



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

DISEÑO DE NANORODS DE ORO CON FÁRMACOS FOTOACTIVOS PARA ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

AUTOR: ADRIÀ PALOMARES FERRANDO

TUTORA: Dra. MARÍA CONSUELO JIMÉNEZ MOLERO

COTUTOR: Dr. IGNACIO VAYÁ PÉREZ

Curso Académico: 2020-21

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. M^a Consuelo Jiménez Molero y al Dr. Ignacio Vayá Pérez por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en el Departamento de Química de la ETSII de la “Universitat Politècnica de València”.

Especialmente quiero agradecer a Nacho por ayudarme en todo momento sin importar el día ni la hora, preocupándose para que no tuviese ninguna duda y que pudiera aprender lo máximo posible. Gracias a él he podido desarrollar mis conocimientos dentro del campo de los nanomateriales. Gracias a su profesionalidad he podido potenciar y aumentar mis conocimientos y espero que esto siga así durante muchos años más, ya que me queda mucho por aprender de él y para mi sería un honor seguir formándome y llegar a convertirme en un profesional a su lado.

En segundo lugar, quiero agradecer a Lorena por ayudarme en cualquier momento para que pudiese trabajar en el laboratorio, ya que ha estado a mi disposición en todo momento. Gracias a su buena predisposición he podido aprender tanto a nivel académico como personal, su ayuda ha sido fundamental en todo este proceso.

Por último, quiero agradecer a mis padres y mi hermana por su ayuda y su apoyo, no solo durante este proceso, sino desde siempre. Por toda la confianza que siempre han depositado en mí, siendo fundamental para que cumpla mis metas. Gracias por la forma que me han educado y haber hecho de mí la persona que soy.

Muchísimas gracias a todos los que habéis formado parte de este proceso y por todo el apoyo brindado.

RESUMEN

Este proyecto se ha centrado en el diseño y estudio de las propiedades de nanorods de oro para su posible aplicación en terapia fototérmica (PTT), para el tratamiento de ciertos tipos de cánceres.

La terapia fototérmica se basa en producir un aumento localizado de la temperatura en la zona tumoral con la consiguiente muerte de las células cancerosas. Para ello, se emplean los nanorods de oro (AuNRs), que tras ser irradiados con luz cercana al infrarrojo provocan un aumento de la temperatura debido a sus propiedades estructurales y ópticas características, sin generar daño significativo a los tejidos no cancerosos, ya que no absorben radiación a esa longitud de onda.

Por este motivo, se han sintetizado diferentes AuNRs con el fin de estudiar sus propiedades fototérmicas en función de su tamaño y de su funcionalización con moléculas biocompatibles, tales como PEG y proteínas (HSA).

Para analizar las propiedades fototérmicas de las diferentes muestras de AuNRs con el fin de investigar su posible uso en PTT, se realizó un experimento donde se irradiaron las distintas muestras con luz de distinta energía. Se observó que se generan diferentes incrementos de temperatura dependiendo del tamaño de los AuNRs.

Con estas muestras se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando células cancerosas de mama humana (SKBr-3). En general, se observó que la irradiación de los AuNRs a 808 nm induce un aumento de la citotoxicidad, debido al aumento localizado de la temperatura en las células. También se observó que la funcionalización de AuNRs con HSA y PEG mejoran la biocompatibilidad del nanomaterial, ya que provoca menor muerte celular sin ser irradiados; sin embargo, tras irradiar a 808 nm, la muerte celular aumenta considerablemente, el cual es uno de los principales objetivos buscados en este proyecto.

Palabras clave: alúmina sérica humana, células SKBr-3, espectroscopía UV-Vis, fotobiología, nanorods de oro, terapia fotodinámica.

RESUM

Aquest projecte s'ha centrat en el disseny i estudi de les propietats de nanorods d'or per a la seua possible aplicació en teràpia fototèrmica (PTT), per al tractament d'uns certs tipus de càncers.

La teràpia fototèrmica es basa a produir un augment localitzat de la temperatura en la zona tumoral amb la consegüent mort de les cèl·lules canceroses. Per a això, s'empren els nanorods d'or (AuNRs), que després de ser irradiats amb llum pròxima a l'infraroig provoquen un augment de la temperatura a causa de les seues propietats estructurals i òptiques característiques, sense generar mal significatiu als teixits no cancerosos, ja que no absorbeixen radiació a aqueixa longitud d'ona.

Per aquest motiu, s'han sintetitzat diferents AuNRs amb la finalitat d'estudiar les seues propietats fototèrmiques en funció de la grandària i de la seua funcionalització amb molècules biocompatibles, com ara PEG i proteïnes (HSA).

Per a analitzar les propietats fototèrmiques de les diferents mostres de AuNRs amb la finalitat d'investigar el seu possible ús en PTT, es va realitzar un experiment on es van irradiar les diferents mostres amb llum de diferent energia. Es va observar que es generen diferents increments de temperatura depenent de la grandària dels AuNRs.

Amb aquestes mostres es van realitzar assajos de viabilitat cel·lular utilitzant cèl·lules canceroses de mama humana (SKBr-3). En general, es va observar que la irradiació dels AuNRs a 808 nm indueix un augment de la citotoxicitat, a causa de l'augment localitzat de la temperatura en les cèl·lules. També es va observar que la funcionalització de AuNRs amb HSA i PEG milloren la biocompatibilitat del nanomaterial, ja que provoca menor mort cel·lular sense ser irradiats; no obstant això, després d'irradiar a 808 nm, la mort cel·lular augmenta considerablement, el qual és un dels principals objectius buscats en aquest projecte.

Paraules clau: alúmina sèrica humana, cèl·lules SKBr-3, espectroscopía UV-Vis, fotobiología, nanorods d'or, teràpia fotodinámica.

ABSTRACT

This project has focused on the design and study of the properties of gold nanorods for their possible application in photothermal therapy (PTT), i. e. for the treatment of certain types of cancers.

Photothermal therapy is based on producing a localized enhancement of the temperature in the tumor area, with the consequent death of cancer cells. For this purpose, gold nanorods (AuNRs) have been used, which after being irradiated with near infrared-light, are able to induce an increase in temperature due to their characteristic structural and optical properties, without generating significant damage to non-cancerous tissues, since they do not absorb radiation at this wavelength.

For this reason, different AuNRs have been synthesized and functionalized with biocompatible molecules, such as PEG and proteins (HSA), in order to study their photothermic properties as a function of their size.

To analyze the photothermic properties of the different AuNRs in order to investigate their possible use in PTT, an experiment was carried out where all samples were irradiated with light of different energies. It was observed that the temperature rises differently depending on the size of AuNRs.

Finally, cell viability assays were performed using human breast cancer cells (SKBr-3). In general, it was observed that the irradiation of AuNRs at 808 nm induces an increase of cytotoxicity, due to the localized enhancement of the temperature within the cells. It was also observed that the functionalization of AuNRs with HSA and PEG improve the biocompatibility of the nanomaterials, since it induces less cell death without being irradiated; however, after irradiation at 808 nm, cell death increases considerably, which is one of the main objectives of this project.

Keywords: human serum albumin, gold nanorods, photodynamic therapy, photobiology, SKBr-3 cells, UV-Vis spectroscopy.

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

DOCUMENTO I: MEMORIA TÉCNICA

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

ÍNDICE DE LA MEMORIA TÉCNICA

1.	OBJETIVOS	11
2.	INTRODUCCIÓN	15
2.1.	EVOLUCIÓN DE LOS NANOMATERIALES.....	15
2.2.	NANOMATERIALES APLICADOS EN BIOMEDICINA	20
2.2.1.	NANOMATERIALES COMO AGENTES DE DIAGNÓSTICO	21
2.2.2.	NANOMATERIALES COMO AGENTES TERAPÉUTICOS	22
2.3.	NANOPARTÍCULAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	23
2.3.1.	NANOESEFERAS DE ORO	25
2.3.2.	NANORODS DE ORO	26
2.3.3.	OTRAS CONFIGURACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	27
2.4.	SÍNTESIS DE NANORODS DE ORO	28
2.4.1.	MÉTODO DE PLANTILLA	29
2.4.2.	MÉTODO ELECTROQUÍMICO	31
2.4.3.	MÉTODO DE CRECIMIENTO CON SEMILLAS	32
2.5.	FUNCIONALIZACIÓN DE NANORODS DE ORO	33
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	37
3.1.	SÍNTESIS DE NANORODS DE ORO	37
3.2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO	40
3.2.1.	ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN UV-VIS.....	40
3.2.2.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	45
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE AuNRs PARA SU POSIBLE USO EN PTT	48
3.4.	FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO	53
3.4.1.	FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO CON HS-PEG-COOH.....	53

3.4.2. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO CON LA PROTEÍNA ALBÚMINA SÉRICA.....	57
3.5. ESTUDIO CELULAR. ENSAYOS BIOLÓGICOS CON SKBR3.....	59
3.6. ESTUDIOS FUTUROS	63
4. CONCLUSIONES	67
5. BIBLIOGRAFÍA	71
6. ANEXOS	75
6.1. ANEXO I: Fichas de seguridad de los reactivos.....	75
6.2. ANEXO II: Equipos instrumentales	81

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN	87
2. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL	88
2.1 PARTIDA I: PRESUPUESTO PARCIAL DE LA SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE LOS AuNRs	88
2.2 PARTIDA II: PRESUPUESTO PARCIAL DEL ESTUDIO CELULAR DE LOS AuNRs CON LÍNEAS CELULARES SKBr-3.....	91
3. PRESUPUESTO BASE DE LICITACIÓN.....	95

DOCUMENTO I: MEMORIA TÉCNICA

1.OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en el diseño y funcionalización de nanorods de oro (AuNRs) de distinto tamaño con el fin de investigar sus propiedades ópticas y térmicas para su posible uso en aplicaciones biológicas (*i. e.*, terapia fototérmica, PTT)

Para ello, se ha seguido y tratado de optimizar distintos métodos de síntesis de AuNRs, así como diferentes formas de poder funcionarlos con moléculas orgánicas biocompatibles. Se ha estudiado las propiedades fototérmicas de diferentes sistemas, irradiando con luz de diferente energía con el fin de conocer el potencial de estos para provocar un aumento de temperatura que se pueda traducir finalmente en el uso de dichos sistemas en PTT.

Finalmente, el trabajo también tiene como objetivo estudiar la citotoxicidad de los AuNRs diseñados tras irradiarlos con luz. Para ello, se han hecho estudios fotobiológicos con líneas celulares del tipo SKBr-3 (células cancerosas de mama humana).

2.INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EVOLUCIÓN DE LOS NANOMATERIALES

El prefijo ‘nano’ es un prefijo griego cuyo significado más general es ‘muy pequeño’; este representa una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} m) [1]. Durante los últimos años, la nanotecnología y la nanociencia han atraído un gran interés en el ámbito de la investigación científica ya que poseen un enorme potencial para multitud de aplicaciones a nivel tecnológico y biomédico [2].

La nanociencia es el estudio de sistemas de escala nanométrica (1-100 nm), mientras que la nanotecnología se define como el diseño, la caracterización, la producción y la aplicación de dichos sistemas en diferentes áreas, bien tecnológicas, médicas, etc.

El desarrollo de la nanociencia se remonta a la época de los griegos en el siglo V a.C., cuando los científicos cuestionaban si la materia era continua o está compuesta por partículas pequeñas llamadas átomos [1]. Tanto el descubrimiento de Watson y Crick de la estructura del ADN en el año 1953 como el estudio de los fullerenos de carbono en los años 80 se puede considerar nanociencia [2].

Los sistemas principales de la nanotecnología y que la nanociencia estudia son los nanomateriales, puesto que han ganado gran relevancia en los avances tecnológicos debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Los nanomateriales se definen como un material natural o sintético compuesto por partículas no ligadas, aglomeradas o agregadas con unas dimensiones externas en el rango de 1 a 100 nm [3].

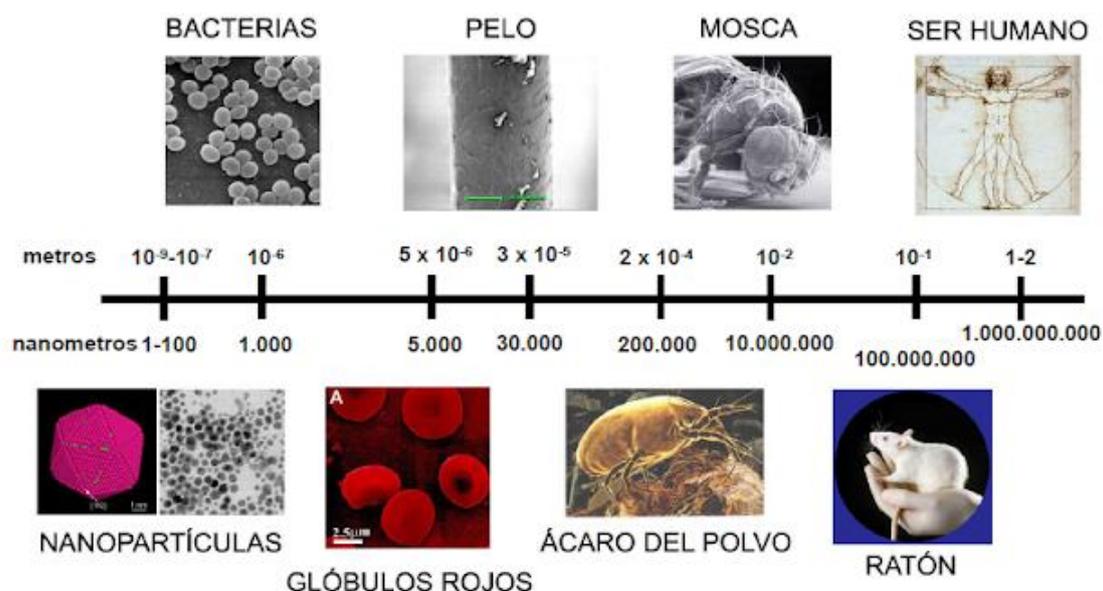


FIGURA 1. Ejemplos de sistemas nanométricos y de tamaño superior. Imagen sacada de la Ref. [4].

Las propiedades de los nanomateriales pueden variar en función de su tamaño. Cuando se tiene un material a escala nanométrica, su área superficial es mucho mayor comparada con la misma cantidad de material de mayor tamaño, lo cual le puede conferir mayor reactividad, variando, asimismo, sus

propiedades eléctricas y resistencia. Existen algunos ejemplos donde un material de tamaño nanométrico puede ser reactivo, pudiéndose utilizar para determinadas aplicaciones, mientras que, si su tamaño aumenta, este pasa a ser inerte[5]. Por ejemplo, el carbono en tamaño nanométrico muestra una elevada radiactividad oxidativa que pueden provocar inflamación al ser inhaladas, convirtiéndose en una las nanopartículas más tóxicas presentes en el aire[6]. Otra razón que provoca una modificación de las propiedades del material es que los efectos cuánticos empiezan a intervenir en su comportamiento, afectando tanto al comportamiento eléctrico como magnético y óptico del nanomaterial. Por lo tanto, se abre un amplio abanico que posibilita el diseño de una gran diversidad de nanomateriales que pueden ser utilizados en diferentes áreas de aplicación [5].

Los nanomateriales han contribuido en el progreso económico de muchos países, lo que ha provocado un mayor interés de producción de materiales a escala nanométrica de diferentes formas y dimensiones. Existe amplia diversidad de nanomateriales, por eso se pueden clasificar de diferentes formas. Dependiendo del material que lo compone existe la siguiente clasificación [3]:

- Nanomateriales basados en carbono:

Son nanomateriales compuestos por carbono. Se forman a partir de la disociación de dióxido de carbono en fase de opalescencia crítica. Existen en diferentes morfologías como esferas, tubos huecos, elipsoides, etc. Los nanomateriales de carbono han favorecido el desarrollo de numerosos componentes electrónicos y funcionales. Algunos ejemplos de nanomateriales de carbono son: fullerenos, grafeno, nanofibras de carbono, etc.

- Nanomateriales de base orgánica:

Son nanomateriales sintetizados a partir de materia orgánica a excepción del carbono. Los nanomateriales orgánicos sirven para el diseño de diferentes estructuras como liposomas, micelas y dímeros gracias a las interacciones débiles que realizan la función de autoensamblaje.

- Nanomateriales de base inorgánica:

Estos nanomateriales se pueden sintetizar a partir de metales como el oro (Au), la plata (Ag), el hierro (Fe), el platino (Pt), o semiconductores y óxidos metálicos.

- Nanomateriales compuestos:

Los nanomateriales compuestos consisten en cualquier combinación de nanomateriales basados en carbono, metales y base orgánica. Dependiendo de su síntesis, adquieren diferentes morfologías con unas propiedades determinadas.

Los nanomateriales también se pueden clasificar en función de su origen, ya que pueden ser nanomateriales naturales o sintéticos. Los nanomateriales naturales se producen a partir de especies biológicas o por actividades antropogénicas. La Tierra está formada por nanopartículas que se han producido de forma natural a lo largo de la evolución. Se pueden encontrar en cualquier lugar de la tierra como puede ser en aguas subterráneas, rocas, en la atmósfera, lava, etc. Por el contrario, los nanomateriales sintéticos se producen a partir de procesos artificiales como la trituración mecánica y procesos físicos, químicos y biológicos [3].

Además de la clasificación de los nanomateriales dependiendo del material que lo constituye y su origen, una de la clasificación más importante es atendiendo a sus dimensiones. Al existir numerosos nanomateriales con diferente forma, se pueden agrupar del siguiente modo:

- Nanomateriales de dimensión 0:

Este tipo de nanomaterial presenta todas sus dimensiones dentro de la escala nanométrica; reciben el nombre de nanopartículas. Dentro de este grupo se encuentran los fullerenos, nanoarcillas, nanomateriales inorgánicos metálicos y los quantum-dots.

- Nanomateriales unidimensionales:

Son nanomateriales que presentan dos dimensiones dentro de la escala nanométrica. Se incluyen los nanotubos y las nanofibras de carbono.

- Nanomateriales bidimensionales:

Estos nanomateriales poseen sólo una dimensión dentro de la escala nanométrica. Tienen forma laminar y entre ellos se encuentran el grafeno, los nanofilms y los nanocoatings.

- Nanomateriales tridimensionales:

Este tipo agrupa a los materiales que no tienen ninguna dimensión dentro de la escala nanométrica. Dentro de este grupo se encuentran los materiales nanoestructurados.

Debido al gran interés que ha suscitado el uso de nanomateriales en diversas áreas tanto tecnológicas como médicas, en los últimos años ha aumentado el presupuesto destinado a la investigación y desarrollo de este tipo de materiales, provocando un gran avance de este campo [5].

Aunque parezca que los nanomateriales se han utilizado para determinadas aplicaciones sólo en los últimos años, en realidad la humanidad ya los utilizaba en el siglo IV d.C., como ya lo hicieron los antiguos romanos. Un ejemplo de ello es la copa de Licurgo, que consiste en una copa compuesta por el vidrio dicróico; este es un tipo de vidrio que cambia de color en función de las condiciones de iluminación, dependiendo de si la luz pasa o no a través del vidrio [1]. Este efecto se obtiene mediante un vidrio que le han introducido nanopartículas de oro y plata, provocando que la copa de Licurgo tome un color rojizo cuando se ilumina por detrás y un color verde cuando se ilumina por delante.

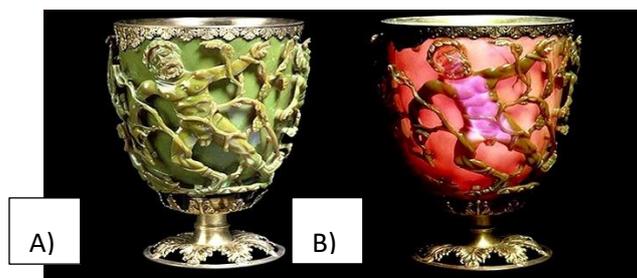


FIGURA 2. Copa de Licurgo. Color verde (A): la copa se ilumina por delante; color rojo (B): la copa se ilumina por detrás.

Posteriormente, en la edad medieval utilizaban esta propiedad para poder decorar las iglesias con vidrieras de diferentes colores, confirmando que el uso de las nanopartículas para diferentes aplicaciones ya se producía en el mundo antiguo [3].

Durante el siglo IX d.C., los mesopotámicos usaban cerámica vidriada para decoloraciones de brillo metálico. Estas decoloraciones mostraron propiedades ópticas asombrosas a causa de la presencia de nanopartículas de Ag y/o Cu aisladas dentro de las capas de esmalte más externas. Mediante estas decoloraciones se observan muestras de color verde y azul brillantes iridiscentes bajo condiciones de reflexión particulares. El análisis TEM reveló que este tipo de cerámicas posee un recubrimiento de

doble capa de nanopartículas, una capa externa de nanopartículas de plata más pequeñas (5-10 nm) y una capa interna de nanopartículas más grandes (5-20 nm). También se observó que la distancia entre las dos capas era aproximadamente 430 nm provocando efectos de interferencia. Además, los minerales que componían la arcilla son el mejor ejemplo del uso natural de los nanomateriales desde la antigüedad; se informó que incluso en 5000 a.C. se utilizaba arcilla para blanquear lanas y ropa en Chipre [3].

Los nanomateriales fabricados en la actualidad pueden mejorar considerablemente las características de estos en términos de resistencia, conductividad, durabilidad y ligereza. Estas propiedades se pueden utilizar en diferentes aplicaciones, por ejemplo, la autocuración anticoagulante y antibacteriana.

La investigación sobre nanopartículas ha proporcionado una base sólida con respecto a la comprensión del comportamiento de los nanomateriales artificiales en el cuerpo, así como de la seguridad en su uso en aplicaciones médicas y en estudios toxicológicos. Por ejemplo, se realizaron diversos estudios utilizando nanopartículas de dióxido de titanio y óxido de aluminio en ratas, observando una mayor respuesta inflamatoria en los pulmones en comparación con la misma masa de partículas más grandes y con la misma composición química [2].

La capacidad teórica de los nanomateriales diseñados para interactuar con los sistemas biológicos en formas adversas creó un gran interés en la comunidad toxicológica que se aceleró enormemente y provocó un interés en la industria farmacéutica sobre el uso de nanomateriales para sistemas de administración de fármacos [2].

A partir del año 2003, la empresa Samsung introdujo una tecnología antibacteriana utilizando nanomateriales de plata iónica en sus lavadoras, aires acondicionados, refrigeradores, etc. También se empezaron a utilizar nanomateriales en otras industrias como la del automovilismo, como relleno en neumáticos que mejoran su adherencia y en las carrocerías para mejorar su rigidez. Por ejemplo, a finales del 2003 Mercedes Benz introdujo una capa de nanopartículas transparentes sobre los acabados de pintura para aumentar la resistencia al rayado y realzar el brillo. Así pues, con el paso de los años se ha incrementado el uso de una amplia variedad de nanomateriales en diferentes productos de consumo [3].

Debido al gran avance en el diseño de nanomateriales, se han podido realizar aplicaciones en diferentes campos, entre las que destacan los siguientes:

- Tecnologías de la información y las telecomunicaciones:

La nanociencia y las nanotecnologías tiene un papel fundamental en la evolución de la tecnología de la información. El empleo de los nanomateriales ha sido fundamental para poder fabricar instrumentos electrónicos de menor tamaño, utilizando sus propiedades ópticas y magnéticas para conseguir celdas capaces de guardar información. Destaca la creación de microchips, como por ejemplo los de silicón. Para fabricar los nanochips se emplean nanomateriales conductores incrustados en una placa que hace la función de soporte, creando un circuito capaz de conducir la electricidad a los diferentes compuestos del microchip.

En los sensores también se utilizan nanomateriales para detectar productos químicos presentes en el medio ambiente o bien para indicar si un alimento se encuentra en buen estado o no. Otra aplicación

es el empleo de nanomateriales en determinadas superficies para conseguir mejores prestaciones que el material inicial. Un ejemplo es la electrónica de plástico para pantallas de visualización flexible. También hay mucho interés en las nanopartículas para emitir o absorber la luz para su uso en celdas de energía solar o en etiquetas biológicas fluorescentes.

- Óptica y optometría:

Los nanomateriales poseen propiedades ópticas que varían enormemente en función de su tamaño y forma; así, la nanoóptica permite la obtención de imágenes nanoscópicas con mucha mayor resolución (por debajo de la longitud de onda) [7].

