



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERIA

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

Caracterización por espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) de mezclas acuosas de ácido ascórbico y quitosán funcionalizadas con nanoparticulas de Ag, Cu y Au.

Tesis que para obtener el grado de:

DOCTOR EN INGENIERIA

Presenta:

Víctor Hugo Vázquez Limón

Director:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, Baja California

Junio de 2014.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Capítulo 1	9
Introducción	9
1.1 Objetivo General	11
1.2 Objetivos Específicos	11
Capítulo 2.- Fundamentos Teóricos	12
2.1 La Nanotecnología: una tecnología de producción a escala	12
2.2 Nanotecnología-nanociencia-nanobiología: manipulación de materiales y sistemas funcionales	13
2.3 Materiales biocompatibles: un nuevo desafío de investigación	14
2.4 Síntesis general y propiedades de nanopartículas	15
La evaporación térmica	19
El depósito químico en fase vapor	19
La preparación de clústeres gaseosos	19
La implantación de iones	19

La molienda de partículas	20
El método coloidal	21
Reducción fotoquímica y radioquímica	22
2.5.2. Síntesis de nanopartículas de plata, cobre y oro.	24
2.6. Microscopía electrónica de barrido	26
Energía dispersiva de rayos X	31
2.7 Espectroscopia de Transformada de Fourier de la Radiación Infrarroja (FTIR	34
2.7.1. Ventajas del método	36
Capítulo 3.- Experimentación	38
3.1. Soluciones de nanopartículas de plata, cobre y oro	38
3.2 Reactivos	38
3.3 Material y Equipo	39
3.4 Preparación de las mezclas acuosas de Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ	39
3.5 Funcionalización de las mezclas acuosas de Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ	40
3.6 Caracterización de los productos: Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y	41

Au NP-AQ por FT-IR

Capítulo 4.- Análisis de resultados y discusiones	44
4.1. Nanopartículas de plata, cobre y oro	44
4.2 Análisis FTIR de compuestos de quitosán ácido ascórbico y nanopartículas de plata, oro y cobre	48
4.3. Posibles estructuras y arreglos	57
Conclusiones	64
Recomendaciones	66
Bibliografía	67

Lista de figuras

Figura 1. Escala que indica las dimensiones nanométricas en vida diaria.	14
Figura 2. Disoluciones con nanopartículas de oro de distintos tamaños.	25
Figura 3. Soluciones acuosas de nanopartículas de plata.	25
Figura 4. Nanopartículas de cobre en solución acuosa coloidal.	26
Figura 5. Generación de señales a partir del haz de electrones incidente.	28

Figura 6. Adquisición de la imagen MEB con electrones.	30
Figura 7. Imagen obtenida por electrones retrodispersados.	31
Figura 8. Localización de los detectores en el interior de la cámara del microscopio electrónico de barrido.	33
Figura 9. Microscopio electrónico de barrido.	33
Figura 10. Esquema de un interferómetro de Michelson.	35
Figura 11. Espectrofotómetro Perkin Elmer. Modelo Spectrum One	43
Figura 12. Análisis de nanopartículas de plata con microscopio electrónico de transmisión. El rango de tamaño de partícula es de 10 a 20 nm.	44
Figura 13. Análisis de nanopartículas de oro con microscopio electrónico de transmisión. El rango de tamaño de partícula es de 15 a 20 nm.	45
Figura 14. Análisis de morfología por microscopia electrónica de barrido de una solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de cobre formando clusters de 120 a 170 nm.	45
Figura 15. Análisis de microscopio electrónico de barrido y EDS realizado a la solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de oro.	46

Figura 16. Análisis químico de EDS para la solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de cobre formando clusters de 120 a 170 nm.	47
Figura 17. Espectrograma FTIR del quitosán.	49
Figura 18. Espectrograma FTIR del Ácido ascórbico.	50
Figura 19. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico.	51
Figura 20. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico-Ag.	52
Figura 21. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico-Cu.	53
Figura 22. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico-Au.	54
Figura 23. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico. Quitosán y Ácido Ascórbico.	55
Figura 24. Espectrograma FTIR de Quitosán- ascórbico, Quitosán - ascórbico -Ag, Quitosán - ascórbico-Au, Quitosán – ascórbico-Au, Quitosán – ascórbico-Cu.	56
Figura 25. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Plata (Ag).	59
Figura 26. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Cobre (Cu)	59

Figura 27. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Oro (Au).	60
---	-----------

Figura 28. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Plata (Ag).	60
---	-----------

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de las partículas características y posibles aplicaciones de los diferentes tipos de nanopartículas en biomedicina	17
--	-----------

Tabla 2. Parámetros de reacciones para la obtención de recubrimientos con el complejo de ascorbato de quitosán con nanopartículas de Ag, Au y Cu.	40
--	-----------

Lista de ecuaciones

Ecuación 1.	23
Ecuación 2.	23
Ecuación 3.	24
Dedicatorias	8

DEDICATORIAS

A DIOS

A LA MEMORIA DE MIS PADRES

A PATY MI COMPAÑERA DE VIDA

A MI ALMA MATER LA UABC Y EL INSTITUTO DE INGENIERÍA

**A MIS DIRECTORES Y ASESORES EN ESTA INVESTIGACIÓN QUE
HOY CONCLUYE**

A MIS COMPAÑEROS DEL DOCTORADO

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA POR EL
APOYO BRINDADO**

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Algo indudable es que la ciencia y la tecnología están en cada componente que nos rodea y que seguirán mejorando la vida hasta crear aparatos que ni la mente más creativa puede imaginar hoy.

En los últimos años se ha comprobado que la organización de la materia a escala nanométrica es la clave del futuro. La nanobiotecnología o ingeniería biomolecular está cambiando los paradigmas hasta ahora planteados con respecto a los componentes y agrupaciones del interior de las células, al obtener nuevos materiales mucho más pequeños.

Uno de los objetivos centrales de la nanociencia es construir pequeñas estructuras para el diseño de materiales avanzados, nanodispositivos de alto rendimiento y miniaturización de dispositivos electrónicos. Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción para tales propósitos, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas (Daniel y Astruc, 2004; Grieve *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2007; Medintz *et al.*, 2005; Pérez-Juste *et al.*, 2005; Shipway *et al.*, 2000), muchas de las cuales pueden ser moldeadas simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material.

Hasta ahora se han realizado avances significativos utilizando estrategias de química húmeda, para sintetizar nanopartículas de alta calidad de una gran variedad de materiales inorgánicos, incluyendo oro, plata, óxido de hierro y semiconductores (Daniel y Astruc, 2004; Grieve *et al.*, 2000; Luc *et al.*, 2007; Medintz *et al.*, 2005; Pérez-Juste *et al.*, 2005; Shipway *et al.*, 2000).

Vemos como también la aplicación de nanopartículas funcionalizadas para actuar como transportadores de fármacos, está siendo más investigada y utilizada en estos últimos tiempos debido a la gran variedad de aplicaciones que tienen en el campo de la biomedicina.

Día a día el campo de la nanotecnología puede ofrecer una gran variedad de productos con un enorme potencial en el ámbito biomédico, pero es necesaria una correcta y completa caracterización para asegurar su biodegradabilidad, biocompatibilidad e inmunogenicidad.

Por lo anteriormente expuesto, surge el interés de este estudio doctoral, y llevar a cabo la caracterización de algunos compuestos funcionalizados con nanopartículas metálicas mediante la aplicación de la técnica de espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) con el fin de conocer acerca de su arreglo estructural.

1.1 Objetivo general:

Caracterizar mediante espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) el arreglo estructural de mezclas de quitosán y ácido ascórbico funcionalizadas con nanopartículas de Ag, Cu y Au (Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ)

1.2 Objetivos específicos:

- Preparar una solución acuosa estable de ácido ascórbico.
- Funcionalizar la mezcla de ácido ascórbico y quitosán en solución acuosa, con nanopartículas de Ag, Cu y Au.
- Caracterizar la morfología, tamaño y composición química de las nanopartículas de Ag, Au y Cu, y sus respectivos compuestos funcionalizados con Quitosan – Ácido Ascórbico, mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica y análisis químico con la técnica de electrones dispersados de rayos X.
- Caracterizar la mezcla de ácido ascórbico-quitosán funcionalizado con nanopartículas de Ag, Cu y Au utilizando el método analítico espectrofotométrico de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 La Nanotecnología: una tecnología de producción a escala

En 1959, Richard Feynman -Premio Nóbel de Física en 1965- presentaba la conferencia “Hay mucho espacio al fondo” ("There is plenty of room at the bottom") para la American Physical Society en el California Institute of Technology (Caltech) sobre el futuro de la investigación científica. Este artículo puede considerarse una predicción sobre la posterior implementación y aplicación de la nanotecnología. En él, Feynman, se refería a la posibilidad de manipular átomo a átomo. Lo que en aquel momento no existía era la tecnología para llevarlo a cabo. El término nanotecnología fue definido por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi -profesor emérito de la *Tokyo Science University*- (Taniguchi, 1974) como una tecnología de producción a la escala del nanómetro: milmillonésima parte de un metro.

Fue necesario contar con el instrumental adecuado para avanzar del campo de las ideas al trabajo aplicado con la realidad cuántica. Se necesitaban nuevos instrumentos. En 1981 el microscopio de efecto túnel (STM), permitió observar una molécula con resolución atómica. En 1986 se inventa el microscopio de fuerza atómica (AFM), que

habilita a manipular átomos uno a uno. A partir de entonces la nanociencia comienza su desarrollo aplicado en forma exponencial.

2.2 Nanotecnología-nanociencia-nanobiología: manipulación de materiales y sistemas funcionales

El prefijo “nano”, significa la mil millonésima parte de algo. En el caso de un nanómetro, significa la mil millonésima parte de un metro, es decir 10^{-9}m . Para tener una idea de estas dimensiones, vamos a dar el siguiente ejemplo. Imaginemos un niño de 1 metro de altura.

La Nanotecnología como el estudio, síntesis y manipulación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica. Tiene por objetivo la fabricación de materiales, objetos y dispositivos tecnológicos en esa escala. Por otra parte, la Nanociencia estudia la materia a escala de estructuras moleculares y atómicas, utilizando las herramientas de la física, química, biología y ciencia de los materiales, buscando responder preguntas básicas sobre el comportamiento de estructuras en esa escala. La nanobiología, podría ser definida como el estudio de material biológico en escala nanométrica. Cuando el material biológico puede ser manipulado en esta escala con el fin de obtener algún producto tecnológico, tenemos el concepto de nanobiotecnología.

El campo de la nanotecnología puede ofrecer una gran variedad de productos con un enorme potencial en el ámbito biomédico, pero es necesaria una correcta y completa caracterización para asegurar su biocompatibilidad e inmunogenicidad.

Un **Nanometro**, es la mil millonésima parte de un metro 10^{-9} m

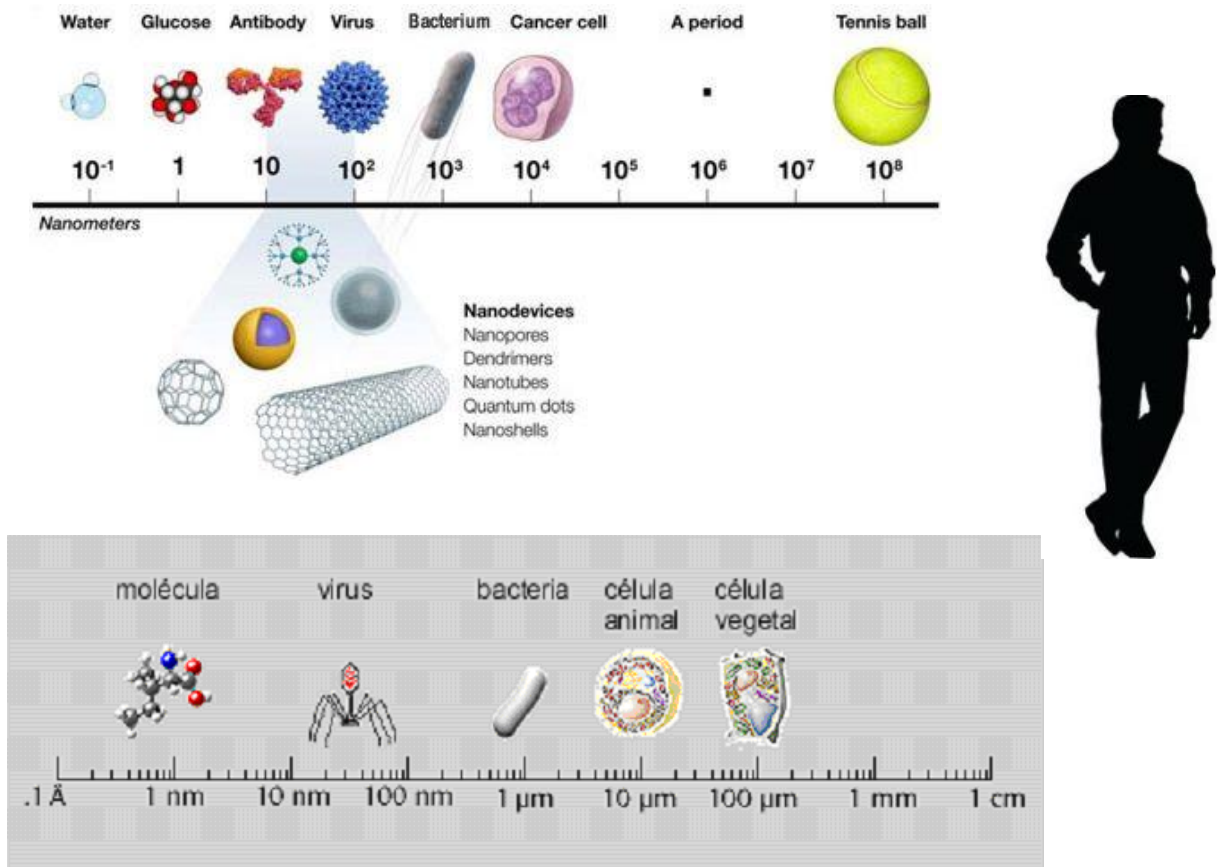


Figura 1. Escala que indica las dimensiones nanométricas en la vida diaria.

2.3 Materiales biocompatibles: un nuevo desafío de investigación

La aplicación de la nanotecnología en medicina es llamada nanomedicina y es empleada para mejorar la calidad de vida de los seres humanos, combatiendo las

enfermedades de una forma innovadora. La nanomedicina es una fuente de distintas aplicaciones, como la construcción de sistemas que puedan llevar el compuesto activo de un fármaco específicamente a la zona dañada del cuerpo.

Un medicamento tomado vía oral pierde gran parte de su efectividad al ser sus compuestos metabolizados en el hígado o digeridos por parte del sistema digestivo, permitiendo que sólo un porcentaje muy reducido del compuesto llegue a la zona afectada y produzca su efecto. La solución de las farmacéuticas es poner grandes cantidades del medicamento en una tableta, calculando lo que se va a desperdiciar en el trayecto, para que la cantidad de compuesto activo que alcance la zona a tratar sea la necesaria. Al administrar la medicina de otras maneras, como lo sería a través de presentaciones inyectables tanto intramusculares como intravenosas, el porcentaje de la pérdida se reduce. El uso de nanopartículas permite atravesar las membranas citoplasmáticas y nucleares para introducir material químico, biológico, o genético en células determinadas. Esta auténtica “nanoentrega” promete tratamientos revolucionarios para enfermedades hoy incurables. (Tessy María López Goerne, 2011)

2.5 Síntesis general y propiedades de nanopartículas

La absorción de la luz por soluciones coloidales de nanopartículas, así como su color cambia en función del tamaño de las nanopartículas presentes. El área superficial de las nanopartículas es mucho mayor que en materiales convencionales, e inclusive

pueden ser igual o más tóxicas que las partículas o fibras de un tamaño no nanométrico del mismo material. Las nanopartículas entran al organismo por vía respiratoria, oral y dérmica. Algunas aplicaciones de las nanopartículas son en el área biomedicina, deportes, higiene, óptica, cuidados personales, electrónica, agentes limpiadores, etc.

El control de las variables involucradas en la síntesis de dichas nanopartículas, nos permite tener control de la morfología de las partículas, así mismo como de sus características, para adaptar sus propiedades en los procesos que involucran las nanopartículas metálicas en cuestión. Otro aspecto fundamental de la síntesis de nanopartículas es su estabilización en una solución de tal manera que puedan estar como un coloide y no precipiten.

