diversos factores, los cuales pueden ser monitoreados por técnicas directas e indirectas, que se correlacionan entre sí. La técnica del MTT o Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol es una de las pruebas usadas comúnmente para medir de manera indirecta la citotoxicidad de un componente y por tanto la viabilidad celular. El MTT es un colorante amarillo soluble en agua que penetra fácilmente la célula, cuando esta se encuentra viable, como se observa en la figura 8, la enzima succinato- deshidrogenasa producida por el metabolismo mitocondrial reduce el compuesto a azul-purpura de formazán usando NADH como donador de electrones. La formación de cristales de Formazán, se relaciona directamente con la cantidad de células viables y puede medirse por medio de espectroscopia visible a una absorbancia de 570 nm. Esta técnica permite conocer si el metabolismo celular ha sido alterado y puede complementarse con una prueba sencilla de viabilidad con azul tripano, eosina o naranja de acridina<sup>50</sup>.





**Figura 8. Reacción de reducción del MTT a Formazán, la enzima succinato deshidrogenasa**

El contacto con un antígeno tóxico produce estrés oxidativo celular, el cual se caracteriza por la emisión de especies de oxígeno reactivas, estas moléculas actúan como radicales libres con potencial oxidativo, afectando los grupos sulfhidrilos proteicos presentes en las membranas de microorganismos y células tumorales. La oxidación de las proteínas conduce al agotamiento de glutatión citosólico, que a su vez reacciona con el anión superóxido formando Óxido Nítrico (NO), esta producción de NO se ha atribuido directamente a los macrófagos, aunque algunos estudios indican que las plaquetas pueden producir este óxido. La determinación del NO se puede realizar por varias técnicas, sin embargo, la técnica más usada se basa en el uso de la enzima nitrato reductasa para promover la oxidación de nitratos a nitritos que en presencia del reactivo de Griess toman un color púrpura oscuro, el cual puede medirse por densidad óptica y correlacionarse por medio de una interpolación a una cantidad cuantificable de producto<sup>51</sup>.

- **Células de hepatoblastoma humano Hep G2**

Hep G2 es una línea celular inmortal obtenida de un niño de 15 años de origen argentino, la cual se caracterizó por presentar un carcinoma hepatocelular bien diferenciado morfológica y funcionalmente, por esta razón, esta línea, ha sido usada como modelo para estudiar diferentes enfermedades hepáticas humanas referentes a la distribución y redistribución de proteínas en el hígado, de la misma forma, se ha implementado el uso de este tipo de células como un parámetro de evaluación de metabolismo hepático y detección de agentes citotóxicos y genotóxicos de una gran variedad de fármacos, productos botánicos y demás xenobióticos<sup>52</sup>.

## CAPITULO 2

### 2. Justificación

A pesar del enorme potencial que representa la nanotecnología para el mundo moderno, aún no existen estudios que permitan conocer a fondo la naturaleza química y eléctrica que confieren estos materiales a los sistemas biológicos. El enorme desafío al que se enfrenta esta nueva tecnología, es determinar las concentraciones óptimas, tamaños de partícula, métodos de síntesis y purificación que generen una respuesta efectiva sin producir algún tipo de daño colateral como la bioacumulación y citotoxicidad.

La espectroscopia de impedancia eléctrica es una técnica que se ha utilizado exitosamente en el estudio de las propiedades de los polímeros dieléctricos, permitiendo el desarrollo de infinidad de dispositivos entre estos biosensores de moléculas biológicas, por esta razón, a partir del año 2008 se iniciaron labores de investigación en nanocompositos de quitosano plata por medio de una colaboración celebrada entre los grupos de biopolímeros y propiedades eléctricas del Cinvestav unidad Querétaro, obteniendo como resultado que la dependencia de la conductividad en nanocompositos de plata puede correlacionarse con la actividad antibacterial de los mismos<sup>4</sup>, Lo cual, abre la puerta a la posibilidad de utilizar un método estandarizado que permita determinar concentraciones óptimas de Np's para su aplicación en sistemas biológicos.

Investigaciones recientes han reportado que las AuNp's en concentraciones adecuadas promueven el desarrollo de sustancias activas que producen crecimiento de queratinocitos y células de glioma propias de sistema nervioso<sup>53,54</sup>, sin embargo, aún no existen herramientas que permitan determinar de forma puntual la concentración optima de las partículas, con base en lo mencionado previamente, se pretende estudiar si existe relación entre la dependencia de la conductividad de compósitos a base quitosano oro con la regeneración celular, y citotoxicidad.

## 2.1 Objetivos

### 2.1.1. Objetivo general

Obtener nanocompósitos a base de quitosano y nanopartículas de oro por medio de síntesis química con el fin de estudiar la dependencia de la conductividad en función de la concentración de nanopartículas empleando la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica, así como, determinar si existe una relación entre la conductividad y la toxicidad del mismo.

### 2.1.2. Objetivos específicos

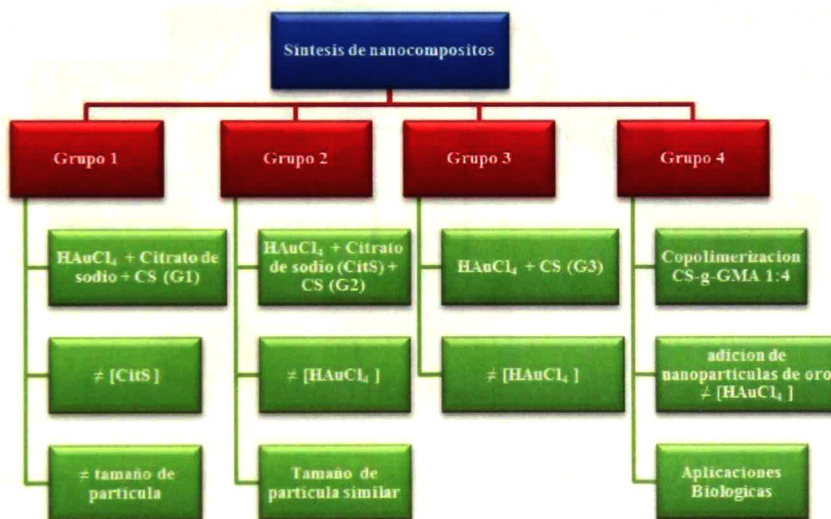
- Sintetizar nanopartículas de oro por medio del método de Turkevich usando citrato de sodio como agente reductor, variando la concentración del  $\text{HAuCl}_4$  y la relación de citrato de sodio/ $\text{HAuCl}_4$ .
- Sintetizar nanopartículas de oro usando quitosano como agente reductor.
- Caracterizar los materiales obtenidos por medio de espectroscopia de infrarrojo (FTIR), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), difracción de rayos X (XRD), análisis termogravimétrico (TGA). Así como determinar un intervalo de tamaño de partícula para cada método de síntesis, y la homogeneidad de las Np's en el material.
- Evaluar las propiedades eléctricas, relajaciones térmicas y tiempo de relajación de los nanocompósitos por medio de espectroscopia de impedancia para si existe o no una dependencia de la conductividad con respecto a la concentración de partícula y el agente reductor empleado en la síntesis.
- Desarrollar un compuesto a base de quitosano y nanopartículas de oro con el fin de evaluar tanto *in vivo* como *in vitro* su posible aplicación como soporte para regeneración de queratinocitos y toxicidad respectivamente.

## CAPITULO 3

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Síntesis de Nanocompuestos

Como se observa en la figura 9, para este trabajo se sintetizaron 4 grupos de materiales, todos basados en el método de reducción química. Para los 3 primeros grupos se realizaron variaciones en cuanto al agente reductor (citrato de sodio y/o quitosano) y la concentración del mismo, mientras para el grupo 4 se sintetizó un copolímero al que posteriormente se le incorporaron nanopartículas obtenidas previamente por el método empleado para el grupo 3.



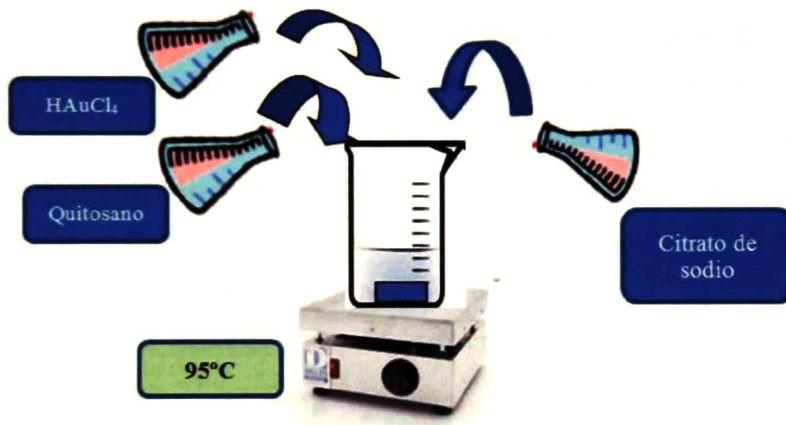
**Figura 9.** Nanocompuestos sintetizados a base de quitosano y nanopartículas de oro obtenidos por el método de Turkevich

Los reactivos usados para esta síntesis fueron: Quitosano de peso molecular medio (300,000 g/mol) con 85% grado de desacetilación (cat. Num. 448877), ácido cloroáurico  $\text{HAuCl}_4$  (cat. num. 50790), citrato de sodio (cat. num. S1804). Todos, adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich® y se usaron sin purificación adicional. Para obtener las soluciones de ácido cloroáurico y citrato de sodio se disolvió la cantidad del reactivo respectivo en agua destilada, por otro lado, la solución de quitosano se realizó usando ácido acético glacial al 0.4 M.

- **Grupo 1.**

A 6 ml de solución de ácido cloroáurico 0.3 mM se le adicionaron 2 ml de quitosano al 2% p/p, posteriormente se homogenizo por medio de agitación magnética y se llevó a un baño María a 95 °C manteniendo la temperatura y la agitación, se adicionó por goteo citrato de sodio al 1% (Figura 10). Las condiciones de la reacción se mantuvieron aproximadamente de 20 a 25 minutos, hasta obtener un color rojo brillante. La cantidad de citrato de sodio fue disminuyendo para cada síntesis obteniendo de esta manera soluciones diferentes con relaciones de 0.1 a 5 de  $\text{HAuCl}_4$ /citrato de sodio.

Las películas fueron obtenidas por medio del método de evaporación de solvente, sirviendo las soluciones en cajas de Petri y dejándolas en un horno de secado a 60 °C toda la noche.



**Figura 10.** Esquema representativo del método de síntesis empleado.

- **Grupo 2**

Para esta síntesis se realizó una serie de materiales a partir de un intervalo de concentraciones crecientes de  $\text{HAuCl}_4$  desde 0.02 a 1 mM. De la misma forma que para el grupo 1 en un vaso de precipitado se homogenizaron 2 ml de quitosano al 2% p/p y 6 ml de la solución de ácido cloroáurico, es importante aclarar que para estos materiales se utilizaron 2 moles de citrato de sodio como reductor por cada mol de  $\text{HAuCl}_4$ . Una vez obtenida la solución se llevó a baño María a 95°C y se adiciono por goteo el citrato de sodio al 1%, el tiempo de reacción fue de 20 a

- **Grupo 3**

A partir de concentraciones de ácido cloroáurico a diferentes molaridades (0.02 a 1 mM) se sintetizaron nanopartículas usando como reductor una solución ácida de quitosano al 2% p/p, para este caso particular no se adiciono citrato de sodio. Las condiciones de reacción y obtención de películas fueron las mismas que se usaron para los materiales de los grupos 1 y 2.

- **Grupo 4**

Para este grupo de materiales se sintetizo un copolímero a base de quitosano y metacrilato de glicidilo (GMA) en una relación molar 1:4. La solución principal se preparó disolviendo 0.25 g de quitosano en ácido acético 0.4 M, posteriormente se mezcló con 1g de GMA y una solución de hidróxido de potasio (KOH) 0.05 M al 15 %. La solución final se llevó a 60 °C manteniendo agitación temperatura y flujo de nitrógeno constante por dos horas. El material obtenido al que llamaremos (CS-g- GMA) se precipito por goteo en acetonitrilo a 40°C, finalmente se retiró el exceso de acetonitrilo del material y se dispersó en agua destilada dejándolo en agitación magnética constante durante 24 horas.

De forma alterna se sintetizaron diferentes nanocompositos a partir  $\text{HAuCl}_4$  (0.15, 0.3, 0.6, 1.07 mM) adicionando una solución de quitosano al 2% p/p como reductor. El método usado para estos materiales fue el mismo que se hizo para los materiales del grupo 3. Al CS-g- GMA dispersado en agua se le adicionaron las diferentes solución de nanopartículas se y se estabilizo la mezcla manteniéndola a 60° C por una hora.

La solución final se dividió en 2 volúmenes iguales uno de estos se sirvió en una caja de Petri la cual se llevó a un horno durante toda la noche a 60°C, a este material se le llamo ((CS-g-GMA)-AuNp's). Al segundo volumen se le adiciono una solución de colágeno tipo I en ácido acético al 0.04% p/p y se mantuvo en agitación constante durante dos horas a temperatura ambiente. Estas

soluciones se sirvieron en cajas de Petri y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta obtener películas, a este material se le llamo (((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col).

### **3.2. Caracterización de materiales**

- **Espectroscopia de infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One. Las películas obtenidas fueron analizadas por la técnica de transmisión en un intervalo de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 16 barridos.

- **Espectroscopia de UV-Vis**

El espectro de ultravioleta se realizó por medio de un equipo Agilent modelo 8453, el análisis se hizo en las soluciones líquidas, en un intervalo de 400 a 800 nm, este equipo se usó para estimar si el tamaño de partícula correspondía con el máximo de absorción en la región visible.

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Estas mediciones fueron hechas en un equipo marca Metler Toledo modelo 851e. Se pesó 1 mg de muestra en crisoles de aluminio de 40  $\mu\text{l}$  manteniendo una atmosfera de aire 50 ml/min. El programa de temperatura consistió en calentar las muestras de 25 a 300°C con escala de 10°C/min.

- **Difracción de rayos X (DRX)**

Los materiales analizados fueron cortados en cuadrados de aproximadamente 4  $\text{cm}^2$  y luego se fijaron en una lámina de cobre. Se utilizó un difractómetro de Rayos X marca Rigaku model ULTIMA IV, equipado con fuente de cobre ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ) a 30kV.

- **Microscopia de barrido electrónico (SEM)**

Para el análisis de partícula se cortaron cuadrados de aproximadamente 0.7x0.7 cm, que fueron fijados en cinta de grafito a una lámina de cobre. Se utilizó un microscopio marca JEOL modelo

JSM-7401F. Debido a que las muestras contenían nanopartículas de oro no se recubrieron previamente como es usual, en este caso se usó el modo COMPO y se manejaron energías de 3.0 a 8.0 kV para evitar que se cargara la película.

- **Preparación de contactos para mediciones dieléctricas**

Para analizar los nanocompuestos por espectroscopia de impedancia se realizaron contactos tipo sándwich, evaporando una capa delgada de oro por cada lado de la muestra, para esto se utilizó un evaporador de plasma marca Plasma Science Inc y un blanco de oro con 99.99% de pureza. El procedimiento se realizó manteniendo un flujo constante de Argón, un vacío de 40 *mTorr*, voltaje de 0.2 Kv, el tiempo de depósito fue de 4 minutos para lado de la muestra. El área y el espesor de cada muestra se midió con un micrómetro marca Mitotuyo.

- **Espectroscopia de impedancia eléctrica**

Se usó un equipo de impedancia marca Agilent modelo 4249A, la amplitud de la señal de medición fue de 100 mV. Para los materiales del grupo 1 y 2 se hicieron mediciones tanto en vacío como en ambiente. Los programas de calentamiento para los dos métodos fueron similares, cada muestra se precalentó de 25 a 40°C con el fin de eliminar el exceso de humedad, se mantuvo la muestra a 40°C hasta que el valor de la resistencia fuera constante, esto se logró en un tiempo aproximado de 20 minutos, posteriormente se dejó enfriar la muestra y se procedió con el análisis de 25 a 130°C para ambiente y para vacío de 3 a 100°C.

Los datos de resistividad obtenidos de las mediciones de impedancia fueron analizados y graficados en el software Zview®. Para todas las muestras se realizó un ajuste al modelo Cole-Cole con resistencia en paralelo, el cual consistió en delimitar el semicírculo, la intercepción con la parte real de la impedancia o frecuencia cero (eje X) permite determinar la resistencia DC  $R_{dc}$ .

Para determinar la conductividad DC ( $\sigma_{dc}$ ) se usó la ecuación:

$$\sigma_{dc} = \frac{d}{R_{dc} \times S}$$



Donde  $d$  es el espesor de la película y  $S$  es el área de la película. Los valores de conductividad fueron graficados usando el software Origin Pro 9.0 ®, obteniendo la dependencia de conductividad *versus* el recíproco de la temperatura.

Para analizar la respuesta dieléctrica de los nanocompuestos se usó el complejo de permitividad  $\varepsilon^*$  que puede convertirse a un complejo de módulo eléctrico por medio de la siguiente ecuación.

$$M^* = \frac{1}{\varepsilon^*} = M' + iM'' = \frac{\varepsilon'}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2} + i \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'^2 + \varepsilon''^2}$$

Donde  $M'$  es la parte real y  $M''$  es la parte imaginaria del módulo eléctrico,  $\varepsilon'$  es la parte real y  $\varepsilon''$  corresponde a la parte imaginaria de la permitividad

Usualmente la interpretación de los datos experimentales se realiza usando la expresión del módulo eléctrico, esta herramienta se emplea para obtener información sobre procesos de relajación que se presentan en materiales con conductividad iónica. Básicamente el uso del módulo eléctrico elimina efectos de enmascaramiento que se presentan en los materiales que poseen inclusiones conductivas y polarización interfacial. La parte imaginaria del módulo depende de la temperatura y puede relacionarse con movimientos de translocación iónica. El tiempo de relajación correspondiente está dada por: donde  $f_p$  es un pico de frecuencia máxima<sup>41</sup>.

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_p}$$

Adicionalmente, se graficaron las mediciones de conductividad versus la temperatura recíproca para todas las muestras y tomando la región no lineal (relajación  $\alpha$ ) se obtuvo el valor de la temperatura de Vogel por medio de la ecuación de Vogel-Fulcher-Tamman (VTF).

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{DT_0}{T - T_0}\right)$$

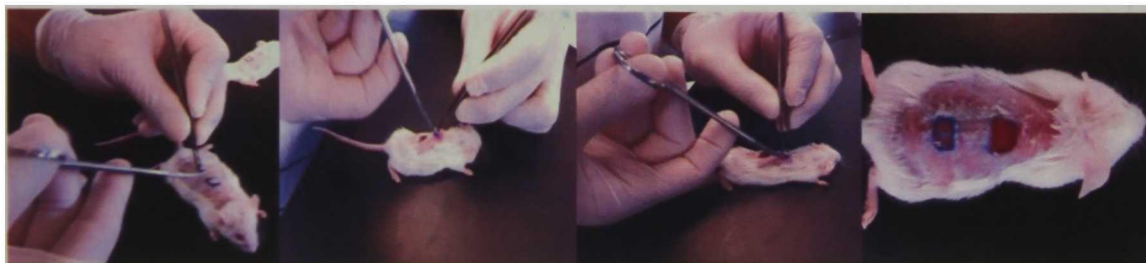
De la región lineal (relajación  $\sigma$ ) se obtuvo el valor de la energía de activación por medio de una regresión lineal y usando la aproximación Arrhenius.

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{RT}\right)$$

### 3.2. Pruebas biológicas

#### 3.2.1. Evaluación de los materiales “*in vivo*”

Los materiales evaluados en esta prueba fueron los obtenidos en el grupo 4, se manejaron cuatro concentraciones (0.15, 0.3, 0.6, 1.07 mM) tanto para ((CS-g-GMA)-AuNp's) como para (((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col) con un total de 8 materiales evaluados. Se usaron dos materiales como controles CS-g-GMA, el cual ya ha sido evaluado con buenos resultados para la regeneración de algunos tejidos, y TheraForm TM , que es una bio-matriz de colágeno absorbible comercial fabricada y distribuida comercialmente para activar la regeneración de piel y tejido conectivo humano. Todos los materiales fueron cortados en cuadrados de 8x8 mm y se lavaron con 600  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por 5 minutos y otras dos veces con 600  $\mu$ L de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), estos materiales fueron esterilizados por luz ultravioleta durante 10 minutos.



**Figura 11.** Proceso de la cirugía. La lesión proxima a la cabeza fue implantada con los materiales a evaluar, el otro segmento lesionado se uso como control negativo. Las áreas de las zonas lesionadas tanto muestra como control se midieron diariamente hasta completar los 15 días de recuperación.

Se usaron 10 ratones hembra de la cepa BALB/C con 6 semanas de nacidos y un peso promedio de 21 g. Cada ratón fue anestesiado usando hidroclicloro de ketamina 100mg/kg y xilazina 5mg/kg<sup>55</sup>. Posteriormente se afeitó la zona dorsal del animal y se removió dos cuadrados de piel (Dermis y epidermis) de 6x6 mm, en esta zona se implanto el material a evaluar y los controles, el otro segmento lesionado se dejó como control para cada animal como se observa en la figura 11. Para evaluar el efecto cicatrizante de los nanocompositos después de aplicarlos sobre el cuadrado de piel removido, se observó el proceso de curación durante 40 días.

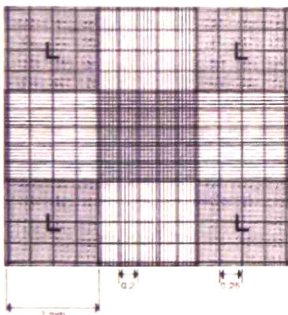
### 3.2.2. Evaluación de los materiales “in vitro”

- **Extracción de macrófagos peritoneales de ratón**

Se sacrificaron 10 ratones hembra de 6 semanas de nacido cepa BALB/C por dislocación cervical, posteriormente se realizó una incisión en zona peritoneal con el fin de retirar dermis y epidermis de dicha zona, a continuación se inyectaron 5 ml de Dulbelcco’s Modified Eagle Medium (DMEM), después de 3 minutos se recuperó el medio inyectado en un tubo Falcón de plástico de 50 ml, esto se repitió por dos ocasiones.

- **Conteo en cámara de Neubauer**

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del medio recuperado y se mezclaron con 20  $\mu\text{L}$  de Azul tripano, esta solución se depositó en la cámara de Neubauer por capilaridad y se contaron las células presentes en los cuadrantes de los extremos (Fig. 12). Una vez obtenido el número de células se aplicó la fórmula. Finalmente se obtuvieron  $5 \times 10^5$  células/ml y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener 50.000 células en 100  $\mu\text{L}$ .



$$\left( \frac{\# \text{células totales}}{4} \right) * dil * 10^4 = \frac{\# \text{células}}{ml}$$

**Figura 12.** Cámara de Neubauer. El volumen de la cámara es de  $0.1 \text{ mm}^3 = 10^4 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ .

- **Cultivo de macrófagos**

En una placa de 96 pozos se cultivaron 100  $\mu\text{L}$  de los macrófagos obtenidos, en cada pozo se cultivó  $5 \times 10^4$  células, posteriormente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF), la placa se incubo durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se observó al microscopio para verificar que los macrófagos se encontraran adheridos a la placa, se retiró el medio y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de nanopartículas de oro obtenidas por el método usado para el grupo 3 (usando quitosano como reductor), las muestras se hicieron por triplicado y se evaluaron 4 concentraciones diferentes (0.3, 0.6, 2 y 3 mM), a continuación se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado al 10% con SBF, la caja se incubo durante 24 horas en las condiciones establecidas y se evaluó citotoxicidad por medio de MTT y detección de óxido nítrico.

- **Cultivo de células HEP-G2**

Las células HEP-G2 fueron donadas por el Cinvestav- Unidad Monterrey. Se utilizaron  $5 \times 10^4$  células en una placa de 96 pozos con 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF), las cuales se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . A las 24 horas se observaron al microscopio, se revisó la viabilidad celular con azul de tripano, confirmando que había un 80% de viabilidad celular, posteriormente adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de nanopartículas de oro obtenidas por el método usado para el grupo 3 (usando quitosano como reductor), las muestras se hicieron por triplicado y se evaluaron 4 concentraciones diferentes (0.3, 0.6, 2 y 3 mM), a continuación se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado al 10% con SBF, la caja se incubo durante 24 horas en las condiciones establecidas.