- Alimentación:

Algunos de los alimentos que ingerimos presentan nanomateriales. Estos se utilizan para mejorar el valor nutricional de los alimentos, mejorando la absorción y la administración de determinados nutrientes, vitaminas y algunos ácidos grasos en suplementos. Las nanopartículas modifican las propiedades de los alimentos, como por ejemplo la viscosidad, mejorando así la textura del alimento. También interesa el empleo de nanomateriales en el envasado de los alimentos para proporcionar las mejores condiciones de conservación. El principal objetivo es asegurar la protección y la calidad del alimento. Se utilizan nanomateriales en envases y recubrimientos para controlar el intercambio de gases, humedad y temperatura ya que admiten la incorporación en su estructura de compuestos como antioxidantes, absorbentes de oxígeno, etc. Además, los nanomateriales tienen ventajas para ser reciclables, reduciendo la contaminación ambiental [8].

- Catálisis:

Los catalizadores hechos a partir de nanomateriales presentan una elevada área superficial proporcionando grandes ventajas, ya que se obtienen elevados rendimientos. Por ejemplo, materiales cerámicos nanoporosos y las nanopartículas de oro son nanomateriales utilizados como catalizadores.

- Bionanotecnología y nanomedicina:

Dentro de campo de la medicina, los nanomateriales son muy prometedores por el gran avance que aportan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Así, se utilizan en bioimagen o en permitir liberación controlada y localizada de fármacos.

También está aumentando el uso de nanomateriales en la producción de dispositivos o sensores para controlar diferentes aspectos de la salud humana, así como en apósitos para heridas con propiedades antibacterianas.

- Aplicaciones industriales:

Los nanomateriales disponen de propiedades que les permite ser utilizadas en aplicaciones muy variadas a nivel industrial. El uso de nanopartículas proporciona la modificación de las propiedades de otros materiales, fabricación de productos tecnológicos de mayor calidad y obtención de productos químicos. Todo esto permite a los nanomateriales ser utilizados en un amplio abanico de aplicaciones industriales como pueden ser, refuerzo de materiales poliméricos, metálicos o cerámicos y obtención de productos textiles, cosméticos y pinturas o tintes, utilizándose en la industria textil, aeroespacial, automovilística y de cosmética entre muchos otros sectores.

La amplia gama de aplicaciones que tienen los nanomateriales provoca que la nanotecnología sea una de las tecnologías más prometedoras del siglo XXI. Tiene la capacidad de convertir la teoría de la

nanociencia en aplicaciones útiles, utilizándose en una amplia gama de campos, desde la química hasta la física y biología, a la medicina, la ingeniería y la electrónica.

2.2. NANOMATERIALES APLICADOS EN BIOMEDICINA

Desde principios del siglo XXI, ha habido un mayor interés en los campos de la nanociencia y la nanotecnología, donde han progresado en diversos campos de la ciencia como son la informática, la biología y la medicina. Varios estudios destacaron el enorme potencial que tienen las nanotecnologías en la biomedicina para el diagnóstico y la terapia de muchas enfermedades humanas. En este sentido, muchos expertos consideran la bionanotecnología como uno de los campos de aplicación más intrigantes de la nanociencia [5]. De entre todos los campos de aplicación que los nanomateriales pueden desempeñar un papel importante, el que despierta un interés creciente dentro de la comunidad científica es su aplicación dentro del campo de la bionanotecnología y de la nanomedicina.

Durante las últimas décadas, las aplicaciones de los nanomateriales en muchas áreas relacionadas con la biomedicina, como en el diagnóstico, la administración de fármacos, en imagen molecular, etc., se están investigando intensamente y obteniendo excelentes resultados.

Actualmente, una gran cantidad de productos relacionados con la medicina contienen nanomateriales, como por ejemplo los nanofármacos; estos consisten en fármacos que incluyen nanomateriales, así como nanopartículas con actividades antibacterianas o nanoestructuras funcionalizadas para la detección de biomarcadores como nanobiochips, nanoelectrodos o nanobiosensores [1].

De entre todos los tipos de nanomateriales que se pueden aplicar en el campo de la biomedicina, los nanomateriales metálicos resultan los más interesantes y de gran potencial. Actualmente, los nanomateriales metálicos tienen una gran utilidad en la biomedicina, especialmente en las áreas de diagnóstico y terapia. Los nanomateriales metálicos están compuestos básicamente por un núcleo magnético y una envoltura polimérica que estabiliza su estructura. Generalmente, en biomedicina, los nanomateriales más utilizados tienen un tamaño entre 5 y 100 nm.

Los nanomateriales tienen unas propiedades físicas particulares que despiertan un gran interés en el campo de la biomedicina, entre las que destacan su núcleo magnético, su alta facilidad para unir moléculas de interés biológico en la superficie del nanomaterial y por la relación que existe entre la superficie y el tamaño. La morfología que presenta este tipo de materiales posibilita la interacción con diferentes estructuras celulares, por eso sirve de gran utilidad para diferentes aplicaciones con estructuras subcelulares y moleculares.

Los nanomateriales más utilizados e investigados en la actualidad son los que presentan un núcleo magnético, por las propiedades supermagnéticas. Los metales que generalmente se utilizan para el diseño de estos sistemas son: oro, platino, cobre, hierro, plata y sílice. Entre estos metales destaca el oro, ya que posee grandes ventajas como son su alta compatibilidad biológica, sus propiedades ópticas particulares, es químicamente inerte y ofrece una superficie con buena capacidad para ser funcionalizada con fármacos y/o sistemas biológicos (proteínas, hormonas, etc.); además, en el proceso de síntesis, se puede controlar tanto el tamaño y como la forma del nanomaterial deseado. Otra particularidad a destacar de los nanomateriales de oro es su fácil biodegradación en el organismo.

Después de ser metabolizados, determinados iones metálicos se sitúan en los depósitos energéticos del organismo y a veces se incorporan en la hemoglobina.

Aunque generalmente los nanomateriales metálicos poseen una alta biocompatibilidad, en ocasiones también pueden presentar toxicidad ya que tienden a agregarse, particularmente en la presencia de fluidos biológicos debido a la existencia de proteínas plasmáticas y sales. Este hecho inhabilita su utilización en aplicaciones biomédicas, ya que provocaría obstrucciones en los capilares pequeños. La cubierta polimérica que envuelven a los nanomateriales sirve de barrera física para evitar la agregación de las nanopartículas. Uno de los polímeros más utilizados para estabilizar las nanopartículas es el polietilenglicol (PEG), por su alta biocompatibilidad y alta afinidad con el nanomaterial y su gran capacidad antiadherente que reduce la captación de las partículas por los macrófagos, incrementando el tiempo de circulación en sangre. Otros polímeros que se utilizan son el polivinilalcohol (PVA) y el polisacárido dextrano [9].

En la actualidad, uno de los mayores retos de la biomedicina es conseguir detectar o diagnosticar las enfermedades en su fase más inicial, para evitar que se produzcan daños irreparables. Por eso existe un objetivo principal en utilizar nanomateriales biofuncionalizados para conseguir lograr su localización en zonas determinadas del organismo para que tengan la utilidad de marcar magnéticamente ciertos tipos de células, como por ejemplo células tumorales.

Esto ha provocado que los nanomateriales tengan un mayor número de aplicaciones biológicas, entre las que destacan su uso como agentes de diagnóstico y terapéutico.

2.2.1. NANOMATERIALES COMO AGENTES DE DIAGNÓSTICO

Una de las técnicas más utilizadas para realizar un diagnóstico de forma no invasiva es la imagen de resonancia magnética. Dicha técnica sirve para interpretar las imágenes entre los tejidos normales y patológicos utilizando agentes de contraste. Se han realizado diferentes avances en el campo de diagnóstico ya que usan nanopartículas metálicas como agentes de contraste debido a que estas producen un alto contraste entre este tipo de imágenes (los tejidos normales y patológicos). Por este motivo, las nanopartículas metálicas pueden servir para detectar enfermedades como el cáncer, arteriosclerosis y enfermedades inflamatorias.

Las nanopartículas tienen cierta afinidad a acumularse en zonas donde existe una alteración de la estructura del tejido, como pueden ser los tumores. Este efecto es debido a la permeabilidad y retención aumentada que tienen los tejidos tumorales. Esto se debe a que los tumores poseen capilares fenestrados, ya que son creados rápidamente, lo cual permite la entrada de moléculas de mayor tamaño. También los tejidos tumorales presentan un sistema de drenaje linfático defectuoso, provocando la acumulación de las nanopartículas en las zonas tumorales. Por lo tanto, las nanopartículas metálicas tienen la capacidad de detectar diferentes tipos de tumores.

Se están sintetizando nanopartículas para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias, como pueden ser la esclerosis múltiple y la aterosclerosis, en las que los macrófagos tienen un papel fundamental. Los macrófagos tienen afinidad por las nanopartículas, por lo que su fagocitosis actúa como un

marcador en zonas inflamadas, las cuales podrán ser visualizadas mediante imagen de resonancia magnética.

Otra aplicación de los nanomateriales como agentes de diagnóstico es la de funcionalizarlos para que sean capaces de reconocer y capturar células tumorales que circulen por el corriente sanguíneo. Las nanopartículas se pueden funcionalizar con moléculas específicas que sean capaces de reconocer células tumorales, quedando marcadas magnéticamente por las nanopartículas y que sea fácil capturar las células tumorales mediante imanes.

2.2.2. NANOMATERIALES COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

Como se ha dicho anteriormente, los nanomateriales tienen la capacidad de dirigirse a células específicas, siendo detectadas a través de resonancia magnética. Así, la capacidad de las nanopartículas de circular por el torrente sanguíneo se puede utilizar como agentes terapéuticos, transportando, por ejemplo, fármacos. Todo esto provoca que las nanopartículas sean unos agentes con diferente funcionalidad de gran utilidad en diagnóstico y terapia de diferentes enfermedades.

Una de las aplicaciones de mayor interés que tienen los nanomateriales magnéticos es la de actuar como agentes transportadores de fármacos y liberarlos en lugares concretos del organismo. Esto es posible a partir de la atracción magnética exterior o de la funcionalización de las nanopartículas con moléculas que sean capaces de reconocer células dianas sobre las que actuar, donde debe producirse la liberación del fármaco. Para que esto se produzca, se inyecta intravenosamente nanopartículas magnéticas; seguidamente, estas reconocen algún receptor presente en la membrana de la célula tumoral y se une a él para introducirse en el interior de la célula. Cuando la nanopartícula se encuentra dentro de la célula liberará el fármaco que estaba anclado en su superficie. Para conseguir la liberación del fármaco de la nanopartícula, se deben introducir sensores que sean capaces de responder a diferentes estímulos químicos o biológicos como cambios de pH, potencial redox, etc. En este contexto, mediante fuerzas físicas como campos magnéticos o eléctricos, ultrasonidos, hipertermia o con la acción de la luz, se puede conseguir dirigir y desencadenar la liberación del fármaco de las nanopartículas. Actualmente, existen alrededor de 150 productos farmacológicos basados en agentes nanométricos.

Algunos nanomateriales tienen la capacidad de responder a un campo magnético alterno externo produciendo calor, proporcionando varias ventajas en aplicaciones biomédicas. Una de las más atractivas es la terapia para eliminar células cancerosas por medio de la hipertermia. La hipertermia es una terapia antitumoral centrada en el aumento localizado de la temperatura por encima de 43 °C en la zona tumoral; para ello, se han utilizado nanomateriales de distinta naturaleza, incluyendo nanopartículas de oro, de hierro, nanohilos magnéticos o nanotubos de carbono. La producción de calor utilizando estos sistemas se puede lograr por la aplicación de campos magnéticos externos mediante un láser de longitud de onda apropiada, ultrasonidos, rayos X de potencia baja, etc. Por otra parte, se ha comprobado que la hipertermia aumenta su rendimiento cuando se combina con otras técnicas utilizadas que ambas sirvan para destruir células tumorales, como la radioterapia.

Las células tumorales, de naturaleza hipóxica son resistentes a las radiaciones; sin embargo, el calor destruye por igual células hipóxicas y células normales. Se ha demostrado que se requiere una dosis menor de radiación para destruir la misma proporción de células tumorales cuando se someten previamente a procesos de hipertermia. Por todo ello, los nanomateriales metálicos se consideran como herramientas muy esperanzadoras para la eliminación no invasiva de células tumorales haciendo uso de la técnica de hipertermia.

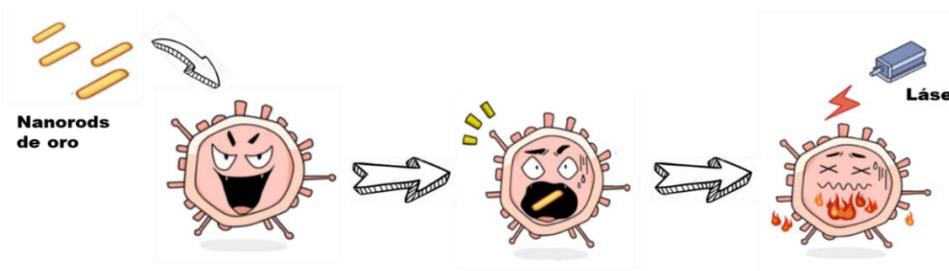


FIGURA 3. Representación de la técnica de hipertermia para la eliminación de células tumorales utilizando nanorods de oro.

2.3. NANOPARTÍCULAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. La Organización Mundial de la Salud publicó que en el año 2020 esta enfermedad fue la causante del fallecimiento de casi 10 millones de personas. Los tipos de cáncer más comunes son el cáncer de mama, pulmonar, colorrectal, próstata, piel y gástrico. El cáncer es una enfermedad que se produce debido a la transformación de las células normales del organismo en células tumorales. Esta alteración deriva de factores genéticos del paciente y de agentes externos. La rápida multiplicación de las células tumorales da lugar a tumores malignos, que si no se tratan con rapidez pueden propagarse a otros organismos, proceso que recibe el nombre de metástasis [10].

La incidencia de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años, por eso cada vez existe un mayor interés para encontrar un tratamiento efectivo que sea capaz de poder eliminar los tumores malignos que se originan en el organismo. Uno de los principales métodos en terapia de tumores es el empleo de calor; en 1700 a.C. ya se utilizaba una punta metálica ardiente para la terapia del cáncer de mama. En la actualidad se han introducido diferentes métodos para el tratamiento de ciertos tumores, como el de irradiar con luz de una determinada longitud de onda a un nanomaterial localizado en el tumor para producir hipertermia. La terapia fototérmica (PTT, PhotoThermal Therapy) logra el calentamiento selectivo empleando agentes fototérmicos, entre los que conviene mencionar a las nanopartículas de oro (AuNPs), cuando estos son irradiados con luz de una energía dada; así, cuando las nanopartículas absorben dicha luz, realizan una transición del estado fundamental al estado excitado; seguidamente, los electrones de los estados excitados pierden su exceso de energía mediante un proceso de relajación vibracional, produciendo un aumento de la temperatura [11].

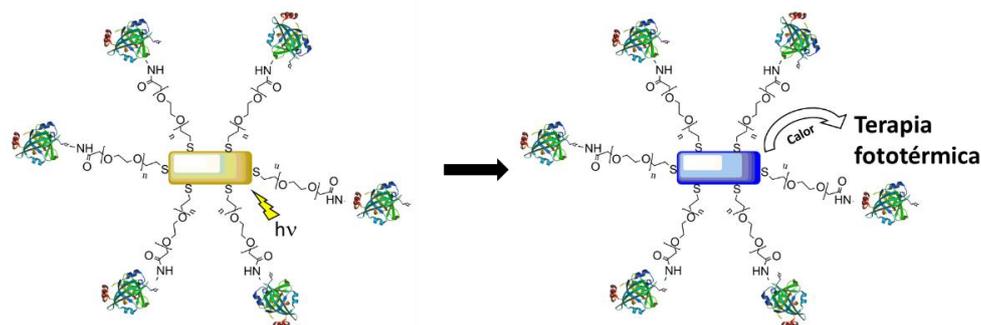


FIGURA 4. Mecanismo de la terapia fototérmica (PTT, PhotoThermal Therapy).

Debido a las propiedades estructurales y ópticas de las nanopartículas, se han convertido en unos agentes terapéuticos de gran utilidad para poder tratar ciertos tumores malignos del organismo; como consecuencia, la terapia fototérmica ha logrado ser una de las terapias más prometedoras para combatir en el futuro los diferentes tipos de cáncer.

Cuando la luz de una cierta energía interacciona con las nanopartículas metálicas, el campo electromagnético de la luz induce una oscilación colectiva de los electrones superficiales de las nanopartículas metálicas en resonancia con la frecuencia de la luz. Éste fenómeno se conoce como resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) [12]. El campo eléctrico de la luz interactúa con los electrones libres de las nanopartículas generando un movimiento colectivo de estos. Se produce pérdida de calor debido a las interacciones con la red de los átomos metálicos, provocando la absorción de la luz y el desplazamiento de los electrones libres con carga negativa respecto al núcleo pesado del metal con carga positiva. Esto genera un dipolo oscilante que emite radiación electromagnética en la misma frecuencia de la oscilación, generando fenómenos de dispersión de luz. La capacidad de dispersar la luz permite a las nanopartículas ser utilizadas para graficar imágenes y el fenómeno de absorción se utiliza en PTT [13].

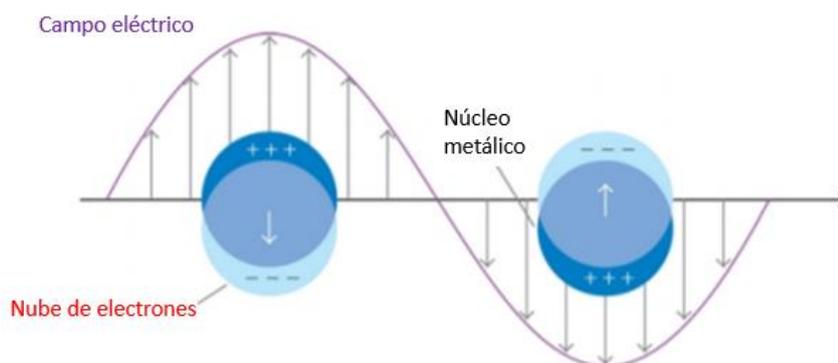


FIGURA 5. Movimiento colectivo de los electrones libres de las nanopartículas. Fenómeno LSPR.

El fenómeno de resonancia de plasmón ha introducido el método PTT como una terapia mucho más selectiva y eficiente contra el cáncer, especialmente utilizando AuNPs con las que se han obtenido excelentes resultados [14]. El oro ya se utilizaba en aplicaciones médicas en la Edad Media, cuando el oro coloidal se empleaba para tratamientos y diagnóstico de enfermedades. Las AuNPs muestran ciertas ventajas en comparación con nanopartículas compuestas por otro tipo de metal ya que poseen

una compatibilidad biológica superior, son fácilmente funcionalizables, y durante el proceso de síntesis es fácil controlar su tamaño y forma. Además de todo esto, sus propiedades ópticas permiten que ciertas AuNPs se puedan irradiar haciendo uso de fuentes de luz en la zona visible y/o infrarroja. Este hecho es importante ya que dicha irradiación no será absorbida por la piel sino mayoritariamente por el nanomaterial de oro que se encuentre localizado en la zona bajo estudio.

Las propiedades plasmónicas de los nanomateriales dependen de su tamaño, forma, de la constante dieléctrica del medio acuoso donde se encuentran las partículas y del ligando estabilizante situado en su superficie.

El rango de longitudes de onda donde se produce la absorción se denomina banda de plasmón superficial. Las nanopartículas esféricas presentan bandas de plasmón con máximos de absorción entre los 530-600 nm, cuya posición depende del diámetro de la nanopartícula. Sin embargo, si se tiene un nanomaterial más alargado (i. e. forma de varilla), al no ser simétrico, la respuesta de las longitudes de onda de absorción vienen determinadas por la oscilación de los electrones en diferentes direcciones [15].

Las nanoestructuras de oro más utilizadas para la terapia fototérmica (PTT) son las nanoesferas (AuNEs) y los nanorods (AuNRs), aunque en los últimos años se han diseñado otro tipo de nanopartículas con forma de estrella, etc.

2.3.1. NANOESFERAS DE ORO

Es la primera estructura que se estudió por su facilidad de fabricación y síntesis. Su pequeño tamaño y su forma basada en liposomas permite una circulación muy eficaz dentro del organismo. Además, las AuNEs tienen una capacidad de funcionalización elevada, lo que hace que sean muy atractivas para aplicaciones de PTT [14]. Estas presentan una única banda de absorción ubicada en la zona visible del espectro electromagnético y, como se ha nombrado anteriormente, su forma depende del tamaño de la nanopartícula.

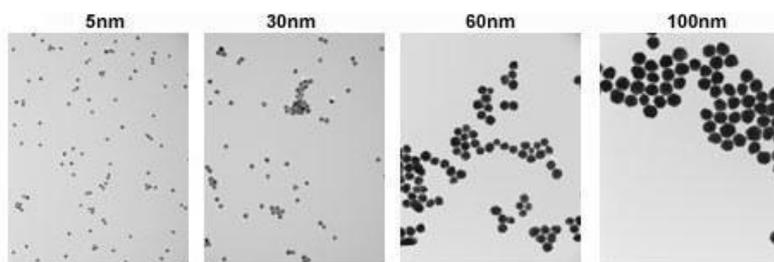


FIGURA 6. Nanopartículas de oro esféricas de diferentes tamaños. Imágenes captadas mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Imagen sacada de la Ref. [16].

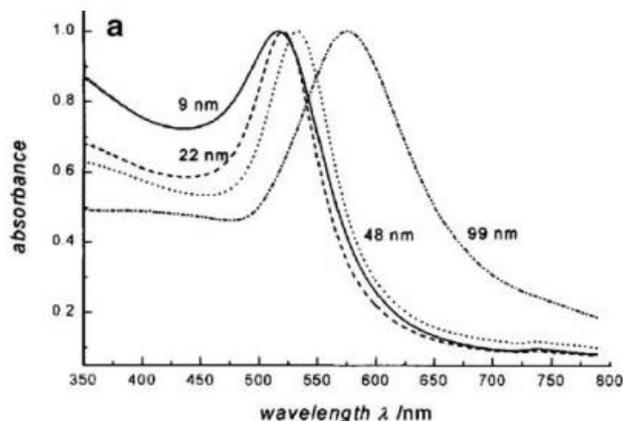


FIGURA 7. Espectro de absorción UV-vis de AuNEs en función del tamaño. Imagen sacada de la Ref. [11].

2.3.2. NANORODS DE ORO

Durante la década de 1990, se realizaron las primeras síntesis de nanorods de oro y se estudiaron sus propiedades por el químico Wang y su equipo. Como se puede observar en la Figura 8, estos tienen forma de varilla. Poseen dos bandas de absorción, la banda transversal de plasmón y la banda longitudinal de plasmón, correspondientes a la oscilación de los electrones a lo largo de la dirección transversal y longitudinal, respectivamente [17]. La banda transversal del plasmón no varía a los cambios de tamaño de AuNR, al contrario de la banda longitudinal del plasmón, que sí varía en función del tamaño del nanorod [12].

La banda trasversal de plasmón presenta un máximo de absorción en la región visible del espectro alrededor de 520 nm. Sin embargo, la banda longitudinal de plasmón, al depender del tamaño de AuNR, se desplaza en general en la región cercana del infrarrojo, aumentando el valor de la longitud de onda cuando aumenta la relación de aspecto largo/ancho del nanomaterial. La banda longitudinal es de mayor intensidad que la transversal y se puede desplazar de 640 a 1050 nm variando la relación de aspecto de 2,4 a 6,6 [17].

