

UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FÍSICA



APLICACIÓN DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CERCANO, PARA
EL ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN CELULAR DE NANOPARTÍCULAS DE
ORO, ORIENTADAS AL TRATAMIENTO DE ALERGIAS INFLAMATORIAS

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Física

ARÉSTEGUI SIERRA ODÓN

LIMA - PERÚ

2016

Dedico este trabajo de tesis a mi Familia:

Patricia y Camila

Agradecimientos

A Dios, hasta donde me guíes llegaré.

A Patricia, por compartir nuestras vidas.

A mis Padres siempre presentes en todo mi desarrollo profesional.

A los Profesores de la facultad de ciencias naturales y matemáticas, especialmente a Pablo G. Gonzales, Rubén Bruna Mercado y José Quiñones por sus enseñanzas, estímulo y amistad.

A los Profesores e Investigadores de la Universidad federal de Alagoas - Brasil, involucrados en este trabajo: Eduardo Fonseca, Emiliano Barreto y Rafael vital.

A las agencias Brasileñas CAPES y FAPEAL por el apoyo financiero.

RESUMEN

En este trabajo de tesis fueron estudiados cultivos in vitro de células peritoneales de ratón interactuando con nanopartículas de oro (AuNPs), mediante microscopía óptica de campo cercano (MOCC), con la finalidad de localizar las AuNPs dentro de las células utilizadas en el tratamiento de alergias inflamatorias.

Las nanopartículas metálicas tienen propiedades ópticas únicas, las similitudes dimensionales de estos nanomateriales y biomoléculas, incluyendo enzimas, anticuerpos (antígenos) o ADN, muestran la posibilidad de generar sistemas híbridos que pueden combinar las propiedades de los nanomateriales con el reconocimiento natural de biomoléculas. Se sabe que estos sistemas híbridos ya han sido ampliamente utilizados para diferentes tipos de tratamientos de enfermedades como alergias y cáncer.

El estudio utilizando nanopartículas de oro (AuNPs) para tratar alergias inflamatorias en ratones, ha servido de base, para comenzar este trabajo de tesis, dando énfasis en la interacción entre las células y nanopartículas metálicas, debido a que los procesos de captación celular son de gran importancia en la biotecnología. Para tal objetivo fue utilizada la microscopía óptica de campo cercano (SNOM) que permite identificar procesos de captación celular en cultivos celulares con AuNPs.

Estos resultados demuestran, que es posible obtener simultáneamente la información topográfica de la superficie celular y transmisión de campo cercano a través de la célula, así como también analizando estos resultados simultáneos, se demuestra que las AuNPs entran en la célula durante el tratamiento alérgico.

ABSTRACT

In this thesis were studied in vitro cultures of mouse peritoneal cells interacting with gold nanoparticles (AuNPs), by scanning near-field optical microscopy (SNOM), in order to locate the AuNPs within cells used in the treatment of inflammatory allergies.

Metal nanoparticles exhibit unique optical properties. The dimensional similarities of these nanomaterials and biomolecules, including enzymes, antibodies (antigens), or DNA, suggest the possibility to generate hybrid systems that may combine the properties of nanomaterials with the natural recognition of biomolecules. It is known that these hybrid systems have been widely used for different treatments of diseases such as allergies and cancer.

The study using gold nanoparticles (AuNPs) to treat inflammatory allergies in mice, has provided the basis to begin this thesis, putting emphasis on the interaction between cells and metal nanoparticles, due to cellular uptake processes are of great importance in biotechnology. For this purpose was used to scanning near-field optical microscopy (SNOM), that allows identify cellular uptake processes in cell cultures with AuNPs.

This results show that, it is possible to obtain simultaneously the cell surface topographic information and near-field transmission across the cell, as well as simultaneous analyzing these results, it is shown that AuNPs into the cell during the allergic treatment.

INDICE

Resumen	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I - GENERALIDADES.....	3
1.1. Objetivos	3
1.1.1.General.....	3
1.1.2.Específico	3
1.2.Planteamiento del Problema	3
1.3.Justificación e importancia del estudio	4
CAPÍTULO II - MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Antecedentes	5
2.1.1. Evolución de la Microscopía	5
2.1.2.Nanopartículas de oro para tratamiento de inflamación alérgica en ratones.	6
2.2.Nanopartículas metálicas	7
2.2.1.Nanopartículas de oro.....	9
2.2.2.Método de síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)	11
2.2.3.Biosíntesis de nanopartículas	11
2.3.Procesos de absorción celular.....	12
CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODO	14
3.1. Preparación de las nanopartículas de oro (AuNps)	14
3.2. Cultivo celular de las muestras biológicas (Células - AuNPs)	14
3.3. Microscopía de barrido por sonda	15

3.4. Técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM).....	18
3.4.1. Principio de la microscopía de fuerza atómica AFM.....	20
3.4.2. Modos de operación del AFM	22
3.4.2.1. Modo Contacto.....	23
3.4.2.2. Modo No-Contacto	25
3.4.2.3. Modo Contacto Intermitente	26
3.5. Técnica de microscopía de campo cercano.....	27
3.5.1. Procedimiento de medida SNOM.....	30
3.5.1.1. Colocando la puntera del SNOM	31
3.5.1.2. Acoplando el láser en la fibra	33
3.5.1.3. Alineamiento del detector	34
3.5.1.4. Efectuando una medida SNOM	36
3.5.2. Procedimiento de análisis de datos SNOM	40
3.5.2.1. Flatten filter	41
3.5.2.2. Z-scale control.....	42
3.5.2.3. Palette setting.....	42
3.5.2.4. 3-D Setting and preview	43
CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	46
4.2. Muestras - Cultivo celular con nanopartículas de oro	48
4.3. Medidas de SNOM: Análisis de imágenes de Topografía Y Transmisión en los cultivos celulares	51
4.3.1. Muestras Puras (No tratadas)	52
4.3.2. Muestras tratadas con 10 ng/ml de AuNPs	54
4.3.3. Muestras tratadas con 100 ng/ml de AuNPs	57
4.3.4. Muestras tratadas con 1000 ng/ml de AuNPs	59
CAPÍTULO V - CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

Índice de Figuras

Figura 1 - Copa Lycurgus museo de Londres en (a) imagen cuando la luz es reflejada y en (b) cuando la luz es transmitida a través de la copa	10
Figura 2 - Mecanismos de absorción celular	13
Figura 3 - El criterio de Rayleigh establece que el límite inferior de dos objetos puntuales a ser resueltos es la distancia entre el primer mínimo de difracción de la imagen de un punto con el máximo central de difracción del otro.	16
Figura 4 - Esquema principal de un AFM	19
Figura 5 - Fuerza entre la puntera y la muestra, en función de la distancia entre ellas	20
Figura 6 - Fuerzas de van der Waals. a) Fuerzas de orientación, b) Fuerzas de inducción y c) Fuerzas de dispersión.....	21
Figura 7 - Representación esquemática de los modos de operación del AFM. (a) Modo contacto, (b) modo no-contacto y (c) modo contacto intermitente.	23
Figura 8 - Sistema de microscopía de barrido por sonda, modelo Multiview 4000 – Nanonics	28
Figura 9 - Esquema da interacción puntera de prueba-luz y muestra.....	29
Figura 10 - Diagrama de bloques SNOM modo transmisión, con los principales componentes del sistema.	30
Figura 11 - Imagen del "Lower Scanner", conteniendo el porta-muestra que queda atrapado a tres esferas de Safira.	31
Figura 12 - Puntera de SNOM indicando tamaño, frecuencia de resonancia, factor de calidad, etc.	32
Figura 13 - Montaje de la puntera en el Upper scanner.	32
Figura 14 - Montaje de la puntera (a) fibra en el acoplador metálico, (b) clavado y (c) corte de la fibra óptica.....	33
Figura 15 - Acoplando la fibra óptica con el láser.....	34
Figura 16 - Puntera tocando el porta muestras	35
Figura 17 - Posiciones del haz láser en los ejes del incidencia del detector.....	36
Figura 18 - Regulando el Setpoint	37
Figura 19 - Control "Stepper Motor control".	37
Figura 20 - Scan Windows Tab.....	38
Figura 21 - ScopeTab	38
Figura 22 - Medidas SNOM con PID sin calibración, resultados simultáneos (a) AFM y (b) transmisión.....	39
Figura 23 - Programa de optimización WSxM4.0, círculos rojos indican los principales comandos de optimización.....	40
Figura 24 - Comando Flatten filter	41
Figura 25 - Comando Zscale control.....	42
Figura 26 - Comando Palette setting	43
Figura 27 - 3-D setting and preview (Sobre posición AFM-Transmisión).....	43
Figura 28 - SPM IMAGE selection, varias imágenes seleccionadas para análisis de perfiles	44
Figura 29 - Aplicación del multiprofile, (a) AFM sección transversal marcada por una línea, (b) transmisión correspondiente a la misma región analizada en el AFM, (c) y (d) Perfiles topográfico y de transmisión correspondientes a la línea indicada en (a) y (b) respectivamente.....	45
Figura 30 - Caracterización de las AuNPs en solución acuosa. (a) Imágenes MET de las AuNPs esféricas y en (b) histograma del diámetro de las AuNPs.	47
Figura 31 – Muestras coloidales de AuNPs y (b) respectivo espectro UV-Vis	47
Figura 32 - Primeras muestras, Pura (a) y tratadas en diferentes concentraciones de AuNPs (b) 10 ng/ml, (c) 100 ng/ml e (d) 1000 ng/ml de AuNPs.	48
Figura 33 - Muestras lavadas con PBS (a) Pura (b) Tratada 1000 ng/ml de AuNPs.	49
Figura 34 - Muestras con colorantes (a) Pura y (b) Tratada 1000 ng/ml de AuNPs.	49

Figura 35 - Muestras apropiadamente preparadas, sin AuNPs (Puras) (a) y Tratadas en diferentes concentraciones de AuNPs (b) 10 ng/ml, (c) 100 ng/ml y (d) 1000 ng/ml de AuNPs.	50
Figura 36 - (a) Muestra utilizada y (b) Muestra dentro del pote de protección.....	51
Figura 37 - Colección simultanea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales no tratadas, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) imagen 3D, combinando los datos topográficos y de transmisión de campo cercano, (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico y perfil de intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.....	53
Figura 38 - (a) Combinación de los datos topográficos y de transmisión. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfica e intensidad transmitida	54
Figura 39 - Colección simultanea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 10 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) imagen 3D, combinando los datos topográficos y de transmisión de campo cercano, (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico y perfil de intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.....	55
Figura 40 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.....	56
Figura 41 - Colección simultanea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 100 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) combinación de los datos ópticos topográficos y de transmisión de campo cercano. (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfica e intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.....	58
Figura 42 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.....	59
Figura 43 - Colección simultanea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 1000 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A e B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul no zoom en A (AFM) e B(SNOM).	60
Figura 44 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.....	61

Lista de Abreviaturas

AuNPs	Nanopartículas de oro
AgNPs	Nanopartículas de Plata
NPs	Nanopartículas
SPR	Resonancia de Plasmones Superficiales
SNOM	Scanning near-field optical microscopy/ Microscopía óptica de campo cercano
AFM	Atomic Force Microscopy/ Microscopía de fuerza atómica.
SPM	Scanning probe microscopy/ Microscopio de barradura por sonda
STM	Scanning Tunneling Microscopy/ Microscópio de efecto Túnel
MET	Transmission Electron Microscopy / Microscopía electrónica de transmisión
UFAL	Universidad Federal de Alagoas - Brasil
UFSM	Universidad Federal de Santa María - Brasil
SBCAL	Sociedad Brasileira de Ciencias de Animales de Laboratorio

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las sociedades humanas está estrechamente relacionado a las habilidades de sus miembros para producir y manipular materiales para satisfacer sus necesidades, es así que los materiales han sido la fuerza motriz para el desarrollo de la civilización humana. Desde los comienzos de la historia materiales naturales como madera, piedra o sílex fueron substituidos por cobre, bronce y posteriormente por hierro, esas substituciones de materiales simples por otros más elaborados y mejorados hizo que el número y tipo de materiales disponibles aumentase rápidamente, surgiendo nuevos materiales innovadores como polímeros, elastómeros, cerámicas, metales, semiconductores, biomateriales, etc. (**XING** et al., 2009, **SCHURCH** et al., 2007). Así también esta evolución trajo la reducción de las dimensiones, comenzando inicialmente con materiales en macro escala, seguida por la micro y actualmente la escala nanométrica (**CALLISTER**, 2002).

Es así que en las dos últimas décadas, una nueva clase de materiales conocidos como nanomateriales, paso a despertar el interés de la comunidad científica, surgiendo nuevas posibilidades de aplicación (**WOJCIECHOWSKI**, 2000), debido a sus nuevas propiedades físicas y químicas asociadas a sus dimensiones físicas con escala nanométrica (10^{-9} m) (**GLEITER**, 1989, **TJONG** and Chen, 2004, **WAGNER**, 1992, **GLEITER**, 1990, **ZARBIN**, 2007). Por ejemplo las nanopartículas de oro (AuNPs) tienen propiedades beneficiosas que son ampliamente utilizadas en todas las áreas de la ciencia, como en la medicina, biología, etc. (**BARRETO** et al., 2015, **SALATA**, 2004, **GILJOHANN** et al., 2010).

Es por eso que resulta importante mejorar el conocimiento respecto de estas nuevas estructuras, es decir conocer previamente sus propiedades y cómo interactúan estas con otros sistemas como por ejemplo sistemas biológicos. Para ese objetivo es necesario también conocer técnicas de caracterización apropiadas, inicialmente técnicas como la microscopía óptica y electrónica permitieron grandes avances en diversas áreas de la ciencia, pero ambas técnicas tenían limitaciones cuando se aplican en sistemas *in vivo*. La microscopía óptica es limitada por la resolución espacial (~ 200 nm), mientras que la microscopía electrónica no permite realizar medidas en medios fisiológicos (**BRANDON** and Kaplan, 2013, **LENG**, 2013). Es por ello que en las últimas décadas fueron hechos muchos esfuerzos con la finalidad de

mejorar las técnicas de caracterización que alcancen respuestas a nivel atómico y molecular, surgiendo las técnicas de microscopía de barrido por sonda (Scanning Probe Microscopy, SPM) y más tarde otras técnicas de microscopía aún más completas, que permiten explorar todo tipo de materiales como células, grafeno, polímeros, nanopartículas, etc. Como por ejemplo la técnica de microscopía óptica de campo cercano SNOM (Scanning Near-field Optical Microscopy) (**KAWATA** et al., 2002), que funciona con una resolución menor que la longitud de onda de la luz utilizada, lo que permite hacer medidas en escalas nanométricas permitiendo medir casi cualquier tipo de muestra con gran precisión sin la necesidad de trabajar en condiciones extremas de temperatura o presión (**KAUPP**, 2006, **FILLARD**, 1996). Esta técnica es una herramienta muy útil en diferentes campos de la ciencia, como por ejemplo en las ciencias biológicas puede ser utilizado para estudiar células, bacterias, ADN, etc. En la química y física es muy útil para estudiar polímeros, nanotubos de carbono, etc. (**FILLARD**, 1996, **ZAREIE** et al., 1998, **HANSMA** et al., 1995, **BUSTAMANTE** et al., 1993, **HANSMA** et al., 1998, **HANSMA** et al., 1994).

Por lo expuesto anteriormente, la presente tesis tiene como referencia un estudio realizado por Barreto y colaboradores (**BARRETO** et al., 2015), en el que son utilizadas nanopartículas de oro para el tratamiento de alergias inflamatorias en células macrófagas de ratón. Siendo de interés utilizar la microscopía óptica de campo cercano (SNOM), para determinar la ubicación espacial de las nanopartículas de oro (AuNPs) después de que estas interactúan con la célula (**KAWATA** et al., 2002). Localizar las AuNPs en el interior de las células servirá para estudios más avanzados cuando estas sean utilizadas en sistemas más elaborados como por ejemplo nanopartículas funcionalizadas, que son de múltiples aplicaciones y de mucho interés en tratamientos direccionados (**SALMASO** et al., 2009).

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. Objetivos

1.1.1. General

Aplicar la técnica de microscopía óptica de campo cercano (SNOM) para estudiar la absorción celular de nanopartículas de oro, utilizadas en el tratamiento de alergias inflamatorias.

1.1.2. Específico

- Determinar los factores que limitan y potencian la aplicación de la microscopía óptica de campo cercano para el estudio de la absorción celular.
- Elaborar cultivos celulares de células peritoneales de ratón con y sin nanopartículas de oro, con calidad óptica apropiada para utilizar el SNOM.
- Analizar en qué medida contribuye el microscópico óptico de campo cercano para determinar procesos de absorción celular.

1.2. Planteamiento del Problema

Actualmente existen diversos tipos de alergias, así como también existe en el mercado una variedad de medicamentos para su respectivo tratamiento, con un valor monetario según la complejidad y formulación para combatir dicha alergia, sin embargo actualmente existen diversos estudios orientados a mejorar dichos tratamientos. Es así que investigadores de diferentes grupos de la Universidad Federal de Alagoas en Brasil (UFAL), comenzaron a estudiar los procesos envueltos en el tratamiento de la alergia del tipo inflamatoria, utilizando nanopartículas de oro (AuNPs) (**LAMPRECHT**, 2008, **BARRETO** et al., 2015).

Por un lado es necesario estudiar cómo actúan las AuNPs en el tratamiento de alergias, por otro lado también es importante saber dónde es que las AuNPs actúan durante dicho tratamiento, pues sabiendo la ubicación espacial de las nanopartículas será posible una futura aplicación mediante funcionalización. Por tanto resulta necesario hacer un estudio de absorción celular, investigando la interacción célula-nanopartículas, de modo que sea demostrado la utilidad de las nanopartículas y que en el futuro, un tratamiento más elaborado mediante nanopartículas de oro funcionalizadas se tornen eficaz y económico (**STERN** and McNeil, 2008, **AGGARWAL** et al., 2009).

1.3. Justificación e importancia del estudio

El microscopio óptico de campo cercano (SNOM) tiene la capacidad de analizar superficies líquidas, materiales biológicos como ácidos nucleicos, proteínas, etc. Siendo un instrumento muy importante para estudiar muestras biológicas (**SIMON** and Durrieu, 2006, **ZHANG** et al., 2012).

Por tanto, la importancia del desarrollo de este trabajo de tesis es obtener experiencia en la caracterización de materiales en escala nanométrica por microscopía óptica de campo cercano, así como también desarrollar la capacidad de análisis de los resultados y sus aplicaciones prácticas en el campo biológico.

Cuando se tienen nanopartículas de oro (AuNPs) en contacto con células, ocurren procesos de fagocitosis, haciendo que las nanopartículas sean absorbidas por la célula, generando una disminución de la inflamación alérgica. Por este motivo es de mucha importancia saber, si de hecho se produjo la absorción de las AuNPs. Entonces mediante el análisis de diagramas de perfil topográfico y perfil de transmisión obtenidos a través del SNOM es posible determinar si sucedió la absorción celular de las AuNPs (**ZHANG** et al., 2012).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Evolución de la Microscopía

Con el invento del microscopio, la humanidad comenzó a ver el mundo minúsculo de células y microorganismos. Un hecho importante para el inicio de las primeras observaciones de materiales biológicos fue realizado por Antonie van Leeuwenhoek, que utilizó espermatozoides de animales y glóbulos rojos de sangre humana en sus primeros experimentos, descubriendo la existencia de microorganismos, que en aquella época, fueron llamados genéricamente como microbios. En 1665 Robert Hooke, publicó resultados de su estudio en un trabajo llamado "Micrographia". Apareciendo por primera vez el nombre "cell". El desarrollo del estudio celular está relacionado directamente al avance tecnológico del microscopio, siendo que a partir de 1950 ha tenido un gran progreso, llegando a medir la membrana celular en orden de nanómetros (**HOOKE**, 2003).

Una nueva fase en la observación celular se inicia en la década de los 80's con el desarrollo de las técnicas de microscopía de barradura con sonda (Scanning Probe Microscopy, SPM), a finales de aquella década ya había un gran número de publicaciones describiendo aplicaciones de SPM en sistemas biológicos, siendo el ADN uno de los primeros materiales biológicos a ser morfológicamente estudiado (**CRICENTI** et al., 2011, **MARINELLO** et al., 2012, **BARÓ** and Reifenberger, 2012).

Una técnica SPM muy interesante que permite detectar estructuras nanométricas es la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), esta técnica tiene algunas ventajas sobre otras cuando se trata con sistemas de origen biológico (**BARÓ** and Reifenberger, 2012), por ejemplo se puede citar la posibilidad de realizar medidas de morfología en células, bacterias, etc. esta técnica fue adaptándose para trabajar en condiciones fisiológicas, permitiendo ver y medir estructuras con gran precisión, siendo capaz de medir casi cualquier tipo de

muestra sin la necesidad de trabajar en condiciones extremas sea de temperatura o presión (**SIMON** and Durrieu, 2006, **BOISSEAU** and Lahmani, 2009).

Es así que la evolución de la AFM permitió obtener imágenes topográficas tridimensionales de muestras biológicas, como moléculas, ADN, células cancerígenas, etc. en diversos medios. Diferente a otras, esta técnica es ampliamente utilizada debido a su alta resolución en escala nanométrica (**BARÓ** and Reifenberger, 2012, **POON** et al., 2008).

Con la evolución de las SPM nace otra técnica conocida como microscopía óptica de campo cercano (SNOM - Scanning Near-Field Optics Microscopy), que posee características similares y superiores que las de una AFM, siendo mejorado el análisis de diversas propiedades y permitiendo realizar mediciones topográficas y de intensidad transmitida a través del material en estudio.

En 1928 Syngge elabora el primer SNOM, utilizando una pequeña abertura para generar la imagen de una superficie con una resolución inferior a la longitud de onda de la luz (**SYNGE**, 1928). Años más tarde, en la década de los 80's nace el primer SNOM plenamente implementado por Pohl y colaboradores (**POHL** et al., 1984) y Lewis y colaboradores (**LEWIS** et al., 1984), en ambos experimentos todos ellos utilizaron una abertura más pequeña que la longitud de onda de la luz utilizada. Además, de utilizar un mecanismo de retroalimentación que mantiene la puntera y la muestra a unos pocos nanómetros de distancia. En 1991 Betzig y colaboradores introdujeron el uso de la fibra óptica, que es la configuración más utilizada en la actualidad (**BETZIG** et al., 1991).

2.1.2. Nanopartículas de oro para tratamiento de inflamación alérgica en ratones.

A pesar de las diversas aplicaciones envolviendo nanopartículas de oro (AuNPs), hay pocos estudios sobre los efectos terapéuticos de estas, en enfermedades respiratorias (**LANONE** and Boczkowski, 2011), lo que torna único el estudio sobre tratamiento de alergias inflamatorias en ratones mediante AuNPs, desarrollado por Barreto y colaboradores (**BARRETO** et al., 2015). Esto fue un hecho importante que motivo al desarrollo de la presente tesis.

Para iniciar el estudio de los efectos beneficiosos de AuNPs en el tratamiento alérgico, Barreto y colaboradores de la Universidad Federal de Alagoas UFAL (**BARRETO** et al., 2015), siguieron los procedimientos de acuerdo a las exigencias de la Sociedad Brasileira de Ciencias de Animales de Laboratorio (SBCAL) y los patrones aceptados para inducción inflamatoria alérgica pulmonar en ratones de acuerdo con Conrad y colaboradores (2009) (**CONRAD** et al., 2009, **BARRETO** et al., 2015).

Colectaron las células macrófagas peritoneales y fluidos de las vías aéreas (nasal) de los roedores para análisis y cultivos “*in vitro*” con AuNPs, siendo evaluadas principalmente la producción de mediadores pro-inflamatorios pulmonares y de especies reactivas de oxígeno en las células, indicando que las AuNPs poseen potencial anti-inflamatorio por atenuar diversos síntomas fisiopatológicos típicos de las inflamaciones alérgicas, pudiendo ser una estrategia relevante para la terapia del asma. En el cultivo *in vitro*, las AuNPs inhibieron la producción de TNF- α y ERO en macrófagos activados sin interferir con la habilidad fagocitaria o con la viabilidad de las células.