La síntesis de nanopartículas permite caracterizar y aplicar sus propiedades únicas, lo que puede llevar a nuevas aplicaciones en catálisis, electrónica, fotónica, magnetismo, así como sensado químico y biológico. La siguiente tabla muestra resumen de las principales características y posibles aplicaciones de los diferentes tipos de nanopartículas [1].

TABLA I. Resumen de las principales características y posibles aplicaciones de los diferentes tipos de nanopartículas en biomedicina.

Nanoproteínas	Características	Posibles aplicaciones biomédicas
Nanoshells	10-300 nm, formadas por un núcleo de sílice y una capa de un compuesto metálico	Agentes de contraste y liberación de fármacos
De carbono		
Nanotubos	Compuestos alargados de carbono de 1 nm de diámetro, con una o varias capas concéntricas	Agentes de contraste, terapia génica, transporte de fármacos, biosensores y vacunas
Fullerenos	Compuestos constituidos por 60 átomos de carbono formando un espacio cerrado y simétrico con forma de balón de fútbol	Transporte de fármacos, agentes de contraste, antioxidantes y bactericidas
Poliméricas	Formadas por polímeros no degradables y degradables, de origen natural o sintético, o mezcla de ambos tipos	Liberación de fármacos, vacunas
Dendrímeros	Estructuras globulares generadas por repetición de polímeros sintéticos compuestas por un núcleo y varias capas con grupos terminales activos	Liberación de fármacos
Metálicas		
De oro	Formadas por oro, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Biosensores, agentes de contraste y termoablación
QD	Estructura fluorescente de 2 a 10 nm, constituida por un núcleo de algún elemento de los grupos II-VI y por una capa de ligandos o polímeros anfipáticos	Diagnóstico por la imagen y tratamiento del cáncer
Magnéticas	Compuestas por un núcleo inorgánico de óxido de hierro u otros metales, recubierto o no con biomoléculas o polímeros orgánicos	Agentes de contraste
Nanoliposomas y nanomicelas	Vesículas esféricas cerradas formadas principalmente por fosfolípidos	Transporte de agentes bioactivos, liberación de fármacos y tratamiento del cáncer

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control racional de la morfología de las partículas y provee los medios para adaptar las propiedades de los materiales durante el proceso de síntesis. Otro aspecto fundamental de la síntesis de

nanopartículas es su estabilización, de tal manera que pueda mantenerse su tamaño y su forma en función del tiempo.

Los métodos de síntesis de nanopartículas suelen agruparse en dos categorías, las aproximaciones «de arriba hacia abajo» (métodos físicos) y las «de abajo hacia arriba» (métodos químicos). Rao *et al.*, 2004; Schmid, 2004.

- 1) La primera consiste en la división de sólidos grandes en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados.
- 2) La segunda aproximación, «de abajo hacia arriba», consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas.

Las nanopartículas pueden ser soportadas o no. El soporte da estabilidad a las nanopartículas, además de que les puede conferir propiedades específicas (Wachs, 2001). Existen varios métodos que utilizan la aproximación «de arriba hacia abajo», los más representativos son (Rao *et al.*, 2004; Schmid, 2004):

a) La evaporación térmica: Consiste en el calentamiento hasta la evaporación (sublimación) del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las variables del proceso en el crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada.

b) El depósito químico en fase vapor: Consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío, en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.

c) La preparación de clústeres gaseosos: Este método utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío.

d) La implantación de iones: Consiste en que los iones de un material pueden ser implantados en un sólido, cambiando por tanto las propiedades físicas y químicas de este último, ya que el ion implantado puede ser de un elemento distinto al que lo compone, también se pueden causar cambios estructurales en el sólido implantado, puesto que la estructura cristalina del objetivo puede ser dañada. El equipamiento

necesario para la implantación de iones suele consistir en una fuente de iones que produce los iones del elemento deseado, un acelerador donde dichos iones son electrostáticamente acelerados hasta alcanzar una alta energía, y una cámara donde los iones impactan contra el objetivo. Cada ion suele ser un átomo aislado, y de esta manera la cantidad de material que se implanta en el objetivo es en realidad la integral respecto del tiempo de la corriente de ion. Esta cantidad es conocida como dosis. Las corrientes suministradas suelen ser muy en microamperios, y por esto la dosis que puede ser implantada en un tiempo razonable es también pequeña.

Por todo esto, la implantación de iones encuentra aplicación en los casos en que el cambio químico necesario es pequeño. Las energías típicas de ion se encuentran en el rango de 10 a 500 keV. La energía de los iones junto con la especie de ion y la composición del objetivo, determinan la profundidad de penetración de los iones en el sólido.

e) La molienda de partículas de tamaño macro o micrométrico, por medio de molinos de alta eficiencia; las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico. Dado que la molienda enérgica y continua de los materiales iniciales puede inferir cambios energéticos en los sólidos, debido a la acumulación de defectos en situación de no-equilibrio, lo que puede causar una disminución de las energías de activación, activando los sólidos para llevar a cabo reacciones químicas en estado sólido. La activación mecanoquímica de sólidos

cristalinos puede producir también alteraciones y cambios tanto texturales como estructurales, que pueden resultar de gran interés en el desarrollo de materiales (Boldyrev, 2006; Imamura *et al.*, 1984). La mecano-síntesis por reacción entre metales y óxidos ha sido estudiada en algunos sistemas con el objeto de obtener materiales compuestos nanoestructurados (Schmid, 2004; Takacs, 1993).

Como puede constatarse en lo aquí descrito, varios de los métodos que utilizan la aproximación «de arriba hacia abajo», salvo la molienda, requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace costosos, por tanto, muchas veces se prefieren los métodos que utilizan la aproximación «de abajo hacia arriba».

Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas.

a) El método coloidal: Los coloides son partículas individuales, que son más grandes que las dimensiones atómicas, pero lo suficientemente pequeño como para exhibir movimiento browniano. Si las partículas son lo suficientemente grandes, entonces su comportamiento dinámico en suspensión en función del tiempo se regirá por las fuerzas de la gravedad y se dará el fenómeno de sedimentación, si son lo suficientemente pequeños para ser coloides, entonces su movimiento irregular en suspensión puede

ser atribuido a bombardeos colectivos de una multitud de moléculas térmicamente agitadas en una suspensión líquida. Este rango de tamaño de partículas en una solución coloidal suele oscilar en el rango de nanómetros, por ello el método coloidal es un método eficiente de producción de nanopartículas (de-Jong, 2009; Schmid, 2004). Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). Este último puede jugar el papel de reductor, de estabilizante o ambos. En principio el tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante así como la naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por periodos de tiempo muy largos, por ejemplo, Michel Faraday, en 1857, creó dispersiones coloidales de oro, que hoy en día aún permanecen estables (Faraday, 1957). A principios de los años cincuenta del siglo pasado, Turkevitch reportó el primer método estándar y reproducible para la preparación de coloides metálicos (partículas de Au de 20 nm por medio de la reducción de $[\text{AuCl}_4^-]$ con citrato de sodio). Adicionalmente fue el primero en proponer un mecanismo paso a paso de la formación de nanoclusters basado en la nucleación y crecimiento (Turkevich *et al.*, 1951; Turkevich y Kim, 1970).

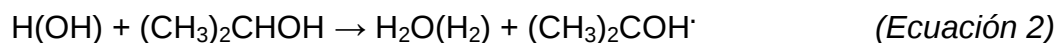
b) Reducción fotoquímica y radioquímica: La síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas.

La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radiación-química (radiólisis) difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica está caracterizada por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 103-104 eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica tienen la ventajas sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza. Además, la reducción fotoquímica y radioquímica permiten producir nanopartículas en condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas.

La reducción fotoquímica en solución se emplea frecuentemente para sinterizar partículas de metales nobles. Estas partículas se obtienen a partir de las sales correspondientes en agua, alcohol o solventes orgánicos. En estos medios, bajo la acción de la luz, se forman las siguientes especies activas:



En el caso de reacción con alcoholes, un átomo de hidrógeno y un radical hidroxilo producen un radical alcohol:



Un electrón solvatado interacciona con, por ejemplo, un átomo de plata, reduciendo el metal (Sergeev, 2006):



2.5.2. Síntesis de nanopartículas de plata, cobre y oro.

Se pueden preparar soluciones acuosas coloidales de nanopartículas de plata, cobre y oro a partir de la reducción de las especies iónicas de estos metales en soluciones acuosas de sales tales como el nitrato de plata (AgNO_3), nitrato de cobre (Cu NO_3) o ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Como especies reductoras y estabilizadoras de la solución coloidal se pueden utilizar el ácido ascórbico, el citrato de sodio y surfactantes catiónicos (cuaternarios de amonio) tales como el bromuro de cetil trimetil amonio entre otros. Los parámetros tales como la concentración de reactivos, temperatura, agitación y tiempo de reacción definen el tamaño final de la nanopartícula.

Estas partículas pueden también ser preparadas auxiliando la reducción con un sistema de celda electroquímica, en cuyo caso el potencial aplicado también jugará un papel importante en la definición del tamaño final de las nanopartículas y de su estabilidad como coloide en solución acuosa. Así mismo, el tipo de electrodos y su pureza influirán en la pureza y la calidad de la nanopartícula sobre todo si se desean obtener nanopartículas monometálicas.

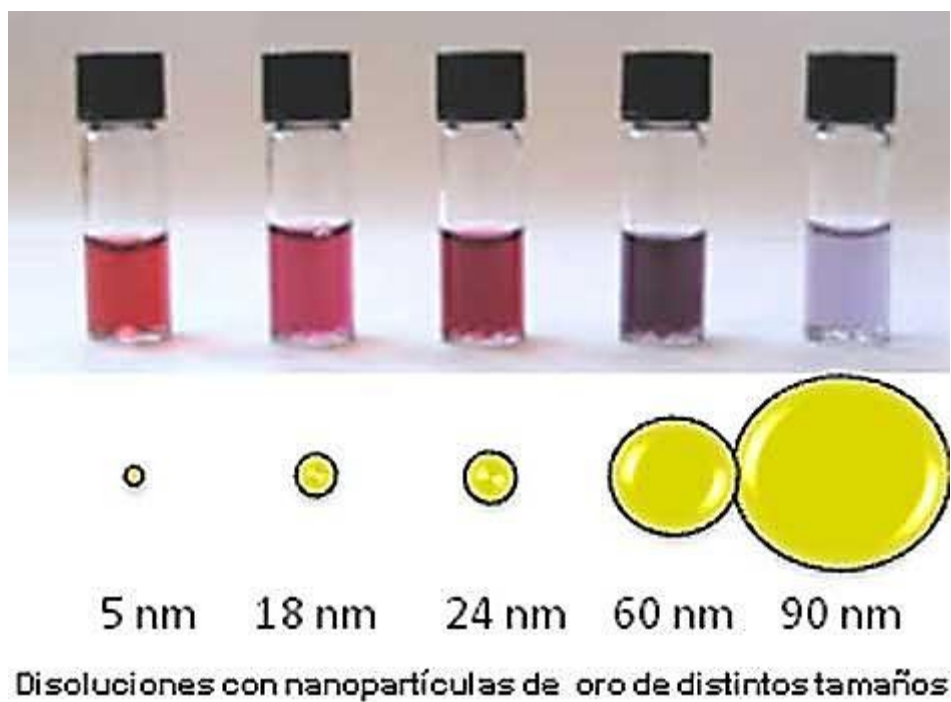


Figura 2. Disoluciones con nanopartículas de oro de distintos tamaños.

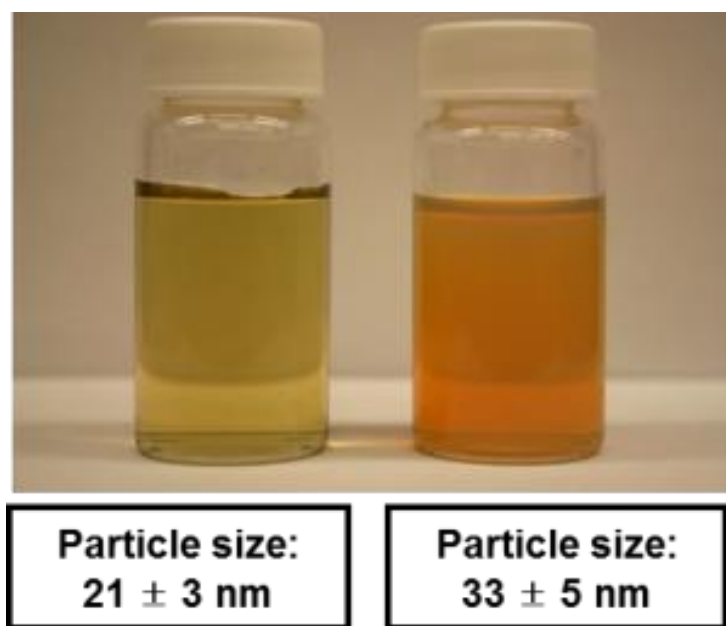


Figura 3. Soluciones acuosas de nanopartículas de plata.

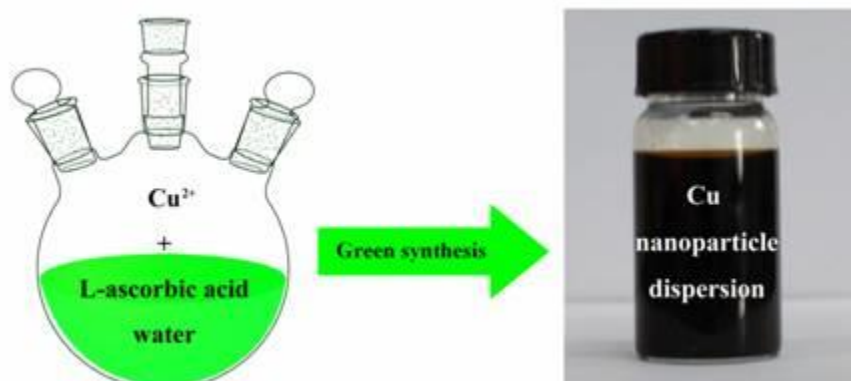


Figura 4. Nanopartículas de cobre en solución acuosa coloidal.

2.6. Microscopía electrónica de barrido

Hoy en día la microscopía electrónica de barrido proporciona una poderosa herramienta que permite el estudio y caracterización morfológica de los nanomateriales y las nanopartículas. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia foto electrónica de dispersión de rayos X (EDS)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades son la alta resolución

(~100 Å), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución (imágenes de electrones secundarios), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie (imágenes de electrones electro dispersados), y un detector de energía dispersiva EDS (espectrómetro de energía dispersiva) permite colectar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas.

Éste produce punto por punto una reconstrucción de la muestra a partir de una señal emitida por la misma muestra. El equipo cuenta con un cañón que genera un haz de electrones de intensidad específica producido mediante la aplicación de un voltaje de aceleración (típicamente de 1-30 keV) a un filamento de tungsteno previamente calentado. Para obtener un haz uniforme de electrones, es necesario mantener la columna del microscopio así como la cámara donde es colocada la muestra, a un alto vacío (10^{-7} Torr). La cámara de vacío está provista de diferentes mandos mecánicos que permiten inclinar, rotar y mover la muestra en diferentes direcciones. El haz de electrones es entonces enfocado para realizar un barrido en la superficie de la muestra mediante unas lentes condensadoras que disminuyen el diámetro del haz de electrones de aproximadamente 15µm en su origen hasta valores del orden de nm al incidir sobre la muestra, unas lentes objetivas que cambian el punto focal y unas aperturas que

cambian la corriente de prueba. El haz se concentra en un diámetro de prueba que puede ser desde 3nm hasta 15nm dependiendo en forma inversa al voltaje utilizado, es decir, es mayor conforme el voltaje es más bajo. En el microscopio electrónico de barrido, además de producirse electrones secundarios, también se generan electrones retrodispersados y fotones de rayos-X característicos durante la interacción del haz de electrones con la muestra.

Cuando el electrón incidente proveniente del haz de electrones expulsa a un electrón del nivel de energía *K*, éste electrón expulsado se convierte en un electrón secundario mientras que el electrón incidente es dispersado fuera de la muestra convirtiéndose en un electrón retrodispersado.