- **Separación de células mononucleares de sangre periférica**

En un tubo con 10 ml de Ficoll-Paque, se adicionaron 5 ml de sangre y se centrifugo a 1400rpm durante 30 minutos conservando la temperatura entre 20 y  $25^\circ\text{C}$ , posteriormente se retiró el sobrenadante y se depositó en otro tubo con 10 ml de DMEM. La mezcla del sobrenadante y el

medio se centrifugo nuevamente durante 10 min a 800 rpm, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en medio 2 mL de medio DMEM adicionado con SBF al 10%.

- **Ensayo de MTT**

Esta prueba se realizó tanto para los macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células de la línea Hep G2, después de 24 horas de cultivo se retiró el medio de cada pozo y se reemplazó por 100  $\mu$ L de medio nuevo, posteriormente se adicionaron 20  $\mu$ L (5mg/mL) de MTT y se llevó a incubar por un periodo de 4 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), una vez cumplido el tiempo de incubación se adicionaron 80  $\mu$ L de dimetil sulfoxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán, como muestra blanco se usaron pozos con células adheridas con medio, MTT y DMSO. Finalmente se hizo la lectura por densidad óptica en un lector de placas para tomando la absorbancia a 570nm.

- **Prueba de Azul tripano**

A 100  $\mu$ L de la suspensión celular (macrófagos y HEP-G2) se le agregaron 100  $\mu$ L de una solución de azul tripano al 0.2% diluida con PBS estéril, se homogenizo la mezcla con agitación leve durante 15 segundos. Posteriormente, se usó una cámara de Neubauer para realizar el conteo de 100 células, finalmente se obtuvo el porcentaje promedio de células teñidas de azul<sup>56</sup>.

- **Detección de Óxido nítrico**

Para esta prueba se usó el kit de detección colorimétrica de Óxido comercializado por Biovision (Cat No. K262-200). Para realizar la curva estándar se emplearon los reactivos proporcionados en el kit, los cuales se presentan en orden de uso el siguiente cuadro

Buffer de ensayo	Cofactor enzimatico
Estandar de Nitratos	Iniciador
Estandar de Nitritos	Reactivo de Griess R1
Enzima Nitrato reductasa	Reactivo de Griess R2

Los estándares de nitratos y nitritos se constituyeron con 100  $\mu\text{l}$  de Buffer obteniendo una solución a 100mM, de cada solución se tomaron 5  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con 495  $\mu\text{l}$  de Buffer para obtener una solución madre de 1 mM. Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocaron 0, 2,4, 6, 8 y 10  $\mu\text{l}$  de cada solución y se ajustó el volumen a 85  $\mu\text{l}$  usando el Buffer de ensayo, para obtener estándares de 0, 2, 4, 6,8, y 10 nmol por pozo.

Se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de la enzima nitrato reductasa obtenida del kit , A cada placa cultivada (macrófagos, BPMC, células Hep G2 y estándares) por cada pozo y 5  $\mu\text{l}$  de cofactor, posteriormente se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, durante este tiempo la enzima convierte los nitratos a nitritos, posteriormente se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de solución potenciadora y se llevó a incubar durante 10 minutos, finalmente se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess R1 y 50  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess R2, la reacción se revelo después de 10 minutos. Cada placa se leyó en un lector de placas usando una absorbancia de 540 nm. Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras estándar fueron graficados y se obtuvo una regresión lineal en la que se interpolo el valor de la absorbancia detectado para cada muestra analizada.

- **Citometría de flujo**

Por medio de Citometría de flujo se analizaron dos tipos de muestras, las cuales fueron colectadas de ratones sometidos a cirugía e implantados con los nanocompuestos empleados en la prueba “*in vivo*” mencionada previamente. Los individuos tratados fueron sacrificados a las 48 horas después de haber recibido el implante, y posteriormente de cada animal se extrajeron 2 ml de sangre, los cuales fueron centrifugados a 1000 rpm para obtener el suero, el cual fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Adicionalmente a cada animal se le extrajo el bazo, el cual fue homogenizado con 200  $\mu\text{l}$  de PBS estéril, centrifugado a 1600 rpm/10 min para obtener el sobrenadante el cual fue almacenado con las mismas condiciones que el suero.

Los análisis de citocinas se realizaron usando un citómetro marca BD Biosciences, modelo Accuri C6, en el que se corrieron las muestras siguiendo las instrucciones específicas del

fabricante del Kit de detección de citocinas Th1/Th2/th17 CBA de ratón producido por BD, las interleucinas evaluados fueron IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, INF  $\gamma$  y TNF.

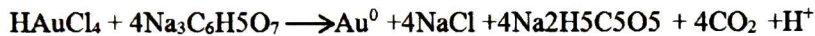
Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete estadístico SPSS v.21.0.0. Los datos mostrados representan la media del error estándar de al menos tres experimentos. La prueba de ANOVA, fue empleada para evaluar la producción de citocinas, y la prueba de Tukey fue empleada para comparaciones entre grupos. El nivel de significancia fue considerado en  $p < 0.05^*$  y altamente significativo para  $p < 0.001^{**}$

## CAPITULO 4

### 4. Resultados y Discusión para materiales del grupo 1

#### 4.1. Síntesis de Nanocompuestos

El método tradicional de Turkevich permite obtener diferentes tamaños de partícula variando la relación entre citrato de sodio y ácido cloro áurico, al incrementar el CS se obtienen partículas de menor tamaño. En teoría, para reducir completamente el  $\text{HAuCl}_4$  se requieren 4 moles de citrato por 1 mol de sal áurica, como se muestra en la ecuación. Para obtener los nanocompuestos del grupo 1, se empleó citrato de sodio como reductor y quitosano como agente estabilizante.



El quitosano se solubiliza en medios acuosos ácidos con pH menor a 6. A pH ácido los grupos amino presentes en la estructura se protonan y por lo tanto se obtiene alta densidad de cargas positivas es aquí donde se forma un polieléctrolito soluble<sup>16</sup>. Por encima de esta barrera de pH se produce la precipitación de CS en el medio, por lo que, al adicionar una cantidad correspondiente a 4 moles de CS por 1 mol de  $\text{HAuCl}_4$ , se observó precipitación del quitosano, debido a que esta cantidad de citrato produjo un cambio de pH de 4 a 7.5.

En la tabla 1 se presentan las relaciones  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$  empleadas para la obtención de los nanocompuestos estudiados. Cabe aclarar que para este grupo de materiales se partió de una solución de ácido cloroáurico al 0.3 mM y quitosano al 2% en peso al cual se le adicionaron diferentes cantidades de citrato de sodio sin rebasar una relación de 2 moles de citrato de sodio por cada mol de ácido cloroáurico, con el fin de evitar la precipitación del quitosano.



**Tabla 1. Nanocompuestos sintetizados variando la concentración de citrato de sodio**

Relación H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> /CS	H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> ( mg/ml)	CS (μL)	2% CS (mL)
0.1	0.624	624	2
0.21	0.624	297	2
0.3	0.624	208	2
0.4	0.624	156	2
0.6	0.624	104	2
2	0.624	31.2	2
3	0.624	20.8	2
5	0.624	12.48	2

## 4.2. Espectroscopia de Infrarrojo

La tabla 2 presenta un resumen de los grupos funcionales característicos del quitosano<sup>57</sup>, los cuales pueden ubicarse en la figura 13 que muestra el espectro de infrarrojo obtenido para la serie de materiales sintetizados.

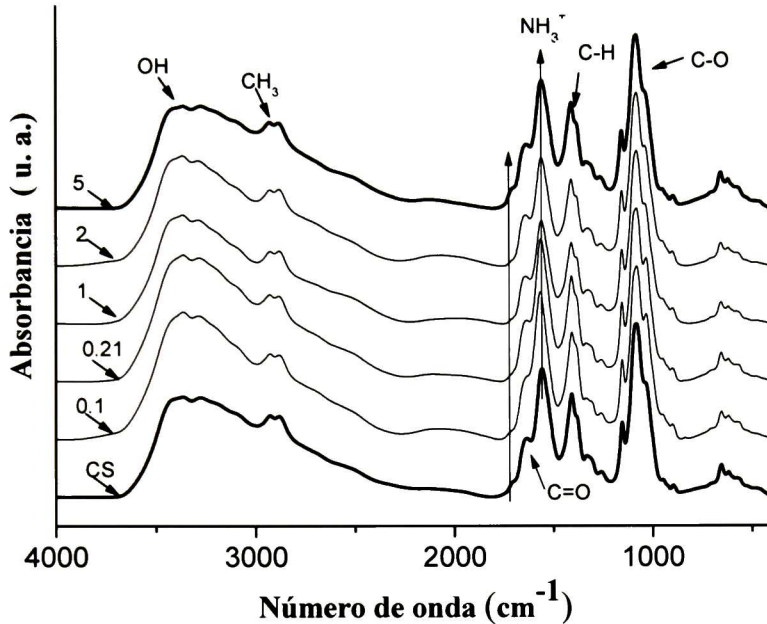
**Tabla 2. Grupos funcionales característicos**

Nº	Grupo Funcional	cm <sup>-1</sup>
1	OH (Estiramiento S.)	3450
2	NH (Estiramiento S.)	3360
3	CH <sub>2</sub> (Estiramiento S y As glucopiranososa)	2870 y 2912 y 1430
4	C=O (Estiramiento As. amida I)	1650
5	NH <sub>2</sub> (Deformación As.)	1560-1590
6	C=O	1730
7	CH <sub>2</sub> (amida II)	1420
8	CH <sub>3</sub> y C-CH <sub>3</sub> (amida III)	1380
9	C-O	1255
10	C-O-C (enlace glicosidico)	1150-1040
11	C-H	838-850

\*S= simétrico, As= Asimétrico.

La primera banda observada a los 3300 cm<sup>-1</sup> corresponde a un estiramiento simétrico de los grupos -OH, seguida de otra banda a los 2880 cm<sup>-1</sup> la cual, se asocia con un estiramiento simétrico del grupo metilo. La banda presente a los 1640 cm<sup>-1</sup> corresponde a un estiramiento antisimétrico del grupo C=O presente en las amidas primarias, la banda a los 1550 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la deformación antisimétrica del grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. La banda a los 1410 cm<sup>-1</sup> se produce

por estiramiento de los grupos C-N, a los  $1025\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que corresponde a estiramientos del enlace glicosidico (C-O-C)<sup>58</sup>.



**Figura 13.** Espectro de infrarrojo de quitosano (CS) y compósitos HAuCl<sub>4</sub>/CS, las relaciones usadas se indicante en la gráfica

Para este grupo de muestras no se observaron variaciones significativas en los espectros de infrarrojo. Se determinó un cambio leve en la intensidad de la banda presente alrededor los  $1640\text{ cm}^{-1}$ , cuando cambia la concentración de CS. Lo que podría implicar una interacción en el carbonilo propio de la amida primaria. Adicionalmente se observa la desaparición de un pequeño hombro asociado a las vibraciones del grupo carbonilo, ubicado a los  $1730\text{ cm}^{-1}$ , como se puede observar en la figura 14 esta banda se observa en el espectro del CS y desaparece en los materiales sintetizados con mayor cantidad de CS, reapareciendo en el nanocompósito con menor cantidad de citrato de sodio.

Aunque en principio el CS se emplea como agente reductor, es importante notar que, estos compósitos fueron desarrollados en un medio con 2% de quitosano, el cual actúa como reductor, por su naturaleza como poliación, por lo que, probablemente en materiales con menores

cantidades de citrato de sodio, el quitosano redujo la sal metálica que no fue reducida por el citrato<sup>37</sup>.

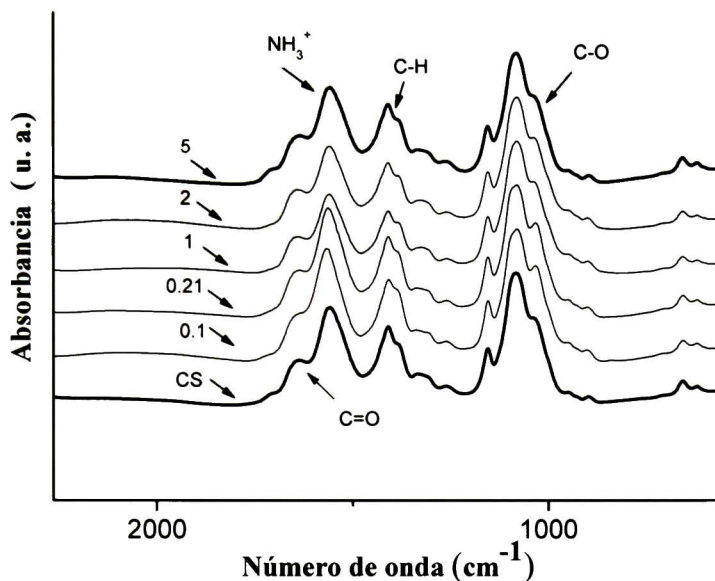


Figura 14. Ampliación espectro de infrarrojo.

### 4.3. Análisis morfológico

Las micrografías de obtenidas por microscopia electrónica de barrido muestran que los nanocompuestos sintetizados presentaron distribución homogénea de las nanopartículas embebidas en el quitosano (figura 15). Usando el software AutoCAD 2007 se realizó el análisis de tamaño de partícula a partir de las micrografías, la distribución de las partículas se muestra en el histograma presentado en la figura 16a para los materiales con una relación igual a 1 de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>/CS, el histograma se obtuvo de 3 micrografías analizadas por cada relación de material.

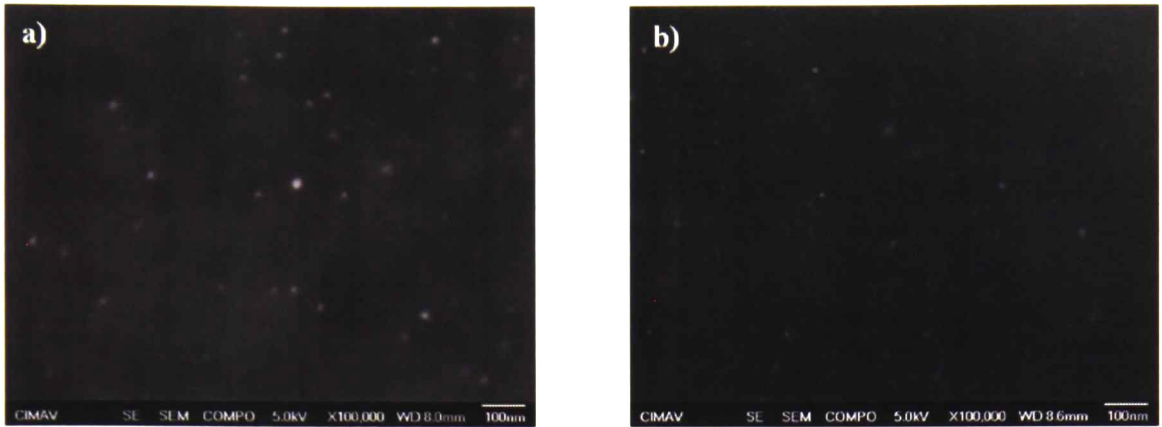


Figura 15. Micrografías de SEM para relaciones de  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$  (a) 0.21 and (b) 1.

Cerca de un 76% de las nanopartículas analizadas se encontraron entre los 8 y los 11 nm. Al incrementar la relación de  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$  antes de 1 el tamaño de la partícula disminuye, sin embargo después de esta relación el promedio de tamaño de partícula no cambia significativamente. Lo que se comprobó nuevamente al obtener la dependencia de las absorbancias máximas para cada material en Uv-Visible (figura 16b), como se expuso previamente el máximo de absorción puede ser relacionado con el tamaño de partícula, confirmando de esta manera el incremento del tamaño de partícula.

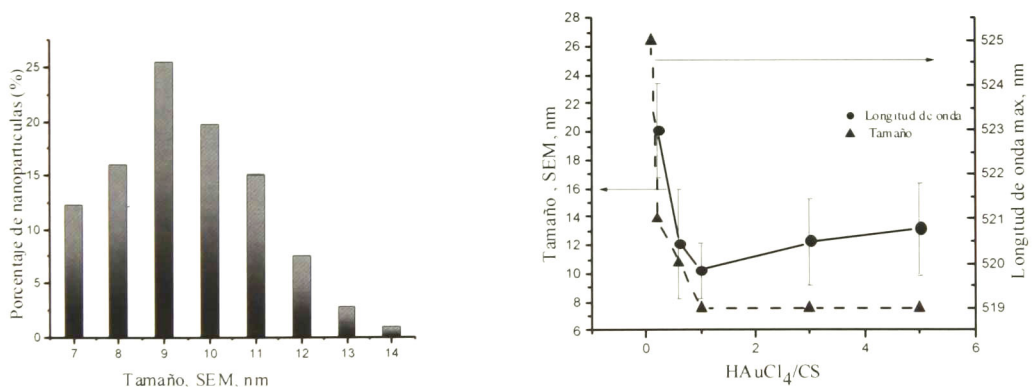


Figura 16.a) Histograma de tamaño de partícula. b) Relación entre tamaño de partícula y máximo de longitud de onda.

La síntesis convencional de Turkevich usa citrato de sodio como agente reductor sin ningún otro compuesto adicional (como quitosano), el incremento de la concentración de CS permite obtener tamaños de partículas menores<sup>59</sup>. Sin embargo al realizar la síntesis de Turkevich usando quitosano en el medio se observó que los materiales obtenidos con pocas cantidades de citrato de sodio el tamaño de partícula disminuyó. Esta tendencia puede obtenerse ya que el quitosano actúa como agente reductor por sus propiedades quelantes y de polimerización, en ausencia del citrato de sodio<sup>Error! Marcador no definido.</sup>. Adicionalmente se ha reportado que al existir un exceso de sal metálica en relación se promueve la nucleación de partículas de tamaños de partícula menor y mayor polidispersidad, lo que concuerda con la tendencia obtenida<sup>60</sup>.

#### 4.4. Mediciones térmicas

El contenido de humedad presente en los materiales fue determinado mediante análisis termogravimétrico (TGA), estas mediciones permiten evaluar el porcentaje de agua libre en la muestra por medio de la disminución de peso durante el análisis calorimétrico. Para medir este parámetro se tomó como referencia, la pérdida de peso a los 120°C, debido a que después de esta temperatura el agua libre de la muestra termina de evaporarse. La figura 17 muestra que el contenido de humedad es menor a medida que aumenta la relación  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$ , para la relación cercana a 1 (la cantidad de citrato de sodio es menor) el valor de la humedad cambia muy poco.

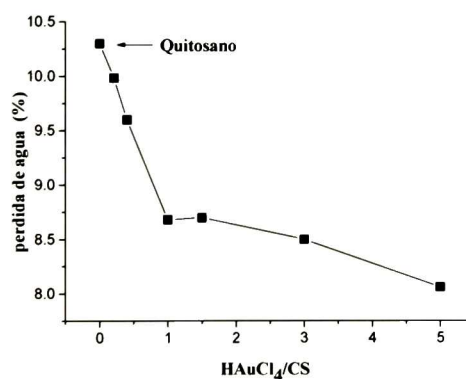


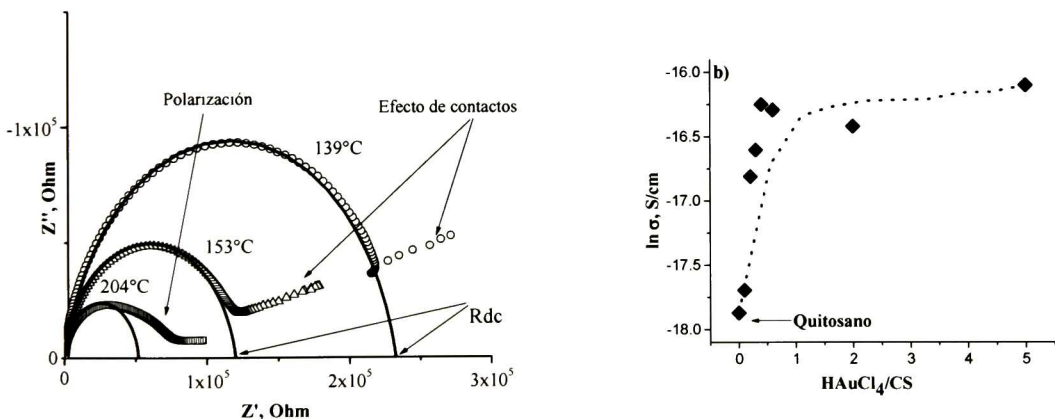
Figura 17. Porcentaje de humedad de los nanocompuestos sintetizados.

Estos resultados implican dos fenómenos relevantes, el primero es que cuando existe mayores cantidades de citrato de sodio aumenta la humedad del material y por tanto el efecto plastificante

del mismo, lo que se puede explicar por una formación de mayor cantidad de enlaces de hidrogeno provenientes del acetato de sodio que se genera en la reacción, en contraposición, los compósitos obtenidos con menor cantidad de citrato de sodio presentaron menor absorción de agua en relación incluso al quitosano, lo cual, puede atribuirse a existan partículas con menor área superficial que genere mayor interacción con la matriz polimérica y de esta manera se bloquee la formación de enlaces de hidrogeno.

#### 4.5. Mediciones de conductividad

Se empleó el modelo de Cole-Cole con una resistencia en paralelo para obtener el valore la resistencia en corriente directa  $R_{cd}^{28}$ . La figura 18a presenta los semicírculos característicos del modelo de Cole-Cole con una resistencia, los cuales corresponden al espectro de impedancia obtenido para un nanocompósito sometido a incrementos de temperatura. El eje de las ordenadas corresponde a la contribución de la parte imaginaria de la impedancia ( $Z''$ ), el eje de las X representa la parte real ( $Z'$ ). Se observa una respuesta casi lineal entre las partes, a bajas frecuencias se presentan distorciones asociadas con la polarización interfacial o con los efectos de contactos



**Figura 18. a) Diagrama de Cole- Cole, ajuste de la medición a frecuencia cero corriente directa. b) Dependencia de la conductividad CD en relación a los nanocompósitos con diferente relación de  $HAuCl_4/CS$**

La figura 18 b muestra la dependencia de la conductividad DC obtenida para cada nanocompósito analizado, los valores fueron calculados mediante de la ecuación  $\sigma_{dc} = d/(R_{dc} \times S)$  anteriormente descrita. Se observa que la conductividad aumenta gradualmente hasta llegar a

relaciones de  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$  cercanas a 1, por lo que es lógico pensar que el citrato de sodio promueve los mecanismos que dan lugar al aumento de la conductividad, sin embargo, los compósitos realizados a bajas cantidades de citrato, presentan un cambio en la conductividad comparados con la muestra de puro quitosano, lo que induce a proponer que la conductividad en este caso depende de varios factores involucrados, entre estos: el porcentaje de agua que varía en relación al Citrato de Sodio, el exceso de  $\text{HAuCl}_4$  y por tanto, el tamaño de partícula.

#### 4.6. Mediciones dieléctricas

La figura 19a presenta la relación entre la parte del módulo eléctrico dado, eje Y *versus* el intervalo de frecuencia de medición (de  $10^2$  a  $10^8$  Hz) eje X. Se observa un desplazamiento progresivo del pico obtenido en modulo eléctrico a bajas temperaturas asociadas a la relajación  $\alpha$  (25, 29 y  $33^\circ\text{C}$ ), y temperaturas mayores, relacionadas con la relajación  $\sigma$  (67, 91, 102 y  $112^\circ\text{C}$ ), al incrementar la temperatura, aumenta el valor de la parte imaginaria del módulo y se presenta un corrimiento gradual en los picos obtenidos que va de menor a mayor frecuencia.