Los resultados en conjunto permitieron concluir que el tratamiento local con AuNPs previene de la reacción inflamatoria alérgica de las vías aéreas y pulmón, la toxicidad de nanomateriales depende de parámetros como tamaño, forma, carga superficial y estado de agregación o dispersión (**FREESE** et al., 2012, **GOSENS** et al., 2010, **ZHANG** et al., 2011, **CHO** et al., 2010, **CONNOR** et al., 2005). Específicamente, la baja concentración de citrato en la producción de nanopartículas permitió que estas no se agreguen y esto adiciono una propiedad importante que redujo bastante la toxicidad de las AuNPs (**BARRETO** et al., 2015).

2.2. Nanopartículas metálicas

Tanto nanopartículas metálicas y semiconductoras poseen propiedades físicas y químicas que dependen de su tamaño y forma. La reducción del tamaño para dimensiones nanométricas aumenta el área superficial, mejorando la eficiencia en aplicaciones que sean dependientes de sitios superficiales (catálisis). Causando fuerte absorción en la región del espectro visible, también son producidas modificaciones de

las propiedades electrónicas, disminuyendo la densidad de estados electrónicos (**LUQUE** et al., 2012).

Una de las propiedades únicas de nanopartículas metálicas es el fenómeno de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) definido como una oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción en respuesta al campo eléctrico de la radiación electromagnética de luz incidente. Diversas nanopartículas metálicas en solución coloidal, tales como plata y oro, presentan una fuerte absorción en la región del espectro visible, lo que permite su caracterización por absorción espectroscópica en las regiones ultravioleta (100 nm - 400 nm) y visible (400 nm - 800 nm), lo que contribuye a identificar el tamaño, forma y composición (**LEE** and El-Sayed, 2006, **XIAO** and Yeung, 2014).

Por tanto se puede ver que las nanopartículas metálicas presentan características específicas que las diferencian de otros materiales, es por eso que han atraído la atención en diversos campos, especialmente en la nanomedicina (**MARKOWSKA** et al., 2013, **VIGDERMAN** et al., 2012).

Entre las nanopartículas más conocidas se pueden mencionar las nanopartículas de plata, oro, fierro, rutenio, etc., por ejemplo las nanopartículas de plata (AgNPs) son altamente eficaces contra diversos microorganismos, pueden ser utilizadas como agentes antibacterianos/antihongos. Otras aplicaciones incluyen su uso para fabricación de productos de limpieza, filtros de aire, revestimientos de refrigeradores, electrodomésticos, celulares, etc. (**BUZEA** et al., 2007).

En los últimos años, diversos trabajos científicos han demostrado el potencial de las nanopartículas de oro (AuNPs) y sus aplicaciones biotecnológicas, repercutiendo positivamente en el desarrollo de áreas de entrega de medicamentos controlados, biosensores, diagnóstico por imágenes y fototerapia (**THAKOR** et al., 2011, **ZHANG** et al., 2011). Entre las propiedades de las AuNPs cabe destacar su efecto SPR, fluorescencia, facilidad de síntesis y funcionalización, todo esto hace que las AuNPs sean consideradas como materiales avanzados con amplia aplicabilidad biomédicas (**GIBSON** et al., 2011, **SALMASO** et al., 2009).

2.2.1. Nanopartículas de oro

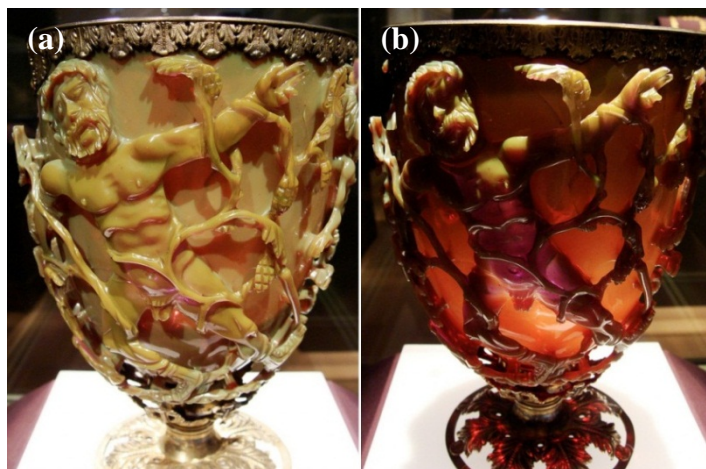
El oro es un elemento químico con símbolo Au (del latín Aurum), número atómico 79, distribución electrónica $(Xe)4f^{14}5d^{10}6s^1$, es un material suave de color amarillo, buen conductor de calor y electricidad (**CORTI** and Holliday, 2009).

Cuando el oro sólido está en tamaños de escala nanométrica y disperso en medio líquido, adquiere el nombre de nanopartículas de oro u oro coloidal (AuNPs), estos materiales son muy estables y tienen propiedades magnéticas, ópticas y electrónicas todas relacionadas con su forma y tamaño (**GALVAGNO** and Parravano, 1978, **HARUTA**, 1997, **FREUND** and Spiro, 1985, **KANG** et al., 2010, **O'NEAL** et al., 2004).

En la naturaleza la alta densidad y resistencia a la corrosión facilitan que se concentre en forma de partículas, el color amarillo y maleabilidad hacen que sea un material muy útil para producir joyas y decoraciones religiosas. Algunos pocos elementos metálicos como la plata, cobre o platina poseen estas mismas características pero en menor intensidad. Además su configuración electrónica permite el control de propiedades ópticas, reactividad química y estructura cristalina. El alto número atómico lo torna relativamente opaco a rayos-X permitiendo que interactúe fuertemente con electrones en microscopías electrónicas (**CORTI** and Holliday, 2009).

Se estima que la extracción del oro se inició en la antigua Bulgaria y en la china IV-V A.C. se usaban soluciones de oro para decoraciones. Otros usos comunes en forma de soluciones fueron para dar color en vidrios y cerámicas. Una de la primeras y más conocidas utilidades del oro, es la copa Lycurgus (Roma, IV D.C.), que tiene la peculiaridad de reflejar una tonalidad verde cuando es expuesta a luz natural Figura 1(a) y trasmite un color rojo intenso cuando es expuesta a luz blanca por dentro, Figura 1(b), debido a que contiene impregnación de nanopartículas de oro y plata de aproximadamente 50 nm (**VAJTAI**, 2013).

Figura 1 - Copa Lycurgus museo de Londres en (a) imagen cuando la luz es reflejada y en (b) cuando la luz es transmitida a través de la copa



Fuente: WebSide - <http://www.britishmuseum.org>

Hasta la edad media la solución de oro era famosa por sus aspectos curativos, siendo utilizada en diversos problemas como disentería, epilepsia, tumores y diagnóstico de sífilis. En 1618 el médico y filósofo Francisci Antonii escribió el primer libro detallando utilidades del uso de oro en estado coloidal, es decir con tamaño nanométrico y en una solución estable (**DANIEL** and **ASTRUC**, 2004).

En modelos de análisis biológicos experimentales fueron registrados efectos terapéuticos de las AuNPs, destacándose especialmente la capacidad de suprimir la actividad de algunas proteínas producidas durante la inflamación (IL-6 y TNF- α) proporcionando mejoras en los síntomas de la artritis en ratones (**DYKMAN** and Khlebtsov, 2011, **E. ABRAHAM PETER B. HIMMEL**, 1997). Es así que las AuNPs presentan propiedades benéficas para el tratamiento de artritis reumatoide (**THAKOR** et al., 2011, **MUKHERJEE** et al., 2005), antioxidantes (**SHAH** and Vohora, 2002) y enfermedades inflamatorias crónicas, como en el caso de las alergias (**KIM** et al., 2007, **JEON** et al., 2003, **BARRETO** et al., 2015, **MUKHERJEE** et al., 2005).

2.2.2. Método de síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

En 1857 Faraday describió la formación de una solución roja oscura de oro coloidal a partir de la reducción de ácido Tetracloroáurico con fósforo, utilizando disulfuro de carbono como solvente (sistema bifásico). Él escribió sobre las propiedades ópticas de filmes finos a partir de estas soluciones y observó un cambio reversible en la coloración (**DANIEL** and **ASTRUC**, 2004).

Actualmente muchos métodos pueden ser utilizados para producir AuNPs, variando principalmente el agente reductor y el medio, obteniéndose diferentes tamaños y coloraciones. Los métodos más utilizados son el de Turkevich y colaboradores (1951) y Brust-Schiffrin et alii (1994) (**TURKEVICH** et al., 1951, **KUMAR** et al., 2007). Otros métodos conocidos son ablación por láser de femtosegundos (**YANG**, 2007, **ASHFOLD** et al., 2004), condensación de vapor de oro (**MAGNUSSON** et al., 1999), reducción electroquímica (**YU** et al., 1997), síntesis por reducción en solución con agitación por ultrason (**OKITSU** et al., 2005), etc. Sin embargo los métodos más baratos y simples son los métodos por reducción química (**BRUST** et al., 1994).

2.2.3. Biosíntesis de nanopartículas

Años atrás la síntesis de nanopartículas (NPs) envolviendo organismos microbianos (bacterias, hongos, virus, etc.) era poco abordado químicamente, pero actualmente la interconexión de nanotecnología y biotecnología microbiana está más avanzada y es posible elaborar sistemas que contengan NPs y organismos biológicos (**MANDAL** et al., 2006). El uso de ratones en las investigaciones biomédicas contribuye significativamente para el entendimiento de la hematología de mamíferos, demostrando mucha similitud con humanos. Así al ser evaluado un determinado tratamiento en ratones, los valores hematológicos también deben ser considerados. Por tanto el uso de un grupo de control con animales sanos es necesario para realizar comparaciones con aquellos sometidos a estudios (**FOX** et al., 2006).

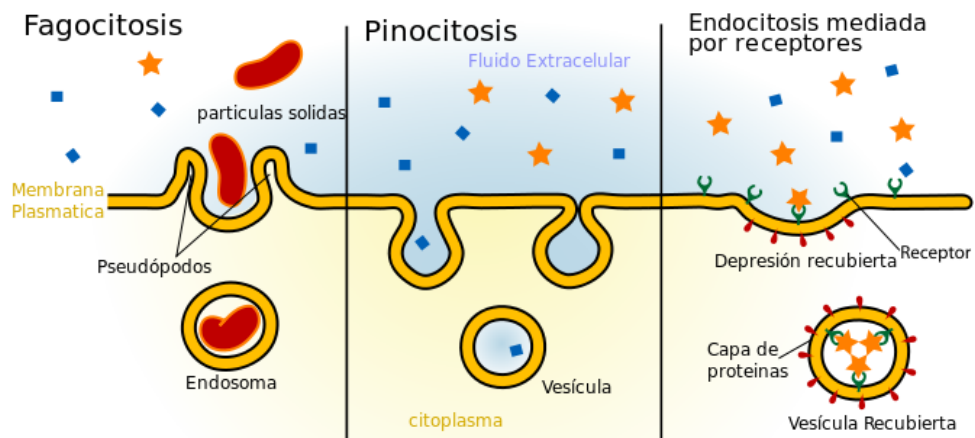
A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento por medio de NPs, todavía hay mucho por ser investigado, esto incluye mejorar la sensibilidad del diagnóstico precoz y reducción de toxicidad de las NPs (**WANG** et al., 2013). El avance en el desarrollo de nanomateriales aplicados a la medicina ha crecido a lo largo de los años. Gran parte se debe a la mejora de los protocolos para síntesis, producción de biomoléculas y principalmente las preocupaciones sobre los posibles efectos tóxicos que las NPs pueden tener cuando entran en contacto con sistemas biológicos (**CHEN** et al., 2011, **CANCINO** et al., 2013). Como por ejemplo en este trabajo de tesis, es importante el uso de células fagocitarias (Macrófagos) para reproducir el proceso de absorción celular y las AuNPs utilizadas son de dimensiones apropiadas (13 nm) para que sean absorbidas por la célula (**BARRETO** et al., 2015), debido a su bajísima toxicidad, estabilidad, banda de absorción grande asociada con la resonancia de plasmones superficiales, biocompatibilidad, etc. (**LOUIS** and Pluchery, 2012).

2.3. Procesos de absorción celular

En la nanotecnología, el uso de nanopartículas metálicas con células biológicas, es de suma importancia, siendo necesario conocer los procesos envueltos en la interacción entre membrana celular y nanopartículas metálicas (**HILLIAIREAU** and Couvreur, 2009, **MAILÄNDER** and Landfester, 2009).

La membrana celular es una estructura fina que envuelve todas las células vivas, es una puerta selectiva que establece una frontera entre el medio intracelular y el ambiente extracelular, permitiendo que la célula lleve para su interior elementos que sean necesarios como sustancias, macromoléculas y hasta microorganismos, o que libere algunas sustancias hacia el exterior. Esta capacidad de la membrana para controlar la entrada y salida de sustancias se llama permeabilidad selectiva, cuando sucede gastando energía la membrana forma vesículas que engloban las sustancias y este transporte es dividido en dos tipos: endocitosis, cuando el transporte es hecho para dentro de la célula y exocitosis, cuando el transporte es hecho para fuera de la célula. Aún la endocitosis es subdividida en fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por receptor, como muestra la Figura 2.

Figura 2 - Mecanismos de absorción celular



Fuente: (HILLAIREAU and Couvreur, 2009)

En la Fagocitosis, la célula (macrófago) engloba partículas sólidas de grandes dimensiones (0,25 a 3,00 μm). Para esto son formadas vesículas minúsculas, difíciles de ser observadas con microscopio óptico común, este tipo de endocitosis sucede en algunos tipos de células. Estudios también han revelado que las NPs cargadas (ya sea positiva o negativamente) son más fagocitadas que las partículas neutras (KARP, 2005).

En la Pinocitosis, la célula engloba líquidos o partículas, este es un sistema de alimentación celular complementario, Inicialmente, cuando el líquido a ser englobado entra en contacto con la membrana plasmática, provoca modificaciones en ella, siendo envuelto el material sin formación de pseudópodos, así ocurre una invaginación de la membrana, con hundimiento progresivo en el citoplasma. Finalmente la membrana forma una pequeña vesícula que es atraída para dentro de la célula.

La endocitosis mediada por receptor es similar a la fagocitosis pero en este caso, la partícula que será absorbida se une a proteínas receptoras específicas "clatrina" concentradas en ciertas áreas de la membrana plasmática que se unen a partículas externas específicas formando pequeñas depresiones en la membrana, produciéndose la invaginación, formándose una vesícula que será transportada para el interior de la célula. Este tipo de endocitosis tiende a ser más rápido y más eficiente para el transporte de sustancias raras (HILLAIREAU and Couvreur, 2009, ROSER et al., 1998, ANDERSON and Shive, 2012, LOTZE and Thomson, 2001, KARP, 2005).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Preparación de las nanopartículas de oro (AuNPs)

El método de síntesis de AuNPs utilizadas tanto en el tratamiento de alergias como en la elaboración de las muestras para este trabajo de tesis. Fueron elaboradas y caracterizadas por los Dres. Cristiano G. (UFSM) y Jandir M. H. (UFAL).

Las AuNPs fueron sintetizadas y estabilizadas con citrato de sodio de acuerdo con Jana et al (2001) (**JANA** et al., 2001). Una solución de 120 mg de iones de oro $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 (\text{H}_2\text{O})$ se disolvió en 250 ml de agua Milli-Q[®] hasta la formación de burbujas, y después fue añadido 50 ml de solución de citrato de sodio (1%) como agente reductor, permaneciendo en calentamiento hasta la ebullición (**BARRETO** et al., 2015, **TURKEVICH** et al., 1951, **KUMAR** et al., 2007).

3.2. Cultivo celular de las muestras biológicas (Células - AuNPs)

Las muestras conteniendo cultivo celular con AuNPs fueron producidas en los laboratorios de biología celular del Instituto de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Federal de Alagoas, AL-Brasil (colaboración Dr. Emiliano Barreto).

Ratones machos suizos fueron sacrificados con éter etílico y sometidos a laparotomía en flujo laminar (VECO). Seguidamente, son colectadas las células de la cavidad peritoneal, aplicando una inyección intraperitoneal de solución salina 2 ml (0,9% NaCl) estéril. Después de tres minutos son recogidas las células por lavado de la cavidad peritoneal con 5 ml de solución de tampón fosfato salino al frío (Phosphate buffered saline - PBS). Luego, las células peritoneales viables (macrófagos) fueron distribuidas en monocapas sobre placas de cultivo de 96 pocillos (Costar^(R)) a una concentración de 1×10^6 células / ml, después se dejó adherir durante 2h en placas incubadas en medio RPMI-1640 (Sigma^(R)) que contiene 10% de FBS (Fetal bovine serum), Después de la incubación, las células no adherentes se eliminaron mediante lavado de las placas tres veces con medio (RPMI) (**BARRETO** et al., 2015).

Los macrófagos peritoneales primarios en monocapas, fueron distribuidas en placas de cultura, bajo condiciones de cultivo de 37 ° C y humedad del invernadero a 5% de CO₂ con concentraciones de PBS + Nanopartículas de oro (AuNPs) en tres diferentes concentraciones 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1000 ng/ml, reposando por 24 horas.

Finalmente las muestras fueron lavadas con etanol por 10 minutos. En este proceso de cultivo son llamadas Muestras Tratadas, cuando las muestras contienen AuNPs y Puras, cuando son sin tratamiento de AuNPs.

3.3. Microscopía de barrido por sonda

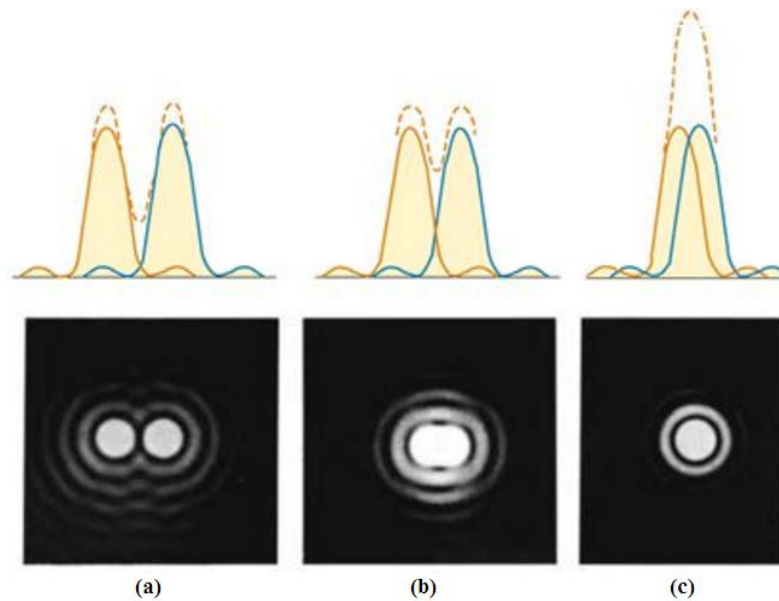
El principio fundamental del microscopio óptico es el límite de difracción que exige que la resolución espacial de una imagen sea limitada por la longitud de onda de la luz incidente, aberturas numéricas del condensador, sistema de lentes y objetivo.

La microscopía óptica basada en lentes es una técnica de imagen no invasiva ampliamente utilizada que presenta ciertas ventajas como facilidad de operación y aplicabilidad en diversas muestras. Sin embargo, tiene la gran desventaja de estar limitada por la resolución espacial.

Esta limitación surge del principio de la difracción de la luz debido al tamaño finito de la lente. El criterio generalmente aceptado para la definición de esta resolución, es el criterio de Rayleigh (**RAYLEIGH**, 1880, **DITCHBURN**, 1982, **HAYNES**, 2013); que define la resolución xy que puede ser alcanzado.

El criterio de Rayleigh establece que el límite inferior para dos objetos puntuales sean resueltos, es la distancia entre el primer mínimo de difracción de la imagen de un punto con el máximo central de difracción del otro, quiere decir que dos fuentes son distinguibles si el máximo de una figura de interferencia coincide con el mínimo de la otra como se muestra en la Figura 3 donde se puede ver en (a) las fuentes están distantes y la imagen está bien resuelta o distinguible, en (b) las fuentes están próximas y la imagen es apenas resuelta (resolución máxima-criterio de Rayleigh) y en (c) las fuentes están muy cercanas superponiéndose por tanto la imagen no está resuelta o indistinguible.

Figura 3 - El criterio de Rayleigh establece que el límite inferior de dos objetos puntuales a ser resueltos es la distancia entre el primer mínimo de difracción de la imagen de un punto con el máximo central de difracción del otro.



Fuente: (WILLIAMS and Carter, 1996), adaptada por el autor.

La microscopía convencional generalmente puede alcanzar un límite de resolución en el orden de la longitud de onda de la fuente de luz visible ($\sim 0.5\mu\text{m}$), además del problema de difracción, otro problema importante en todas las técnicas de microscopía basada en lentes es la desfocalización de la luz. Esto significa que haces de luz desde lugares que están fuera del plano focal también son detectados.

Por tanto los microscopios comunes están limitados por la difracción óptica clásica, es por eso importante utilizar una técnica de microscopía que supere la resolución del microscopio óptico común, es decir que supere el límite de difracción óptica clásica, los sistemas de microscopía que superan este límite de resolución son conocidos como microscopios de barradura por sonda (Scanning Probe Microscope – SPM) que cuentan con una sonda (punta o puntera) que explora la superficie de una muestra permitiendo monitorear la interacción puntera-muestra (TSUKRUK and Singamaneni, 2012).

Es así que un SPM es una familia de microscopios donde una sonda conocida como punta o puntera barre la superficie de una muestra, registrando punto a punto algún tipo de interacción entre la puntera y la superficie de la muestra. Las posiciones (x, y) y los registros cuantitativos de la interacción son almacenados para cada punto de la barradura, generando una imagen de la superficie.

Los dos modos básicos de operación de un SPM son:

Microscopio de efecto Túnel (STM – Scanning Tunneling Microscopy) : La microscopía de efecto túnel (STM) es un instrumento para tomar imágenes de superficies a nivel atómico, utiliza una puntera conductora (tungsteno o platina-iridio) muy fina, próxima a una muestra conductora o semiconductora, con una diferencia de potencial aplicada entre muestra y puntera. Cuando la proximidad entre puntera y muestra es aproximadamente 10\AA y es aplicada una diferencia de potencial de centenas de mV, ocurre el paso de una corriente de efecto túnel (corriente de polarización) entre muestra y puntera de aproximadamente nA. La corriente de tunelización varía exponencialmente con la distancia entre la puntera y la muestra, esta señal es monitoreada y utilizada para crear la imagen conforme la posición de la puntera escanea a través de la superficie (CHEN, 2008).

Microscopía de fuerza atómica (AFM – Atomic Force Microscopy): Es una de las técnicas más apropiadas cuando se utilizan muestras biológicas, es así que esta técnica de microscopía básica es muy utilizada en diversas áreas de la ciencia. La comprensión del funcionamiento de este microscopio es fundamental pues es similar en muchos aspectos a un sistema de microscopía de campo cercano conocido como SNOM, que en este caso es de mucho interés en este trabajo de tesis.

Con estos tipos de microscopía es posible ver y medir estructuras con gran precisión tanto en escala micrométrica y nanométrica, por un lado el AFM es capaz de medir cualquier tipo de muestra sin necesidad de trabajar en condiciones extremas (como bajas temperaturas o altas presiones), permite realizar medidas de muestras biológicas, como por ejemplo, observar bacterias, DNA y células cancerígenas, haciendo este instrumento de medida una herramienta muy útil en diferentes campos de la ciencia como Medicina, Biología, Química, etc., además utilizando diferentes tipos de puntas sean magnéticas o metálicas, este microscopio es capaz de medir topografía y conductividad simultáneamente.