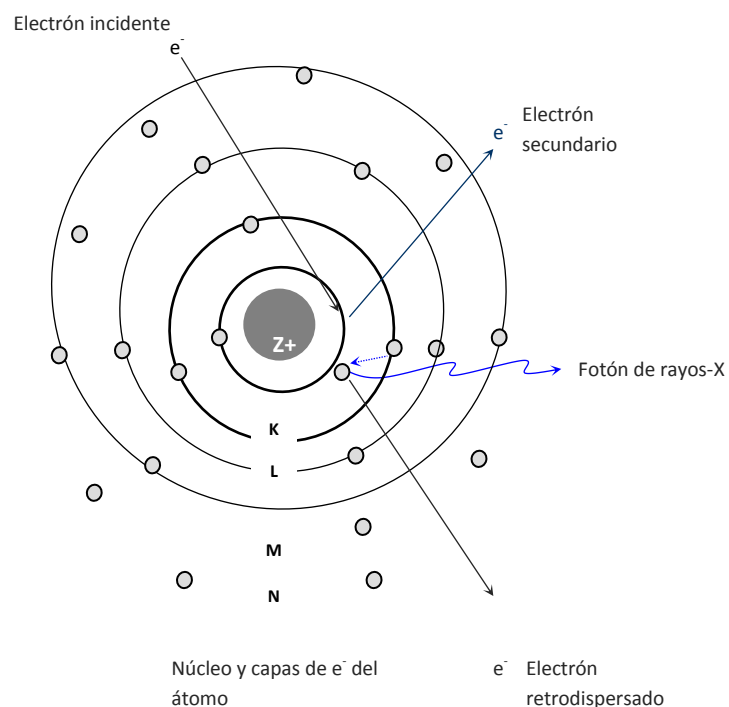


Figura 5. Generación de señales a partir del haz de electrones incidente.

Un electrón del nivel de energía L llena el espacio que quedó en el nivel K y entonces se generan rayos-X (K -alfa), un electrón del nivel de energía M entonces llena el espacio en el nivel L y genera rayos-X (L -alfa) y por último un electrón del nivel N llena el espacio en el nivel M y genera rayos-X (M -alfa). En la Figura se muestra un esquema de la generación de éstas señales^[127]. Dependiendo del voltaje de aceleración y la densidad del material de la muestra puede variar la profundidad hasta la cual los electrones del haz incidente interaccionan con la muestra. La señal de electrones secundarios se absorbe rápidamente por la muestra, de esta manera sólo se detecta la que se origina de 1 a 10 nm de profundidad; la señal de electrones retrodispersados es de mayor energía y se produce a una profundidad de 0.1 a 1 μm mientras que la señal de rayos-X se genera de los 0.2 a 2 μm de profundidad.

- Electrones secundarios

La señal de electrones secundarios nos muestra la morfología de superficie de la muestra. Estos electrones tienen baja energía (menos de 50eV) y son colectados por un detector y después amplificados para obtener una imagen de la muestra a altas magnificaciones de manera que se puedan apreciar pequeños detalles que con un microscopio convencional no se pudieran detectar (Figura). El sistema de detección está constituido por un colector (centellador) capaz de generar luz cuando es excitado por los electrones secundarios y un tubo fotomultiplicador que convierte esta señal luminosa en una señal eléctrica amplificada, capaz de modular el haz de un tubo de rayos catódicos, obteniéndose de esta forma un punto correspondiente de la imagen. La imagen obtenida de la señal de electrones secundarios deriva su contraste, en la

escala de los grises, principalmente de la topografía de la muestra. Las áreas que se encuentran frente al detector tienden a ser ligeramente más claras que las áreas más alejadas y los orificios o depresiones tienden a ser más oscuros mientras que las orillas y superficies inclinadas se observan más claras.

- Electrones retrodispersados

Los electrones retrodispersados tienen mayor energía (mayor a 50eV) y son adquiridos por un detector específico para esta señal. La señal de electrones retrodispersados es causada por la colisión del haz de electrones incidentes con el núcleo de un átomo dentro de la muestra, de esta manera los electrones son reflejados y dispersados hacia fuera de la muestra. Estas colisiones son directamente proporcionales al número atómico y muestran el contraste entre números atómicos o fases. Una fase de mayor número atómico produce más electrones retrodispersados y se obtiene una imagen más clara. Los elementos ligeros se observan como zonas oscuras y los elementos pesados como zonas brillantes. Una imagen originada por los electrones retrodispersados revela diferencias en la composición química por diferencias de contraste.

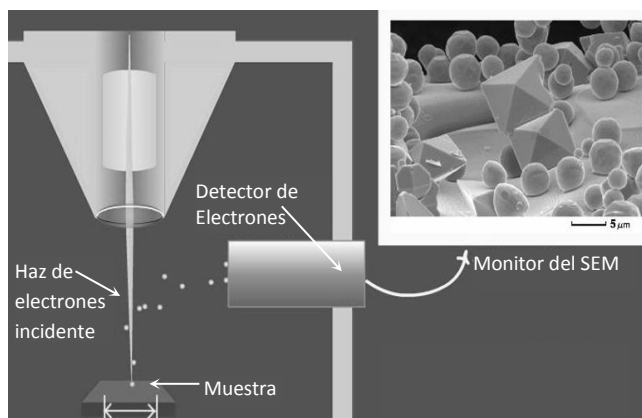


Figura 6. Adquisición de la imagen MEB con electrones.

En la Figura se aprecia la imagen por electrones retrodispersados de un corte transversal realizado a una muestra donde se observa claramente el contraste hay entre los de distintos materiales según su densidad o número atómico. En el área del cobre (Cu) se puede apreciar inclusive la diferencia de contraste debido a la orientación de los cristales.

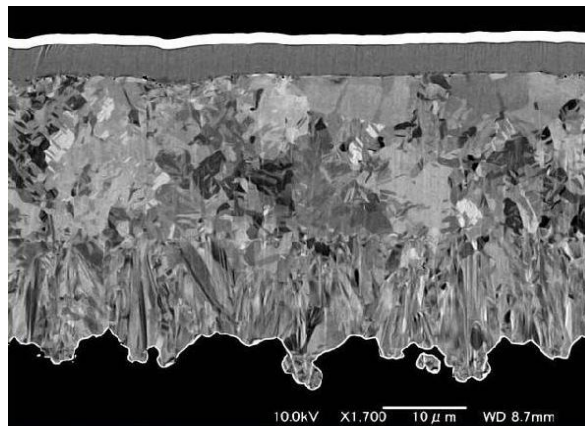


Figura 7. Imagen obtenida por electrones retrodispersados.

- Energía dispersiva de rayos-X

La integración de la espectroscopía de energía dispersa con el microscopio electrónico de barrido hace posible que además de obtener la estructura superficial, se obtenga la composición de la muestra. A este análisis de composición química se le llama Espectroscopia de Energía Dispersiva de rayos-X o EDS. El detector EDS es un dispositivo del estado sólido (Si ó Ge) designado para detectar fotones de rayos-X y convertir su energía en carga eléctrica. Ésta carga se transforma en señal, la cual es procesada de forma que se identifica la energía de rayos-X obteniendo así su origen elemental.

Las señales de rayos-X típicamente son producidas cuando el haz de electrones causa la salida de un electrón de una capa interior. Un electrón de una capa exterior toma su lugar y brinda la salida de un fotón de rayos-X cuya energía puede ser relacionada con su masa nuclear y la diferencia en las energías de los orbitales de los electrones involucrados. El espectro de dispersión de energías se presenta usualmente como un histograma en donde el eje horizontal son unidades de energía en Kilo-electronvoltios (KeV) y el eje vertical nos muestra el número de cuentas o intensidad (Kcnt), que se va auto-ajustando a medida que crece el número de cuentas de la energía del pico más alto. Los rayos-X son clasificados por su energía en forma ascendente, es decir, de un número atómico bajo el cual presenta baja energía, a un número atómico alto con mayor energía. De esta manera se puede conocer la composición elemental de la muestra de interés que se esté analizando.

Normalmente se obtiene un análisis cualitativo de los materiales constituyentes de la muestra, sin embargo, en muestras planas y bien pulidas es posible hacer análisis cuantitativos al comparar la intensidad de los rayos-X con la producida en una muestra estándar (patrón) de composición conocida. Es preciso hacer una corrección (ZAF) en función de tres factores: número atómico (Z), absorción (A) y fluorescencia (F) antes de extraer los resultados cuantitativos. En el interior de la cámara del microscopio electrónico de barrido es donde se encuentran ubicados los tres detectores para las señales que se generan: el detector de electrones secundarios, de electrones retrodispersados y el detector de fotones de rayos-X característicos (Figura).

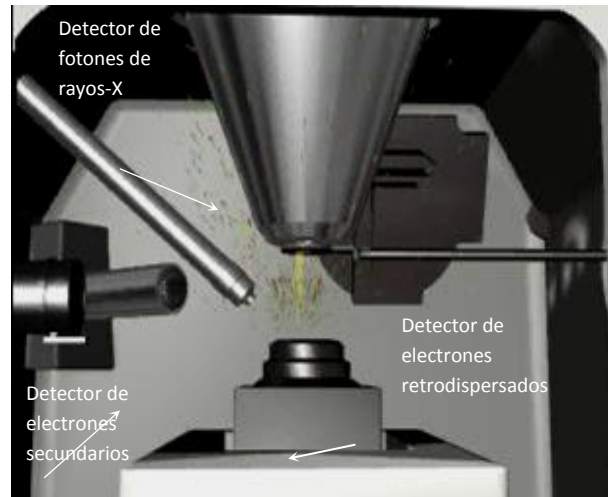


Figura 8. Localización de los detectores en el interior de la cámara del microscopio electrónico de barrido.



Figura 9. Microscopio electrónico de barrido.

2.7 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los primeros instrumentos infrarrojos fueron del tipo dispersivo. Estos instrumentos dispersivos separan las frecuencias individuales de energía de la fuente de emisión infrarroja (foco). Esta separación se lleva a cabo por medio de un prisma o rejilla.

El prisma de infrarrojo es igual que un prisma de luz visible el cual separa la luz visible en sus colores (frecuencias). El prisma o rejilla es un elemento de dispersión que mejor separa las frecuencias de la energía infrarroja. El detector mide la cantidad de energía en cada frecuencia, la cual pasa a través de la muestra.

Este instrumento está basado en el principio del interferómetro de Michelson, que funciona del siguiente modo: la radiación primero golpea a un divisor o separador que escinde el haz de la luz en dos partes iguales (espejo semirreflejante). Estos dos haces de luz interfieren en el divisor después en su viaje de vuelta cuando son reflejados sobre otros dos espejos. Uno dispuesto frente a la trayectoria del haz original (espejo móvil 1) y el otro perpendicular (espejo fijo 2). En esta trayectoria se dispone la muestra y a continuación el detector IR (ver Figura #)

La intensidad resultante de la superposición de los dos haces es medida como función del desfase (s) del espejo móvil en su desplazamiento respecto la posición intermedia. El gráfico resultante (Intensidad vs. Desfase) se denomina interferograma.

La transformación de Fourier se usa como método matemático para el desarrollo en serie la curva obtenida (interferograma). La transformada está constituida por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la

radiación. Gracias a un programa de ordenador este tedioso cálculo matemático se simplifica y se obtienen resultados exactos y rápidos de las frecuencias elementales contenidas en el interferograma. La transformada de Fourier (o desarrollo en serie de Fourier) del interferograma es el espectro ordinario obtenido por aparatos convencionales IR.

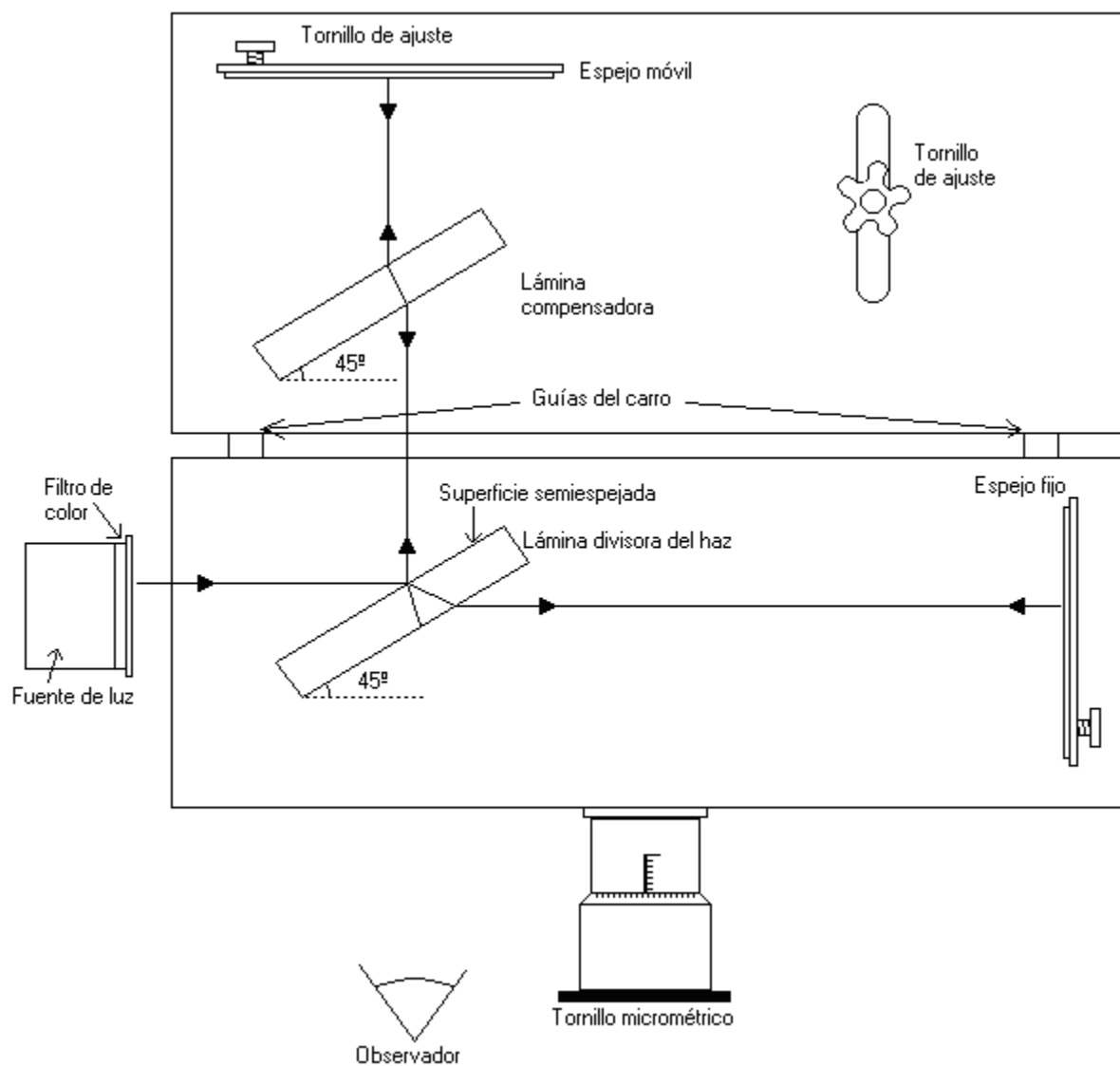


Figura 10. Esquema de un interferómetro de Michelson.

En efecto, el interferograma contiene la absorción completa de la muestra descrita para cada longitud de onda por la correspondiente disminución de intensidad luminosa. El interferograma más sencillo corresponde a una radiación monocromática (una sola frecuencia), obteniéndose una curva función coseno de la frecuencia correspondiente. En cualquier interferograma cada punto contiene datos de todas las frecuencias que contiene el espectro completo y no de una sola frecuencia como en el espectro ordinario.

Así la información de una señal con forma de coseno en el detector (interferograma más simple) sería mostrada después de la trasformada como una sola línea de un número de onda particular (luz monocromática de una sola frecuencia). Pero cualquier interferograma común es el resultado de la combinación de múltiples frecuencias que con la TF es posible descubrir.

2.7.1. Ventajas del método

Las ventajas de este método de IR-TF son básicamente dos:

1. mejorar la resolución de los espectros
2. obtener mayor sensibilidad

La mejora de sensibilidad es consecuencia de una mayor energía de flujo del haz de luz hasta llegar al detector y de la mejora de la relación señal/ruido (S/N) por promediación de interferogramas. Es tan notable el avance de sensibilidad que en el

momento en que tecnológicamente se pudieron hacer interferómetros de Michelson baratos y precisos prácticamente todos los espectrofotómetros comerciales IR en la actualidad son IR-TF.