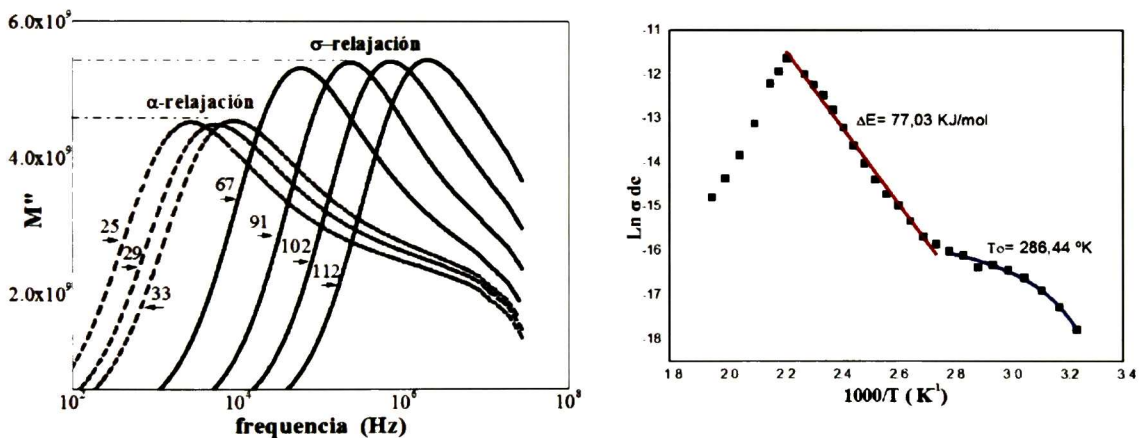


Figura 19. a) Modulo eléctrico, se observan los picos a diferentes temperaturas b) conductividad *versus* temperatura reciproca

La parte b de la figura presenta la dependencia de la conductividad DC ( $\sigma_{dc}$ ) *versus* el reciproco de la temperatura para la muestra con relación 0.1  $\text{HAuCl}_4/\text{CS}$  medida en condiciones

ambientales. Se delimita claramente una dependencia no lineal a temperaturas bajas (36 a 86°C), la cual puede describirse por medio de la relación de Vogel-Fulcher-Tammann (VTF)

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{DT_0}{T - T_0}\right)$$

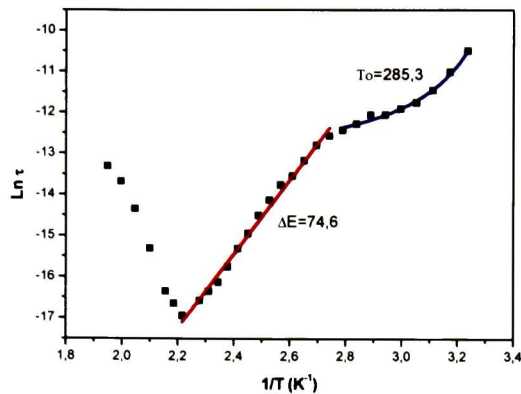
Este tipo de dependencia se relaciona con la relajación  $\alpha$ , la cual a su vez puede asociarse con la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), explicada por medio de una aproximaciones matemáticas, donde se define al polímero como un fluido en movimiento, y se supone que el fluido es un sistema cristalino rodeado de la mayor cantidad de vecinos, este modelo matemático demuestra que la región cercana al fenómeno cinético (estado de no equilibrio) presenta una relación con la ley de Vogel Fulcher<sup>61</sup>. La expresión que lo relaciona es bastante sencilla:

$$T_g = T_0 + (50 \text{ o } 70)$$

Para esta muestra la temperatura de Vogel fue de 286.44°K. Adicionalmente se observa una dependencia lineal, correspondiente a la relajación  $\sigma$  del material, la cual puede describirse como una regresión lineal tipo Arrhenius, la cual se relaciona la pendiente con la energía de activación, que particularmente para esta muestra fue de 77.03 KJ/mol

El tiempo de relajación, calculado a partir de la frecuencia máxima de los picos localizados en el diagrama de módulo eléctrico *versus* el recíproco de la temperatura, se muestra en la figura 18. Se puede observar que se presenta una dependencia similar a las mediciones de conductividad (figura 19b). La dependencia no lineal se encontró entre los 36 y 86 °C y la temperatura de Vogel calculada fue de 285° K, la parte lineal se observó desde los 92 hasta los 178°C presentando una energía de activación calculada fue de 75 KJ/mol.





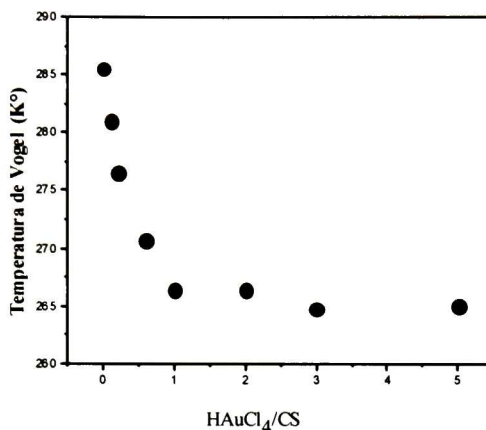
**Figura 20. Tiempo de relajación versus el recíproco de la temperatura**

La aparición de la relajación  $\sigma$  se relaciona con la conductividad iónica, esto se ha reportado anteriormente para muestras de quitosano puro<sup>Error! Marcador no definido.</sup> y un grupo amplio de polisacáridos<sup>Error! Marcador no definido.</sup>. Como se expuso anteriormente, esta relación aparece debido al reacomodo de los grupos radicales de la cadena polimérica y la migración de iones, la cual es responsable de las polarizaciones dieléctricas adicionales en sistemas no homogéneos eléctricamente y amorfos<sup>Error! Marcador no definido.</sup>. La relajación  $\sigma$  se observe en un intervalo de 70-150 °C en las películas medidas sin vacío y para las películas medidas en vacío o películas secas el intervalo fue un poco más amplio (25-150 °C). Adicionalmente esta relajación mostro un comportamiento tipo Arrhenius con energías de activación de entre 87 y 130 kJ/mol. Valores que corresponden a lo reportado anteriormente para quitosano y demás polisacáridos similares<sup>Error! Marcador no definido.</sup> 43.

La figura 21 muestra la relación de la temperatura de Vogel versus la relación H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/CS. La temperatura de Vogel  $T_0$ , es la temperatura de activación aparente de la relajación  $\alpha$  en muchos polímeros, usualmente se relaciona con un valor de 50 a 70°K menor a la temperatura de transición vítrea<sup>Error! Marcador no definido.</sup> que a su vez se encuentra relacionada con la absorción de humedad y por tanto al efecto plastificante de los mismos.

En el caso de los nanocompuestos obtenidos se observó que la temperatura Vogel disminuye cuando disminuye el contenido de humedad (Fig.17 y Fig 21), aunque este comportamiento se podría catalogar como “anormal”, es importante notar que la asociación de nanopartículas con macromoléculas (polisacáridos), producen una red intercomunicada por enlaces particulares de

regiones específicas tanto de la partícula como de la matriz, lo que produce una pérdida de estabilidad en el polímero y por tanto alteraciones en las propiedades del material <sup>6</sup>



**Figura 21.** Temperatura de Vogel obtenida para los materiales sintetizados.

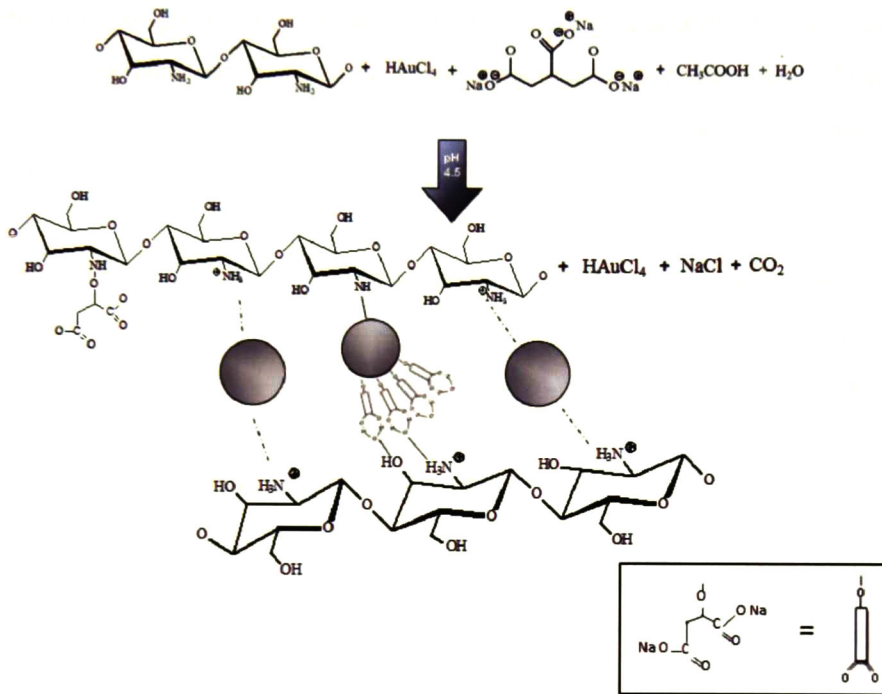
Los compósitos sintetizados con mayor cantidad de citrato de sodio, presentan más productos de reacción, los cuales producen enlaces de hidrogeno con el grupo amino del quitosano, aumentando el efecto plastificante del material. De la misma forma, las muestras sintetizadas con menor cantidad de Citrato presentan interacciones electrostáticas débiles entre la superficie de la nanopartícula polarizada y el quitosano directamente. Adicionalmente el exceso de ácido cloroáurico puede ser el responsable de un comportamiento anormal en la temperatura de Vogel, ya que existirán más sitios de nucleación y estos poseerán interacciones débiles con las moléculas de agua debido a la naturaleza electrostática de la nanopartícula, actuando como plastificador ¡Error! Marcador no definido.

La síntesis de nanopartículas de oro usando un medio citrato de sodio y quitosano de forma conjunta es un proceso relativamente sencillo en la práctica, sin embargo, estos dos componentes se ionizan en medio acuoso ácido produciendo una serie de interacciones electrostáticas complejas entre el ácido clorourico, el citrato de sodio y el quitosano al mismo tiempo. El nanocompuesto obtenido tendrá diferentes tipos de enlaces:

Nanopartícula- Quitosano

Nanopartícula- Citrato de sodio (producto de reacción)

Basandonos en estos resultados se propone la siguiente reaccion entre el CS,  $\text{HAuCl}_4$ , citrato de sodio y acido acetico:



**Figura 22.** Estructura propuesta en base a las posibles interacciones entre la nanopartícula, el citrato de sodio, el quitosano y el ácido acético involucrados en la reacción.

Debido a esto, los nanocompuestos preparados con diferente relación de citrato a pesar de contener la misma cantidad de quitosano y ácido cloroáurico, presentaron variaciones en la conductividad iónica, debido a que, al disminuir la cantidad de citrato, aumenta la concentración de ácido cloroáurico y por tanto la concentración de iones. Como resultado aumenta la conductividad del polímero y el efecto plastificante del ácido cloroáurico en el material aumenta<sup>62</sup>. Para las muestras mayores a 1 el quitosano juega el papel de reductor por medio de los grupos amino libres, permitiendo la formación de partículas y como se expuso anteriormente, la cantidad de quitosano empleada fue la misma para todos los materiales, por lo que se observa un efecto de saturación, para el tamaño de partícula (Fig.16), Conductividad (Fig.18), Absorción de agua (Fig.17) y temperatura de Vogel (Fig.21)

Es importante resaltar que la variación de citrato de sodio en la reacción, afecta directamente el contenido de humedad, la conductividad y las relajaciones térmicas del material. Los productos de reacción puede forman enlaces de hidrogeno con la matriz del material uniendo el grupo OH del quitosano y su grupo carboxilato (ver la estructura propuesta)<sup>63</sup>. Por otra parte, las películas sintetizadas con bajas concentraciones de citrato presentaran interacciones electrostáticas débiles distribuidas por toda la superficie de la nanopartícula, la cual se encuentra polarizada y unida directamente a los grupos  $\text{NH}_2$  del quitosano

El exceso de  $\text{HAuCl}_4$  presente en los materiales fue reducido por acción del quitosano, y aunque es bien conocido que este polisacárido tiene la facultad de reducir esta sal de oro, aun no se conocen con claridad los detalles de esta reacción, sin embargo, lo más probable es que los grupos OH actúen en la reacción formando sitios de nucleación y posteriormente nanopartículas metálicas. Lo que sí es un hecho es que el sitio de unión entre la nanopartícula de oro cargada superficialmente y el quitosano es el grupo amino y que estas uniones se dan por fuerzas electrostáticas<sup>64</sup>: Para este grupo de materiales no se observó con claridad esta interacción debido a que la concentración de ácido cloroáurico usada fue muy baja, sin embargo este efecto se observará en los capítulos siguientes para mayor entendimiento.

#### 4.5. Conclusiones

Se logó obtener nanocompósitos de oro- quitosano por medio del proceso de reducción química usando con cantidades decrecientes de citrato de sodio, como reductor.

Por sus propiedades químicas, el quitosano actuó como agente reductor y estabilizante, permitiendo la formación de partículas con menor tamaño, en los compósitos con pocas cantidades de CS.

A partir del material con relación 1  $\text{HAuCl}_4$ /CS, se observó un efecto de saturación producido por el  $\text{HAuCl}_4$ , al cual se le atribuye la variación en la conductividad, temperatura de Vogel y

absorción de agua. De la misma forma, estos efectos se correlacionan con la decreciente concentración de citrato de sodio en la reacción, por lo que, es necesario profundizar en el tema y de esta manera definir con mayor claridad las atribuciones de cada componente en la síntesis.

## CAPITULO 5

### 5. Resultados y Discusión para materiales del grupo 2

#### 5.1. Síntesis de Nanocompósitos

En el capítulo 4, se estudiaron las características propias de nanocompósitos a base de quitosano sintetizados variando la cantidad de citrato de sodio, estos materiales presentaron dependencias poco convencionales que fueron atribuidas a el exceso de  $\text{HAuCl}_4$  y CS, por esta razón en el presente capítulo se discutirán los resultados y dependencias que se obtuvieron para materiales desarrollados empleando el método de Turkevich a partir de diferentes concentraciones milimolares de ácido cloroáurico, todos los detalles de la reacción se presentaron en el capítulo 2: materiales y métodos.

En la tabla 3 se puede observar una serie de 8 compósitos representativos para este grupo de materiales, cabe aclarar que para todos se mantuvo una relación molar de 1:2 entre el ácido cloroáurico y el citrato de sodio debido a que como se comentó en el capítulo anterior, al incrementar la concentración de CS el pH de la reacción aumenta y el quitosano presente en el medio tiende a precipitarse.

**Tabla 3. Nanocompósitos sintetizados variando la concentración de ácido cloroáurico**

$\text{HAuCl}_4(\text{mM})$	$\text{HAuCl}_4$ ( mg/ml)	CS ( $\mu\text{L}$ )	2% CS (mL)
<b>0.02</b>	6.79	30.886	2
<b>0.06</b>	21.75	98.857	2
<b>0.1</b>	33.98	154.464	2
<b>0.2</b>	67.96	285.586	2
<b>0.4</b>	135.92	659.046	2
<b>0.6</b>	203.87	922.665	2
<b>0.8</b>	292.22	1318.09	2
<b>1</b>	363.57	2141.90	2

\*Para todas las reacciones se utilizaron 6 ml de  $\text{HAuCl}_4$ , 2 ml de CS 2% p/p y la cantidad en citrato de sodio en el correspondiente para obtener la relación molar de 1:2 respectivamente.

## 5.2. Espectroscopía de Infrarrojo

La figura 23 compara el espectro de infrarrojo obtenido para quitosano puro con los materiales sintetizados a diferentes concentraciones de ácido cloroáurico. Inicialmente se observa que todas las muestras presentan las bandas características del quitosano (tabla 2). A los a los  $3300\text{ cm}^{-1}$  se delimita una banda que corresponde a un estiramiento simétrico de los grupos  $-\text{OH}$ , seguida de la banda asociada a un estiramiento simétrico del grupo metilo ubicada a los  $2880\text{ cm}^{-1}$ . La banda presente a los  $1640\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un estiramiento antisimétrico del grupo  $\text{C}=\text{O}$  presente en las amidas primarias, la banda a los  $1550\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la deformación antisimétrica del grupo  $\text{NH}_3^+$ . La banda a los  $1410\text{ cm}^{-1}$  se produce por estiramiento de los grupos  $\text{C}-\text{H}$ , a los  $1025\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que corresponde a estiramientos del enlace glicosídico ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ )<sup>58</sup>.

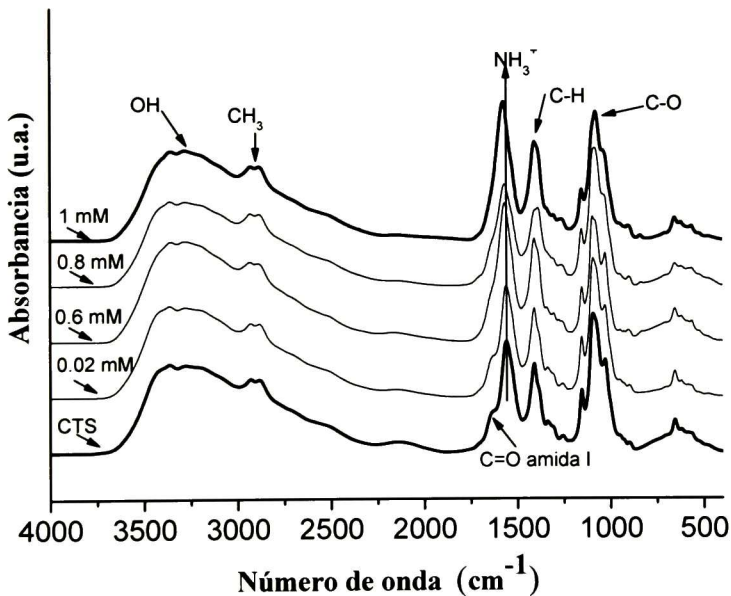


Figura 23. Espectro de infrarrojo de quitosano (CS) y compósitos sintetizados variando las concentraciones de  $\text{HAuCl}_4$

Aunque los espectros son bastante similares para los grupos de materiales 1 y 2, es importante resaltar que para los compósitos sintetizados en el grupo 2 se observaron diferencias

significativas entre el quitosano puro y las demás muestras. Al incrementar la concentración de sal de oro en los nanocompuestos, la intensidad del hombro presente a los  $1650\text{ cm}^{-1}$  decrece proporcionalmente hasta casi desaparecer para las muestras sintetizadas al  $1\text{ mM}$  (Fig. 24), esta vibración se relaciona con el estiramiento antisimétrico del grupo  $\text{C}=\text{O}$  y a su vez con la amida I presente en las unidades acetiladas del quitosano que se encuentran enlazadas de forma paralela con otra cadena principal del polímero<sup>65</sup>. La segunda variación se observó en la banda asociada a las vibraciones  $\text{N-H}$  del grupo  $\text{NH}_3^+$  ubicado a los  $1550\text{ cm}^{-1}$ , como se muestra en la figura 24, con el aumento de la molaridad se produjo un corrimiento de dicha banda y un cambio en el ancho de la misma.

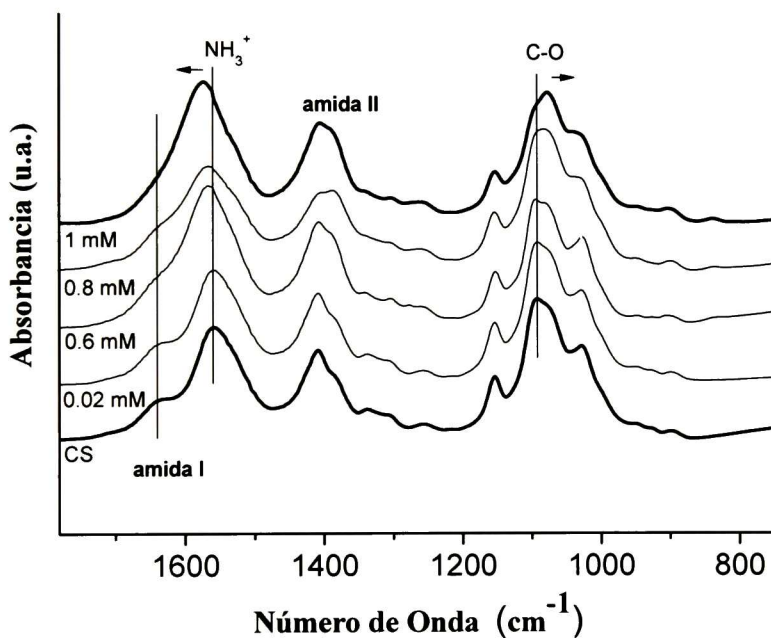


Figura 24. Ampliación del espectro de infrarrojo para los materiales del grupo 2

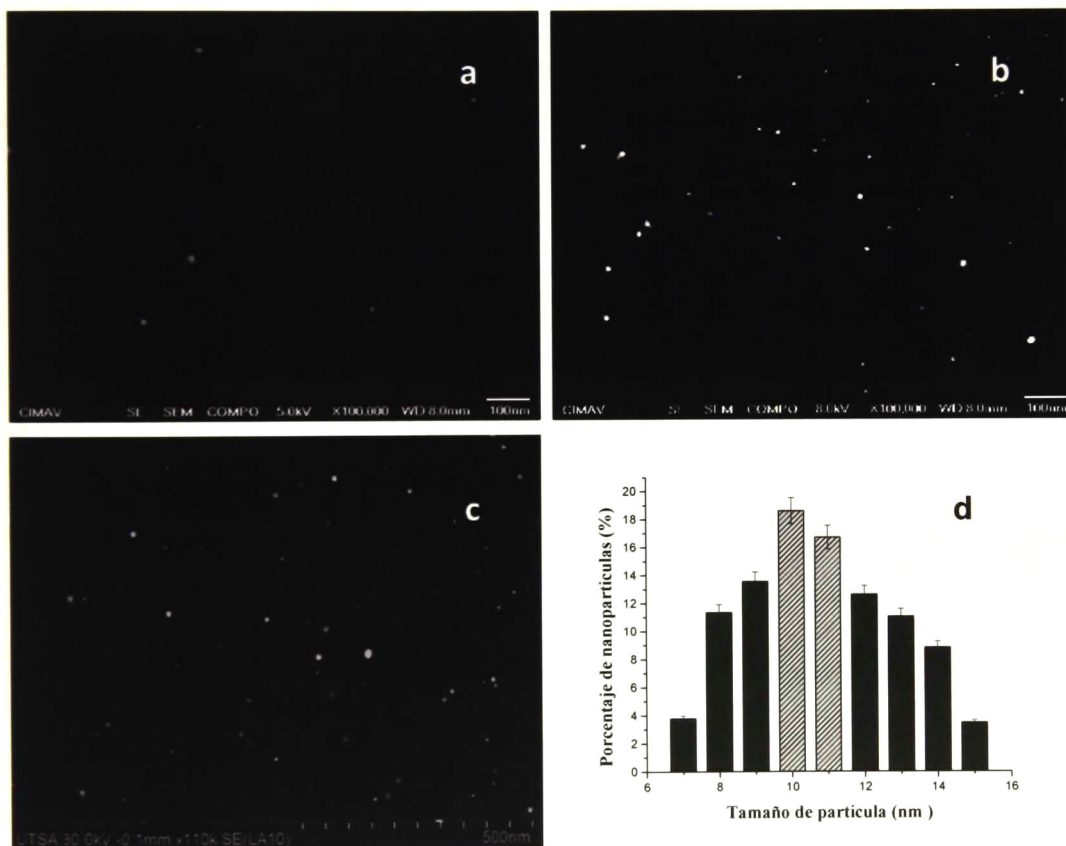
Así mismo, se observó un corrimiento de la banda ubicada a los  $1080\text{ cm}^{-1}$  a longitudes de onda menores, lo cual se relaciona con vibraciones de  $\text{C-O}$  del enlace glicosídico, otra variación en el ancho de banda se pudo ver a los  $1420\text{ cm}^{-1}$ , generalmente asociado con vibraciones de  $\text{C-H}$  en el grupo de amida II. Estas contribuciones indican que, puede haber una interacción entre la superficie de las nanopartículas y los grupos amino del quitosano, aunque no se puede despreciar



la contribución que proporcionan los productos del citrato y el acetato provenientes de la reacción y que se observan específicamente en las regiones afectadas por los grupos carbonilos<sup>57</sup>.

### 5.3. Análisis morfológico

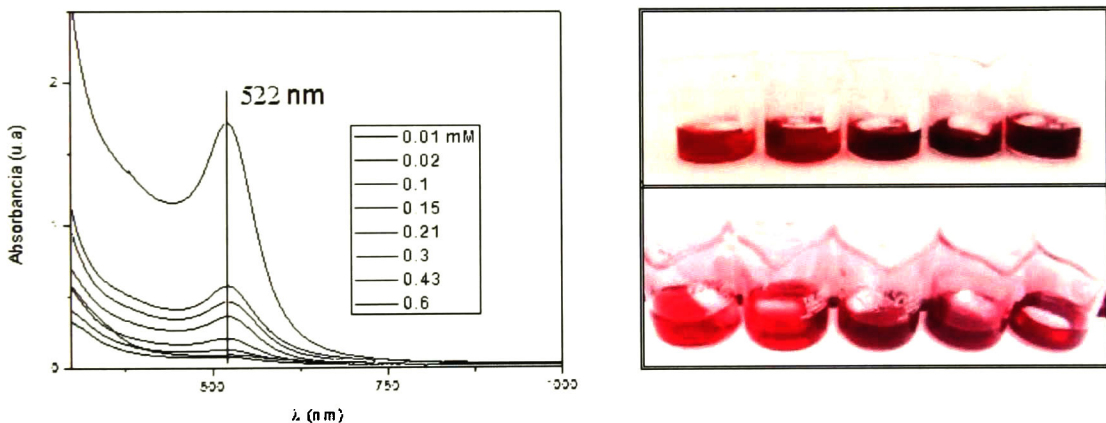
Las micrografías de SEM mostraron que las nanopartículas embebidas en la matriz de quitosano se encuentran distribuidas homogéneamente como se observa en la figura 25. De la misma forma, se puede notar, que la concentración de nanopartículas en la película es proporcional a la molaridad de ácido cloroáurico respectivamente, lo que implica que para estos compósitos hubo una reducción completa de la sal precursora.