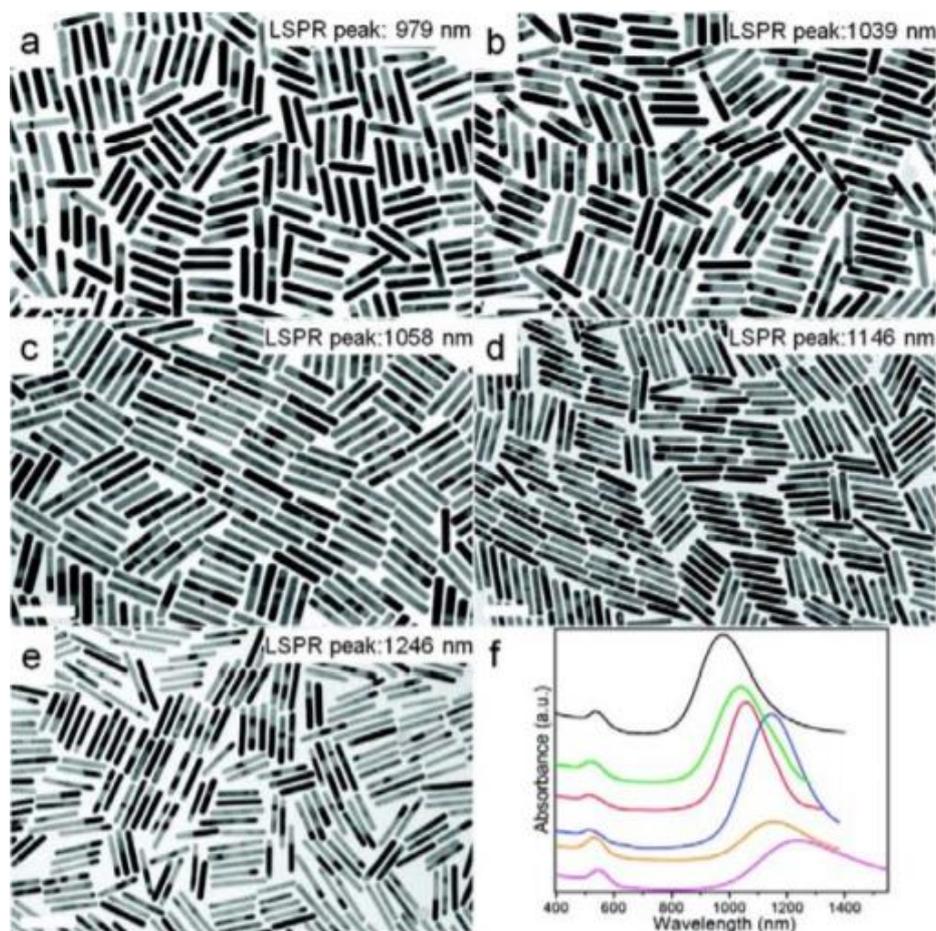


FIGURA 8. Las imágenes a), b), c), d) y e) corresponden a AuNRs de diferentes tamaños, donde se indica la longitud de onda donde se encuentra el máximo de cada banda longitudinal del plasmón. La imagen f) muestra los correspondientes espectros de absorción UV-vis de los distintos AuNR. Imagen sacada de la Ref. [12].

Como se ha comentado con anterioridad, el tejido humano no absorbe luz a una longitud de onda cercana al infrarrojo; por tanto, la región cercana al infrarrojo es óptima para irradiar la zona del organismo bajo estudio donde se encuentre localizado AuNR, por lo que el daño que se produce a los tejidos no cancerosos será mínimo, convirtiendo así a AuNRs en unos nanomateriales muy prometedores para su utilización en PTT [11].

2.3.3. OTRAS CONFIGURACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

A medida que van apareciendo nuevas metodologías de síntesis, se van desarrollando nuevas configuraciones de nanopartículas de oro. Por ejemplo, las nanoestrellas de oro (ver Figura 9), con su estructura delgada y ramificada, tienen la capacidad de mejorar la absorción de luz cerca de la zona del infrarrojo porque las propiedades plasmónicas en las puntas de las nanopartículas son mejores que

otras configuraciones. Este hecho hace que las nanoestrellas de oro puedan ser muy útiles para aplicaciones fototérmicas.

Algunas modificaciones recientes de la nanotecnología incluyen la encapsulación de nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas para terapia de imagen y autoensamblaje, con el fin de mejorar la eficiencia y biocompatibilidad de la terapia fototérmica [14].

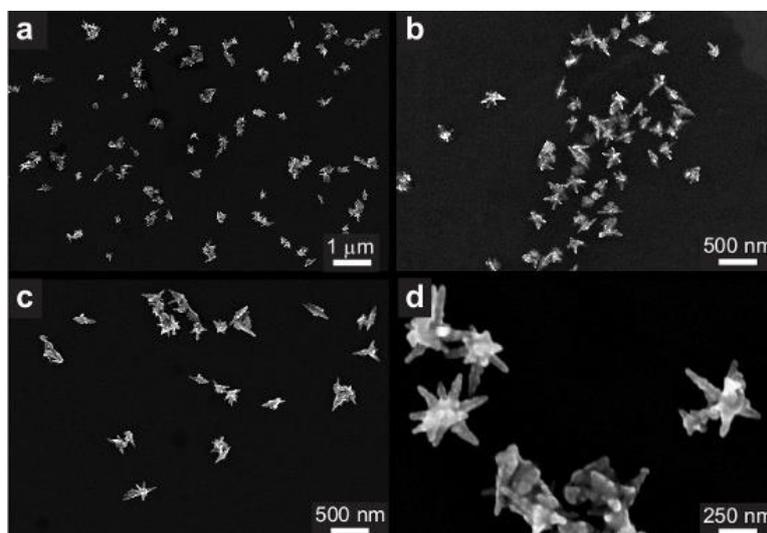


FIGURA 9. Imágenes de nanoestrellas de oro por microscopía electrónica de transmisión. Imagen sacada de la Ref. [18].

2.4. SÍNTESIS DE NANORODS DE ORO

El método de síntesis utilizado es determinante para la posterior aplicación de las nanopartículas de oro, ya que en función del método seguido se obtendrán AuNPs de oro esféricas, en forma de rod, etc., que serán útiles para diferentes aplicaciones. Esto es especialmente importante cuando las nanopartículas van a ser utilizadas en aplicaciones médicas y biológicas, ya que se necesita un tamaño y forma determinado para que cumplan su función sin causar ningún daño en el organismo.

Las primeras nanopartículas utilizadas en las vidrieras de las iglesias se obtuvieron a partir de oro sólido cuyo tamaño se reducía mediante procesos físicos. En 1857, Faraday publicó un informe sobre la síntesis de oro coloidal; consiguió obtener disoluciones rojizas a partir de la reducción de una disolución de tetracloroáurico (HAuCl_4) con una mezcla bifásica de fosforo en disulfuro de carbono. En 1908, se realizaron estudios para explicar la razón detrás de los colores de la disolución de nanopartículas [3]. Faraday fue el primero en darse cuenta de la dependencia del color de la disolución con el tamaño de la nanopartícula. Más adelante, en la segunda mitad del siglo XX, aumentó el interés en el control del tamaño y la forma de las nanopartículas en función del método de síntesis. Así, se produjeron ciertos avances con el método de Turkevich (1951), posteriormente mejorado por Frens en 1973. Fue en 1993 cuando Muvaney y Girsing llevaron a cabo la primera síntesis y estabilización de

nanopartículas de oro utilizando tiolatos. Esta técnica fue mejorada por Schiffrin en 1994 con el método bifásico Brust-Schiffrin [19].

Actualmente hay más de 70.000 publicaciones sobre síntesis de AuNPs, las cuales se han ido mejorando y optimizando, permitiendo un mayor control del tamaño y forma de la nanopartícula deseada [19]. Todas las síntesis de nanopartículas de oro que existen hoy en día siguen dos técnicas diferentes: *top down* o *bottom up*. Respecto a la *top down*, fue la primera técnica de síntesis de nanopartículas; se obtenían a partir de un material sólido mediante procesos físicos, como por ejemplo, molienda o erosión hasta conseguir el tamaño de partícula deseado. Por el contrario, la técnica *bottom up* consiste en diferentes síntesis de AuNPs donde se generan moléculas de oro individuales a partir de una reducción química o biológica de una sal de oro; posteriormente, dichas moléculas reducidas se irán agrupando para formar las nanopartículas con un tamaño y forma determinados [12]. La técnica *bottom up* consta de tres fases: la primera consiste en la *nucleación*, donde se produce la reducción de Au^{3+} a Au^0 , formando pequeños núcleos de oro sólido. La siguiente fase es la *fase de crecimiento*, donde los pequeños núcleos de oro tienen una energía superficial elevada y se van uniendo, aumentando así su tamaño y disminuyendo su energía superficial, consiguiendo una menor energía de Gibbs. Por último, la *fase de coagulación* es la más importante para controlar el tamaño final de las nanopartículas. En esta etapa, las nanopartículas coagulan, aumentando su tamaño hasta que actúan los agentes estabilizantes, como por ejemplo el surfactante catiónico CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), que tiene un papel fundamental definiendo la coagulación en un momento determinado [20].

La síntesis de nanorods de oro (AuNRs) resultó ser una síntesis complicada por su estructura característica en forma de varilla. El interés que había despertado en la comunidad científica por sus propiedades ópticas únicas provocó que muchos investigadores se dedicaran a desarrollar un proceso de síntesis de AuNRs sencillo y reproducible. Con el tiempo han aparecido diferentes métodos que han ido introduciendo mejoras para disminuir la dificultad en el proceso de síntesis; a continuación, se comentarán algunos de los diferentes métodos que existen [21]:

2.4.1. MÉTODO DE PLANTILLA

El método de plantilla para la síntesis de AuNRs fue propuesto por primera vez por Martin y su equipo [12]. Este método consiste en la deposición electroquímica de oro sobre una plantilla, donde se puede depositar dentro de los poros de policarbonato nanoporoso o sobre una membrana de aluminio. Este método fue inicialmente empleado para elaborar electrodos microscópicos, pero posteriormente se aplicó para la síntesis de nanorods [21].

La plantilla se prepara a partir de la anodización del aluminio en una solución ácida. La anodización consiste en una técnica para modificar la superficie de un material donde se genera una capa protectora sobre el aluminio por medio del óxido protector del aluminio, conocido como alúmina. Después de realizar el proceso de anodización aparecen poros uniformes cuyo tamaño depende del tiempo de anodización [22].

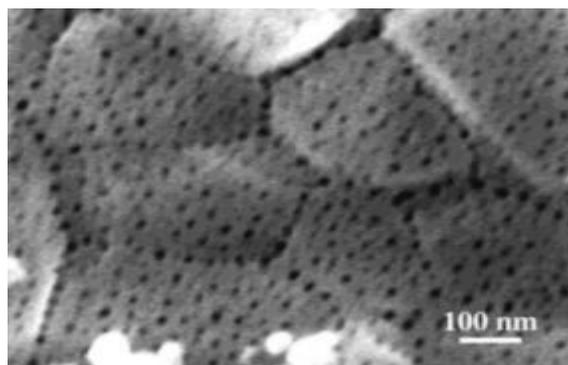


FIGURA 10. Imagen de la membrana de alúmina tomada por microscopio electrónico de barrido. Imagen sacada de la Ref. [12].

Una vez se obtiene la plantilla, se lleva a cabo el siguiente proceso: inicialmente, se pulveriza una pequeña cantidad de cobre o plata sobre la membrana de alúmina para crear una película conductora por electrodeposición, la cual se utilizará como base para la síntesis de AuNRs (etapa 1). A continuación, se lleva a cabo la electrodeposición de oro dentro de los poros de alúmina (etapa 2). Posteriormente, se diluye selectivamente tanto la película de cobre o plata y la membrana de alúmina en presencia de un estabilizador polimérico, como puede ser la polivinilpirrolidona (PVP) (etapa 3). Finalmente, los nanorods de oro sintetizados se disolverán en agua o en un disolvente orgánico por agitación (etapa 4) [21]. El tamaño transversal de los nanorods dependerá del diámetro de los poros, mientras que el longitudinal dependerá de la cantidad de oro depositado dentro de los poros. En toda la plantilla la deposición, el tamaño de los poros no es uniforme, lo que conlleva la obtención de AuNRs de tamaño muy variable; por otra parte, el rendimiento en el proceso de síntesis es generalmente muy bajo.

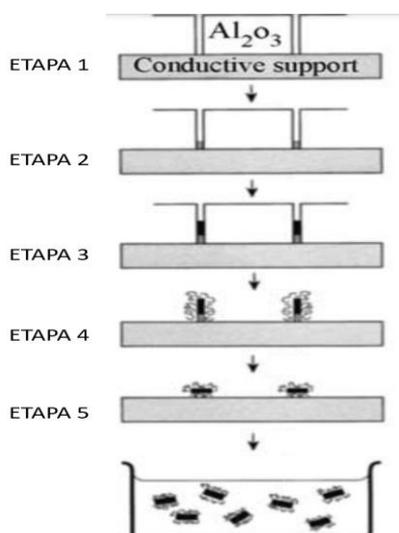


FIGURA 11. Representación del proceso de síntesis de AuNRs mediante el método de plantilla.

2.4.2. MÉTODO ELECTROQUÍMICO

En la década de los 90, Wang y su equipo propusieron por primera vez un método electroquímico para sintetizar AuNRs con un alto rendimiento [12]. Esta técnica consiste en llevar a cabo la síntesis dentro de una celda electroquímica de dos electrodos. Los electrodos utilizados son una placa de platino que actúa como cátodo y una placa metálica de oro que actúa como ánodo de sacrificio, ambas con dimensiones similares. Ambos electrodos se sumergen en un electrolito líquido, que consiste en una disolución compuesta por el tensioactivo catiónico CTAB y una pequeña cantidad de bromuro de tetradodecilamonio (TCAB), que actúa como un tensioactivo catiónico más hidrófobo. El CTAB, además de actuar como soporte electrolítico, también actúa como estabilizador de los nanorods ya que evita su posterior agregación, manteniendo su forma específica [21].

El proceso electrolítico se realiza en modo galvanostático, con una corriente de 3 mA a una temperatura de 26 °C, colocándose un dispositivo ultrasónico en el interior de la celda. Del mismo modo, se añade acetona en el electrolito para aflojar la estructura micelar del CTAB para que adopten una forma cilíndrica. También se añade ciclohexano para mejorar la geometría alargada de los nanorods.

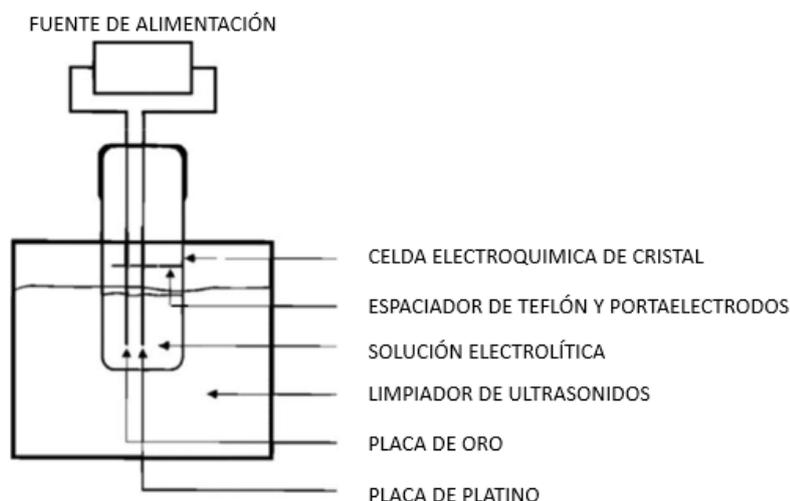


FIGURA 12. Diagrama del montaje para la síntesis electroquímica de AuNRs.

Durante todo el proceso, el oro del ánodo se oxida formando iones AuBr^{4-} . Estos aniones forman un complejo con el tensioactivo catiónico y migran al cátodo donde tiene lugar la reducción de los aniones de AuBr^{4-} , produciéndose la nucleación para formar AuNRs. A medida que se van formando los nanorods, se le aplica ultrasonidos para dispersar las nanopartículas de las proximidades del cátodo. El tamaño de AuNRs depende de la concentración de los iones de oro.

2.4.3. MÉTODO DE CRECIMIENTO CON SEMILLAS.

Entre todos los métodos que existen para sintetizar AuNRs, el método de crecimiento con semillas es el más utilizado, ya que es el más sencillo. Por otro lado, con este método se consigue controlar mejor el tamaño de los nanorods, obteniéndose partículas muy similares con poca dispersión en cuanto a forma y tamaño, además de con un mayor rendimiento [12].

El mecanismo de síntesis consta de dos partes: en la primera de ellas, se lleva a cabo la síntesis de unas semillas de oro, mientras que en la segunda se produce el crecimiento de AuNRs. Inicialmente, las semillas de oro tienen un tamaño de 3-4 nm. Estas se sintetizan por reducción química de una sal de oro (HAuCl_4) con un agente reductor fuerte, como es el borohidruro de sodio (NaBH_4), en presencia de CTAB, dando lugar a una disolución coloidal de nanopartículas de oro. Estas semillas sirven como sitios de nucleación para un posterior crecimiento anisotrópico de los nanorods de oro [23].

En la etapa de crecimiento, las semillas obtenidas se añaden a una disolución compuesta por HAuCl_4 y CTAB, que ejerce el papel de agente estructurante, junto con un agente reductor débil, como es el ácido ascórbico. El mecanismo de formación de AuNRs en medios tensioactivos todavía no se conoce en su totalidad; se propuso un mecanismo de "cremallera" donde las cadenas de CTAB se absorben a la superficie de las nanopartículas mediante interacciones del tipo Van der Waals con los grupos trimetilamonio de las cadenas de CTAB (ver la Figura 13). Entre ambas bicapas formadas por cadenas de CTAB, se situará la semilla de oro sobre la que se irá depositando más oro metálico que vendrá de la reducción de la sal de oro por el ácido ascórbico, generando de esta forma un nanorod que irá creciendo en una sola dirección debido a la estructura que forman las cadenas de CTAB a su alrededor [21].

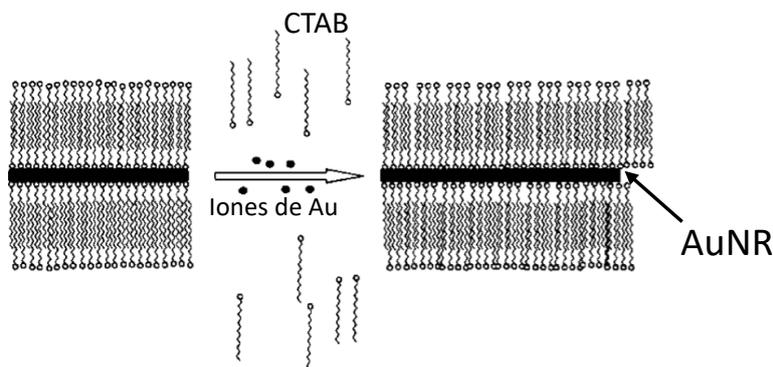


FIGURA 13. Representación del proceso de crecimiento de AuNRs a partir de las semillas de oro. Formación de la bicapa de CTAB sobre la superficie del nanorod, que ayuda al crecimiento de AuNR en una sola dirección a medida que se introducen más iones de oro. Imagen sacada de la Ref. [21].

Se observó que la longitud de las cadenas del tensioactivo (CTAB) es fundamental para controlar el tamaño de los nanorods; si las longitudes de las cadenas son pequeñas se obtendrán nanorods con longitudes más pequeñas. Del mismo modo, el rendimiento mejora con el aumento del estado coloidal de las semillas de oro obtenidas en la primera etapa [21].

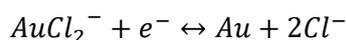
En presencia de CTAB, el ácido ascórbico reduce la sal de oro (AuCl_4^-) a (AuCl_2^-) siguiendo la siguiente reacción:



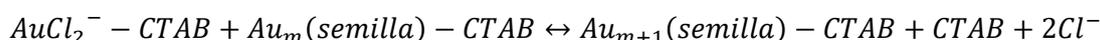
Los aniones $AuCl_4^-$ y $AuCl_2^-$ en disolución se absorben a las cadenas de CTAB, por eso, los iones $AuCl_2^-$ no precipitan en forma de oro. Cuando se tiene una disolución con $AuCl_2^-$ y CTAB añadiendo $HAuCl_4$, no se forman semillas de oro porque no tiene lugar la siguiente reacción (no se reducen los aniones $AuCl_2^-$):



La reducción de los aniones $AuCl_2^-$ ocurre a través de la transferencia de los electrones que se encuentran en la superficie de las semillas de oro y los aniones $AuCl_2^-$, dando lugar a la siguiente reacción:



En presencia de CTAB, la reacción de reducción es la siguiente:



Los aniones $AuCl_2^-$ se reducen sobre las semillas de oro aumentando así su tamaño. Teniendo en cuenta la presencia del CTAB, el crecimiento de las nanopartículas se produce de forma longitudinal, obteniendo así AuNRs con su geometría característica en forma de varilla.

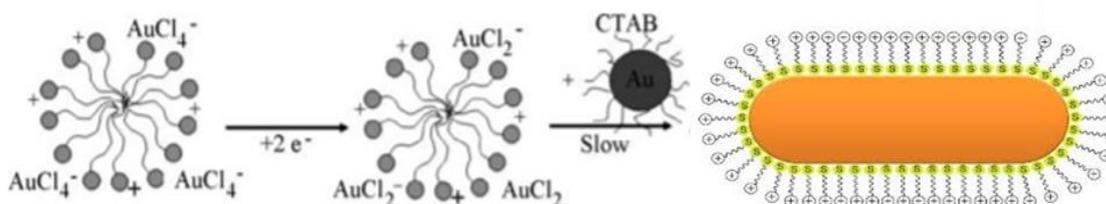


FIGURA 14. Representación de la síntesis de AuNR mediante el método de crecimiento de semillas.

En relación a la nucleación de los átomos de oro que se produce en la segunda etapa, se encontró que la adición de nitrato de plata ($AgNO_3$) ayuda a controlar con mayor facilidad la relación de aspecto de AuNR. Cuando se añade la sal de plata en la etapa de crecimiento, la relación de aspecto de los nanorods aumenta, logrando un cambio en la banda longitudinal del plasmón. No obstante, cuando la concentración de nitrato de plata supera una concentración crítica, la relación de aspecto de los nanorods de oro empieza a disminuir.

2.5.FUNCIONALIZACIÓN DE NANORODS DE ORO

Como se ha comentado con anterioridad, el CTAB se utiliza para sintetizar AuNRs tanto por el método de crecimiento con semillas como por el método electroquímico. Esto hace que los nanorods queden cubiertos por una bicapa de moléculas cargadas positivamente. Los AuNRs cubiertos con CTAB sólo son estables en disolución acuosa con un pH inferior al neutro, y su estabilidad varía cuando hay una elevada concentración de sal, o cuando se añade un disolvente orgánico y la concentración de CTAB es baja, lo que limita los posteriores usos de los nanorods [12].

El CTAB se absorbe fuertemente a la superficie del nanorod, lo que dificulta su eliminación sin que estos agreguen; este hecho es importante, ya que como se ha comentado con anterioridad la agregación de nanopartículas metálicas normalmente generan toxicidad, por lo que dificultaría su uso en aplicaciones biológicas. Por otro lado, se ha comprobado que, durante la síntesis de AuNRs, los iones plata se depositan sobre la superficie del nanorod. La plata depositada en la superficie se disuelve en soluciones acuosas en iones de plata. Cuando los nanorods se encuentren recubiertos con moléculas orgánicas, el CTAB y los iones plata son muy citotóxicos siendo de nuevo un gran obstáculo para muchas aplicaciones biomédicas. El CTAB tiene la capacidad de provocar agujeros a escala nanométrica en la membrana lipídica de las células debido a las interacciones electrostáticas con los cationes NH_4^+ , incrementando su permeabilidad. Respecto a los iones de plata, son capaces de producir la despolimerización de actina, causando la muerte celular [24].

Por todo ello, se ha realizado un esfuerzo para funcionalizar la superficie de los nanorods con el objetivo de sustituir el CTAB con ligandos más biocompatibles. El polietilenglicol (PEG) es uno de los ligandos más utilizados, con una elevada biocompatibilidad y estabilidad en aplicaciones biomédicas [24]. Los AuNRs modificados con PEG son muy estables en disoluciones acuosas e incluso en algunos disolventes orgánicos. Además, permite la unión de biomoléculas, como proteínas y anticuerpos, que pueden ayudar a la biocompatibilidad del nanomaterial, así como a su internalización en las células, disminuyendo además su toxicidad. Por ejemplo, se puede anclar una proteína como la albúmina sérica humana (HSA), que es la proteína más abundante en el plasma, encargada de transportar sustancias tanto endógenas como exógenas (fármacos, hormonas, ácidos grasos, etc.) por el torrente sanguíneo.

3.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

3.1. SÍNTESIS DE NANORODS DE ORO

Con la finalidad de obtener nanorods de oro, se realizó un procedimiento similar al del método de crecimiento por semillas [21]. La síntesis de nanorods de oro en un medio acuoso se ha llevado a cabo en dos etapas distintas: formación de semillas de oro (etapa 1); a partir de estas, se inicia la formación de nanorods de oro (etapa 2). Para la síntesis, se utilizan los reactivos que se indican en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de AuNRs.

ETAPA	REACTIVOS	PESO MOLECULAR (g/mol)
ETAPA 1	Hidruro tetracloroáurico (HAuCl ₄)	383,83
	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	364,5
	Borohidruro de sodio (NaBH ₄)	37,83
ETAPA 2	Hidruro tetracloroáurico (HAuCl ₄)	383,83
	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	364,5
	Nitrato de plata (AgNO ₃)	168,87
	Ácido ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)	176,12

Para empezar el proceso de síntesis, se prepararon las diluciones que muestra la *Tabla 2* en diferentes viales, donde previamente se pesó la cantidad de cada reactivo; seguidamente, se añadió en cada vial la cantidad precisa de disolvente (agua ultrapura Milli-Q) utilizando micropipetas de diferente volumen, con el fin de obtener una disolución de cada reactivo a una concentración determinada.