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

Capítulo 3

Experimentación

3.1. Soluciones de nanopartículas de plata, cobre y oro

Para la experimentación fueron utilizadas soluciones acuosas coloidales diluidas de nanopartículas de plata, cobre y oro, preparadas en el Laboratorio de Corrosión y Materiales, por reducción química y electroquímica utilizando sales tales como el nitrato de plata (AgNO_3), nitrato de cobre (CuNO_3) o ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Como especies reductoras y estabilizadoras de las soluciones coloidales se utilizaron citrato de sodio y soluciones glucosa. Para la reacción electroquímica se utilizaron electrodos de alta pureza de plata, oro y cobre, y contraelectrodos de platino.

3.2 Reactivos:

- Quitosán . Sigma Aldrich
- Ácido Ascórbico. Sigma Aldrich
- Agua desionizada

3.3 Material y Equipo:

- Vaso de precipitados Pyrex de 2000 ml
- Agitador magnético. Thermolyne
- Termómetro de -10 a 110 C
- Barra de agitación magnética de 2 pulg x 3/16 de pulg
- Balanza Analítica con precisión de 0.00001 g.
- Placa eléctrica de calentamiento.
- Espectrofotómetro Spectrum One de Perkin Elmer.
- Microscopio electrónico de barrido JEOL 6010.

3.4 Preparación de las mezclas acuosas de Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ

En un vaso de precipitados se agregaron 1800 ml de agua desionizada. 3168 mg de ácido ascórbico y 288 mg de quitosán. Se cubrió el vaso de precipitados para evitar evaporación. Posteriormente se dejó mezclando la solución por medio de agitación magnética, a una temperatura de 25° C para obtener los complejos de Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ.

Durante las tres primeras horas aún eran visibles las partículas en suspensión correspondientes a quitosán. Se continuó con el proceso de agitación y al final de 24 horas la solución se volvió totalmente transparente y homogénea. Después de una semana la solución permanecía transparente con un ligero color amarillento.

3.5 Funcionalización de las mezclas acuosas de Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ

Se utilizaron soluciones coloidales de nanopartículas de Ag, Au y Cu con tamaño de 10 a 20 nm en concentraciones de 10 partes por millón (ppm). Posteriormente se mezclaron los dos reactantes, el complejo de ascorbato de quitosán a temperatura ambiente en todas las pruebas y la solución de nanopartículas Ag, Au y Cu, mismas que fueron preparadas a diferentes temperaturas.

En este proceso se reaccionó quitosán con ácido ascórbico, obteniendo una mezcla de ascorbato de quitosán. La cantidad de ácido ascórbico reaccionada con quitosán fue la mínima requerida para que fuera soluble en medio acuoso.

Posteriormente se agregaron las nanopartículas de Ag, Cu y Au por separado para funcionalizar cada una de ellas, en las mezclas de ascorbato de quitosán en solución acuosa. Estas nanopartículas se recubrieron en el grupo OH de la heteromolécula del ácido ascórbico.

Este recubrimiento de las nanopartículas metálicas por la heteromolécula del ácido ascórbico, pueden formar diferentes estructuras, bidimensionales y tridimensionales tomando como punto de unión la nanopartícula, lo cual nos da una estructura amorfa. La cantidad de nanopartículas es casi un infinitésimo -1 molar de la cantidad del quitosán. Es decir, tomando en cuenta el número de Avogadro que 1 mol es 6.02×10^{27} átomos o moléculas, tenemos una gran cantidad de monómeros de glucosamina, mismos que reaccionan en forma aleatoria con el ácido ascórbico formando el ascorbato de quitosán.

Obteniendo de esta manera, longitudes cortas y largas con unidades de ascorbato de glucosamina dentro del polímero de carbohidrato de quitosán. Así, como una gran cantidad de unidades de glucosamina libres.

Debido a la poca cantidad de unidades de ascorbato de glucosamina formadas y a la cantidad picomolar de nanopartículas metálicas, existe la probabilidad que sea muy difícil que dos o más cadenas que contengan unidades de ascorbato de glucosamina se recubran, lo que nos dará una estructura algo así como un collar muy largo con perlas recubiertas en grandes longitudes, y con una ligera probabilidad de que haya un polirecubrimiento de unidades de ascorbato de glucosamina sobre la superficie de la nanopartícula metálica.

La Tabla 1, muestra las condiciones bajo las cuales fueron preparadas las soluciones funcionalizadas del complejo de ascorbato de quitosán con las nanopartículas de Ag, Au y Cu.

3.6 Caracterización de los productos: Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ por FT-IR

Las muestras se caracterizaron mediante espectroscopia FT-IR. Mismas que se depositaron en el porta muestra del espectrofotómetro, hasta obtener una película de concentración suficiente, para obtener un buen espectrograma, con buena definición de las bandas de la muestras (transmitancia >80) para su posterior interpretación.

Prueba	Medio	Metal	Temperatura ° C (Sol. coloidal)	ppm finales	Potencial Redox mV	Apariencia Final
1	CH-AA	Ag	50-70	132	67.6	Transparente
2	CH-AA	Ag	26	123	143.7	Lechoso crema
3	CH-AA	Au	24	28	127	Rosáceo
4	CH-AA	Ag	103	124	138.3	Lechoso crema
5	CH-AA	Ag	102	119	127.6	Lechoso gris
6	CH-AA	Ag	90	136	123.8	Morado

Tabla 2. Parámetros de reacciones para la obtención de recubrimientos con el complejo de ascorbato de quitosán con nanopartículas de Ag, Au y Cu.

Las muestras de estudio fueron las siguientes:

- Ácido Ascórbico
- Quitosán
- Mezcla ácido ascórbico y quitosán en medios acuosos
- Ag NP-AQ, Cu NP-AQ y Au NP-AQ

Para los análisis de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo con dispositivo de atenuación de reflectancia ATR, como el que se muestra en la Figura 11.

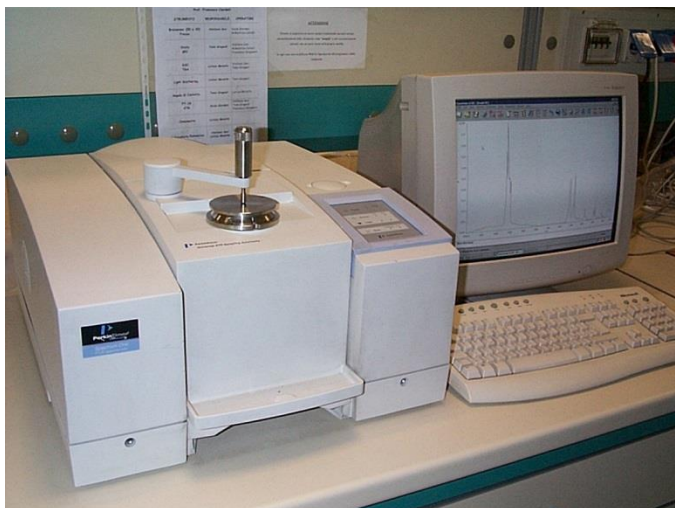


Figura 11.: Espectrofotómetro Perkin Elmer. Modelo Spectrum One.

Capítulo 4

Análisis de Resultados y Discusiones

4.1. Nanopartículas de plata, cobre y oro

Las soluciones acuosas coloidales de nanopartículas de plata oro y cobre fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido y transmisión, para verificar su morfología y tamaño. Los resultados son mostrados en las Figuras 4.1 a 4.3.

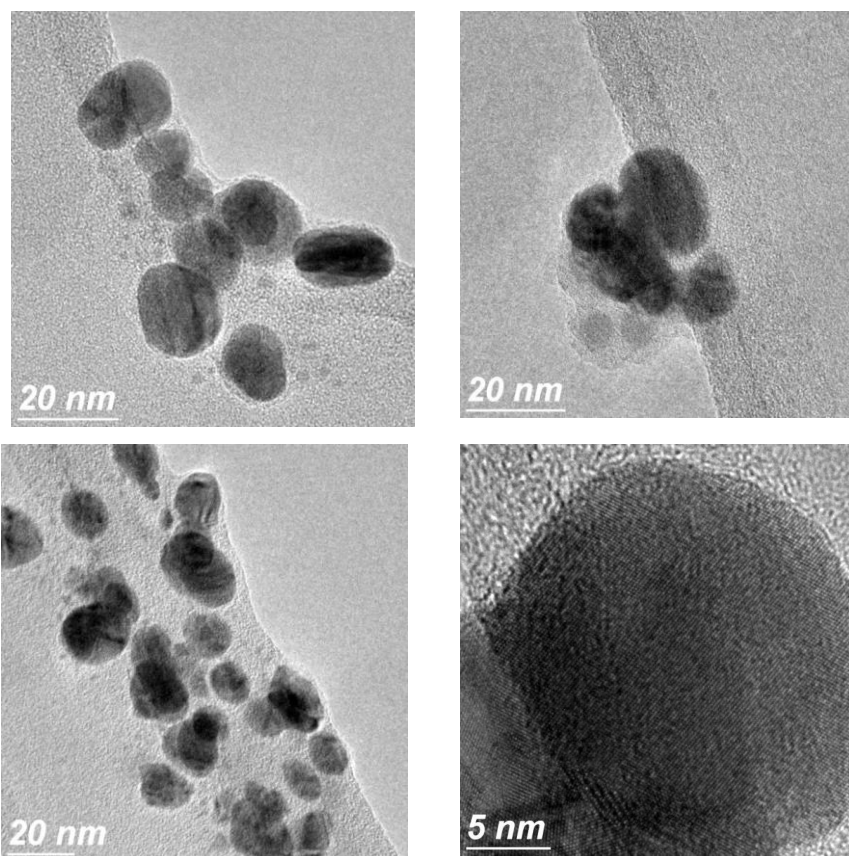


Figura 12.. Análisis de nanopartículas de plata con microscopio electrónico de transmisión. El rango de tamaño de partícula es de 10 a 20 nm.

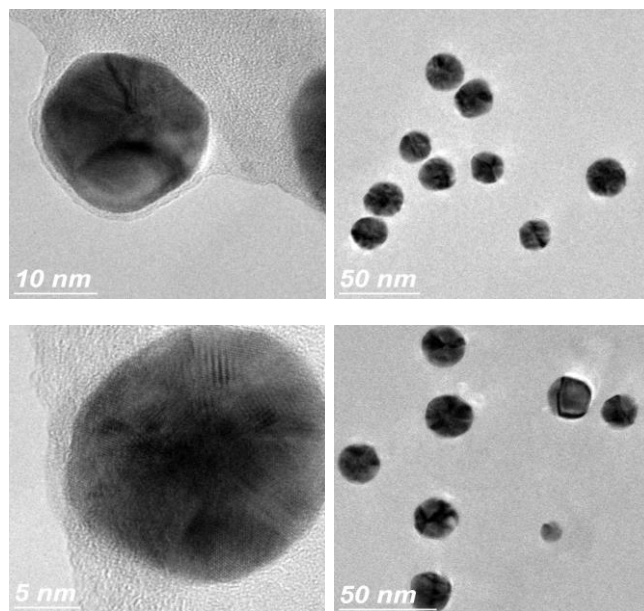


Figura 13. Análisis de nanopartículas de oro con microscopio electrónico de transmisión. El rango de tamaño de partícula es de 15 a 20 nm.

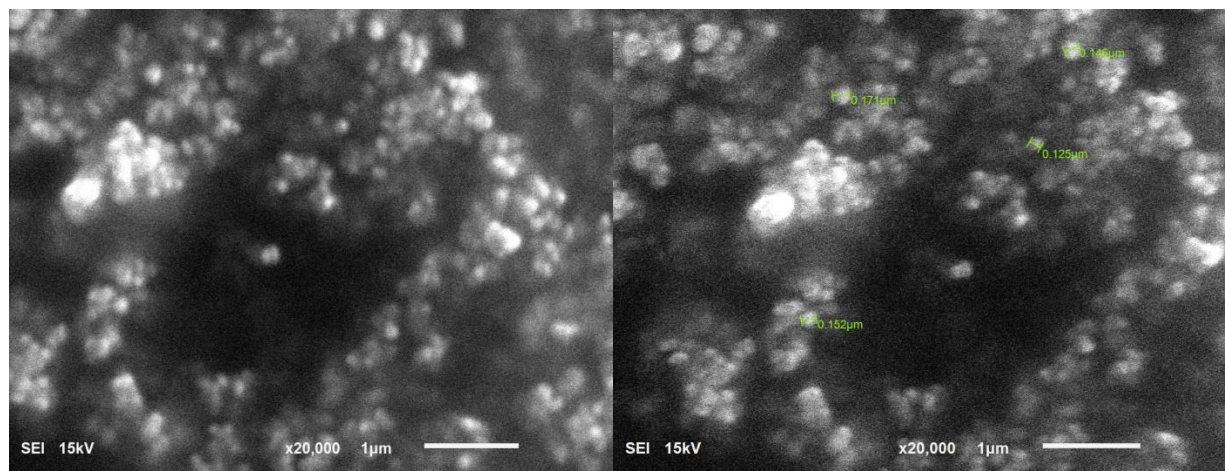


Figura 14. Análisis de morfología por microscopia electrónica de barrido de una solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de cobre formando clusters de 120 a 170 nm.

Las películas funcionalizadas de quitosán ácido ascórbico y nanopartículas también fueron analizadas en el microscopio electrónico de barrido para conocer acerca de su morfología y capacidad de formación de película, para ello fue necesario evaporar a temperatura ambiente la solución coloidal acuosa sobre pequeñas placas de aluminio pulido a espejo. Para verificar su composición química se utilizó el equipo de EDS (electrones dispersados de rayos X) que se encuentra adaptado al microscopio. En la Figura 4.4. se muestra el resultado del análisis realizado a la solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de oro.

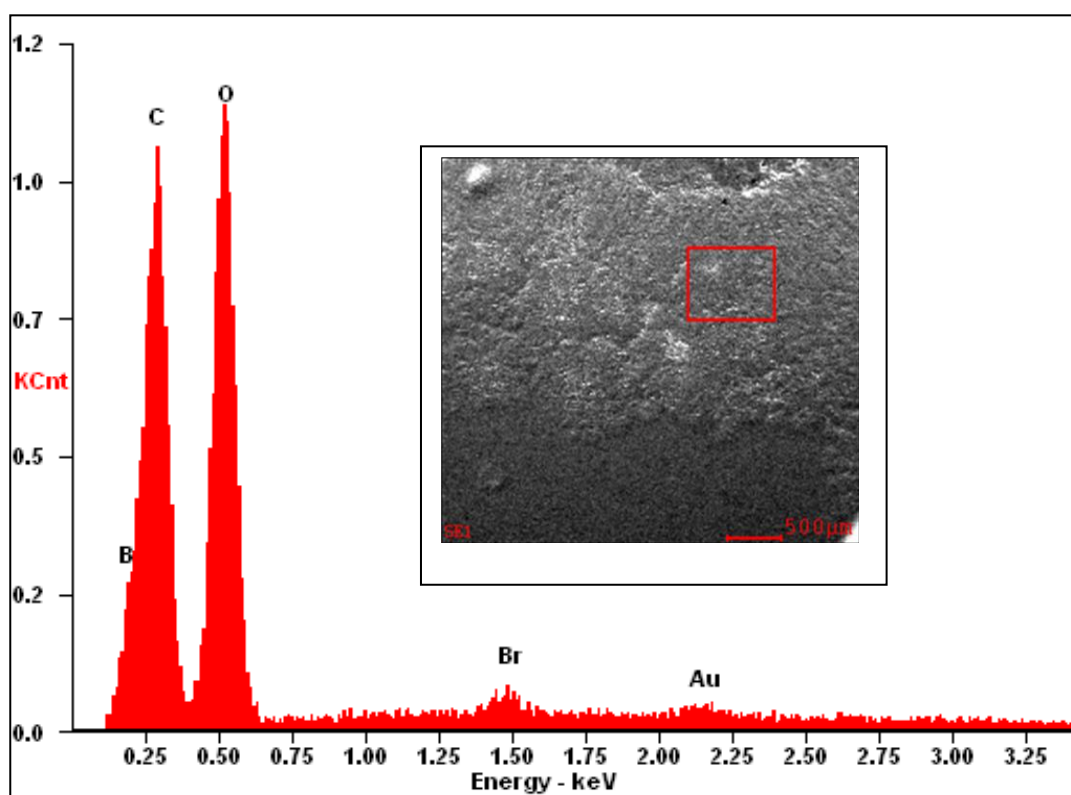


Figura 15. Análisis de microscopio electrónico de barrido y EDS realizado a la solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de oro.