**Figura 25.** Micrografías de SEM obtenidas para materiales con concentraciones de a) 0.06 mM y b) 1 mM de  $\text{HAuCl}_4$  (después del punto de percolación). c). Micrografía de TEM para la concentración 0.3 mM; las nanopartículas de oro se diferencian por los puntos blancos. d) histograma de distribución de tamaño de partícula obtenido del análisis de micrografías de TEM.

El análisis de tamaño de partícula se realizó usando la misma metodología aplicada a los materiales del grupo 1, por medio del software AutoCAD 2007, se determinó la dimensión de las partículas empleando, mínimo tres micrografías de diferentes áreas para cada material. El promedio de tamaño de partícula fue de 10 nm, como se observa en el histograma de distribución de tamaño de partícula (fig.25d) un 60% de las partículas analizadas se encuentran entre 9 y 12 nm.

En la figura 26a se muestran los espectros de UV-Vis realizados para los nanocompuestos obtenidos, todos los materiales presentaron un plasmón de resonancia con valores máximos de absorción entre 516 y 522 nm, de la misma forma, se observó que la intensidad de la banda de absorción aumenta en función a la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  (Fig 26b)... De acuerdo con lo reportado en la literatura, los valores de absorción obtenidos, se relacionan con intervalos de tamaño de 9 a 15 nm, por lo que, se pudo determinar que los tamaños de partícula obtenidos por el análisis, son congruentes con los picos máximos de absorbancia<sup>66</sup>.



**Figura 26. a) Espectroscopia de UV-Vis, b) fotografía de soluciones de nanopartículas de oro con concentraciones crecientes de precursor**

#### 5.4. Mediciones térmicas

El contenido de agua libre en cada película fue determinado en base a un análisis termogravimétrico, teniendo en cuenta que la pérdida de peso a los 120° C se relaciona directamente con la evaporación de agua, se obtuvo una tendencia inversamente proporcional de la humedad en relación a la concentración de nanopartículas, como se observa en la figura 27 a mayor concentración de ácido cloroáurico en la reacción, se obtuvo menor porcentaje de pérdida de peso.

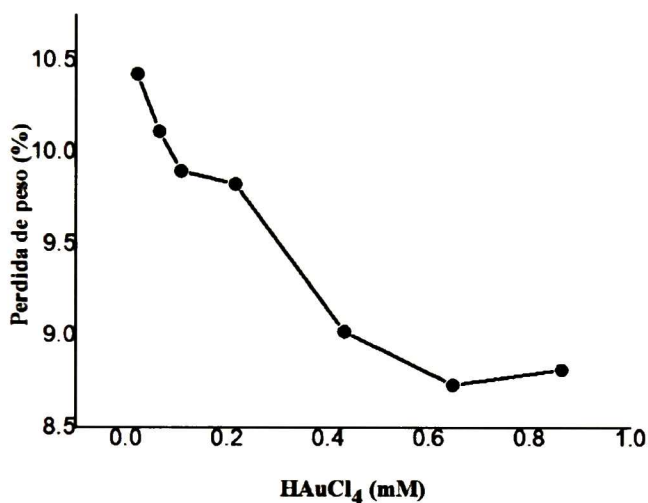
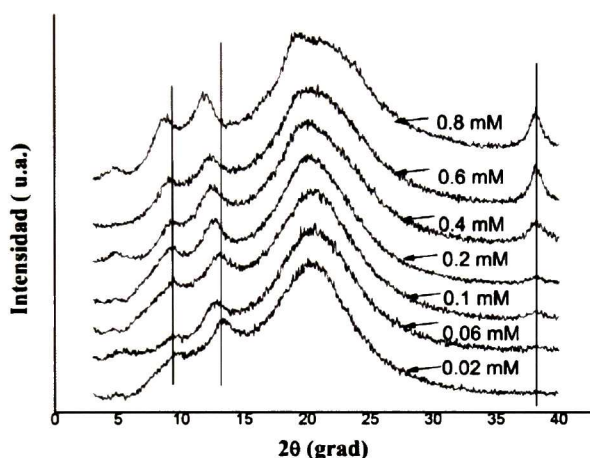


Figura 27. Análisis de porcentaje de humedad para materiales del grupo 2

Es bien conocido que, como producto de la reacción entre el citrato de sodio y el ácido cloroáurico se obtienen ácidos carboxílicos, que permiten recubrir la nanopartícula y eliminar efectos de aglomeración<sup>67,68,69</sup> lo que implica que las fuertes interacciones entre el quitosano y los productos de reacción del citrato, así como el quitosano y las nanopartículas, limitan la formación de enlaces con moléculas de agua que puedan existir en el ambiente, impidiendo la formación de enlaces de hidrogeno.

### 5.5. Difracción de rayos X (XRD)

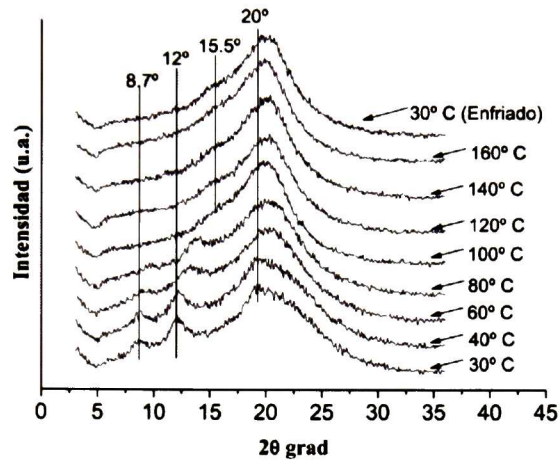
Con el fin de corroborar la presencia de oro en los nanocompuestos, se realizó difracción de rayos X a cada material, todos los espectros mostraron picos de difracción alrededor de  $2\theta = 8.7^\circ$ ,  $12^\circ$ ,  $20^\circ$  y  $38.18^\circ$ , particularmente, para la muestra con mayor concentración de  $\text{HAuCl}_4$  se observó la aparición de otro pico cerca de los  $21.8^\circ$ . Como lo muestra la figura 28 al incrementar la concentración de ácido cloroáurico, se presentó un aumento gradual en la intensidad del pico ubicado a los  $38.18^\circ$  característico de la reflexión del oro, de la misma forma, los planos de difracción a los  $8.7^\circ$  y  $12^\circ$  tuvieron un corrimiento a valores de  $2\theta$  menores.



**Figura 28.** Espectro de rayos X realizado a películas obtenidas con diferente concentración milimolar de  $\text{HAuCl}_4$ .

Varios autores han descrito que, los picos de difracción ubicados alrededor de  $8.7^\circ$ ,  $12^\circ$  y  $21.8^\circ$  han sido relacionados con la forma hidratada del quitosano (quitosano tipo I), mientras que una reflexión alrededor de los  $20^\circ$  se asocia a una combinación de la fase cristalina y amorfa simultáneamente o quitosano tipo II<sup>70, 71, 72, 73</sup>. A simple vista los resultados sugieren que el incremento de la concentración de nanopartículas en el material, afecta la estructura convencional del quitosano, promoviendo la interacción de la matriz y las moléculas de agua, modificando las distancias interplanares, esto se reconfirma con los resultados obtenidos para el porcentaje de humedad (Fig 27). Sin embargo, con el fin de entender con mayor profundidad la estructura del quitosano en estado sólido y su interacción con las nanopartículas de oro con el agua, se realizaron difractogramas de rayos X a una muestra sintetizada con 0.2 mM de ácido

cloroáurico, calentando la película desde temperatura ambiente hasta 160° C como se observa en la figura 29.



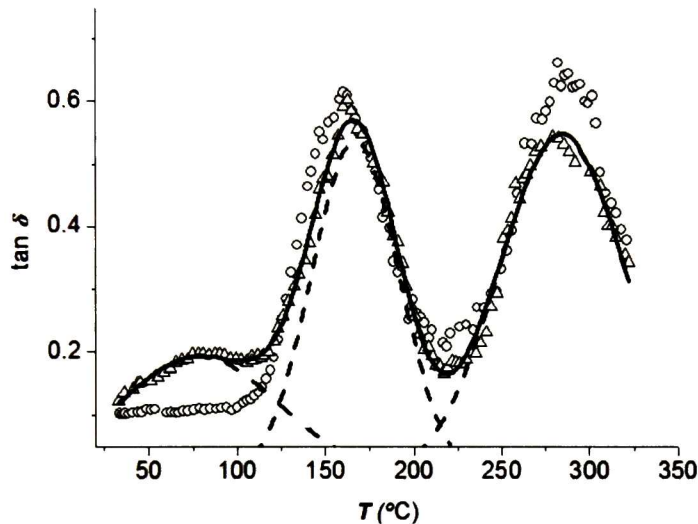
**Figura 29.** Patrón de difracción de rayos X obtenido para una película de 0.2 mM de ácido cloroáurico con incremento gradual de temperatura.

Los patrones de difracción obtenidos para el nanocompuesto de 0.2 mM de  $\text{HAuCl}_4$  mostraron que al incrementar la temperatura los planos relacionados con la forma hidratada del quitosano ( $2\theta = 8.6^\circ$  y  $12^\circ$ ) presentaron un corrimiento a valores de  $2\theta$  mayores, y desaparecieron cerca de los  $100^\circ\text{C}$ , así como, el pico a los  $2\theta = 21.8^\circ$ . Adicionalmente entre los 100 y  $120^\circ\text{C}$  comienza a aparecer un plano ubicado a los  $2\theta = 15.5^\circ$ , el cual corresponde a la forma deshidratada o seca del quitosano<sup>70,71</sup>. Después del calentamiento se dejó enfriar la muestra hasta llegar a temperatura ambiente ( $30^\circ\text{C}$ ) y se observó que en estas condiciones el compuesto mantiene la forma deshidratada con un contenido de agua cercano a 0.2 % peso.

### 5.6. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Como se ha expuesto anteriormente, el contenido de humedad de los nanocompuestos, es un parámetro sumamente relevante, el cual puede afectar de forma crítica las propiedades de los mismos y por tanto los mecanismos de conducción, por esta razón se realizaron análisis de DMA con el fin de esclarecer el panorama en cuanto al efecto del agua en los procesos de relajación,

para esto se midieron todas las películas con y sin previo calentamiento a 120°C. Como lo muestra la figura 30 se graficó la  $\tan \delta$  versus la temperatura para un compuesto sintetizado a 0.2 mM de ácido cloroáurico, el contenido de humedad para la muestra sin precalentamiento fue de 9.8%, y para la muestra con precalentamiento fue de 0.2 % en peso. Las mediciones arrojaron tres picos de la  $\tan \delta$ , para las muestras con mayor humedad, sin embargo para las mismas muestras con baja humedad se observó una desaparición del primer pico.



**Figura 30.**  $\tan \delta$  versus temperatura, la medición se hizo en una película obtenida con 0.2 mM de  $\text{HAuCl}_4$ , durante el primer barrido el material contenía 9.8 % de humedad (triángulos abiertos), el segundo barrido se realizó con un precalentamiento de la muestra con un porcentaje de humedad de 0.2% peso (círculos abiertos) la línea continua presenta los resultados del ajuste y la línea segmentada presenta los picos obtenidos del ajuste..

Los nanocompuestos con diferentes concentraciones fueron analizados de la misma manera que la película a 0.2.mM. La figura 31a muestra la dependencia obtenida para este grupo de materiales sin calentamiento previo (contenido de humedad de 9.8% en peso), el primer pico mostro una relación clara con la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  en cada material, mientras que el segundo pico ubicado a los 165°C y tercer a los 285°C, no presentaron una tendencia clara. Al retirar el exceso de humedad de las muestras por calentamiento previo (contenido de humedad de 0.2% peso) se observó la desaparición del primer pico (Fig. 30), lo que corrobora que el contenido de agua en las muestras altera la estructura del material.

Es importante recordar que en quitosano puro y compósitos de quitosano con nanopartículas de plata también presenta picos a 75°C y 165°C, además el pico a los 165°C se ha relacionado con

la temperatura de transición vítrea de estos materiales y el pico a los 285°C se asocia con la relajación  $\sigma$  ;Error! Marcador no definido., 28

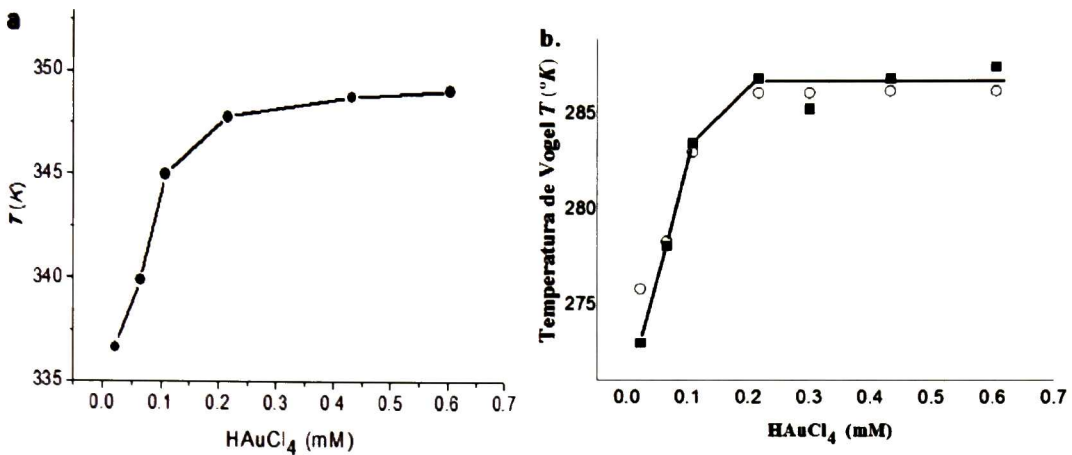
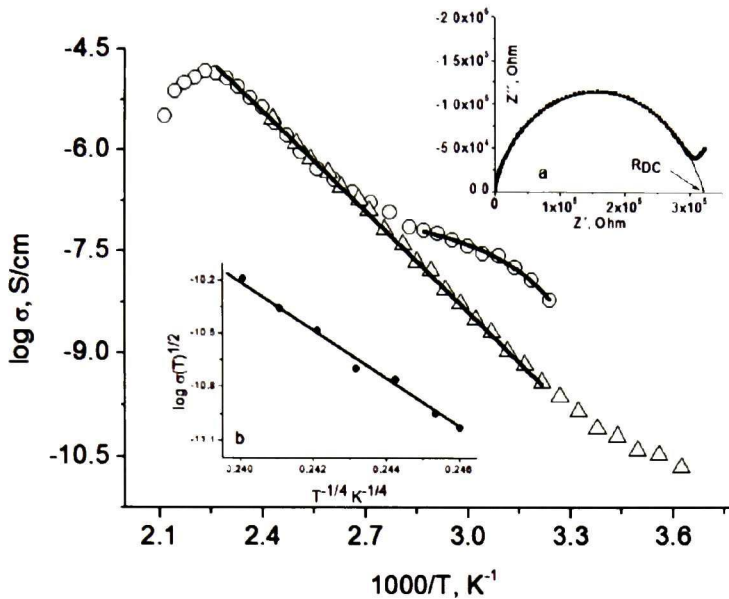


Figura 31.a) posición del primer pico obtenido en mediciones de DMA para nanocomposites a diferente concentración de ácido cloroáurico b) temperatura de Vogel calculada a partir de las mediciones de conductividad (círculos abiertos) mediciones dieléctricas (cuadrados negros).

Debido a que es difícil concluir la naturaleza de los procesos de relajación observados por la técnica de DMA, se llevaron a cabo mediciones de espectroscopia dieléctrica en los nanocompositos.

### 5.7. Mediciones de conductividad

La figura 32 muestra la dependencia de la conductividad eléctrica en corriente directa en función de la temperatura para una muestra con 0.3 mM de  $\text{HAuCl}_4$  antes y después del precalentamiento, es decir con 9.5% y 0.2% en peso de agua respectivamente. La conductividad fue calculada usando la ecuación  $\sigma_{DC} = d/(R_{DC} \times S)$  explicada en los capítulos anteriores, y el valor de la resistencia empleado fue determinado por medio del ajuste al semicírculo obtenido en impedancia eléctrica y basado en el modelo de Cole-cole con resistencia en paralelo. Como se observa en la figura se obtiene la  $R_{DC}$  a partir del ajuste realizado cuando se presenta una intersección entre los ejes de la parte real e imaginaria = 0 (o en el límite  $f \rightarrow 0$ )<sup>74</sup>.



**Figura 32.** Conductividad en corriente directa *versus* el inverso de la temperatura para una película de sintetizada con una concentración de 0.3mM de HAuCl<sub>4</sub>. Los círculos abiertos corresponden a la dependencia de la conductividad para la película sin precalentamiento (9.5% de humedad) y los triángulos abiertos delimitan el comportamiento de la conductividad para la misma película pero con un precalentamiento (0.2% de humedad). a) Modelo de Cole-Cole con resistencia en paralelo usado para obtener el valor de la resistencia en corriente directa  $R_{DC}$  b) dependencia de  $\log \sigma (T)^{1/2}$  vs  $T^{-1/4}$

En primer lugar es importante resaltar que en general cada nanocompuesto mostro 4 diferentes comportamientos, todos en función de la temperatura

- 1) Para las muestras que fueron medidas directamente se observó un comportamiento no lineal en el intervalo de temperatura entre los 25 y 70°C, el cual puede ser descrito por la relación de Vogel–Fulcher–Tammann (VFT)  $\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{DT_0}{T-T_0}\right)$  donde  $\sigma_0$  es un factor pre-exponencial,  $D$  es una constate del material y  $T_0$  es a lo que se le conoce como la temperatura de Vogel. Este comportamiento se relaciona con la relajación  $\alpha$  y como se verá posteriormente con el contenido de agua libre presente en el material
- 2) Una dependencia lineal tipo Arrhenius  $\sigma = \sigma_0 \exp\left(-\frac{E_{a\sigma}}{RT}\right)$  y relacionada con la relajación  $\sigma$  del material, la cual fue observada en el intervalo de temperatura comprendido de 70 a 150°C para materiales sin precalentamiento y de 33 a 150°C para los compósitos



sometidos a precalentamiento. Sin embargo los dos tipos de muestras presentaron la misma energía de activación de 103.2 kJ/mol, lo que implica que esta contribución es dependiente del número de portadores de carga.

- 3) Una pendiente negativa, observada en las muestras con y sin precalentamiento a los 160°C que corresponde al inicio de la degradación del material
- 4) Una dependencia no lineal para películas con precalentamiento presente en el intervalo de temperatura de 0 a 33°C.

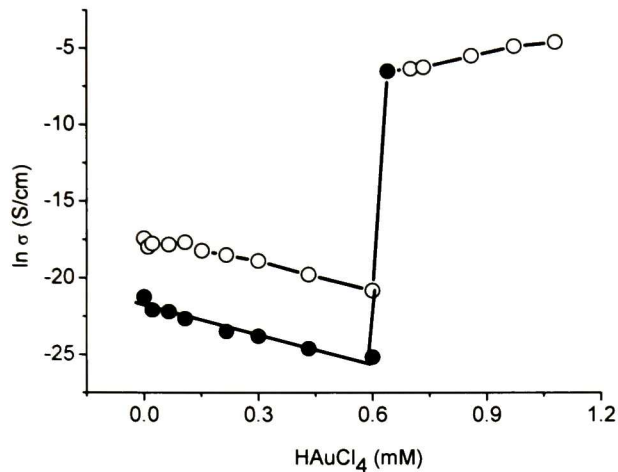
Para las muestras con menor contenido de humedad (0.2% peso de acuerdo a las mediciones de TGA realizadas previamente) se observó la desaparición de la dependencia no lineal, dando lugar en su mayoría a un comportamiento tipo Arrhenius que inicio desde los 33°C y continuo hasta el punto de inicio de la degradación.

Adicionalmente, en todas películas secas ubicadas por debajo del umbral de percolación en el intervalo de temperatura de 0 a 33°C, se observó que la conductividad presento una dependencia no lineal. Este comportamiento no lineal se ha observado en muchos polímeros y puede ser explicado por el modelo del salto de rango de la variable (VRH) propuesto por Mott<sup>75,76</sup>. De acuerdo con este modelo la dependencia de la conductividad en función de la temperatura puede escribirse de la siguiente forma:

$$\sigma_{dc}(T) = \sigma_0 \exp\left[-\left(\frac{T_0}{T}\right)^\gamma\right]$$

Donde  $\sigma_0$  se considera como el valor del límite de la conductividad a una temperatura infinita y  $\sigma_0 \sim 1/T^{1/2}$ ,  $T_0$  depende de la localización y densidad de los estados y el exponente  $\gamma$  se relaciona con la dimensionalidad  $d$  de proceso en la vía de transporte a partir de la ecuación  $\gamma = 1/(1 + d)$ , donde  $d = 1, 2, 3$ . La aplicabilidad del modelo de VRH fue examinada graficando los resultados experimentales en la forma  $\ln \sigma(T)^{1/2}$  vs  $T^\gamma$ . Se propone que los materiales CS/AuNp's demuestran características tridimensionales y su comportamiento de transporte descrito por la expresión  $\ln \sigma(T)^{1/2}$  vs  $T^{1/4}$  puede ser lineal, como se observa en las mediciones experimentales<sup>77</sup>.

Todas las muestras presentaron un comportamiento similar. La figura 33 muestra la dependencia de la conductividad obtenida para las películas secas (círculos abiertos) y húmedas (círculos solidos negros) a temperatura ambiente con diferente concentración de  $\text{HAuCl}_4$ .



**Figura 33.** Dependencia de la conductividad para muestras del grupo 2, los círculos abiertos muestran la conductividad obtenida para muestras secas y los círculos negros muestran el mismo parámetro para películas a temperatura ambiente.

El valor de la conductividad disminuyó progresivamente para los nanocompuestos con concentraciones de 0 a 0.6 mM de ácido cloroáurico. La conductividad iónica de la película de quitosano puro puede relacionarse con la presencia de especies conductivas de los grupos  $\text{NH}_3^+$  y los iones  $\text{H}^+$ . de acuerdo a lo descrito en la literatura el número de iones  $\text{H}^+$  y grupos amino protonados disminuyen debido a la formación de enlaces con las nanopartículas y el citrato de sodio. El incremento en la concentración de la sal de oro y citrato de sodio, producen una disminución de la cantidad de iones y grupos amino protonados, por lo que disminuye el valor de la conductividad, como se observa en la figura 33. La conclusión anterior fue confirmada en los obtenidos para espectroscopia de infrarrojo, donde se observa, el corrimiento y deformaciones de la banda correspondiente a los grupos  $\text{NH}_3^+$ , atribuida a la interacción entre el grupo amino y la partícula metálica.

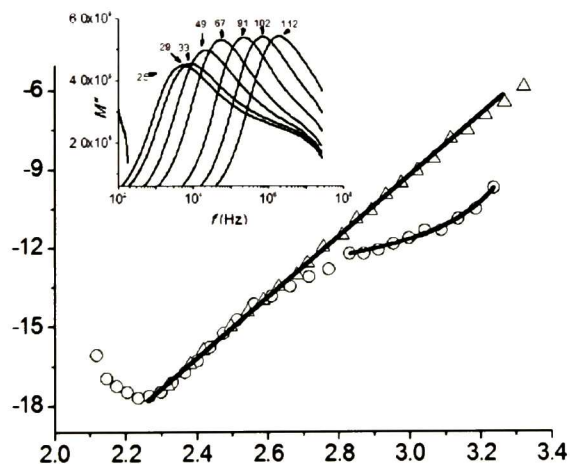
A una concentración de 0.6 mM de ácido cloroáurico se observó que la conductividad de las dos películas, tanto húmeda como seca mostraron un incremento abrupto en 6 órdenes de magnitud (desde  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  S/cm) correspondiente a un efecto de percolación. Sin embargo de acuerdo con

las micrografías realizadas por SEM y TEM (Fig. 25) no se observan conexiones físicas entre las nanopartículas de oro. Por esta razón, y de acuerdo a la reacción propuesta con previamente para películas con sales de  $\text{HAuCl}_4$  y  $\text{NaCl}$ , se propone que el efecto de percolación observado para este grupo de materiales está relacionado con la aparición de un camino conductivo entre las AuNp's y las sales.