Por otro lado, el SNOM tiene las mismas funciones y adicionalmente cuenta con una fibra óptica que permite hacer medidas de transmisión en diversos materiales transparentes y translucidos, así el SNOM es un instrumento de medida producto de la evolución de las microscopías por sonda (SPM) (KAUPP, 2006).

3.4. Técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM)

A inicios de la década de 1980, los físicos Gerd Binnig y Heinrich Rohrer estudiaron las fuerzas que actúan entre los electrones de la superficie de un metal y una puntera metálica en los laboratorios de la compañía IBM en Zurich (Suiza). Esta investigación que inicialmente fue centrada en el estudio de las interacciones entre materiales, se convertiría en uno de los más fantásticos instrumentos de medida experimental que existen en la actualidad: el microscopio de barrido, que poco después daría lugar a una gran familia de equipos similares, usados para observar objetos en escala atómica, es así que aparece el microscopio de fuerza atómica (AFM) también conocido como Scanning force microscopy (SFM), elaborado en 1986 por Binnig, Quate y Gerber, después que observaron que la puntera del STM ejercía fuerzas sobre la superficie de una muestra en la misma orden que las fuerzas interatómicas (KAUPP, 2006, FUKUI, 1992).

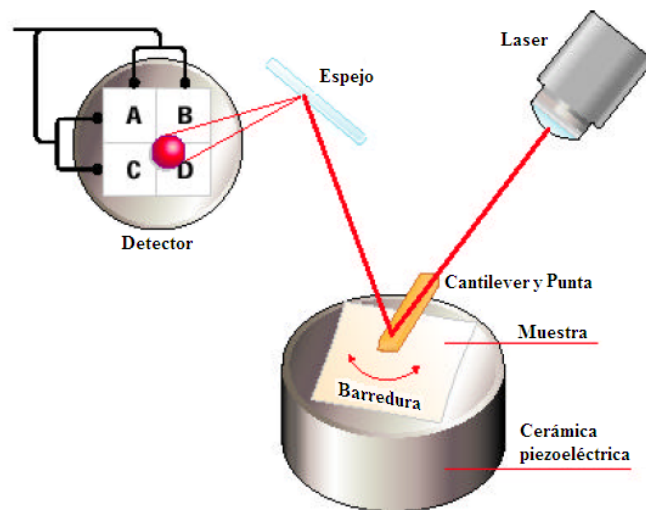
El Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewton, se basa en la existencia de una fuerza dependiente de factores como: separación entre Puntera/Muestra, materiales componentes, geometría y contaminación de la puntera/muestra. Es así que el AFM es compuesto básicamente por una puntera que permite efectuar la barredura superficial de la Muestra en estudio, midiéndose la fuerza de la Interacción atómica entre la puntera y superficie.

Las fuerzas predominantes implicadas durante la barredura de AFM, que generan deflexiones en el cantiléver son las de atracción y las de repulsión. La primera debido a las grandes distancias que van 100 nanómetros a algunos nanómetros, son las interacciones predominantemente atractivas, debido a las llamadas fuerzas de Van der Waals. Cuando se aproxima más la puntera con la superficie, las interacciones comienzan a ser repulsivas (fuerzas positivas), debido a la proximidad y consecuente repulsión entre los orbitales electrónicos de los átomos de la superficie de la muestra y los de la punta del AFM. Esta repulsión electrostática debilita la fuerza atractiva a medida que la distancia disminuye, es decir estas fuerzas actúan cuando entra en contacto la punta o puntera con la superficie y tienen su origen en el principio de exclusión Pauli, en términos prácticos este principio impide que dos cuerpos ocupen el mismo lugar en el espacio. Las fuerzas se anulan cuando la distancia entre los átomos

es de algunos angstroms o mayores distancias (distancia característica de una unión química).

Un diagrama simplificado del microscopio AFM es mostrado en la Figura 4, ahí se puede ver que una muestra está sobre una cerámica piezoeléctrica especial (Scanner) que sirve para posicionarla, así la superficie es mapeada o recorrida por una puntera o punta unida a un brazo de apoyo, llamado cantiléver.

Figura 4 - Esquema principal de un AFM



Fuente: (BRAGA and RICCI, 2004), adaptada por el autor.

En el cantiléver es incidido un haz láser y la luz reflejada es direccionada para un espejo y después captada por una matriz de fotodiodos (fotodetector), siendo después colectada la señal de salida por un amplificador diferencial, midiéndose así las deflexiones y cambios de posición del cantiléver e intensidad de luz, debido a rugosidades de la muestra durante la barradura (**BRAGA and RICCI, 2004, BHUSHAN, 2004, GIESSIBL, 2003**). Los movimientos detectados son captados mediante señales eléctricas que son almacenadas y procesadas por una computadora provista con el programa apropiado (Multiview 4000 nanonics), para seguidamente ser convertidas en imágenes topográficas bidimensiones (2D) o tridimensionales (3D) de la superficie del material con resolución atómica (**BRAGA and RICCI, 2004, NANONICS IMAGING, 2010, HERRMANN et al., 1997, CHINAGLIA, 2010**).

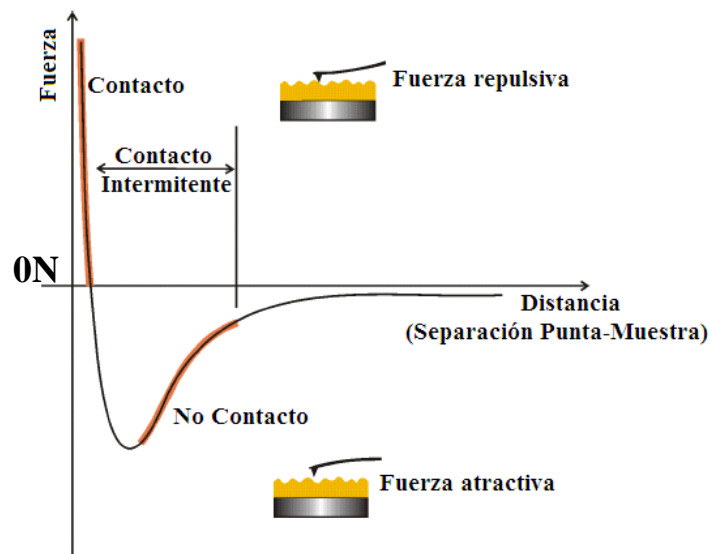
El modelo de microscopio Nanonics utilizado en esta tesis, funciona con la particularidad que la puntera es unida a un cantiléver llamado tuning-fork, el cual vibra a una frecuencia de resonancia natural durante la barradura, evitando el uso de láser.

Las Fuerzas de interacción entre la puntera y la muestra hacen que el tuning-fork cambie de la frecuencia natural de resonancia en la cual se encontraba vibrando, produciéndose una diferencia de altura en la topografía. Esa variación de fase o amplitud permite que el software cree un mapa topográfico de la muestra (**NANONICS IMAGING**, 2010).

3.4.1. Principio de la microscopía de fuerza atómica AFM

Para entender el funcionamiento del AFM, es necesario tener conocimiento de las fuerzas que actúan entre los sistemas microscópicos siendo que las pequeñas distancias son un factor importante. En la Figura 5, son representadas las fuerzas que actúan entre punta o puntera y la muestra en función de la distancia que las separa.

Figura 5 - Fuerza entre la puntera y la muestra, en función de la distancia entre ellas



Fuente: (CHINAGLIA, 2010), adaptada por el autor.

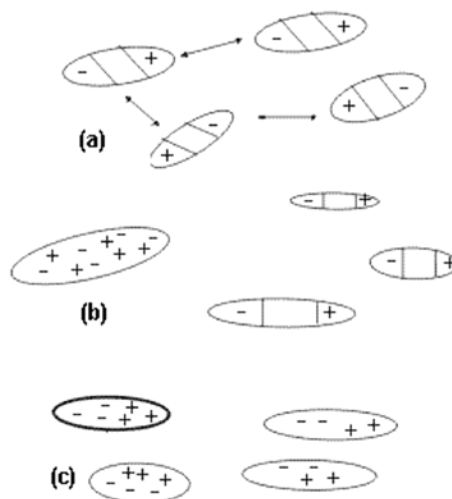
Las fuerzas son atractivas en la región debajo de la línea de fuerza nula (0N), hacen que el cantiléver se flexione hacia el lado de la muestra (fuerza atractiva). Sobre esta línea del cero, las fuerzas son repulsivas y generan que el cantiléver se flexione en sentido opuesto de la muestra (fuerza repulsiva). Este tipo de fuerza es proveniente del potencial de interacción entre dos o más átomos dado por $V(r) = 4\varepsilon \left(\frac{\sigma}{r^{12}} + \frac{\sigma}{r^6} \right)$, donde ε es la profundidad del potencial y σ es la

distancia (finita) donde el potencial inter partícula es cero; r es la posición de la puntera en relación a la superficie (ZANETTE, 2010, CHANG, 2005).

La interacción repulsiva a distancias cortas se origina en el principio de exclusión de Pauli: es decir que dos fermiones no pueden estar en el mismo estado, con el mismo momento angular de espín, mismo componente z del momento angular y la misma ubicación espacial (ATKINS and DE PAULA, 2011, ZANETTE, 2010, CHANG, 2005).

Las fuerzas de van der Waals que actúan entre dos átomos o moléculas pueden ser clasificadas en fuerzas de orientación, de inducción y de dispersión, representadas en la Figura 6 (ZANETTE, 2010).

Figura 6 - Fuerzas de van der Waals. a) Fuerzas de orientación, b) Fuerzas de inducción y c) Fuerzas de dispersión.



Fuente: (ZANETTE, 2010)

Las fuerzas de orientación resultan de la interacción entre dos moléculas polares con momentos dipolares permanentes (ver Figura 6.a). Fuerzas inductoras son debido a la interacción de una molécula polar y no polar, donde la polar induce una polaridad en las proximidades de la otra. El campo eléctrico de la molécula polar destruye la simetría de la distribución de cargas de la molécula no polar, lo que resulta en una atracción similar a la registrada entre las moléculas polares (véase la Figura 6.b). Las moléculas no polares tienen dipolos fluctuantes

finitos y grandes momentos multipolares en intervalos de tiempo muy cortos, los cuales interactúan, dando lugar a fuerzas de dispersión entre ellos.

Para las moléculas no polares, la distribución electrónica es en promedio simétrica. Pero a cada momento una parte de la molécula tiene más electrones que la otra. Por lo tanto, cada molécula (o átomo) se comporta como polar, pero esta "polarización" varía constantemente en magnitud y dirección. Entonces se tienen momentos fluctuantes (ver Figura 6.c).

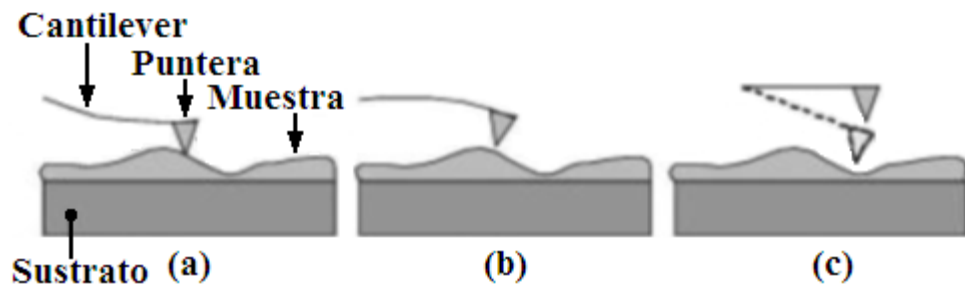
Las fuerzas de dispersión son generalmente más altas que las de orientación e inducción, excepto en el caso de moléculas polares muy fuertes como las del agua. Las fuerzas de la dispersión o, en general, las fuerzas de van der Waals son atractivas y por lo general crecen rápidamente cuando las moléculas, átomos o cuerpos se acercan entre sí (**ATKINS** and DE PAULA, 2011, **CHANG**, 2005).

3.4.2. Modos de operación del AFM

Si la punta escanea a una altura constante, se corre el riesgo de que la punta choque directamente con la superficie de la muestra generando daños tanto en la muestra como también en la puntera, es así que el AFM cuenta con un sistema de autorregulamiento de posición (Feedback), que es utilizado para ajustar la distancia entre punta y muestra manteniendo la fuerza resultante constante. En ese sentido los AFM cuentan con diferentes modos de barradura o modos de operación, que se refieren específicamente a la distancia mantenida entre la puntera y la muestra, estos modos son utilizados según el tipo de muestra utilizada, tipo de barrido y tipo de información que se desee obtener.

En general los modos de realizar imágenes pueden ser clasificados en tres tipos: modo contacto cuando la puntera está muy cerca de la muestra, modo no contacto cuando está más alejada la puntera y modo dinámico o contacto intermitente cuando el contacto es intermitente, como muestra la Figura 7, ahí se puede observar la deflexión del cantiléver en los modos respectivos.

Figura 7 - Representación esquemática de los modos de operación del AFM. (a) Modo contacto, (b) modo no-contacto y (c) modo contacto intermitente.



Fuente: (CHICHESTER, 1998), adaptada por el autor.

En el primer caso Figura 7(a), el equipo trabaja en la región repulsiva y este método es llamado de modo contacto, en esta región el cantiléver se flexiona en dirección opuesta, alejándose de la muestra. Cuando es operado en la región atractiva Figura 7(b) el método es llamado de modo no-contacto, en esta región el cantiléver se flexiona hacia la muestra, siendo atraído por las fuerzas de van der Waals o por la capilaridad de la capa de contaminación en caso de imperfecciones de la muestra. Un tercer modo de operación es el contacto intermitente, Figura 7(c), se puede decir que el combina ambos modos, Repulsivo y Atractivo, produciendo una oscilación del cantiléver durante la barradura (**BRAGA** and **RICCI**, 2004, **BHUSHAN**, 2004, **GIESSIBL**, 2003).

Es importante el conocimiento de cada uno de estos modos de operación, pues de acuerdo al tipo de muestra se tendrá que escoger la mejor opción de operación. Para profundizar más en cada uno de estos modos de operación a continuación se detalla cada uno de ellos:

3.4.2.1. Modo Contacto

El modo contacto fue el primer modo inventado para AFM, es el modo de operación más simple y rápido, sirvió de base para los otros modos de operación. Con este modo se consigue una topografía rápida, es decir no es necesario mucho tiempo para obtener imágenes.

En este modo de operación, la puntera hace un leve contacto con la superficie de la Muestra, es decir algunos angstroms de separación $<5\text{\AA}$, produciendo una repulsión electrónica. Así es realizado el barrido de la superficie de la muestra, como indicó la Figura 7(a). Cuando la Punta barre, la superficie pasa por puntos de diferentes alturas, generando variaciones en la deflexión del cantiléver, estas deflexiones son medidas a través de un haz de láser reflejado en la punta del cantiléver, llegando hasta una matriz de fotodiodos. Durante la barredura la deflexión del cantiléver es mantenida constante funcionando como una señal de feedback, es decir la fuerza entre punta y superficie es mantenida constante durante el barrido manteniéndose una deformación constante, haciendo que el cantiléver se mueva verticalmente a cada punto, a través del sistema de retroalimentación (feedback) asociado con una computadora.

En este modo las fuerzas que actúan son repulsivas de van der Waals (repulsión electrónica), con orden de 10^{-6}N . Este modo permite analizar la morfología superficial, visco elasticidad, coeficientes de fricción y otras propiedades.

Utilizando la técnica llamada *force modulation*, se puede por ejemplo, identificar y mapear regiones de diferente dureza o elasticidad en materiales heterogéneos. Como resultado, se localizan transiciones entre los diferentes componentes en mezclas de polímeros, materiales compuestos y elastómeros, así como material orgánico en sustrato más duro.

En condiciones ambientales (al aire libre), la mayoría de las superficies están recubiertas con una capa de vapor de agua y contaminantes con varios nanómetros de espesor. Cuando la puntera toca esta capa de líquido, el efecto de la acción capilar crea tensión superficial jalando la punta hacia abajo. La punta toca la superficie, pero los efectos de esta tensión pueden distorsionar la imagen, generando características falsas, pudiendo ser dañada la muestra o inclusive quebrar la puntera debido a las fuerzas generadas.

Otro problema que puede ocurrir, particularmente en muestras suaves, es la deformación plástica de la superficie como resultado de la fuerza de arrastre. Además de los daños a la superficie y producción de imágenes erróneas, se tiene la contaminación por los residuos y el consiguiente deterioro de la punta. Es por estos motivos que este modo de operación es especialmente indicado para muestras rígidas (**CHINAGLIA**, 2010, **BRAGA** and **RICCI**, 2004).

3.4.2.2. Modo No-Contacto

En el modo no contacto, el cantiléver está unido a un elemento piezoeléctrico y oscilando a su frecuencia resonante. Cuando la punta se aproxima a la superficie en el modo oscilante, la oscilación cambia, aumentando la frecuencia de resonancia ligeramente, debido a la fuerza entre la punta y la muestra (100kHz a 1MHz), y aparecen las fuerzas de interacción actuantes de Van der Waals atractivas y electrostáticas, más débiles que en el modo contacto, de la orden de 10^{-12} N.

La fuerza de Van der Waals, o cualquier otra fuerza de largo alcance que se extiende sobre la superficie, actúan para disminuir la frecuencia de resonancia del cantiléver. Esta disminución en la frecuencia de resonancia combinada con el sistema de retroalimentación mantendrá una amplitud de oscilación constante.

Este efecto se traduce como una amortiguación de la oscilación del cantiléver, lo que conduce a una reducción en la frecuencia y en la amplitud de la oscilación. La oscilación se controla mediante un transductor de fuerza, y el escáner ajusta la altura z, a través del "feedback loop" para ser capaz de mantener la punta a una distancia fija de muestra, similarmente como en el modo de contacto. Se genera y aplica una señal oscilante al cantiléver de manera que este vibre en su frecuencia de resonancia. La oscilación de la puntera es monitoreada, a medida que esta escanea la superficie de la muestra. Así la señal de salida se detecta mediante la medición de la variación de frecuencia o amplitud, utilizándose un sistema de retroalimentación "feedback loop" que mantendrá constante la interacción punta-muestra.

En el modo no contacto, la punta debe estar lo suficientemente distante de la superficie, aproximadamente $10 \text{ \AA} - 100 \text{ \AA}$, sin tener que pasar al régimen de repulsión utilizado por el modo contacto. Por lo tanto, este modo de operación es realizado en el régimen atractivo, como fue mostrado en la Figura 5, aquí la muestra no sufre fricción de la puntera durante el barrido o problemas de fuerza de arrastre, como en el modo contacto, aunque la resolución sea menor, debido a la fuerza de interacción débil producto de la gran distancia entre Punta y Muestra, es por eso que este modo es útil para muestras suaves (**HO** and West, 1996, **YANG** et al., 2007, **HOOGENBOOM** et al., 2006, **ZIMMERMANN** et al., 1999, **BRAGA** and **RICCI**, 2004, **HERMINGHAUS** et al., 1997, **CHINAGLIA**, 2010).

3.4.2.3. Modo Contacto Intermitente

En el modo contacto intermitente o dinámico (*tapping mode*), la sonda consiste de una puntera unida a un cantiléver oscilante que, durante la barredura, toca la superficie de la muestra en el punto de máxima amplitud de oscilación. El cantiléver oscila en su frecuencia de resonancia (frecuencia natural, $50 \times 10^3 \text{ Hz} - 500 \times 10^3 \text{ Hz}$) o próximo de ella con amplitud máxima típica (20 nm - 100 nm), en condiciones ambientales al aire libre. La separación entre la puntera y superficie de la muestra es de aproximadamente $5 \text{ \AA} - 20 \text{ \AA}$. Durante la barredura, hay disipación de energía cuando la punta pasa por diferentes alturas de la muestra, generando disminución en la amplitud de oscilación de la punta. Esto evita que sucedan fuerzas de arrastre pues la fuerza de interacción varía siendo en promedio 10^{-9} N . Entonces la reducción de la amplitud es utilizada para identificar y medir las características de la superficie, pues cuando la punta pasa sobre una región con depresión, habrá mayor libertad de movimiento para el cantiléver, que oscila con mayor amplitud. Por otro lado cuando la punta pasa por una región elevada o un pico, la oscilación quedará más limitada.

Por tanto el sistema de retroalimentación es utilizado para corregir la altura y mantener la amplitud constante, se puede deducir que en este modo, la interacción Punta-Muestra es intermitente quiere decir va desde el régimen “Fuerza cero”, pasando por el régimen atractivo, hasta llegar al

régimen repulsivo, como mostró la Figura 5 (**CHINAGLIA**, 2010). Además la amplitud de oscilación de la punta es definida por su RMS (root mean square), obtenida a través de la señal generada en el fotodiodo por el haz del láser reflejado en el cantiléver (amplitud de oscilación que debe ser mantenida constante). Mediante el *feedback* con una computadora, el RMS es mantenido constante durante la barradura, moviendo el cantiléver verticalmente, a cada punto, de esta manera la punta toca suavemente la superficie de la muestra y elimina la fuerza de arrastre o de fricción (fuerza laterales) presente en el modo contacto. Así, la posición vertical del cantiléver, juntamente con la posición (x, y) correspondiente, es almacenada en una computadora para formar finalmente la imagen topográfica.

Es necesario resaltar que este modo es utilizado para superar las restricciones presentes en los modos contacto y no contacto, pues en este modo, el contacto entre punta y muestra es delicado, así la superficie de la muestra es menos modificada siendo un modo de operación indicado para trabajar con muestras biológicas, polímeros y muestras demasiado rugosas, pues estas son maleables y deforman fácilmente, también este modo es apropiado cuando se usan punteras frágiles (**RENSEN** et al., 1999, **CHINAGLIA**, 2010, **BRAGA** and **RICCI**, 2004).

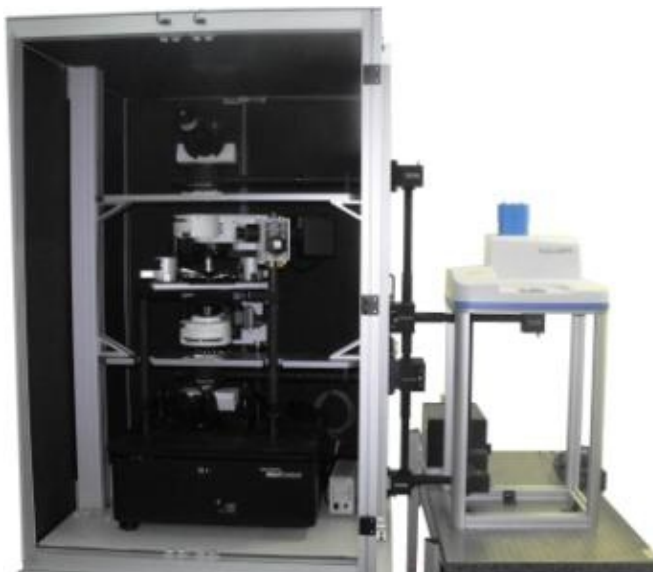
3.5. Técnica de microscopía de campo cercano

Conociendo el funcionamiento básico del AFM, se puede complementar conceptos y entender cómo se desenvuelve el funcionamiento de la microscopía de campo cercano.

Específicamente, en este trabajo de tesis para el análisis de muestras celulares conteniendo AuNPs, se utilizó el sistema de microscopía Raman confocal de múltiples puntas con campo cercano y fuerza atómica modelo Multiview 4000 - Nanonics del grupo de investigación de física de la materia condensada y materiales OPTMA-UFAL, como muestra la foto del equipo en la Figura 8, fue utilizado parte de las funciones del equipo siendo de mayor interés la microscopía óptica de campo cercano en modo transmisión bajo condiciones ambientales (**FILLARD**, 1996, **HECHT** et al., 2000).

La microscopía óptica de campo cercano, mayormente conocida como SNOM (*Scanning Near-field Optical Microscopy*), es un microscopio de barrido con sonda (SPM –Scanning Probe Microscope) con la particularidad de usar una sonda especial y apropiados equipos o bloques adicionales que permiten realizar estudios aprovechando los efectos de campo cercano (**HECHT** et al., 2000).