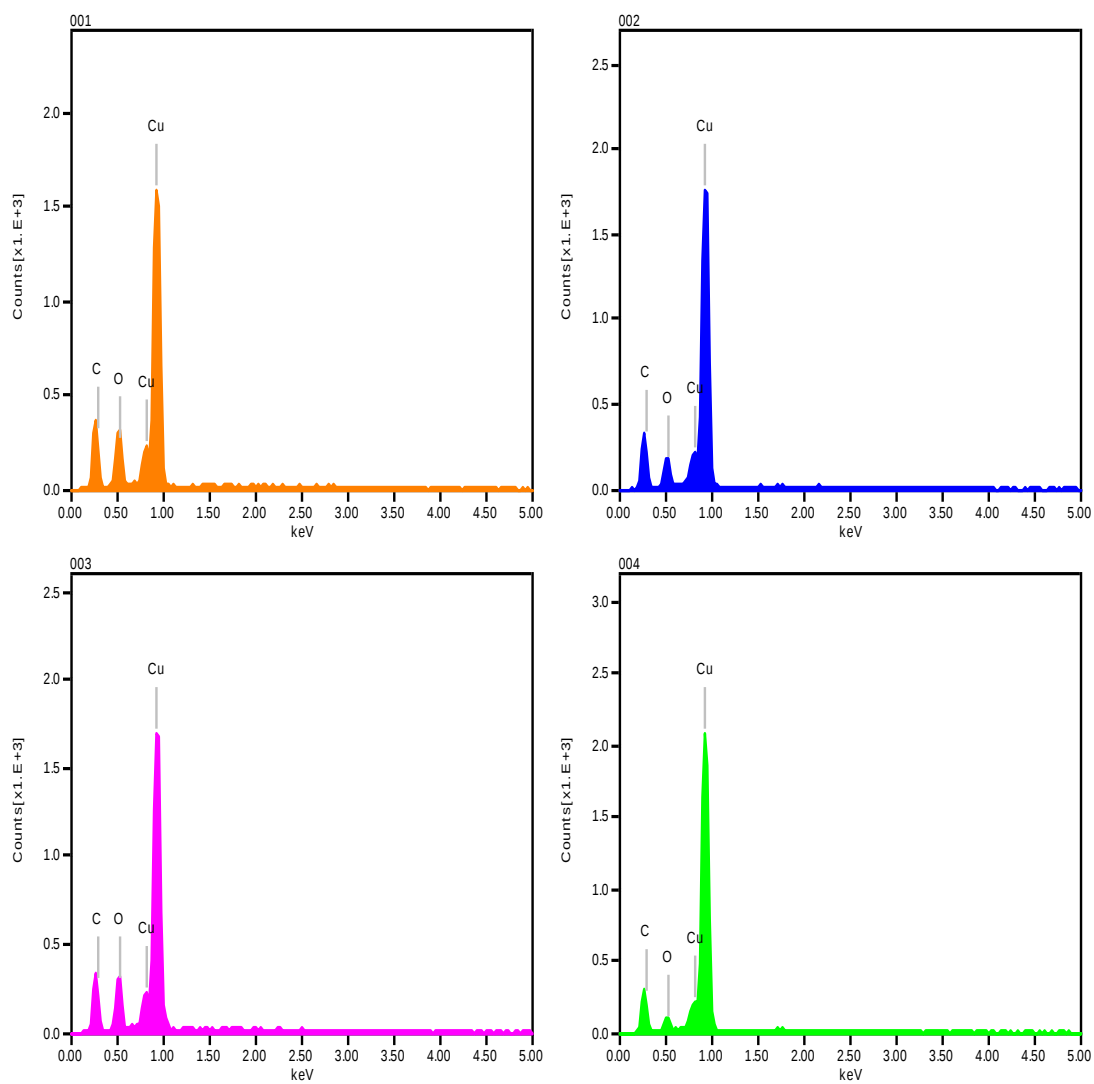


Figura 16. Análisis químico de EDS para la solución de quitosán ácido ascórbico funcionalizado con nanopartículas de cobre formando clusters de 120 a 170 nm.

4.2. Análisis FTIR de complejos de quitosán ácido ascorbico y nanopartículas de plata, oro y cobre.

Los productos resultantes de las reacciones entre el quitosán de medio peso molecular y el ácido ascórbico, así como sus complejos formado por la interacción con soluciones acuosas de nanopartículas de plata, oro y cobre en condiciones de agitación y temperaturas de alrededor de 100 °C, fueron analizados por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier.

Los resultados son mostrados en las Figuras 17 a la 24. Todos los espectros fueron realizados en el rango de 650 a 4000 cm^{-1} y a un promedio de 12 barridos por muestra, la cual fue concentrada sobre el dispositivo ATR por evaporación de gotas de la solución acuosa correspondiente.

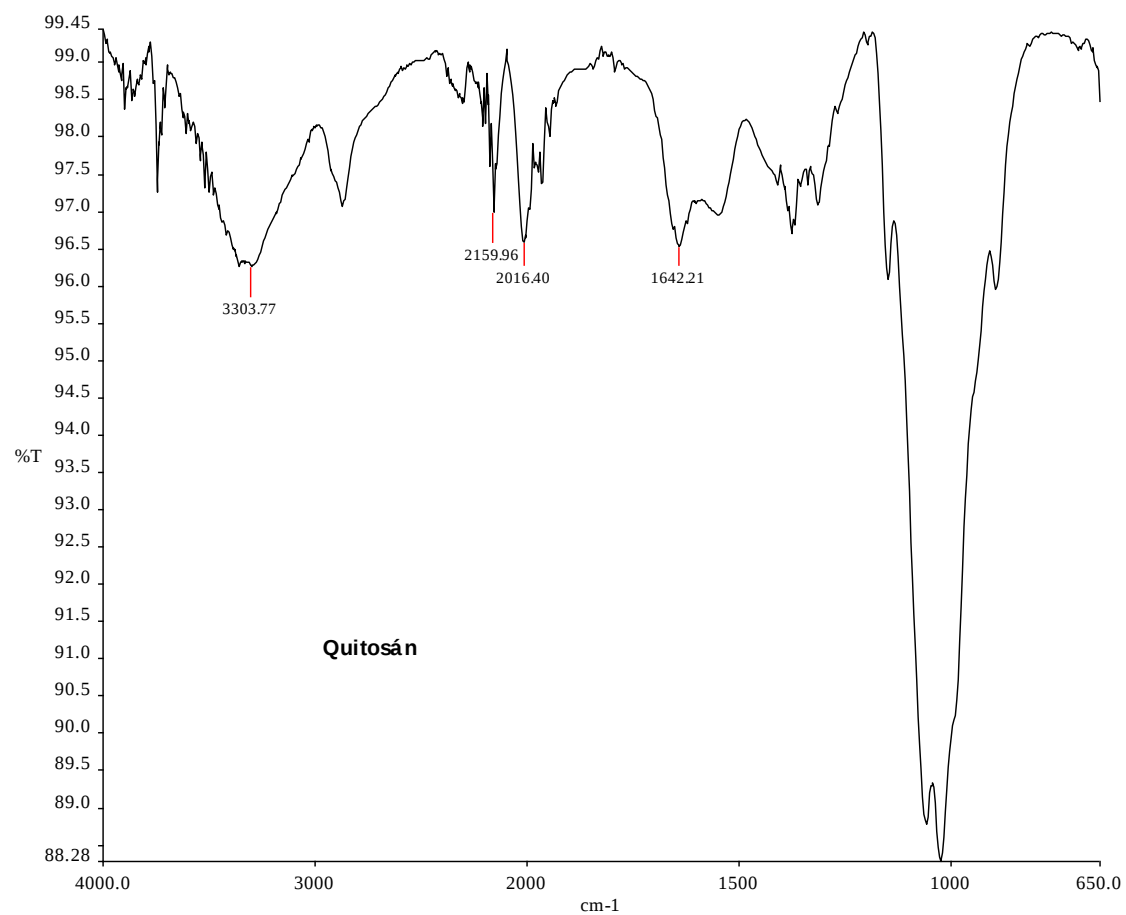


Figura 17. Espectrograma FTIR del quitosán.

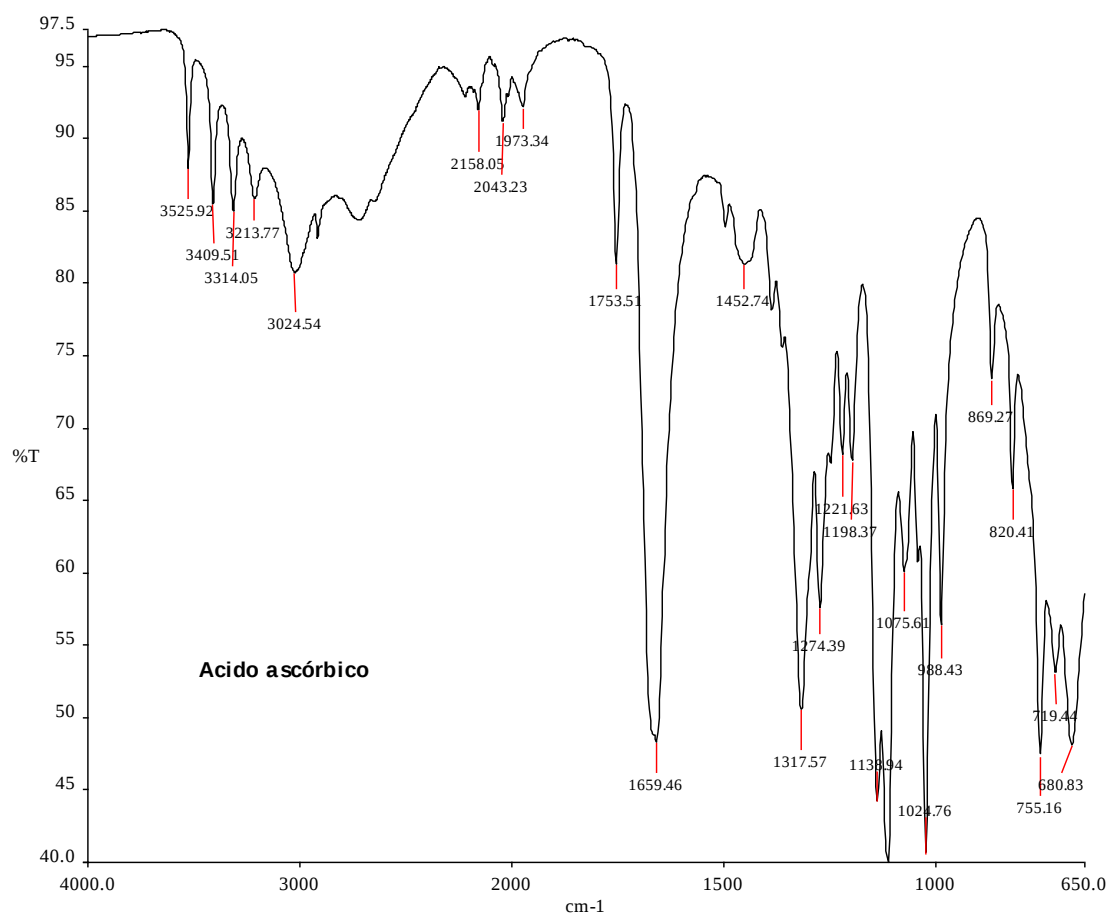


Figura 18. Espectrograma FTIR del Ácido ascórbico.

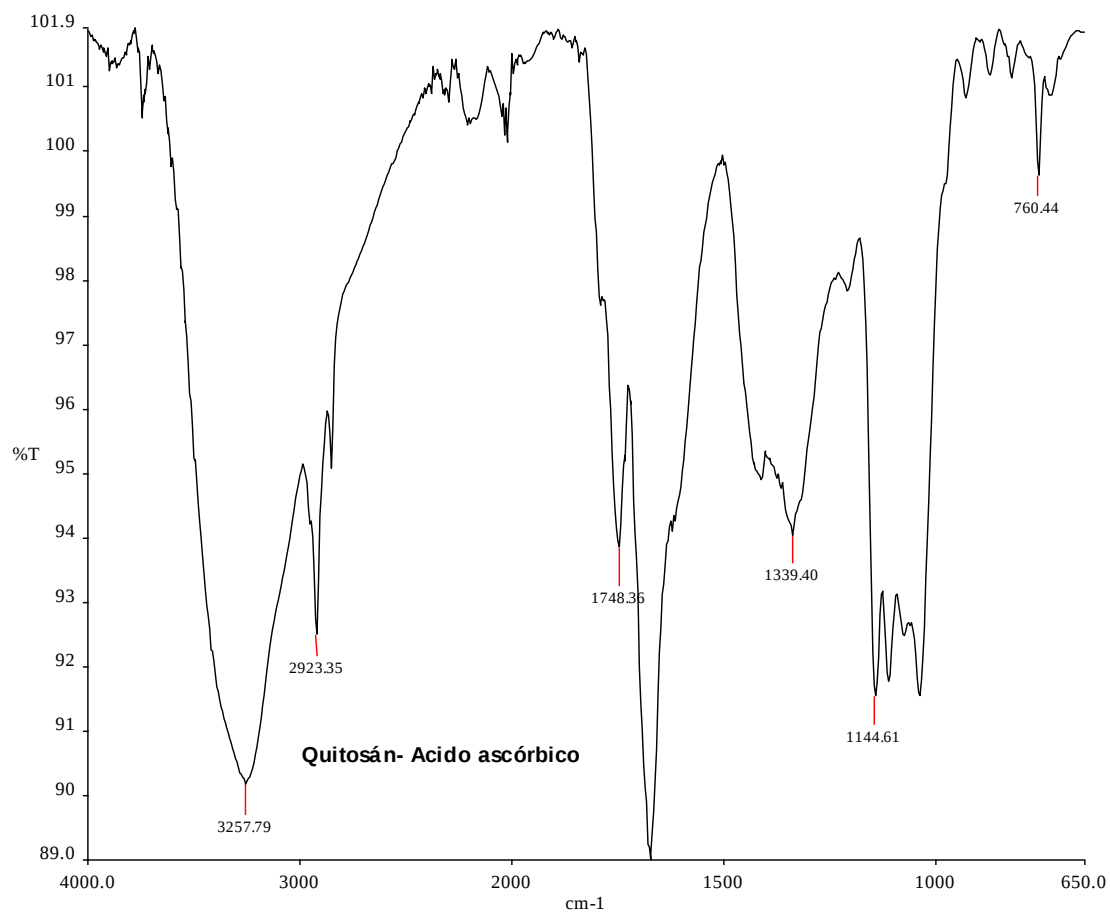


Figura 19. Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico.