### 5.8. Mediciones dieléctricas

Como se mencionó en el capítulo anterior (ver capítulo 4) para las mediciones correspondientes al proceso de relajación se empleó la expresión del módulo eléctrico, ya que, como se describió en el capítulo 2 el módulo eléctrico permite suprimir los efectos producidos por la polarización interfacial y las contribuciones de los contactos.

El cambio de la parte imaginaria del módulo eléctrico *versus* la frecuencia obtenida para el nanocompuesto sintetizado con 0.3 mM de  $\text{HAuCl}_4$  se muestra en la figura 34, donde se puede ver que en el intervalo de temperatura de 25 a 70°C los picos presentan menor amplitud que para los picos en el intervalo de temperatura de 70 a 150°C, de la misma forma se puede notar que al incrementar la temperatura se produce un corrimiento a intervalos de frecuencia mayores.

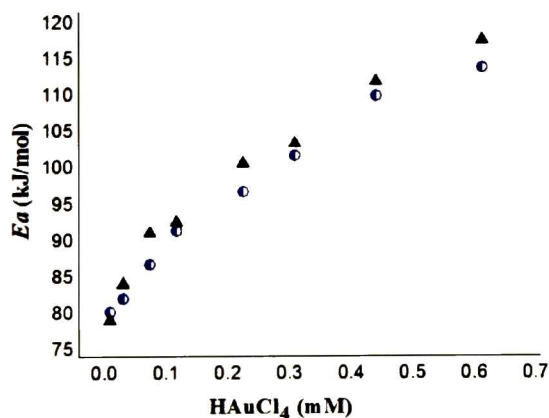


**Figura 34.** Dependencia del tiempo de relajación para un nanocompuesto a 0.3 mM de ácido cloroáurico. Los círculos abiertos corresponden a muestras sin precalentamiento mientras que los triángulos abiertos presentan el comportamiento de las muestras con tratamiento. La grafica insertada presenta el cambio de amplitud y corrimiento de los picos a diferentes temperaturas.

De la misma forma que para la conductividad se pueden observar tres dependencias diferentes en la película con precalentamiento a una humedad de 0.2%

- 1) Comportamiento no lineal en el intervalo de temperatura de 22 a 70°C, con picos de menos amplitud, los cuales describen una tendencia de Vogel-Fulcher- Tamman
- 2) Dependencia lineal tipo Arrhenius en el intervalo de temperatura de 70 a 150°C, la cual se observa desde los 22 a los 150°C para la misma muestra sometida previamente a precalentamiento con temperatura de activación de 102. 4 Kj/mol
- 3) A temperaturas cercanas a 160°C se observa una pendiente negativa que se identifica con el inicio del proceso de degradación<sup>78, 79</sup>.

Las mediciones de conductividad en películas secas presentaron una desaparición de la dependencia no lineal tipo VTF dando lugar a la aparición de una tendencia lineal que conservo la misma pendiente observada en las películas húmedas. En la figura 35 se muestra que la energía de activación calculada para las películas sintetizadas de 0 a 0.8 mM de HAuCl<sub>4</sub>, a partir del tiempo de relajación y las mediciones de conductividad arrojaron valores muy similares.



**Figura 35.** Energía de activación calculada para materiales del grupo 2. Los círculos muestran los valores obtenidos por medio de la medición de conductividad y los triángulos muestran los resultados de las mediciones dieléctricas

Así mismo se puede ver que la energía de activación fue directamente proporcional a la concentración de sal de oro empleada en la síntesis de cada material. Tanto las mediciones de conductividad como las dieléctricas en películas con bajos porcentajes de humedad (0.2%) mostraron una pendiente lineal constante con valores de 80 a 118 kJ/mol, sin embargo en el caso de las películas con humedad mayor la fracción lineal obtenida fue menor (70 a 160°C), lo que concuerda con reportes previos de quitosano y otros polisacáridos, en los que un comportamiento tipo Arrhenius se observa en materiales con baja humedad y son relacionados con procesos de relajación  $\sigma$ <sup>78,43</sup>. Dicha relajación se relaciona con los procesos de difusión local de iones entre altos potenciales de barrera en sistemas desordenados compuestos por fases conductoras y no conductoras.

La conductividad iónica de un polímero se relaciona con el número de iones conductivos presentes en el mismo, estos iones pueden excitarse por un proceso térmico que genera una cantidad de energía suficiente para que este ion se difunda de una posición a otra, a esta energía se le conoce como la energía de activación<sup>80</sup>.

Retomando los resultados obtenidos en las mediciones de DMA (Fig. 30) se observa claramente que el primer pico relacionado con la relajación  $\alpha$  se encuentra presente en muestras con mayor humedad, mientras que en películas con bajos porcentajes de agua este pico desaparece, lo que implica que esta relajación, es un proceso altamente dependiente del contenido de humedad presente en la muestra y por tanto la temperatura de transición vítrea calculada a partir del comportamiento no lineal tipo VFT, dependerá del contenido acuoso.

Por otra parte, el segundo pico obtenido se observó en los dos tipos de muestras y corresponde a la relajación  $\sigma$ , de la cual se calcularon los valores de la energía de activación, revelando que, esta relajación depende de la concentración de nanopartículas presentes en cada material<sup>78</sup>. Al comparar la temperatura de transición vítrea  $T_g$  obtenida en las mediciones de DMA (Fig. 31) con la temperatura de Vogel  $T_0$  obtenida de las mediciones de espectroscopia de impedancia eléctrica (fig. 31b), se puede obtener la siguiente relación:  $T_g = T_0 + 61.9 \pm 0.7$  K.

Los resultados obtenidos sugieren que la temperatura de transición vítrea está relacionada con el porcentaje de humedad del material y por tanto con el efecto plastificante que ejercen las moléculas de agua en los nanocompuestos. Esta conclusión se basa en los resultados obtenidos

por difracción de rayos X ya que como se presentó anteriormente cuando aumenta la cantidad de partículas metálicas en el compósito disminuye el porcentaje de humedad debido a las interacciones que generan las nanopartículas y se observa un corrimiento en los planos de difracción típicos del quitosano y por tanto un cambio en la distancia interplanar del mismo.

### 5.9. Conclusiones

Los nanocompósitos sintetizados a base de quitosano y citrato de sodio presentan enlaces de hidrogeno que a bajas concentraciones de ácido cloroáurico se encuentran mediados por los productos de reacción del CS, sin embargo, cuando la concentración de nanopartículas es mayor las interacciones de la matriz polimérica con moléculas de agua disminuyen debido a que las interacciones electrostáticas entre el quitosano y la nanopartícula aumentan bloqueando los grupos amino del CS.

Debido a que la relajación  $\alpha$  es dependiente al porcentaje de humedad, y a su vez, este parámetro es dependiente de la concentración de nanopartículas en el material, tanto esta relajación como la temperatura de Vogel y la temperatura de transición vítrea dependerán de la interacción del nanocompósito con las moléculas de agua libre presentes en el material, esta conclusión esta soportada tanto en las mediciones realizadas por DMA como en los estudios realizado por XRD.

La relajación  $\sigma$  mostro una dependencia tipo Arrhenius típica, con energías de activación entre 80 y 118 kJ/mol, la cual depende de la concentración de nanopartículas presente en el compósito, ya que al aumentar la cantidad de partículas en el material aumenta la energía de activación.

La aparición de un incremento de 6 órdenes de magnitud (de  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  S/cm) por encima de 0.6 mM de  $\text{HAuCl}_4$ , en la conductividad tanto para materiales humedos como secos, fue causado por el aumento de la concentracion de nanoparticulas en la matriz de quitosano y productos de reaccion . el efecto de percolacion observado para este grupo de materiales esta relacionado con la aparicion de una ruta de conduccion entre las nanoparticulas de oro y las sales presentes en el material

## CAPITULO 6

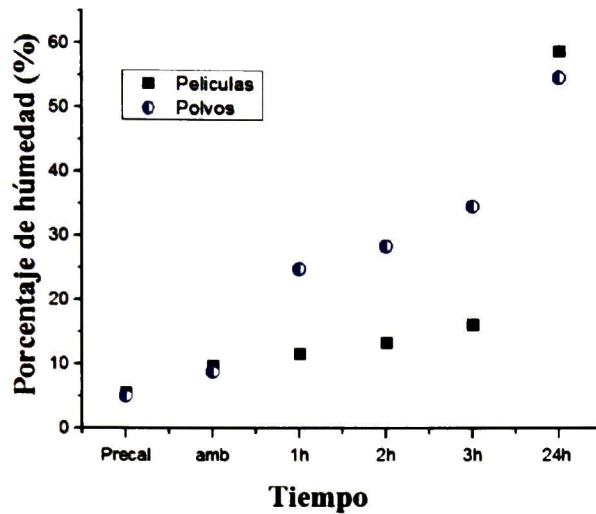
### 6. Análisis Estructural del Quitosano puro

Como se expuso en los capítulos anteriores tanto la conductividad como las relajaciones térmicas de los nanocompuestos sintetizados, son parámetros dominados, en primera instancia, por la interacción de la matriz con moléculas de agua o en otras palabras por el porcentaje de humedad, el cual será mayor o menor según la composición química que presente el material. En este orden de ideas, para comprender con mayor claridad los fenómenos que ocurren en los compósitos con nanopartículas de oro, es necesario conocer las modificaciones estructurales que se presentan en quitosano puro por acción del agua.

Con el fin de profundizar, aclarar y determinar la contribución específica de la humedad en las relajaciones térmicas del quitosano se realizaron algunos cálculos teóricos que permitieron obtener patrones de difracción de rayos X para muestras de quitosano con diferentes porcentajes de humedad, estos resultados fueron comparados con muestras hidratadas en cámara húmeda a diferentes tiempos (1, 2, 3 y 24 horas), adicionalmente se precalentó la muestra por 24 horas a 60 grados con el fin de obtener una estructura anhidra. Todas las muestras fueron medidas por análisis de rayos X y comparadas con los resultados teóricos.

#### 6.1. Análisis Termogravimétrico

Como se observa en la figura 36 tanto los polvos como las películas sometidas a cámara húmeda incrementaron la absorción de agua a través del tiempo. El polvo de CS presento mayor porcentaje de humedad a tiempos cortos (1, 2 y 3 horas), lo cual se puede atribuir a que al solubilizar el quitosano en ácido acético los grupos amino se encuentran enlazados con otras cadenas poliméricas, disminuyendo los sitios de unión de agua libre, sin embargo después de 24 horas de tratamiento los dos tipos de muestra se hidrataron en porcentajes cercanos a (56%  $\pm$  3).



**Figura 36.** Porcentaje de humedad de muestras de quitosano, cuadrados negros películas de quitosano sintetizadas por el método de evaporación de solvente, círculos rellenos a la mitad, polvo de quitosano, muestras sometidas en cámara húmeda a diferentes tiempos.

Estos resultados confirman que, la absorción de agua en el quitosano depende no solo del porcentaje de desacetilación, también depende de la organización estructural de la matriz del polisacárido y el tiempo de exposición a ambientes húmedos.

## 6.2. Difracción de rayos X

De la misma forma se realizaron mediciones de rayos x para todas las muestras, los difractogramas que se observan en la figura 37 presentan corrimientos específicamente de los planos  $hkl$  (200) y el (010) respectivamente. Las películas de quitosano mostraron como signo característico un corrimiento del plano (200) a valores mayores de  $2\theta$  ( $19.4^\circ$  a  $20.9^\circ$ ) manteniendo la misma posición para el plano (010), mientras que para las muestras en polvo el plano (010) tuvo un corrimiento a valores menores de  $2\theta$  ( $11.58^\circ$  a  $9.92^\circ$ ) en función de la humedad.



Estos resultados confirman que la estructura del quitosano en solución acida o sal, y el quitosano puro presenta variaciones relevantes y por tanto las moléculas de agua que interaccionan con cada muestra generan una expansión de la celda cristalina por el incremento de la distancia interplanar, lo cual se refleja claramente en los picos de difracción ubicados alrededor de  $8.7^\circ$ ,  $12^\circ$  y  $21.8^\circ$ , los cuales han sido relacionados con la forma hidratada del quitosano (quitosano tipo I), mientras que una reflexión alrededor de los  $20^\circ$  se asocia a una combinación de la fase cristalina y amorfa simultáneamente o quitosano tipo II.

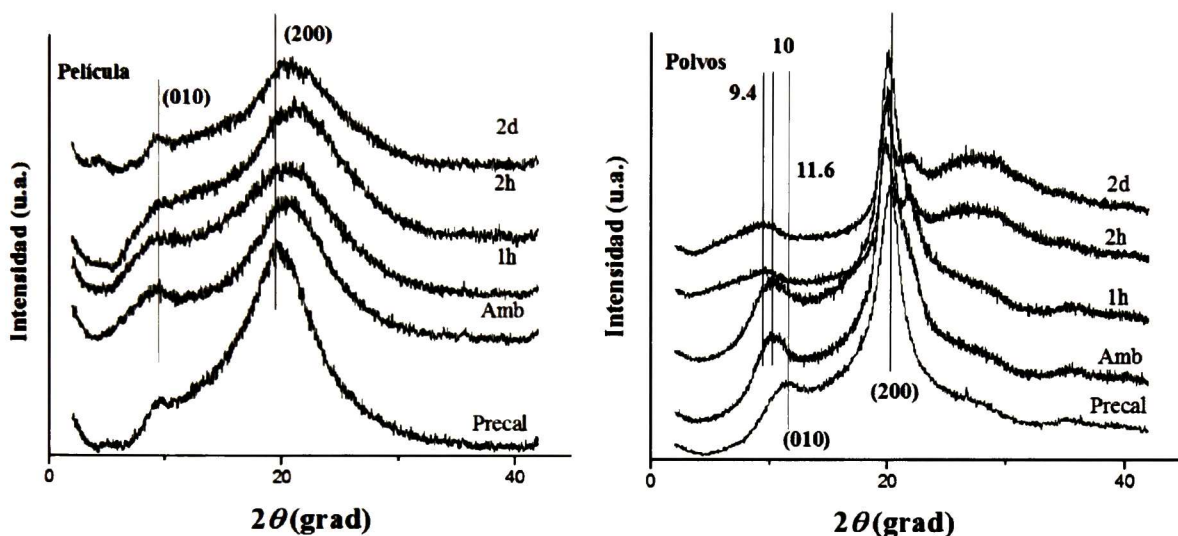


Figura 37. Análisis de difracción de rayos X realizados a películas de quitosano y polvo de quitosano hidratados a diferentes tiempos

### 6.3. Cálculos de estructura teóricos

Las aproximaciones estructurales a nivel teórico se desarrollaron teniendo en cuenta valores de 0, 5, 10 y 14 % de humedad partiendo de una celda unitaria con coordenadas asignadas en los planos a, b y c como se observa en la figura 38, a, define la distancia existente entre dos cadenas poliméricas principales cuando se encuentra de forma vertical o una sobre la otra, b, define la distancia entre dos cadenas teniendo en cuenta los radicales de forma horizontal o cuando se encuentran una a un lado de la otra y c define el largo de una cadena polimérica

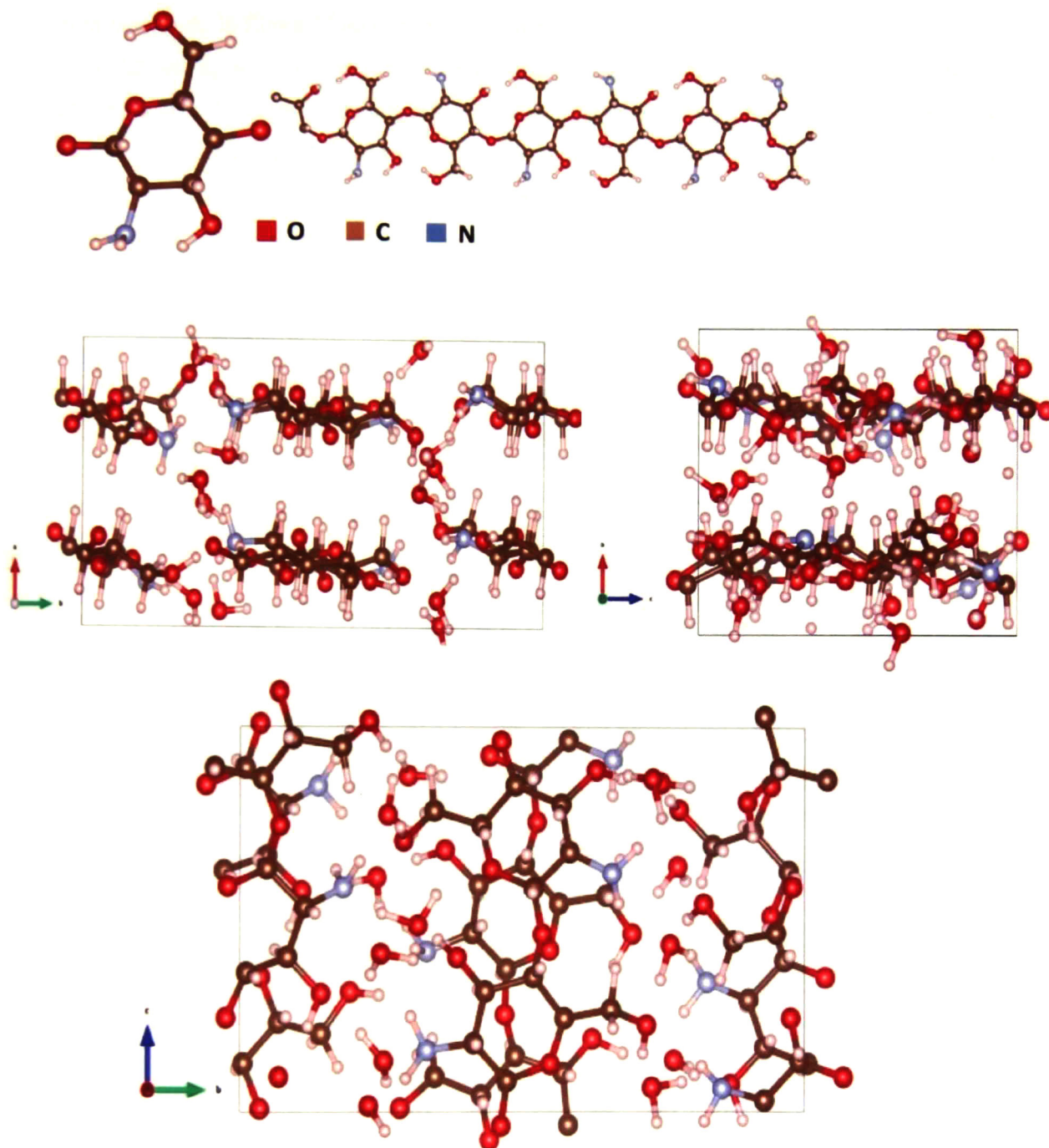


Figura 38. Estructura tridimensional de una molécula de quitosano, delimitación de planos a, .b y c

En la parte a de la figura 39 se observan los difractogramas calculados variando la cantidad de moléculas de agua en la estructura de quitosano, estos resultados muestran que todas las estructuras calculadas presentaron modificaciones en la intensidad o ubicación de los picos y por tanto en su patrón de difracción, principalmente en los planos (010), (020) y (200) ubicados a los  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $20^\circ$  de  $2\theta$ . La parte b de la figura muestra una serie de mediciones experimentales realizadas a una misma película de quitosano, la cual fue calentada de  $30$  hasta  $160^\circ\text{C}$ .

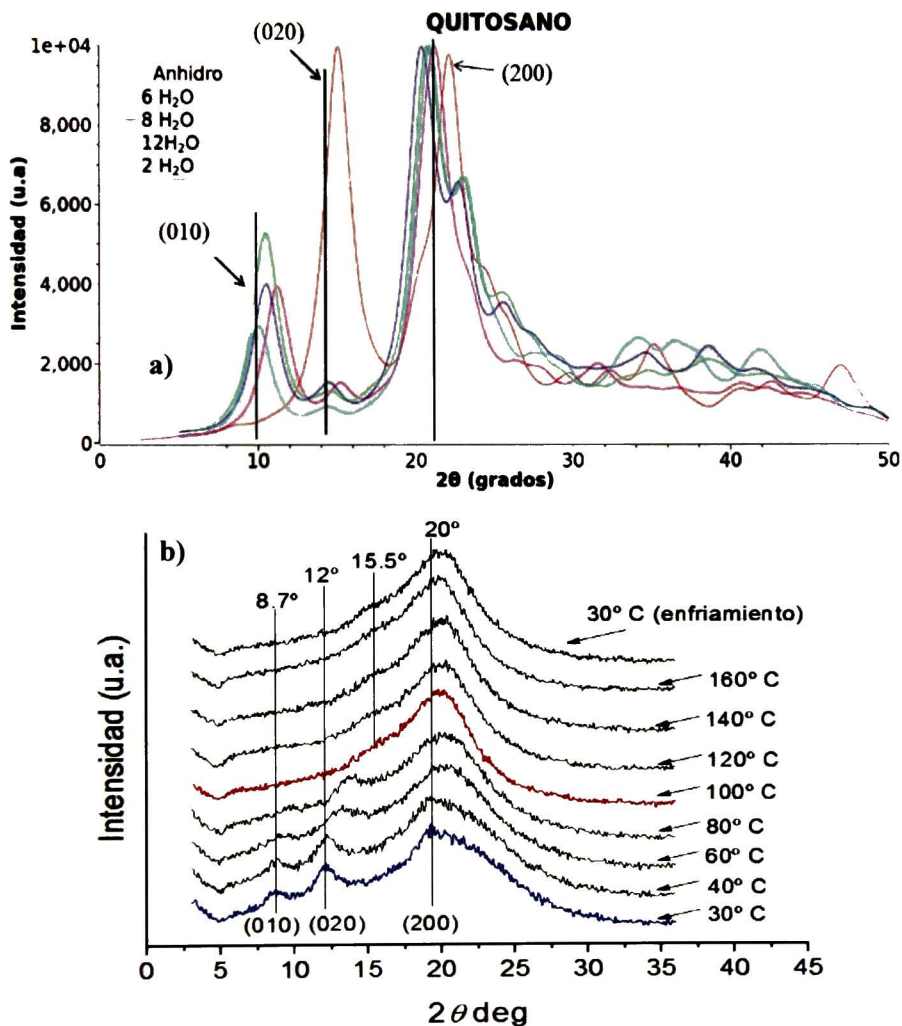
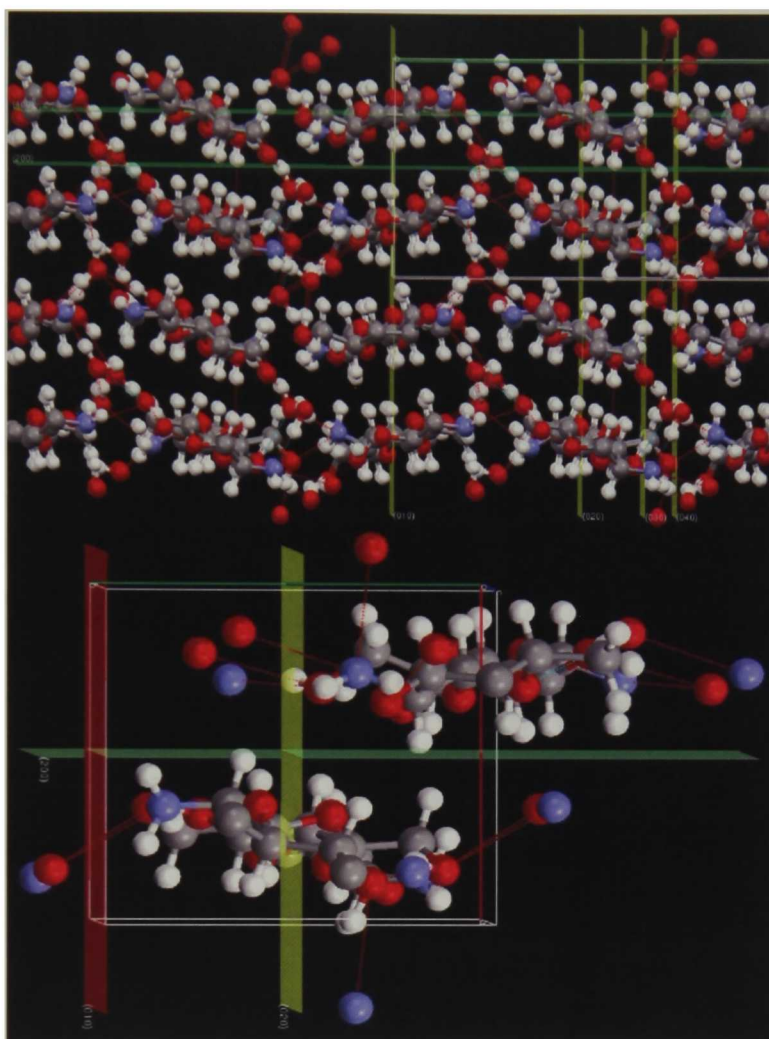