Figura 8 - Sistema de microscopía de barrido por sonda, modelo Multiview 4000 – Nanonics



Fuente: Elaborado por el autor - Laboratorio OPTMA

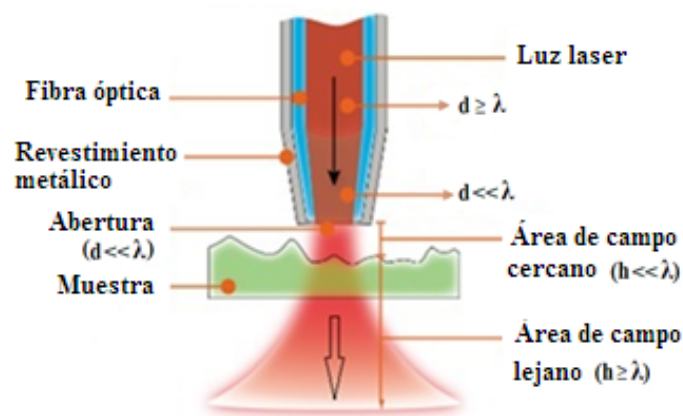
El SNOM hace uso del campo cercano conocido como campo evanescente (no propagante), es decir, campos cuyas intensidades decaen exponencialmente con la distancia a partir del objeto, esta característica permite obtener imágenes de alta resolución, permitiendo así estudiar diversos materiales nanoestructurados como nanotubos, células, polímeros, etc. Esta es una de las ventajas de esta técnica, pues es posible obtener de manera simultánea informaciones de las propiedades estructurales en escala nanométrica (Fuerza Atómica - topografía) y las imágenes de espectroscopia de transmisión óptica, siendo así un instrumento muy importante para estudiar muestras biológicas (**SIMON** and Durrieu, 2006, **ZHANG** et al., 2012).

La Figura 9 muestra la importancia de interacción de la puntera, luz y la muestra, para que puedan ser aprovechados los campos evanescentes. Se Puede observar que la luz pasa a través de una punta cónica con diámetro de dimensiones inferiores al límite de difracción de la luz ($\lambda > \varnothing 50 \text{ nm} - 100 \text{ nm}$).

Garantizando así la resolución de la medida. A continuación la luz ilumina la muestra ubicada dentro de su campo cercano a una distancia mucho menor que el diámetro de la abertura (~ 5 nm) proporcionando la sensibilidad al sistema (AESCHIMANN, 2004, BETZIG and Trautman, 1992, DUARTE, 2009).

Al igual que en los sistemas de AFM, en el SNOM los modos de operación conocidos son: modo de contacto, modo de no contacto y modo de contacto intermitente todos ellos con las mismas propiedades que un AFM (NANONICS IMAGING, 2010).

Figura 9 - Esquema da interacción puntera de prueba-luz y muestra.

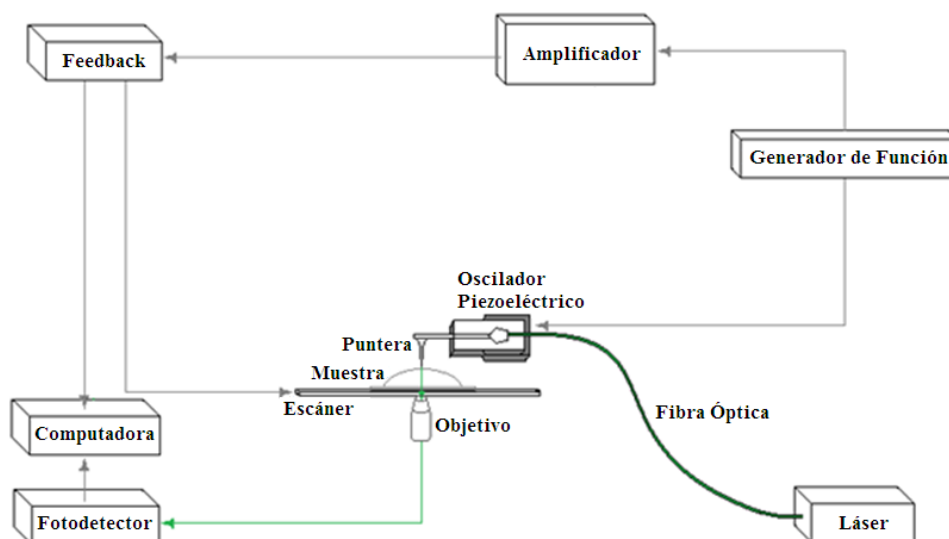


Fuente: Adaptado por el autor – NanoScan technology

Cuando se estudian interacciones entre células y nanopartículas, el modo más apropiado es el modo contacto intermitente (Tapping mode), pues es el más adecuado para trabajar en muestras Suaves como son las biológicas, en este modo el cantiléver oscila en torno a una amplitud de vibración de 20 nm a 100 nm generando un contacto intermitente constante y sensible a los cambios en la altura entre la puntera y la superficie de la muestra, todo este proceso es controlado por el sistema de retroalimentación (feedback), evitando fuerzas del arrastre lateral que pueden causar que la muestra se mueva del cubreobjetos, así en conjunto con la configuración del sistema adecuado es posible detectar señales de la superficie y las transmitidas a través de la muestra, que proporcionan información importante para el análisis de la captación celular de AuNPs (STARK et al., 2001, DE LANGE et al., 2001, FRANKEL et al., 2006).

El esquema de la Figura 10, muestra un sistema integrado SNOM con los principales componentes, en esta configuración la luz de un láser (532 nm Nd-YAG/ Láser Power Supply 20 mw) es focalizada en una fibra óptica y conducida hasta una puntera (diámetro de abertura $\varnothing 50\text{nm}$) que emitirá la luz hasta atravesar la muestra. Esta luz transmitida es colectada por un objetivo (50x, NA: 0,45 - Nikon SLWD PLAN, Japan) y detectada por un fotodetector (APD Perkin Elmer MD942). El mecanismo de *Feedback* (retroalimentación) monitorea la distancia entre la fuente de luz y la muestra. Los resultados son analizados mediante un software comercial de procesamiento de imágenes WSxM4.0 (ZHANG et al., 2012, STARK et al., 2001, FRANKEL et al., 2006).

Figura 10 - Diagrama de bloques SNOM modo transmisión, con los principales componentes del sistema.



Fuente: (ZHANG et al., 2012), adaptada por el autor

3.5.1. Procedimiento de medida SNOM

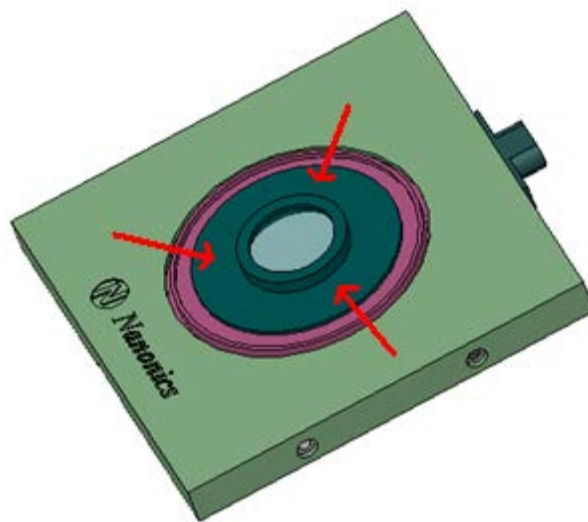
A continuación se describen los principales pasos para tener una idea específica de cómo se realiza una medida SNOM. Estos procedimientos de medición son similares a los utilizados por un AFM, diferenciándose en algunos detalles.

Cuando son utilizadas algunas muestras como células o bacterias, estas requieren una preparación adecuada que permita la realización de la medida, de

modo que durante la medida no sufran algún daño. Específicamente para el caso de medidas SNOM en la configuración Transmisión las muestras deben ser transparentes y pequeñas, lo suficiente como para caber en el porta muestras del equipo (~Ø1 cm).

Después de tener una muestra colocada en un porta muestra adecuado, el siguiente paso es posicionarlo en el microscopio como muestra la Figura 11, para eso el porta muestra es colocado sobre el soporte del Lower Scanner, compuesto por tres esferas de Safira (indicadas por las flechas).

Figura 11 - Imagen del "Lower Scanner", conteniendo el porta-muestra que queda atrapado a tres esferas de Safira.



Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010)

3.5.1.1. Colocando la puntera del SNOM

Después de colocar el porta muestras en el microscopio, el siguiente paso es identificar la puntera que será utilizada. El tipo de puntera a ser utilizado dependerá de la medida que se necesite realizar, si es solo AFM (puntera simple) o SNOM (puntera con fibra óptica), para realizar simultáneamente AFM y transmisión. También deben ser consideradas si las muestras son líquidas o sólidas (medidas al aire libre), pues las punteras son diferentes para estos casos. En este caso se utiliza una puntera de SNOM.

Las punteras sean de SNOM o AFM vienen en un case o estuche, que indica algunas de sus características como la frecuencia, resonancia del tuning-fork, factor de calidad, tamaño, modo de trabajo como reflexión, transmisión o colección, como muestra la Figura 12. Donde muestra un case con puntera y fibra óptica para SNOM y las características escritas en la capa del “case”.

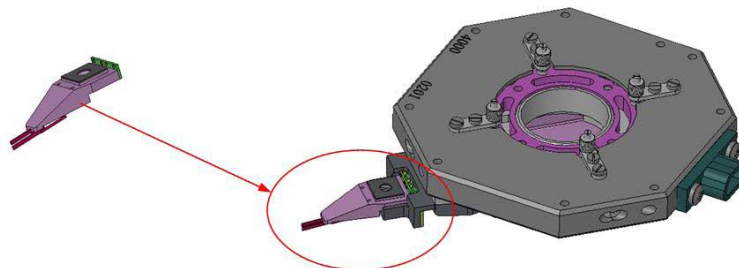
Figura 12 - Puntera de SNOM indicando tamaño, frecuencia de resonancia, factor de calidad, etc.



Fuente: Elaborado por el autor, Laboratorio OPTMA

Entonces una vez identificada la puntera (Para SNOM - puntera unida a una fibra óptica), se coloca en el sistema piezoeléctrico (Upper Scanner) como muestra la Figura 13. Esto es para que la puntera pueda realizar un test de barrido.

Figura 13 - Montaje de la puntera en el Upper scanner.

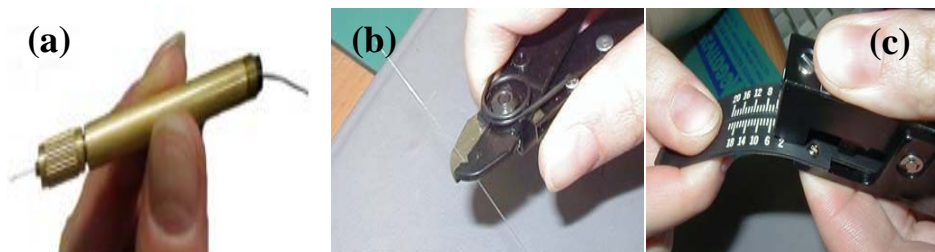


Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010)

Este proceso debe ser realizado con sumo cuidado, pues las punteras son extremadamente sensibles y frágiles, corriendo el riesgo de quebrarse con facilidad. Una vez colocada la puntera en el scanner, seguidamente es realizado un “*test de control*” mediante un software (NanoWorkshop-NWS) con esto se verifica que la puntera esté correctamente colocada en el sistema.

Seguidamente, se unen la fibra óptica con el sistema láser, entonces se ingresa el extremo de la fibra óptica dentro del acoplador de fibra, dejando una parte de la fibra sobresaliente (~10 mm) como muestra la Figura 14 (a). Antes de ajustar la fibra en el acoplador, se debe pelar el recubrimiento de la parte final de la fibra unos 20 mm -30 mm como muestra la Figura 14 (b), seguidamente debe ser “*Clivada*”, es decir se corta una parte del extremo (~5 mm -10 mm) para mejorar la conducción del haz del láser a través de la fibra como muestra la Figura 14 (c).

Figura 14 - Montaje de la puntera (a) fibra en el acoplador metálico, (b) pelado y (c) corte de la fibra óptica.



Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), Elaborado por el autor

3.5.1.2. Acoplado el láser en la fibra

De este proceso dependerá obtener buenas imágenes SNOM, pues es aquí donde se tiene que alinear el láser con la fibra óptica de modo que se concentre todo el haz láser posible en la fibra.

Con la fibra ya unida al acoplador, ahora se introduce el acoplador dentro del sistema de ejes de alineamiento del láser como muestra la Figura 15 asegurándolo con el tornillo marcado con una X, seguidamente se enciende el láser y mediante las perillas A (vertical) y B (horizontal) se alinea

el láser, que en la mayoría de casos es mejor dejar fijos y solo se hace el alineamiento utilizando las perillas C y D que desplazan la fibra en la posición X e Y. Para verificar que esté correctamente alineado, se verifica que se consiguió la máxima corriente en la fuente del detector “APD Counter & Power Supply” (~1,5 mA). Esto debe ser realizado con la luz de apoyo del equipo apagada para evitar quemar el detector.

Figura 15 - Acoplando la fibra óptica con el láser



Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

3.5.1.3. Alineamiento del detector

Aquí es cuando es alineado el haz del láser que sale por la abertura de la puntera, es decir se concentra el máximo de luz en el detector. Este procedimiento para una medida SNOM modo transmisión es hecho en 5 pasos:

- 1 - Mediante el programa (NanoWorkshop -NWS) se realiza el acercamiento de la puntera con la muestra, para ubicar una célula específica y saber el límite de desplazamiento de la puntera, como se puede ver en la Figura 16, la puntera (indicada con la flecha roja) está sobre la superficie del porta muestras y se puede ver su ubicación.

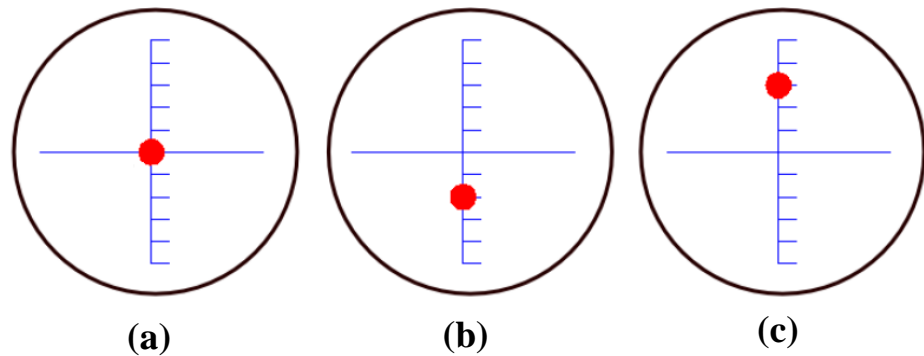
Figura 16 - Puntera tocando el porta muestras



Fuente: Elaborado por el autor

- 2 - Retirar la puntera un poco para evitar problemas de dispersión.
- 3 – Se Debe conseguir ver la luz saliendo de la puntera, en el programa de imagen. Una vez localizada la luz, se alinea la puntera en el cruzamiento (centro de la escala) Figura 17, para eso se debe de mirar por el ocular del microscopio. Para este alineamiento es necesario mover las perillas X-Y Stage del microscopio, esto hace que se mueva todo el sistema puntera-muestra quedando fijo el detector.
- 4 - Antes de realizar un test de alineamiento, se apagan las luces del laboratorio y luces de apoyo del microscopio, esto es para evitar quemar el detector.
- 5 - Se enciende la fuente del detector “APD Counter & Power Supply”, si el led rojo enciende quiere decir que la luz es demasiado intensa y está saturando el detector y es necesario disminuir la intensidad del láser. En la fuente es mostrado un display que indica la corriente registrada que para las medidas debe ser de aproximadamente (~ 1.5 mA), pues el fotodetector transforma la señal de luz en señal de voltaje, cuyo valor depende de la posición del haz sobre el área del fotodetector, es por eso que el sistema se alinea con el fotodetector de manera que el haz láser llegue exactamente en el centro de éste (en el centro de los ejes) mostrado en la Figura 17(a), los otros casos (a) y (b) el haz de láser incide fuera del fotodetector por tanto son incorrectos.

Figura 17 - Posiciones del haz láser en los ejes del incidencia del detector



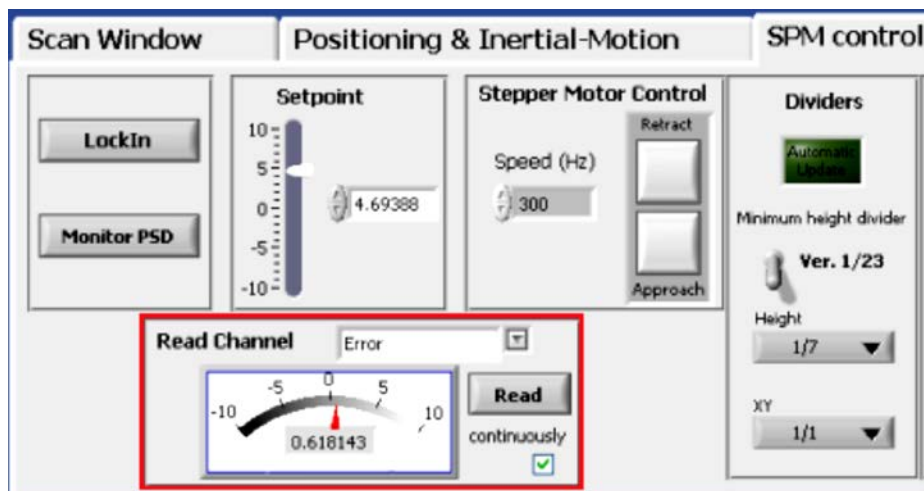
Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

3.5.1.4. Efectuando una medida SNOM

Una vez realizados los procedimientos anteriores ahora se puede realizar una medida SNOM, para lo cual se siguen los siguientes pasos:

- 1 - Se identifica la frecuencia de resonancia del tuning-fork, mediante el software NWS del sistema, es decir el sistema identifica la frecuencia de la puntera, que será la frecuencia base con la cual el sistema trabajará, usual 33-43KHz según el tipo de puntera. Así también son establecidos los parámetros de ganancia y amplitud de oscilación.
- 2 - SetPoint, este es un parámetro muy importante que identifica la cercanía de la puntera con la superficie de la muestra, este actúa graduando la fuerza aplicada por la puntera sobre la superficie de la muestra, este parámetro es ajustado antes de realizar la medida y en ocasiones también durante ella, para ser efectuada una medida SNOM el SetPoint debe tener un valor de error de 0,3 o menor en el mejor de los casos. Se Puede ver en la Figura 18 el panel donde grafico donde se regula el SetPoint.

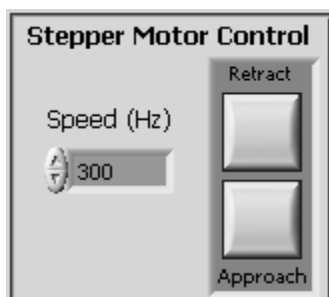
Figura 18 - Regulando el Setpoint



Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

3 - Ahora, se puede efectuar la medida SNOM, para eso se aproxima la puntera con la muestra en el SPM controller (Approach), este acercamiento debe ser realizado con una velocidad bien baja, para que el impacto de la punta con la superficie no sea fuerte. En el programa esto es colocado en el Speed (Hz) con un valor recomendable de 300Hz, como muestra la Figura 19 del Stepper Motor Control.

Figura 19 - Control "Stepper Motor control".

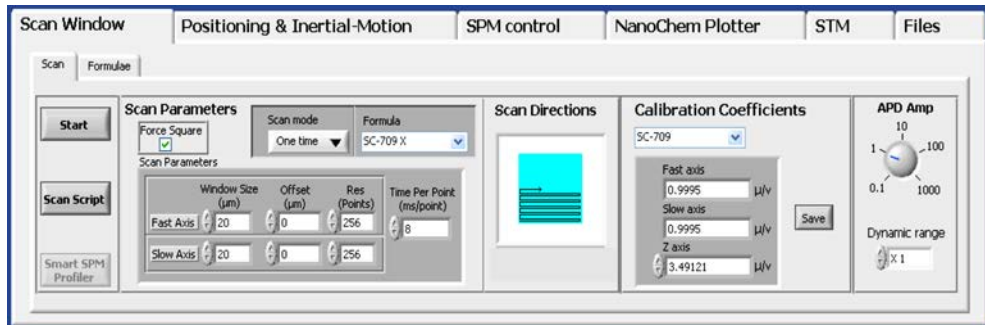


Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

4 - Previo a comenzar la medida SNOM, se configuran los parámetros que caracterizaran los resultados, es decir dirección del escaneo, tamaño de imagen ($5 \times 5 \mu\text{m}$), resolución (256×256), offset (inicio de la barradura $x=0, y=1$), velocidad de barradura (8-12 ms), etc. Como se

puede ver en la Figura 20 mostrando el Scan Windows Tab con las secciones para este procedimiento.

Figura 20 - Scan Windows Tab

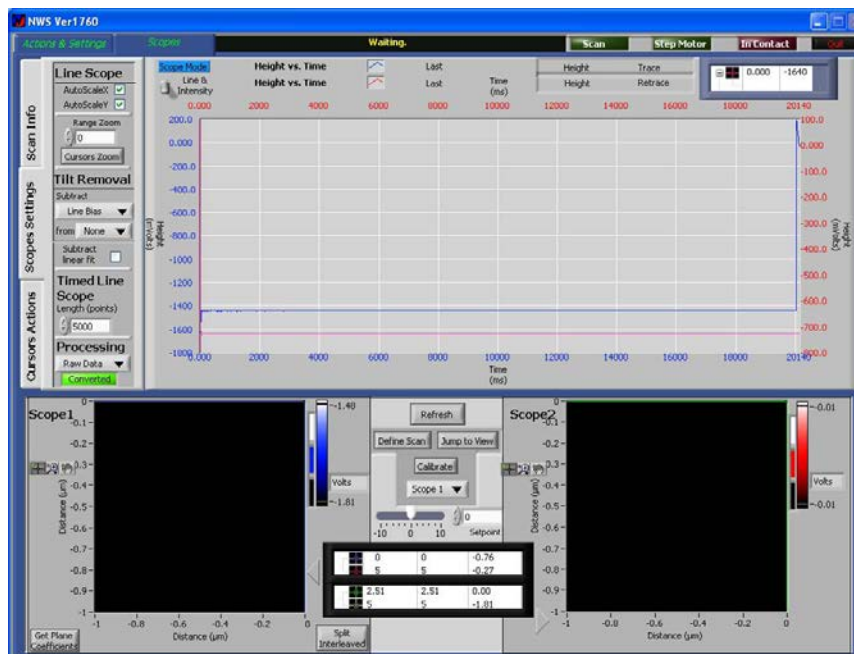


Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

Una vez establecidos estos parámetros se puede comenzar la barradura cliqueando en Start, recordando que antes de comenzar la medida ya debe de estar encendido el detector y las luces del laboratorio principalmente luces de apoyo del equipo apagadas.

5 - Después de presionar Start, aparecerá una ventana NWS de adquisición “ScopeTab”, como muestra la Figura 21.

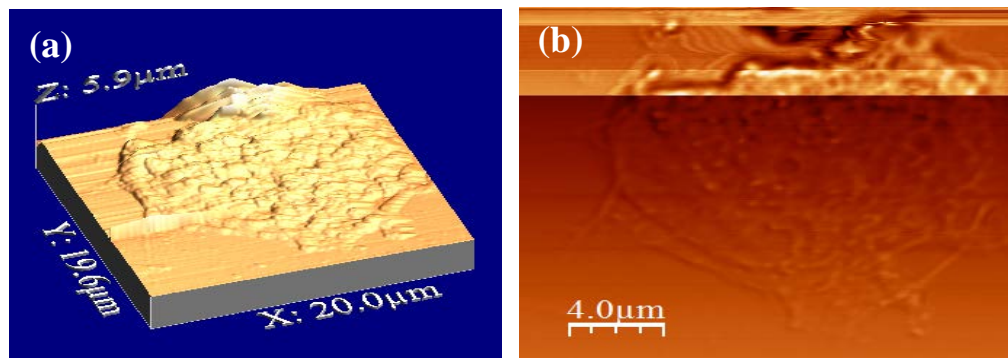
Figura 21 - ScopeTab



Fuente: (NANONICS IMAGING, 2010), adaptada por el autor.