Tabla 2. Condiciones de los reactivos utilizados para síntesis de AuNRs.

ETAPA	REACTIVOS	MASA (mg)	MOLES	VOLUMEN (μL)	CONCENTRACIÓN
ETAPA 1	HAuCl ₄	0,85	2,5·10 ⁻⁶	1250	0,002 M
	CTAB	274	752·10 ⁻⁶	3760	0,2 M
	NaBH ₄	0,34	9·10 ⁻⁶	900	0,01 M
ETAPA 2	HAuCl ₄	1,09	3,2·10 ⁻⁶	1600	0,002 M
	CTAB	277	760·10 ⁻⁶	3800	0,2 M
	AgNO ₃	0,082	482·10 ⁻⁶	32	0,015 M
	C ₆ H ₈ O ₆	0,9	5,1·10 ⁻⁶	51,2	0,1 M

Una vez preparadas las disoluciones de cada reactivo en sus respectivos viales, se inició la etapa 1 del proceso de síntesis de los nanorods de oro. Por lo que respecta a la disolución de NaBH_4 , se debe preparar fresca y dejar en baño de hielo para que se enfríe completamente. Los viales que contienen las disoluciones de CTAB para la etapa 1 y 2, se añadieron en un baño de ultrasonidos durante 10-15 minutos para favorecer su completa disolución en agua Milli-Q. Considerados estos dos puntos previos a la síntesis de AuNRs, se procedió a sintetizar las semillas (etapa 1); para ello, en un vial de 10 mL se añadió 1,25 mL de la dilución de HAuCl_4 0,002 M y se diluyó añadiendo 2,74 mL de agua ultrapura con agitación de 200 rpm; la disolución tenía un color amarillo claro por la presencia de la sal de oro. Posteriormente, se añadió 3,76 mL de CTAB 0,2 M, observándose un cambio de color de la disolución de amarillo a naranja. A continuación, se añadió de golpe y en agitación vigorosa (1200 rpm) 900 μL de la disolución de NaBH_4 0,01 M en baño de hielo, dejando en agitación 20 segundos; pasado ese tiempo, se detuvo la agitación y se dejó en reposo a temperatura ambiente; la disolución adquirió un color marrón claro, indicativo que se habían formado las semillas (nanopartículas esféricas) de oro.

En el momento de añadir la disolución de NaBH_4 , que como se ha comentado en la introducción es un agente reductor fuerte, al entrar en contacto con los aniones de la sal de oro (AuCl_4^-) en presencia de CTAB, dichos aniones se reducen formando átomos de oro sólido. Estos átomos de oro tienden a agregarse dando lugar a semillas de oro que posteriormente servirán como punto de partida para la formación de AuNRs. Por eso, al añadir el NaBH_4 , el color de la disolución empieza a cambiar hasta tener un color más marrón, debido a las semillas de oro en reposo. Dicho proceso se muestra en la Figura 15.

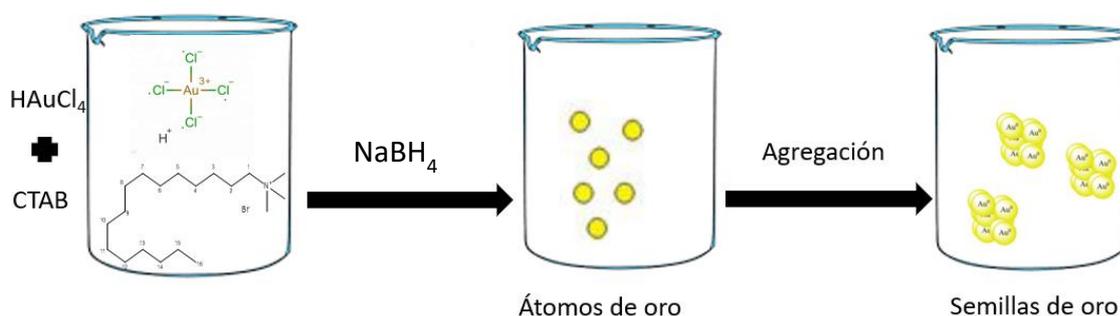


FIGURA 15. Representación de la formación de las semillas de oro (etapa 1).

Una vez se prepararon las semillas de oro, mientras se dejaban en reposo, se empezó la segunda etapa de la síntesis de los nanorods. Se cogió un balón de fondo redondo en el que se añadieron 1,6 mL de la dilución de HAuCl_4 0,002 M. A continuación, se añadió 2,52 mL de agua ultrapura y se empezó a agitar a 200 rpm. Mientras se agitaba, se añadieron 3,8 mL de la disolución de CTAB 0,2M; la mezcla de reacción adquirió, de nuevo, un color anaranjado. Seguidamente, se añadieron 32 μL de la disolución de AgNO_3 0,015M y 51,2 μL de la disolución de ácido ascórbico 0,1M; en este momento, la disolución cambió rápidamente de color naranja a ser completamente incolora. El ácido ascórbico, como se ha comentado en la introducción, es un reductor débil capaz de reducir los aniones AuCl_4^- de la sal de oro a AuCl_2^- ; por eso, al añadir el ácido ascórbico la disolución se convierte incolora.

Para finalizar, se aumentó la agitación de la mezcla de reacción a 1200 rpm, y se añadió 34,7 μL de la disolución de semillas de oro obtenidas en la primera etapa, dejándose en agitación vigorosa durante 20 segundos. En este caso, las semillas que se añadieron habían estado en reposo durante 10 min tras

sintetizarse. Pasados los 20 segundos, se dejó la mezcla de reacción en reposo y a temperatura ambiente durante 24 horas. A medida que avanzaba el tiempo, la disolución fue adquiriendo una tonalidad más oscura debido a la formación de AuNRs. La etapa 2 de síntesis de AuNRs se esquematiza en la Figura 16.

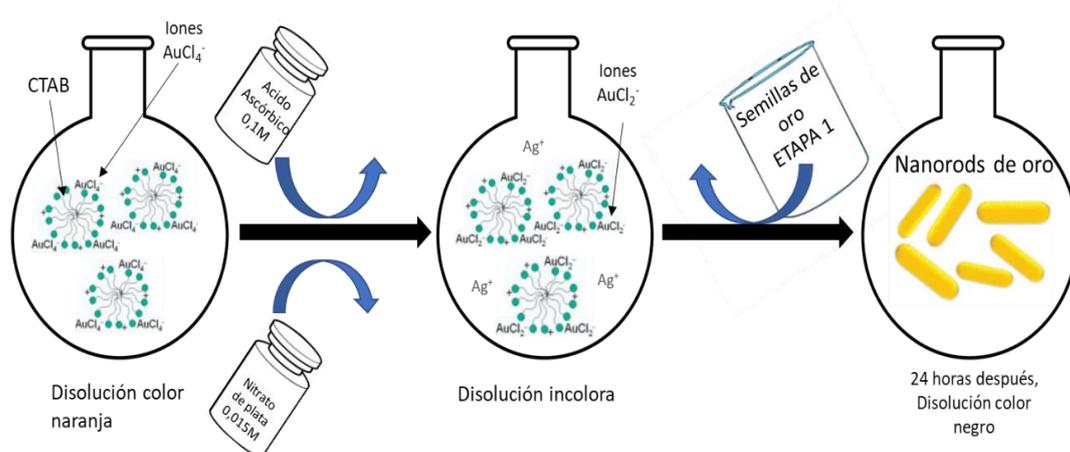


FIGURA 16. Representación de la etapa 2 del proceso de síntesis de AuNRs.

Posteriormente, para eliminar el exceso de CTAB de los nanorods, se realizaron diferentes lavados con agua. Se introdujo la disolución en un tubo Falcon para centrifugar la muestra durante 15 min a 12000 rpm y 10 °C. Al sacar el tubo Falcon de la centrifuga se observó que en la parte inferior el color de la disolución era negro y en la parte superior era incolora (sobrenadante). Eso se debe a que al centrifugar todos los nanorods se depositaron en la parte inferior del tubo, permitiendo así poder eliminar el exceso de CTAB por decantación. Los AuNRs se resuspendieron en agua y se procedió a realizar nuevos lavados siguiendo el mismo protocolo. Tras realizar varios lavados, la disolución de AuNR resultante se filtró en filtros de jeringa de PTFE de 0.2 μm , obteniéndose una disolución como la que se observa en la Figura 17.



FIGURA 17. Disolución de AuNRs después de lavar repetidas veces y filtrar.

Como se ha comentado en la introducción, una etapa clave en el tamaño de AuNRs que se pretende obtener es el tiempo que pasa una vez se han sintetizado las semillas de oro y se han utilizado para hacer crecer el nanorod. Así, en el primer AuNR sintetizado, pasaron unos 10 min entre que se sintetizaron las semillas y se utilizaron en la etapa 2. Sin embargo, se realizaron distintas síntesis de AuNR donde se utilizaron las semillas tras haber estado en reposo durante distintos tiempos: 10 min,

1h, 2h, 5h, 24h y 48h. De esta forma, se intentó conocer cómo varía el tamaño de AuNR en función del tiempo que está en reposo las semillas de oro.

A continuación, se muestra un esquema resumen de todo el proceso de síntesis de los nanorods de oro:

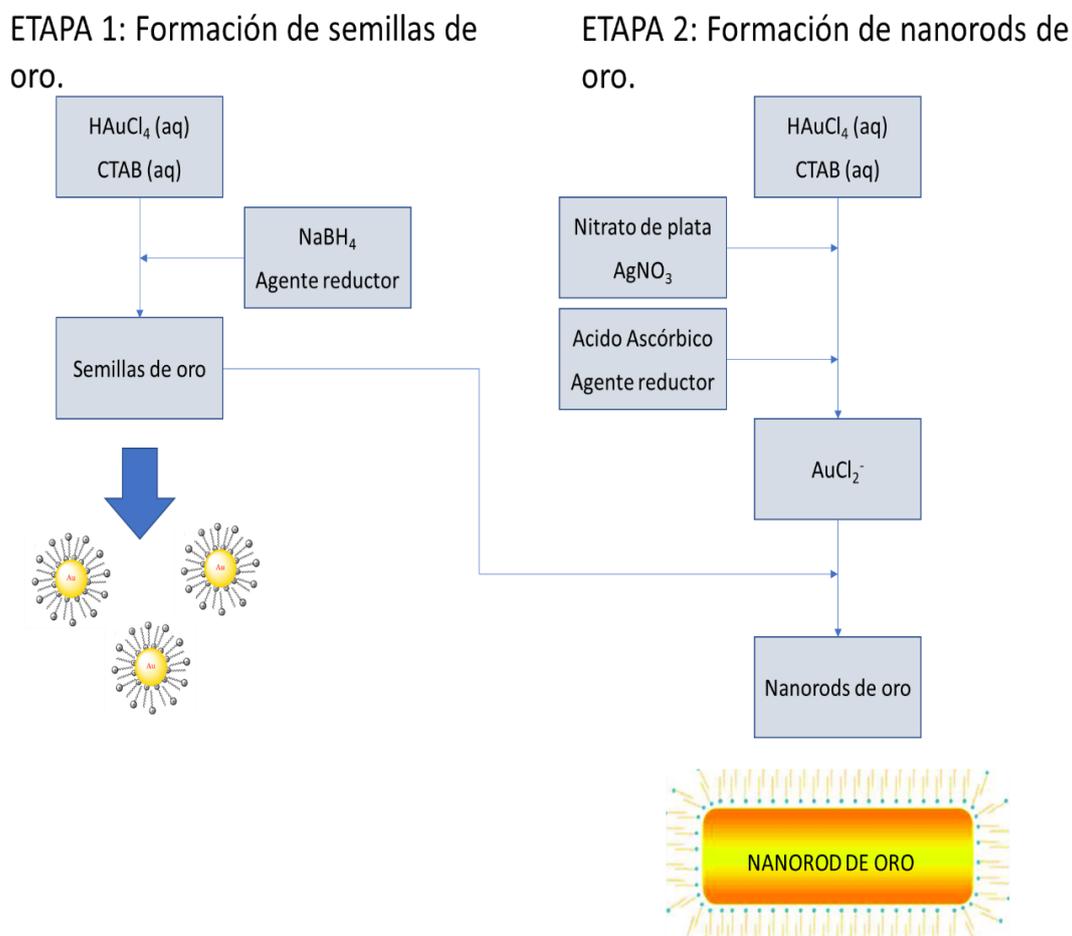


FIGURA 18. Esquema resumen de la síntesis de AuNRs.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO

3.2.1. ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN UV-VIS

Con la finalidad de investigar las propiedades ópticas de AuNRs, se estudió en primer lugar la radiación electromagnética que pueden absorber los nanorods de oro sintetizados en un rango de longitud de onda de 220 a 900 nm. Así pues, se registró el espectro de absorción UV-vis de todos los AuNRs sintetizados.

Para ello, se cogieron aproximadamente 2 mL de la muestra de los nanorods obtenidos y con la ayuda de una pipeta se introdujeron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico; antes de proceder a

realizar la medida, se limpiaron bien las paredes de la cubeta con agua destilada y posteriormente con acetona para eliminar cualquier impureza que pudiese dar lugar a errores en la medida. Antes de registrar el espectro de absorción de la muestra, se debe realizar una medida previa (línea base) conteniendo el disolvente utilizado, en este caso, agua Milli-Q.

Tras registrar la línea base, se insertó la cubeta con la muestra de nanorod para medir el espectro de absorción en el rango de los 220 a los 900 nm.

En la Figura 19 se muestra el espectro de absorción del primer nanorod sintetizado, etiquetado como AuNR1.

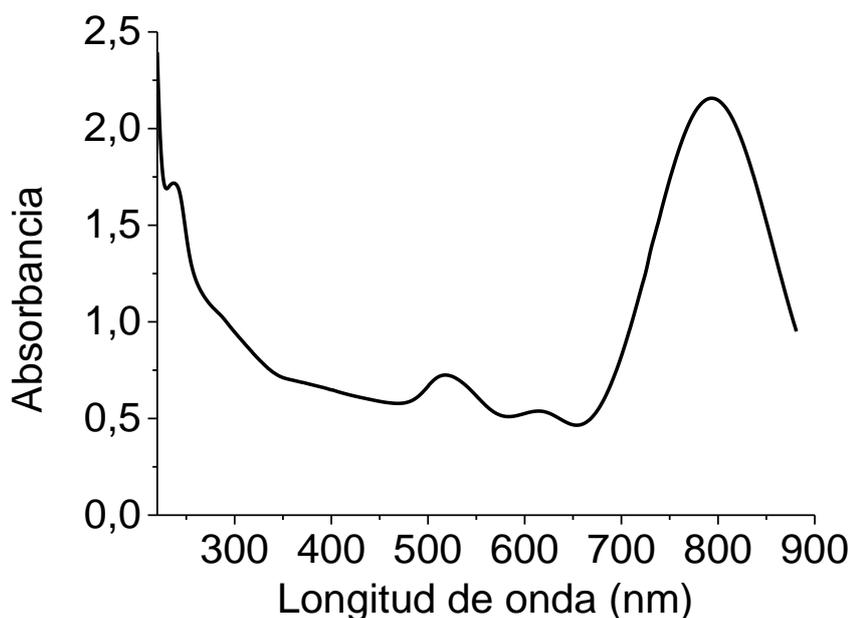


FIGURA 19. Espectro de absorción UV-vis de AuNR1.

Analizando el espectro de absorción de AuNR1, se puede observar que presenta varias bandas de absorción: la banda de mayor intensidad está situada a una longitud de onda con un máximo centrado en 788 nm. Esta banda se asocia a la banda de plasmón longitudinal del nanorod. La segunda banda de menor absorción, centrada alrededor de los 520 nm se asocia a la banda transversal de plasmón de AuNR. El espectro obtenido es un espectro característico de un AuNRs.

Como se ha comentado con anterioridad, con el fin de optimizar el proceso de síntesis y observar cómo varía el tamaño y forma de los nanorods de oro, se sintetizaron nuevos AuNRs variando el tiempo que se deja en reposo las semillas de oro de la etapa 1; por otro lado, se repitió la síntesis de los nanorods en diferentes ocasiones ya que no se conseguía reproducir el tamaño de los mismos siguiendo el mismo protocolo. Esto nos llevó a utilizar reactivos de diferentes lotes ya que en un primer momento supusimos que alguno de los reactivos utilizados podría no estar en óptimas condiciones. Por todos estos motivos, se obtuvieron un variado número de AuNRs que mostraban distintos máximos de absorción en el espectro UV-vis, variando de los 650 a los 800 nm; esto es un claro indicio de que los nanorods obtenidos en los distintos procesos de síntesis tenían tamaños diferentes. Así pues,

adicionalmente a AuNR1, se estudiaron las propiedades ópticas de otros nanorods sombreados como AuNR2, AuNR3, AuNR4, AuNR5, AuNR6, AuNR7, AuNR8 y AuNR9.

A continuación, se muestran los espectros de absorción de las diferentes muestras obtenidas:

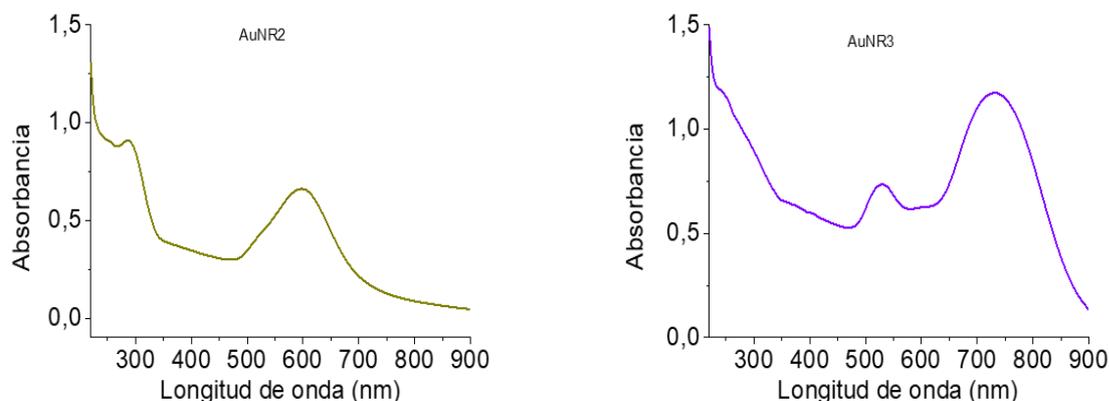


FIGURA 20. Espectro de absorción de AuNR2 (izquierda) y AuNR3 (derecha) en medio acuoso.

En la Figura 20, se muestran los espectros de absorción de las muestras AuNR2 y AuNR3. Analizando la muestra AuNR2, se puede observar que sólo existe una única banda de absorción sobre los 600 nm. Como se ha comentado en la introducción, las nanopartículas esféricas sólo poseen una banda de absorción que varía en función del tamaño de la misma y que puede estar centrada en el rango de 520-600 nm; por lo tanto, en vista del espectro de absorción que muestra AuNR2, se puede deducir que no se trata de un nanorod, sino de nanopartículas de forma esférica. La forma de AuNR2 se caracterizó posteriormente por TEM (ver apartado 3.2.2, Figura 24).

Por lo que respecta al espectro de absorción de AuNR3, se observan dos bandas de absorción, una banda situada a 530 nm y otra ca. 730 nm. La banda de absorción localizada a una longitud de onda menor se puede asociar con la oscilación de los electrones libres a lo largo de la superficie transversal de AuNR3 (banda transversal de plasmón), mientras que la banda centrada a una mayor longitud de onda se asocia al movimiento oscilatorio de los electrones libres de la superficie longitudinal del nanorod (la banda longitudinal de plasmón).

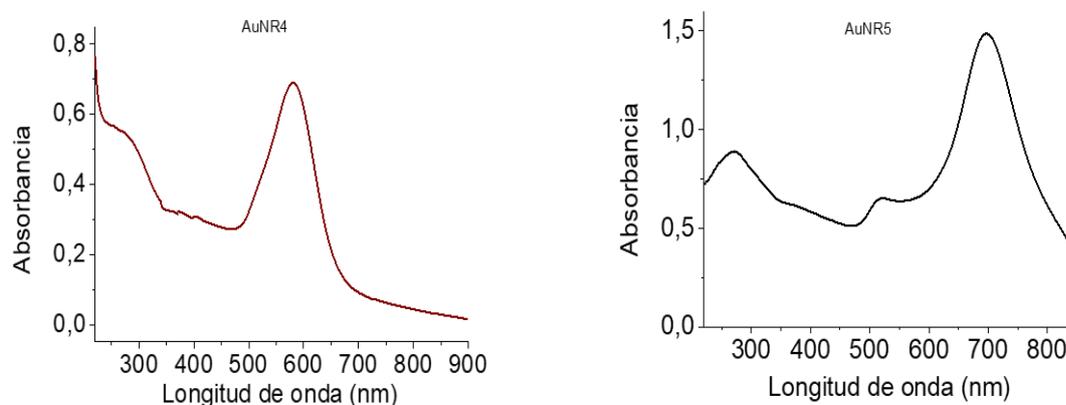


FIGURA 21. Espectro de absorción de AuNR4 (izquierda) y AuNR5 (derecha) en agua.

La Figura 21 muestra los espectros de absorción de las muestras AuNR4 y AuNR5. Analizando el espectro de absorción de AuNR4, tiene sólo una banda de absorción situada sobre 580 nm. Al igual que ocurría con la muestra AuNR2, viendo el espectro de absorción de AuNR4, se puede deducir que se trata de nanopartículas esféricas, sin tener ninguna asimetría en su forma que provoque la aparición de dos bandas de plasmón en su espectro ultravioleta.

Del espectro de absorción de AuNR5, se observan dos bandas con máximos situados sobre 520 nm y 700 nm, lo cual es indicativo de que efectivamente la muestra AuNR5 es un nanorod de oro, ya que la banda a 520 nm se puede asociar a la banda transversal de plasmón y la situada sobre 700 nm se asocia a la banda longitudinal de plasmón.

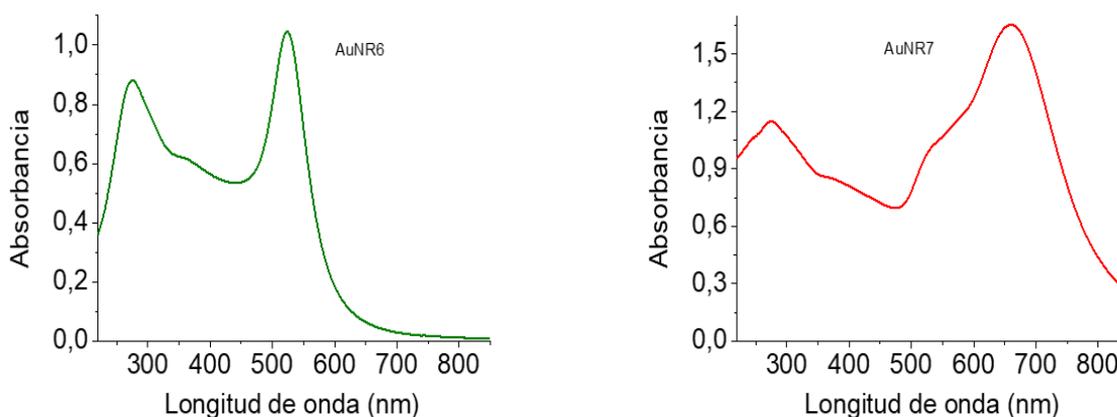


FIGURA 22. Espectro de absorción de AuNR6 (izquierda) y AuNR7 (derecha) en medio acuoso.

En la Figura 22 aparecen los espectros de absorción de las muestras AuNR6 y AuNR7. De nuevo, del espectro obtenido de AuNR6, parece tratarse de una nanopartícula esférica, con el máximo de la banda de absorción en 525 nm.

En cuanto al espectro de absorción de la muestra AuNR7, se observa que tiene una banda ancha con un máximo centrado en 660 nm con un pequeño hombro sobre los 530 nm. Por lo tanto, se puede concluir que AuNR7 puede tratarse de una mezcla de nanopartículas esféricas de gran tamaño con alguna nanopartícula con forma de nanorod.