Figura 39. Difractogramas de rayos X calculados teóricamente para muestras con diferente humedad

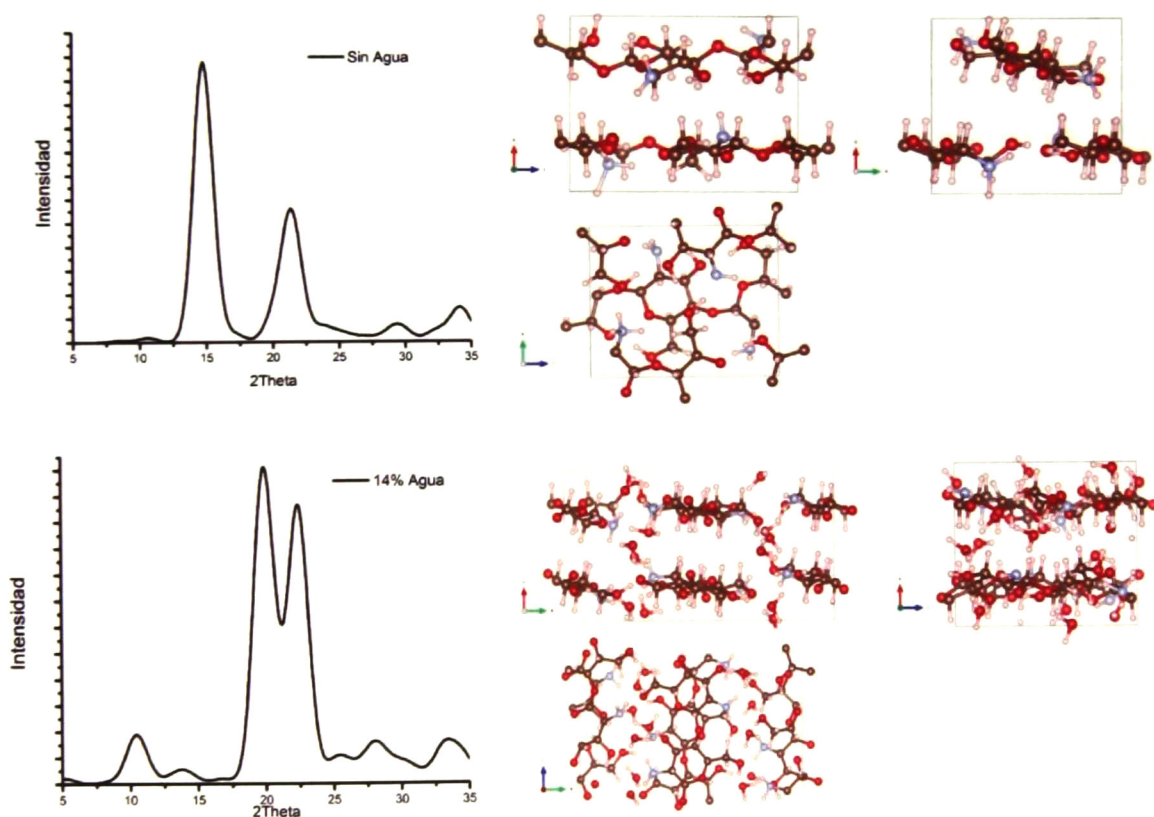


**Figura 40.** Distribución de los planos de difracción de una molécula de quitosano. Plano (200) se encuentra ubicado entre dos cadenas principales, (010) en los extremos de la cadena y (020) es el plano que pasa en el extremo de una cadena polimérica de quitosano y el punto medio de otra.

Al comparar los planos de difracción obtenidos de forma teórica y experimental se observa que existe una relación estrecha entre el corrimiento de los planos y el porcentaje de humedad, las muestras con mayor cantidad de agua tuvieron valores de  $2\theta$  menores indicando que la distancia interplanar aumenta, y al calentar la muestra de forma experimental se observa que particularmente el plano 200 se desplaza a valores mayores de  $2\theta$  debido a que el porcentaje de humedad disminuye, en base a estos resultados se ha propuesto que las moléculas de agua libre

que tienen a incorporarse entre las cadenas principales y los extremos de cadena como lo muestra la figura 40 estos sitios se relacionan con los planos (200) y (010) respectivamente.

De esta manera al comparar los difractogramas experimentales y teóricos se pudo determinar que al incrementar las moléculas de agua el plano 010 se intensifica, lo que coincide con los resultados experimentales en los polvos de quitosano (Fig. 37). Adicionalmente, en los cálculos teóricos se observa la presencia de un nuevo plano de difracción ubicado cerca a los  $23^\circ$  de  $2\theta$  que ha sido reportado por otros autores y relacionado con porcentajes de humedad cercanos al 15 %, como lo presenta la figura 41. Al comparar los resultados experimentales se observa que para las muestras en película, el pico ubicado alrededor de los  $20^\circ$  de  $2\theta$  aumenta su ancho medio al incrementar el porcentaje de humedad, probablemente por la contribución del plano relacionado a muestras hidratadas <sup>44</sup>.



**Figura 41.** Difracción de rayos X calculada para estructuras anhidras e hidratadas hasta en un 14% de humedad.

#### 6.4. Conclusiones

Anteriormente el quitosano fue catalogado como un material amorfo, sin embargo, actualmente la molécula de CS se puede considerar como una cadena polimérica tridimensional que interacciona con otras cadenas del mismo polisacárido, moléculas de agua y algunos ácidos, es claro que este polisacárido posee en su estructura fases amorfas y cristalinas que pueden variar en función de la humedad, ya que, el agua libre que interacciona con el polímero modifica radicalmente la estructura del mismo y por tanto las propiedades fisicoquímicas y eléctricas que presenta.

El vínculo entre los análisis de XRD experimentales y los cálculos teóricos fue una herramienta fundamental en el entendimiento y comprensión de los resultados obtenidos en esta tesis, ya que cada grupo de nanocompuestos sintetizados fue un sistema complejo, debido a las interacciones particulares en cada caso, fue necesario estudiar las modificaciones moleculares que sufre el quitosano puro y de esta manera se obtuvo una esquematización de la molécula de quitosano, ubicando los planos y lugares específicos donde se une el agua a la estructura, lo cual es de suma importancia ya que este factor permite explicar fenómenos conductivos, y el origen de las relajaciones térmicas del material a partir del contenido acuoso del material.

## CAPITULO 7

### 7. Resultados y Discusión para materiales del grupo 3

#### 7.1. Síntesis de materiales

Como se expuso en los capítulos anteriores, el CS y el citrato de sodio permitieron obtener nanocompósitos estables, sin embargo, el análisis de las propiedades eléctricas fue un proceso complejo debido a que el porcentaje de humedad y la conductividad de los materiales pueden atribuirse al exceso de ácido cloroáurico y la presencia de citrato de sodio, con el fin de esclarecer y profundizar la contribución de cada uno de estos componentes se sintetizo una serie de materiales utilizando solamente quitosano y ácido cloroáurico con diferentes concentraciones mili molares, todos los detalles de la reacción se presentaron en el capítulo 2: materiales y métodos.

En la tabla 4 se puede observar una serie de 8 compósitos representativos para este grupo de materiales,

**Tabla 4.** Nanocompósitos sintetizados variando la concentración de ácido cloroáurico, usando solamente quitosano al 2% p/p como agente reductor

<b>HAuCl<sub>4</sub>(mM)</b>	<b>HAuCl<sub>4</sub> ( mg/ml)</b>	<b>2% CS (mL)</b>
<b>0.15</b>	0.05	2
<b>0.3</b>	0.1	2
<b>0.6</b>	0.2	2
<b>0.86</b>	0.29	2
<b>1.4</b>	0.47	2
<b>1.7</b>	0.58	2
<b>3</b>	1	2
<b>5</b>	6	2

#### 7.2. Espectroscopia de Infrarrojo

Como se observa en la figura 42, el espectro de infrarrojo obtenido para los compósitos sintetizados presento un comportamiento similar para todas las películas. La banda cercana a los

3300  $\text{cm}^{-1}$  se produce por un estiramiento simétrico del grupo -OH, seguida de otra banda presente alrededor de los 2800  $\text{cm}^{-1}$  asociada con el estiramiento simétrico del grupo metilo. La banda a los 1640  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con el estiramiento antisimétrico del grupo C=O de las amidas primarias, a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  se observa otra banda de absorción que corresponde a la deformación antisimétrica del grupo  $\text{NH}_3^+$ . A los 1410  $\text{cm}^{-1}$  se delimita otra banda producida por el estiramiento de los grupos C-H, a los 1025  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda principalmente relacionada con los estiramientos del enlace glicosídico (C-O-C).

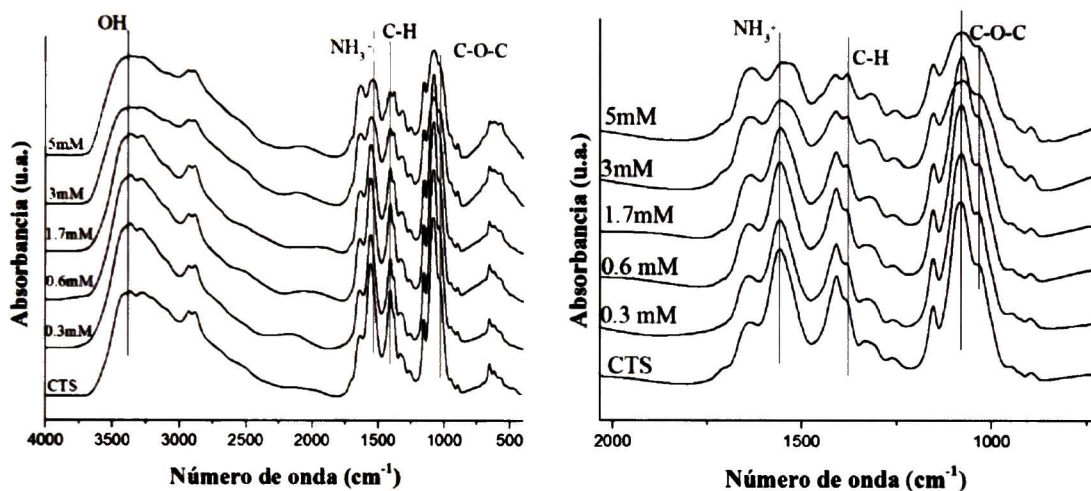


Figura 42. a. Espectroscopia de Infrarrojo realizada a los compósitos del grupo 3. b. ampliación del área más significativa del espectro en el intervalo de 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

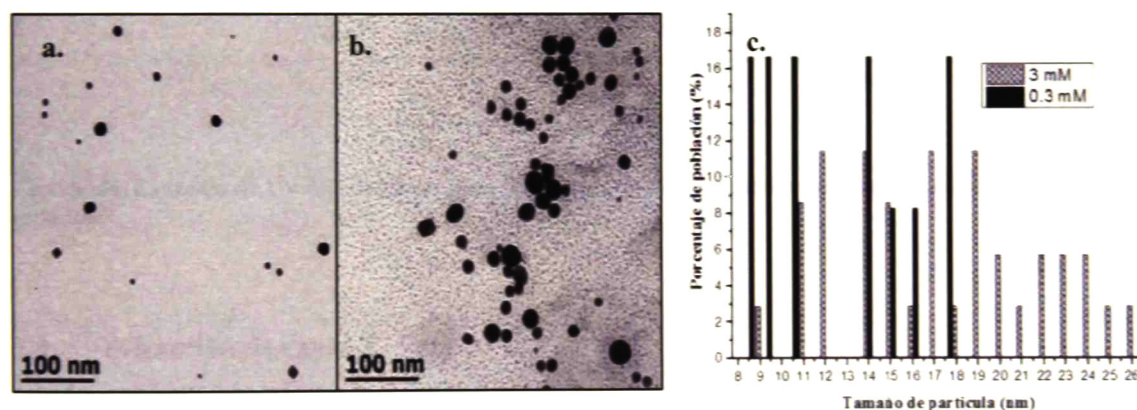
A simple vista se observa que se presenta un ensanchamiento y disminución de la intensidad de las bandas ubicadas a los 3500 y 3300  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a estiramientos simétricos de los grupos -OH y -NH respectivamente, aunque cabe aclarar que puede haber un solapamiento de las contribuciones de las mismas, una ampliación en el área comprendida entre los 2000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , muestra que a medida que aumenta la concentración de ácido cloroáurico, la banda ubicada a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  pierde intensidad y aumenta su ancho característico, lo cual implica que las vibraciones del grupo amino protonado se ven afectadas por la interacción de la nanopartícula metálica con esta especie química, dicho comportamiento fue descrito por Wei y Quian en 2008, para nanocompósitos de plata y oro obtenidos usando quitosano como agente reductor, proponen que la interacción en de la partícula y la matriz polimérica se da



específicamente entre la superficie polarizada y el grupo  $\text{NH}_3^-$ <sup>37</sup>, de la misma forma a la banda asociada al enlace entre C-H situada a los  $1380\text{ cm}^{-1}$  incrementa su intensidad, por otro lado las bandas presentes a los  $1070$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con estiramientos del enlace glicosídico (C-O-C) y estiramientos de C-N respectivamente disminuyen su intensidad. Teniendo en cuenta probablemente debido a la saturación de nanopartículas en la matriz del material.

### 7.3. Análisis morfológico

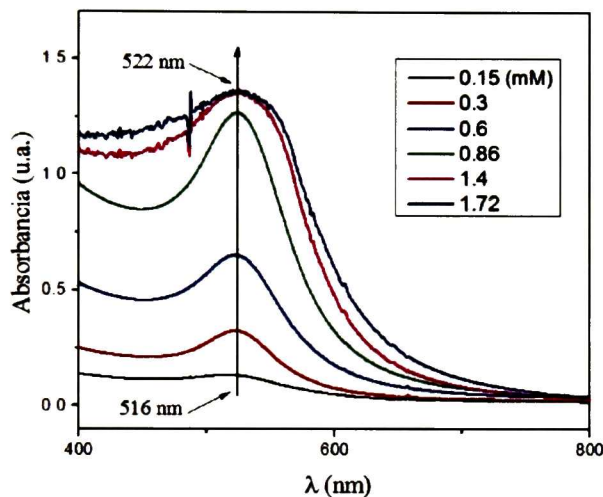
En la figura 43 se pueden observar dos micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión a dos compósitos sintetizados de 0.3 y 3 mM de  $\text{HAuCl}_4$ . Se aprecia, que las nanopartículas de oro obtenidas en la matriz de quitosano se encuentran distribuidas de forma homogénea principalmente en los compósitos con menor concentración, los compósitos de mayor concentración muestran partículas definidas, algunas de estas se encuentran formando aglomeraciones.



**Figura 43.** Micrografías de TEM, a. 0.3 mM b. 3 mM. c. Histograma de tamaño de partícula para cada tipo de muestra.

De la misma forma, se ve, que al incrementar la concentración de sal de oro, aumenta la cantidad de nanopartículas y el intervalo del tamaño de las mismas incrementa cerca de 10 nm, esto corresponde con lo observado en la figura 44, ya que el espectro de UV-vis muestra que la intensidad de la banda de absorción aumenta de forma proporcional a la concentración de ácido cloroáurico en el compósito. Los valores máximos de absorción se encuentran entre los 516 y

522 nm, por lo que se puede inferir que el tamaño de partícula de los materiales es similar para todos los materiales, lo que corresponde a lo reportado en la literatura, ya que, al aumentar la concentración de quitosano en la reacción se puede obtener mayor cantidad de sitios de nucleación y por tanto menor tamaño de partícula<sup>81,82</sup>. En este caso, la concentración de CS empleada en la síntesis fue la misma para todos los compósitos por lo que se esperaba obtener tamaños de partícula, esta tendencia se evidencia en el análisis de tamaño de partícula ya que el intervalo obtenido para los nanocompósitos se encontró entre 9 y 30 nm



**Figura 44.** Espectro de UV-Vis obtenido para los nanocompósitos sintetizados usando quitosano como agente reductor

#### 7.4. Difracción de rayos X

Todos los difractogramas obtenidos mostraron picos de difracción alrededor de  $2\theta = 12^\circ$  y  $20^\circ$ , adicionalmente se observó otro pico a los  $21.8^\circ$ . La reflexión más fuerte se observa alrededor de los  $2\theta=20^\circ$ , la cual se relaciona con una mezcla de las fases amorfa y cristalina del quitosano (tipo II)<sup>70</sup>. El incremento de la concentración de nanopartículas se evidencia en el corrimiento del pico ubicado  $2\theta= 12^\circ$  y en el pico ubicado en  $2\theta= 38.18^\circ$ , el cual aumenta su intensidad a mayores concentraciones de ácido cloroáurico.

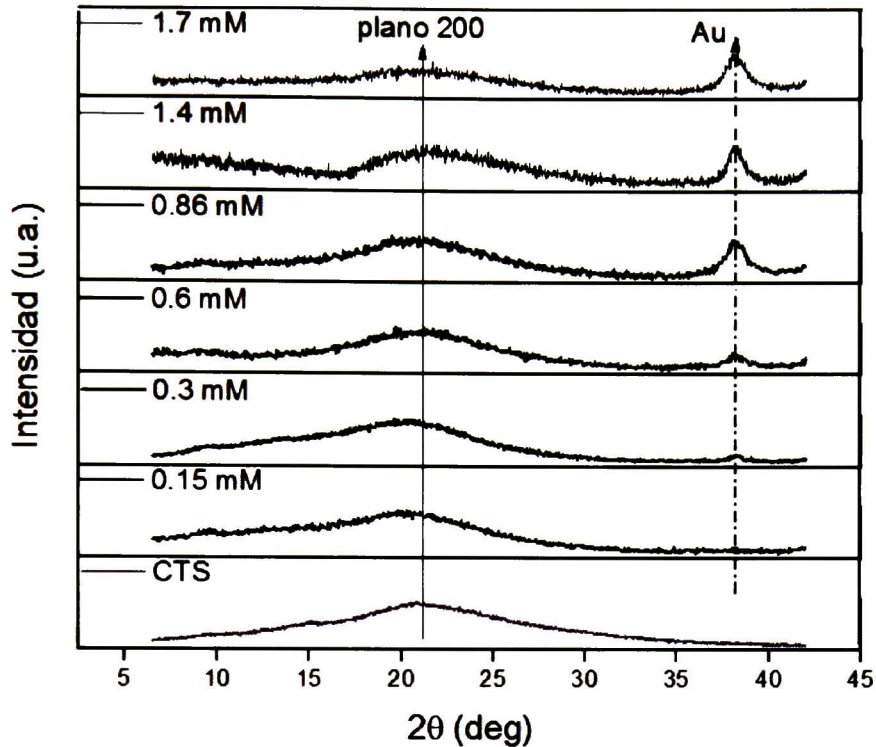
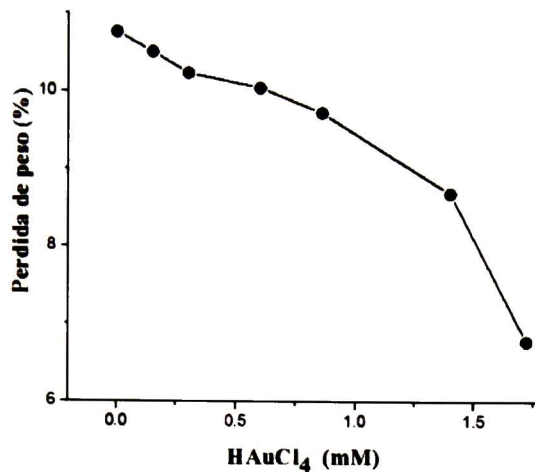


Figura 45. Difractograma de rayos X obtenido de los materiales sintetizados a diferentes concentraciones de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>.

### 7.5. Análisis Termogravimétrico

La figura 46 muestra el porcentaje de humedad registrado para los nanocompuestos sintetizados usando quitosano como agente reductor, se observa para concentraciones mayores de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> la humedad es menor, esto se da debido a que, al aumentar la concentración de sal de oro en el material, se generan más enlaces entre el CS y las partículas metálicas, que disminuye la absorción de moléculas de agua en el material.



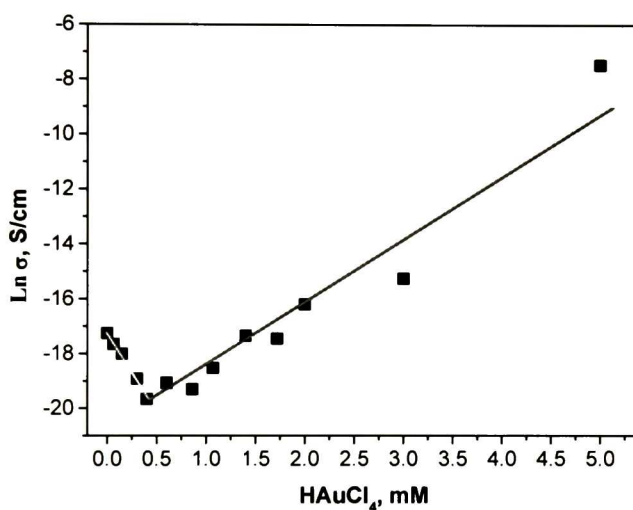
**Figura 46.** Porcentaje de humedad evaluado para los materiales sintetizados usando quitosano como agente reductor

### 7.6. Mediciones de conductividad

La conductividad eléctrica en corriente directa ( $\sigma_{DC}$ ), fue calculada a partir de la ecuación antes mencionada  $\sigma_{DC} = d/(R_{DC} \times S)$ , donde  $d$  y  $S$  son el espesor y el área de la muestra respectivamente<sup>74</sup>. Como se observa en la figura 47 a bajas concentraciones de nanopartículas la conductividad disminuye, sin embargo, después de 0.6mM de HAuCl<sub>4</sub> se presenta un aumento significativo en los valores de conductividad, el cual se puede atribuir a la formación de estructuras aglomeradas como se observó en las micrografías de TEM.

De acuerdo con la teoría media efectiva la conductividad DC de un sistema con inclusiones conductivas como la matriz de un polímero dieléctrico tiende a incrementar. En el caso de los sistemas quitosano- nanopartículas de oro, la conductividad disminuye a concentraciones bajas de nanopartículas, esta disminución de conductividad puede explicarse por la interacción de las partículas metálicas con la matriz de quitosano (ver mediciones de FTIR). Tales interacciones son específicas para compósitos de quitosano y son relacionadas con el contenido de humedad del mismo (Fig. 46) y el número de iones libres de  $H^+$  y  $OH^-$ , los cuales se relacionan con la conductividad del quitosano puro. A altas concentraciones de AuNp's la conductividad en los materiales incrementa debido a la formación de rutas conductivas desarrolladas por las nanopartículas. Por esta razón se observa un mínimo en la conductividad DC. Este valor mínimo

aparece debido a la competencia de dos mecanismos: disminución de iones  $H^+$  y  $OH^-$  libres y la formación de rutas conductivas en el compósito formadas por las nanopartículas. En base a estos resultados es difícil obtener un valor exacto que se relacione con un umbral de percolación debido a que la dependencia de la conductividad vs la concentración de  $HAuCl_4$  no presenta una región de saturación (a altas concentraciones de ácido cloroáurico se observan aglomerados). Sin embargo el valor estimado puede estar entre los 0.3 y 0.6 mM de  $HAuCl_4$ . A concentraciones mayores de sal de oro se observó formación de aglomerados, lo cual dio lugar a un incremento de la conductividad debido a la formación de rutas de conducción formadas por nanopartículas y como resultado se observó una disminución en el área superficial de la nanopartícula.