En los cuadros oscuros es donde aparece el progreso de la medida, durante esta etapa es importante considerar que un parámetro importante en el proceso de medición es el “Feedback Gain” que contribuye enormemente para la obtención de las imágenes, está basado en el algoritmo de ganancia PID, mecanismo de retroalimentación muy utilizado en sistemas de control, que básicamente calcula el error entre un valor medido y un valor deseado, consta de tres parámetros distintos: el Proporcional, el Integral, y el Derivativo. El valor Proporcional depende del error actual. El Integral depende de los errores pasados y el Derivativo es una predicción de los errores futuros. La suma de estas tres acciones es usada para ajustar el proceso, posibilitando que la puntera permanezca con las mismas características de configuración iniciales durante todo el proceso de medida, así se evita que la puntera toque demasiado sobre la muestra o que quede muy alejada pudiendo suceder que la medida salga afectada como muestra la Figuras 22 (a) para AFM de baja calidad y (b) Trasmisión con errores de calidad. En este ejemplo el sistema PID no fue correctamente ajustado, influenciado en el Feedback que controla que la distancia Puntera–Muestra sea permanente durante todo el proceso de medición.

Figura 22 - Medidas SNOM con PID sin calibración, resultados simultáneos (a) AFM y (b) transmisión



Fuente: Elaborado por el autor

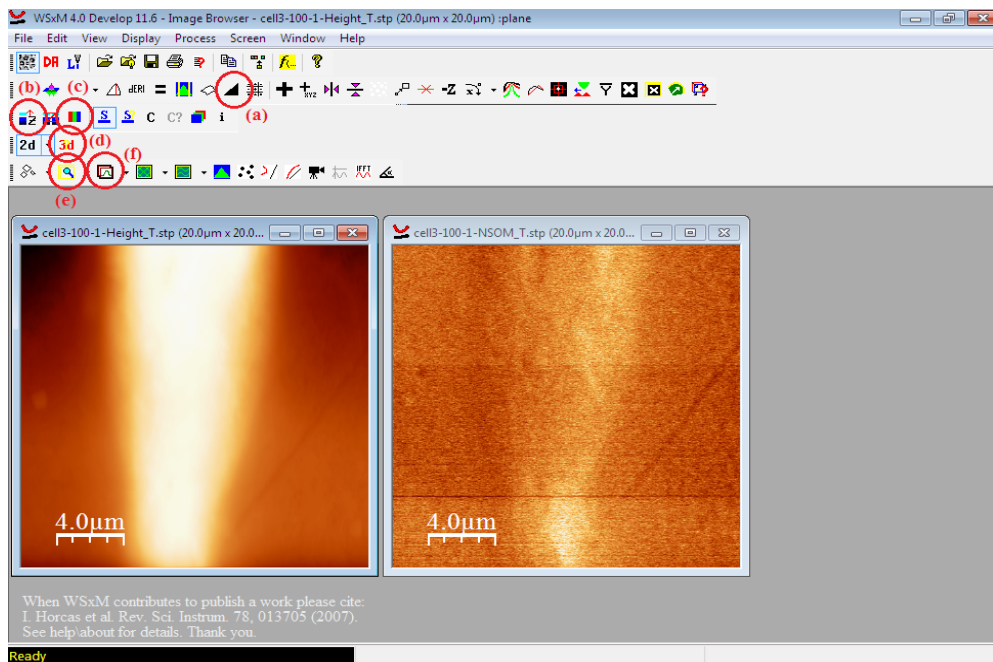
Una vez finalizada la medida, el programa automáticamente sugerirá para guardar la información. Se recomienda previamente apagar el detector y retirar la puntera del contacto. Seguidamente guardar los datos.

3.5.2. Procedimiento de análisis de datos SNOM

Durante la medida de SNOM son registrados dos informaciones importantes: (Height) referido a una medida de AFM y transmisión referido al paso del láser a través de la muestra (SNOM), con las cuales se puede monitorear simultáneamente lo que sucede en cada punto del barrido tanto en la superficie como también en el interior de la célula.

Para realizar el análisis de los resultados, es necesario utilizar un software gráfico WSxM4.0, este proceso es conocido como optimización de imágenes. Entonces se abren ambas informaciones (Height - AFM y NSOM - transmisión) como muestra la Figura 23, y son aplicados diferentes comandos de optimización, los principales comandos están marcados con círculos y nombrados con letras, estos son (a) Flatten filter, (b) Z-scale control, (c) Palette setting, (d) 3-D Setting and preview, (e) zoom - multiple zoom y (f) Profile-multiprofile. Con estos comandos se realiza la optimización de las imágenes, mejorando la resolución y resaltando las regiones de interés tanto de la información de AFM como de la Transmisión (**HORCAS** et al., 2007). Para completar el análisis principalmente los datos de Transmisión, es utilizada la plataforma de análisis matemática Oring7.5.

Figura 23 - Programa de optimización WSxM4.0, círculos rojos indican los principales comandos de optimización.



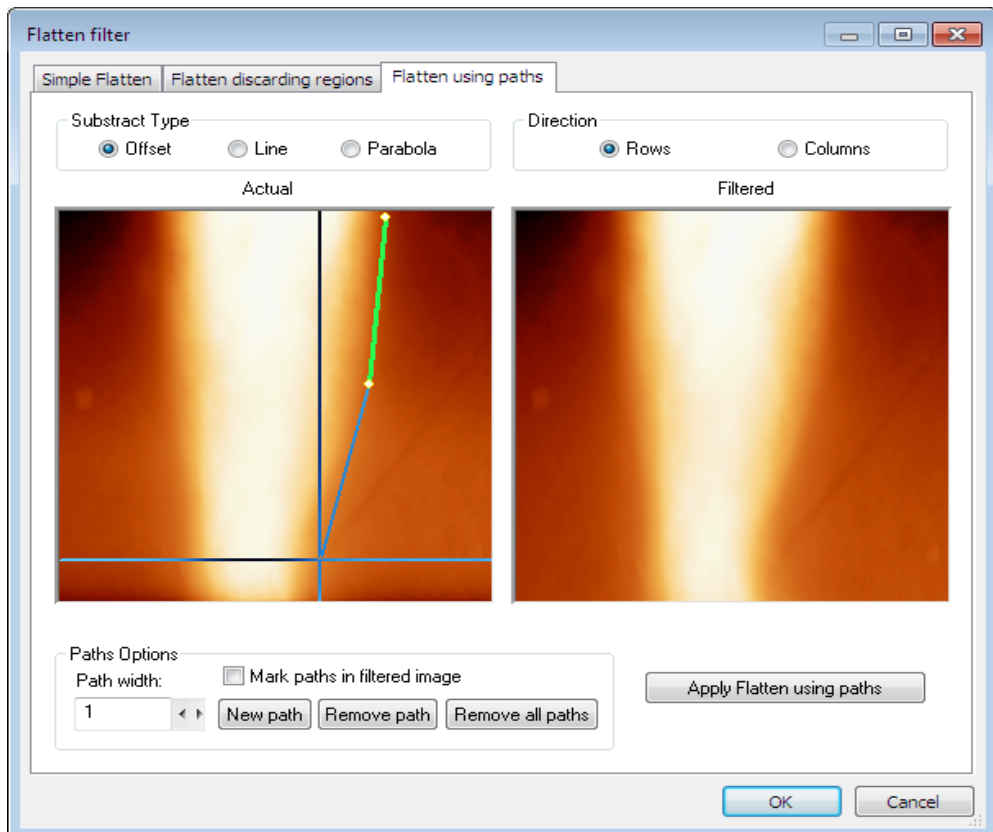
Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

3.5.2.1. Flatten filter

Las imágenes de SNOM pueden presentar ruidos de baja frecuencia. Este ruido puede ser propio del sistema u oscilaciones espontaneas, apreciados como distribución de irregularidades en la imagen, entonces para corregir esas imperfecciones se usa el filtro Flatten, que se encargara de remover este tipo de ruido.

Para hacer esto cliquer en el icono Flatten filter, marcado con círculo rojo (a) de la Figura 23, ahí aparecerá la ventana Flatten filter, como muestra la Figura 24, seguidamente se seleccionan Flatten using paths y New path, así mediante líneas verticales y horizontales son seleccionadas las regiones que serán excluidas, es decir son separados un relieve de otro. Finalmente es seleccionado apply flatten, este procedimiento puede ser realizado varias veces hasta que se consiga obtener una imagen donde se distingan los relieves altos de las depresiones en la imagen.

Figura 24 - Comando Flatten filter

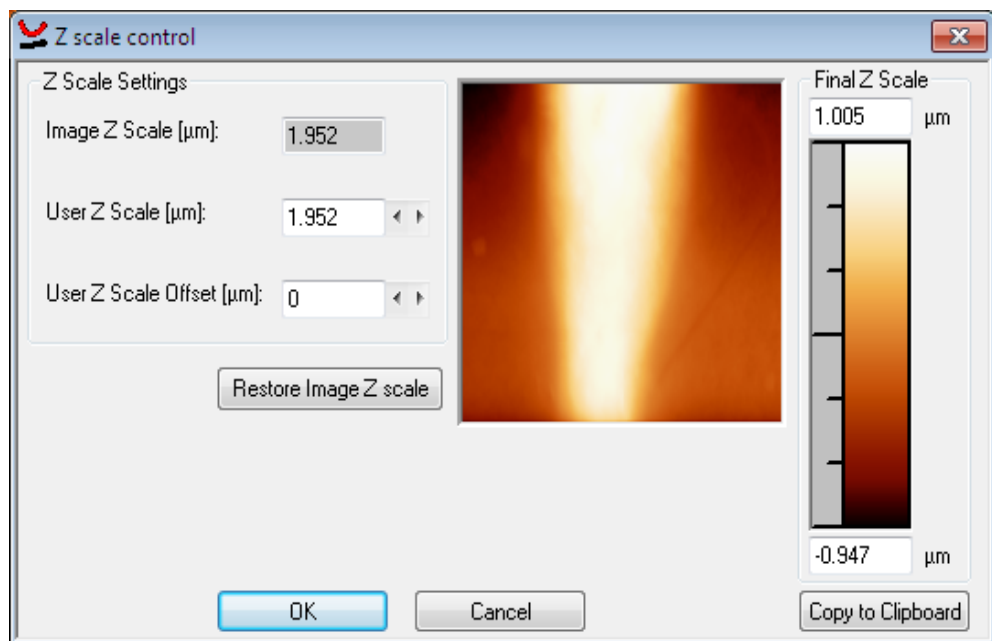


Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

3.5.2.2. Z-scale control

Para mejorar la calidad de la imagen aún más, después de realizar el Flatten filter, se puede aplicar el comando Z-scale control, indicado por el círculo rojo (b) en la Figura 23, seguidamente saldrá la ventana Z scale control, mostrado en la Figura 25, para esto son variados los valores de Z scale/offset.

Figura 25 - Comando Zscale control

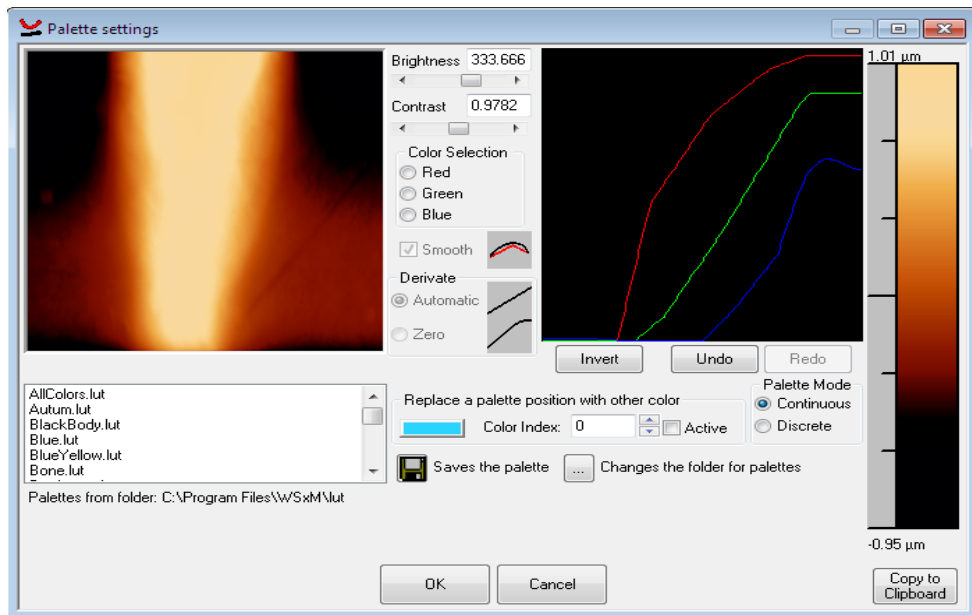


Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

3.5.2.3. Palette setting

Con este comando se da una optimización más completa en la imagen, eliminando imperfecciones producidas por el mal contacto durante la barradura, es decir este comando consigue hacer un tratamiento de la imagen más completo comparado con los otros comandos Flatten filter y Z scale control. Para utilizarlo clicar en el icono indicado por el círculo rojo (c) de la Figura 23, seguidamente aparece la ventana Palette setting, mostrada en la Figura 26. Ahí son variados los valores de Brightness y contrast, de modo que el relieve queda mejor definido.

Figura 26 - Comando Palette setting

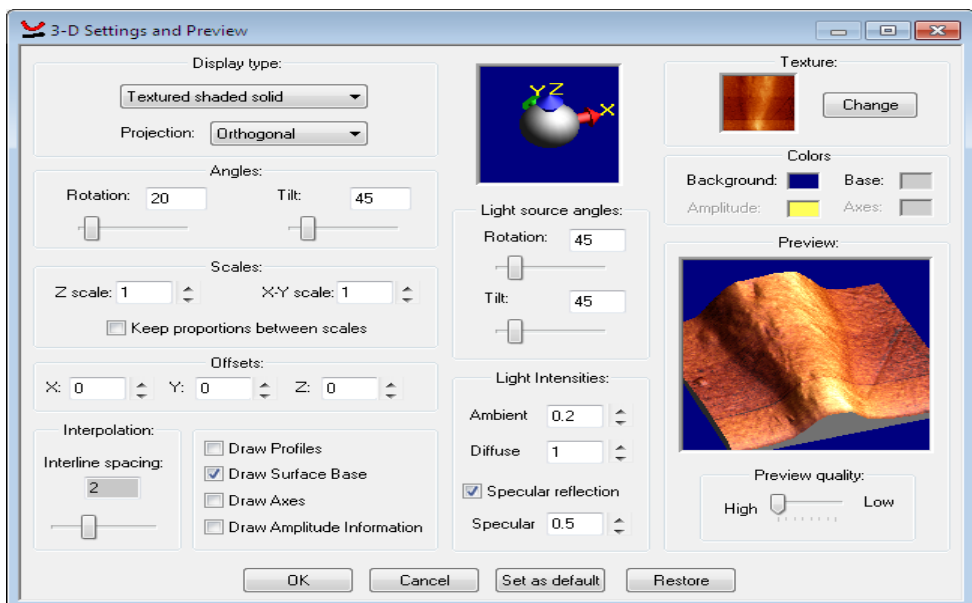


Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

3.5.2.4. 3-D Setting and preview

Con este comando se consigue realizar una imagen 3D que combina los resultados de AFM y Transmisión de modo que la imagen que se aprecia en la Figura 27 es una sobre posición de ambas informaciones.

Figura 27- 3-D setting and preview (Sobre posición AFM-Transmisión)



Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

Con esto se puede saber el comportamiento en cada parte de la célula exactamente en la topografía y en su interior. Para aplicar este comando clicar el icono marcado por el círculo rojo (d) de la Figura 23.

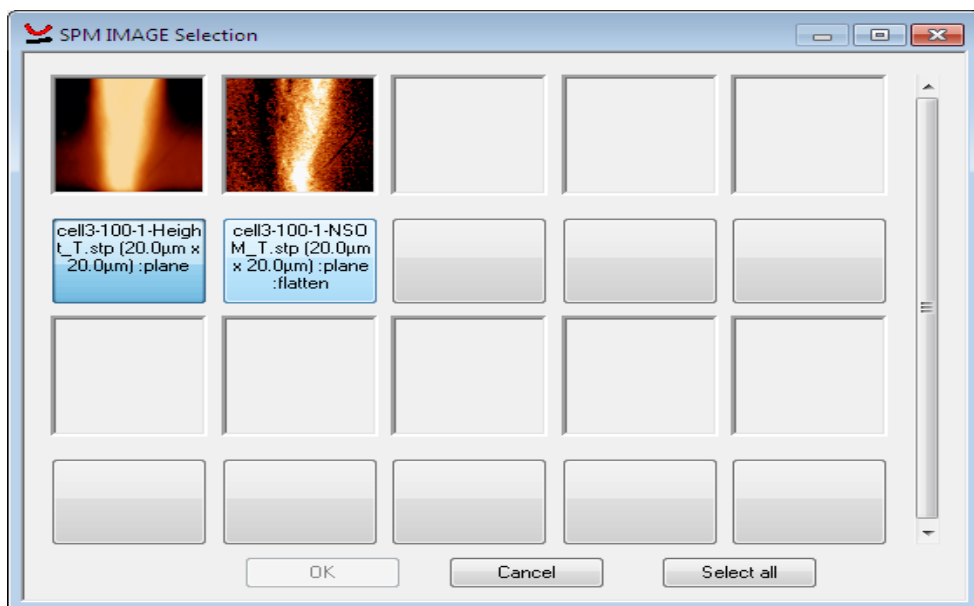
3.5.2.5. Zoom - multiple zoom

Este comando indicado con círculo rojo (e) en la Figura 23, permite seleccionar una o varias áreas simultáneamente para poder realizar un zoom, así se pueden ver con más detalle los comportamientos tanto de superficie como de transmisión.

3.5.2.6. Profile-multiprofile

Con este comando son seleccionadas simultáneamente las imágenes que serán analizadas AFM y Transmisión, para eso es seleccionado el comando Profile-multiple indicado por el círculo rojo (f) en la Figura 23, es decir varios perfiles a ser analizados, entonces aparecerá la ventana SPM IMAGE selection, de la Figura 28, donde se seleccionan las imágenes que serán analizadas.

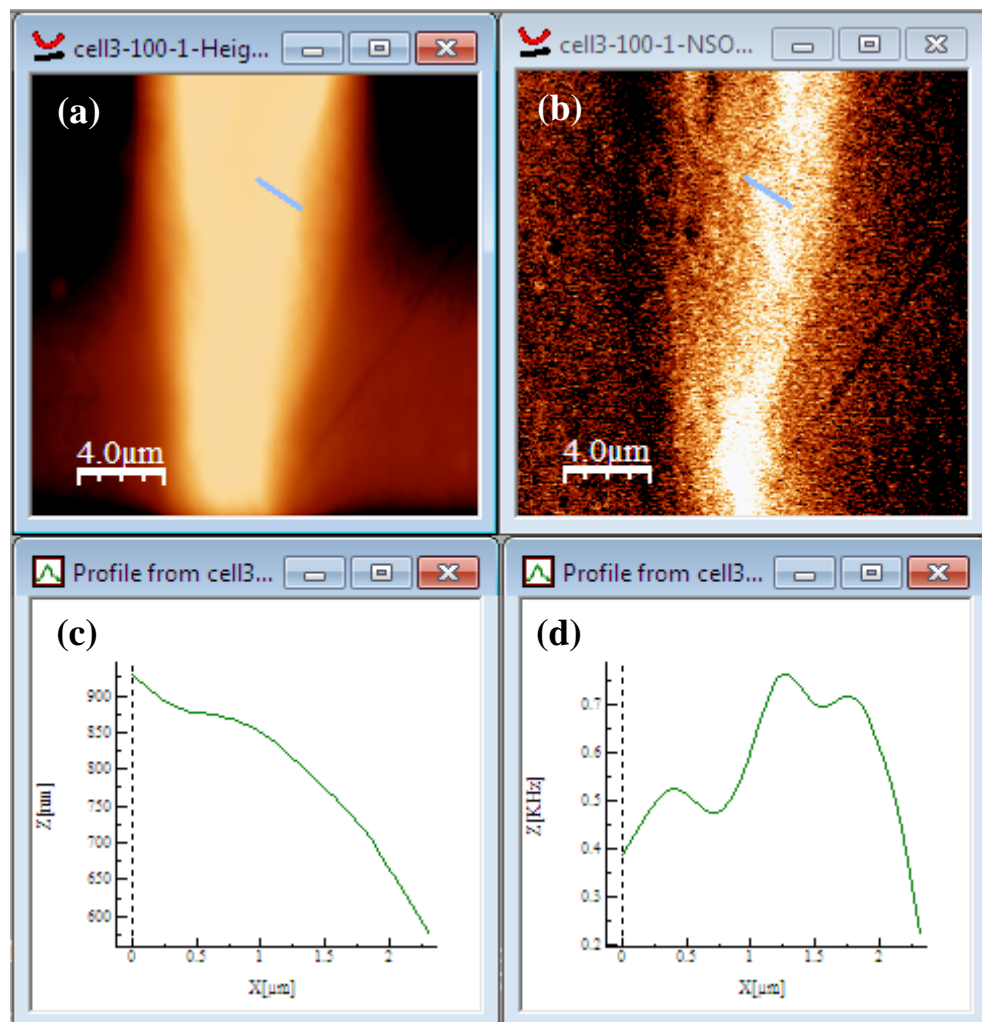
Figura 28 - SPM IMAGE selection, varias imágenes seleccionadas para análisis de perfiles.



Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

Seguidamente aparecerán los perfiles respectivos a cada imagen, donde se puede establecer el tamaño de perfil que será analizado como muestra la Figura 29 (a) AFM y (b) Transmisión, donde se ven las líneas marcando la región que será analizada. En la Figura 29 (c) es mostrado el correspondiente perfil topográfico, Altura (nm) Vs longitud (μm) y en (d) el perfil de transmisión, Señal transmitida (KHz) Vs longitud (μm), ambas informaciones indican el comportamiento de la sección transversal y de transmisión respectivamente.

Figura 29 - Aplicación del multiprofile, (a) AFM sección transversal marcada por una línea, (b) transmisión correspondiente a la misma región analizada en el AFM, (c) y (d) Perfiles topográfico y de transmisión correspondientes a la línea indicada en (a) y (b) respectivamente.



Fuente: Elaborado por el autor, Programa WSxM4.0

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

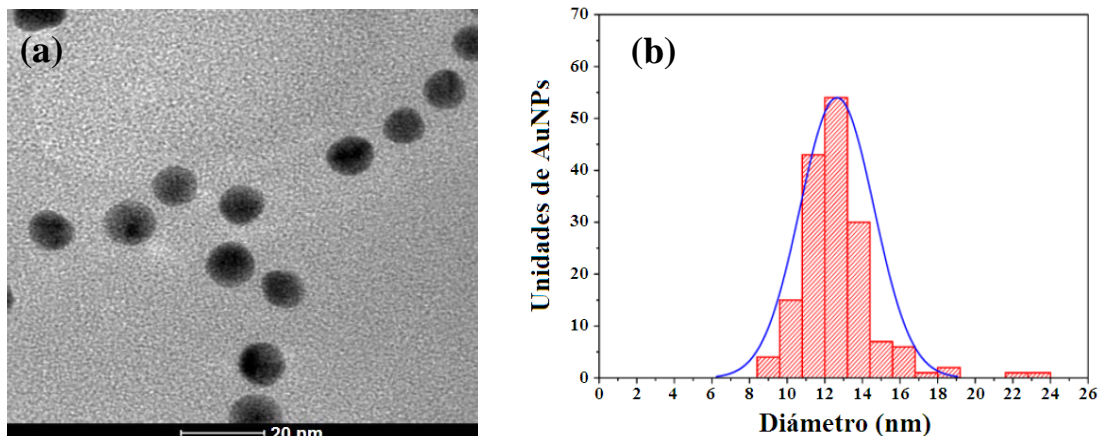
4.1. Caracterización de las nanopartículas de oro

Para este estudio las AuNPs utilizadas fueron elaboradas con el mismo patrón que en el estudio de Barreto (**BARRETO** et al., 2015), pues necesitan tener un tamaño específico con las mismas características que las utilizadas en el tratamiento de alergias inflamatorias.