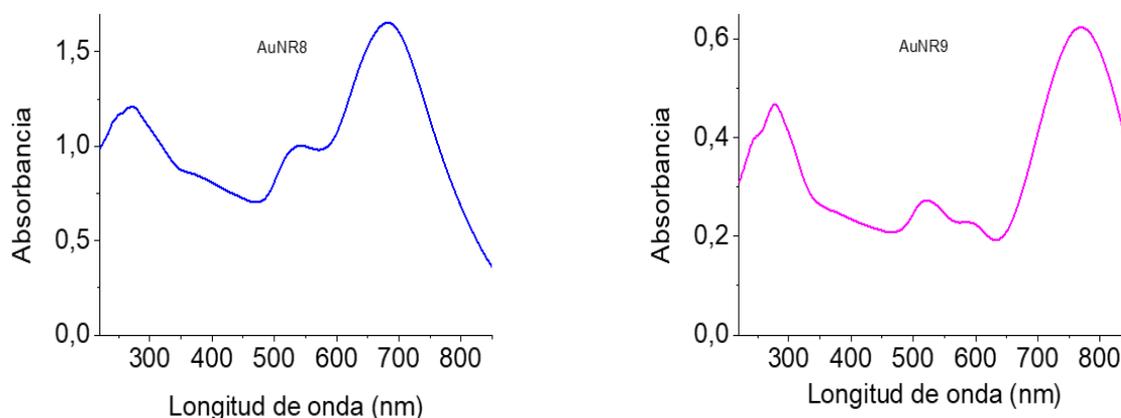


FIGURA 23. Espectro de absorción de las muestras AuNR8 (izquierda) y AuNR9 (derecha).

Finalmente, la Figura 23 muestra los espectros de absorción de AuNR8 y AuNR9. Ambos espectros presentan distintos máximos de absorción. Así, AuNR8 tiene una banda de absorción situada sobre 540 nm y otra sobre 680 nm, mientras que el espectro de AuNR9 muestra una banda de absorción sobre 520 nm y otra *ca.* 770 nm, asociadas, como se ha explicado con anterioridad, a las bandas transversales y longitudinales de plasmón, respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que ambas muestras son nanorods de oro con un tamaño diferente.

De los resultados obtenidos de la espectroscopia de UV-vis, se puede deducir que algunas síntesis dieron lugar a AuNRs mientras que otras, por razones que no hemos podido controlar y por tanto desconocemos, corresponden a nanopartículas esféricas de oro. La *Tabla 3* muestra un resumen de los resultados obtenido.

Tabla 3. Caracterización de las diferentes muestras a partir de la espectroscopia de UV-vis.

MUESTRA	Máximos de la banda de absorción (nm)			Forma nanopartículas
	SPR	TSPR	LSPR	
AuNR1	-	518	788	Nanorod
AuNR2	597	-	-	Esférica
AuNR3	-	530	731	Nanorod
AuNR4	579	-	-	Esférica
AuNR5	-	517	696	Nanorod
AuNR6	524	-	-	Esférica
AuNR7	-	531	660	Esférica/Nanorod
AuNR8	-	541	682	Nanorod
AuNR9	-	520	771	Nanorod

En conclusión, se han sintetizado y estudiado los espectros de absorción de 9 muestras diferentes. De los resultados inicialmente obtenidos por espectroscopia de absorción UV-vis, se deduce que se han obtenido diferentes tipos de nanopartículas: nanorods y nanoesferas. Las muestras AuNR2, AuNR4 y AuNR6, aunque se siguió el mismo procedimiento de síntesis que para el resto de muestras, se concluye que tienen forma esférica. Cada una de ellas muestra el máximo de la banda de absorción a una longitud de onda diferente, por lo que tienen diferente tamaño (ver Figura 6 y 7 de la introducción). Así, el menor tamaño de nanopartículas esféricas corresponde a AuNR6, ya que su máximo de absorción se encuentra a longitudes de onda menores, mientras que el mayor tamaño corresponde a AuNR2, cuyo máximo está desplazado a longitudes de onda mayores. Por otro lado, se ha observado que el ancho de la banda de absorción aumenta a medida que la banda se desplaza hacia longitudes de onda mayores; así, la banda de absorción de AuNR6 es más estrecha en comparación con la de AuNR2, resultado que confirma el mayor tamaño de AuNR2 respecto al resto de nanopartículas esféricas obtenidas. Otro parámetro a tener en cuenta para intuir la forma de un nanomaterial es el color. Así, las disoluciones coloidales de AuNR2, AuNR4 y AuNR6 tenían un color

rojizo, típico de nanopartículas de oro esféricas, diferente al color de las otras muestras, con una tonalidad entre azul-violeta oscuro y negro, típico de AuNRs.

El hecho de no haber obtenido nanorods en estas muestras 2, 4 y 6, a pesar de seguir el mismo procedimiento, se puede deber muchos factores. Estas se sintetizaron con la misma concentración de los reactivos utilizados para AuNR1, pero de lotes diferentes que parecía no estar en óptimas condiciones. Por eso, un posible factor que provocó que no se formaran nanorods de oro, puede ser que el estado de los reactivos no era el adecuado. Otro factor que lógicamente puede afectar es que el CTAB utilizado no se anclara bien a la superficie de la nanopartícula sin formar la doble bicapa alrededor de la nanopartícula, favoreciendo la agregación de las semillas de oro para formar finalmente los AuNRs.

Por lo que respecta a las muestras AuNR1, AuNR3, AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9, después de analizar sus espectros de absorción UV-vis, se deduce que sí corresponden a nanorods de oro de diferente tamaño. Como se ha comentado en la introducción, la banda longitudinal de plasmón depende de la relación de aspecto de los nanorods. Las muestras AuNR1, AuNR3 y AuNR9 tienen la banda longitudinal de plasmón situada a una longitud de onda superior a los 700 nm, especialmente para AuNR1 y AuNR9, que se sitúa sobre los 790 y los 770, respectivamente. Esto indica que estos nanorods presentarán una forma más alargada, con una relación de aspecto longitudinal/transversal mayor. Estos nanorods, especialmente AuNR1, pueden aportar mayores beneficios para aplicaciones fototérmicas (PTT) ya que se podrán irradiar a una longitud de onda mayor, provocando de esta forma un menor daño a los tejidos del organismo, que no absorberán la radiación.

Por último, parece que AuNR7 es una mezcla de nanorods de oro y nanopartículas esféricas. Esto quiere decir que la mayoría de las semillas de oro han agregado formando nanopartículas esféricas grandes y algunas semillas han sufrido el proceso de crecimiento para formar el nanorod. En este caso, el espectro de absorción contiene dos bandas solapadas, que al tratarse de algunas nanopartículas esféricas con un tamaño elevado tienen una banda de absorción ancha que se solapa con la banda longitudinal de plasmón de los nanorods.

3.2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Una vez se sintetizaron y estudiaron los espectros de absorción UV-vis de las nueve muestras de nanopartículas de oro, se intentó caracterizar la morfología de estas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). El equipo TEM utilizado se encuentra en el Servicio de Microscopía de la UPV. Para las muestras analizadas en este proyecto, se utilizó el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución con 200 kV de aceleración. Así, se pudo determinar la forma, el tamaño y/o distribución de tamaños de algunas de las nanopartículas sintetizadas. Además, se pudo corroborar la diferencia de tamaño de las distintas nanopartículas comparando las imágenes TEM con los resultados obtenidos de la espectroscopia de absorción UV-Vis.

El microscopio TEM está formado por un cañón, una serie de lentes para enfocar el haz de electrones en la muestra y un sistema que registra la interacción de los electrones lanzados sobre la muestra en

forma de una imagen. El microscopio TEM tiene un sistema de vacío para que el haz de electrones no interaccione con moléculas de aire que provocarían errores en los resultados.

Aunque se quiso analizar por TEM todas las muestras diseñadas, por diversos motivos, entre los que cabe destacar motivos de seguridad debido al Covid-19, falta de disponibilidad del equipo en el momento en que se iban obteniendo las distintas nanopartículas, etc., no se pudo realizar el análisis para todas ellas.

En primer lugar, se analizaron las nanopartículas de la muestra AuNR2, con el fin de caracterizar el tamaño y forma de estas.

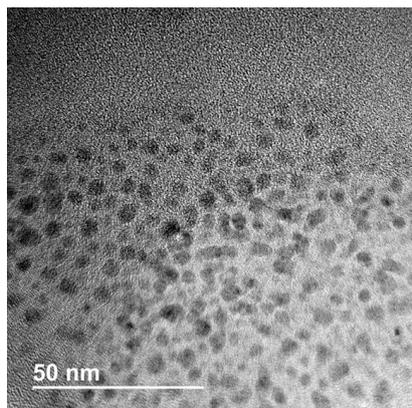


FIGURA 24. Imágenes TEM de AuNR2.

Como se puede observar en la Figura 24, la gran mayoría de las semillas de oro presentan una forma esférica con un tamaño bastante uniforme que no supera los 5 nm de diámetro.

A continuación, se muestra la imagen TEM de AuNR3:

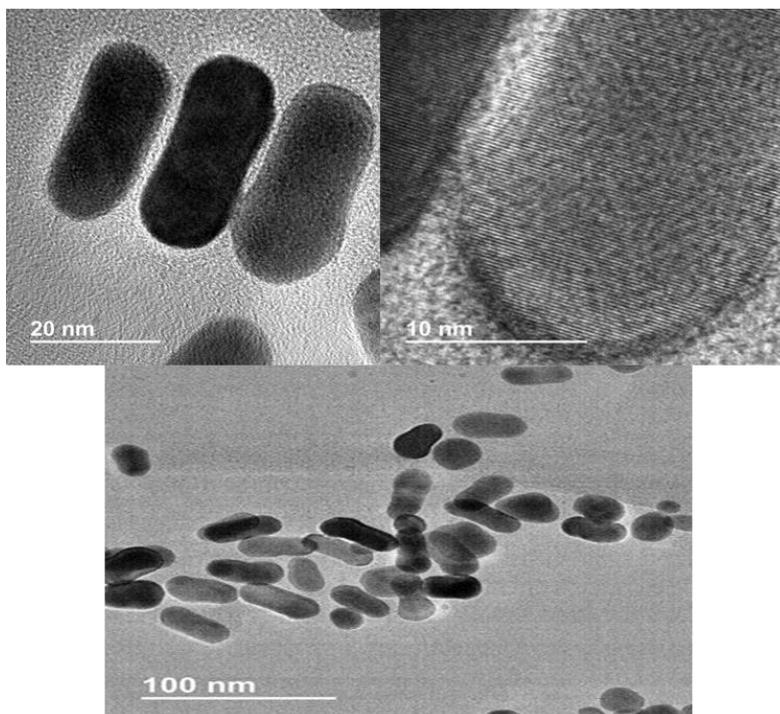


FIGURA 25. Imágenes de TEM de AuNR3.

Como se puede observar en la Figura 25, las nanopartículas obtenidas para la muestra AuNR3, corresponde a nanorods de oro. Así, se confirma que del espectro UV-vis de esta muestra, los dos máximos de absorción corresponden a la banda transversal y longitudinal del nanorod. En las imágenes TEM también se observan algunas nanopartículas con forma esférica u ovalada, que deben provenir de la agregación de algunas semillas de oro, aunque cabe destacar que mayoritariamente se observan nanorods de oro. Se tomaron diversas medidas de los nanorods que aparecen en las imágenes, realizándose una media de la anchura y la longitud de estos. Así, en general, AuNR3 tiene una longitud media de 30 nm y una anchura media de unos 12 nm. Conocido el tamaño medio de AuNR3, se puede calcular su relación de aspecto a partir del tamaño longitudinal/transversal del mismo; el valor obtenido es de 2,5. Además, de la imagen superior derecha de la Figura 25, se puede observar los planos cristalinos de los nanorods de oro.

Otras muestras que también se pudieron analizar por TEM son las muestras AuNR5, AuNR7 y AuNR8.

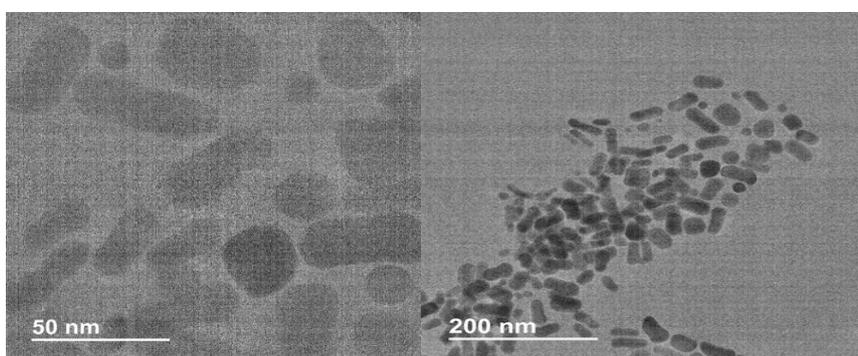


FIGURA 26. Imágenes TEM de AuNR5.

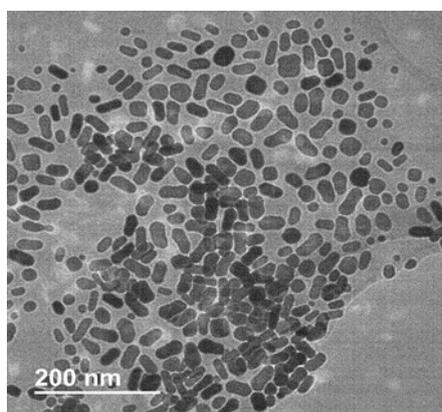


FIGURA 27. Imágenes TEM muestra de AuNR7.

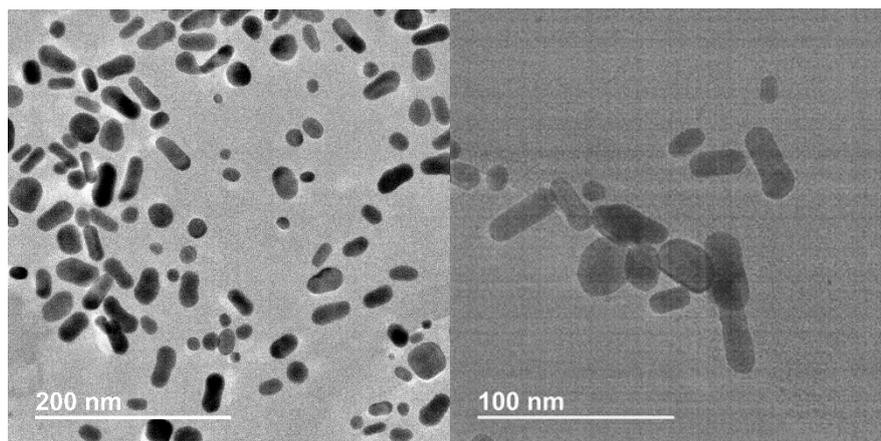


FIGURA 28. Imágenes TEM de AuNR8.

De las imágenes TEM de las muestras AuNR5, AuNR7 y AuNR8, representadas en las Ilustraciones 26, 27 y 28, se observa que todas presentan tamaños diferentes. Analizando la Figura 26, gran parte de AuNR5 son nanorods de oro con una geometría similar a AuNR3, pero también se observa una porción de nanopartículas cúbicas, esféricas y ovaladas; en general, se ha detectado mayor dispersión.

Analizando la Figura 27 y 28, las muestras AuNR7 y AuNR8 también presentan diferentes tipos de nanopartículas, donde aparecen nanorods, nanopartículas esféricas, cúbicas y ovaladas, de distinto tamaño.

En el caso de AuNR7, haciendo uso de la espectroscopia de absorción UV-vis, sí que se había observado la presencia de nanopartículas de diferente forma a los nanorods, pero después de analizar las imágenes TEM, se puede afirmar que todas las muestras presentan en mayor o menor medida cierta cantidad de nanopartículas esféricas, siendo los nanorods de oro obtenidos de una forma similar con variaciones no muy sustanciales en cuanto al tamaño longitudinal.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE AuNRs PARA SU POSIBLE USO EN PTT

Se realizó un estudio sobre las propiedades fototérmicas de las diferentes muestras de nanorods de oro obtenidas con el fin de analizar su posible utilización en terapia fototérmica (PTT). Así, se midió el aumento de temperatura que se obtenía tras irradiar los diferentes AuNRs con luz de distinta energía (532 y 808 nm). Estas medidas pudieron llevarse a cabo con AuNR5, AuNR6, AuNR7, AuNR8 y AuNR9.

Para ello, se irradiaron las muestras AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9 con un láser continuo a una longitud de onda de 808 nm con una potencia de 700 mW. Asimismo, se irradiaron las muestras AuNR5, AuNR6, AuNR7 y AuNR8 con un láser pulsado a 532 nm a una potencia 40 mJ (10 pulsos/segundo). Conviene recordar, que todas las muestras corresponden a nanorods de oro, a excepción de la muestra 6, que tiene forma esférica. Se midió el aumento de temperatura de esta nanoesfera ya que tiene su banda de plasmón con máximo sobre 530 nm, muy cercano a la longitud de onda de excitación del láser pulsado. La intención es comparar el aumento de temperatura que

genera la nanoesfera en comparación con los AuNRs, cuyo máximo está desplazado a longitudes de onda mayores.

Para realizar el estudio fototérmico, se prepararon disoluciones en medio acuoso de todas muestras con la misma absorción a la longitud de onda de excitación (532 o 808 nm). Para los nanorods AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9, que se irradiaron a 808 nm, se prepararon disoluciones con una absorción de 0,6 a 808 nm, mientras que para AuNR5, AuNR6, AuNR7 y AuNR8, se prepararon disoluciones con una absorción cercana a 1 a 532 nm.

Las irradiaciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, conteniendo 2 mL de disolución de AuNR; esta se mantuvo en constante agitación durante la irradiación con el fin de homogeneizar la muestra. Las muestras a irradiar se colocaron a 20 cm del láser de excitación. La medida de temperatura se realizó con un termómetro digital cuya punta metálica se puso en contacto con la disolución de AuNR evitando que interaccionase con el haz de luz. Así, una vez preparado el montaje, se irradiaron las diferentes muestras controlando el incremento de temperatura de la muestra en función del tiempo.

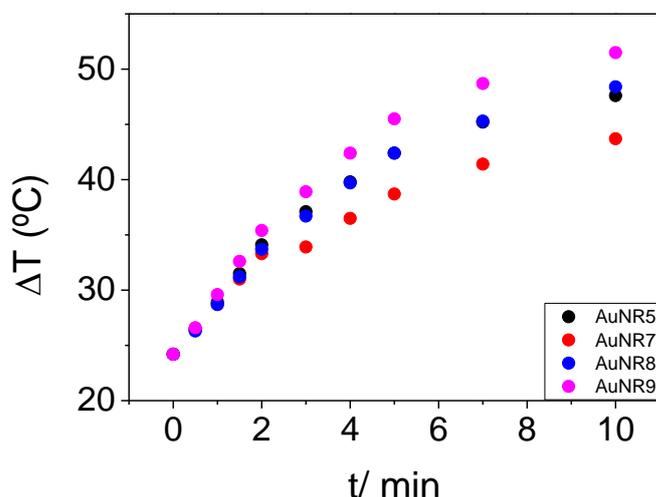


FIGURA 29. Variación de la temperatura en función del tiempo de irradiación de AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9 con un láser a 808 nm.

Como se observa de la Figura 29, todas las muestras siguen una tendencia muy parecida, ya que la temperatura del medio va aumentando con el tiempo de irradiación hasta que sobre los 10 min parece que empieza a estabilizarse. De los nanorods investigados, el que provoca un aumento de temperatura mayor es AuNR9, el cual presenta su máximo de absorción de la banda de plasmón (771 nm) más cercano a la longitud de onda de excitación (808 nm). En este sentido, el nanorod que debería provocar un menor aumento de la temperatura debería coincidir con aquel cuyo máximo de banda de plasmón estuviera a una longitud de onda menor, que en este caso coincide con AuNR7, que efectivamente es quien provoca un menor aumento de la temperatura. Así pues, aunque todos los AuNRs absorben la misma cantidad de luz a 808 nm, aquellos que presentan una banda de plasmón con el máximo más cercano a la longitud de onda de excitación, son los que generan un mayor aumento de la temperatura. Esto se debe a que la oscilación colectiva de los electrones superficiales de los nanorods en resonancia

con la frecuencia de la luz irradiada es mucho más eficiente, produciendo un incremento de temperatura mayor.

Con el fin de investigar la estabilidad de los nanorods, se registraron los espectros de absorción UV-vis antes y después de ser irradiados con el láser continuo a 808 nm. Así pues, la Figura 30 muestra los espectros de absorción de AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9 antes y después de ser irradiados.

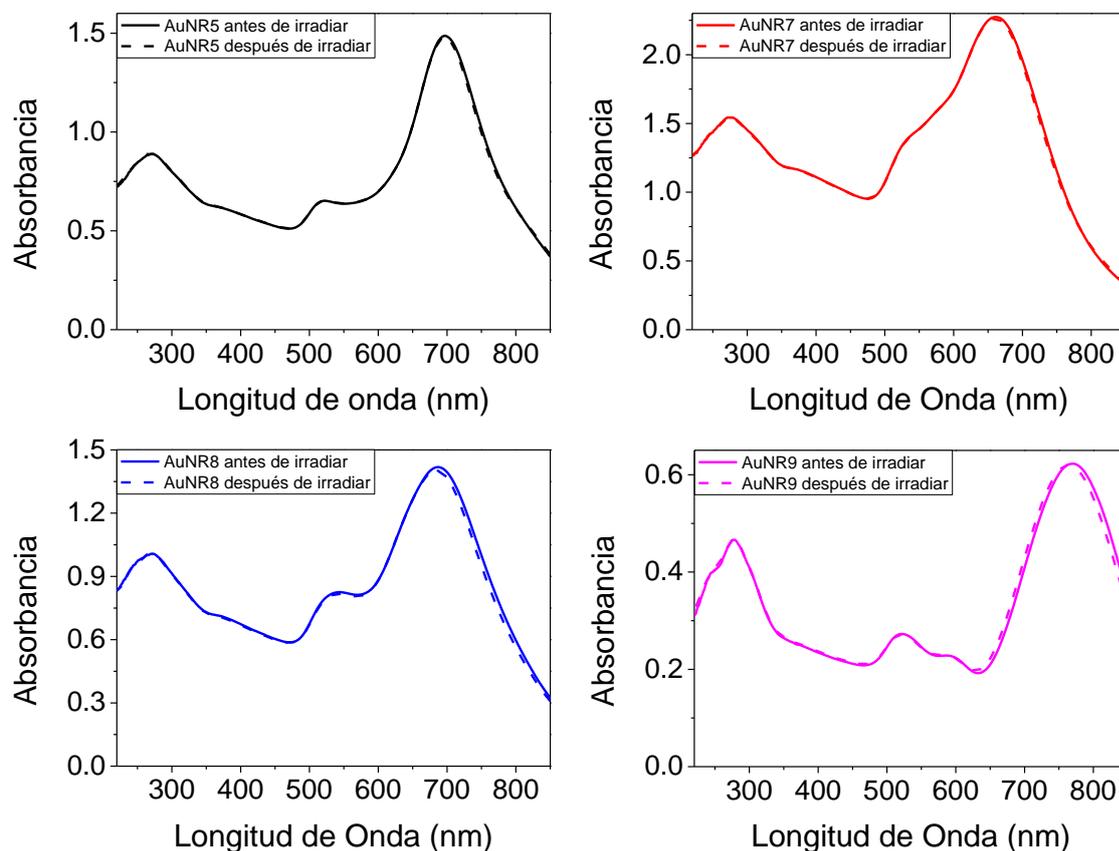


FIGURA 30. Espectros de absorción de AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9 antes y después de ser irradiados a 808 nm.

Como se puede apreciar, no se detectan cambios significativos entre los espectros de absorción de los nanorods tras de ser irradiados a 808 nm. Esto es un claro indicio que los nanorods diseñados no sufren cambios importantes en su estructura, ni generan agregación tras la irradiación a esta longitud de onda. Esto es importante ya que, como se comentó previamente en la introducción, la agregación de nanopartículas metálicas aumenta considerablemente la toxicidad, pudiendo generar mayores daños adversos en el organismo.

A continuación, se muestran los resultados sobre la irradiación de las muestras AuNR5, AuNR6, AuNR7 y AuNR8 con el láser pulsado a 532 nm. La Figura 31 muestra el aumento de temperatura que provocan dichos sistemas tras ser irradiados.

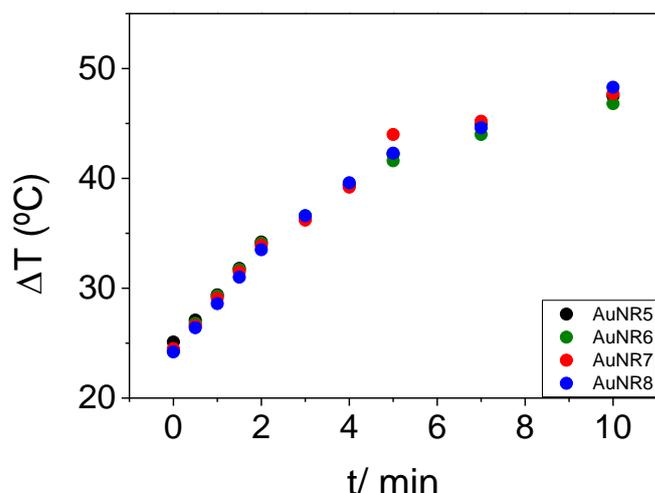


FIGURA 31. Variación de la temperatura en función del tiempo de irradiación de AuNR5, AuNR6, AuNR7 y AuNR8 con un láser a 532 nm.