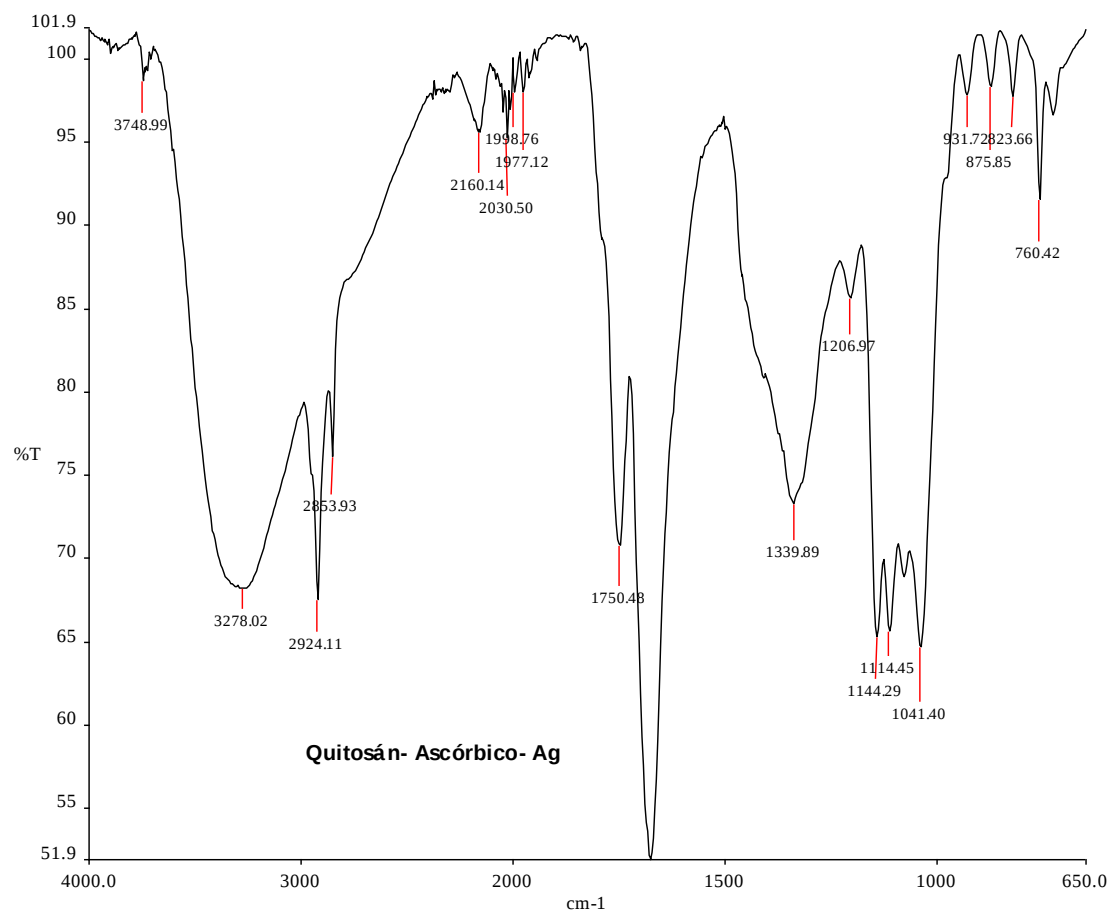


Figura 20. Espectrograma FTIR de Qitosán-Ácido ascórbico-Ag.

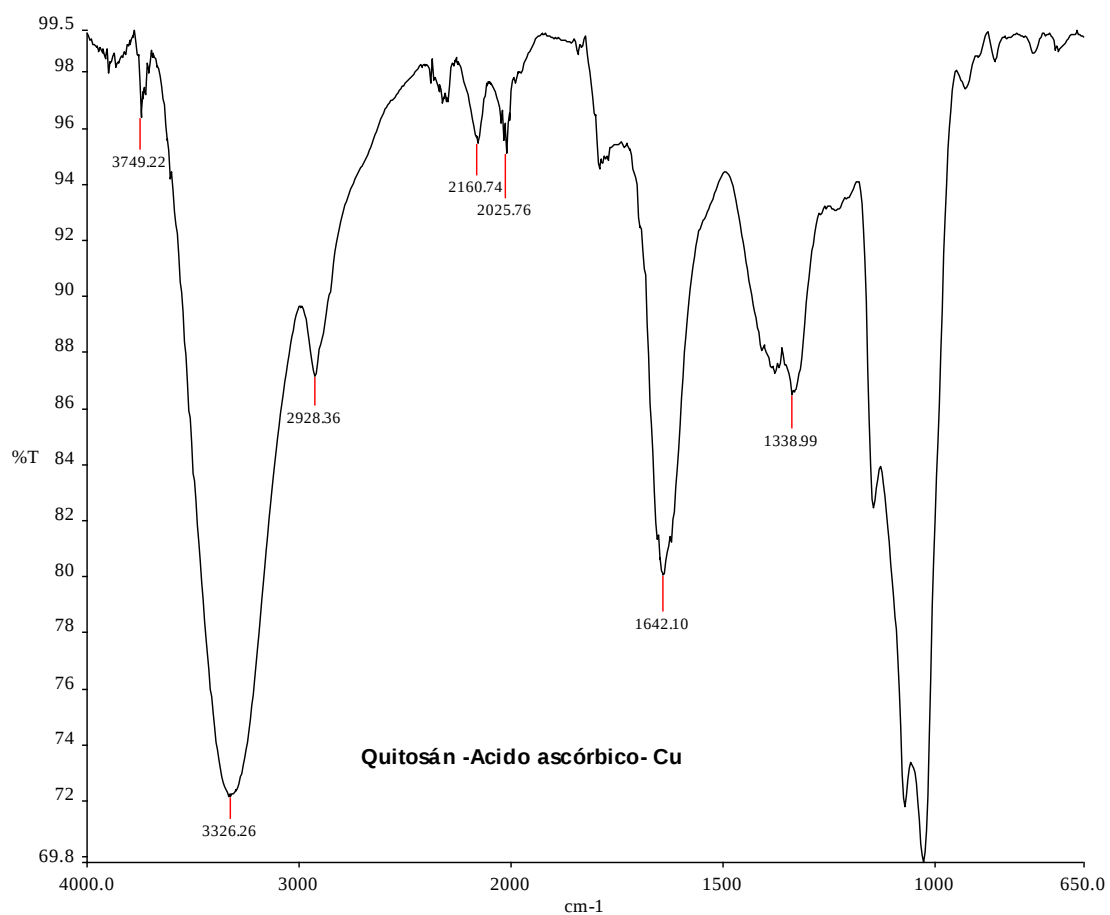


Figura 21. Espectrograma FTIR de Qitosán-Ácido ascórbico-Cu.

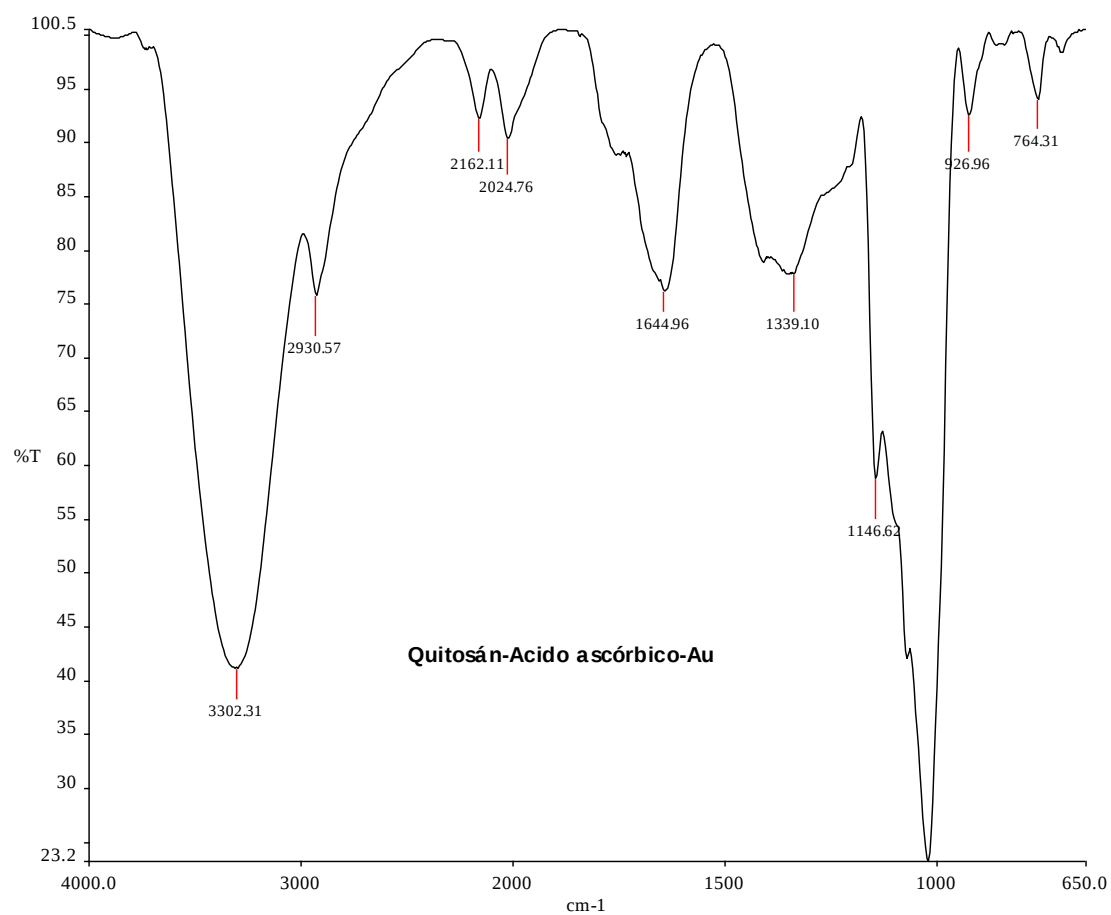


Figura 22. Espectrograma FTIR de Qitosán-Ácido ascórbico-Au.

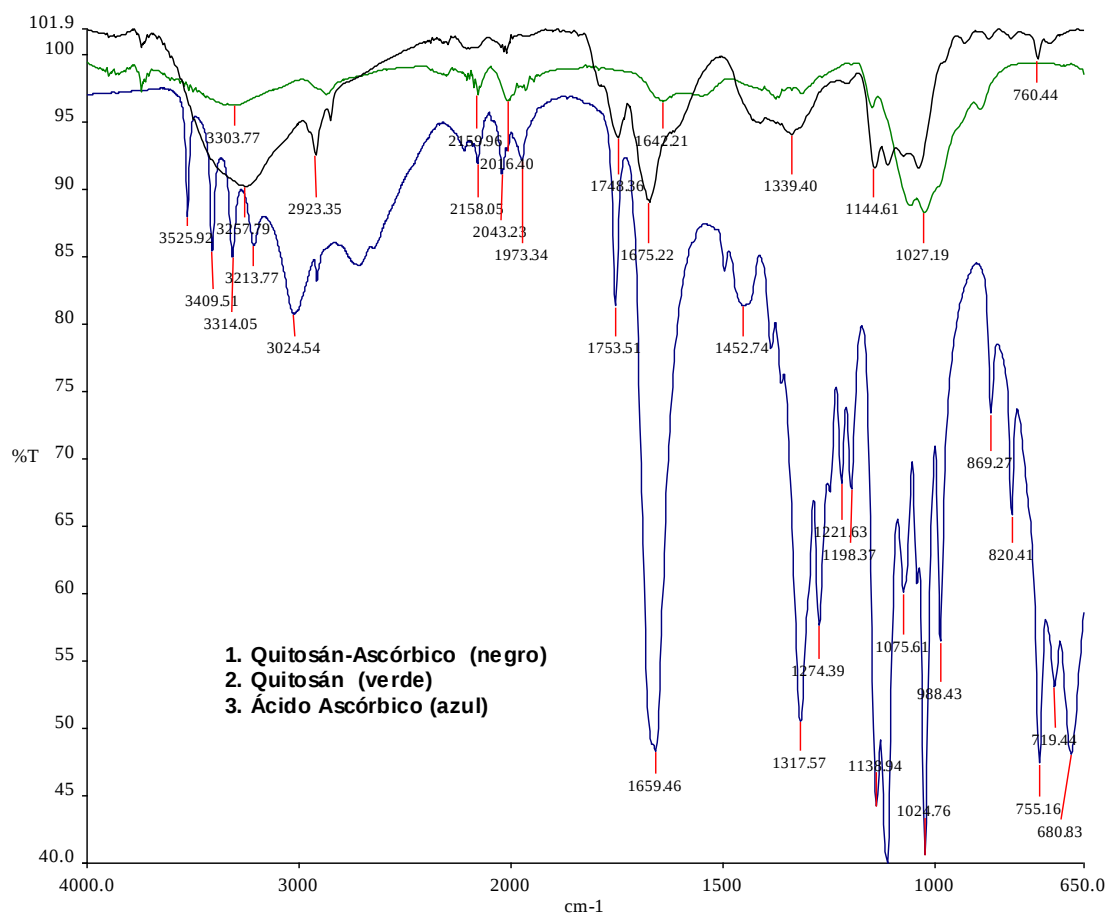


Figura 23.Espectrograma FTIR de Quitosán-Ácido ascórbico, Quitosán y Ácido Ascórbico.

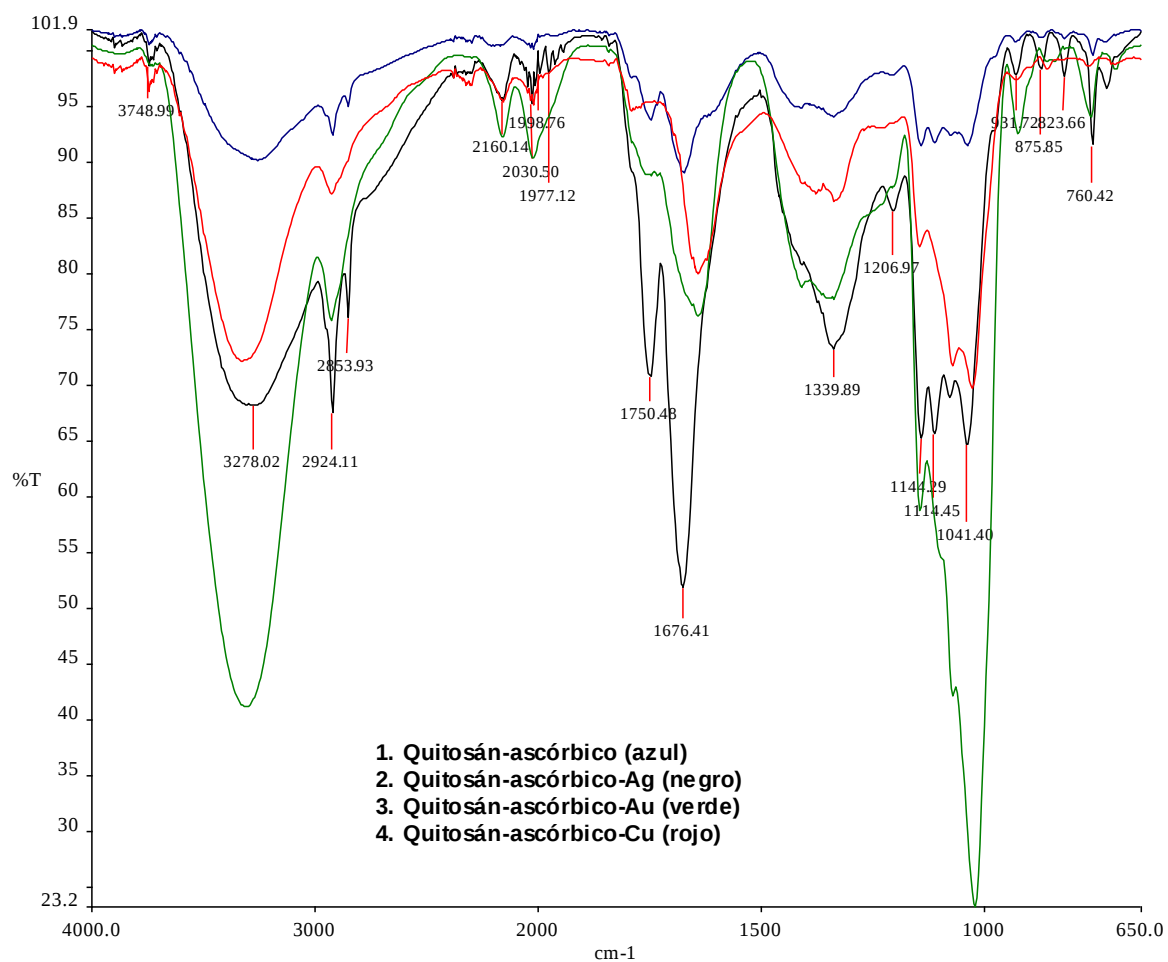


Figura 24. Espectrograma FTIR de Qitosán- ascórbico, Qitosán - ascórbico -Ag, Qitosán - ascórbico-Au, Qitosán – ascórbico-Au, Qitosán – ascórbico-Cu.

4.3. Posibles estructuras y arreglos

De las seis pruebas realizadas, se tomaron espectros infrarrojos, cada espectro de la solución de ascorbato de quitosán funcionalizada con partículas metálicas, se comparó con el espectro infrarrojo del ascorbato de quitosán, notándose la presencia de sales de amina (complejos de amina), así como de grupos carbonilo, correspondientes al ácido ascórbico y a la quitina (4.5 %) que está presente en el Quitosán de medio peso molecular comprado de Sigma Aldrich, mismo que se incorpora en un determinado porcentaje con la nanopartícula metálica, formando un recubrimiento alrededor de la nanopartícula metálica.

A partir del análisis del comportamiento de las bandas principales de los espectros FTIR, se proponen las posibles estructuras moleculares que se muestran en las Figuras 25 a la 28.