Las AuNPs utilizadas para este estudio fueron sintetizadas en el Laboratorio de Polímeros y Coloides de la Universidad Federal de Santa María (UFSM-Brasil), con la supervisión del Dr. Cristiano Giacomelli y la caracterización de las AuNPs fue realizada en los laboratorios del Instituto de Física da Universidad Federal de Alagoas, Grupo OPTMA-UFAL-Brasil, con la supervisión del Dr. Jandir M. H. determinándose la morfología y diámetro medio, utilizando imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET). El histograma de la distribución del tamaño de las nanopartículas en la solución coloidal fue obtenido midiendo 500 partículas seleccionadas al azar en las imágenes de MET (Figura 30(a)), esto demostró que la dispersión de las AuNPs son estables y esféricas con diámetro medio de 13 nm, apropiado por ser biocompatibles, con banda de resonancia de plasmones superficiales entorno de 520 nm (**BERRY**, 2009).

El espectro de absorción de NPs metálicas presenta una intensa banda alargada en la región del espectro visible, no encontrada en metales de grandes tamaños. Dicha banda es debido al efecto de resonancia de plasmones de superficie que aparece debido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción en respuesta a una excitación óptica (**LINK** and **EL-SAYED**, 1999) .

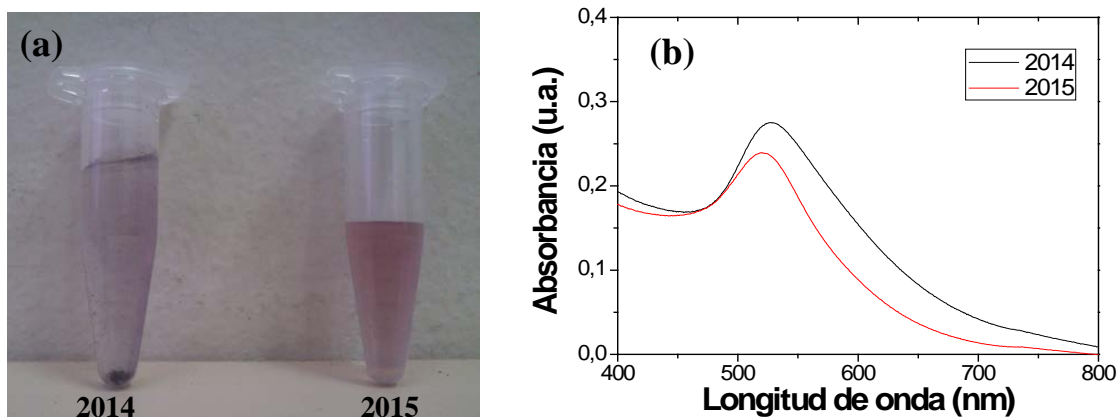
Figura 30 - Caracterización de las AuNPs en solución acuosa. (a) Imágenes MET de las AuNPs esféricas y en (b) histograma del diámetro de las AuNPs.



Fuente: (BARRETO et al., 2015).

En la Figura 31 (a) son comparadas dos muestras coloidales de AuNPs, ambas muestras fueron fabricadas del mismo modo pero en diferentes años (2014 y 2015).

Figura 31 – (a) muestras coloidales de AuNPs y (b) respectivo espectro UV-Vis.



Fuente: Elaborado por el autor

A simple vista se nota que AuNPs estables (2015) presentan una coloración roja correspondiente a AuNPs estables, por otro lado las muestras que fueron elaboradas un año atrás (2014), ahora presentan una tonalidad azulada, esto debido a que estas nanopartículas estuvieron por mucho tiempo guardadas y con el tiempo se generaron aglomeraciones, aumentando su tamaño, haciendo que la banda de absorción se desplace hacia longitudes de onda mayores, como se puede ver en las respectivas bandas de absorción mostradas en la Figura 31 (b), para AuNPs estables en entorno de 520 nm (curva roja) y para AuNPs aglomeradas (curva negra), la banda

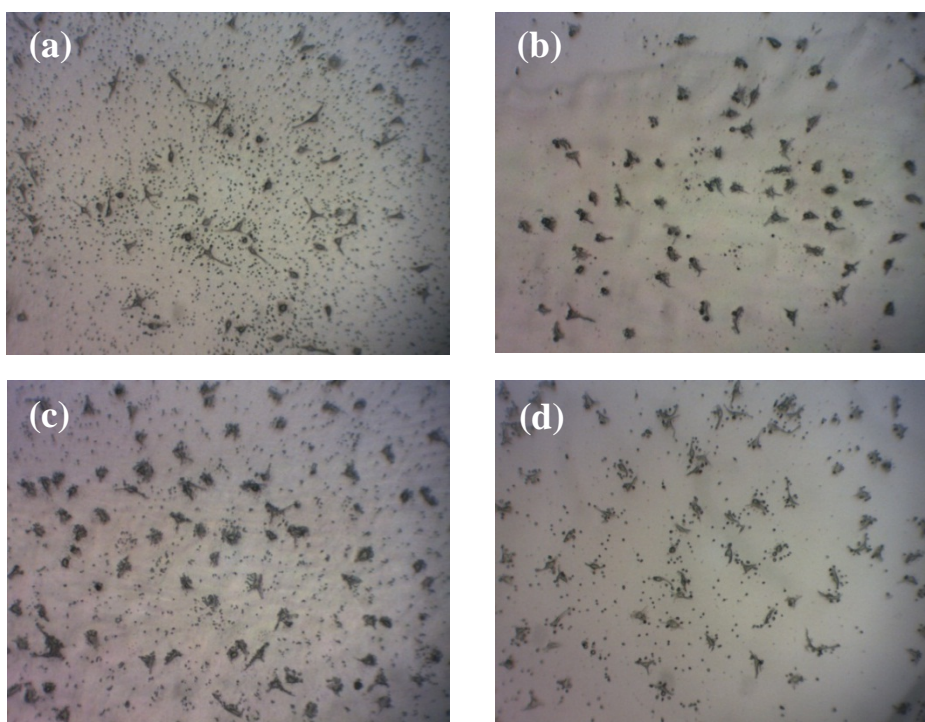
fue desplazada para 530 nm (**MELO JR** et al., 2012, **DANIEL** and **ASTRUC**, 2004). Para este caso grandes aglomeraciones son perjudiciales (toxicas), cuando interactúan con material vivo (**BARRETO** et al., 2015).

Estos espectros de absorción fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS-NIR 3600, en rango de longitud de onda entre 400 nm a 800 nm, con pasos de 0,5 nm, colectados por un computador con software Shimadzu, análisis de datos y gráficos tratados mediante el programa OriginPro8.

4.2. Muestras - Cultivo celular con nanopartículas de oro

Con la finalidad de hacer un estudio comparativo, fueron elaborados dos tipos de muestras: Tratadas (Células con AuNPs) y Puras (Células sin AuNPs). Durante este proceso fueron elaboradas muestras adicionales con el fin de mejorar las condiciones ópticas y obtener una mejor señal de transmisión SNOM, mostradas en las figuras 32 a-d.

Figura 32 - Primeras muestras, Pura (a) y tratadas en diferentes concentraciones de AuNPs (b) 10 ng/ml, (c) 100 ng/ml e (d) 1000 ng/ml de AuNPs.

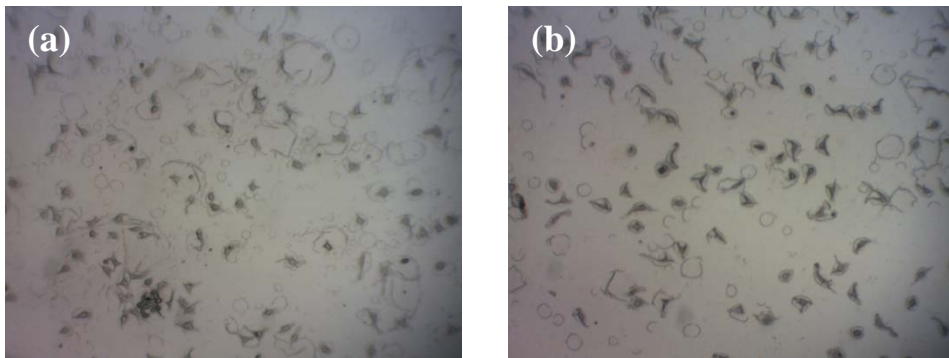


Fuente: Elaborado por el autor

Las primeras muestras presentaron algunas dificultades en el momento del cultivo, como muestran las Figuras 32 a-d, obtenidas mediante microscopía óptica simple, se puede ver que en (a) una muestra Pura y Tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs en (b) 10 ng/ml, (c) 100 ng/ml y (d) 1000 ng/ml, en todos los casos las muestras presentan partículas adicionales, posiblemente suciedad que impedía la realización de la medición SNOM.

Para corregir esto las muestras fueron lavadas con PBS y secadas durante un tiempo apropiado (~30'-1h), con esto aparentemente mejoraron la calidad óptica como se muestran en las Figuras 33(a) Puras y (b) Tratadas a 1,000 ng/ml de AuNPs.

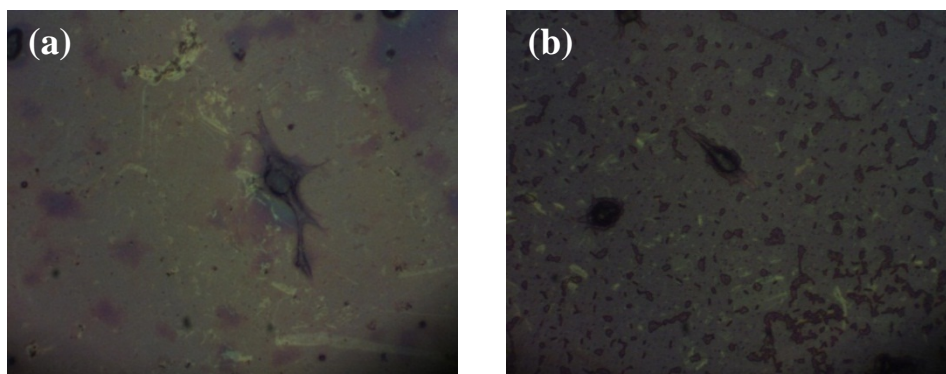
Figura 33 - Muestras lavadas con PBS (a) Pura (b) Tratada 1000 ng/ml de AuNPs.



Fuente: Elaborado por el autor

El lavado mejoró la apariencia, pero produjo que la puntera se trabara con la muestra durante la medición SNOM, entonces posteriormente para mejorar la visualización fue utilizado colorante, como muestran las Figuras 34 (a) Pura y (b) Tratadas con 1000 ng/ml de AuNPs.

Figura 34 - Muestras con colorantes (a) Pura y (b) Tratada 1000 ng/ml de AuNPs.

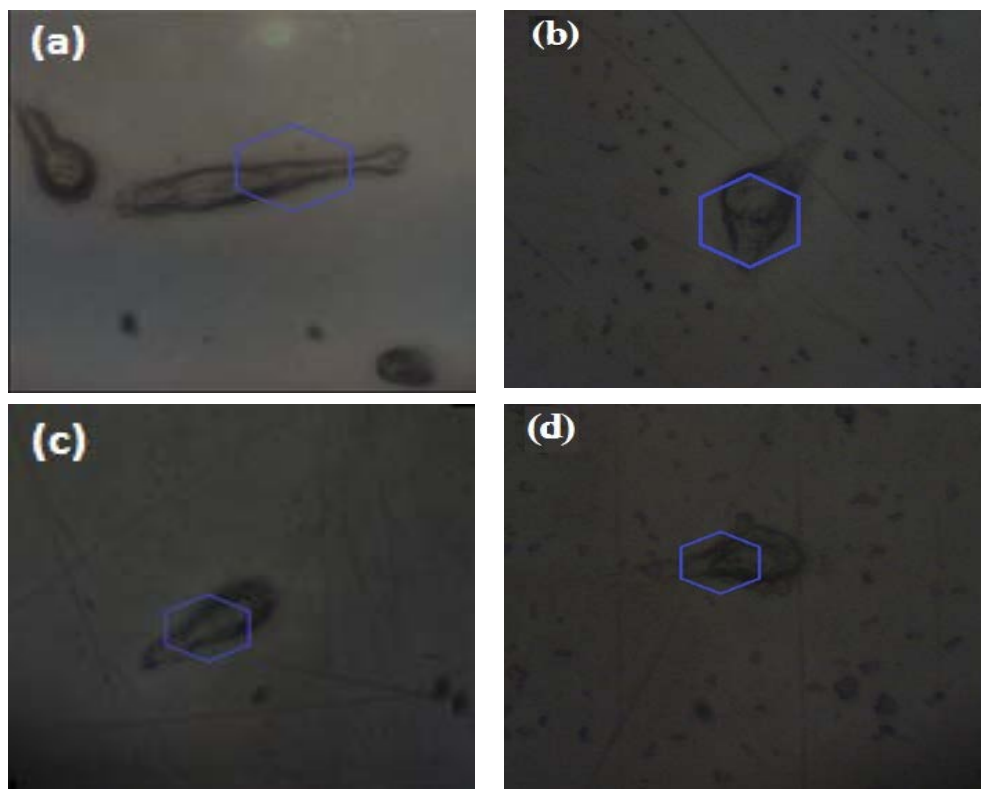


Fuente: Elaborado por el autor

Focalizando el microscopio se puede observar que nuevamente hay un problema pues las células han mejorado la apariencia en cierta medida, pero no permiten el paso del haz láser (SNOM) a través de ellas, debido a que están oscuras.

Finalmente, el proceso de cultivo y preparación de las muestras fue mejorado, siguiendo rigurosamente los patrones establecidos para cultivo celular, como fue explicado en el capítulo III (**BARRETO** et al., 2015), así las muestras presentaron una mejora considerable en la apariencia y limpieza posibilitando el paso del haz láser (SNOM) a través de ellas, como muestran las Figuras 35 (a) Pura y Tratadas en (b) 10ng/ml, (c) 100 ng/ml y (d) 1000 ng/ml. Los hexágonos en azul muestran la región que será analizada.

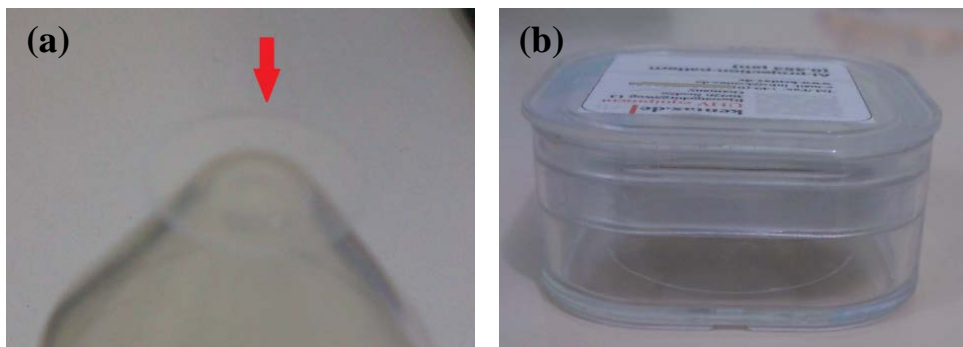
Figura 35 - Muestras apropiadamente preparadas, sin AuNPs (Puras) (a) y Tratadas en diferentes concentraciones de AuNPs (b) 10 ng/ml, (c) 100 ng/ml y (d) 1000 ng/ml de AuNPs.



Fuente: Elaborado por el autor

La Figura 36 (a) la flecha roja indica una de las muestras utilizada en este trabajo de tesis (lámina de vidrio conteniendo cultivo celular), esta es colocada en un pote de protección para impedir la proliferación de hongos u otros contaminantes propios del medio externo como muestra la Figura 36 (b).

Figura 36 - (a) Muestra utilizada y (b) Muestra dentro del pote de protección



Fuente: Elaborado por el autor

4.3. Medidas de SNOM: Análisis de imágenes de Topografía y Transmisión en los cultivos celulares

Se sabe que las células tienen la capacidad de absorber materiales externos a través del mecanismo de endocitosis, durante este proceso una pequeña porción de la membrana celular invagina para formar una vesícula que englobará sustancias exteriores, lo que permite el transporte de sustancias externas para el interior de la célula (KARP, 2005, WILHELM et al., 2002). El proceso de captación celular de nanopartículas metálicas mediante receptor es inducido por proteínas presentes en la membrana celular que se adhieren en la superficie de las AuNPs (LYNCH, 2007), así las NPs quedan internalizadas y agrupadas en aglomerados o *Clusters*, esto se debe a que antes de ser absorbidas estas generan pequeñas aglomeraciones que se adhieren a las células (JIN et al., 2009, CHITHRANI et al., 2006, WILHELM et al., 2003).

En este trabajo de tesis es de importancia que suceda la captación de las nanopartículas de oro (AuNPs), es decir confirmar que las nanopartículas de oro ingresan dentro de la célula. Por tanto se estudian las interacciones Célula-AuNPs con microscopía óptica de campo cercano (SNOM) en la configuración a modo transmisión, donde principalmente se analizan los resultados simultáneos de topográfica e imagen óptica de transmisión en campo cercano (HECHT et al., 2000).

Por un lado en la topografía de la superficie celular se estudia la interacción Célula-Nanopartículas como si fuera una medida de AFM, por otro lado en la transmisión a través de la célula, se analiza las heterogeneidades de la transmisión que indica la ubicación espacial de las AuNPs dentro de la célula, después de haber sido absorbidas (**PAWLEY**, 2006, **ZHANG** et al., 2012, **SCHMID** et al., 2013, **EZUGWU** et al., 2015).

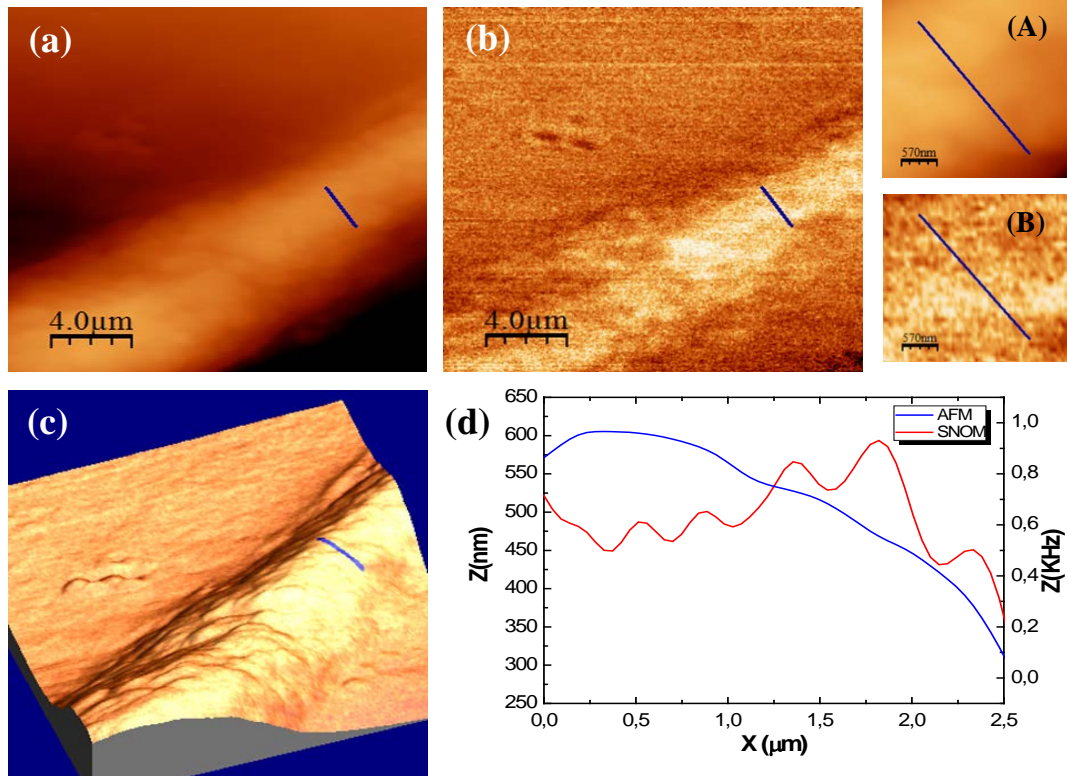
Para la realización de medidas SNOM apropiadas, inicialmente se realiza una medida de microscopía simple, como mostraron las Figuras 35 a-d, confirmando la transparencia y limpieza de las muestras, seguidamente se alinea el sistema, para luego realizar las diversas medidas de microscopía óptica de campo cercano en el modo de transmisión, a continuación son mostrados algunos de los resultados.

4.3.1. Muestras Puras (No tratadas)

Inicialmente fueron medidas muestras Puras (sin tratamiento con AuNPs), el análisis de estas muestras mostró que no hay restos de ningún material en la superficie, pues de lo contrario estos serían atraídos por la puntera e impediría continuar la barradura como muestra la imagen de topografía de la Figura 37 (a).

En la imagen óptica debido a la transmisión SNOM en la Figura 37 (b) se ve que no presenta regiones oscuras prominentes, es decir el haz láser atravesó la muestra sin dificultad (**ZHANG** et al., 2012). En las Figuras 37 (a) y (b) correspondientes a la misma región celular. Se considera una sección de la célula para ser analizada, marcada con una línea azul, estas regiones son ampliadas y mostradas mediante un zoom en las Figuras 37 (A) y 37 (B), se ve que ambas regiones no presentan manchas oscuras, es decir tanto en la superficie como dentro de la célula no hay material extra que se interponga durante la medida. En la Figura 37 (c) se muestra una imagen 3D que combina la topografía e imagen de transmisión, se puede ver que no presenta imperfecciones o regiones oscuras, esto es debido a que esta célula no fue tratada con AuNPs, por tanto la luz pasa a través de ella sin muchas alteraciones.

Figura 37 - Colección simultánea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales no tratadas, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) imagen 3D, combinando los datos topográficos y de transmisión de campo cercano, (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico y perfil de intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.

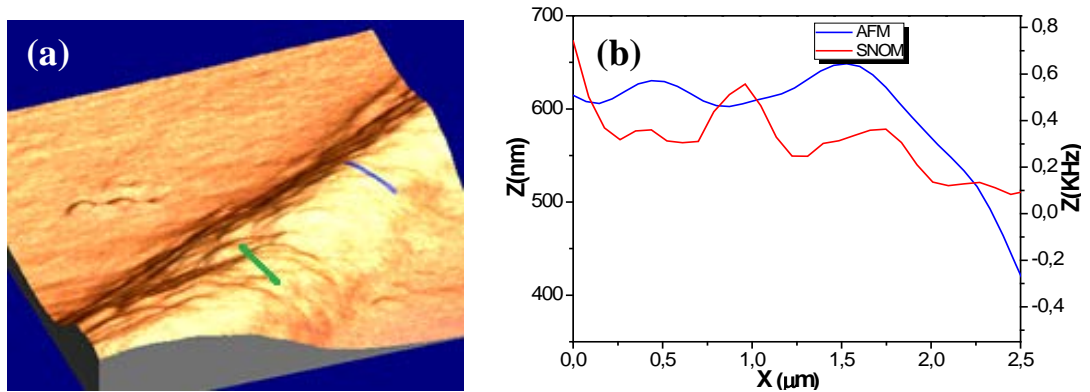


Fuente: Elaborado por el autor

Se Sabe que esta es una célula pura por tanto ningún material se interpondrá entre el haz láser y la célula o el haz láser y el detector, apenas pueden suceder pequeñas oscilaciones en la señal captada debido a la célula u oscilaciones propias del sistema. Para poder analizar de un modo más preciso si sucede absorción del haz láser por algún material que no sea la célula, es decir si el haz láser sufre absorción cuando pasa a través de la célula, en la Figura 37 (d) es formado un diagrama que indica la sección topográfica (AFM) con curva azul y perfil de intensidad transmitida (SNOM) con curva roja correspondientes a las regiones marcadas por las líneas en las Figuras 37 (a) y (b). Aquí la topografía no presenta cambios abruptos y la intensidad transmitida no presenta caídas de intensidad significativas, apenas muestra oscilaciones propias del sistema, confirmando así la pureza de la célula (ZHANG et al., 2012).