Al contrario que ocurría con los resultados observados de aumento de temperatura tras irradiar las muestras a 808 nm, aquí no se observan diferencias significativas en dicho aumento de temperatura entre las distintas muestras, ya que todas siguen la misma tendencia. Sorprendentemente, la muestra AuNR6, que tiene forma esférica y un máximo de la banda de plasmón (524 nm) muy cercano a la longitud de onda de excitación, no provoca un aumento de temperatura superior a los AuNRs estudiados, cuyas bandas de plasmón absorben con máximos a $\lambda > 660$ nm. Por otro lado, el aumento de temperatura observado tras irradiar a 532 nm es ligeramente inferior al detectado tras irradiar las muestras a 808 nm, aun teniendo las muestras mayor absorción a 532 nm; de cualquier forma, es difícil hacer una comparativa ya que las muestras se irradian a diferentes energías, pero según los resultados obtenidos, parece que las irradiaciones a 808 nm son algo más efectivas que las realizadas a 532 nm.

Como se hizo para el caso de las muestras irradiadas a 808 nm, se estudió la estabilidad de los nanomateriales tras ser irradiados a 532 nm. Conviene resaltar que la irradiación de AuNR5, AuNR7 y AuNR8 provocó un cambio completo del color de las muestras, pasando de un tono azul oscuro/negro a rojo (ver Figura 32). Esto es un claro indicio de que se produce un cambio muy significativo en la estructura del nanomaterial; por el color rojizo de los distintos AuNRs al ser irradiados, se puede anticipar que estos pasan a adquirir una estructura esférica.

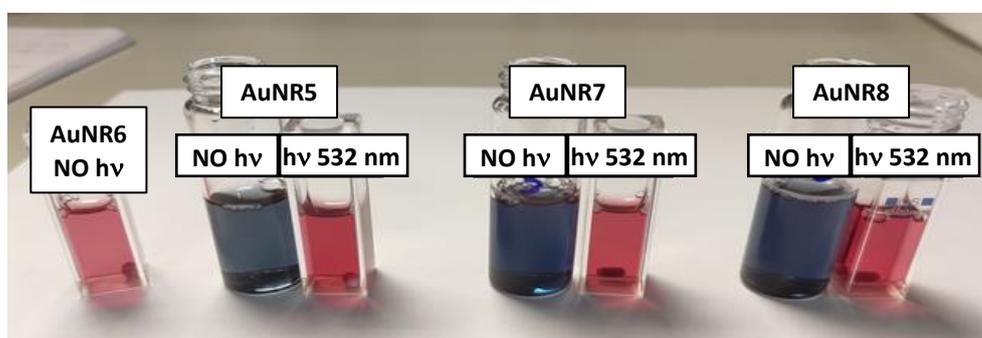


FIGURA 32. Fotografía de las muestras AuNR5, AuNR6, AuNR7 y AuNR8, antes y después de ser irradiadas a 532 nm; conviene mencionar que AuNR6 no sufrió cambios significativos de color.

Además de detectarse un cambio de color completo de los nanorods, también se observó un cambio muy significativo en sus espectros de absorción UV-vis tras de ser irradiados a 523 nm (ver Figura 33).

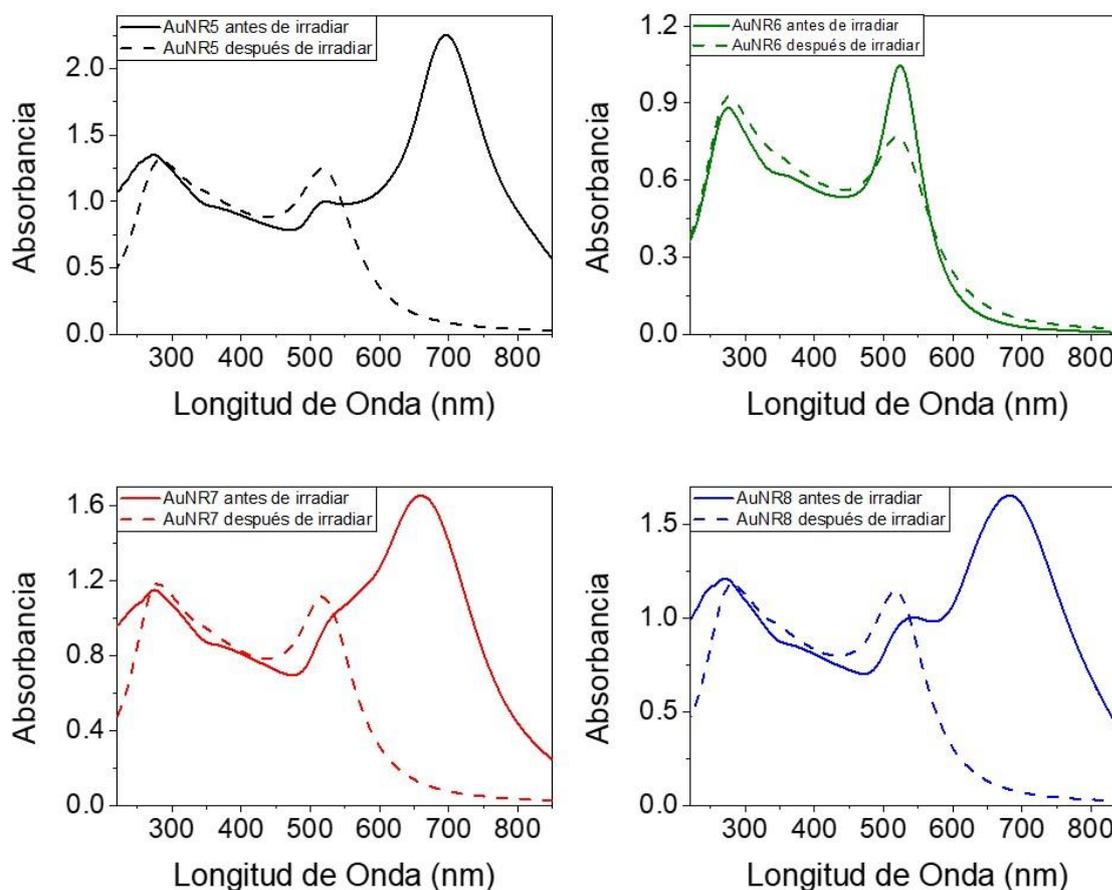


FIGURA 33. Espectros de absorción de las muestras AuNR5, AuNR7, AuNR8 y AuNR9, antes y después de irradiar a 532 nm.

Como se puede observar, la irradiación a 532 nm provocó la desaparición de la banda longitudinal de plasmón en cada uno de los AuNRs estudiados. Los espectros de todas las muestras tras ser irradiadas acaban mostrando una única banda de absorción alrededor de los 530 nm, con una forma muy similar a la que tienen las nanopartículas esféricas. Así pues, se puede concluir que la irradiación de AuNRs a 532 nm genera un cambio total de la estructura del nanomaterial, pasando éste de forma de varilla a esférica. Adicionalmente, este proceso podría dar lugar a mayor agregación de los nanomateriales, con el consiguiente aumento de su toxicidad.

Cuando se irradia con un láser a 532 nm, la energía del haz es mayor que cuando se irradia a una longitud de onda mayor. Los fotones que forman el haz de luz que sale del láser chocan contra los electrones superficiales de los nanorods. Cuando la longitud de onda del láser se sincroniza con la banda transversal de plasmón, los electrones superficiales empiezan a vibrar produciendo un estrechamiento del nanorod hasta llegar a romperse. Dentro de la duración del pulso del láser, los nanorods de oro absorben los fotones, y como la transferencia de calor entre el nanorod y el medio (disolvente) es lenta, se produce un aumento de la energía interna de los nanorods que hace que se

fragmenten en forma de nanopartículas esféricas. Así pues, un láser de pulso de alta potencia, cuando irradia una disolución coloidal de nanorods de oro, los funde convirtiéndolos en nanopartículas esféricas [25].

Algo importante a tener en cuenta como paso previo al posible uso de AuNRs en PTT, es que no produzcan toxicidad en células no cancerosas o a otros orgánulos. Como se ha comentado con anterioridad, unos de los objetivos principales de utilizar nanorods de oro en terapia fototérmica es que la irradiación de los nanorods incremente la temperatura en el tumor con el fin de matar las células cancerosas. Los resultados obtenidos indican que todas las muestras han inducido un aumento de la temperatura tras ser irradiadas tanto a 532 como a 808 nm, por lo que podría esperarse que podrían ser útiles en PTT; sin embargo, las irradiaciones a 808 nm parecen ser más ventajosas ya que no producen cambios significativos en la estructura del nanomaterial, mientras que las irradiaciones a 532 nm sí generan cambios en las nanopartículas, pudiendo dar lugar a la formación de agregados que podrían generar daños adicionales de toxicidad que convendría evitar, como por ejemplo taponar capilares, siendo muy perjudicial para el organismo.

Así, tras analizar todos los resultados derivados del ensayo fototérmico, los nanorods de oro parecen presentar mejores propiedades que las nanopartículas esféricas de oro para su posible uso en PTT. Además, para conseguir mejores rendimientos, es preferible que el máximo de la banda longitudinal de plasmón esté cerca de la longitud de onda a la que se va a irradiar, ya que generará un mayor incremento de la temperatura en un menor tiempo de irradiación.

3.4.FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO.

3.4.1.FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO CON HS-PEG-COOH

Como ya se comentó en la introducción, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter ampliamente utilizado para diferentes aplicaciones tecnológicas, especialmente para aplicaciones biológicas. Pertenece a un tipo de medicamentos que reciben el nombre de laxantes osmóticos. Debido a sus propiedades físico-químicas, cada vez se utiliza más en biomateriales.

El objetivo principal de funcionalizar los AuNRs es el de sustituir las moléculas de CTAB adsorbidas en la superficie del nanorod de oro por moléculas de PEG, ya que el CTAB es altamente tóxico. El proceso de eliminar el CTAB de los nanorods puede provocar la agregación de los nanorods, lo cual conduciría a un aumento notable de su citotoxicidad o incluso a la agregación completa, lo que impediría su uso para cualquier tipo de aplicación, ya que formaría estructuras metálicas macromoleculares que no serían funcionalizables ni útiles en ningún sentido. En la bibliografía se pueden encontrar distintos métodos para funcionalizar AuNRs; sin embargo, no todos son efectivos ni tampoco se obtienen AuNRs lo suficientemente libres de CTAB para su uso en aplicaciones biológicas. En este proyecto, se utilizó un método muy sencillo, capaz de poder intercambiar las moléculas de CTAB por las de PEG sin provocar ningún cambio en la estructura de los nanorods de oro[24]. Los reactivos que se utilizaron en este método son los que se muestran en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la funcionalización de AuNR con PEG.

REACTIVOS	MASA MOLAR (g/mol)
Tween 20	1227,54
BSPP	500
PEG	3145
NaCl	58,44

La estructura molecular de los reactivos utilizados se muestra en la FIGURA 34.

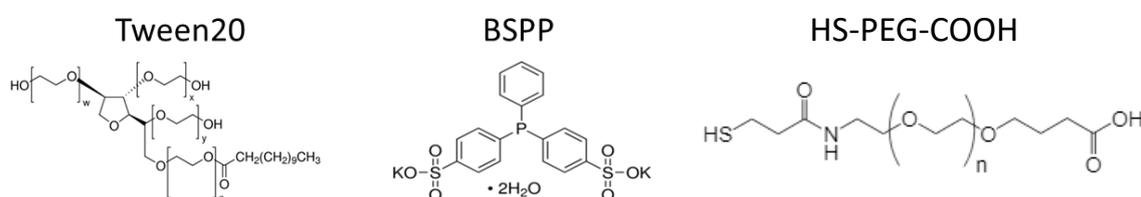


FIGURA 34. Estructura molecular del Tween20, BSPP (Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt) y HS-PEG-COOH.

El Tween20 es un tensoactivo no iónico que se utiliza para estabilizar la superficie de los nanorods de oro. En lo que respecta al BSPP, es una sal de triarilfosfina soluble en agua y realiza la función de agente de activación en la superficie de los nanorods de oro. Su tamaño molecular es más pequeño en comparación al tamaño de las moléculas de PEG, por ese motivo, tiene mayor facilidad para introducirse dentro de la bicapa lipídica que forma el CTAB alrededor de los nanorods de oro.

El mecanismo de funcionalización de AuNRs con PEG (ver Figura 35) se inicia con que las moléculas de Tween20 se introducen a través de la bicapa de CTAB para anclarse a la superficie del nanorod y actuar como un agente estabilizante. Seguidamente, las moléculas de BSPP también se introducen dentro de la bicapa de CTAB y se absorbe fácilmente a la superficie del nanorod de oro. El BSPP tiene una estructura molecular que presenta varias cargas, que primero desplaza las moléculas de CTAB de la superficie del nanomaterial y luego activa electrostáticamente la superficie de AuNR para que se puedan anclar las moléculas de PEG. Finalmente, el NaCl provoca una mayor estabilidad de los nanorods, ya que tienen la capacidad de anclar a los iones de plata sobre la superficie de los nanorods de oro.

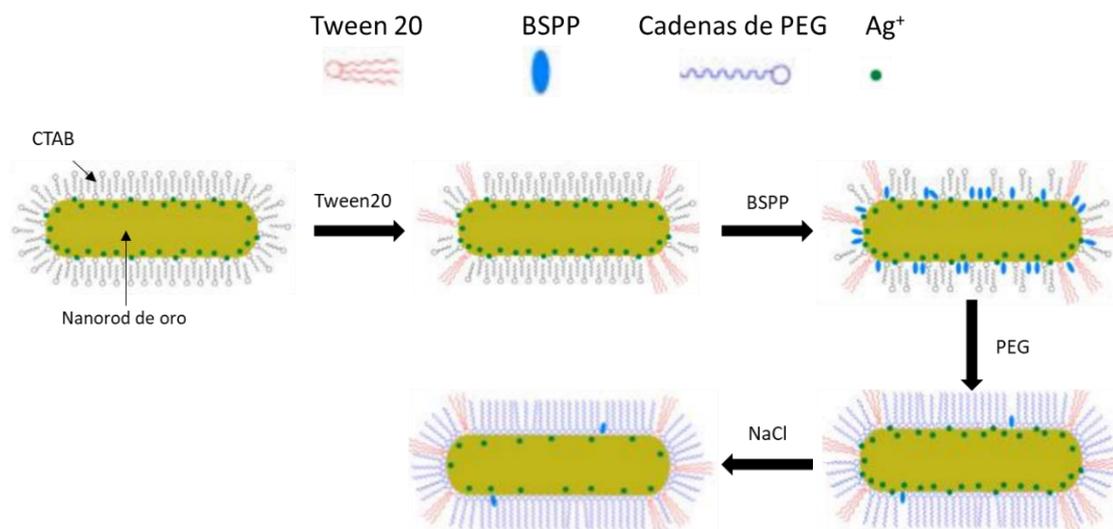


FIGURA 35. Representación del mecanismo de funcionalización de AuNR con PEG.

Para funcionalizar los AuNR con PEG, se siguió el siguiente protocolo: en primer lugar, se prepararon todas las disoluciones de los reactivos que intervienen. Todos los reactivos son sólidos, excepto el Tween20 que es un líquido muy viscoso. Para preparar una disolución de Tween20 de 200 μL con una relación de 2% en volumen en agua Milli-Q, se cogió un vial y se le añadieron 196 μL de agua. Seguidamente, con la ayuda de una micropipeta, se cogieron 4 μL de Tween20 y se añadieron al vial conteniendo los 196 μL de agua Milli-Q; este paso se tiene que realizar con mucho cuidado porque al ser una muestra viscosa puede formar burbujas en el interior de la pipeta; además, hay que evitar que haya un exceso de reactivo alrededor de la punta de la pipeta que varíe la cantidad de Tween20 añadida.

Los otros reactivos, al ser compuestos sólidos, se pudieron pesar sin problemas, preparándose las disoluciones en medio acuoso que se indican en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados para la funcionalización de AuNRs con PEG.

REACTIVOS	MASA	MOLES	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
BSPP	10 mg	$2 \cdot 10^{-5}$	200 μL	0,1 M
PEG	5 mg	$1,6 \cdot 10^{-6}$	1600 μL	0,001 M
NaCl	467,52 mg	0,008	4000 μL	2 M

La funcionalización de AuNRs se realizó de la siguiente forma: en viales conteniendo 1.5 mL de agua, con una agitación de 200 rpm, se añadió de forma consecutiva las siguientes cantidades de reactivo: 100 μL de la disolución de Tween20 2% en volumen, 100 μL de la disolución de BSPP 0,1M, 800 μL de la disolución de PEG 0,001M y 2000 μL de la disolución de NaCl 2 M. Una vez añadido todos los

reactivos, se añadió 4 mL de la muestra correspondiente de AuNR, dejándose la mezcla de reacción en agitación suave (200 rpm) y a temperatura ambiente durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, se detuvo la agitación y se realizaron diversos lavados con agua Milli-Q, con el fin de eliminar el exceso de reactivo que no haya reaccionado, así como para eliminar el CTAB eliminado de la superficie de AuNR. Cada lavado se realiza con unos 5 mL de agua, donde la muestra se centrifuga a 12000 rpm durante 15min y a 10 °C, eliminando el sobrenadante tras cada centrifuga y rediluyendo de nuevo con agua Milli-Q. Finalmente, las muestras funcionalizadas con PEG se filtraron en filtros de jeringa de PTFE de 0.2 µm.

La Figura 36 muestra el espectro de absorción UV-vis de AuNR1 en CTAB y tras ser funcionalizado con PEG.

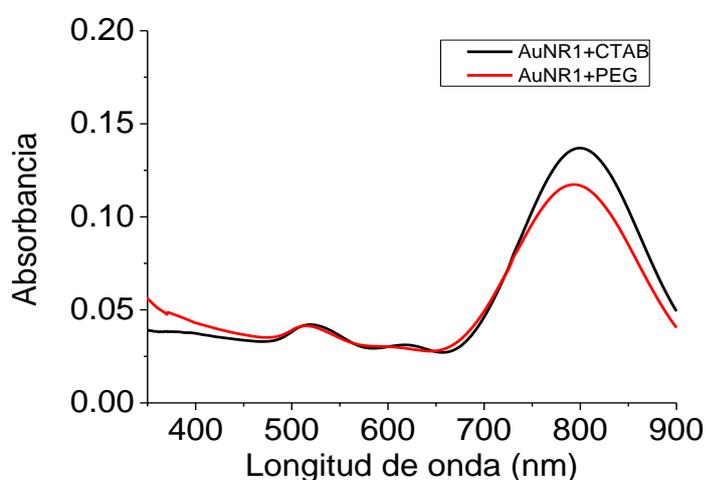


FIGURA 36. Espectros de absorción de AuNR1 en CTAB y funcionalizado con PEG.

Comparando el espectro de absorción de los nanorods de oro de la muestra AuNR1 funcionalizados con PEG y el espectro de absorción de los mismos nanorods sin funcionalizar (con CTAB en la disolución), se observan pequeñas diferencias entre las dos bandas de plasmón; esto es debido a que se modifica la superficie del nanomaterial. Existen algunas diferencias entre los espectros a longitudes de onda menores a 400 nm, pero en este rango espectral no aparece ninguna referencia característica relacionada con el tamaño o forma de los nanorods de oro.

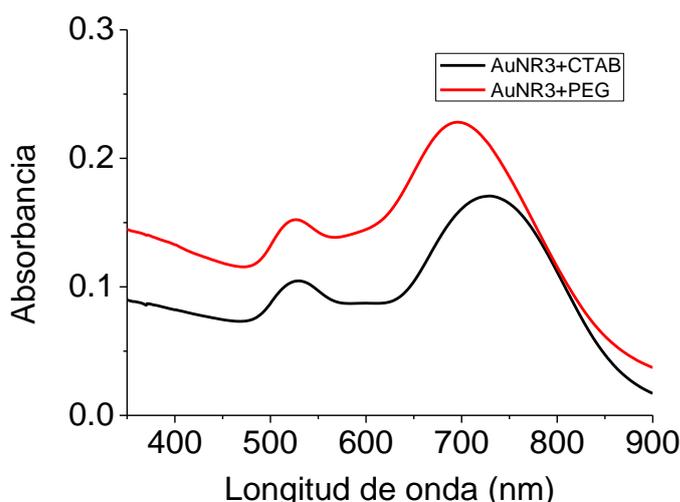


FIGURA 37. Espectros de absorción de AuNR3 en CTAB y funcionalizado con PEG.

Como se puede observar, al funcionalizar AuNR3 con PEG, se observan cambios algo más significativos en el máximo de absorción de la banda de plasmón longitudinal en comparación con AuNR1. Estos se deben a que se modifica la superficie del nanorod.

3.4.2.FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANORODS DE ORO CON LA PROTEÍNA ALBÚMINA SÉRICA

Las cadenas de PEG permiten anclar una proteína a la superficie de los nanorods de oro. Con el objetivo de observar diferencias en los estudios de viabilidad celular, se funcionalizaron los nanorods de oro de la muestra AuNR3, que contenían PEG, con la proteína albúmina sérica humana (HSA), cuya estructura se muestra en la Figura 38.



FIGURA 38. Estructura de HSA.

Para poder anclar HSA covalentemente a las cadenas de PEG de la superficie de los nanorods de oro, se hacen reaccionar con un exceso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y de N-hidroxisuccinimida (NHS); la mezcla de reacción se deja en agitación durante una hora. Pasado ese tiempo, el crudo de reacción se centrifuga durante 15 min a 12000 rpm a 10 °C. En estas condiciones,

los AuNRs-PEG-NHS quedarán en el fondo del tubo Falcon, mientras que los reactivos que no hayan reaccionado quedarán en disolución, la cual se elimina por decantación. A continuación, se resuspenden los AuNRs-PEG-NHS en 2 mL de agua y se le añade una disolución conteniendo HSA en exceso (2 mg/mL), dejándose la mezcla en agitación suave y temperatura ambiente hasta el día siguiente. Pasado ese tiempo, el crudo de reacción se centrifuga durante 15 min a 12000 rpm a 10 °C, desechando el sobrenadante, y se realizan varios lavados en agua para eliminar el exceso de HSA que no haya reaccionado. Así, finalmente tendremos nanorods de oro funcionalizados con HSA (AuNRs-PEG-HSA).

La reacción se llevó a cabo utilizando 400 µL de los nanorods de oro con PEG y HSA. Para ello, primero se preparó una disolución madre de la proteína a una concentración de 20 µM. Así, sabiendo que la masa molecular de HSA es de 67 kDa, se calcularon los gramos de proteína que había que pesar para luego diluirse en 200 µL de agua Milli-Q y así tener una concentración de 20 µM.

$$20 \cdot 10^{-6} M \times 200 \cdot 10^{-6} L = 4 \cdot 10^{-9} \text{ moles de HSA}$$
$$4 \cdot 10^{-9} \text{ moles de HSA} \times 67000 \frac{\text{gramos}}{\text{mol}} = 0,00268 \text{ gramos de HSA}$$

Conocida la cantidad de HSA a pesar para llevar a cabo la funcionalización de AuNR-PEG con la proteína, se procedió a seguir el protocolo experimental arriba explicado. Dicha reacción de funcionalización de los nanorods de oro con PEG y HSA se realizó principalmente con AuNR3. Así, tras obtener AuNR3-PEG-HSA, se registró su espectro UV-vis (ver Figura 39).

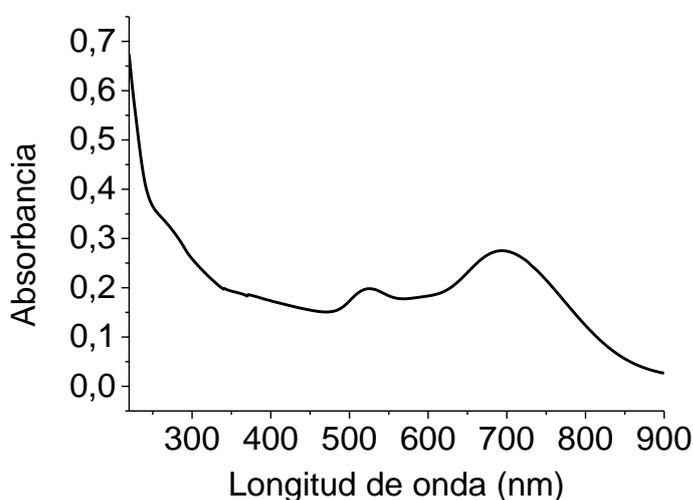


FIGURA 39. Espectro de absorción UV-vis de AuNR3-PEG-HSA.