Los espectros de FTIR de chitosan + ascórbico funcionalizados con las nanopartículas de plata, oro y cobre son muy similares. Un amplio pico se observa en un rango de 3400 a 3200 cm^{-1} , atribuido a los 4 grupos $-\text{OH}$ de C6, C3, C5 y C2 de la vitamina C.

En la banda de 1720-1750 cm^{-1} , se presenta un pequeño hombro, atribuido a las vibraciones de estiramiento de la lactona $\text{C}=\text{O}$, formando enlaces de hidrógeno intermolecular en ácido ascórbico, además de un pico intenso a 1640 a 1670 cm^{-1} atribuido a la amida ($\text{C}=\text{O}$).

Una banda de absorción característica de vibraciones de flexión de $-\text{NH}_3^+$ aparece a 1615 cm^{-1} aproximadamente para los complejos con oro y cobre. Este resultado sugiere que los grupos $-\text{NH}_2$ de las cadenas de quitosán fueron protonados por los H^+ , inducidos por la acidez del ácido ascórbico en la solución. Una débil vibración de deformación de $\text{C}-\text{CH}_3$ aparece a 1340 cm^{-1} , indicando un alto grado de des-acetilación del quitosán utilizado.

Otra explicación puede ser en función de que la nanopartícula presente en los diferentes complejos del ascorbato de quitosán, está recubierta por el grupo OH con el que tiene el PKa mayor, y el grupo OH con PKa menor forma la sal con el grupo amino de la glucosamina que es el monómero de la quitosán o quitina desacetilada.

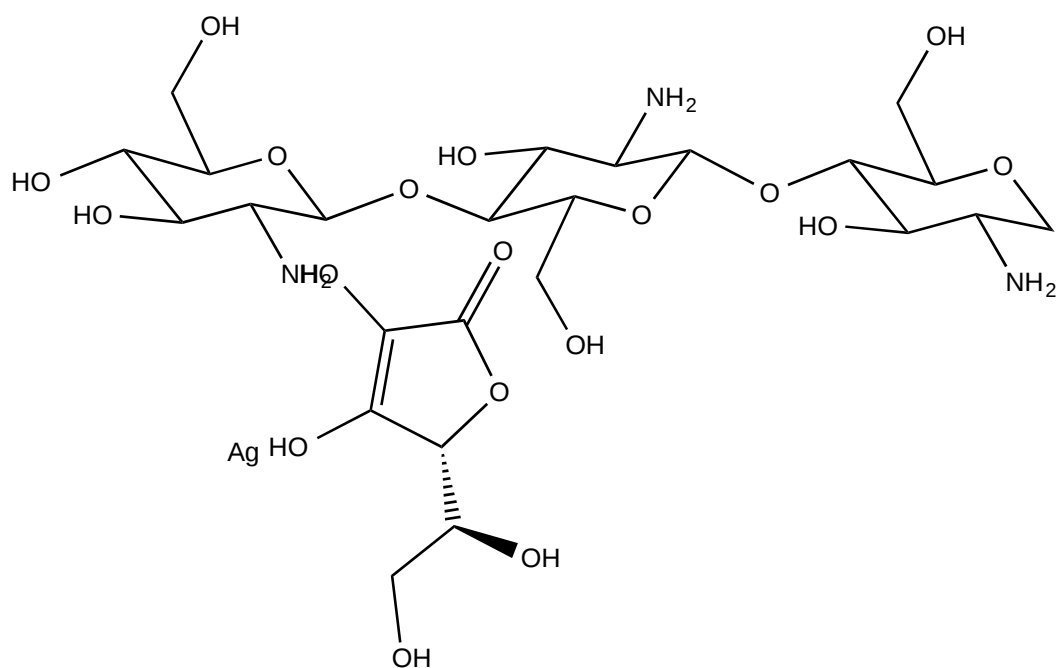


Figura 25. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán

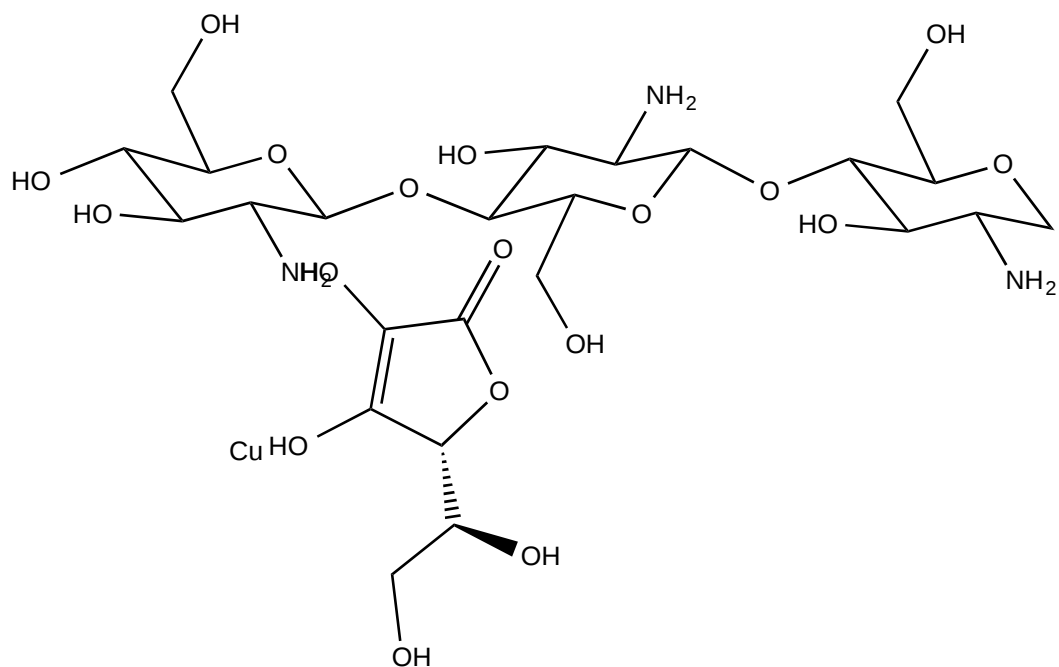


Figura 26. . Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Cobre (Cu).

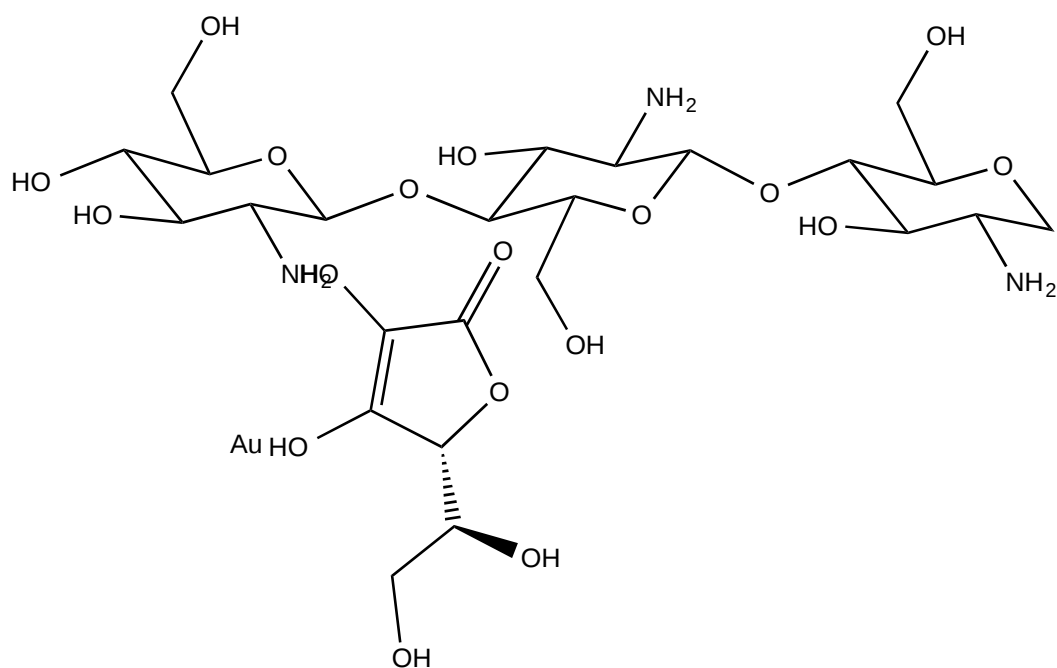


Figura 27. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Oro (Au).

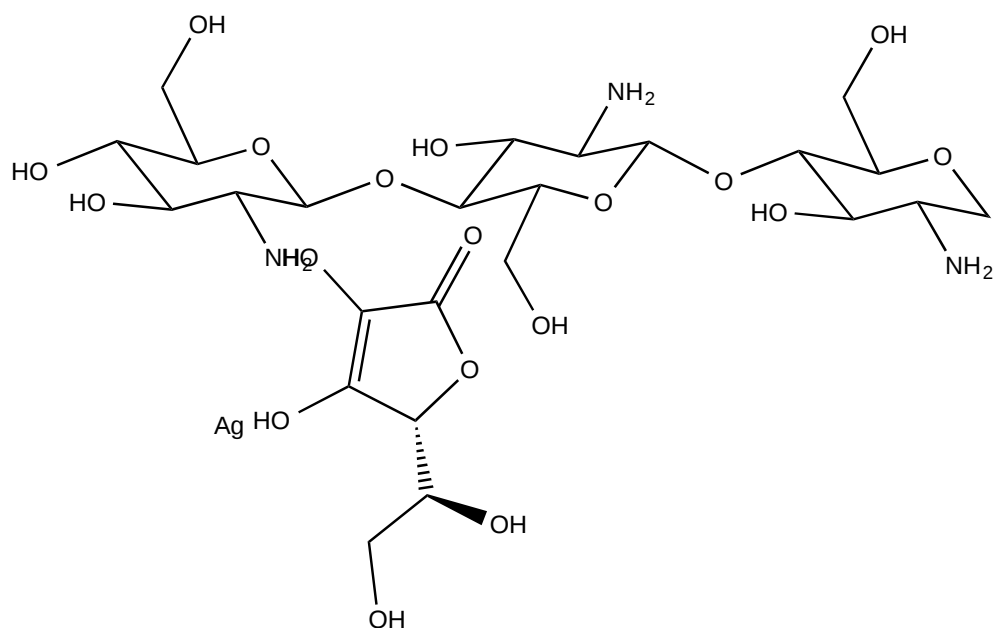


Figura 28.. Posible estructura mezcla Ácido Ascórbico – Quitosán funcionalizada con Plata (Ag).

En el ascorbato de quitosán existen muchos grupos amino que no reaccionaron con el ácido ascórbico. Suponiendo que un grupo amino de la glucosamina que reaccionó con el ácido ascórbico formando ascorbato de quitosán y un tramo (longitud) de distancia considerable de grupos amino libres (unidades o monómeros de glucosamina) y después otra molécula de ácido ascórbico que va a reaccionar con la glucosamina formando el ascorbato de quitosán; que recubre la nanopartícula metálica, este tramo libre de grupos amino, forma una cuerda o catenaria cuyo tamaño depende de la distancia que exista entre las moléculas de ascorbato de quitosán y el recubrimiento con la nanopartícula metálica.

Según la forma de la nanopartícula metálica es el trayecto que sigue la cadena polimérica que formó una especie de envoltura sobre la nanopartícula metálica. Es decir, esta cadena polimérica de considerable longitud puede estar recubriendo parte del área superficial de la nanopartícula, en una especie de micela que estabiliza a la misma en la solución acuosa coloidal.

Aun cuando la concentración de las nanopartículas en solución coloidal pareciera baja (10 ppm), la cantidad de nanopartículas es del orden de 10^{12} . Sin embargo, es difícil predecir una posible estructura final de las nanopartículas metálicas recubiertas, ya que intervienen variables, como velocidad de agitación, temperatura, peso molecular del quitosán. Dando una estructura tridimensional en la cual una nanopartícula puede estar

recubierta por varias cadenas compuestas de ascorbato de glucosamina. Esto hace que quede la cadena no recubierta libre y en conjunto todas las cadenas libres alrededor de la nanopartícula metálica forman una micela como ya mencionamos anteriormente y que actúa como recubrimiento

Debido a este fenómeno conocido como “Caped”, las micelas formadas corresponden al número de ppm de nanopartículas presentes, lo cual le da estabilidad a la nanopartícula recubierta por el ascorbato de quitosán, alargando la vida de suspensión de ésta en la solución acuosa coloidal.

Muchos monómeros de glucosamina quedan libres, formando el equivalente a oligómeros, por su cadena corta de monómeros de glucosamina separados por el monómero que forma el ascorbato de quitosán, permitiendo que se recubra uno de los grupos ácido (grupo carbonilo) del ácido ascórbico.

Los grupos amino no convertidos en sales forman un arco o una cuerda entre ambas amidas que son adsorbidas formando un recubrimiento total alrededor de la nanopartícula metálica, quedando cadenas de quitosán libres alrededor de ella, formando un arreglo micelar tridimensional, lo que le da estabilidad, evitando su precipitación, así como su posterior aglomeración.

Se caracterizaron los compuestos sintetizados con la finalidad de ver si la plata fue recubierta por el ascorbato de quitosán, así como la formación del Acetato de quitosán y las nanopartículas recubiertas por el ascorbato de quitosán.

Esta presentación de nanopartículas recubiertas con la mezcla de ácido ascórbico-quitosán forman un coloide en solución acuosa y se aplica en medio acuoso, también se pueden formar películas de nanopartículas de quitosán, esparciendo el líquido en una superficie y dejando evaporar el agua, repitiendo esto varias veces para aumentar el espesor de la película formada y así obteniendo otra forma de aplicarse en forma de película sobre la superficie requerida, además de la aplicación en forma coloidal.

Todas las mezclas de ácido ascórbico - quitosán fueron funcionalizadas con soluciones acuosas conteniendo nanopartículas (10-20 ppm) de Plata, Cobre y Oro, sintetizadas en el laboratorio por medios electroquímicos y de reducción química.

Conclusiones

A partir de los resultados anteriormente comentados, se concluye que la mezcla de ácido ascórbico – quitosán si fue funcionalizada por las nanopartículas metálicas utilizadas de Au, Ag y Cu.

Las seis muestras preparadas presentan diferente apariencia debido a las condiciones de temperatura y agitación utilizadas durante su preparación, así como seguramente a la orientación y conformación tridimensional de los nanoclusters formados por la interacción del complejo de ascorbato de quitosán y las nanopartículas metálicas. Sin embargo esta parte de conformación estructural no fue estudiada en el presente trabajo.

Se comprueba que el ácido ascórbico tiene doble función: formar el recubrimiento alrededor de la nanopartícula metálica, un grupo ácido reacciona con el grupo amino y el otro grupo ácido se recubre con la nanopartícula metálica, sirviendo de anclaje de la película de quitosán, estos puntos de anclaje están espaciados, lo que hace que la película de quitosán forme una carpa, pudiendo tener formas irregulares en función de la distancia entre cada molécula de ácido ascórbico como de un punto de anclaje.

En el ascorbato de quitosán existen muchos grupos amino que no reaccionaron con el ácido ascórbico.

Aun cuando la concentración de las nanopartículas en solución coloidal pareciera baja (10 ppm), la cantidad de nanopartículas es del orden de 10^{12} . Sin embargo, es difícil predecir una posible estructura final de las nanopartículas metálicas recubiertas, ya que intervienen variables, como velocidad de agitación, temperatura, peso molecular del quitosán.

Según la forma de la nanopartícula metálica es el trayecto que sigue la cadena polimérica que se recubrió con la nanopartícula metálica, esta cadena polimerizada por su longitud puede estar recubriendo parte del área superficial de la nanopartícula. Esto da como resultado una estructura tridimensional en la cual una nanopartícula puede estar recubierta por varias cadenas que contienen ascorbato de glucosamina y esto permite la formación de una micela.

Las soluciones acuosas coloidales finales obtenidas del complejo funcionalizado presentan una gran estabilidad y no se observó ninguna precipitación de los componentes.

Este tipo de complejos pueden tener gran utilidad como coadyuvantes para la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos, dada la capacidad de actuación del quitosán como andamio en la recuperación de tejido y el efecto biocida de las nanopartículas utilizadas.

Recomendaciones

Se recomienda continuar dos líneas de investigación con los complejos de quitosán ácido ascórbico funcionalizados con nanopartículas de plata, oro y cobre.