**Figura 47.** Dependencia de la conductividad eléctrica obtenida de las películas sintetizadas a concentraciones de 0.15 a 5 mM

## 7.7. Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de oro con tamaños entre los 9 y 30 nm, las cuales se encontraron distribuidas homogéneamente, los materiales con mayores concentraciones mostraron tendencia a formar agregados o aglomerado, los cuales son responsables del aumento de la conductividad eléctrica. Aunque la síntesis de nanocompuestos de oro empleando quitosano como agente

reductor es un proceso bien conocido, se observó que la conductividad de estos materiales se encuentra estrechamente relacionada con la concentración de nanopartículas en el mismo.

El porcentaje de humedad en estos materiales fue inversamente proporcional a la concentración de nanopartículas, debido a que una gran parte de las interacciones se darán entre el quitosano y la partícula, bloqueando los sitios de enlace de las moléculas de agua.

Los análisis de XRD y TEM evidenciaron que los materiales presentan nanopartículas de oro, las cuales se encuentran unidas al quitosano por medio interacciones generadas principalmente entre el grupo amino del quitosano y la superficie de la partícula metálica.

Finalmente al comparar los resultados de conductividad de los materiales de los grupos 2 y 3 se pudo aclarar que, el citrato de sodio modifica drásticamente el porcentaje de humedad de los compósitos y a su vez contribuye en el fenómeno de percolación de estos materiales. No obstante, la concentración de nanopartículas de oro en los compósitos es el parámetro más importante en la dependencia eléctrica.

## CAPITULO 8

### Evaluación de la posible actividad estimuladora de los nanocompositos como cicatrizantes

#### 8. Materiales del grupo 4

En los capítulos anteriores se analizaron a profundidad, las propiedades fisicoquímicas y eléctricas de los compósitos desarrollados, determinando los mecanismos de interacción de las AuNp's con la matriz de quitosano y las posibles vías de reacción entre el HAuCl<sub>4</sub> con citrato de sodio como reductor. Se demostró que para los métodos utilizados para obtener los materiales del grupo 1 y 2 se obtienen productos de reacción adicionales, lo cual puede ser contraproducente en las aplicaciones de estos materiales en procesos biomédicos. Debido a esto se eligió método 3 (empleando quitosano como agente reductor y estabilizador de nanopartículas de oro) ya que esta síntesis no genera productos de reacción ni presenta sales en exceso.

Para la aplicación del material en ingeniería de tejidos es importante cumplir con algunos requisitos: biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y propiedades mecánicas adecuadas. Los nanocompositos seleccionados responden a la mayoría de los requerimientos, sin embargo, su resistencia mecánica no es óptima. Por esta razón y con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del material se adiciono un 20% de metacrilato de glicidilo (GMA) al material. El GMA es un monómero sintético perteneciente a la familia de grupos epóxicos, esta molécula puede ser funcionalizada con el quitosano en medios acuosos ácidos reaccionando con los grupos aminos, carboxilos e hidroxilos. Es odontología es usado como diluyente de resinas epóxicas y es biodegradable<sup>83</sup>.

A este copolímero se le llamo (CS-g-GMA), la adición de este monómero permite obtener un hidrogel mejorando la viscosidad, índice de hinchamiento y las propiedades mecánicas del quitosano puro, sin interferir con los demás requerimientos establecidos, por lo que puede ser usado como soporte celular para aplicaciones biomédicas. Adicionalmente se agregó un 0.3 % de colágeno, ya que esta proteína es un componente principal de huesos, cartílagos, piel y tejido conectivo, de la misma forma hace parte importante de la matriz extracelular en animales.

Como se presenta en la tabla 5, los materiales fueron sintetizados usando como base un copolímero híbrido natural sintético desarrollado en el grupo de investigación de polímeros y biopolímeros de Cinvestav- Querétaro, al cual se le adicionaron diferentes concentraciones de nanopartículas de oro y colágeno tipo IV por medio de síntesis modificadas.

Tabla 5. Materiales evaluados “*in vivo*”

Material	Concentración
TheraForm	Control
CS-g-GMA	Control
((CS-g-GMA)-AuNp's)	0.15
((CS-g-GMA)-AuNp's)	0.3
((CS-g-GMA)-AuNp's)	0.6
((CS-g-GMA)-AuNp's)	1.07
((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col)	0.15
((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col)	0.3
((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col)	0.6
((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col)	1.07

\*Los detalles de la síntesis se presentan en Capítulo 3

### 8.1. Análisis morfológico

Las micrografías de SEM que se observan en la figura 48 muestran nanopartículas metálicas a diferentes concentraciones distribuidas homogéneamente en la matriz del material ((CS-g-GMA)-AuNp's)-Col). La cantidad de nanopartículas aumenta de acuerdo a la concentración de la sal de oro. La parte c de la figura, correspondiente a la concentración 1.07 mM de HAuCl<sub>4</sub>, presenta formación de aglomerados de partículas, adicionalmente se determinó que el intervalo de tamaño de partícula para estos compósitos fue de 10 a 20 nm





Figura 48. Micrografías de SEM obtenidas para soluciones con a) 0.3 mM, b) 0.6 mM and c) 1.07 mM de HAuCl<sub>4</sub>.

## 8.2. Evaluación "In vivo" de nanocompósitos de oro/quitosano

Después de la cirugía el progreso de la reparación fue evaluado por 40 días de acuerdo a los parámetros establecidos en el manual de lesiones y úlceras de la OECD 404<sup>84</sup>. Todos los datos fueron colectados y analizados usando el software Microsoft Excel 2010. La tabla 5 muestra los parámetros de evaluación empleados para esta prueba, donde 1 es el valor más bajo y corresponde a buena recuperación y 4 a recuperación limitada o ineficiente. Cada aspecto fue calificado diariamente para cada material incluyendo los controles, al término del tiempo de evaluación todas las lesiones fueron calificadas como lesiones de tipo 1.

Tabla 6. Diagrama de evaluación de recuperación. 1= recuperado, 4= recuperación limitada por factores externos. De acuerdo al puntaje de evaluación el progreso de sanación de la herida puede ser clasificado en 4 tipos.

Puntaje	1	2	3	4
<b>Aspecto</b>	<b>Eritematoso</b>	<b>Enrojecido</b>	<b>Amarillo</b>	<b>Necrotic</b>
Extensión de la lesión	0-1 cm	>1-3 cm	>3-6 cm	>6 cm
Profundidad de la lesión	0	<1cm	1-3cm	<3cm
Cantidad de exudado	Ausente	Insuficiente	Moderado	Abundante
Calidad de exudado	Ausente	Seroso	Turbio	Purulento
Tejido necrotico	Ausente	<25	25-50%	<50%2
Tejido Granular	100-75%	<75-50%	<50-25%	<25%
Edema	Ausente	+	++	+++
Dolor	0-1	2-3	4-6	7-10
Tejido circundante	Sano	Escamoso	Eritematoso	Macerado
<b>Clasificación de las heridas por puntaje</b>				
Tipo I	10 a 15 puntos			
Tipo II	16 a 21 puntos			
Tipo III	22 a 27 puntos			
Tipo IV	28 a 40 puntos			

El proceso de recuperación de una herida puede ser explicada en tres fases: inflamatoria, proliferativa y maduración. La primera fase se observa principalmente entre los días 1 a 3 y se caracteriza por la presencia de áreas enrojecidas circundantes a la lesión, esta etapa es relevante debido a que en este tiempo la herida se encuentra expuesta directamente al material evaluado y por lo tanto puede determinarse si existe o no rechazo del implante, adicionalmente se puede

determinar si se produce o no infección por medio de áreas enrojecidas, producción de exudado e inflamación local. Entre los días 3 y 15 se observa el crecimiento de una capa ligera de tejido a la cual se le conoce como tejido de granulación o granular, el cual permite la protección de la herida en contra de los agentes externos y el desarrollo de tejido de reparación o epitelialización, en este punto se observa una disminución del enrojecimiento del área afectada, a partir del día 15 el proceso de reparación termina dando lugar a que los fibroblastos o miofibroblastos que aún se encuentren en el tejido puedan diferenciarse a queratinocitos<sup>85</sup>.

La tabla 6 muestra la evaluación de los parámetros establecidos en la tabla 5 después de 7 días de haber hecho la cirugía, los resultados sugieren que los nanocompuestos usados como implantes no contribuyeron al proceso inflamatorio.

**Tabla 7. Promedio de la evaluación de los materiales usados como implantes para la recuperación a los 7 días de cirugía.**

Dia7										
Material	Extensión de lesión	Profundidad de lesión	Cantidad Exudado	Calidad Exudado	Tejido Necro	Tejido Granular	Edema	Dolor	Piel circundante	Total
0.15 Col	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>0.15</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
0.3 Col	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>0.3</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
0.6 Col	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>0.6</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
1.07 Col	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>1.07</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
CS-GMA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
<b>TheraForm</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9

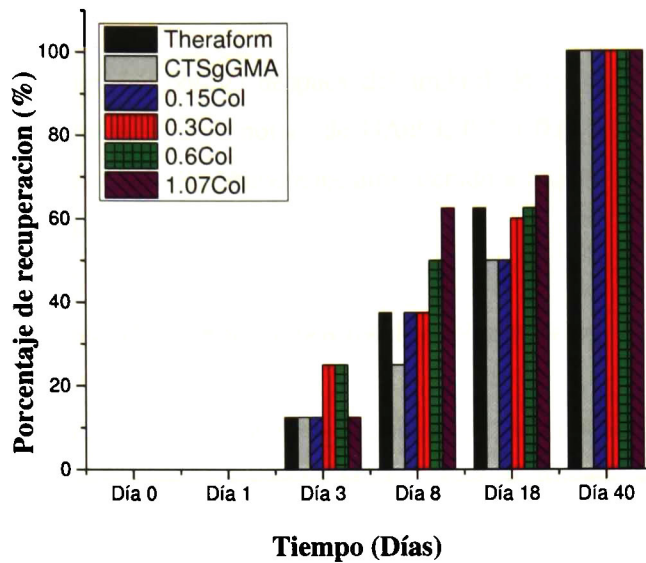
La figura 49 muestra el tejido recuperado a los 40 días después de haber hecho la cirugía, en primer lugar se debe observar que todos los materiales permitieron la recuperación de la lesión, sin producir rechazo. La parte inferior dorsal correspondiente a las lesiones control se pueden comparar de dos formas, la primera, con todas las cicatrices pertenecientes al grupo de individuos empleados en la prueba, determinando que la regeneración de la piel por vía natural, es decir, sin implantar algún material, fue similar para todo el grupo. La segunda es comparando las dos cicatrices finales de cada individuo, Es aquí donde se destaca que la recuperación más satisfactoria, se presentó para los materiales que contenían colágeno y específicamente los que fueron sintetizados a 0.3 y 0.6 mM de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, cabe aclarar que el termino satisfactorio se refiere al aspecto físico y cosmético del tejido recuperado es decir color, área, profundidad, rugosidad.



**Figura 49. Tejido cicatrizado después de 40 días de cirugía. Controles: TheraForm y CS-g-GMA. A) Materiales sin colágeno, b) Materiales con colágeno**

Los resultados anteriores demostraron que en efecto los materiales que poseen concentraciones cercanas al cambio de conductividad presentaron mejores resultados, en la figura 47 presentada en el capítulo 7 se observa la dependencia de la conductividad para nanocompuestos sintetizados usando quitosano como agente reductor, este material fue usado como base para las películas implantadas en esta prueba y como se observa el cambio en la conductividad se da a partir de la concentración de 0.3 mM de  $\text{HAuCl}_4$ .

De la misma forma se determinó el porcentaje de recuperación para cada material implantado midiendo el área total de la lesión durante los 40 días de evaluación, en la figura 50 se observan los resultados obtenidos para los nanocompuestos sintetizados con colágeno. Aunque todos los materiales permitieron el 100% de la recuperación, es importante resaltar que los materiales sintetizados con 0.3 y 0.6 mM de  $\text{HAuCl}_4$  mostraron una respuesta mayor para el día 3, ya que mientras que los controles y demás implantes arrojaron un porcentaje cercano al 12%, estos compósitos mostraron un valor de casi un 30 %.



**Figura 50. Porcentaje de recuperación evaluado a 40 días para nanocompuestos sintetizados con colágeno**

La regeneración de las lesiones en la piel requiere procesos complicados que incluyen una amplia gama de procesos moleculares y fisiológicos. Existen reportes en literatura sobre el uso del quitosano un material sustituto en la recuperación de la piel debido a sus ventajas como la homeostasis, la aceleración de la regeneración y estimulación de la síntesis de colágeno<sup>86</sup>. Aunque se han propuesto diferentes explicaciones sobre la interacción de este polímero con las células, la más aceptada se base en que por su naturaleza catiónica el CS permite la interacción electrostática con grupos aniónicos de los glicosaminoglicanos y proteoglicanos que se encuentran ampliamente distribuidos en el cuerpo además de otras especies con carga negativa<sup>31</sup>.

Adicionalmente, el uso de nanopartículas de oro para aplicaciones de biología celular, como en el caso de todos los nanomateriales, ha sido un área limitada debido a que la interacción entre la partícula con las células a niveles moleculares es un espacio casi inexplorado. Sin embargo, en base a lo reportado, el área superficial de las AuNp's pueden modificarse al embeberse en quitosano y de esta manera, se propone obtener una partícula nanométricas que posea las características catiónicas propias del quitosano y de esta manera aumentar las interacciones

electrostáticas con los grupos aniónicos y otras especies de carga negativa que aceleran el proceso de la regeneración del tejido.

Esta hipótesis puede explicar porque después del umbral de percolación ( el cual ha sido estimado entre la concentración milimolar de  $\text{HAuCl}_4$  0.3 a 0.6 en los capítulos anteriores) disminuye el efecto curativo de los nanocompositos, debido a una disminución de la superficie efectivo de las nanopartículas.

### 8.3. Evaluación “*In vitro*” de nanocompósitos de oro/quitosano

Como se expuso en el capítulo 3 la complementariedad de las técnicas de la reducción del (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) MTT y azul de tripano, permiten conocer si la célula evaluada se encuentra en condiciones óptimas tanto a nivel metabólico, como a nivel de membrana, en la figura 51 se presentan los resultados obtenidos para estos dos ensayos, como se observa los porcentajes de citotoxicidad son cercanos a 0 cuando se evalúan células mononucleares de sangre periférica y macrófagos, para las células HEPG2 como era de esperar se observan valores mayores de toxicidad, debido a que esta línea celular es altamente sensible, de la misma forma se observa que el porcentaje de proliferación concuerda con los valores obtenidos para el MTT, conservando el comportamiento para la línea de cáncer de hígado

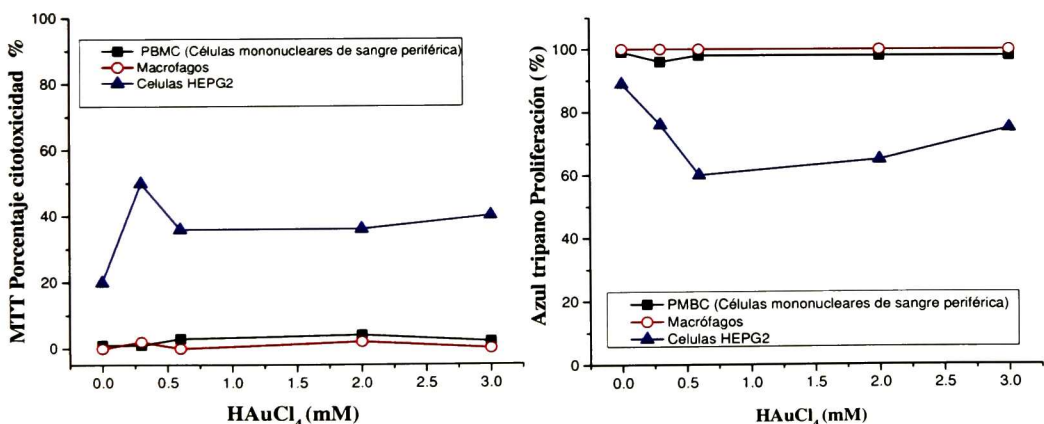


Figura 51. Ensayo de MTT y azul tripano realizado a tres líneas celulares: Células mononucleares periféricas, macrófagos y HEPG2.

Lo que demuestra que en condiciones normales las concentraciones optimas de nanopartículas determinadas en base a los estudios de impedancia eléctrica, no producen citotoxicidad y permiten la proliferación celular casi en un 100 %. La figura 52 muestra los resultados obtenidos en la prueba de oxido nitrico realizada a celulas HEPG2 y macrofagos a 24, 48 y 72 horas, se observa que la produccion de este oxido fue minima para las dos lineas evaluadas en relacion al control LPS de *E coli*.

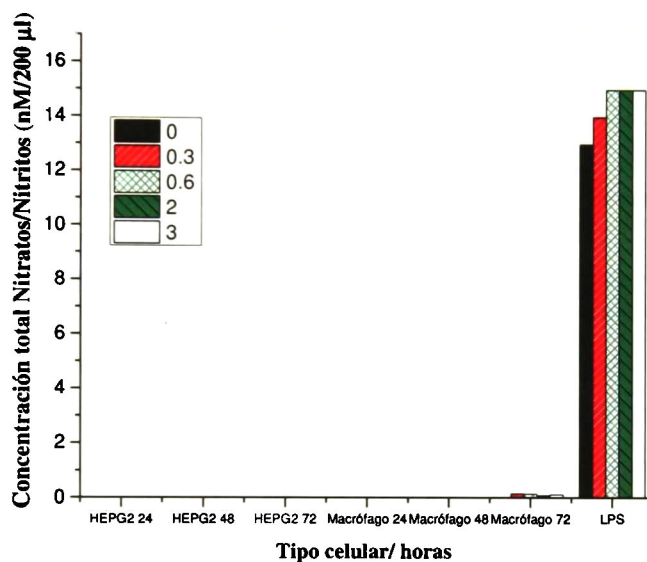


Figura 52. Prueba de óxido nítrico, realizada a células HEPG2 y macrófagos a 24, 48 y 72 horas

#### 8.4.Citometría de Flujo

Como se observa en la tabla 8 la producción de citocinas para cada material fue diferente. En los ratones tratados con Theraform como control, se detectó la presencia de todas las citocinas evaluadas excepto IL17A. Los grupos de ratones tratados con CS-g-GMA, ((CS-g- GMA)-AuNp´s 0.15), ((CS-g- GMA)-AuNp´s)-col 0.15, indujeron la producción de todas las citocinas. El ((CS-g- GMA)-AuNp´s 0.6) produjo todas las citocinas a excepción de la IL-4, por otra parte, los materiales ((CS-g- GMA)-AuNp´s 1.07) y ((CS-g- GMA)-AuNp´s)-col 1.07) no indujeron la producción de las citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IL17A), finalmente, en los grupos de ((CS-g-

GMA)-AuNp's col 0.6), ((CS-g- GMA)-AuNp's 2) y ((CS-g- GMA)-AuNp's 3) no se encontró la producción de las citocinas (IL-2, IL-4 e IL-10).

Los análisis estadísticos entre grupos fueron realizados, tomando el Theraform, como control debido a su empleo comercial y nula toxicidad comprobada. Se encontró que este indujo la producción de la mayoría de las citocinas evaluadas (IL-2 (0.28 pg/mL), IL-4 (2.87 pg/mL), IL-6 (2.04 pg/mL) INF- $\gamma$  (2.97 pg/mL), TNF (2.12 pg/mL), e IL-10 (1.84 pg/mL) excepto IL17A (0 pg/mL). Al comparar la producción de IL-2 e IL-4 entre grupos, el CS-g- GMA indujo de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la producción de estas citocinas en los individuos estudiados, no encontrando diferencia significativa en la producción de citocinas para los otros grupos comparados con el grupo de Theraform.

**Tabla 8. Evaluación de la producción de citocinas en suero de ratones BALB/C sometidos a un modelo de reparación de tejido**

Material Evaluado	Citocinas de suero extraído de sangre						
	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	INFY (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IL17A (pg/mL)	IL10 (pg/mL)
TheraForm	0.28	2.87	2.04	2.97	2.12	0	1.84
<b>CS-g- GMA</b>	<b>3.94*</b>	<b>9.5*</b>	<b>26.15*</b>	<b>11.1*</b>	<b>39.84*</b>	<b>4.93*</b>	<b>31.12*</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 0.15	0.53	2.47	17.27*	17.3*	6.4*	1.74*	7.5*
<b>((CS-g- GMA)-AuNp's-col)-0.15</b>	<b>0.32</b>	<b>3.3</b>	<b>11.2*</b>	<b>4.64</b>	<b>13.59*</b>	<b>0.93*</b>	<b>14.67*</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 0.6	0.45	0	2.26	5.46	4.38	0.21	1.21
<b>((CS-g- GMA)-AuNp's-col)-0.6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>94.06**</b>	<b>2.34</b>	<b>9.86*</b>	<b>0.65</b>	<b>0</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 1.07	0	0	2.44	0.83	5.59*	0	0
<b>((CS-g- GMA)-AuNp's-col)-1.07</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2.63</b>	<b>0.87</b>	<b>7.06*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 2	0	0	944.26**	2.44	27.21*	0.34	0
<b>((CS-g- GMA)-AuNp's 3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>174.58**</b>	<b>2.98</b>	<b>1.78</b>	<b>0.11</b>	<b>0</b>

**P<0.05 p<0.001\*\***

En cuanto a la producción de IL-6 su producción fue significativa ( $p < 0.05$ ) en los grupos de ratones tratados con CS-g- GMA, CS-g- GMA-AuNp's 0.15, y CS-g- GMA-AuNp's-col 0.15 y altamente significativa ( $p < 0.001$ ) en los grupos CS-g- GMA-AuNp's-col 0.6, CS-g- GMA-AuNp's 2 y CS-g- GMA-AuNp's 3 para los demás grupos no se encontró diferencia significativa comparado con el grupo de Theraform. Al evaluar la producción de INF- $\gamma$  esta solo fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para los grupos CS-g- GMA y CS-g- GMA-AuNp's 0.15 comparado con el grupo de Theraform. Para la producción de TNF se encontró diferencia significativa para los grupos CS-g- GMA, CS-g- GMA-AuNp's 0.15, CS-g- GMA-AuNp's-col 0.15, CS-g- GMA-AuNp's-col 0.6, CS-g- GMA-AuNp's 1.07, CS-g- GMA-AuNp's-col 1.07 y

CS-g- GMA-AuNp's 2, no encontrando diferencia significativa para los demás grupos tratados comparados con el Theraform.

En la producción de IL-17A solo se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para los grupos tratados con CS-g- GMA, CS-g- GMA-AuNp's 0.15, y CS-g- GMA-AuNp's-col) 0.15, comparados con el grupo de Theraform. Finalmente, solo se encontró diferencia significativa en los grupos tratados con CS-g- GMA, CS-g- GMA-AuNp's 0.15, y CS-g- GMA-AuNp's-col 0.15 comparados con el grupo de Theraform.

Debido a que el control positivo (TheraForm) empleado en la prueba presento una baja producción de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, INF $\gamma$ , TNF, e IL-10) y ausencia de IL17A, se esperaba obtener comportamientos similares en los grupos de ratones implantados con los nanocompósitos evaluados, sin embargo, se obtuvieron diferencias en la producción de citocinas según el material empleado. Desde el punto de vista clínico se puede afirmar que todos los materiales empleados para la prueba “*in vivo*” indujeron una cicatrización óptima del tejido sin presencia de infección, alergia o toxicidad, de la misma forma, ningún ratón presentó crecimiento de pelo hirsuto, característico de fiebre en los animales, e incluso algunos nanocompósitos indujeron mejores parámetros de cicatrización que el TheraForm.

La sanación de un tejido es un proceso regulado en el cual las plaquetas y la fibrina llenan inmediatamente a la herida formando un tampón insoluble, para proteger al individuo de contaminantes externos, seguido de la reepitelialización en la cual se proliferan queratinocitos adyacentes a la herida y migran sobre el área lesionada. Estos dos procesos están regulados por la actividad de monocitos/macrófagos, ya que estas células proveen los factores angiogénicos y de crecimiento necesario para la limpieza de debris y la activación alterna por medio de la expresión de marcadores específicos. Por otro lado los neutrófilos apoyan la actividad neutralizadora de patógenos en conjunto con los macrófagos. Estudios realizados por McFarland y colaboradores mostraron que ratones con funciones inhibidas de macrófagos presentan exceso de fibrina y debris celular, generando retrasos en la sanación de heridas en comparación con ratones sin tratamiento, de la misma forma se observó que en ratones Knockout de IL-6 la reparación de heridas se ve retardada como un resultado de la mala infiltración de macrófagos y por lo tanto deficiencia en los procesos de reepitelialización<sup>87</sup>.