3.5. ESTUDIO CELULAR. ENSAYOS BIOLÓGICOS CON SKBR3

Tras caracterizar los nanorods de oro y estudiar sus propiedades ópticas y físicas tras irradiarlos con luz de diferente energía, se llevó a cabo un estudio celular con el fin de investigar la posibilidad de poder utilizarlos en aplicaciones biológicas. Para ello se cultivaron células de adenocarcinoma humano SKBr-3, que son células cancerosas de mama humana.

Al tratar con células vivas, todo el procedimiento se debe realizar con especial atención, dentro de cabinas de flujo laminar perfectamente esterilizadas, ya que cualquier fallo podría provocar la contaminación de las células y provocar su muerte. Para que esto no suceda, todo el material que se introduce en la vitrina debe estar previamente limpiado y esterilizado con etanol 70%, para así evitar cualquier contaminación de las células.

Para el estudio de viabilidad celular, se utilizaron dos muestras de nanorods de oro: AuNR1 y AuNR3 a una concentración aproximada de 80 nM. En el caso de AuNR1, se utilizaron AuNR1 en CTAB y funcionalizado con PEG, para observar la diferencia entre ambos compuestos y ver cómo afectan a las células. Por lo que respecta los nanorods de la muestra AuNR3, se quería observar la utilidad que tiene utilizar estos nanorods con PEG y la mejora del rendimiento del proceso que tiene anclar la proteína HSA o a la superficie de la nanopartícula. Adicionalmente, también se estudió el efecto que podría tener FBPet interaccionando con HSA. FBPet es un derivado etilado del fármaco flurbiprofeno (FBP), el cual se usa para el tratamiento del dolor, fiebre, procesos inflamatorios, etc [26].

Para preparar la muestra de los AuNR3-PEG+HSA+FBPet, primero se preparó una disolución concentrada de FBPet utilizando como disolvente agua Milli-Q, y con la ayuda de una micropipeta se añadió a la muestra AuNR3-PEG+HSA, obteniendo finalmente una disolución de concentración de FBPet de *ca.* 80 nM.

Las células SKBr-3 se encontraban congeladas en tubos criogénicos a -80 °C. En primer lugar, se procedió a descongelar las células; para ello, se introdujeron en un baño de agua a 37 °C durante 2-3 minutos. Posteriormente, se pasaron a un tubo de centrifuga y se añadió 9 mL de medio de cultivo (McCoy HyClone) con nutrientes (FBS). A continuación, se introdujo en una centrifuga a 800 rcf durante 5 minutos a 21 °C. Tras centrifugarse, se eliminó el sobrenadante, quedando las células en el fondo del tubo, las cuales se resuspendieron con 4 mL de medio de cultivo. Las células se introdujeron en una placa de cultivo con 10 mL adicionales de medio de cultivo y se dejaron en el incubador a 37 °C en atmosfera de dióxido de carbono al 5% durante 48h. De esta forma, se favoreció la replicación de células con fin de obtener una cantidad adecuada para proceder a realizar los ensayos de viabilidad celular. Las células que van creciendo sobre la superficie de la placa quedan pegadas a la misma; estas se muestran en la Figura 40.

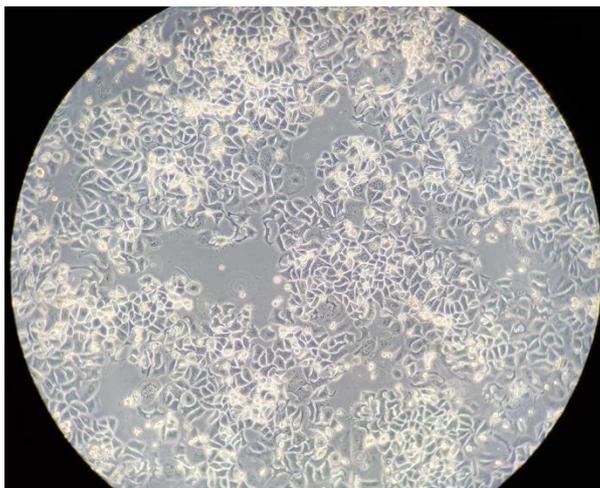


FIGURA 40. Fotografía de las células SKBr-3 tomada por microscopio.

Para poder desanclar las células de la superficie de la placa, se utilizó tripsina-EDTA. La tripsina es una enzima que realiza la función de romper enlaces peptídicos mediante hidrólisis. Se quiere levantar las células de la placa de cultivo para después transferirlas a un pozo Nunc Nunclon™ Surface transparente de 96 pocillos (ver Figura 41), donde se realizará el ensayo de viabilidad celular. Para poder desanclar las células, se procedió de la siguiente forma: primero se eliminó el medio de cultivo de la placa. Seguidamente, se lavó con 5 mL de disolución tampón fosfato salino estéril (PBS), homogeneizando para lavar bien la placa. A continuación, se añadieron 5 mL de tripsina, asegurándose que cubría toda la superficie de la placa, y se dejó incubar durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se comprobó en el microscopio que todas las células se habían despegado de la superficie de la placa (en este punto, las células tienen un aspecto circular, distinto al mostrado en la Figura 40, donde están pegadas sobre la superficie de la placa). Si se observa algunas células que aún no se ha despegado, se les ayuda con pequeños golpes sobre la placa.

Una vez todas las células se despegaron de la superficie de la placa de cultivo, se añadieron 5 mL del medio de cultivo con el fin de desactivar la tripsina; para ello, se homogenizó bien la disolución con el medio. Seguidamente, con la ayuda de la pipeta electrónica, se recogió todo el contenido de la placa de cultivo y se dejó en un tubo Falcon de 15 mL, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm y 21 °C. Al finalizar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 4 mL de medio de cultivo. Para calcular la concentración de las células, se realizó de forma manual mediante el uso de un hemocitómetro Neubauer (ver Figura 41). Para ello se pegó el cubreobjetos al hemocitómetro y se pipetearon 10 μ L de la muestra de células por un lado de la placa del hemocitómetro. El hemocitómetro Neubauer contiene una cuadrícula que facilita el conteo del número de células depositadas en cada cuadrante, para así calcular de forma aproximada el número total de células que hay en los 4 mL en las que se resuspendieron.

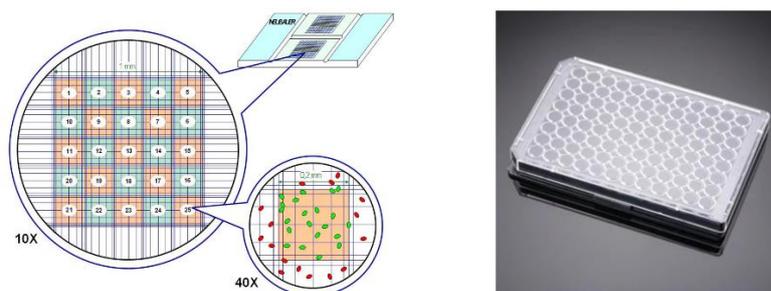


FIGURA 41. Cámara de Neubauer (izquierda) y placa de 96 pocillos (derecha).

Una vez introducida la muestra dentro de la placa, con la ayuda del microscopio se contó el número de células que se encontraban en el interior de cada cuadrante. La cuadrícula del hemocitómetro utilizado está compuesta por cuatro cuadrículas, por lo que se contó el número de células en cada cuadrante para realizar una media.

Tabla 6. Cantidad de células cultivadas medidas mediante un hemocitómero Neubauer.

	Número de células SKBr-3
CUADRANTE A	26
CUADRANTE B	27
CUADRANTE C	15
CUADRANTE D	37
Promedio	26,25

El promedio obtenido, en este caso de 26,25, se multiplica por 10^4 ; así, la concentración de células que se obtuvo en los 4 mL de medio de cultivo fue de $26,25 \times 10^4$ células/mL. El ensayo de viabilidad celular se debe realizar con una concentración de células de $6 \cdot 10^4$ células/mL. Para ello, una vez calculada la concentración de células, se calculó el volumen de medio que se tiene que añadir para conseguir diluir las células hasta la concentración necesaria ($6 \cdot 10^4$ células/mL).

A continuación, se procedió a sembrar las células en los pocillos de la placa Nunc Nunclon™. Para ello, con la ayuda de una pipeta multicanal, se introdujeron 100 μ L de células en los pocillos centrales de la placa y PBS estéril en los pocillos de los exteriores. Finalmente, la placa de 96 pocillos se introdujo en la incubadora durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de dióxido de carbono.

Tras pasar las 48 horas, se eliminó el medio de cada pocillo con la ayuda de la pipeta multicanal y se le realizaron dos lavados con 100 μ L de PBS estéril. A continuación, se añadieron 50 μ L de las disoluciones de AuNR (~80 nM) por triplicado, así como los controles positivos (estauroesporina; induce la muerte celular) y negativos (medio de cultivo sin nutrientes; no daña las células). La placa se dejó incubar durante 3 horas en atmosfera de 5% de dióxido de carbono a 37 °C. Pasado ese tiempo, se eliminaron los 50 μ L de muestra de cada pocillo y se volvieron a realizar dos lavados, el primero utilizando 100 μ L de medio de cultivo sin nutrientes y el segundo utilizando 100 μ L de medio de cultivo con nutrientes.

Con el fin de estudiar el potencial de AuNRs en PTT, algunas células fueron irradiadas con el láser de 808 nm durante 5 min; para ello, y como ya se hizo con anterioridad, el láser se colocó a unos 20 cm

de los pocillos a irradiar. Tras irradiar las muestras, las células fueron incubadas de nuevo durante 48 horas en atmosfera de 5% de dióxido de carbono a 37 °C.

Finalmente, pasados los dos días de incubación, se añadió a cada pocillo 20 µL del reactivo CellTiter-Blue®. Este reactivo interacciona con las células y tiene un color diferente dependiendo del estado de éstas: si las células están vivas es de color rosa, mientras que si las células están muertas es de un color azul oscuro. Así, tras añadir el reactivo CellTiter-Blue®, se volvió a incubar la placa durante 4 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C.

Tras la incubación, se procedió a determinar la viabilidad celular: para ello, se utilizó un Lector Multilabel EnVision™ (Wallac) 2103 (Perkin Elmer). Así, se midió la emisión de cada pocillo a 590 nm tras excitar a 560 nm. A partir de los valores obtenidos en cada pocillo, se tomó como referencia los valores de los controles positivo y negativo, sino un 100% de viabilidad celular el resultado obtenido en el control negativo y un 0 % el del control positivo, y en función de las intensidades obtenidas para los pocillos conteniendo AuNRs, se hizo la media de las tres medidas y se sacó el porcentaje correspondiente con su desviación típica. Los resultados obtenidos se muestran e la Figura 42.

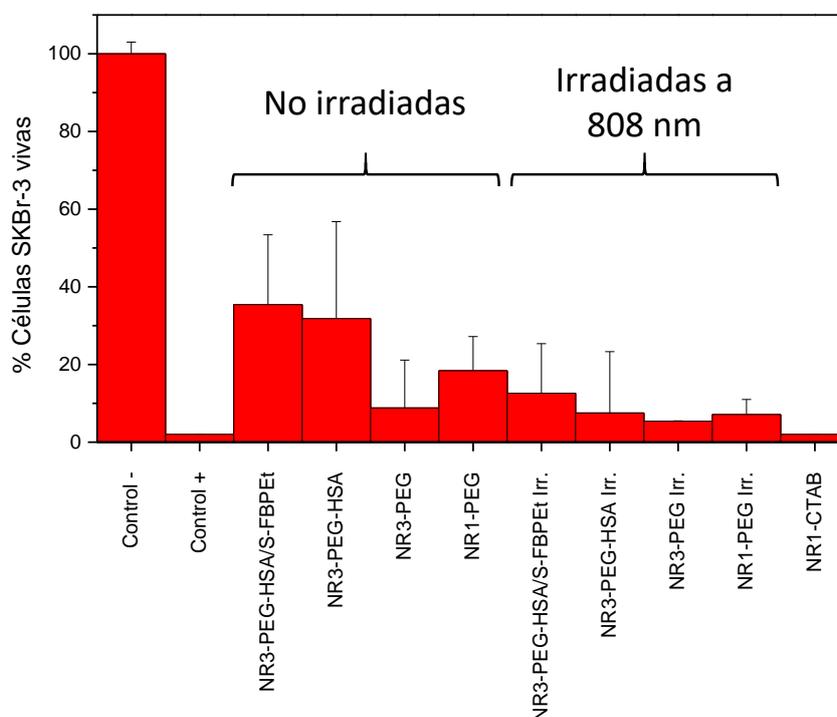


FIGURA 42. Tasa de supervivencia de células cancerosas SKBr-3.

Como se puede observar, la tasa de supervivencia de las células SKBr-3 es inferior al 40 % en todos los casos estudiados. Conviene destacar que los AuNR conteniendo CTAB en la superficie son mucho más tóxicos que los funcionalizados con PEG y/o HSA. Respecto a estos últimos, es importante mencionar que la irradiación de las células conteniendo estos AuNRs provoca una mayor muerte de las células cancerosas, lo cual es un claro indicio de que la irradiación a 808 nm provoca un aumento de temperatura localizado que induce la muerte celular. Sin embargo, estos resultados no son del todo satisfactorios ya que los AuNR funcionalizados con PEG y/o HSA ya inducen la muerte celular sin necesidad de irradiar. El resultado más satisfactorio sería diseñar AuNRs que no generaran daño alguno

a las células mientras que tras ser irradiados a 808 nm, generaran una importante muerte de células cancerosas.

En general, sí que se puede concluir la utilidad de los nanorods de oro para aplicarse en terapias fototérmicas (PTT) para tratar de eliminar células tumorales. También el hecho de funcionalizar a los nanorods con HSA a las cadenas de PEG provoca que aumente su biocompatibilidad sin causar tantos daños al organismo. De cualquier forma, convendría realizar experimentos adicionales con el fin de confirmar los resultados obtenidos, ya que por medidas del Covid-19, sólo se pudo realizar un único experimento de viabilidad celular.

3.6. ESTUDIOS FUTUROS

Las restricciones derivadas de la pandemia por el Covid-19 provocaron muchas limitaciones a la hora de desarrollar este trabajo de fin de grado: acceso al laboratorio de investigación del departamento de química, acceso al laboratorio de cultivos celulares en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La fe, etc. Por lo tanto, se podrían realizar ciertas investigaciones adicionales que aportaran mayor información sobre los resultados obtenidos acerca de los nanorods de oro diseñados, así como de su posible uso en aplicaciones biológicas.

En primer lugar, convendría repetir los experimentos de viabilidad celular presentados en este TFG, con el fin de estudiar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Además, sería interesante estudiar la citotoxicidad de los AuNR no sólo en células cancerosas SKBr-3 sino en células sanas de mama humana MCF-10A, con el fin de investigar el daño que se puede generar en éstas últimas. De esta forma, se podrían diseñar nanomateriales no sólo con la proteína que se ha utilizado en este TFG (la albúmina sérica humana), sino con otras biomoléculas que puedan mejorar su biocompatibilidad y selectividad en la interacción con células cancerosas, lo cual sería una situación ideal.

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

- ✓ Se han diseñado nanorods de oro de diferente tamaño empleando el método de crecimiento con semillas, intentando optimizar el proceso de síntesis en función de las necesidades requeridas. Se ha observado que el tamaño de AuNRs varía en función del tiempo que se dejan las semillas de oro en reposo durante el proceso de síntesis.
- ✓ Se han caracterizado las propiedades ópticas y estructurales de AuNRs de diverso tamaño mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Algunos de los espectros de absorción UV-Vis de los AuNRs presentan una banda de plasmón transversal situada a una longitud de onda muy parecida, lo que indica que tienen un tamaño parecido. Sin embargo, se han sintetizado AuNRs con la banda longitudinal de plasmón situada a longitudes de onda mayores, lo cual indica que poseen una longitud mayor. Finalmente, con la ayuda de las imágenes TEM, se ha podido observar las diferentes formas de las nanopartículas obtenidas y se ha podido medir sus dimensiones.
- ✓ La irradiación de los AuNRs con un láser pulsado de 532 nm y un láser continuo de 808 nm ha permitido estudiar las propiedades fototérmicas de los distintos AuNRs. Se ha observado que todos los irradiados a 808 nm producen un aumento de la temperatura que varía ligeramente en función del tamaño de AuNR, siendo superior para el nanorod de mayor longitud (con la banda de plasmón cercana a 800 nm). Cuando los mismo AuNRs se irradian a una longitud de onda de 532 nm, también se produce un aumento de la temperatura ligeramente inferior que el conseguido a 808 nm, sin observarse diferencias significativas entre los distintos AuNR. Además, a 532 nm, se produce la fragmentación de los AuNRs convirtiéndolos en nanopartículas esféricas. Por lo tanto, los AuNRs cuya banda longitudinal de plasmón se sitúa más cerca del infrarrojo, aportan mayores beneficios para aplicaciones fototérmicas (PTT) ya que permite utilizar un láser de menor energía que no genere cambios significativos en la estructura del nanomaterial, además de provocar un menor daño a los tejidos del organismo.
- ✓ Se ha conseguido funcionalizar los AuNRs con polietilenglicol. De esta forma, se han sustituido las cadenas de CTAB (altamente tóxico) por las cadenas polipeptídicas de PEG, mejorando la biocompatibilidad de los AuNRs para su posible uso en aplicaciones biológicas. Además, se ha conseguido unir covalentemente la proteína albúmina sérica humana (HSA) a la superficie de los AuNRs a través de las cadenas de PEG, lo que también ha mejorado su biocompatibilidad.
- ✓ Por último, se ha estudiado la viabilidad celular de los AuNRs sintetizados en células cancerosas de mama humana SKBr-3 mediante el ensayo de citotoxicidad con CellTiter Blue®. A pesar de que convendría realizar experimentos adicionales que confirmen los resultados obtenidos, se ha observado que la citotoxicidad de los AuNRs aumenta cuando son irradiados. Se puede afirmar que los AuNRs con CTAB como agente estructurante son mucho más tóxicos que cuando contienen cadenas de PEG ancladas a la superficie. Además, el hecho de funcionalizar los AuNRs con HSA y flurbiprofeno-etilado a las cadenas de PEG provoca que aumente su

Diseño de nanorods de oro con fármacos fotoactivos para estudios de citotoxicidad celular

biocompatibilidad sin causar tantos daños al organismo. En función de los resultados obtenidos, como trabajo futuro buscar otros biomarcadores (otro tipo de proteínas, vitaminas, fármacos, cadenas polipeptídicas, etc.) para aumentar la biocompatibilidad sin generar daño alguno a la célula cancerosa, para así generarlo exclusivamente por la aplicación de luz visible-IR.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, "The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine," *Molecules*, vol. 25, no. 1, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/molecules25010112.
- [2] A. Santamaria, "Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology," *Methods Mol. Biol.*, vol. 926, pp. 1–12, 2012, doi: 10.1007/978-1-62703-2-1_1.
- [3] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, and M. K. Danquah, "Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 1050–1074, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- [4] "Roberto Aula Mentor Multimedia y WEB 2.0: Nanomateriales." <http://robmentorweb2.blogspot.com/2012/08/nanomateriales.html> (accessed Sep. 01, 2021).
- [5] A Dowling *et al.*, "Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties," *London R. Soc. R. Acad. Eng. Rep.*, vol. 46, no. July, pp. 618–618, 2004, doi: 10.1007/s00234-004-1255-6.
- [6] T. D. Tetley, "Health effects of nanomaterials," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. 3, pp. 527–531, 2007, doi: 10.1042/BST0350527.
- [7] J. Aizpurua, R. Esteban, P. Alonso-gonzález, and R. Hillenbrand, "Nanoóptica : controlando la luz en la nanoescala," *CicNetwork*, 2015, [Online]. Available: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/137321/1/PáginasCN15.pdf>.
- [8] G. A. Ojeda, A. M. Arias Gorman, and S. C. Sgroppo, "Nanotecnología y su aplicación en alimentos Nanotechnology and its applications in food," *Mundo Nano*, vol. 12, no. 23, pp. 89–102, 2019, [Online]. Available: <http://www.scielo.org.mx/pdf/mn/v12n23/2448-5691-mn-12-23-7.pdf>.
- [9] M. Ramos and C. Castillo, "Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas," *Ide@s CONCYTEG*, vol. 6, no. 72, 2011.
- [10] "Cáncer." <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Jul. 30, 2021).
- [11] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles," *Lasers Med. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 217–228, 2008, doi: 10.1007/s10103-007-0470-x.
- [12] J. Cao, T. Sun, and K. T. V. Grattan, "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 195, pp. 332–351, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2014.01.056.
- [13] A. M. Osorio Anaya, J. J. Manrique Fajardo, and Ó. Cornejo Sánchez, "Estudio Teórico Del Plasmón En Nanoesferas De Oro," *Rev. la Soc. Química del Perú*, vol. 85, no. 4, pp. 432–439, 2019, doi: 10.37761/rsqp.v85i4.257.
- [14] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, and H. Park, "Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy," *Front. Chem.*, vol. 7, no. APR, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00167.
- [15] H. Chen, L. Shao, Q. Li, and J. Wang, "Gold nanorods and their plasmonic properties," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 7, pp. 2679–2724, 2013, doi: 10.1039/c2cs35367a.

- [16] "Standard Gold Nanoparticles | Cytodiagnosics Inc."
<https://www.cytodiagnosics.com/collections/standard-gold-nanoparticles> (accessed Jul. 31, 2021).
- [17] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT)," *Alexandria J. Med.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–9, 2011, doi: 10.1016/j.ajme.2011.01.001.
- [18] Z. AU - Kereselidze, V. H. AU - Romero, X. G. AU - Peralta, and F. AU - Santamaria, "Gold Nanostar Synthesis with a Silver Seed Mediated Growth Method," *JoVE*, no. 59, p. e3570, 2012, doi: doi:10.3791/3570.
- [19] P. Zhao, N. Li, and D. Astruc, "State of the art in gold nanoparticle synthesis," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 257, no. 3–4, pp. 638–665, 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- [20] "Nanopartículas de oro: procesos fotoinducidos y estudios de transferencia de fase SALVADOR POCOVÍ MARTÍNEZ," 2013.
- [21] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, and P. Mulvaney, "Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 249, no. 17-18 SPEC. ISS., pp. 1870–1901, 2005, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.030.
- [22] "Anodización." <https://www.quimica.es/enciclopedia/Anodización.html> (accessed Aug. 03, 2021).
- [23] A. Gole and C. J. Murphy, "Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 19, pp. 3633–3640, 2004, doi: 10.1021/cm0492336.
- [24] K. Liu *et al.*, "Biocompatible gold nanorods: One-step surface functionalization, highly colloidal stability, and low cytotoxicity," *Langmuir*, vol. 31, no. 17, pp. 4973–4980, 2015, doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00666.
- [25] S. Link and M. A. El-Sayed, "Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 40, pp. 8410–8426, 1999, doi: 10.1021/jp9917648.
- [26] M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, and I. Vayá, "Characterisation of the lowest singlet and triplet excited states of S-flurbiprofen," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, no. 11–12, pp. 1038–1041, 2004, doi: 10.1039/b408530b.

6. ANEXOS

6. ANEXOS

6.1. ANEXO I: FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS REACTIVOS

En este apartado, se muestran los aspectos de seguridad de todos los reactivos empleados en la síntesis y funcionalización de los nanorods de oro para trabajar con ellos de forma segura.

Ácido tetracloroáurico(III) trihidrato

- Forma molecular: $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

- Toxicidad aguda Categoría 4
- Lesión ocular grave/irritación ocular Categoría 1
- Sensibilizante respiratorio Categoría 1
- Corrosión o irritación cutáneas Categoría 1B

PALABRA DE ADVERTENCIA: Peligro.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA:

- Pictogramas



- Indicaciones de peligro
 - H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
 - H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

- Consejos de prudencia

Consejos de prudencia – prevención

- P260 No respirar el polvo.
- P280 Llevar guantes/gafas de protección.

Consejos de prudencia – respuesta

- P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con abundante agua.
- P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
- P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE Toxicóloga/médico.