Una de estas líneas deberá estar enfocada en dilucidar la estructura dimensional que forman estos complejos y la optimización de los grupos funcionales libres con respecto a la adición de una concentración mayor de nanopartículas.

Otra segunda línea de investigación deberá estudiar los efectos en la piel desde una formulación cosmética como podría ser el poder despigmentador del complejo funcionalizado con nanopartículas de cobre y plata, tema que está ya siendo abordado por otra compañera del programa doctoral.

Dentro de esta misma línea también se debe estudiar el efecto de estos complejos en el tratamiento de enfermedades como el pie diabético, donde el efecto de andamiaje del quitosán puede contribuir al logro de resultados más rápidos en la regeneración de tejidos.

Bibliografía

1. A.J. Varma, S.V. Deshpande, J.F. Kennedy, Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, (2004) *Carbohydrate Polymers* 55, pp. 77–93.
2. Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, (2008) *Bioresource Technology*, 99(5), pp. 1359-1367.
3. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, Á. Functional characterization of chitin and chitosan, (2009) *Current Chemical Biology*, 3(2), pp. 203-230
4. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization (2001) *Polymer*, 42 (8), pp. 3569-3580
5. Chen, R.-H., Domard, A., Muzzarelli, R.A.A., Tokura, S., Wang, D.-M. Advances in chitin/chitosan science and their applications (2011) *Carbohydrate Polymers*, 84(2), p. 695.
6. Chiancone A., Foladori, G. (2010). Las nanotecnologías en Uruguay. Red Latinoamericana de Nanotecnología y Sociedad (ReLANS), Universidad de la República, Comisión Sectorial de Extensión y Actividades en el Medio (CSEAM), 2010.
7. Chiancone, A; Chimuris, R.; & Garrido Luzardo, L. (2008). La nanotecnología en el Uruguay. En: Foladori, G., e Invernizzi, N. (Org.). Las Nanotecnologías en América Latina. México D.F.: Miguel Angel Porrúa, 125-145.

8. Cho, Y., Kim, J.T., Park, H.J. Size-controlled self-aggregated N-acyl chitosan nanoparticles as a vitamin C carrier (2012) *Carbohydrate Polymers*, 88(3), pp. 1087-1092.
9. Cho, Y., Shi, R., Borgens, R.B. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury, (2010) *Journal of Experimental Biology*, 213 (9), pp. 1513-1520.
10. Croisier, F., Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, (2013) *European Polymer Journal*, 49 (4), pp. 780-792.
11. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial (2012) *Carbohydrate Polymers*, 87 (2), pp. 995-1012.
12. Davey, M.W., van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. and Fletcher, J. (2000). Plant l-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability, and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80, 825–860.
13. Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvão, M.R., Rocha, J. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, (2002) *International Journal of Biological Macromolecules*, 31 (1-3), pp. 1-8.
14. Fennema, O. R., 1993. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. España.
15. Goldstein, J., Newbury, D. E., Joy, D. C., Lyman, C. E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L. C., Michael, J. R. (2003), "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis", Springer, New York, NY.

16. González-Fernández, A., Olmedo, M. P., Fernández, T. L., Vázquez, R. S., & Freitas, B. D. Nanotecnología y sistema inmunitario.
17. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Smilowitz, H.M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice (2004) *Physics in Medicine and Biology*, 49(18), pp. N309-N315
18. Han, W.-K., Choi, J.-W., Hwang, G.-H., Hong, S.-J., Lee, J.-S., Kang, S.-G. Fabrication of Cu nano particles by direct electrochemical reduction from CuO nanoparticles , (2006) *Applied Surface Science*, 252 (8), pp. 2832-2838.
19. Hiraku Onishi, Yoshiharu Machida, Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice, (1999) *Biomaterials* 20 , pp. 175-182.
20. Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S.V., Tamura, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review, (2010) *Carbohydrate Polymers*, 82 (2), pp. 227-232.
21. JEOL (2006), "A guide to scanning electron microscope", JEOL, USA. Peabody, MA.
22. Kasaai, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, (2008) *Carbohydrate Polymers*, 71(4), pp. 497-508
23. Kasaai, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, (2008) *Carbohydrate Polymers*, 71 (4), pp. 497-508.
24. Katsutoshi Inoue, Kazuharu Yoshizuka, Keisuke Ohto, Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan, (1999) *Analytica Chimica Acta* 388, pp 209-218.

25. Kay, L. & Shapira, P. (2008). Developing Nanotechnology in Latin America. *Journal of Nanoparticle Research*, 11: 259-278.
26. Kelly, K.L., Coronado, E., Zhao, L.L., Schatz, G.C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment, (2003) *Journal of Physical Chemistry B*, 107 (3), pp. 668-677.
27. Khan, T.A., Peh, K.K., Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods, (2002) *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), pp. 205-212.
28. Khan, Z., Singh, T., Hussain, J.I., Hashmi, A.A., Au(III)-CTAB reduction by ascorbic acid: Preparation and characterization of gold nanoparticles, (2013) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, pp. 11-17.
29. Khan, Z., Al-Thabaiti, S.A., Obaid, A.Y., Al-Youbi, A.O. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method, (2011) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82 (2), pp. 513-517.
30. Khor, E., Lim, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan, (2003) *Biomaterials*, 24 (13), pp. 2339-2349.
31. Kleekayai, T., Suntornsuk, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste (2011) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (5), pp. 1145-1154.
32. Koide, S.S. Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks, (1998) *Nutrition Research*, 18 (6), pp. 1091-1101.

33. Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, (2004) *Chemical Reviews*, 104(12), pp. 6017-6084.
34. Kumar, S., Kumari, M., Dutta, P.K., Koh, J. Chitosan biopolymer schiff base: Preparation, characterization, optical, and antibacterial activity, (2014) *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63(4), pp. 173-177.
35. Kumirska, J., Czerwicka, M. Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan, (2010) *Marine Drugs*, 8 (5), pp. 1567-1636
36. Kurita, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans, (2006) *Marine Biotechnology*, 8 (3), pp. 203-226
37. L. Vargas, Corrosión atmosférica de la plata de uso en la industria electrónica en ambientes con bajas concentraciones de sulfuros. Tesis Doctoral, Mexicali, B.C., 2009.
38. Lazo G, Abal A, Lazo S, Durso G, Belloni F, Ivanov M., Tanevich A, Pazos F, Perez, Cagliada N, "Alteraciones de las varillas del esmalte ante la aplicación de ácidos fosfórico, axálico y maleico al SEM", Facultad de Odontología - UNLP – Argentina.
39. Li, C.-C., Chang, S.-J., Su, F.-J., Lin, S.-W., Chou, Y.-C. Effects of capping agents on the dispersion of silver nanoparticles, (2013) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 419, pp. 209-215
40. Lim, Z.-Z.J., Li, J.-E.J., Ng, C.-T., Yung, L.-Y.L., Bay, B.-H. Gold nanoparticles in cancer therapy, (2011) *Acta Pharmacologica Sinica*, 32 (8), pp. 983-990.

41. Liu, H., Xiang, B., Qu, L. Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy, (2006) *Journal of Molecular Structure*, 794(1-3), pp. 12-17.
42. M. Monier, D.M. Ayad, Y. Wei, A.A. Sarhan, Adsorption of Cu(II), Co(II), and Ni(II) ions by modified magnetic chitosan chelating resin, *Journal of Hazardous Materials*, (2010) Volume 177, Issues 1–3, pp. 962–970
43. Madhusudhan, A., Reddy, G.B., Venkatesham, M., Hu, A., Singh, S.S., Efficient pH dependent drug delivery to target cancer cells by gold nanoparticles capped with carboxymethyl chitosan Year the Document was Publish 2014 Source of the Document *International Journal of Molecular Sciences*
44. Malette, W.G., Quigley, H.J., Gaines, R.D., Johnson, N.D., Rainer, W.G. Chitosan: A new hemostatic, (1983) *Annals of Thoracic Surgery*, 36 (1), pp. 55-59.
45. Marc Lavertu, Stephane Méthot, Nicolas Tran-Khanh, Michael D. Buschmann, High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation, (2006) *Biomaterials* 27, pp. 4815–4824.
46. Mathews, C. K., 2003. Bioquímica. 3ª. Edición. Ed. Prentice Hall. España.
47. Mazur, A. y Harrow, B., 1973. Bioquímica Básica. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.
48. Melo, R. V. y Cuamatzi, T. O., 2007. Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverté Ediciones, S.A. de C.V. México.

49. Morrison, T. M. y Boyd, R. N., 1976. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México.
50. Mourya, V.K. Inamdar, N.N., Tiwari, A. Carboxymethyl chitosan and its applications (2010) *Advanced Materials Letters*, 1 (1), pp. 11-33
51. Mourya, V.K., Inamdar, N.N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, (2008) *Reactive and Functional Polymers*, 68(6), pp. 1013-1051.
52. Murugadoss, A., Pasricha, R., Chattopadhyay, A. Ascorbic acid as a mediator and template for assembling metallic nanoparticles, (2007) *Journal of Colloid and Interface Science*, 311(1), pp. 303-310
53. Muzzarelli, R.A.A. Chitin and its derivatives: New trends of applied research, (1983) *Carbohydrate Polymers*, 3(1), pp. 53-75.
54. Muzzarelli, R.A.A. Colorimetric determination of chitosan, (1998) *Analytical Biochemistry*, 260(2), pp. 255-257.
55. O. Lundvall, M. Gulppi, M.A. Paez , E. Gonzalez, J.H. Zagal, J. Pavez , G.E. Thompson, Copper modified chitosan for protection of AA-2024, (2007) *Surface & Coatings Technology* 201, pp. 5973–5978.
56. Osborn, H. M. I. y Khan, T. K., 2000. Oligosaccharides: Their synthesis and biological roles. Oxford University Press. United States
57. Patra, C.R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., Mukherjee, P. Application of gold nanoparticles for targeted therapy in cancer, (2008) *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4 (2), pp. 99-132

58. Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides, (2006) *Carbohydrate Polymers*, 64(1), pp. 98-103
59. Percot, A., Viton, C., Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells, (2003) *Biomacromolecules*, 4 (1), pp. 12-18
60. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, (2009) *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), pp. 641-678.
61. Ping Ding, Ke-Long Huang, Gui-Yin Li, Wen-Wen Zeng, Mechanisms and kinetics of chelating reaction between novel chitosan derivatives and Zn(II), (2007) *Journal of Hazardous Materials* 146, pp. 58–64.
62. Ping Ding, Ke-Long Huang*, Gui-Yin Li, Yan-Fei Liu, Wen-Wen Zeng, Kinetics of adsorption of Zn(II) ion on chitosan derivatives, (2006) *International Journal of Biological Macromolecules* 39, pp. 222–227.
63. Reicha, F.M., Sarhan, A., Abdel-Hamid, M.I., El-Sherbiny, I.M. Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method, (2012) *Carbohydrate Polymers*, 89 (1), pp. 236-244.
64. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications (2006) *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31 (7), pp. 603-632.
65. -Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications, (2006) *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), pp. 603-632.

- 66.S. Kiyota Cazares Estudio del comportamiento frente a la corrosión de recubrimientos base cerio aplicados sobre aleación de aluminio 6061, Tesis Doctoral, Mexicali, B.C., 2011.
- 67.Sadeghi, B., Meskinfam, M. A direct comparison of nanosilver particles and nanosilver plates for the oxidation of ascorbic acid, (2012) *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 97, pp. 326-328.
- 68.Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P.V.D., Ghosh, S.S., Chattopadhyay, A. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite, (2008) *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2), pp. 142-146.
- 69.Shi, X., Li, X., Du, Y. Recent progress of chitin-based materials, (2011) *Acta Polymerica Sinica*, (1), pp. 1-11.
- 70.Tessy María López Goerme, Nanotecnología y nanomedicina: la ciencia del futuro... hoy, Arkhé, 2011. ISBN:6077781207, 9786077781202
- 71.Tian Xiaolin, Tian Dafeng, Wang Zhongyan, Mo Fengkui, Synthesis and Evaluation of Chitosan-Vitamin C Complexes, (2009)*Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 114, 2986–2991.
- 72.Tian, X.L., Tian, D.F., Wang, Z.Y., Mo, F.K. Synthesis and evaluation of chitosan-Vitamin C complex , (2009) *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71 (4), pp. 371-376.
- 73.Tran, D.L., Pham, G.D., Nguyen, X.P., Vu, D.H., Nguyen, N.T., Tran, V.H., Mai, T.T.T., Ba, T.C., Some biomedical applications of chitosan-based hybrid nanomaterials. (2011), *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2 (4), art. no. 045004.

74. Tze-Wen Chung, Min-Chia Yang, Wei-Jean Tsai, A fibrin encapsulated liposomes-in-chitosan matrix (FLCM) for delivering water-soluble drugs Influences of the surface properties of liposomes and the crosslinked fibrin network, (2006) *International Journal of Pharmaceutics* 311, pp. 122–129.
75. Usman, M.S., Ibrahim, N.A., Shameli, K., Zainuddin, N., Yunus, W.M.Z.W. Copper nanoparticles mediated by chitosan: Synthesis and characterization via chemical methods, (2012) *Molecules*, 17 (12), pp. 14928-14936.
76. Valodkar, M., Modi, S., Pal, A., Thakore, S. Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu-Ag alloy nanoparticles: A green approach, (2011) *Materials Research Bulletin*, 46 (3), pp. 384-389.
77. Van De Velde, K., Kiekens, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state¹³C NMR, (2004) *Carbohydrate Polymers*, 58(4), pp. 409-416.
78. Vanderlinde, W. (2004), “Energy dispersive X-ray analysis”, EDFAS (Ed.), Microelectronics failure analysis, ASM International, Cleveland, OH., p.p. 628-639.
79. Varawut Tangpasuthadol, Noppong Pongchaisirikul, Vipavee P. Hoven, Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein adsorption, (2003) *Carbohydrate Research* 338, pp. 937–942.
80. Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., Ma, X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity, (2009) *Carbohydrate Research*, 344 (17), pp. 2375-2382
81. X.Z. Shu, K.J. Zhu, The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release,

- (2002) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54, pp. 235–243.
82. Xianzeng Ye, Qinghua Yang, Yan Wang, Nanqiang Li, Electrochemical behaviour of gold, silver, platinum and palladium on the glassy carbon electrode modified by chitosan, and its application, (1998) *Talanta* 47, pp. 1099–1106.
83. Xiaolin, T., Dafeng, T., Zhongyan, W., Fengkui, M. Synthesis and evaluation of chitosan-vitamin C complexes, (2009) *Journal of Applied Polymer Science*, 114 (5), pp. 2986-2991.
84. Xin-Yuan Shi, Tian-Wei Tan, Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2, (2002) *Biomaterials* 23, pp. 4469–4473.
85. Xiong, J., Wu, X.-D., Xue, Q.-J. One-step route for the synthesis of monodisperse aliphatic amine-stabilized silver nanoparticles, (2013) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 423, pp. 89-97.
86. Yang Yang, Qiang He, Li Duan, Yue Cui, Junbai Li, Assembled alginate/chitosan nanotubes for biological application, (2007) *Biomaterials* 28, pp. 3083–3090.
87. Yohannan Panicker, C., Tresa Varghese, H., Philip, D. FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of Vitamin C (2006) *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(3-4).
88. Yuan Hua, MengWang, DuoWang, Xueli Gao, Congjie Gao, Feasibility study on surface modification of cation exchange membranes by quaternized chitosan for improving its selectivity, (2008) *Journal of Membrane Science* 319, pp. 5–9.

89. Zhao, Y., Park, R.-D., Muzzarelli, R.A.A. Chitin deacetylases: Properties and applications, (2010) *Marine Drugs*, 8(1), pp. 24-46
90. Zheng Cui, Yan Xiang, Jiangju Si, Meng Yang, Qi Zhang, Tao Zhang, Ionic Interactions between sulfuric acid and chitosan membranes, (2008) *Carbohydrate Polymers*, Vol. 73 (1), pp. 111-116.
91. Zhetcheva, V.D.K., Pavlova, L.P. Synthesis and spectral characterization of a decavanadate/chitosan complex (2011) *Turkish Journal of Chemistry*, 35 (2), pp. 215-223.
92. Zoldners, J., Kiseleva, T., Kaiminsh, I. Influence of ascorbic acid on the stability of chitosan solutions (2005) *Carbohydrate Polymers*, 60(2), pp. 215-218.