En la Figura 38 (a) se analiza otra región de la imagen 3D en esta célula pura, marcada por una línea verde, como se puede ver en el análisis de la Figura 38(b), la sección topográfica (curva azul) no presenta cambios abruptos y el perfil de intensidad transmitida (curva roja) no presenta caídas de intensidad significativas, solo oscilaciones.

Figura 38 - (a) Combinación de los datos topográficos y de transmisión. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfica e intensidad transmitida



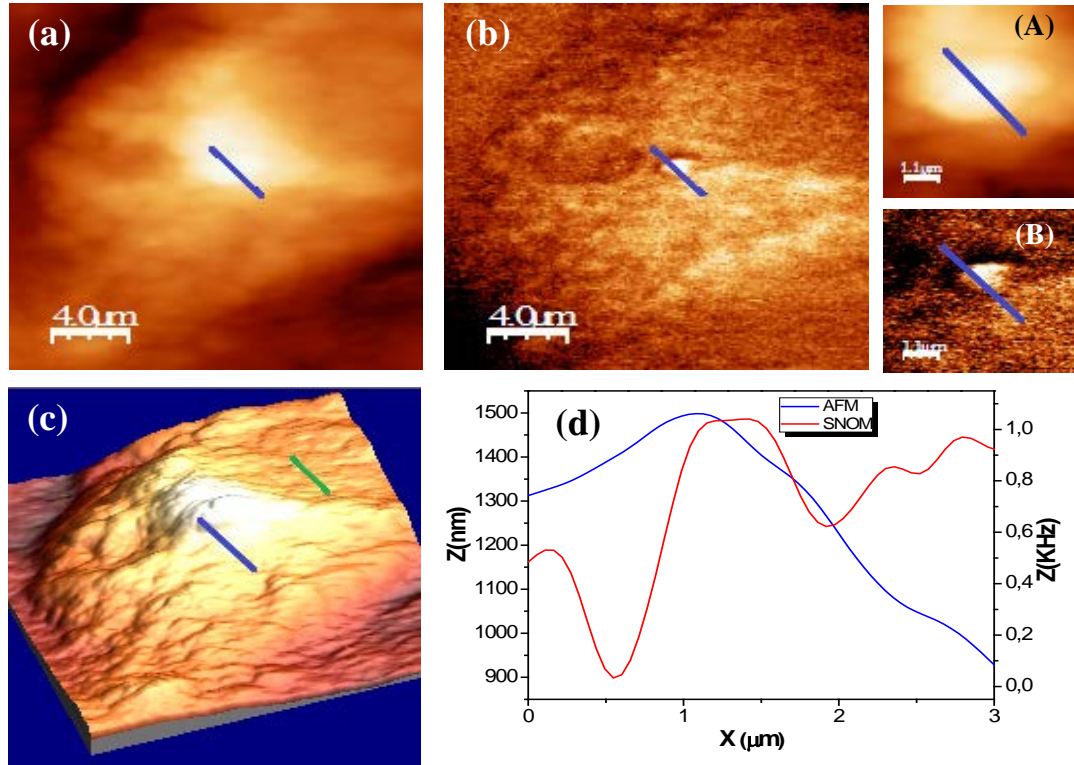
Fuente: Elaborado por el autor

Por tanto, en una muestra no tratada, es decir sin nanopartículas de oro, no hay presencia de algún material tanto fuera como dentro de la célula. Estos resultados eran esperados pues esta es una muestra no tratada y no debe de tener ningún material que impida el paso del láser hasta el detector (ZHANG et al., 2012, SCHMID et al., 2013).

4.3.2. Muestras tratadas con 10 ng/ml de AuNPs

Ahora se analizan las muestras con cierta concentración de AuNPs (10ng/ml), en la Figura 39 (a) es mostrada una región de la superficie celular (Topografía), analizando esta imagen se puede ver que no tiene algún tipo de aglomeración de AuNPs, es decir no hay AuNPs presentes en la superficie, pues también durante la preparación las células son lavadas y las AuNPs que podrían estar en la superficie son retiradas, si en caso todavía hubiese quedado algunas AuNPs, estas quedarían atrapadas en la puntera y la medida tendría que ser realizada nuevamente.

Figura 39 - Colección simultánea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 10 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) imagen 3D, combinando los datos topográficos y de transmisión de campo cercano, (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico y perfil de intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.



Fuente: Elaborado por el autor

A continuación se examina el interior de la célula, esto es mediante la transmisión mostrado en la Figura 39 (b), se puede ver que la imagen óptica presenta ciertas regiones oscuras, esto indica que estas regiones pueden estar absorbiendo el haz láser, por tanto esto se ve en la imagen como manchas oscuras, un tipo de patrón óptico típico cuando las células captaron nanopartículas metálicas (HECHT et al., 2000, ZHANG et al., 2012). En este caso por ser una muestra con baja concentración de AuNPs, es de esperar poca presencia de estas.

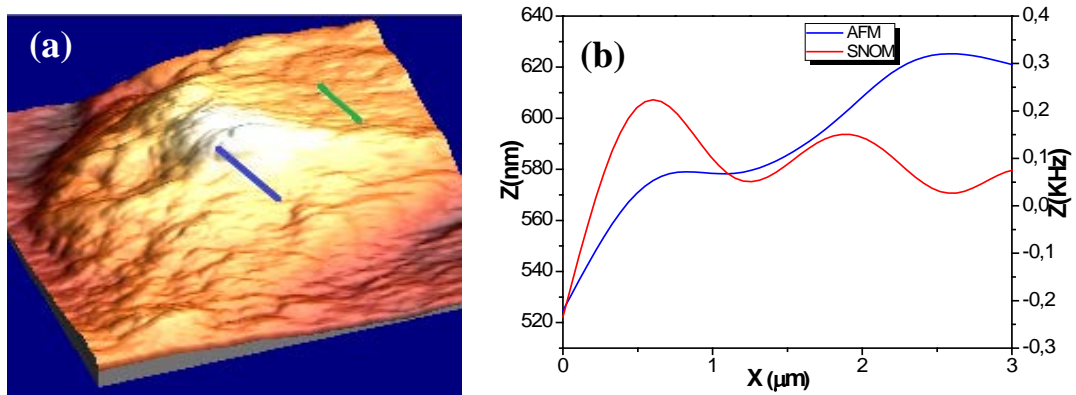
Se Marca una línea azul, tanto en la topografía (a) como en la imagen óptica (b), para poder realizar un análisis más preciso en toda la extensión de la línea. Se vio que en la topografía no había alguna imperfección en esta región, pero en la imagen óptica aparecieron unas manchas. Para poder observar mejor las regiones marcadas en las Figuras 39 (a) y 39 (b), es mostrado un zoom en la Figura 39 (A) topografía y 39 (B) transmisión respectivamente.

La Figura 39 (c) se muestra una imagen 3D que combina la topografía e imagen óptica de transmisión, en esta Figura también está marcada la región de análisis con línea azul y adicionalmente se analiza otra “región clara” marcada por una línea verde, para comparar ambas regiones.

En la Figura 39(d), se muestra la sección topográfica (AFM) en azul y perfil de intensidad transmitida (SNOM) en rojo, se puede observar que mientras en la sección topográfica no hay cambios abruptos por otro lado en la intensidad transmitida hay caídas significativas de intensidad, esto indica que de hecho el haz láser está siendo interrumpido por presencia de AuNPs en estas regiones.

Para completar el análisis en la Figura 40 (a) se analiza la sección marcada por la línea verde en esta misma célula. En este caso esta región no presenta manchas, es decir no hay presencia de AuNPs, para demostrar esta afirmación en la Figura 40 (b) se observan las respectivas señales de la sección topográfica (AFM) en azul y perfil de intensidad transmitida (SNOM) en rojo, ahí se puede ver que la topografía es limpia, no presenta irregularidades y en la transmisión no hay caídas de intensidad, apenas oscilaciones propias debido a la interacción del sistema con la célula (ausencia de AuNPs) (HECHT et al., 2000, ZHANG et al., 2012). Por tanto las caídas de intensidades registradas anteriormente en la Figura 39 (d) son debido a la presencia de las AuNPs en el interior de la célula.

Figura 40 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.



Fuente: Elaborado por el autor

4.3.3. Muestras tratadas con 100 ng/ml de AuNPs

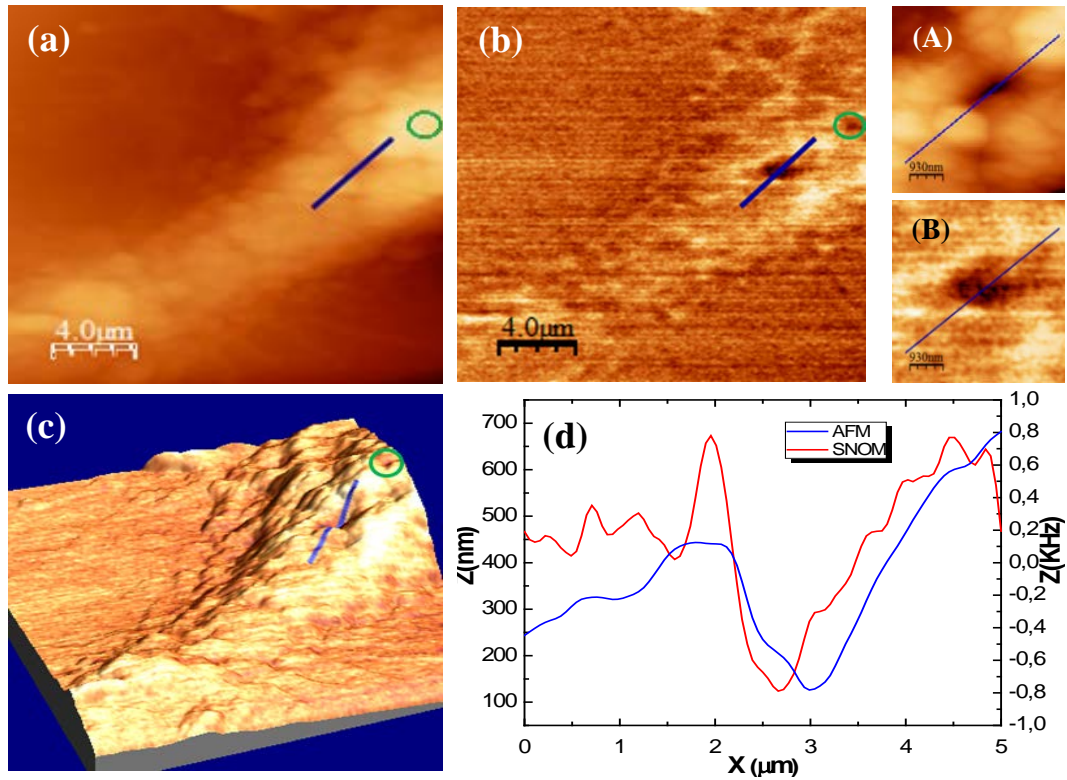
En la Figura 41 (a) se muestra una imagen de la topografía celular para una muestra tratada con concentración mayor (100 ng/ml de AuNPs), se observa que no hay distorsiones en la superficie es decir sin posibles aglomeraciones de AuNPs. Por otro lado analizando la transmisión óptica de campo cercano de la Figura 41 (b), se puede ver que hay regiones claras y puntos o manchas oscuras, una de estas manchas es marcada con una línea azul para análisis, también se identifica otra región con mancha oscura (identificada con círculo verde), como ya fue mencionado antes, estas manchas oscuras son un tipo de patrón óptico típico cuando las células captaron nanopartículas (**HECHT** et al., 2000, **ZHANG** et al., 2012).

Para poder observar con más detalle, se hace un zoom de la región marcada (línea azul) en ambas Figuras, 41 (A) correspondiente a la topografía y la Figura 41 (B) para la transmisión óptica, ahí se puede ver que ambas figuras presentan una mancha, por un lado en la topografía esta mancha es una depresión que puede haber sido generada durante el proceso fagocítico o por la interacción de la propia puntera, por otro lado la transmisión muestra una mancha indicando que hay presencia de AuNPs (**ZHANG** et al., 2012).

En la Figura 41 (c) es mostrada una imagen 3D que combina la topografía e imagen óptica de transmisión, en esta Figura es identificada una mancha (círculo verde) y también está marcada la región para análisis (línea azul).

En la Figura 41 (d), los diagramas de sección topográfica (AFM) en azul y perfil de intensidad transmitida (SNOM) en rojo, permite analizar si sucedieron procesos de absorción, por un lado se puede ver que la topografía presenta una depresión que puede ser atribuido a la acción de la puntera con la célula o principalmente al proceso de absorción que genera un tipo de depresión en la membrana celular, por otro lado la intensidad transmitida indica que en esta región hay presencia de AuNPs, pues la caída de la intensidad es considerable, por tanto aquí también está habiendo una interrupción del paso del haz del láser a través de la célula (**ZHANG** et al., 2012, **SCHMID** et al., 2013).

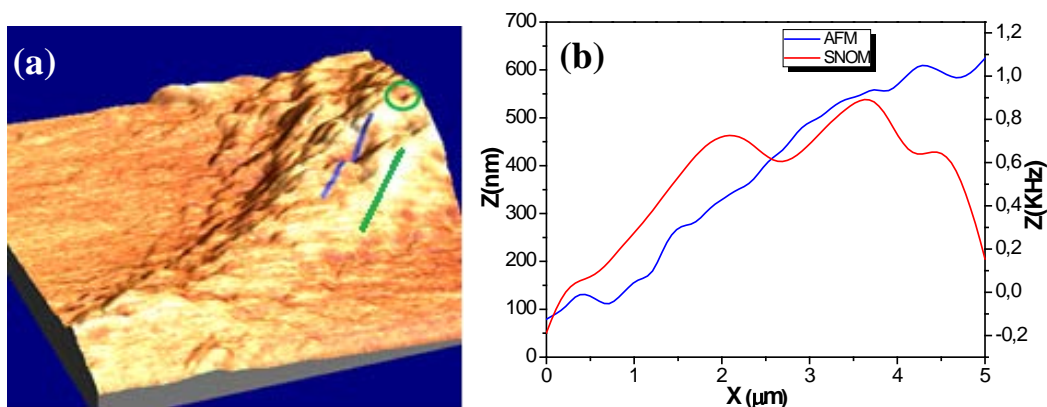
Figura 41 - Colección simultánea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 100 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A y B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) combinación de los datos ópticos topográficos y de transmisión de campo cercano. (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfica e intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul.



Fuente: Elaborado por el autor

Complementando el análisis en la Figura 42 (a), se selecciona otra region sin manchas (línea verde), se puede ver que esta región no presenta ninguna mancha oscura y observando las respectivas señales de sección topográfica (curva azul) y perfil de intensidad transmitida (curva roja) de la Figura 42 (b), se puede ver que la topografía no presenta irregularidades y la transmisión no muestra caídas de intensidad, apenas oscilaciones del sistema (HECHT et al., 2000), por tanto las caída de intensidad registradas anteriormente en la Figura 41 (d) son debido a la presencia de las AuNPs en el interior de la célula, confirmando una vez más que sucedió absorción de AuNPs en aquellas regiones oscuras (ZHANG et al., 2012, HECHT et al., 2000).

Figura 42 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.



Fuente: Elaborado por el autor

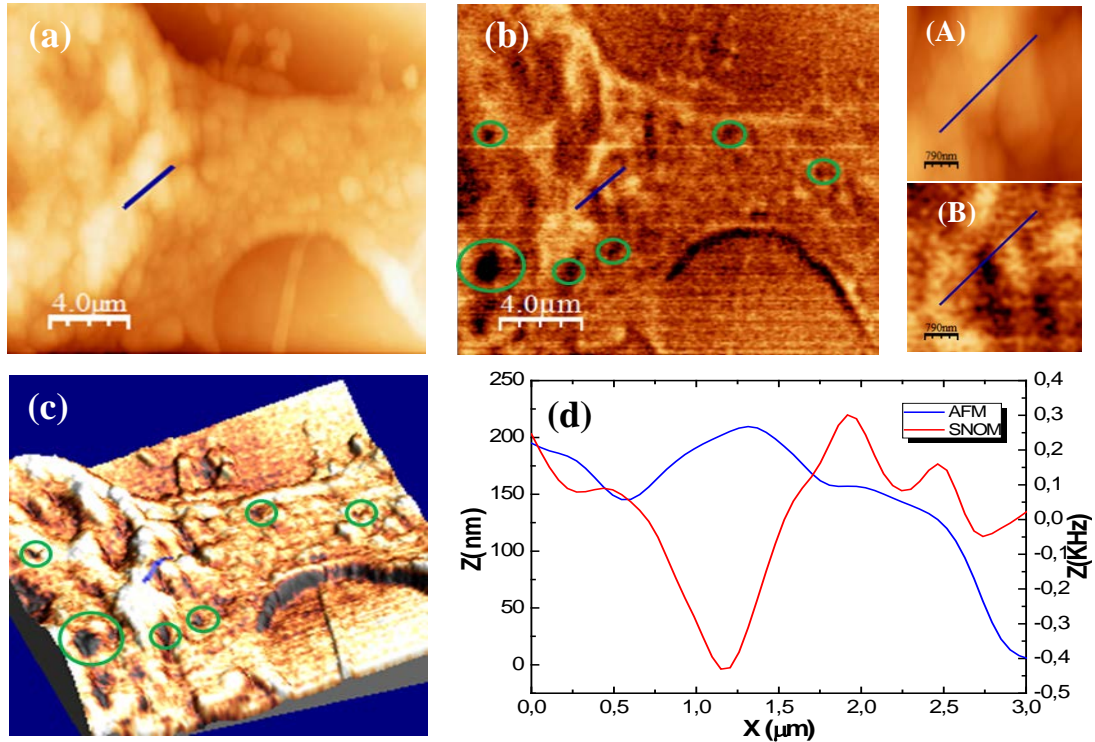
4.3.4. Muestras tratadas con 1000 ng/ml de AuNPs

Para células tratadas con elevada concentración de AuNPs (1000 ng/ml), se muestra la imagen topográfica en la Figura 43 (a) se puede ver que no presenta aglomeraciones o alguna distorsión superficial, es decir tiene una superficie limpia.

En la transmisión óptica de campo cercano de la Figura 43 (b), existen muchas regiones con presencia de manchas o puntos oscuros, debido a la mayor concentración de AuNPs, esto indica que la luz es absorbida en estas regiones debido a la presencia de AuNPs en el interior de la célula. Como ya fue visto antes estas manchas son un patrón óptico típico cuando hay presencias de AuNPs (ZHANG et al., 2012, JIN et al., 2009). A continuación es marcada una línea azul en una de estas regiones oscuras para análisis y algunas de las otras manchas son destacadas con círculos verdes. Se puede ver que estas manchas no eran perceptibles en la topografía, es decir no hay AuNPs en la superficie pues las AuNPs están dentro de la célula como muestran las Figuras 43 (A) y 43 (B), con los respectivos zooms de estas regiones en la topografía y transmisión respectivamente.

La Figura 43 (c) muestra una imagen 3D producto de la combinación de la topografía e imagen óptica de transmisión, en esta Figura también se ven e identifican las regiones con manchas.

Figura 43 - Colección simultánea de medidas SNOM transmisión en las células peritoneales tratadas con 1000 ng/ml, en (a) imágenes topográficas, (b) imágenes ópticas. A e B zoom del área indicada con línea azul en a y b. (c) combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (d) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la misma posición indicada con línea azul no zoom en A (AFM) e B (SNOM).



Fuente: Elaborado por el autor

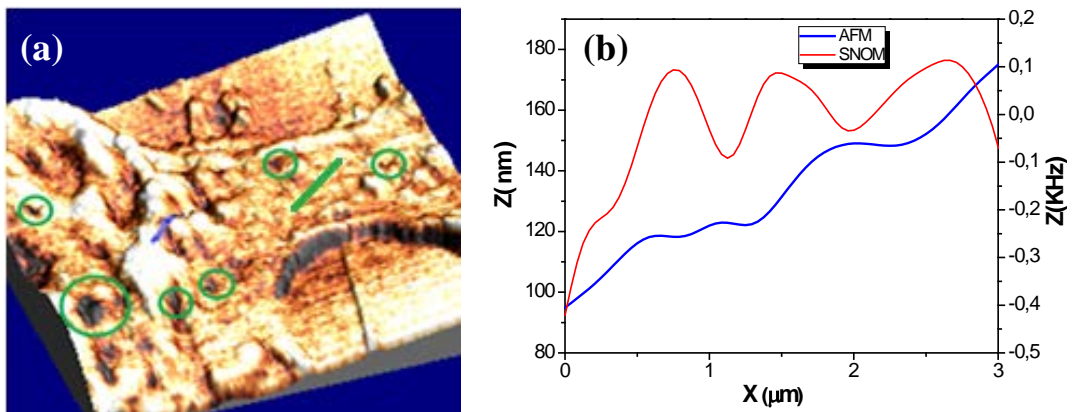
Para completar el análisis de la sección marcada (línea azul), se muestran en la Figura 43 (d), los correspondientes diagramas de sección transversal topográfica (curva azul - AFM), sin cambios abruptos y el perfil de intensidad transmitida (curva roja - SNOM), mostrando caídas considerables en el perfil de intensidad transmitida. Entonces habrá mayor absorción de luz exactamente en las regiones donde hay manchas oscuras debido a la presencia de AuNPs, esto indica que de hecho el haz láser está siendo interrumpido en estas regiones donde suceden las disminuciones de señal, es por eso que las AuNPs dentro de las células aparecen como manchas oscuras, sucediendo diferencias de contraste en las imágenes ópticas de transmisión (ZHANG et al., 2012, SCHMID et al., 2013, JIN et al., 2009).

Comparando las Figuras 43 (a) y (b) y (d) se puede ver que la topografía no muestra irregularidades, sin ningún material en la superficie celular. Por otro lado en la imagen óptica las manchas indican presencia de las AuNPs dentro de la

célula, esto es confirmado mediante los diagramas de sección transversal de perfil topográfico (superficie sin alteraciones) e intensidad transmitida (caídas de intensidad).

En esta misma muestra también se analiza una región que no presentaba manchas, esto se puede ver en la Figura 44 (a) que es la imagen 3D simultanea de topografía y transmisión, ahora adicionando una línea verde marcando la región que será analizada. En la Figura 44 (b), se muestra el análisis de las respectivas señales de sección topográfica (AFM – curva azul) indicando que esta región es limpia sin irregularidades. La curva roja corresponde al perfil de intensidad transmitida (SNOM), ahí se puede ver que en la señal no tubo caídas significativas, apenas oscilaciones propias de la interacción del sistema con la célula (**HECHT** et al., 2000), esto confirma la hipótesis que solo en las regiones donde hay caída de intensidad se tendrá patrones oscuros, es decir regiones con presencia de AuNPs (**SCHMID** et al., 2013, **ZHANG** et al., 2012).

Figura 44 - (a) Combinación de los datos ópticos topográficos y de campo cercano. (b) diagrama de la sección transversal de perfil topográfico e intensidad transmitida correspondiente a la región marcada con línea verde.



Fuente: Elaborado por el autor

En todos los casos cuando la célula fue tratada hubo registro de regiones con disminuciones de intensidad en la transmisión, debido a la presencia de nanopartículas, es decir absorción celular de las AuNPs. En estas mismas muestras también había regiones que no presentaban manchas debido a que en estas regiones no había sucedido absorción de AuNPs. Por otro lado las células no tratadas (Puras), no tuvieron caída de señal en el perfil de intensidad

transmitida (SNOM), esto era de esperar pues había ausencia de AuNPs, así el SNOM transmisión demostró que es una técnica muy útil para identificar y localizar la ubicación espacial de AuNPs dentro de cultivos celulares (**ZHANG** et al., 2012, **PAWLEY**, 2006).