La producción altamente significativa de IL-6, no significativa de IL17A, aunado a la ausencia de IL-10 observada en los materiales, (((CS-g-GMA)-AuNp's)-col)-0.6, ((CS-g- GMA)-AuNp's)-2 y ((CS-g- GMA)-AuNp's)-3, sugieren que estos nanocompuestos pueden inducir el proceso de cicatrización con mayor efectividad en comparación a los demás implantes evaluados e inclusive al Theraform, apoyados en la observación clínica del proceso de recuperación y el hecho de que la deficiencia de IL-17 en ratones Knockout acelera el proceso de sanación de heridas, ya que reduce el proceso inflamatorio y mejora la angiogénesis<sup>88</sup>, adicionalmente en ratones Knockout de IL-10 se ha reportado que el proceso de reparación de herida más rápido<sup>89</sup>.

**Tabla 9. Evaluación de la producción de citocinas de bazo de ratones BALB/C sometidos a un modelo de reparación de tejido**

Material Evaluado	Citocinas de bazo						
	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	INFY (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IL17A (pg/mL)	IL10 (pg/mL)
TheraForm	1.79	0	0.63	7.3	19.7	0	0
<b>CS-g- GMA</b>	<b>0.67</b>	<b>0</b>	<b>0.48</b>	<b>3.63</b>	<b>10.08</b>	<b>0</b>	<b>1.32</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 0.15	1.23	0	1	8.58	19.95	0	3.23
<b>(((CS-g- GMA)-AuNp's)-col) 0.15</b>	<b>0.8</b>	<b>0</b>	<b>0.78</b>	<b>3.31</b>	<b>9.67</b>	<b>0.04</b>	<b>0</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 0.6	0.9	0	0.88	3.42	29.52	0	0
<b>(((CS-g- GMA)-AuNp's)-col) 0.6</b>	<b>0.68</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2.76</b>	<b>9.41</b>	<b>0.11</b>	<b>0</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 1.07	0.71	0	0	4.9	7.91	0	4.91
<b>(((CS-g- GMA)-AuNp's)-col) 1.07</b>	<b>0.7</b>	<b>0</b>	<b>0.48</b>	<b>4.71</b>	<b>14.11</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
((CS-g- GMA)-AuNp's 2	1.25	0	1.35	2.06	7.56	0.16	0
<b>(((CS-g- GMA)-AuNp's) 3</b>	<b>0.32</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6.16</b>	<b>8.35</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

No se encontró diferencia en la producción de citocinas en bazo comparados con el TheraForm, sugiriendo que estos materiales no tienen la capacidad a nivel sistémico de generar una respuesta inflamatoria semejante que comprometa la homeostasis del individuo.

## 8.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos de las pruebas “*in vivo*” sugieren que puede existir una relación entre la dependencia de la conductividad de los materiales y su desempeño en la regeneración de queratinocitos, de la misma forma se determinó que las concentraciones de nanopartículas de oro usadas para los compósitos no generan una respuesta citotóxica y que permiten la proliferación celular.

Los estudios a nivel de citometría de flujo demostraron que los compósitos ((CS-g-GMA)-AuNp's)-col)-0.6, ((CS-g- GMA)-AuNp's)-2 y ((CS-g- GMA)-AuNp's)-3 presentaron una mayor capacidad de regeneración, mejores resultados cosméticos y baja toxicidad, lo que nos permite proponerlos como alternativas puntuales en aplicaciones de tipo biomédico, específicamente en el área de la regeneración de heridas en piel.

## 9. Conclusiones finales y perspectivas

Se sintetizaron nanopartículas de oro por medio de 4 métodos usando citrato de sodio y quitosano como agente reductor, variando la concentración del  $\text{HAuCl}_4$  y la relación de citrato de sodio/ $\text{HAuCl}_4$ .

Los materiales obtenidos fueron caracterizados y estudiados por medio de espectroscopia de impedancia, espectroscopia de infrarrojo (FTIR), espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), Difracción de rayos X (XRD), análisis termogravimétrico (TGA)

Los estudios realizados sugieren que existe una relación entre la dependencia de la conductividad de los nanocompuestos y su desempeño a nivel biológico. De la misma forma se comprobó que los compósitos con nanopartículas de oro pueden funcionar como alternativas en el proceso de cicatrización y reparación de heridas.

Como perspectivas se propone desarrollar materiales con concentraciones mayores de quitosano para estudiar la dependencia de la conductividad, el porcentaje de humedad y relajaciones térmicas de estos materiales, ya que se espera que al aumentar la matriz del nanocompuesto se puedan generar nanopartículas con menor tamaño y por tanto fenómenos conductivos diferentes.

En cuanto a los estudios biológicos se propone evaluar parámetros específicos de crecimiento propio del tejido epidérmico mediante la detección del Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y Factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF). Así como probar la capacidad de regeneración de estos compósitos en modelos biológicos con daños propios de diabetes.

## 10. Publicaciones y presentaciones

**D. G. Zárate-Triviño**, R. Gómez-García, E. A. Elizalde-Peña, J. S. Castro, S. Nuño-Donlucas, E. Ruvalcaba-Paredes, F. Villaseñor-Ortega, J. E. Gough<sup>6</sup>, C.Velasquillo<sup>\*</sup>, and G. Luna-Barcenas. **Synthesis, characterization and *in vitro* chondrocyte response of a novel (Chitosan-g-Glycidyl Methacrylate)-collagen II hydrogel.** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition part B.* 2012. (*enviado*).

**D. G. Zárate-Triviño**, E. Prokhorov, G. Luna-Bárceñas, M. A. Hernandez-Landaverde, M. E. Mendoza Duarte, M. J. Yacamán. **Synthesis and characterisation of the chitosan-gold nanoparticles thin films nanocomposite.** *Journal of Nanoparticles research.* 2013. (*Enviado*).

E.A. Elizalde-Peña, **D.G. Zárate-Triviño**, S.M. Nuño-Donlucas, L. Medina-Torres, J.E. Gough, I.C. Sanchez, F. Villaseñor and G. Luna-Barcenas. **Synthesis and characterization of a hybrid (chitosan-g-glycidylmethacrylate)-xanthan hydrogel.** *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24 (12) 2013

Iraís A. Quintero Ortega, Josué D. Mota-Morales, Eduardo A. Elizalde Peña, **Diana G. Zárate-Triviño**, Yair A. De Santiago, Arturo Ortiz, Beatriz García Gaitán, Isaac C. Sanchez, and Gabriel Luna-Barcenas. **Cryogenic Process to Elaborate Poly(ethylene glycol) Scaffolds Experimental and Simulation Studies.** *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 52(2) 706-715.2013

J. Betzabé González-Campos, Josué D. Mota-Morales, Siva Kumar,**Diana Zárate-Triviño**, Montserrat Hernández-Iturriaga, Yevgen Prokhorov, Milton Vazquez Lepe, Zaira Y. García-Carvajal, Isaac C. Sanchez, Gabriel Luna-Bárceñas. **New insights into the bactericidal activity of chitosan-Ag bionanocomposite: The role of the electrical conductivity.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* .111(1)741-746.2013

J. Betzabe González-Campos, Gabriel Luna-Bárceñas, **Diana G. Zárate-Triviño**, Arturo Mendoza-Galván, Evgen Prokhorov, Francisco Villaseñor-Ortega, and Isaac C. Sanchez. **Handbook of polymer synthesis, characterization, and processing.** In *Polymer States and Properties*. ISBN: 9780470630327

**XXII INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS, EXPOSITOR, CANCUN-QUINTANA RO, 11 A 15 DE AGOSTO DE 2013 \*HEALING EFFECT OF NANOCOMPOSITE BASED ON CHITOSAN/AU.** **D. G. Zárate Triviño**, M. A. Hernandez-Landaverde, R.A. Mauricio Sanchez, M. E. Mendoza Duarte, M. A. Franco Molina, C. Rodríguez Padilla, E. Prokhorov, and G. Luna-Bárceñas.

**3RD INTERNATIONAL CONFERENCE “NANOMATERIALS: APPLICATIONS PROPERTIES-2013 (NAP-2013)”**, PRESENTACION, 16 A 21 DE SEPTIEMBRE DE 2013

\*CHITOSAN-GOLD NANOPARTICLE COMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATION.  
**Zarate-Triviño D.**, Valenzuela Acosta M., Prokhorov Y., Luna-Bárceñas G., Rodríguez Padilla C., Franco Molina M

## Bibliografía

---

- <sup>1</sup> C. Ranjan Patra, R. Bhattacharya, D. Mukhopadhyay, P. Mukherjee. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2010**; 62: 346–361
- <sup>2</sup> M. Li-Na, L. Dian- Jun, W. Xin. Synthesis and Applications of Gold Nanoparticle Probes. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. **2010**; 38: 1–7.
- <sup>3</sup> R. Coradeghini, S. Gioria, C. Pascual García, P. Nativo, F. Franchini, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. *Toxicology Letters*. **2013**; 217: 205-216.
- <sup>4</sup> J. B. González-Campos, S. Kumar, D. Zárate-Triviño, M. Hernández-Iturriaga, MV Lepe, ZY. García-Carvajal, IC. Sanchez, G. Luna-Bárceñas. New insights into the bactericidal activity of chitosan-Ag bionanocomposite: The role of the electrical conductivity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2013**; 111C:741-746.
- <sup>5</sup> J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *Journal of Physics and Chemistry B*. **2006**; 110: 15700- 15707.
- <sup>6</sup> I. V. Bakeeva, Y. A. Kolesnikova, N. A. Kataeva, K. S. Zaustinskaya, S. P. Gubin, and V. P. Zubov. Gold nanoparticles as structuring for the formation of hybrid nanocomposites. *Russian Chemical Bulletin*. **2008**; 57: 337-334.
- <sup>7</sup> A. Sugunan, C. Thanachayanont, J. Dutta, J. G. Hilborn. Heavy – metal ion sensors using chitosan capped gold nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*. **2005**; 6: 335-340.
- <sup>8</sup> H. Patra, B. Shuvojit, U. Chandhuri, P. Lahiri, A. Dasgupta. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine*. **2007**; 3: 111-119.
- <sup>9</sup> T. Yonezawa, T. Kunitake. Practical preparation of anionic mercapto ligand- stabilized gold nanoparticles and their immobilization. *Colloids and Surfaces A*. **1999**; 149: 193-199.
- <sup>10</sup> R. Jin, L.S. Moreira Teixeira, P. J. Dijkstra, M. Karperien, C. A. Blitterwijk, Z.Y. Zhong, J. Feijen. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. **2009**; 30: 2544-2551.
- <sup>11</sup> E. Khor, L. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. **2003**; 24: 2339-2349.
- <sup>12</sup> S. Madihally, H. Matthew. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. **1999**; 20: 1133-42
- <sup>13</sup> Li X. Yang B, S. Shi, X. Kong, G. Guo, M. Huang, F. Luo, Y. Wei, X. Zhao. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*. **2010**; 80: 860-865.
- <sup>14</sup> S. Boca, M. Potara, F. Toderas, O. Stephan; P. Baldeck, S. Astilean. Uptake and biological effects of chitosan. Capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells. *Materials Science and Engineering C*. **2011**; 31: 184-189.
- <sup>15</sup> N.V. Majeti, R. Kumar. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. **2000**; 46: 1-27.

- 
- <sup>16</sup> C.K.S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. **2009**; 34: 641-678.
- <sup>17</sup> J. P. Zikakis. Chitin, chitosan and related enzymes. Ed. Academic press inc. 1<sup>a</sup> Edición. **1984**. Orlando. 162.
- <sup>18</sup> K.N. Aye, W.F. Stevens. Technical note improved chitin production by pretreatment of shrimp shells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2004**; 79 :421-425.
- <sup>19</sup> A. Domard, M. Domard. Chitosan: Structure- Properties Relationship and Biomedical Applications. Ed. Marcel Dekker. 2<sup>a</sup> Edicion. **1989**. New York: 187-189.
- <sup>20</sup> F. Shahidi, m J. K. Arachchi, Y.J. Jeon. Food applications of chitin and chitosan; A review. *Trends in Food Science and Technology*. **1999**; 10: 37-51
- <sup>21</sup> F. Quignard, A. Choplin, A. Domard. Chitosan: A natural polymeric support of catalysts of the synthesis of fine chemicals. *Lagmuir*. **2000**; 16: 9106-9108.
- <sup>22</sup> C. Chatelet, O. Damour, A. Domard. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. **2001**; 22: 261-268.
- <sup>23</sup> P. Sandford. Chitosan: Commercial uses and potential applications. Chitin and chitosan sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science. **1989**. New York: 51-59.
- <sup>24</sup> M. Rinaudo. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. **2006**; 31: 603-632.
- <sup>25</sup> M. R. Kumar. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and fuctional polimers*, **2000**; 46: 1-27.
- <sup>26</sup> Q. Li, B. Song, Z. Yang, & H. Fan. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan indifferent acid solutions. *Carbohydrate Polymers*, **2006**; 63:272–282.
- <sup>27</sup> Y. Wan, K. A. M. Creber, B Peppley, V. T. Bui. Ionic conductivity of chitosan membranes. *Polymer*. **2003**; 44: 1057-1065
- <sup>28</sup> J. B. González-Campos, E. Prokhorov, G. Luna-Bárceñas, A. Fonseca-García, I. C. Sanchez. Dielectric relaxations of chitosan: The effect of water on the  $\alpha$ -relaxation and the glass transition temperature. *Journal of Polymer Science B*. **2009**; 47: 272–282.
- <sup>29</sup> L. Ilium. Chitosan an its use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*. **1998**; 15: 1326-1331.
- <sup>30</sup> T Jiang, R. James, S. G. Kumbar, C. T. Laurencin. Chitosan as a Biomaterial: Structure, properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. Chapter 5. Natural and Synthetic Biomedical Polymers. Elsevier Applied Science. **2014** New York : 91-113.
- <sup>31</sup> R. Muzzarelli. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*. **2009**; 76:167-182.
- <sup>32</sup> I. C. Shaw. Gold-based therapeutic agents. *Chemical Review*. **1999**; 99: 2589-2600.
- <sup>33</sup> J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *P.S. Williams*. **1951**: 55-74
- <sup>34</sup> P. Zhao, N. Li, D. Astruc. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2013**; 257:638– 665.

- <sup>35</sup> N. Dung, K. Dong Joo, S. Myoung Gi, K. Kyo Seon. Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl<sub>4</sub>. *Advanced Powder Technology*. **2010**; 21: 111–118.
- <sup>36</sup> H. Huang, X. Yang. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Triphosphosphate. *Biomacromolecules* **2004**; 5: 2340-2346.
- <sup>37</sup> D. Wei, W. Quian. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2008**;62:136–142
- <sup>38</sup> T. Yawo-Kuo, C. Yu-Wan, S. Chao-Ming. Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions. *Powder Technology*. **2008**; 185: 251–257.
- <sup>39</sup> A. N. Shipway, M. Lahav, R. Gabai, I. Willner. Investigations into the electrostatically induced aggreration or Au nanoparticles. *Langmuir*. 2000; 16: 8789-8795.
- <sup>40</sup> A. J. Viudez Navarro. síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Cordoba. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. **2011**.
- <sup>41</sup> M. Köhler, P. Lunkenheimer, A. Loidl. Dielectric and conductivity relaxation in mixtures of glycerol with LiCl. *The European Physical Journal E*. **2008**; 27: 115-122.
- <sup>42</sup> S.F. Edwards. The glass transition in polymers. *Polymer*. **1994**; 35: 3827-3830.
- <sup>43</sup> J. Einfeldt , D. Meißner, A. Kwasniewski. Contributions to the molecular origin of the dielectric relaxation processes in polysaccharides – the high temperature range. *Journal of Non-Crystalline Solids*. **2003**; 320: 40–55.
- <sup>44</sup> M. Al Kobaisi, P. Murugaraj, D. E. Mainwaring. Origin and influence of Water- Induced Chain Relaxation Phenomena in Chitosan Biopolymers. *Journal of Polymer Science. Part B*. **2012**, 50: 403-414.
- <sup>45</sup> D. J. Crofton, R. A. Pethrick. Dielectric studies of proton migration and relaxation in wet cellulose and its derivatives. *Polymer*. **1981**; 22: 1048-1053.
- <sup>46</sup> S. Koutsopoulos. Molecular fabrications of smart nanobiomaterials and applications in personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**; 64: 1459-1476
- <sup>47</sup> Y. Zhang, H. He, W-J. Gao, S-Y Lu, Y. Liu, H-Y Gu. Rapid adhesión and proliferation of keratinocytes on the gold colloid/chitosan film scaffold. *Journal of Materials Science and Engineering*. **2009**; 29: 908-912.
- <sup>48</sup> J-Gang Leu, S. An Chen, H. Min Chen, W. Mein Wu, C. Feng Hung, Y. Der Yao, C. Shun Tu, Y. Jen Liang. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and  $\alpha$ -lipoic acid. *Nanomedicine*. **2012**;8: 767–775
- <sup>49</sup> A. Abbas, A. Lichtman, S. Pillai. Inmunología celular y Molecular. Sexta edición. Editorial Elsevier. **2011**. Amsternam. 19-47.
- <sup>50</sup> T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**; 65:55-63.
- <sup>51</sup> A. Perez Ruiz, A. Rodriguez Calzadilla, M. Vivian y R. Padron Chacon. El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. . *Revista Cubana Estomatología* . **1997**; 34: 84:86.
- <sup>52</sup> S. C. Sahu, M. Amankwa Sakyi, M. W. O'Donnell, R. L. Sprando. Effects of usnic acid exposure on human hepatoblastoma HepG2 cells in culture. *Journal of Applied Toxicology*. **2012**; 32:722–730.



- <sup>53</sup> L. Jing, W. Lei, Y. Xiang, P. Zhi, C. Hong. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferring-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters*. **2009**; 274: 319-326.
- <sup>54</sup> L. Shuangyun, X. Donglin, H. Guijuan, J. Hongxia, W. Yufei, G. Haiying. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2010**; 81: 406-411
- <sup>55</sup> H. Sorg, C. Krueger, B. Vollmar. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *Journal of Anatomy*. **2007**; 211: 810-818.
- <sup>56</sup> J. Coll Morales. Técnicas de diagnóstico en virología. Vol 1. Madrid. Ed. Diaz de Santos. **1993**.
- <sup>57</sup> A. Pawlak, M. Mucha. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica acta*. **2003**; 396: 153-166.
- <sup>58</sup> D. R. Bhumkar, H. M. Joshi, M. Sastry; V. B. Pokharkar. Chitosan reduce gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharmacological Research*. **2007**; 24: 1415-1426.
- <sup>59</sup> J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hiller. The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions Faraday Society*. **1951**; 11: 55-75.
- <sup>60</sup> S. C. Lee, S. W. Lee, J. I. Kang. Preparation and characterization of Chitosan-Gold Nanocomposites for Drug Delivery Application. *Surface Review Letters*. **2010**, 17, 165-172.
- <sup>61</sup> S.F. Edwards. The glass transition in polymers. *Polymer*. **1994**; 35: 3827-3830.
- <sup>62</sup> Z. Osman, Z.A. Ibrahim, A.K. Arof. Conductivity enhancement due to ion dissociation in plasticized chitosan based polymer electrolytes. *Carbohydrate Polymers*. **2001**; 44: 167-173
- <sup>63</sup> J. Otrowska-Czubenko, M. Pieróg, Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. *Ed Polish Chitin Society*. **2010**; 15, 33-40.
- <sup>64</sup> H. Huang, X. Yang. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate. *Biomacromolecules*. **2004**, 5, 2340-2346.
- <sup>65</sup> J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguëlles-Monal, J. Desbrières, M. Rinaudo. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. **2001**; 42: 3569-3580.
- <sup>66</sup> S. Link, M. A. El-Sayed. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *Journal of Physics and Chemistry. B*. **1999**. 103:4212-4217.
- <sup>67</sup> J. Polte, T. Torsten Ahner, F. Delissen, S. S. Sokolov, F. F. Emmerling, A. F. Thünemann, R. Kraehnert, Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. *Journal of American Chemical Society*. **2010**; 132 1296-1301
- <sup>68</sup> J. Polte, M. Herder, R. Erler, S. Rolf, A. Fischer, C. Würth, Mechanistic insights into seeded growth processes of gold nanoparticles, *Nanoscale*. **2010**; 2: 2463-2469
- <sup>69</sup> S. Kumar, K. S. Gandhi, R. Kumar, Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrated Method. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2007**; 46: 3128-3136.
- <sup>70</sup> K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, T. Watanabe. New polymorph of chitosan. *Macromolecules*. **1984**; 17: 973-975

- <sup>71</sup> S. Demarger-Andre, A. Domard. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state. *Carbohydrate Polymers*. **1994**; 23:211- 219
- <sup>72</sup> Z. Zong, Y. Kimura, M. Takahashi, H. Yamane, Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans, *Polymer*. **2000**; 41: 899-906.
- <sup>73</sup> K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, K. Ogawa, Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*. **2000**; 41: 237-247
- <sup>74</sup> A. Heilmann. Polymer films with embedded metal nanoparticles, Springer, Berlin. **2003**.
- <sup>75</sup> N.F. Mott, Metal–insulator transitions. Taylor & Francis, London. **1990**.
- <sup>76</sup> G.C. Psarras. Hopping conductivity in polymer matrix-metal particles. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. **2006**; 37:1545-1553.
- <sup>77</sup> S. Capaccioli, M. Lucchesi, P. A. Rolla, G. Ruggeri. Dielectric response analysis of a conducting polymer dominated by the hopping charge transport, *Journal of Physics Condensed Matter*. **1998**; 10: 5595- 5617.
- <sup>78</sup> H. Huang, X. Yang, Chitosan mediated assembly of gold nanoparticles multilayer, *Colloids and Surfaces. Part A*. **2003**; 226: 77-86.
- <sup>79</sup> K. Esumi, N. Takei, T. Yoshimura, Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces. B*. **2003**; 32: 117-123
- <sup>80</sup> T. Blythe, D. Bloor, Electrical properties of polymers. Cambridge University Press, New York, **2005**
- <sup>81</sup> Adlim and Abu Bakar. Preparation of chitosan-gold nanoparticles part 2. The role of chitosan. Indo. *Journal of Chemistry*. **2008**; 8:320-326.
- <sup>82</sup> F. K. Alanazi, A. A. Radwan, I. A. Alsarra. Biopharmaceutical applications of nanogold. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2010**; 18, 179-193.
- <sup>83</sup> OECD SIDS Initial Assessment Report. Glydicyl methacrylate CAS No. 106-91-2. Japón. **2000**; 1-79.
- <sup>84</sup> OECD 404. Guideline for the testing of chemical. Acute Dermal Irritation/Corrosion. **2002**; 1-40.
- <sup>85</sup> R. Diegelmann, M. Evans. Wound Healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. **2004**; 9: 283-289..
- <sup>86</sup> C.R. Lee, A. J. Grodzinsky, M. Spector. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials*. **2001**; 22: 3145-3154.
- <sup>87</sup> M. M. McFarland-Mancini, H. M. Funk, A. M. Paluch, M. Zhou, P. V. Giridhar, C. A. Mercer, S. C. Kozma, and A. F. Drew. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. *Journal of Immunology*. **2010**; 184: 7221-7228.
- <sup>88</sup> I. Paris, S. Charreau, E. Guignouard, M. Garnier, L. Favot-Laforge, V. Huguier, F.-X. Bernard, F. Morel, J.-C. Lecron. O014 Critical role of Th17 pro-inflammatory cytokines to delay skin wound healing. *Cytokine*. **2012**; 59: 503.
- <sup>89</sup> T. Kimura, M. Sugaya, A. Blauvelt, H. Okochi, S. Sato. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. *Journal of Leukocyte Biology*. **2013**; 94: 137-145.

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DOCTORAL DEL (LA) C. DIANA GINETTE ZARATE TRIVIÑO TITULADA: "USO DE NANOPARTICULAS METALICAS PARA APLICACIONES BIOMEDICAS", FIRMAN AL CALCE DE COMÚN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS VEINTE DÍAS DEL MES DE FEBRERO DEL AÑO 2014.



DR. J. GABRIEL LUNA BÁRCENAS



DR. EVGEN PROKHOROV



DR. FRANCISCO ESPINOZA BELTRÁN



DR. JUAN DE DIOS FIGUEROA CÁRDENAS



DR. ALBERTO HERRERA GÓMEZ



DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA



CINVESTAV - IPN  
Biblioteca Central



SSIT0012396