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

- Forma molecular: $C_{19}H_{42}BrN$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

- PELIGRO ACUÁTICO A LARGO PLAZO Categoría 1
- Lesión ocular grave/irritación ocular Categoría 1
- PELIGRO ACUÁTICO AGUDO Categoría 1
- Toxicidad aguda Categoría 4
- Corrosión o irritación cutáneas Categoría 2
- Toxicidad específica para determinados órganos Categoría 3

PALABRA DE ADVERTENCIA: Peligro.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA:

- Pictogramas

GHS05, GHS07,
GHS08, GHS09



- Indicaciones de peligro
 - H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
 - H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

- Consejos de prudencia

Consejos de prudencia - prevención

- P260 No respirar el polvo.
- P280 Llevar guantes/gafas de protección.

Consejos de prudencia - respuesta

- P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con abundante agua.
- P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
- P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE Toxicóloga/médico.
- P391 Recoger el vertido.

Borohidruro de sodio

- Forma molecular: $NaBH_4$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

- Toxicidad aguda Categoría 3.
- Lesión ocular grave/irritación ocular Categoría 1.
- Toxicidad para la reproducción Categoría 1B.
- Corrosión o irritación cutáneas Categoría 1C.
- Sustancia que, en contacto con el agua, desprende gases inflamables Categoría 1.

PALABRA DE ADVERTENCIA: Peligro.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA:

- Pictogramas

GHS02, GHS05,
GHS06, GHS08



- Indicaciones de peligro
 - H260 En contacto con el agua desprende gases inflamables que pueden inflamarse espontáneamente.
 - H301 Tóxico en caso de ingestión-
 - H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
 - H332 Nocivo en caso de inhalación.
 - H360FD Puede perjudicar a la fertilidad. Puede dañar al feto (en caso de exposición).

- Consejos de prudencia

Consejos de prudencia - prevención

- P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Consejos de prudencia - respuesta

- P301+P330+P331 EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.
- P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
- P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
- P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE toxicología/médico.

Nitrato de plata

- Forma molecular: AgNO_3
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

- Sólido comburente Categoría 2
- Sustancias y mezclas corrosivas Categoría 1
- Corrosión o irritación cutáneas Categoría 1B
- Lesión ocular grave/irritación ocular Categoría 1
- PELIGRO ACUÁTICO AGUDO Categoría 1
- PELIGRO ACUÁTICO A LARGO PLAZO Categoría 1

PALABRA DE ADVERTENCIA: Peligro.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA:

- Pictogramas

GHS03, GHS05,
GHS09



- Indicaciones de peligro
 - H272 Puede agravar un incendio; comburente
 - H290 Puede ser corrosivo para los metales
 - H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
 - H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
- Consejos de prudencia
 - Consejos de prudencia - prevención
 - P273 Evitar su liberación al medio ambiente.
 - P280 Llevar guantes/gafas de protección.
 - Consejos de prudencia - respuesta
 - P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuagar la piel con agua [o ducharse].
 - P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.
 - P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE toxicología/médico.

Ácido ascórbico

- Forma molecular: $C_6H_8O_6$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

Esta sustancia no reúne los criterios para ser clasificada conforme al Reglamento no 1272/2008/CE.

PALABRA DE ADVERTENCIA: No es necesario.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA: No es necesario

Tween 20

- Forma molecular: $C_{58}H_{114}O_{26}$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

Esta sustancia no reúne los criterios para ser clasificada conforme al Reglamento no 1272/2008/CE.

PALABRA DE ADVERTENCIA: No es necesario.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA: No es necesario

BSPP

- Forma molecular: $C_{18}H_{13}K_2O_6PS_2 \cdot 2H_2O$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

- Irritación cutánea Categoría 2
- Irritación ocular Categoría 2
- Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única Categoría 3

PALABRA DE ADVERTENCIA: Atención.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA:

- Pictogramas



- Indicaciones de peligro
 - H315 Provoca irritación cutánea.
 - H319 Provoca irritación ocular grave.
 - H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- Consejos de prudencia
 - P261 Evitar respirar el polvo.
 - P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Polietilenglicol (PEG)

- Forma molecular: $H(OCH_2CH_2)_nSH$
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

Esta sustancia no reúne los criterios para ser clasificada conforme al Reglamento no 1272/2008/CE.

PALABRA DE ADVERTENCIA: No es necesario.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA: No es necesario

Cloruro de sodio (NaCl)

- Forma molecular: NaCl
- Identificación de la sustancia según el Reglamento (CE) no 1272/2008:

CLASIFICACIÓN:

Esta sustancia no reúne los criterios para ser clasificada conforme al Reglamento no 1272/2008/CE.

PALABRA DE ADVERTENCIA: No es necesario.

ELEMENTOS DE LA ETIQUETA: No es necesario

6.2. ANEXO II: EQUIPOS INSTRUMENTALES

ESPECTROFOTÓMETRO

El espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-vis) es un equipo capaz de realizar un espectro UV-Visible, irradiando fotones con una longitud de onda de las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Un espectro UV-Visible es una medida gráfica de la cantidad de fotones de una longitud de onda determinada que una muestra absorbe.

Un espectrofotómetro contiene un monocromador que selecciona los fotones procedentes de una fuente de luz; así, en cada instante, la muestra es irradiada con luz de una longitud de onda determinada. El espectrofotómetro utilizado para registrar los espectros de absorción UV-vis es del modelo V-650 de la casa JASCO (ver Figura 43). Este equipo tiene un rango de medida que abarca longitudes de onda entre 190 nm hasta 1100 nm, con una velocidad de escaneo que puede alcanzar los 8000 nm/min.



FIGURA 43. Fotografía del espectrofotómetro de absorción UV-vis utilizado durante la ejecución del proyecto.

MICROSCOPIO DE TRASMISIÓN ELECTRONICA

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que irradia un haz de electrones debidamente acelerados sobre una muestra delgada bien preparada. Cuando los electrones colisionan sobre la muestra, parte de estos atraviesan la muestra y otra parte son desviados. Todos los electrones son modulados y conducidos por lentes para dar lugar a una imagen. La imagen TEM es de distintas intensidades de gris, dependiendo del grado de dispersión de los electrones incidentes. Esta imagen aporta información de la estructura de la muestra. Cuando la muestra es cristalina (como es el caso de los AuNRs), en imagen TEM se observa la orientación de los planos cristalinos. El microscopio TEM utilizado se observa en la Figura 44 (equipo del Servicio de Microscopía de la UPV).

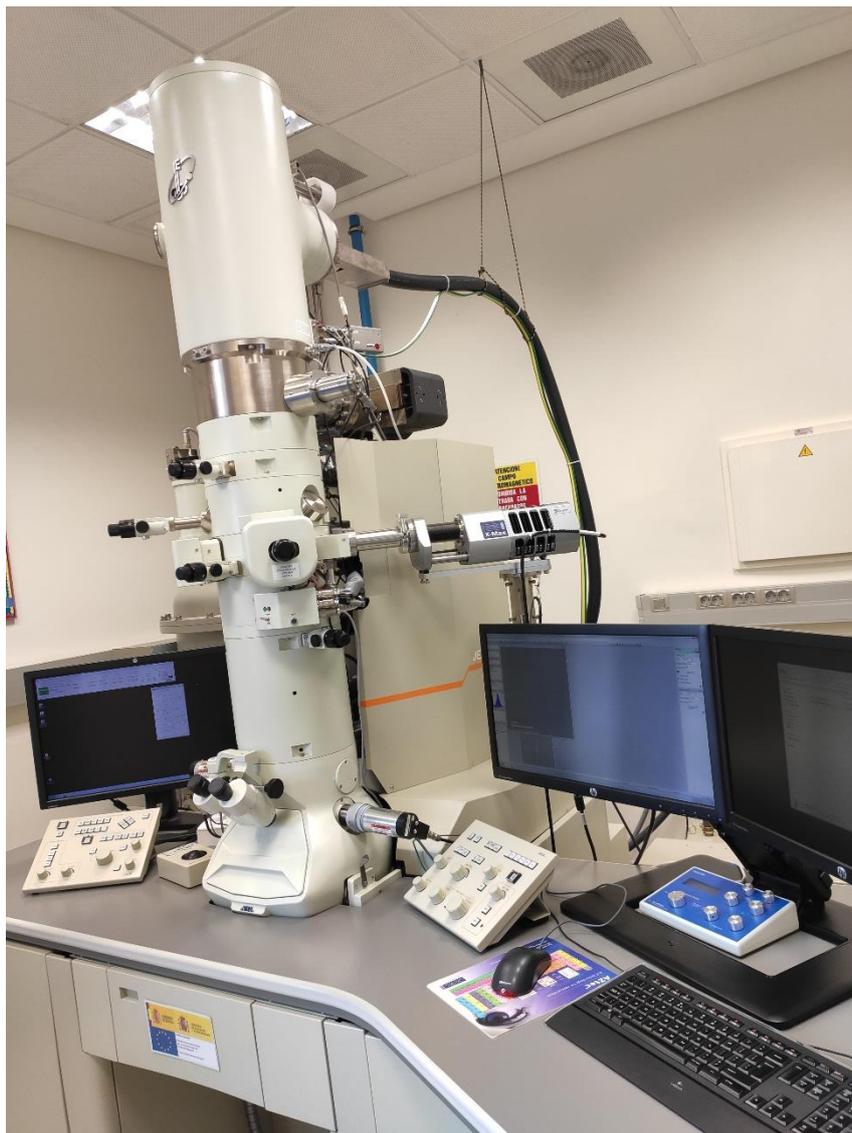


FIGURA 44. Fotografía del equipo TEM utilizado durante la ejecución del proyecto.

LÁSER CONTINUO DE 808 nm

El láser que aparece en la Figura 45 es el utilizado para irradiar los AuNRs a una longitud de onda de 808 nm con una potencia de 700 mW.

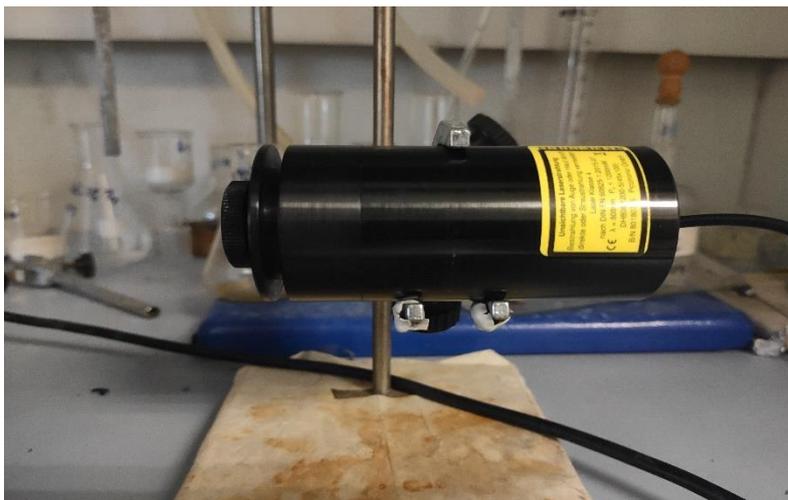


FIGURA 45. Fotografía del láser continuo de 808 nm utilizado durante la ejecución del proyecto.

LÁSER PULSADO A 532 nm

El láser que aparece en la Figura 46 es el láser pulsado (40 mJ, 10 pulsos/segundo) utilizado para irradiar los AuNRs a una longitud de onda de 532 nm.



FIGURA 46. Fotografía del láser pulsado de 532 nm utilizado durante la ejecución del proyecto.

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se presenta el documento del presupuesto con el objetivo de conocer el coste total de ejecución de este trabajo. El presupuesto se ha fraccionado en dos partidas: la primera partida es la síntesis y caracterización de los distintos AuNRs funcionalizados con PEG, HSA y flurbiprofenoetilado, y la segunda partida para el estudio celular a través de ensayos de citotoxicidad de los nanorods con líneas celulares SKBr-3.

El presupuesto total incluye el coste de los instrumentos, materiales y recursos humano que se han utilizado en cada partida. Por lo tanto, cada partida se desglosará en cuatro apartados: reactivos, materiales, instrumentalización y recursos humanos.

Los precios de los materiales de laboratorio utilizados fueron sacados de las páginas webs comerciales de la marca *Fisher Scientific*, *Labbox*. Se ha utilizado el precio unitario de cada material, de modo que si el precio que aparecía en la web era por un lote se ha dividido el precio del lote por el número de unidades de cada lote para conseguir el precio unitario de cada material. Para conocer el precio de los reactivos y disolventes se ha empleado la casa comercial Sigma-Aldrich.

La instrumentalización utilizada en proyecto se puede separar en dos bloques: instrumentalización no analítica e instrumentalización analítica. En ambos casos, para calcular el precio por hora que conlleva emplear los equipos necesarios, se ha considerado un tiempo de amortización de 10 años para todos los equipos empleados, con 180 días hábiles por año y 8 horas trabajadas por año. El coste por hora de uso se calcula aplicado la *Ecuación 1*

$$\text{Coste por hora de uso (€)} = \frac{\text{Coste equipo (€)}}{\text{Tiempo de amortización (h)}} = \frac{\text{Coste equipo (€)}}{10 \times 180 \times 8 \text{ (h)}} = \frac{\text{Coste equipo (€)}}{14400 \text{ (h)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

A excepción del servicio de microscopía electrónica se ha considerado el precio de las tarifas de servicio que se encuentran en la página web de la Universidad Politécnica de Valencia.

2. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL

El presupuesto de ejecución material como se ha dicho anteriormente está dividido en dos presupuestos parciales. Además, se ha aplicado un porcentaje de costes directos igual al 2%, correspondiente a los costes difíciles de identificar.

2.1 PARTIDA I: PRESUPUESTO PARCIAL DE LA SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE LOS AuNRs

Tabla 7. Importe total (en €) de la mano de obra empleada en la Partida I.

MANO DE OBRA				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Tutor experimental	120	20,00	2400,00
h	Técnico de laboratorio	150	18,00	2700,00
h	Graduado en Ingeniería química	250	9,00	2250,00
%	Costes Directos Complementarios	2	7350,00	147,00
Importe total de mano de obra (€)				7497,00

Tabla 8. Importe total (en €) del material empleado en la Partida I.

MATERIALES				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
Ud	Guantes desechables de nitrilo (200ud)	1	32,00	32,00
Ud	Pipeta Pasteur de vidrio (250ud)	1	9,97	9,97
Ud	Varilla magnética para agitación (10ud)	1	9,61	9,61
Ud	Microespátula con cuchara de acero inoxidable (5ud)	2	39,18	78,36
Ud	Puntas para pipeta 5000 µL (250ud)	0,5	25,11	12,56
Ud	Puntas para pipeta 1000 µL (96ud)	1	5,06	5,06
Ud	Puntas para pipeta 200 µL (96ud)	1	4,02	4,02
Ud	Puntas para pipeta 20µL (96ud)	1	4,02	4,02
Ud	Soporte de pie trípode	3	14,43	43,29
Ud	Pinza de sujeción de tres dedos de doble ajuste con nuez	3	13,16	39,48
Ud	Pinza de sujeción universal	2	15,01	30,02

Diseño de nanorods de oro con fármacos fotoactivos para estudios de citotoxicidad celular

Ud	Nuez doble, tipo fisher (4ud)	1	13,18	13,18
Ud	Portacubetas de polietileno	1	2,31	2,31
Ud	Cubeta de cuarzo de 3,5 mL de capacidad con tapa (2ud)	2	231,84	463,68
Ud	Cubeta de cuarzo de 1,4 mL de capacidad con tapa (2ud)	2	169,06	338,12
Ud	Matraz Erlenmeyer esmerilado de 50 mL	1	3,02	3,02
Ud	Matraz Erlenmeyer esmerilado de 100 mL	2	3,27	6,54
Ud	Matraz esférico esmerilado fondo redondo 50mL	4	4,20	16,80
Ud	Matraz esférico esmerilado fondo redondo 100 mL	2	4,59	9,18
Ud	Probeta graduada base hexagonal de 100 mL	2	4,00	8,00
Ud	Micropipeta de volumen variable de 2µL a 20µL	1	246,00	246,00
Ud	Micropipeta de volumen variable de 20µL a 100µL	1	246,00	246,00
Ud	Micropipeta de volumen variable de 100µL a 1000µL	1	246,00	246,00
Ud	Micropipeta de volumen variable de 1000µL a 5000µL	1	263,00	263,00
Ud	Soporte de corcho para balones de 50 mL	4	4,89	19,56
Ud	Soporte de corcho para balones de 100 mL	2	8,11	16,22
Ud	Jeringa esteril con deslizamiento Luer de 10mL (100ud)	0,3	44,15	13,25
Ud	Aguja hipodinamica (100ud)	0,3	6,20	1,86
Ud	Tapón de plastico para esmerilados (10ud)	1	6,59	6,59
Ud	Vial de vidrio transparente de 6 mL (306ud)	0,4	38,99	15,60
Ud	Vial de vidrio transparente de 20 mL (100ud)	1	88,46	88,46
Ud	Vial de vidrio de 40 mL (72ud)	1	130,08	130,08
Ud	Eppendorf de 1,5 mL (500ud)	1	15,62	15,62
Ud	Gradilla universal para tubos centrifuga	1	14,43	14,43
Ud	Tubos cónicos para centrifuga Falcon™ de 50 mL (500ud)	0,5	201,45	100,73
Ud	Recuperador de varillas magenticas de agitación	1	16,58	16,58
Ud	Filtros de jeringa de PTFE de 0.2 µm (100ud)	0,5	185,00	92,50
%	Costes Directos Complementarios	2	2569,18	51,38
Importe total de los materiales (€)				2713,06

Tabla 9. Importe total (en €) de reactivos químicos empleados en la Partida I.

REACTIVOS				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
g	CTAB	5	0,49	2,45
g	HAuCl4	0,1	157,07	15,71
g	NaBH4	0,05	1,66	0,08
g	AgNO3	0,002	7,34	0,01
g	C6H8O6	0,02	0,25	0,01
mL	Tween 20	0,5	0,70	0,35
g	BSPP	0,05	240,00	12,00
g	Polietilenglicol	0,02	364,40	7,29
g	NaCl	3	0,89	2,67
g	Albúmina sérica humana	0,003	140000,00	420,00
%	Costes Directos Complementarios	2	460,57	9,21
Importe total de reactivos (€)				469,78

Tabla 10. Importe total (en €) de la instrumentación no analítica empleada en la Partida I.

INSTRUMENTACIÓN NO ANALÍTICA					
Unidad	Descripción	Cantidad	Coste del equipo (€)	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Termómetro electrónico	1	234	0,02	0,02
h	Centrifugadora de velocidad de giro máximo de 14000 rpm	4	5394	0,37	1,50
h	Centrifugadora de Eppendorf	3	5218	0,36	1,09
h	Láser continuo de 808nm, 700 mW	1	615	0,04	0,04
h	Láser pulsado a 532 nm, 40 mJ, 10pulsos/segundo	1	730	0,05	0,05
%	Costes Directos Complementarios	2	-	2,70	0,05
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)					2,75

Tabla 11. Importe total (en €) de la instrumentación analítica empleada en la Partida I.

INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA					
Unidad	Descripción	Cantidad	Coste del equipo (€)	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Espectrofotómetro UV-Visible	10	6000	0,42	4,17
h	Placa con agitador magnético	80	1195	0,08	6,64
h	Balanza analítica con resolución 0,01mg	24	3950	0,27	6,58
€/h	Servicio de microscopía electrónica de transmisión 200 kV	2	-	135,00	270,00
%	Costes Directos Complementarios	2	-	287,39	5,75
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)					293,14

Tabla 12. Presupuesto parcial de la Partida I.

Importe total de reactivos (€)	469,78
Importe total de mano de obra (€)	7497,00
Importe total de los materiales (€)	2713,06
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)	2,75
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)	293,14
Presupuesto parcial Partida I (€)	10975,73

2.2 PARTIDA II: PRESUPUESTO PARCIAL DEL ESTUDIO CELULAR DE LOS AuNRs CON LÍNEAS CELULARES SKBR-3.

Tabla 13. Importe total (en €) de la mano de obra empleada en la Partida II.

MANO DE OBRA				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Tutor experimental	24	20,00	480,00
h	Técnico de laboratorio	20	18,00	360,00
h	Graduado en Ingeniería química	15	9,00	135,00
%	Costes Directos Complementarios	2	975,00	19,50
Importe total de mano de obra (€)				994,50

Tabla 14. Importe total (en €) del material empleado en la Partida II.

MATERIALES				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
Ud	Bata de laboratorio	1	16,48	16,48
Ud	Cámara de recuento Neubauer	1	88,15	88,15
Ud	Eppendorf estéril de 1,5 mL (50 ud)	0,2	53,70	10,74
Ud	Pipeta multicanal TACTA	1	616,72	616,72
Ud	Pipeta electrónica	1	410,00	410,00
Ud	Placa estéril de 96 pocillos	1	167,00	167,00
Ud	Matraz de cultivo celular estéril	1	123,50	123,50
Ud	Depósitos de reactivos desechables (100 ud)	0,25	367,60	91,90
Ud	Filtro estéril de tamaño de poro 0,22 µm	1	237,00	237,00
Ud	Jeringa estéril de 2 mL	1	10,00	10,00
Ud	Jeringa estéril de 5 mL	1	10,00	10,00
Ud	Punta de plástico estéril para micropipeta de 20 a 100 µL	1	116,00	116,00
Ud	Punta de plástico estéril para pipeta de 2 a 20 µL	1	116,00	116,00
%	Costes Directos Complementarios	2	2013,49	40,27
Importe total de los materiales (€)				2053,76

Tabla 15. Importe total (en €) de reactivos químicos empleados en la Partida II.

REACTIVOS				
Unidad	Descripción	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
Ud	PBS	1	115,00	115,00
Ud	Línea celular SKBr-3	1	375,00	375,00
Ud	CellTiter Blue	1	395,00	395,00
L	Etanol	8	13,38	107,04
Ud	Medio de cultivo HyClone McCoy's 5A	2	19,00	38,00
Ud	Medio de cultivo MEGM BulletKit CC-3151	2	193,00	386,00
Ud	Tripsina EDTA 0,25%	2	16,00	32,00
Ud	Tripsina EDTA 0,05%	2	12,00	24,00
%	Costes Directos Complementarios	2	1472,04	29,44
Importe total de reactivos (€)				1501,48

Tabla 16. Importe total (en €) de la instrumentación no analítica empleada en la Partida II.

INSTRUMENTACIÓN NO ANALÍTICA					
Unidad	Descripción	Cantidad	Coste del equipo (€)	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Incubador	336	12000,00	0,83	280,00
h	Fotorreactor multilámpara	8	5000,00	0,35	2,78
h	Microscopio	2	4000,00	0,28	0,56
h	Baño termostataado	6	300,00	0,02	0,13
%	Costes Directos Complementarios	2	-	283,46	5,67
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)					289,13

Tabla 17. Importe total (en €) de la instrumentación analítica empleada en la Partida II.

INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA					
Unidad	Descripción	Cantidad	Coste del equipo (€)	Precio unitario (€/ud)	Importe (€)
h	Lector de placas	8	35000,00	2,43	19,44
%	Costes Directos Complementarios	2	-	19,44	0,39
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)					19,83

Tabla 18. Presupuesto parcial de la Partida II.

Importe total de reactivos (€)	1501,48
Importe total de mano de obra (€)	994,50
Importe total de los materiales (€)	2053,76
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)	289,13
Importe total de la Instrumentación no analítica (€)	19,83
Presupuesto parcial Partida II (€)	4858,70

Tabla 19. Presupuesto de ejecución material.

Presupuesto parcial Partida I (€)	10975,73
Presupuesto parcial Partida II (€)	4858,70
Presupuesto de ejecución material (€)	15834,43

3. PRESUPUESTO BASE DE LICITACIÓN

Para calcular el presupuesto base de licitación del proyecto, una vez obtenido el presupuesto ejecución material (PEM), se aplica una serie de porcentajes. Primero se incluye los gastos generales (GG) que engloba los costes de mantenimiento y eléctricos, los GG corresponden un 15% del presupuesto de ejecución material. Seguidamente se aplica el beneficio industrial (BI), que corresponde el 6% del presupuesto de ejecución material. Con la suma del PEM, GG y BI se obtiene el presupuesto de ejecución por contrata (PEC). Para finalizar se aplica sobre el PEC el 21% de I.V.A. para conseguir el presupuesto base de licitación.

Tabla 20. Presupuesto base de licitación.

Presupuesto de ejecución material (€)	15834,43
Gastos generales (GG) 15%	2375,16
Beneficio industrial (BI) 6%	950,07
Presupuesto de ejecución por contrata (PEC)	19159,66
Impuesto Valor Añadido (IVA) 21%	4023,53
Presupuesto base de licitación	23183,19

El presupuesto base de licitación del proyecto asciende a **VEINTE Y TRES MIL CIENTO OCHENTA Y TRES CON DIECINUEVE CÉNTIMOS.**