La comparación de estos resultados con trabajos similares encontrados en las referencias bibliográficas, indica que estos resultados están correctos y que tienen concordancia con otros estudios de captación celular de nanopartículas metálicas, por ejemplo en una publicación realizada en 2012 por Zhang y colaboradores, fueron estudiadas la absorción de nanopartículas de óxido de hierro en células, en aquel trabajo también son registrados patrones de manchas con los cuales se deduce la ubicación espacial de las nanopartículas metálicas (**JIN** et al., 2009, **ZHANG** et al., 2012).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se aplica la técnica de microscopía óptica de campo cercano (SNOM) a modo transmisión para estudiar la absorción celular de nanopartículas de oro (AuNPs), utilizadas en el tratamiento de alergias inflamatorias.

Se estableció un proceso apropiado de cultivo celular in vitro de células macrófagas peritoneales de ratón conteniendo diferentes concentraciones de nanopartículas de oro (AuNPs), lo que fue un factor importante para el desarrollo de esta tesis, obteniéndose muestras de buena calidad óptica, así como también fueron determinadas las condiciones específicas de alineamiento del sistema posibilitando realizar adecuadamente las medidas.

La microscopía óptica de campo cercano (SNOM) en la configuración transmisión, permitió determinar simultáneamente la topografía y la intensidad transmitida en las muestras celulares.

A partir del análisis comparativo entre topografía e intensidad transmitida de muestras tratadas y no tratadas, fue posible determinar que de hecho las nanopartículas de oro (AuNPs) ingresan en la célula mediante un mecanismo de absorción celular, esto fue observado principalmente en las disminuciones de intensidad transmitida en las regiones oscuras de la imagen de transmisión óptica.

Estos resultados son consistentes con otros estudios sobre absorción celular de nanopartículas metálicas, por lo tanto, la técnica SNOM es una técnica muy eficiente para la identificación de nanopartículas metálicas dentro de materiales biológicos como es el caso de las células.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHIMANN, L.** 2004. **Apertureless Scanning Near-Field Optical Microscope Probe for Transmission Mode Operation** Ph.D, University of Neuchâtel.
- AGGARWAL, P., HALL, J. B., MCLELAND, C. B., DOBROVOLSKAIA, M. A. & MCNEIL, S. E.** 2009. **Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy.** *Advanced drug delivery reviews*, 61, 428-437.
- ANDERSON, J. M. & SHIVE, M. S.** 2012. **Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.** *Advanced drug delivery reviews*, 64, 72-82.
- ASHFOLD, M. N., CLAEYSSSENS, F., FUGE, G. M. & HENLEY, S. J.** 2004. **Pulsed laser ablation and deposition of thin films.** *Chemical Society Reviews*, 33, 23-31.
- ATKINS, P. & DE PAULA, J.** 2011. **Physical chemistry for the life sciences**, Oxford University Press.
- BARÓ, A. M. & REIFENBERGER, R. G.** 2012. **Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications**, John Wiley & Sons.
- BARRETO, E., SERRA, M. F., DOS SANTOS, R. V., DOS SANTOS, C. E. A., HICKMANN, J., COTIAS, A. C., PÃO, R., RIBEIRO, C., TRINDADE, S. G. & SCHIMIDT, V.** 2015. **Local Administration of Gold Nanoparticles Prevents Pivotal Pathological Changes in Murine Models of Atopic Asthma.** *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11, 1038-1050.
- BERRY, C. C.** 2009. **Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42, 224003.
- BETZIG, E., TRAUTMAN, J., HARRIS, T., WEINER, J. & KOSTELAK, R.** 1991. **Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale.** *Science*, 251, 1468-1470.
- BETZIG, E. & TRAUTMAN, J. K.** 1992. **Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit.** *Science*, 257, 189-195.
- BHUSHAN, B.** 2004. **Springer handbook of nanotechnology.** *Sensor Review*, 24, 319-319.
- BOISSEAU, P. & LAHMANI, M.** 2009. **Nanoscience: Nanobiotechnology and nanobiology**, Springer Science & Business Media.
- BRAGA, P. C. & RICCI, D.** 2004. **Atomic force microscopy: biomedical methods and applications**, Springer Science & Business Media.
- BRANDON, D. & KAPLAN, W. D.** 2013. **Microstructural Characterization of Materials**, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.
- BRUST, M., WALKER, M., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J. & WHYMAN, R.** 1994. **Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 801-802.
- BUSTAMANTE, C., KELLER, D. & YANG, G.** 1993. **Scanning force microscopy of nucleic acids and nucleoprotein assemblies.** *Current Opinion in Structural Biology*, 3, 363-372.
- BUZEA, C., PACHECO, I. I. & ROBBIE, K.** 2007. **Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.** *Biointerphases*, 2, MR17-MR71.

- CALLISTER, W. D.** 2002. **Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales**, *Volume 1*, Reverte.
- CANCINO, J., NOBRE, T. M., OLIVEIRA JR, O. N., MACHADO, S. A. & ZUCOLOTTI, V.** 2013. **A new strategy to investigate the toxicity of nanomaterials using Langmuir monolayers as membrane models.** *Nanotoxicology*, 7, 61-70.
- CHANG, R.** 2005. **Physical chemistry for the biosciences**, University Science Books.
- CHEN, C. J.** 2008. **Introduction to scanning tunneling microscopy**, Oxford University Press.
- CHEN, X., GAMBHIR, S. S. & CHEON, J.** 2011. **Theranostic nanomedicine.** *Accounts of chemical research*, 44, 841-841.
- CHICHESTER, B.** 1998. **Procedures in Scanning Probe Microscopies.** *Procedures in Scanning Probe Microscopies.*
- CHINAGLIA, E. F.** 2010. **Microscopia de Varredura por Sonda Mecânica (Scanning Probe Microscopy).** USP.
- CHITHRANI, B. D., GHAZANI, A. A. & CHAN, W. C. W.** 2006. **Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells.** *Nano Letters*, 6, 662-668.
- CHO, W.-S., CHO, M., JEONG, J., CHOI, M., HAN, B. S., SHIN, H.-S., HONG, J., CHUNG, B. H., JEONG, J. & CHO, M.-H.** 2010. **Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles.** *Toxicology and applied pharmacology*, 245, 116-123.
- CONNOR, E. E., MWAMUKA, J., GOLE, A., MURPHY, C. J. & WYATT, M. D.** 2005. **Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity.** *Small*, 1, 325-327.
- CONRAD, M., YILDIRIM, A., SONAR, S., KILIÇ, A., SUDOWE, S., LUNOW, M., TEICH, R., RENZ, H. & GARN, H.** 2009. **Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models.** *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 1246-1254.
- CORTI, C. & HOLLIDAY, R.** 2009. **Gold: science and applications**, CRC Press.
- CRICENTI, A., COLONNA, S., GIRASOLE, M., GORI, P., RONCI, F., LONGO, G., DINARELLI, S., LUCE, M., RINALDI, M. & ORTENZI, M.** 2011. **Scanning probe microscopy in material science and biology.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44, 464008.
- DANIEL, M.-C. & ASTRUC, D.** 2004. **Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology.** *Chemical reviews*, 104, 293-346.
- DE LANGE, F., CAMBI, A., HUIJBENS, R., DE BAKKER, B., RENSEN, W., GARCIA-PARAJO, M., VAN HULST, N. & FIGDOR, C. G.** 2001. **Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy.** *J Cell Sci*, 114, 4153-60.
- DITCHBURN, R. W.** 1982. **Óptica**, Spain.
- DUARTE, A. S.** 2009. **Dissertação em: Fabricação e caracterização de nanoponteiras metálicas para microscopia óptica de campo próximo.** Mestrado, UFRGS.
- DYKMAN, L. & KHLEBTSOV, N.** 2011. **Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects.** *Acta naturae*, 3, 34.

- E. ABRAHAM PETER B. HIMMEL, G. 1997. Management of rheumatoid arthritis: rationale for the use of colloidal metallic gold. *Journal of nutritional & environmental medicine*, 7, 295-305.**
- EZUGWU, S., YE, H. & FANCHINI, G. 2015. Three-dimensional scanning near field optical microscopy (3D-SNOM) imaging of random arrays of copper nanoparticles: implications for plasmonic solar cell enhancement. *Nanoscale*, 7, 252-260.**
- FILLARD, J. P. 1996. *Near Field Optics and Nanoscopy*, Singapore.**
- FOX, J. G., BARTHOLD, S., DAVISSON, M., NEWCOMER, C. E., QUIMBY, F. W. & SMITH, A. 2006. *The Mouse in biomedical research: diseases*, Academic Press.**
- FRANKEL, D. J., PFEIFFER, J. R., SURVILADZE, Z., JOHNSON, A. E., OLIVER, J. M., WILSON, B. S. & BURNS, A. R. 2006. Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging. *Biophys J*, 90, 2404-13.**
- FREESE, C., UBOLDI, C., GIBSON, M. I., UNGER, R. E., WEKSLER, B. B., ROMERO, I. A., COURAUD, P.-O. & KIRKPATRICK, C. J. 2012. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 9, 23.**
- FREUND, P. L. & SPIRO, M. 1985. Colloidal catalysis: the effect of sol size and concentration. *The Journal of Physical Chemistry*, 89, 1074-1077.**
- FUKUI, M. 1992. Tecnicas de microscopia de tunelamento de eletrons (MTE) e microscopia de força atomica (MFA) aplicadas ao estudo desuperficies de grafite e diamante.**
- GALVAGNO, S. & PARRAVANO, G. 1978. Chemical reactivity of supported gold: IV. Reduction of NO by H₂. *Journal of Catalysis*, 55, 178-190.**
- GIBSON, M. I., DANIAL, M. & KLOK, H.-A. 2011. Sequentially modified, polymer-stabilized gold nanoparticle libraries: Convergent synthesis and aggregation behavior. *ACS combinatorial science*, 13, 286-297.**
- GIESSBL, F. J. 2003. Advances in atomic force microscopy. *Reviews of modern physics*, 75, 949.**
- GILJOHANN, D. A., SEFEROS, D. S., DANIEL, W. L., MASSICH, M. D., PATEL, P. C. & MIRKIN, C. A. 2010. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 3280-3294.**
- GLEITER, H. 1989. Nanocrystalline materials. *Progress in materials science*, 33, 223-315.**
- GLEITER, H. 1990. Structure and properties of nanometer-sized materials. *Phase Transitions: A Multinational Journal*, 24, 15-34.**
- GOSENS, I., POST, J. A., DE LA FONTEYNE, L., JANSEN, E., GEUS, J. W., CASSEE, F. R. & DE JONG, W. H. 2010. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol*, 7, 37.**
- HANSMA, H. G., BROWNE, K. A., BEZANILLA, M. & BRUICE, T. C. 1994. Bending and straightening of DNA induced by the same ligand: characterization with the atomic force microscope. *Biochemistry*, 33, 8436-8441.**

- HANSMA, H. G., GOLAN, R., HSIEH, W., LOLLO, C. P., MULLEN-LEY, P. & KWOH, D. 1998. DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy. *Nucleic acids research*, 26, 2481-2487.**
- HANSMA, H. G., LANEY, D., BEZANILLA, M., SINSHEIMER, R. L. & HANSMA, P. K. 1995. Applications for atomic force microscopy of DNA. *Biophysical journal*, 68, 1672.**
- HARUTA, M. 1997. Size-and support-dependency in the catalysis of gold. *Catalysis Today*, 36, 153-166.**
- HAYNES, R. 2013. Optical microscopy of materials, Springer Science & Business Media.**
- HECHT, B., SICK, B., WILD, U. P., DECKERT, V., ZENOBI, R., MARTIN, O. J. F. & POHL, D. W. 2000. Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications. *The Journal of Chemical Physics*, 112, 7761-7774.**
- HERMINGHAUS, S., FERY, A. & REIM, D. 1997. Imaging of droplets of aqueous solutions by tapping-mode scanning force microscopy. *Ultramicroscopy*, 69, 211-217.**
- HERRMANN, P. S., DA SILVA, M. A., BERNARDES, R., JOB, A. E., COLNAGO, L. A., FROMMER, J. E. & MATTOSO, L. H. 1997. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. *Polímeros: ciência e tecnologia*, 7, 51-61.**
- HILLAIREAU, H. & COUVREUR, P. 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2873-2896.**
- HO, H. & WEST, P. 1996. Optimizing AC-mode atomic force microscope imaging. *Scanning*, 18, 339-343.**
- HOOGENBOOM, B., HUG, H., PELLMONT, Y., MARTIN, S., FREDERIX, P., FOTIADIS, D. & ENGEL, A. 2006. Quantitative dynamic-mode scanning force microscopy in liquid. *Applied physics letters*, 88, 193109.**
- HOOKE, R. 2003. Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon, Courier Corporation.**
- HORCAS, I., FERNÁNDEZ, R., GOMEZ-RODRIGUEZ, J., COLCHERO, J., GÓMEZ-HERRERO, J. & BARO, A. 2007. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, 78, 013705.**
- JANA, N. R., GEARHEART, L. & MURPHY, C. J. 2001. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 13, 2313-2322.**
- JEON, K.-I., BYUN, M.-S. & JUE, D.-M. 2003. Gold compound auranofin inhibits I κ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK β subunit. *Experimental and molecular medicine*, 35, 61-66.**
- JIN, H., HELLER, D. A., SHARMA, R. & STRANO, M. S. 2009. Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano*, 3, 149-58.**
- KANG, B., MACKEY, M. A. & EL-SAYED, M. A. 2010. Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 1517-1519.**
- KARP, G. 2005. *Biologia celular e molecular, conceitos e experimentos*, Brasil.**

- KAUPP, G.** 2006. **Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching: Application to Rough and Natural Surfaces**, Germany.
- KAWATA, S., OHTSU, M. & IRIE, M.** 2002. **Nano-optics**, Springer Science & Business Media.
- KIM, N. H., LEE, M. Y., PARK, S. J., CHOI, J. S., OH, M. K. & KIM, I. S.** 2007. **Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3.** *Immunology*, 122, 607-614.
- KUMAR, S., GANDHI, K. & KUMAR, R.** 2007. **Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method.** *Industrial & engineering chemistry research*, 46, 3128-3136.
- LAMPRECHT, A.** 2008. **Nanotherapeutics: drug delivery concepts in nanoscience**, CRC Press.
- LANONE, S. & BOCZKOWSKI, J.** 2011. **Titanium and gold nanoparticles in asthma: the bad and the ugly.** *European Respiratory Journal*, 37, 225-227.
- LEE, K.-S. & EL-SAYED, M. A.** 2006. **Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 19220-19225.
- LENG, Y.** 2013. **Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods**, Weinheim, Germany.
- LEWIS, A., ISAACSON, M., HAROOTUNIAN, A. & MURAY, A.** 1984. **Development of a 500 Å spatial resolution light microscope: I. light is efficiently transmitted through $\lambda/16$ diameter apertures.** *Ultramicroscopy*, 13, 227-231.
- LINK, S. & EL-SAYED, M. A.** 1999. **Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 4212-4217.
- LOTZE, M. T. & THOMSON, A. W.** 2001. **Dendritic cells: biology and clinical applications**, Academic Press.
- LOUIS, C. & PLUCHERY, O.** 2012. **Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology**, Singapore.
- LUQUE, R., VARMA, R. S. & CLARK, J. H.** 2012. **Sustainable preparation of metal nanoparticles: methods and applications**, Royal Society of Chemistry.
- LYNCH, I.** 2007. **Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface.** *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 373, 511-520.
- MAGNUSSON, M. H., DEPERT, K., MALM, J.-O., BOVIN, J.-O. & SAMUELSON, L.** 1999. **Gold nanoparticles: production, reshaping, and thermal charging.** *Journal of Nanoparticle Research*, 1, 243-251.
- MAILÄNDER, V. & LANDFESTER, K.** 2009. **Interaction of Nanoparticles with Cells.** *Biomacromolecules*, 10, 2379-2400.
- MANDAL, D., BOLANDER, M. E., MUKHOPADHYAY, D., SARKAR, G. & MUKHERJEE, P.** 2006. **The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 485-492.
- MARINELLO, F., PASSERI, D. & SAVIO, E.** 2012. **Acoustic scanning probe microscopy**, Springer Science & Business Media.

- MARKOWSKA, K., GRUDNIAK, A. M. & WOLSKA, K. I. 2013. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol*, 60, 523-30.**
- MELO JR, M. A., SANTOS, L. S. S., DO CARMO GONÇALVES, M. & NOGUEIRA, A. F. 2012. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Quim. Nova*, 35, 1872-1878.**
- MUKHERJEE, P., BHATTACHARYA, R., WANG, P., WANG, L., BASU, S., NAGY, J. A., ATALA, A., MUKHOPADHYAY, D. & SOKER, S. 2005. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 11, 3530-3534.**
- NANONICS IMAGING, L. 2010. MultView4000TM.**
- O'NEAL, D. P., HIRSCH, L. R., HALAS, N. J., PAYNE, J. D. & WEST, J. L. 2004. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer letters*, 209, 171-176.**
- OKITSU, K., ASHOKKUMAR, M. & GRIESER, F. 2005. Sonochemical synthesis of gold nanoparticles: effects of ultrasound frequency. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 20673-20675.**
- PAWLEY, J. B. 2006. Handbook of Biological Confocal Microscopy, USA.**
- POHL, D. W., DENK, W. & LANZ, M. 1984. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Applied physics letters*, 44, 651-653.**
- POON, B., RITTEL, D. & RAVICHANDRAN, G. 2008. An analysis of nanoindentation in linearly elastic solids. *International Journal of Solids and Structures*, 45, 6018-6033.**
- RAYLEIGH, L. 1880. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 40, 254.**
- RENSEN, W., VAN HULST, N., RUITER, A. & WEST, P. 1999. Atomic steps with tuning-fork-based noncontact atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 75, 1640-1642.**
- ROSER, M., FISCHER, D. & KISSEL, T. 1998. Surface-modified biodegradable albumin nano-and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 46, 255-263.**
- SALATA, O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2, 3.**
- SALMASO, S., CALICETI, P., AMENDOLA, V., MENEGHETTI, M., MAGNUSSON, J. P., PASPARAKIS, G. & ALEXANDER, C. 2009. Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. *Journal of Materials Chemistry*, 19, 1608-1615.**
- SCHMID, M., GRANDIDIER, J. & ATWATER, H. A. 2013. Scanning near-field optical microscopy on dense random assemblies of metal nanoparticles. *Journal of Optics*, 15, 125001.**
- SCHURCH, F. F., BEVILAQUA, R. C. A. & FAGAN, S. B. 2007. Propriedades eletrônicas e estruturais de nanotubos de carbono e aplicação como carreadores de fármacos. *Disciplinarum Scientia*, 8, 95-105.**
- SHAH, Z. A. & VOHORA, S. B. 2002. Antioxidant/restorative effects of calcined gold preparations used in Indian systems of medicine against global and focal models of ischaemia. *Pharmacology & toxicology*, 90, 254-259.**

- SIMON, A. & DURRIEU, M. C.** 2006. **Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion.** *Micron*, 37, 1-13.
- STARK, M., MÖLLER, C., MÜLLER, D. J. & GUCKENBERGER, R.** 2001. **From Images to Interactions: High-Resolution Phase Imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy.** *Biophysical Journal*, 80, 3009-3018.
- STERN, S. T. & MCNEIL, S. E.** 2008. **Nanotechnology safety concerns revisited.** *Toxicological sciences*, 101, 4-21.
- SYNGE, E.** 1928. XXXVIII. **A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region.** *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6, 356-362.
- THAKOR, A., JOKERST, J., ZAVALETA, C., MASSOUD, T. & GAMBHIR, S.** 2011. **Gold nanoparticles: a revival in precious metal administration to patients.** *Nano letters*, 11, 4029-4036.
- TJONG, S. & CHEN, H.** 2004. **Nanocrystalline materials and coatings.** *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 45, 1-88.
- TSUKRUK, V. V. & SINGAMANENI, S.** 2012. **Scanning Probe Microscopy of Soft Matter: Fundamentals and Practices**, Singapore.
- TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C. & HILLIER, J.** 1951. **A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.** *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- VAJTAI, R.** 2013. **Springer handbook of nanomaterials**, Springer Science & Business Media.
- VIGDERMAN, L., KHANAL, B. P. & ZUBAREV, E. R.** 2012. **Functional Gold Nanorods: Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications** (Adv. Mater. 36/2012). *Advanced Materials*, 24, 5016-5016.
- WAGNER, M.** 1992. **Structure and thermodynamic properties of nanocrystalline metals.** *Physical Review B*, 45, 635.
- WANG, R., BILLONE, P. S. & MULLETT, W. M.** 2013. **Nanomedicine in action: an overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials.** *Journal of Nanomaterials*, 2013, 1.
- WILHELM, C., BILLOTEY, C., ROGER, J., PONS, J. N., BACRI, J. C. & GAZEAU, F.** 2003. **Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating.** *Biomaterials*, 24, 1001-11.
- WILHELM, C., GAZEAU, F., ROGER, J., PONS, J. & BACRI, J.-C.** 2002. **Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization.** *Langmuir*, 18, 8148-8155.
- WILLIAMS, D. B. & CARTER, C. B.** 1996. **The transmission electron microscope**, Springer.
- WOJCIECHOWSKI, S.** 2000. **New trends in the development of mechanical engineering materials.** *Journal of Materials Processing Technology*, 106, 230-235.
- XIAO, L. & YEUNG, E. S.** 2014. **Optical Imaging of Individual Plasmonic Nanoparticles in Biological Samples.** *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7, 89-111.

- XING, S., ZHANG, C., AI, H., ZHAO, Q., ZHANG, Q. & SUN, D. 2009. Theoretical study of the interactions of β -cyclodextrin with 2'-hydroxyl-5'-methoxyacetophone and two of its isomers. *Journal of Molecular Liquids*, 146, 15-22.**
- YANG, C.-W., HWANG, S., CHEN, Y. F., CHANG, C. S. & TSAI, D. P. 2007. Imaging of soft matter with tapping-mode atomic force microscopy and non-contact-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 18, 084009.**
- YANG, G. 2007. Laser ablation in liquids: applications in the synthesis of nanocrystals. *Progress in Materials Science*, 52, 648-698.**
- YU, Y.-Y., CHANG, S.-S., LEE, C.-L. & WANG, C. C. 1997. Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101, 6661-6664.**
- ZANETTE, S. I. 2010. INTRODUÇÃO À MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, São paulo-Brasil.**
- ZARBIN, A. J. 2007. Química de (nano) materiais. *Química Nova*, 30, 1469.**
- ZAREIE, M., ZENCIR, Y., ÜNALEROĞLU, C., ZÜMREOĞLU-KARAN, B. & PIŞKIN, E. 1998. pH-Independent decomposition reactions of L-ascorbic acid in aqueous metal solutions. 2. Imaging by scanning tunneling microscopy. *Polyhedron*, 17, 2633-2638.**
- ZHANG, X.-D., WU, D., SHEN, X., LIU, P.-X., YANG, N., ZHAO, B., ZHANG, H., SUN, Y.-M., ZHANG, L.-A. & FAN, F.-Y. 2011. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 2071.**
- ZHANG, Y., KYLE, J., PENCHEV, M., YAZDANPANAH, V., YU, J., LI, Y., YANG, M., BUDAK, G., OZBAY, E., OZKAN, M. & OZKAN, C. 2012. Transmission Near-Field Scanning Optical Microscopy Investigation on Cellular Uptake Behavior of Iron Oxide Nanoparticles. *BioNanoScience*, 2, 135-143.**
- ZIMMERMANN, H., HAGEDORN, R., RICHTER, E. & FUHR, G. 1999. Topography of cell traces studied by atomic force microscopy. *European Biophysics Journal*, 28, 516-525.**